

# 地高辛素、生物素标记产毒性大肠杆菌 I 型不耐热肠毒素ADN 探针的制备及应用

曹 伟\* 彭文伟 谢彦博

( 传染病学教研室 )

余守义 黄君健 陈忠义

( 第一军医大学 )

**提 要** 采用随机引物法制备地高辛素、生物素和  $^{32}\text{P}$  标记产毒性大肠杆菌 I 型不耐热肠毒素 (LT<sub>I</sub>) DNA 探针。地高辛素、生物素和  $^{32}\text{P}$  LT<sub>I</sub> 探针分别在 DNA 斑点杂交试验中检测到 0.1pg、1pg 和 0.1pg 的质粒 DNA, 在菌落原位杂交试验中检测到 12、120 和 12 个细菌/ml, 在粪便斑点杂交试验中检测到 24、240 和 24 个细菌/ml。采用 RNA 酶 A 和 蛋白酶 K 消化处理滤膜, 消除了假阳性, 使得地高辛素、生物素 LT<sub>I</sub> 探针的特异性与  $^{32}\text{P}$  LT<sub>I</sub> 探针完全一致。检测 143 株自腹泻病人分离的大肠杆菌, 14 株 (9.79%) 阳性, 3 种探针结果相同。

**关键词** 地高辛素 生物素 探针 肠毒素

核酸杂交技术已逐渐成为微生物感染、癌症和遗传病的临床诊断及流行病学调查的一种有力工具, 具有特异性强、敏感性高、相对快速及同时检测许多标本的优点。目前所用探针多采用同位素标记。然而, 同位素半衰期短、价昂和同位素处理等问题限制了这一技术在临床和流行病学调查的常规应用。目前人们正致力于研制非同位素探针。我们采用随机引物法制备了地高辛素(digoxigenin)、生物素(biotin)和  $^{32}\text{P}$  标记产毒性大肠杆菌 I 型不耐热肠毒素(LT<sub>I</sub>) DNA 探针。对影响地高辛素和生物素探针杂交试验敏感性和特异性的因素进行了系统研究, 比较了地高辛素探针和生物素探针的特点, 成功地进行了地高辛素、生物素 LT<sub>I</sub> 探针的 DNA 斑点杂交、菌落原位杂交和粪便斑点杂交试验。

## 材 料 和 方 法

**菌 株** 含重组质粒 EWD<sub>200</sub> 菌株由 S.

Falkow 教授赠送。标准 ETEC 野生株 H<sub>10407</sub>、E<sub>2403</sub>、T<sub>118</sub>、M<sub>421</sub> 由 Man, H. Ng 教授赠送。143 株大肠杆菌自腹泻病人分离到。其余的菌株为本实验室保存菌种。

**试 剂** Hind III、地高辛素标记、检测盒购自 Boehringer Mannheim; 生物素-T-dATP、随机引物 DAN 标记盒、生物素检测系统购自 BRL;  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP 购自 Amersham。硝酸纤维素滤膜购自 S&S。

**质粒提取** 碱性法裂解细菌<sup>[1]</sup>, 用酚、氯仿抽提代替氯代铯密度梯度离心并用 RNA 酶 A 去除 RNA。

**LT<sub>I</sub>-DNA-Hind III 酶切片段的制备** 按产品说明书将纯化的质粒 EWD<sub>200</sub> 用 Hind III 消化。1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳后, 用 NACS-PREPAC<sup>TM</sup> 层析柱(BRL) 回收 0.8kb 的 LT<sub>I</sub> DNA 片段。

**DNA 探针的标记** 按随机引物法产品说明书制备地高辛素、生物素和  $^{32}\text{P}$  标记 LT<sub>I</sub> DNA 探针。 $^{32}\text{P}$  LT<sub>I</sub> 探针的比放射性强度为  $1.6 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ 。

**DNA 杂交滤膜的准备** ① DNA 斑点杂交

\* 研究生, 现在江苏省南通医学院传染病学教研室工作

滤膜：将质粒样品热变性后点膜、80℃烘烤2小时；②菌落原位杂交滤膜<sup>[2]</sup>；③粪便斑点杂交滤膜<sup>[3]</sup>。上述所有滤膜在80℃烤2小时后，凡用于地高辛素、生物素探针杂交的滤膜须经过下述方法处理。滤膜浸于TE(pH8.0) 2×5分钟；RNA酶A消化；TE、TES(10mM Tris-HCl pH7.8-5mM EDTA-0.5%SDS)各洗涤2分钟；蛋白酶K消化；TES洗涤2×5分钟，2×SSC洗涤5分钟。凉干备用。

**DNA杂交** ①<sup>32</sup>P LT<sub>I</sub> 探针杂交参照Hames方法<sup>[4]</sup>。50%甲酰胺溶液中37℃预杂交3小时、杂交12小时，杂交液中探针浓度为1.6×10<sup>6</sup>cpm/ml，放射自显影72小时观察结果。②生物素 LT<sub>I</sub> 探针杂交参照谢彦博<sup>[5]</sup>方法并加以改良。杂交液中探针浓度为0.2μg/ml，杂交4小时。③地高辛素 LT<sub>I</sub> 探针按照产品说明书进行操作。预杂交液中封闭剂浓度改为2.5%，杂交液中探针浓度为0.2μg/ml，杂交4小时。生物素探针和地高辛素探针杂交后显色4小时。

## 结 果

**地高辛素、生物素 LT<sub>I</sub> 探针的特异性**  
在 DNA 斑点杂交试验、菌落原位杂交试验和粪便斑点杂交试验中，地高辛素、生物素 LT<sub>I</sub> 探针的特异性与 <sup>32</sup>P LT<sub>I</sub> 探针相同(图1~3)。

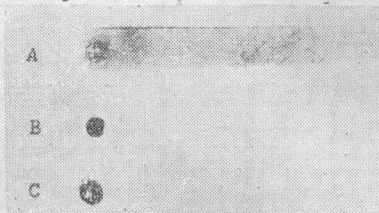


图1 LT-探针特异性鉴定 I (DNA 斑点杂交试验)

△点样顺序(从左→右) EWD<sub>299</sub>(LT<sub>I</sub><sup>+</sup>)、PBR<sub>322</sub>、PBR<sub>322</sub>、PAM<sub>6</sub> (HB $\bar{\nu}$ -DNA)、PRIT<sub>10036</sub>(ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>)、pSLM<sub>006</sub>(ST<sub>Ib</sub><sup>+</sup>)、pCHL<sub>6</sub> (ST<sub>I</sub><sup>+</sup>)、小牛胸腺DNA、小牛血清白蛋白、10:1TE (pH8.0)

- △△A. <sup>32</sup>P探针杂交
- B. 地高辛素探针杂交
- C. 生物素探针杂交

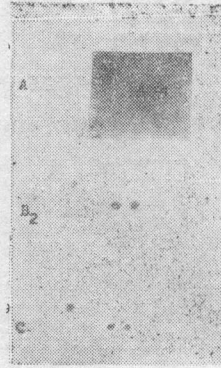


图2 LT<sub>I</sub>探针特异性鉴定 I (菌落原位杂交试验)

△菌株点样顺序(从左→右、从上→下) EWD<sub>299</sub>(LT<sub>I</sub><sup>+</sup>)、E. coli C<sub>600</sub> (无质粒)、E. coli C<sub>600</sub> (pBR<sub>322</sub>)、pRIT<sub>10036</sub> (ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>)、pSLM<sub>004</sub> (ST<sub>Ib</sub><sup>+</sup>)、pCHL<sub>6</sub> (ST<sub>I</sub><sup>+</sup>)、枯草杆菌 (pGAT<sub>6</sub>)、H<sub>10407</sub>(LT<sub>Ia</sub><sup>+</sup>、ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>、ST<sub>Ib</sub><sup>+</sup>)、E<sub>2403</sub>(LT<sub>I</sub><sup>+</sup>)、T<sub>118</sub> (ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>)、M<sub>421</sub>(ST<sub>Ib</sub><sup>+</sup>)、E. coli C<sub>600</sub> (带CT基因的重组质粒)、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、金葡菌、白葡菌、变形杆菌

- △△A. <sup>32</sup>P探针杂交
- B. 地高辛素探针杂交
- C. 生物素探针杂交



图3 LT<sub>I</sub> 探针特异性鉴定 II (粪便斑点杂交试验)

△混有待检菌株的粪便悬液点样顺序(从左→右) EWD<sub>299</sub>(LT<sub>I</sub><sup>+</sup>)、E. coli C<sub>600</sub>(无质粒)、E. coli C<sub>600</sub> (pBR<sub>322</sub>)、H<sub>10407</sub> (LT<sub>I</sub><sup>+</sup>、ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>、ST<sub>Ib</sub><sup>+</sup>)、E<sub>2403</sub>(LT<sub>I</sub><sup>+</sup>)、T<sub>118</sub>(ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>)、M<sub>42</sub>(ST<sub>Ia</sub><sup>+</sup>)、LB 液体培养基粪便混悬液

- △△A. <sup>32</sup>P探针杂交
- B. 地高辛素探针杂交
- C. 生物素探针杂交

**地高辛素、生物素 LT<sub>I</sub> 探针的敏感性**  
在 DNA 斑点杂交试验、菌落原位杂交试验和粪便斑点杂交试验中,地高辛素、生物素、<sup>32</sup>P LT<sub>I</sub> 探针分别可检测到 0.1pg、1pg、0.1pg 12、120、12 个细菌/ml, 24、240、24 个细菌/ml (图4~6)。

**应用** 用 3 种探针检测 143 株自腹泻病人分离的大肠杆菌, 14 株阳性。阳性率为 9.79%。3 种探针的杂交结果完全一致。

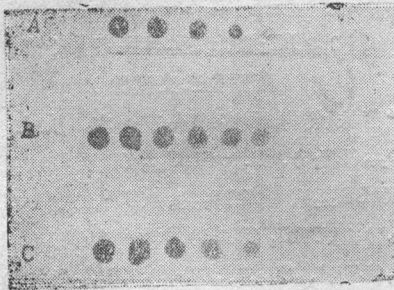


图 4 LT<sub>I</sub> 探针敏感性鉴定 I  
(DNA 斑点杂交试验)

<sup>Δ</sup>EWD<sub>299</sub>点样顺序 (从左→右) 10ng、1ng、100pg、10pg、1pg、100fg、10fg

- <sup>ΔΔ</sup>A. <sup>32</sup>P 探针杂交 (放射自显影72小时)
- B. 地高辛素探针杂交 (显色 4 小时)
- C. 生物素探针杂交 (显色 4 小时)

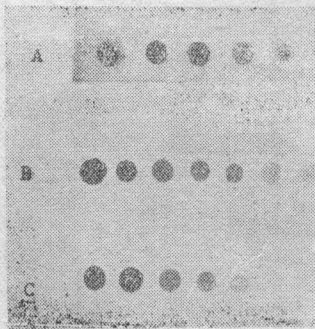


图 5 LT<sub>I</sub> 探针敏感性鉴定 II  
(菌落原位杂交试验)

<sup>Δ</sup>细菌 (EWD<sub>299</sub>) 悬液系列稀释 (个细菌/ml) 点样顺序 (从左→右) 1.2×10<sup>7</sup>、1.2×10<sup>6</sup>、1.2×10<sup>5</sup>、1.2×10<sup>4</sup>、1.2×10<sup>3</sup>、1.2×10<sup>2</sup>、1.2×10<sup>1</sup>、1.2×10<sup>0</sup>

- <sup>ΔΔ</sup>A. <sup>32</sup>P 探针杂交 (放射自显影72小时)
- B. 地高辛素探针杂交 (显色 4 小时)
- C. 生物素探针杂交 (显色 4 小时)

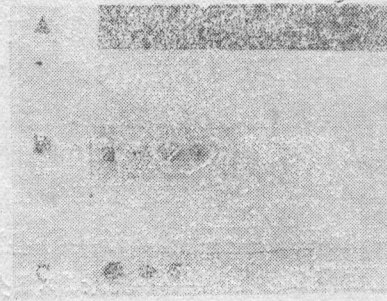


图 6 LT<sub>I</sub> 探针敏感性鉴定 III  
(粪便斑点杂交试验)

<sup>Δ</sup>系列稀释细菌悬液与粪便混匀液 (个细菌/ml) 点样顺序 (从左→右) 2.4×10<sup>4</sup>、2.4×10<sup>3</sup>、2.4×10<sup>2</sup>、2.4×10<sup>1</sup>、2.4×10<sup>0</sup>、点样点6-8

- <sup>ΔΔ</sup>A. <sup>32</sup>P 探针杂交 (放射自显影72小时)
- B. 地高辛素探针杂交 (显色 4 小时)
- C. 生物素探针杂交 (显色 4 小时)

## 讨 论

地高辛素是最新研制的一种非同位素标记物。它是一种甾族半抗原化合物,借助一交联臂连接到 dUTP 上。带有地高辛素标记的 dUTP 可作为酶的底物掺入 DNA 从而合成地高辛素标记 DNA 探针。在与靶 DNA 杂交后利用抗地高辛素抗体-碱性磷酸酶结合物进行酶联免疫试验检测。目前地高辛素标记探针的研究刚开始<sup>[6]</sup>, 尚未见用于细菌学诊断的报道。

经 RNA 酶 A 和蛋白酶 K 消化处理的粗质粒点样硝酸纤维素滤膜用于地高辛素 LT<sub>I</sub> 探针杂交, 结果不理想; 仅用或不用蛋白酶 K 消化, 结果不理想。分别将游离的地高辛素 dUTP、抗地高辛素抗体-碱性磷酸酶结合物、显色剂与经 RNA 酶 A、蛋白酶 K 消化的点样滤膜进行反应, 无显色点出现, 说明假阳性的出现, 与地高辛素标记物本身及其检测系统无关; 而与样品自身残留的 RNA 和蛋白有关。在生物素标记探针杂交试验中亦有类似于上述情况的发生。这是因为, 亲和素对滤膜及样本中目的顺序以外的成份非特异性吸附结合。用链霉亲和素代替亲和素可减少非特异性吸附<sup>[7,8]</sup>, 但

仍会与待测分子伴存的某些糖蛋白以及生物素类似物(可能是一些 tRNA 的修饰碱基)产生亲和作用。此外样本中还可能存在内源性生物素(结合在丙酮酸羧化酶和乙酰辅酶 A 羧化酶等上)。因此,完全去除蛋白和 RNA 是保证生物素标记探针杂交试验特异性的前提<sup>[9]</sup>。据此可以推测,地高辛素在某些性质方面类似于生物素。在地高辛素、生物素 LT<sub>1</sub> 探针菌落原位杂交、粪便斑点杂交试验时尤其应注意充分的 RNA 酶 A 和蛋白酶 K 消化,方能保证满意的结果。仅用蛋白酶 K 消化的滤膜进行杂交,结果不理想。这与 Kumar 的报道相同<sup>[10]</sup>,而与 Sethabutr 的报道相反<sup>[11]</sup>。个中原因值得进一步探讨。

随机引物法(random priming)是近年来发展的一种有效的探针标记新方法<sup>[12,13]</sup>。本实验采用随机引物法标记探针。<sup>32</sup>P-LT<sub>1</sub> 探针的比放射性强度为  $1.6 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g、杂交后放射自显影 72 小时可检测到 0.1pg EWD<sub>200</sub> 质粒 DNA。因此本实验所用 <sup>32</sup>P 探针作为非同位素探针的对照是有效、可行的。生物素 LT<sub>1</sub> 探针杂交后显色 4 小时可检测到 1pg EWD<sub>200</sub>, 敏感性比 <sup>32</sup>P 探针低 10 倍;显色超过 4 小时,本底明显增加影响结果观察。这些结果分别与文献报道相同<sup>[9,11]</sup>。地高辛素 LT<sub>1</sub> 探针杂交后显色 4 小时可检测到 0.1pg EWD<sub>200</sub>, 显色 24 小时可见到 0.01pg EWD<sub>200</sub> 点样处有显色点出现,而本底无明显增加。说明地高辛素标记探针具有非常高的敏感性。但从临床诊断的迅速、准确的角度出发,显色 4 小时的敏感度(0.1pg)已足以满足目前所有实验的要求,无需为追求过高的敏感性而延长显色时间。

本实验地高辛素、生物素探针敏感性之所以高,除与随机引物法的有效标记有关外,与提高杂交液中探针浓度亦有重大关系。我们将这两种探针提高到 0.2 $\mu$ g/ml,将杂交时间缩短至 4 小时,杂交后严格洗膜、取得令人满意的效果。

在地高辛素探针杂交时封闭剂的浓度对结果有影响,以预杂交液中 2.5%、杂交液和缓

冲液 II 中 0.5% 为最佳,而且耗费的封闭剂的量亦不大。地高辛素探针在水溶液 68℃ 和 45% 甲酰胺溶液 42℃ 条件下杂交结果一致;而生物素探针在 68℃ 水溶液条件下杂交本底高,影响结果观察。说明生物素标记探针在 68℃ 条件下不稳定,地高辛素标记探针的稳定性好。

在非同位素探针杂交试验中,我们比较了国产(北京化工学校附属工厂)和进口硝酸纤维素滤膜,二者结果一致。因此可用国产硝酸纤维素膜代替进口膜用于非同位素探针杂交。这为国内普遍使用非同位素探针提供了方便。进口尼龙膜用于地高辛素 LT<sub>1</sub> 探针杂交,本底显色较深,影响结果判断。这可能与该尼龙膜的批号有关。因缺乏其它批号的尼龙膜,未能验证。进口尼龙膜用于生物素探针杂交,结果理想。已杂交的尼龙膜用二甲基甲酰胺处理后可再次杂交,这为某些实验提供了便利。

地高辛素、生物素 LT<sub>1</sub> 探针敏感性等于或接近于 <sup>32</sup>PLT<sub>1</sub> 探针,三者特异性相同。尽管在地高辛素、生物素探针杂交时需要采用 RNA 酶 A 和蛋白酶 K 消化,但完成整个杂交的时间(从样品点膜到获得结果)仅需 20~30 小时,而完成 <sup>32</sup>P 探针杂交试验则需 4~5 天。地高辛素、生物素探针的高敏感性和高特异性、短时间可获得结果、性质稳定、无半衰期之弊、可长期保存、操作安全、无需防护等优点,使得地高辛素、生物素探针取代同位素探针成为可能。

本实验首次将地高辛素标记探针应用于细菌学诊断。其与生物素探针特异性相同,而敏感性高 10 倍,性质更稳定。因此选用非同位素探针时以地高辛探针为优。迄今,国内尚未有生物素标记 LT<sub>1</sub> 探针的研究报道。

产 LT<sub>1</sub> 的产毒性大肠杆菌是国内感染性腹泻的重要病原体。地高辛素、生物素 LT<sub>1</sub> 探针杂交技术的建立为全面了解其流行病学及临床诊断提供了一个有力的工具。

#### 参 考 文 献

- [1] Maniatis T, et al. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold

Spring Harbor. 1982:193~196.

- [2] 陈锦光, 李淑琴. 肠毒素性大肠杆菌 (ET-EC) 不耐热肠毒素 (LT) 基因探针的研制. 微生物学报 1985; 25(2):119.
- [3] 俞守义, 等. 热敏感肠毒素基因探针的制备及其特性的研究. 中华流行病学杂志 1986; 7(3):170.
- [4] Hames BD, Higgins SJ. Nucleic acid hybridisation. A practical approach. Oxford: IRL Press. 1985:200~210.
- [5] 谢彦博, 等. 生物素标记乙型肝炎病毒 DNA 探针的制备及应用. 中山医科大学学报 1987; 8(3):15.
- [6] Dooley S, et al. Rapid detection of DNA-binding factors using protein-blotting and digoxigenin-dUTP marked probes. Nucleic Acids Res 1988; 16(24):1839.
- [7] Forster AC, et al. Non-radioactive hybridization probes prepared by the clinical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. Nucleic Acids Res 1985; 13(1):745.
- [8] Mancelidis L, et al. High-resolution mapping of satellite DNA using biotinlabelled DNA probes. J Cell Biol 1982; 95(2):619.
- [9] Bialkowska-Hobrzanska H. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by dot blot hybridization with biotinylated DNA probes. J Clin Microbiol 1987; 25(2):338.
- [10] Kumar A, et al. Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase. Anal Biochem 1988; 169(2):376.
- [11] Sethabutr O, et al. A non-radioactive DNA probe to identify Shigella and enteroinvasive E. coli in stools of children with diarrhoea. Lancet 1985; I(8464):1095.
- [12] Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 1983;132(1):6.
- [13] Feinberg AP, Vogelstein B. Addendum. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 1984; 137(1):266.

## PREPARATION AND APPLICATION OF DIGOXIGENIN-LABELED AND BIOTINYLATED TYPE I HEAT-LABILE TOXIN

Cao Wei Peng Wenwei Xie Yanbo

(Sun Yat-Sen University of Medical Sciences)

Yu Shouyi Huang Junjian Cheng Yizhong

(The First Army University of Medical Sciences)

Type I heat-labile toxin(LT<sub>I</sub>) DNA probes were labeled with digoxigenin, biotin, and <sup>32</sup>P by random priming. Digoxigenin labeled, biotinylated, and <sup>32</sup>P LT<sub>I</sub> probe detected 0.1 pg, 1 pg, and 0.1 pg of EWD<sub>209</sub> DNA in DNA blot hybridization; 12, 120 and 12 bacteria per millilitre of normal saline in bacteria in situ hybridization; 24, 240, and 24 bacteria per millilitre of stool suspension in stool blot hybridization after exposure to indicator dyes for 4 hours or X-ray film for 72 hours. The treatment of nitrocellulose membrane filters with RNase A and proteinase K eliminated the possibility of false-positivity and made the specificity of digoxigenin labeled and biotinylated LT<sub>I</sub> probes as good as <sup>32</sup>P LT<sub>I</sub> probe. 9.79% (14/143) Escherichia coli from diarrheal patients were detected by these three probes.

Key words Digoxigenin Biotin Probe Enterotoxin