

生物素标记庆大霉素耐药基因探针

严世方 包幼迪

(福建医学院基因工程研究室, 福州)

采用低熔点琼脂糖挖块法回收源自澳大利亚的 pDG0103 的 2.0kb 的 BamHI-HindIII 片段(携带 2"-0-腺苷转移酶[ANT(2'')]基因)和自建的 pBY102 的 4.9kb 的 PstI-EcoRI 片段。以缺口平移法,用生物素-7-dATP 进行标记,制备成探针。通过 Southern 印迹杂交和菌落原位杂交,证明澳源的 Gm-DNA 探针与美国的探针同源,而与作者构建的 Gm-DNA 探针不同源。再以菌落原位杂交法,用生物素标记的上述两种探针分别检测 106 株庆大霉素(Gm)耐药的细菌,结果表明这些菌株携带的 Gm 钝化酶基因的类型不止一种。

关键词 生物素;DNA 探针;庆大霉素

近年来,庆大霉素(Gm)耐药率的增长趋势日益引起重视,临床和基础微生物学家们已开始寻找一种适于追踪细菌耐药基因的高度特异和敏感的方法——DNA 探针。Tenover^[1] 和 Groot Obbink^[2]用放射性同位素 ³²P 标记法分别构建了 310bp 和 2.0kb 编码 2"-0-腺苷转移酶 [ANT(2'')] 的 Gm 耐药基因探针,Barg^[3]构建了 975 bp 编码 3-乙酰转移酶 [AAC(3)-V] 的 Gm 耐药基因探针。国内外尚未见用生物素标记 Gm 耐药基因探针的报道。

本文用生物素标记自建的 4.9kb^[4] 和澳源的 2.0kb^[2]的 Gm-DNA 探针检测 106 株 Gm 耐药细菌,取得了较满意的结果。

材料和方法

(一) 菌株

85/HB 101 (pBY101) 和 PE 85/802 (pBY102) 由作者构建^[4]。E. coli RR1 (pDG0103) 和 E. coli RR1 (pDG0109) 由澳大利亚的 Groot Obbink 博士惠赠^[2]。E. coli PS 1170 (pFCT3103) 和 E. coli

PS1323(pGH54) 由美国的 Tenover 博士惠赠^[1]。106 株待测的 Gm 耐药菌是我室从福州市内医院收集并保存于半固体中的大肠杆菌^[5]、痢疾杆菌^[6]和致病性大肠杆菌 (EPEC)^[7],其余为我室常规使用菌株。

(二) 工具酶及标准 DNA

限制性核酸内切酶 PstI、EcoRI、BamHI 和 HindIII, λ DNA/HindIII 购自 New England Biolabs 公司和华美生物工程公司。溶菌酶和 RNase 为 Sigma 公司产品。蛋白酶 E 为 Merck 公司产品。

(三) 其它材料

低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品。

硝酸纤维素膜:北京化工学校附属工厂生产的孔径为 0.45 μ m 的微孔滤膜。

(四) DNA 提取、纯化和酶切方法^[8]

(五) DNA 酶切片段的回收

已酶解的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳分离后,在欲回收的 DNA 片段前方挖掉一块凝胶,用已融化的低熔点琼脂糖凝胶填

本文于 1989 年 8 月 30 日收到。

充,待凝固后继续电泳,注意观察所需的 DNA 片段一旦全部进入低熔点琼脂糖凝胶中即刻停止电泳,其余步骤参考文献^[4]。

(六) 缺口平移法

用 BRL 公司的缺口翻译试剂盒及生物素-7-dATP 分别标记 pDG 0103 的 2.0 kb 的 BamHI-HindIII 片段和 pBY 102 的 4.9 kb 的 PstI-EcoRI 片段,反应条件按 BRL 公司的说明书。

(七) Southern 印迹杂交

Southern 吸印转移按 Smith 和 Summers^[9] 的方法进行。杂交、洗膜和 ABAP 染色法均参照 BRL 公司的说明书。

(八) 菌落原位杂交

1. 原位杂交膜的制备:取一张已高温湿热灭菌的硝酸纤维素膜(NC)(其圆半径同培养皿内半径),平整地覆盖在 LB 平板上,并使其贴紧,作好标记。将细菌点种于此膜上,37℃ 培养 3 小时左右,揭下 NC 膜,置于 0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl 变性处理 10 分钟,将此膜转于 1 mol/L Tris · HCl/1.5mol/L NaCl (pH8.0) 中和 5 分钟两次,自然干燥,80℃ 干烤 2 小时固定。将此膜置于蛋白酶 E 溶液(终浓度 1mg/ml, 0.01mol/L Tris · HCl pH7.8, 0.01mol/L EDTA, 0.05% SDS)中,37℃ 1.5 小时两次,2 × SSC 漂洗 1 次,继之 2 × SSC 3 分钟 3 次,自然干燥,80℃ 干烤 2 小时,置塑料袋内密封,-20℃ 保存备用。

2. 杂交及 ABAP 染色法同(七)。

结 果

(一) DNA 片段的回收

采用低熔点琼脂糖挖块法,分离获得 pDG0103 的 2.0kb 的 BamHI-HindIII 片段和 pBY102 的 4.9kb 的 PstI-EcoRI 片段。将它们与原酶解物在琼脂糖凝胶上同时电



图 1 低熔点琼脂糖挖块法回收 DNA 酶切片段
Fig. 1 Recovery of DNA restriction fragment using low-temperature-melting agarose by the slot method

Lanes: A) HindIII digest of Lambda;
B) BamHI-HindIII double digest of pDG0103;
C) 2.0 kb BamHI-HindIII fragment from pDG0103;
D) PstI-EcoRI double digest of pBY102;
E) 4.9 kb PstI-EcoRI fragment from pBY102

泳检测(图 1),以已知浓度的 λ DNA/HindIII 为标准对照系,在紫外灯下观察并根据荧光强度正比于 DNA 含量的原理估计回收前后的 DNA 浓度,可知 DNA 片段的回收率达 50—70%,且 DNA 片段纯度高。

(二) 探针的敏感性检测

以缺口平移法,利用生物素-7-dATP 标记上述回收的两种 DNA 片段,从中取少量逐级稀释后点到硝酸纤维素膜上,以已标好的已知浓度的 λ DNA 作对照,ABAP 法染色检测标记效果,两种探针的敏感度均达到 0.5pg。

(三) Southern 印迹杂交结果

从图 2-1 的溴源的 2.0 kb Gm-DNA

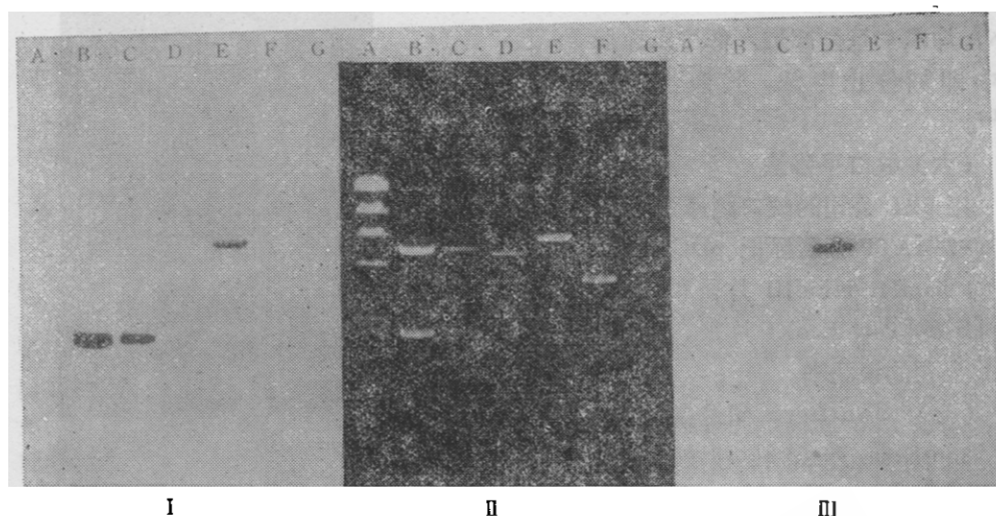


图 2 (I) pDG0103 的 2.0kb 探针的 Southern 杂交结果
(II) 质粒 DNA 的酶切片段的琼脂糖凝胶电泳检测图
(III) pBY102 的 4.9kb 探针的 Southern 杂交结果

Fig. 2 Southern hybridization with the 2.0 kb probe from pDG0103
(I) agarose gel electrophoresis of restriction fragments of plasmid DNA
(II) and Southern hybridization with the 4.9 kb probe from pBY102
(III) Lanes: A. HindIII digest of Lambda; B. BamHI-HindIII double digest of pDG0103 (0.04 μ g/ml); C. BamHI-HindIII double digest of pDG0103 (0.02 μ g/ml); D. PstI-EcoRI double digest of pBY102; E. BamHI digest of pFCT3103; F. BamHI digest of pGH54; G. BamHI digest of pBR322

探针杂交结果可知, pDG0103 的 2.0kb 的 BamHI-HindIII 片段位置出现紫蓝色区带, 且浓度越大者杂交强度越强; 质粒 pBR 322 的 BamHI 酶切片段位置不出现紫蓝色区带, 这分别说明本实验的阳性和阴性对照准确可靠。由此图还可以看出, pFCT3103 的 BamHI 酶切片段位置出现紫蓝色区带, 而源自 pBY102 的 4.9kb 的 PstI-EcoRI 片段位置和 pGH54 的 980bp 的 APH(3')-I(编码卡那霉素抗性)基因片段位置都不出现紫蓝色区带。这些结果证明澳大利亚的探针与美国的探针同源, 而与作者构建的 Gm-DNA 探针不同源。从图 2-III 的 pBY102 的 4.9kb Gm-DNA 探针杂交结果再次证明作者构建的 Gm-DNA 探针与澳大利亚及美国的探针不同源。

(四) 菌落原位杂交结果

图 3-a 和图 3-b 的各个对应位置的细菌相同。这里仅列出 52 株待测细菌的检测图, 另有 54 株待测细菌的检测图未列出。60—65 号为阴性对照。从图 3-a 的澳源的 pDG0103 的 2.0kb 探针的杂交结果可知, 58 号的 *E. coli* RR1 (pDG0103) 和 59 号的 *E. coli* RR1 (pDG0109) 均呈杂交阳性, 可作为本实验的阳性对照。28 号的 *E. coli* PS1170 (pFCT3103) 呈杂阳性, 而 E2、E2 的质粒消除株, E2/802、85/HB101 和 PE85/802 均为阴性, 这亦证明澳源的 Gm-DNA 探针与美国的探针同源, 而与作者构建的 Gm-DNA 探针不同源。

从图 3-b 的 pBY 102 的 4.9 kb Gm-DNA 探针的杂交结果可知, 53 号的 E2、54 号的 E2/802、55 号的 85/HB101、56 号的 PE85/802 呈杂交阳性, 均可作为本

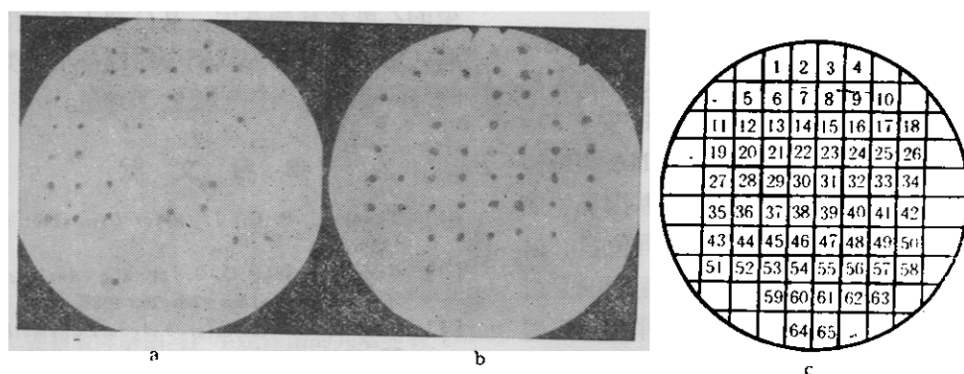


图 3 (a) pDG0103 的 2.0kb 探针的菌落原位杂交结果
(b) pBY102 的 4.9kb 探针的菌落原位杂交结果
(c) 菌落位置图

Fig. 3 Colony hybridization with the 2.0 kb probe from pDG 0103 (a), colony hybridization with the 4.9 kb probe from pBY102 (b) and location of colony (c) Locations: 1 through 27, 29 through 50, 52, 53 and 57: 52 strains of gentamicin resistant bacteria to be detected; 51. E2 strain (curing of pEFM2); 53. E2; 54. E2/802; 55. 85/HB101; 56. PE85/802; 28. *E. coli* PS 1170 (pFCT3103); 58. *E. coli* RR1 (pDG0103); 59. *E. coli* RR1 (pDG 0109); 60 through 65: *E. coli* k 802 (pBR322), *E. coli* PS1323 (pGH54), *E. coli* k 802, *E. coli* HB101, *E. coli* k12 W1485, *E. coli* k12 W1485 (RP4), as negative control

表 1 两种探针对 106 株细菌的菌落原位杂交结果

Table 1 The result of colony hybridization of 106 strains with two probes

细 菌 Bacteria	株数 Strains	Both (-)		Both (+)		Only 2.0 kb (+)		Only 4.9 kb (+)	
		Strains	(%)	Strains	(%)	Strains	(%)	Strains	(%)
<i>E. coli</i>	81	14	17.28	36	44.44	10	10.33	24	29.63
<i>Shigella</i>	22	1	4.55	9	40.91	1	4.55	11	50.00
EPEC	3	0		1	33.33	0		1	33.33
Total	106	15	14.15	46	43.40	11	10.38	36	33.96

实验的阳性对照。28 号的 pFCT3103、58 号的 pDG0103 和 59 号的 pDG 0109 均为阴性, 这再次证明作者构建的 Gm-DNA 探针与澳源及美国的探针不同源。

106 株待测的 Gm 耐药细菌的菌落原位杂交结果见表 1。由此可知, 仅与 pDG 0103 的 ANT(2'') 基因同源者占 10.38%; 仅与 pBY102 的 Gm 耐药基因同源者占

33.96%; 而两种基因兼有者占 43.40%; 与两种基因都不同源的占 14.15%, 提示这些细菌可能有其他类型的 Gm 钝化酶基因。

讨 论

本文回收 DNA 片段所采用的低熔点琼脂糖挖块法是一种省时省料保质量的好方法, 所得的 DNA 片段的纯度和回收率

不亚于文献^[8]的方法,因此可以推广应用。

本文标记 DNA 探针使用的生物素标记法较同位素标记法快速、可靠、安全、稳定、经济和方便。已有报道^[10] DNA 探针诊断腹泻性大肠杆菌,所有致病基因都能成功地用于生物素标记,而不用同位素。但是生物素标记 DNA 探针技术用于细菌耐药性的检测及耐药基因传播规律的研究尚未见报道。本文首次用生物素标记 DNA 探针研究 Gm 耐药基因。此法敏感性较高,而且探针稳定。经实验证明标记好的探针在-20℃冰箱中保存两年后其活性几乎不减。因此它将为临床的耐药基因诊断及分子流行病学调查开辟一条新的途径。

庆大霉素钝化酶的种类繁多,但在不同地区、不同时期具有很大区别^[11]。从本文的菌落原位杂交结果来分析,由于菌株来源不同, Gm 耐药菌株的钝化酶基因不只一种,除了有 ANT(2'') 外,还有不同类

型的乙酰转移酶基因,其分型工作有待研究。这些菌株还为我们今后制备不同类型的 Gm 耐药基因探针提供了方便。

参考文献

- [1] Tenover, F. C.: *J. Infect Dis.*, **150**: 678, 1984.
- [2] Groot Obbink, D. J. et al.: *Antimicrob Agents Chemother*, **28**: 96, 1985.
- [3] Barg, N. L.: *Antimicrob Agents Chemother*, **32**: 1834, 1988.
- [4] 严世方等: 福建医学院学报, **23**(2): 155, 1989.
- [5] 包幼迪等: 福建医学院学报, **21**(2): 97, 1987.
- [6] 包幼迪等: 中华微生物学和免疫学杂志, **2**(3): 304, 1982.
- [7] 金少雄等: 中华微生物学和免疫学杂志, **8**(1): 12, 1988.
- [8] Maniatis T, et al: *Molecular Cloning-a Laboratory manual*, p.90; p.170, Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the United States of America, 1982.
- [9] Smith, G. E. & Summers, M. D.: *Anal. Biochem.*, **109**: 123, 1980.
- [10] 林万明: 国外医学微生物学分册, **5**: 228, 1988.
- [11] 严世方等: 国外医学流行病学传染病学分册, **5**: 216, 1989.

TWO BIOTIN-LABELED PROBES OF GENTAMICIN RESISTANCE GENES

Yan Shifang Bao Youdi

(Laboratory of Genetic Engineering, Fujian Medical College, Fuzhou)

A 2.0 kb BamHI-HindIII fragment of pDG0103 from Australia containing gentamicin 2''-O-adenylyltransferase [ANT(2'')] gene and a 4.9 kb PstI-EcoRI fragment of pBY102 were recovered from low-temperature-melting agarose by the slot method. Both fragments were labeled with biotin-7-dATP by nick translation with a commercial kit. The result of colony and Southern hybridization was that: the 2.0 kb probe from Australia hybridized with that containing ANT(2'') from

America, while no hybridization occurred between the 2.0 kb probe and the 4.9 kb probe constructed in our lab. Furthermore, the above two fragments were used as probes for detection of 106 strains of gentamicin resistant Enterobacteriaceae. It revealed that there were more than one gentamicin resistance gene in the tested strains.

Key words

Biotin; DNA probe; Gentamicin