

用新法制备 K88ac 基因探针

张林元 邓小昭

(南京军区军事医学研究所,南京)

由于遗传工程技术的发展,基因探针被广泛应用。探针的 DNA 大都来自于大肠杆菌的重组质粒,这样制备的探针易污染该菌的染色体和载体 DNA,作菌落杂交时易出现假阳性。为了克服这些缺点,用枯草杆菌质粒作载体克隆 K88ac 基因的 *EcoRI* 小片段。以枯草杆菌重组质粒作探针,与含 K88ac 基因的菌株杂交呈阳性,而不含 K88ac 基因的菌株呈阴性,且阴阳性有明显区别。

材料和方法

(一) 细菌菌株与质粒

Bacillus subtilis 168, *Bacillus subtilis* 168 (pUB110) 来自中科院遗传所, *E. coli* RR1 (pNZ 8802) 本人工作^[1],野生株 K88⁺, K99⁺, 987P⁺, CFAI⁺, CFAII 等来自于兽药监察所,北京畜牧研究所和北京生物制品检定所。

(二) 质粒 DNA 的提取

用 0.4mol/L NaOH 变性法粗提质粒 DNA,再用 CsCl₂-EB 密度梯度离心纯化质粒 DNA^[2]。

(三) 基因克隆的方法

电泳及回收质粒方法按本人以前方法进行^[1]。用 *EcoRI* 酶消化 pNZ 8802 质粒 DNA,以低熔点琼脂糖回收 *EcoRI* 小片段,与用同种酶消化并用牛肠碱性磷酸单脂酶处理的 pUB110 连接,转化到枯草杆菌 168,筛选 K₈₈⁺ 的菌株,获得含 K88ac 小片段重组质粒 PNZ8803^[3]。

(四) 缺口翻译与 α³²P]dATP 的标记^[4]

DNaseI 的活化: DNaseI (华美生物公司) 配成 100mg/ml,于 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 5mmol/L MgCl₂ 中冰浴放置 1h。

缺口翻译: 1μg 的 DNA, 50 mmol/L Tris (pH 7.5), 5mmol/L MgCl₂, 10mmol/L 巯基乙醇, 10μg/ml 牛血清白蛋白, 75 μCi (7000 Ci/mmol) α³²PdATP(Amersham),加10μmoldCTP, 10 μmoldGTP, 10 μmoldGPP, 10 pg 的 DNaseI, 反

应体积 50μl,在 14℃ 经 1 分 30 秒,加 4u 的 DNA PolymeraseI,在 14℃ 放置 3h,加 0.25mol EDTA (pH 8.0) 中止反应。经 Sephadex 50 (medium) 小柱 (0.7 cm × 22 cm) 分管收集 (0.5ml/管),取在 LKB2215 型液体闪烁计上计数约为 10⁷cpm 者,并在 100℃ 煮 10 min 使 DNA 变性。

菌落原位杂交^[4]: 取灭菌的醋酸-硝酸纤维素滤膜 (北京化工学校),孔径 0.45μm,平铺于 LB 平板上,用灭菌牙签点种待检菌。经 37℃ 10 h,取出滤膜置于 0.5 mol/L NaOH 饱和的新华滤纸上,经 20min,膜移至 1mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 mol/L NaCl 饱和的滤纸上 10min, 80℃ 烘干 2h,再移膜至预杂交液中: 50% 甲酰胺, 0.1% SDS, 5 × SSC, 1 × Denhardt's 液 (0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% Pico11 400, 0.02% 牛血清白蛋白), 100 μg/ml 鲑鱼精子 DNA, 37℃ 预杂交 4h,加约 10⁶cpm/ml 的探针 DNA,杂交 24h,取出膜在 0.5% SDS, 2 × SSC 液中漂洗 1.5h,换三次液,烘干膜于 -70℃ 放射自显影。

(五) 玻片凝集和反向间接血凝方法同前^[1]

结 果

(一) 重组质粒 pNZ8803 和 pNZ8802 的酶切电泳图

从图 1-C 可以看出 pNZ8803 被 *EcoRI* 消化后形成二条带,较大的一条是 pUB110 的 DNA 带,较小的一条是 pNZ8802 经 *EcoRI* 消化后形成的小片段,该小片段含有部分 K88ac 基因。

(二) 用 K88ac 抗原基因探针的菌落原位杂交结果 (图 2)

与 K88ac 抗血清的玻片凝集及反向间接血凝法检测的结果一致 (表 1)。可以看出,不管是

本文于 1987 年 4 月 13 日收到。

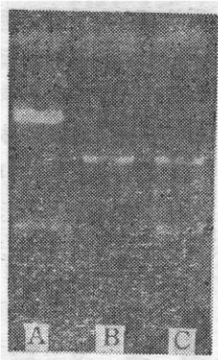


图 1 重组质粒 pNZ8802 和 pNZ8803 的酶切泳动图

- A. pNZ8802 + EcoRI
B. pUB110 + EcoRI
C. pNZ8803 + EcoRI

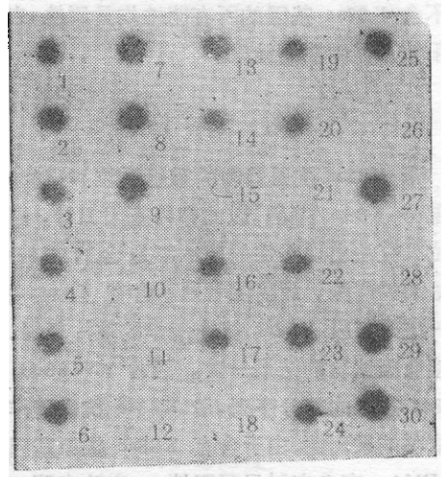


图 2 用部分 K88ac 抗原基因探针的菌落杂交
黑点表明阳性, 不出现黑色表示阴性

表 1 菌落杂交和 K88ac 抗原的测定结果

菌株编号	菌株名称	菌落杂交	玻片凝集	反向间接血凝
1, 2	<i>B. subtilis</i> 168 (pNZ8803)	+	-	-
3, 4	<i>E. coli</i> RR1 (pNZ8802)	+	+	+
5, 6	<i>E. coli</i> 79-1454	+	+	+
7	<i>E. coli</i> 44562	+	+	+
8	44563	+	+	+
9	44564	+	+	+
10	<i>E. coli</i> RR1 (pBR322)	-	-	-
11	<i>B. subtilis</i> 168	-	-	-
12	<i>E. coli</i> 44813	-	-	-
13	<i>E. coli</i> 44566	+	+	+
14	44567	+	+	+
15	44815	-	-	-
16	C83901	+	+	+
17	C83907	+	+	+
18	EPEC	-	-	-
19	<i>E. coli</i> C83549	+	+	+
20	西 948	+	+	+
21	EIEC	-	-	-
22	<i>E. coli</i> 西 948 ^a	+	+	+
23	西 948 ^b	+	+	+
24	西-0 ^c	+	+	+
25	清-21 ^d	+	+	+
26	<i>E. coli</i> B41	-	-	-
27	C83549	+	+	+
28	74-208	-	-	-
29	沟-225	+	+	+
30	沟-225	+	+	+

K88ac 或 K88ab 的菌株均出现杂交阳性结果,而与不含 K88ac 基因的所有菌株均是阴性,未出现假阳性和假阴性的结果。

讨 论

带 K88ac 抗原基因的重组质粒 pNZ8802,只有部分 K88ac 基因,以此作为基因探针,用菌落原位杂交法出现阳性的菌株都是含有 K88ac 抗原基因的菌株,而阴性者则不含有 K88ac 基因,这一结果与以 K88ac 抗血清作的玻片凝集、反向间接血凝试验的结果一致。因为 pNZ8803 只有 K88ac 基因的部分序列,用 K88ac 抗血清作检测抗原时结果阴性。由于含有 K88ac 抗原基因及载体 DNA,在杂交时呈现阳性。实验表明 K88ac 基因探针与 K99、987P、CFAI、CFIⅡ及 EPEC、EIEC 等的菌株杂交呈阴性,说明这些菌毛基因之间存在很弱的同源性或没有同源性。作杂交时

可以使自显影延长至 1—2 个星期,而阴性菌株未出现一点痕迹,表明探针的敏感性和特异性很好。虽然 pUB110 质粒 DNA 上带卡那霉素的抗性基因,但这些野生株中没有卡那霉素抗性,故用 pNZ8803 作基因探针不影响流行病学上的调查。

革兰氏阳性的枯草杆菌染色体及质粒与革兰氏阴性的大肠杆菌染色体及载体 DNA 之间同源性较差,用本文的方法制作的基因探针检测大肠杆菌菌株,不仅省去回收片段这一步骤,而且具有很好的敏感性和特异性。

参 考 文 献

- [1] 张林元等: 生物工程学报, 1(4): 42, 1985。
- [2] 张林元等: 遗传, 4(5): 28, 1982。
- [3] 汤懋斌等: 微生物学报, 10(2): 189, 1964。
- [4] Manitis, T. et al.: Molecular Cloning A Laboratory Manual, CSH, p. 109, 1982。

A NEW METHOD PREPARED GENE PROBE

Zhang Linyuan Deng Xiaozhao

(Institute of Military Medicine, Command, PLA. Nanjing)

Plasmid pNZ8802 containing K88ac gene was digested by *EcoRI*, and the small fragment was cloned to vector plasmid pUB110. One of the hybrid plasmids was named as pNZ8803 which was used to gene probe for detecting variety of strains. Strains containing K88ac or K88ab gene were all positive hybridization, and strains which did not containing K88ac

gene were all negative hybridization. The result indicated that the gene probe was highly specificity and sensitivity.

Key words

Gene probe; K88ac gene; *Bacillus subtilis*