



微生物基因探针检测技术最新进展

林万明 阚劲松 宋欣明 蒋国桥 徐建雄

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

为及时了解国外微生物基因探针检测技术的最新研究动向,我们从第六届微生物与免疫学快速和自动化检测方法国际学术会议中,筛选出有关内容介绍给大家,以期对国内同行有所启迪。

(一) PCR 产物的快速检测和测序

固相技术是生物分子合成和分离的有效手段之一。由于固相与反应液相易于分离,可进行一系列快速自动化操作。下面简单介绍一种 PCR 扩增 DNA 序列的固相测序方法。将生物素选择性地引入 PCR 扩增产物的一条链, Lac 操纵子序列引入另一条链中。体外扩增产物通过与磁珠上的链霉亲和素共价结合而固相化。利用包含 *E. coli* Lac 阻碍物和 β -半乳糖苷酶的重组融合蛋白测定结合量,根据 Sanger 法测序,可用碱或甲酰胺选择性选脱另一条链。由于酶和缓冲液很易改变,测序反应可在最佳条件下完成。该法还可对基因组 DNA 和质粒 DNA 进行固相测序,并已用于衣原体和恶性疟原虫临床样品的检测。

(二) DNA 非放射性标记技术

1. 红非绕脒-铷复合物标记寡核苷酸:红非绕脒-铷复合物在化学和热力学方面都非常稳定,且合成相对简单。它们可特异地与合成的探针相连,通过时间分辨荧光仪高灵敏检测。铷复合物标记的寡核苷酸仍能特异地与其互补的 DNA 杂交,并且在杂交过程中未发现淬灭现象。

2. 辣根过氧化物酶标记寡核苷酸:在合成寡核苷酸中,用 C₆-硫醇修饰剂将其 5' 端修饰,产生的寡核苷酸可与辣根过氧化物酶直接标记。杂交后,用化学发光法检测固相化的寡核苷酸。整个过程从标记到出胶片不超过 5 小时。该法标记的寡核苷酸已用于单个碱基错配检测

和菌落筛选。

3. 氨基乙酰酰肼和戊二醛生物素标记系统:一种新型的使用生物素氨基乙酰酰肼和戊二醛进行 DNA 生物素标记,具有简单、快速、有效的特点。DNA 变性后,最佳标记反应仅需 10 min。利用链霉亲和素结合的碱性磷酸酶在尼龙膜上进行点杂交,可检测少至 7.5pg 的 DNA。

(三) 基因探针技术的应用

1. 利用 rRNA 基因探针 (H900) 检测细胞培养中的支原体污染:细胞培养常被支原体污染,以 rRNA 基因探针杂交较其它方法有明显的优点:对细胞培养样品无需核酸纯化。H900 限制片段来自猪鼻支原体 23S rRNA 基因,探针序列与 rRNA 序列中的可变区和恒定区均互补。样品在 SDS 和 SSC 中于 100℃ 处理 5 分钟可使靶分子 (rRNA) 易于杂交。该探针可检测到所有污染细胞培养的常见支原体。

2. 喹啉类抗生素对质粒复制的影响:用生物素标记的 DNA 探针检测细菌质粒 DNA 并研究 Ciprofloxacin 和萘啶酮酸对质粒的影响。通过计算机控制的影像分析系统来检测斑点杂交所产生的颜色深浅。Ciprofloxacin 浓度约为最小抑菌浓度一半时,能使细菌质粒拷贝数减少,而萘啶酮酸在相同浓度下的作用较弱。

3. HYBRICOMBTM 简化 DNA 探测和基因诊断:样品 DNA 通过化学方法将磺酸基团引入到胞嘧啶 C₆ 位上,标记的样品 DNA 和固相未标记探针 DNA 杂交后,由抗磺酸化 DNA 抗体的酶联显色反应来显示杂交。该系统以盒式方式组装,探针 DNA 固定在梳形塑料片的梳齿上,不同的未标记 DNA 可吸附在梳齿上。该技术可检测单一样品中多个序列片段。

4. 夹心杂交法检测人乳头瘤病毒: 根据夹心杂交原理设计出一种用于检测子宫颈拭子样品中的人乳头瘤病毒。一条固定在磁微珠上的单链探针(捕获探针)用以捕捉液相中靶 DNA, 靶 DNA 的另一近邻区域可与另一产生信号的探针(信号探针)杂交。该法所用的信号探针是未标记的 RNA。利用未标记 RNA 探针比标有生物素或其它信号基团的 DNA 探针有更多

的优点。由于非特异结合探针(单链 RNA)不被酶标抗 RNA: DNA 抗体所识别, 从而使敏感性得到提高, 在 2.5 小时内可检测出少至 0.25 pg (2.9×10^4 分子) 的人乳头瘤病毒-16DNA。

参 考 文 献

Sixth International Congress On Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Helsinki-Espoo, Finland, 7-10, June 1990.