

## · 简 报 ·

## 用光生物素标记 DNA 探针鉴定军团菌种

唐英春 张扣兴 龙伟潮 张天托 廖适生

**关键词** 光生物素; 分子杂交; 军团菌**中图分类号** L378.4

DNA探针过去多用同位素标记,但半衰期短,价格昂贵,且防护和操作困难,故应用受限。近年来非同位素标记探针大量应用,结果十分理想<sup>[1]</sup>。作者用光生物素标记 DNA 探针的方法,对本室保存的标准军团菌种进行了鉴定。对从环境中分离培养到的形态疑似军团菌的菌落亦进行了鉴定。

**材 料 和 方 法**

**试剂** 光生物素液,包被有25个标准军团菌种单链 DNA 的微小反应板及部分试剂由日本长崎大学医学部惠赠。其余试剂为国产自配。

**菌种** 包括 *Legionella pneumophila* 等30株细菌,其中17株来源于美国疾病控制中心(CDC),3株为本室分离,10株为临床分离标本。

**细菌DNA提取** 参照Ezaki等的方法<sup>[2]</sup>。

**DNA光生物素标记** 参照Forster等的方法<sup>[3]</sup>。

**DNA杂交检测** 将标记的单链 DNA 与3 ml杂交液混匀,加入包被有标准菌种DNA的微小反应板中,每孔100 $\mu$ l,用胶膜封盖,置恒温箱50 $^{\circ}$ C反应90min。取出弃杂交液,每孔用400 $\mu$ l 2 $\times$ SSC液冲洗3次,然后各孔再加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶液100 $\mu$ l,置恒温箱37 $^{\circ}$ C 10min,弃酶液,用2 $\times$ SSC液冲洗3次,再加过氧化物酶显色液置恒温箱37 $^{\circ}$ C,30min观察结果。

**空调水分离军团菌** 方法参照<sup>[4]</sup>。

**结 果**

30min内被检的军团菌种,在微小反应板的对应孔里均出现肉眼可见的蓝色。其中CDC提供的 *Legionella micdadei*,不但在对应孔显色,在 *Legionella Spiritensis* 亦显浅蓝色。后者消失较快。空调水中分离的5个疑似军团菌的菌落,标准血清诊断法出现了1例假阳性的结果,而DNA探针法则未出现假阳性和假阴性。

**讨 论**

军团菌属从1977年正式命名以来,到现在已发现了26个种43个血清型<sup>[5]</sup>。它们的培养特性和理化性质大部分是相同的,但致病性有很大的不同,可引起肺炎,包括很多难治性肺炎,亦有对人非致病的。致病菌对抗生素的敏感性与其他菌属亦不同。长期以来主要是根据它们的一般特性及血清学方法来鉴定,此方法有假阳性和假阴性存在<sup>[6]</sup>,还有很多从环境中分离的军团菌不能得到鉴定。

近年来,根据DNA-DNA同源性对军团菌种进行了生物化学鉴定和分类<sup>[7]</sup>。国外已用同位素标记DNA探针法检测军团菌种。因探针是用同位素标记的,不易在大多数临床实验室应用。本文所用方法,综合实验结果作者认为有如下优点:①能避免血清学方法鉴定时出现交叉反应的弊端,从而减少假阳性和假阴性的结果;②可快速鉴定每一个军团菌种;③结果判断简单明瞭;④适用于一般临床实验室,有利于推广应用。实验中 *Legionella micdadei* 在 *Legionella Spiritensis* 孔亦出现浅蓝色,可能是因为两个军团菌种DNA同源性达到57%~67%<sup>[7]</sup>。作者体会,一个标本同时两个孔中显色,判断结果时应以颜色明显,消失时间慢者为阳性结果;实验时要严格按照实验条件特别是杂交和洗膜时的温度要恒定、准确。

**参 考 文 献**

1. Langer PR, et al. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:6633
2. Ezaki T, et al. Transfer of *peptococcus indolicus*, *peptococcus asaccharolyticus*, *peptococcus prevotii*, and *peptococcus magnus* to the genus *peptostreptococcus* and proposal of *peptostreptococcus tetradius* Sp. nov.

Int J Syst Bacteriol 1983;33:683

3. Forster AC, et al. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. Nucleic Acids Res 1985;13:745

4. 唐英春, 等. 中国广州市内ホテルの Cooling tower から検出された *Legionella pneumophila* の分離状況とその細菌学的性状. 感染症学杂志 1985;59(8):787

5. Benson RF, et al. *Legionella qujnlivanti* SP. nov. Isolated from water. Curr Microbiol 1989;18:195

6. Orrison LH, et al. Determination of antigenic relationships among Legionellae and non-legionellae by direct fluorescent antibody and immunodiffusion test. J Clin Microbiol 1983;17:332

7. Brenner DJ, et al. Ten New Species of Legionellae. Int J Syst Bacteriol 1985;35:50

(1991-03-01收稿 1992-04-10修回)



## 淋巴显微外科手术的实验和临床研究

课题负责 朱家恺

(附属第一医院显微外科)

四肢淋巴水肿和乳糜尿的病人是由于先天或后天性淋巴道阻塞引起淋巴回流障碍造成肢体水肿或淋巴液流入泌尿道形成乳糜尿。多累及青壮年劳动者,严重影响劳动力。过去由于淋巴管管径小,管壁薄,无法手术方法去除病因,引流淋巴液,只用切除或堵塞方法去治疗,复发率高。作者多年来对淋巴显微外科进行深入研究,引进国外技术加以改良,在国内首次取得淋巴管静脉吻合术成功。其特点是按肢体皮下主要静脉解剖部位,找寻集合淋巴管,并将肢体分成2~4段,分别在各段的远侧皮内注射活性染料和找集合淋巴管接上局部的小静脉。采用部分切开缝合法处理淋巴管;自制一套辅助手术器械,如对抗器、扩张器,减少损伤、提高效率;并首创用深淋巴管与静脉吻合手术,其位置恒定、口径较粗,容易取得良好效果;还在国内首先报告用健侧淋巴管移植代替用肢体原已损害淋巴管,使消肿率提高。该成果还收集不少人的集合淋巴管的标本资料进行研究,首次提出人的集合淋巴管有较厚的平滑肌,部分肌束突入管腔内成肉柱,为淋巴管自发性节律性收缩的物质基础,成为推动淋巴流动的内在动力,并不像一般认为集合淋巴管壁很薄,很少平滑肌,推动淋巴流动靠外力作用;同时提出病人的巨噬细胞的吞噬功能低落,可能是反复感染或复发的重要原因。应用淋巴管静脉吻合术治疗淋巴系统疾病已被国内外同行普遍重视和应用,可解放一批劳动力并取得明显社会效益。该成果获1992年广东省科技进步二等奖。

(冯世容)