

血链球菌特异 DNA 片段探针制备及临床应用

潘亚萍 赵彦艳 孙开来 章锦才

摘要 目的: 探讨血链球菌特异 DNA 片段探针制备及临床应用。方法: 采用特异引物的 PCR 扩增及运用探针进行 Southern 杂交, 斑点杂交来检测口腔链球菌同源序列。结果: S34_{sr}, S34 非 1 和 ATCC10556 的 DNA 含有同源序列, 另有两株血链球菌临床分离株斑点杂交结果为弱阳性, 其它 30 余株细胞杂交结果阳性。结论: 血链球菌 ATCC10556 菌株中的 nif 基因为血链球菌的特异基因, 该基因在血链球菌蛋白的表达及功能尚待深入探讨。

关键词 血链球菌 地高辛探针 nif 基因

以往的研究表明血链球菌 S_{sr} DNA 重组质粒 PCRTM 3-S_{sr} 含有 nif 基因¹。nif 基因在血链球菌的能量代谢及蛋白功能的具体作用及与口腔疾病的发生相关因素仍未完全明确, 血链球菌 ATCC10556 所含有的 nif 基因是否也存在于其它菌群未见报道。本研究根据已知序列, 设计特异引物及标记的 DIG 探针再次验证 nif 的基因是否存在于血链球菌 ATCC10556 菌株中; 另一方面检测口腔链球菌及其它菌群中是否也含有 nif 基因。

1 材料和方法

1.1 菌种选择

血链球菌: ATCC10556, S34_{sr}, S34 非 1, JFr 及临床分离株; 变链球菌: 国际参考株血清型 c, d, f 及临床分离株; 唾液链球菌: HHT 模式株; 其它菌种: 大肠杆菌、绿脓杆菌、阴沟杆菌、产气荚膜杆菌、葡萄球菌、奈瑟代菌等共 30 余种细菌。

1.2 引物设计

通过 oligonucleotide 二级结构检测, 根据测序的 800 bp DNA 片段设计一对引物。上游引物: 5'TAGTTGAA GCGA TTAAAGCG3', 下游引物: 5'TCGTCGTGAAA GCCAAA3'。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取

常规方法 经碘酚和氯仿, 氯仿和异戊醇抽提细菌染色体 DNA。

煮沸法 过夜培养细菌, 收集菌体, 溶菌酶, 1% SDS 及蛋白酶 K, 65 °C 水浴 1 小时; 加入自配的 DNA 裂解液混匀水浴 60 °C 1 小时; 沸水煮沸 10 分, 12000 r/min 离心 5 分, 收集上清液即含有细菌染色体 DNA。

1.3.2 PCR 扩增

以细菌 DNA 为模板 用设计的特异一对引物进行

PCR 扩增。反应条件为 95 °C 变性 3 分, 95 °C 1 分, 55 °C 50 秒, 72 °C 1.5 分, 72 °C 延伸 5 分, 40 个循环。

1.3.3 地高辛(DIG)标记探针制备

DIG 探针标记 ATCC10556 PCR S_{sr} 质粒酶切产物加入双蒸水 16 μl, 100 °C 加热 5 分使 DNA 变性, 加入 DIG 标记引物 4 μl 20 小时孵育, 标记后用 0.2 M μ 的 EDTA 终止反应。

探针浓度测定 标记的产物 1 μl 加入到 39 μl DNA 稀释液中, 倍比稀释, 点样定量测定显示 1:33 稀释浓度的探针做杂交实验较为适宜。

1.3.4 Southern 印迹、斑点印迹和 Southern 杂交及检测

细菌 DNA PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖电泳检测, 将凝胶变性后印迹于尼龙膜, DNA 转移 24 小时, 80 °C 2 小时真空干燥尼龙膜; 斑点印迹为细菌提取的染色体 DNA 5 μl 沸水煮沸 10 分变性, 点样于尼龙膜, 将尼龙膜 80 °C 真空干燥 2 小时。

将尼龙膜放入含有变性探针的杂交液 2.5 ml 中杂交, 68 °C 16 小时, 洗膜, 加入二抗, 最后加入 10 ml 新鲜配制的底物显色。

2 结果

2.1 特异引物 PCR 扩增

根据引物设计预计扩增出 559 个碱基, 在设计 PCR 扩增条件下, 电泳仅出现一条特异带并与预计长度相符。结果显示血链球菌 ATCC10556 及 S34_{sr} 扩出同样片段, 而且血链球菌 JFr 菌株、变链球菌、唾液链球菌、大肠杆菌等非亲源性细菌未扩

本课题由美国中华医学会 CMB 基金资助

作者单位: 110002 中国医科大学口腔医学院口腔内科学教研室(潘亚萍), 中国医科大学基础医学院遗传学教研室(赵彦艳, 孙开来), 华西医科大学口腔医学院(章锦才)

出相应DNA片段(图1)。

2.2 细菌DNA提取的改进

采用自配的细菌裂解液提取细菌DNA使检测方法更为容易和简单。采用同样PCR扩增条件,ATCC10556扩出同等特异片段,而其它细菌未扩出同样DNA片段,显示煮沸后提取的DNA足够PCR扩增需要(图2)。

2.3 Southern杂交

Southern印迹杂交显示800bp左右DNA基因片段含有ATCC10556 S_r 基因,即nif基因(图3)。斑点杂交表明,血链球菌国际参考株S34 s_r ,S34非1同样含有nif基因,其中血链球菌2株临床分离株为弱阳性。阴性对照及变链球菌、唾液链球菌、革兰氏阴性杆菌、产气杆菌、葡萄球菌等菌株杂交阴性,表明不含有nif基因(图4)。

3 讨论

3.1 设计特异引物PCR扩增结果评价

本文设计的一对引物是根据ATCC10556特异DNA片段已知序列所设计的一对引物,含有大部分nif基因。实验结果再次验证用TA克隆系统进行PCR片段转化克隆成功,结果确切,同时也再次证实血链球菌ATCC10556确含有nif基因同源序列,有效序列长度为765个碱基。本研究的DNA碱基序列仅含有部分nifs和nifu基因序列,并不能完成细菌蛋白表达²,血链球菌哪一种蛋白或功能表达与nifs和nifu基因有关是研究关键,设计适宜引物进行DNA片段多次克隆及表达研究,寻找ATCC10556nif完整基因是目前首要任务。

nif基因已在10余株细菌中发现^{3,9},作者对口腔中大部分口腔链球菌菌群进行检测,除ATCC10556及S34 s_r 外,其它菌株未扩增出同样DNA片段,显示了ATCC10556血链球菌DNA基因片段具有较强的特异性。能否完全判断上述微生物中不存在同样的nif基因,证据还不充分。主要原因是作者设计的一对引物长度仅是20和17个碱基,扩增条件要求高,在其它种属细菌中完全扩增同等DNA片段可能性较小,只有与ATCC10556遗传特性非常相近的细菌才有可能,因此尚需运用更好的检测手段进行验证。

3.2 DIG探针评价及临床应用

本研究运用的随机引物法地高辛标记是近年

来发展起来的一种较为理想的核酸探针标记方法,并有取代缺口平移法而作为实验室中DNA探针标记的常规方法趋势⁵。本研究制备的DIG探针包含ATCC10556全部nif基因序列,比特异引物PCR扩增检测方法特异性更准确,特异性更高,敏感性好,细菌只要含有部分同源碱基序列即可检出。本实验表明,制备的DIG探针与ATCC10556亲缘性非常相近的血链球菌S34 s_r ,S34非1杂交强阳性,表明这两种菌株含有nif基因,另两株血链球菌临床分离株斑点杂交呈弱阳性,表明可能存在与ATCC10556部分基因序列相似的DNA。

作者曾探讨血链球菌ATCC10556含有nif基因同源序列,推测其功能与其产生过氧化氢相关¹。DIG探针的制备使进行此方面相关性研究手段简化,通过DIG探针检测,Southern或斑点杂交寻找血链球菌nif基因表达及相关性的研究将指日可待。

3.3 DNA提取方法的改进利于临床检测

血链球菌外膜蛋白富含糖蛋白,在提取DNA时常由于蛋白污染导致DNA纯度下降,因此提取DNA过程中如何去除蛋白质尤为重要。本实验采用煮沸法提取细菌DNA,实验方法简单,蛋白更易变性。本实验自配的细菌裂解液较适用于口腔链球菌,提取的DNA纯度与传统提取方法即酚和氯仿抽提无明显差异,使PCR技术应用于口腔链球菌的检测更为实用化,也为本课题进一步深入研究提供一种较为有效的方法。

(本文图见中心插页6)

4 参考文献

- 1 潘亚萍,王红杨,金春元,等.血链球菌部分基因克隆及与nif基因同源序列初探.华西口腔医学杂志,1999,17(1):9~11
- 2 Ouzounis C, Sander C. Homology of the nifs family of proteins to a new class of pyridosal phosphate-dependent enzymes. FEBS Lett, 1993, 322(1): 159~164
- 3 阎大来,何路红,李秀伦.巴西固氮螺菌ntrBc基因克隆与核苷酸序列分析.微生物学报,1995,35(1):242~249
- 4 Sun D, Setlow P. Cloning, nucleotide sequence and regulation of the bacillus subtilis and a nifs-like gene, both of which are essential. J Bacteriol, 1993, 175(5): 1423~1432
- 5 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯,等.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,1992:474~490

(1998-05-20收稿)

(下转第112页)

Cartilage Matrix Synthetic Ability of Rabbit Articular Chondrocytes Cultured *in vitro*

Chen Fulin, Mao Tianqiu, Feng Xue, et al

College of Stomatology, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: To observe the ability of matrix synthesis of rabbit articular chondrocytes cultured *in vitro*. **Methods:** Rabbit articular chondrocytes were acquired by digestion of 0.1% type II collagenase and cultured *in vitro*, then cell morphology and ultrastructure were observed with phase-contrast microscope and scanning electronic microscope. With continuous culturing of chondrocytes in DMEM medium containing 15% FBS, synthesis of cartilage matrix was observed by using microscope and safranin-O staining. **Results:** The cultured chondrocytes were polygonal cells. There were many rough endoplasmic reticula and mitochondria in cytoplasm, and a lot of secretory vesicles under cell membrane and in the cytoplasm. When cultured for 10 days, some small and white nodules were formed on the bottom of the culture dish, and volcano-mouth-like structures were formed when cultured for 20 days. Both these nodules and structures contained GA₆-positive substances were demonstrated by safranin-O staining. **Conclusion:** Chondrocytes can produce matrix and cartilage-like tissue *in vitro*, so it is feasible to produce cartilage by culturing chondrocytes *in vitro*.

Key words: chondrocyte matrix synthesis cell culture

(上接第 109 页)

Preparation of *Streptococcus sanguis* DIG-labeled DNA Probes and Clinical Application

Pan Yaping

Department of Oral Medicine, Dental School, China Medical University

Zhao Yanyan, Sun Kailai

Department of Heredity, Basic Medicine College, China Medical University

Zhang Jincai

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To investigate oral *Streptococcus* *nif* gene. **Methods:** According to the 800 base pairs (bp) sequence, a couple of special primer was designed, which were 5'-TAGTTGAA GCGA TTAAA GCG-3' and 5'-TCGTCGTGAAA GCCAAA-3'. DIG-labeled DNA probes of ATCC10556 800bp DNA fragment and 559bp DNA fragment were made. By using Southern blotting and dot blotting, more than 30 bacterial strains were checked. **Results:** 559bp sequence was according with the reported results, and the Southern blot results showed that S34sr, S34 no 1 strains had homologous sequence with ATCC10556, two strains of *Streptococcus sanguis* were weak positive, and other strains were negative. **Conclusion:** *Streptococcus sanguis* ATCC10556 strain contained exactly *nif* gene and *nif* gene may be the special gene of *Streptococcus sanguis* ATCC 10556.

Key words: *Streptococcus sanguis* DIG probe *nif* gene