

热敏感肠毒素基因探针的制备及其特性的研究

第一军医大学流行病学教研室 俞守义 李美霞* 罗不凡* 陈义忠

产毒性大肠杆菌(ETEC)是引起腹泻的一个重要病原菌。但在粪便中直接分离鉴定比较困难,所以有关它的流行病学资料还了解不多。近来国外许多学者认为不耐热肠毒素(LT)基因探针技术是对该菌进行深入流行病学研究的一个有用工具^[1,2], ETEC产生热稳定肠毒素(ST)和热不稳定肠毒素,现在检测它们的方法发展很快,种类繁多,难易不一,可大致归纳为二类:免疫化学方法和组织培养或动物试验方法^[3]。其中不少方法都需要一定的设备和技术条件,有的所费时间较长,有的敏感性也不高,所以WHO在腹泻病控制计划中也强调要改进对ETEC的检测技术和评价^[4]。美国等八个国家50多名专家在一次有关腹泻的专题讨论会纪要中也专门提出要加强基因探针检测技术的研究^[5]。LT探针技术是近年来发展起来的一种新方法,被称为第四代检测技术,它是利用分子生物学的一些基本技术和原理从携带有LT质粒的工程菌中分离、纯化LT遗传基因,利用缺口翻译方法(Nicktranslation)把 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP标记到LT遗传基因上所制成。然后根据同源DNA在一定条件下碱基能互相配对(杂交)的原理去检测待检标本中与LT DNA分子结构相同的基因,而不像其它检测方法那样必须去检测肠毒素本身。由于LT探针是在基因水平上作检测所以特异性较高、敏感性较强,据报告比经典的Y-1细胞测毒法的敏感性还高一万倍。该法不仅一次可以检测几百份样品而且还可以直接从粪便中进行检测,更适合于流行病学的现场调查和实验室诊断。我们在北京军医科学院基础所帮

助指导下研制成了LT基因探针并对其特性作了进一步的研究。

材料和方法

菌株: LT⁺参照菌, *E. coli* C₈₀₀ (PMMO 30) 作为工程菌、*E. coli* 403-1~5、*E. coli* 34-1、*E. coli* 55-2; LT⁻参照菌 *E. coli* C₈₀₀、*E. coli* 802 上述菌株均由北京军事医学科学院赠送。枯草杆菌、变形杆菌链球菌由我校微生物教研室提供。

试剂: Hind III 由中国医学科学院生化室提供、*E. coli* DNase I (Z Merck)、*E. coli* Polymerase I (美国 Wisconsin)、dCTP、dGTP、dTTP (西德进口)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (英国进口和北京中国科学院原子能研究所赠送)、溶菌酶 (中科院生物物理所生化试剂厂出品)、三羟基氨基甲烷 (Sigma)、甲酰胺 (Fabrik CH-9470)、硅鱼精 DNA、Triton X-100 由北京军医科学院赠送、Na₂EDTA、蔗糖、异戊醇 (广东化工厂出品)、琼脂糖 (上海医药公司)、Sephadax G-50、RNase (美国 Pharmacia Uppsala)

LB培养基: 蛋白胨10g、酵母膏5g、NaCl 10g 溶于1000ml水, pH7.5, 固体培养基加1.5~2%琼脂, 培养基中均含氨苄青霉素, 终浓度50 μ g/ml。

LT-质粒分离纯化: 取工程菌PMMO30菌株(含LT-质粒)的菌悬液按0.5%的量接种于LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养4~6小

*广州市防疫站进修生。

时($A_{600} \approx 0.6$ OD)、加氯霉素至终浓度 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$,以扩增LT-质粒,继续培养 $14 \sim 16$ 小时,离心 4000rpm ,收集菌体并用ST液(25% 蔗糖、 50mM Tris-HCl pH8.0)悬浮菌体依次用溶菌酶(终浓度 $3 \text{mg}/\text{ml}$)、Tris-HCl、 Na_2EDTA 、Triton X-100来裂解菌体,离心 $30,000 \text{rpm}$, $60' 4^\circ\text{C}$,得到清亮裂解液,用pH8.0的水饱和酚、 $24:1$ (V/V)氯仿异戊醇先后多次抽提去除蛋白,最后一次抽提物加二倍体积的冷乙醇 -20°C 过夜, $15,000 \text{rpm}$ 离心 $60'$,取沉淀,吹干酒精,加适量TE液(1mM Tris-HCl, 1mM Na_2EDTA , pH8.0)悬浮沉淀,在751型紫外分光光度计上测OD值($A=260$),配成 10 个OD/ml的菌浮液即为粗制的LT-质粒悬液。再用So氏酸酚法^[6](稍加修改)进一步纯化粗制LT-质粒,加RNase至终浓度 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 孵育 $1 \sim 2$ 小时(RNase须预先煮沸 15 分钟以灭活DNase!),再加pronase(37°C 预活化 2 小时)至终浓度 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 2 小时,经 1.5M NaCl, 1M NaAC, pH4.0处理,再加等体积 50mM NaAC(pH4.0)平衡的重蒸酚和 $1/2$ 体积的氯仿异戊醇在冰浴中混匀, 4°C 5000rpm 离心 $20'$,取上层水相重复 $1 \sim 2$ 次,然后用 1M Tris-HCl, pH8.6中和,再加 5 倍体积的乙醚除酚,加二倍体积的无水乙醇和 $1/5$ 体积的 1M NaAC pH5.0,在 -20°C 沉淀过夜, 15000rpm 离心 60 分钟,沉淀物即为纯化的LT-质粒。

LT-DNA Hind III酶切片段的制备:将纯化的LT-质粒用Hind III限制性核酸内切酶按产品说明书方法消化,然后用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 100V , $2 \sim 3$ 小时,从琼脂糖凝胶中回收电泳纯的LT-DNA Hind III酶切片段, 4°C 保存作同位素标记用。

LT基因探针的制备:根据Rigby和Maniatis的缺口翻译方法^[7,8],用DNase I作为合成DNA的引物模板(Primer-template),通过*E. coli* polymerase I把 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 上的脱氧核苷残基结合到DNA的 $3'$ -羟基末端而同时

核酸外切酶从 $5'$ 端不断切去磷酸残基使新合成的带有 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 的DNA链不断从 $5'$ 端向 $3'$ 端延长,从而合成了特异性的带同位素的LT-DNA基因探针。再将反应混合物通过Sephadex G-50把已标上同位素和未标上同位素的LT-DNA片段分开,在液闪仪(Backman LS9800)测定探针的放射性比强,我们每批探针的放射性比强都 $>10^8 \text{cpm}/\text{min} \cdot \mu\text{gDNA}$ 。 4°C 保存备用。

DNA-DNA菌落原位杂交:按已报道的方法操作^[9]。

探针特异性试验:将LT⁺、LT⁻各参照菌株分别在一张直径 9cm 的硝酸纤维素滤膜上点样,滤膜预先贴于营养琼脂平板上(简称琼脂滤膜,下同),将琼脂滤膜 37°C 培养 $18 \sim 24$ 小时,按DNA-DNA菌落原位杂交法鉴定。实验重复四次。

探针敏感性试验:将LT⁺参照株55-2接种于普通琼脂斜面, 37°C 培养过夜,次日每支斜面加 1ml 灭菌生理盐水(NS)冲洗菌苔成悬液,合并后用电磁搅拌器均匀 1 分钟,再用NS从原始管(稀释度为 10^0)起作 10 倍连续稀释 $10^0 \rightarrow 10^{-19}$ 共 20 管,取 10^{-7} 、 10^{-8} 两管用平板涂布法活菌计数计算出原液管(10^0)的活菌浓度($7.4 \times 10^{12}/\text{ml}$)。设两个对照:LT⁻参照株*E. coli* C₆₀₀和不加菌的NS(图2第22号和21号)。每管分别取样在琼脂滤膜上点样, 37°C 培养过夜,作菌落原位杂交。实验重复二次。

大便直接点膜的定性和定量试验:定性试验:取健康人正常大便(经南方医院检验科作常规及细菌学培养鉴定) 6g 平均分装于两组青霉素小瓶中,每组 3 个,第一组每瓶加LT⁺菌悬液(~ 6 亿/ml) 1ml 和NS各 1ml 为实验组,第二组每瓶只加NS 2ml 为对照组与粪便混成匀浆, 37°C 温孵 2 小时使LT⁺菌与粪便中正常菌群充分适应,然后琼脂滤膜点样做原位杂交。定量试验:取正常粪便 14g 分装于 14 只灭菌青霉素瓶内。取LT⁺菌悬液(~ 7 亿/ml)作 10 倍连续稀释至第 13 管(稀释度为 10^{-12} ,浓度约 70 个菌/ml),

每管取1ml,加1mlNS放入上述12个小瓶中,最后一小瓶(14号瓶)不加菌液,只加2 mlNS (图4 第16号)作粪便对照,另设*E.coli*55-2和*E.coli*C₆₀₀分别为LT⁺和LT⁻对照(图4 第14、15号),以后按定性试验方法操作。

探针稳定性试验:

将英国进口的同位素和国产同位素所制成的探针分别从半衰期起算日算起间隔22天、69天和21天、38天作探针的特异性试验以观察这二种探针的稳定性和有效期限,放射自显影时间也分别由20小时相应延长到36~72小时。

结 果

特异性:用LT⁺、LT⁻参照菌株以及其它一些常见的不产生肠毒素的菌株连续做四次特异性试验结果完全一致,未发现假阴性和假阳性结果(图1)。

敏感性试验:LT⁺参照菌*E.coli*55-2活菌悬液($\sim 7 \times 10^{12}/\text{ml}$)连续10倍稀释至第13管

(活菌浓度约7个/ml)仍能得到阳性结果,表明LT探针的敏感性可达到检出7个菌/ml菌悬液的水平(图2第13号点),而普通培养基1000个菌/ml的样品是很难直接培养出来。

大便直接点膜:在定性试验中阳性和阴性大便均未出现假阳性或假阴性结果(图3),定量试验中35个菌/ml粪便悬液仍能检出阳性结果(图4,第12号黑点)。这结果表明该探针不仅有较高的特异性和敏感性,而且还可以从粪便中直接检测,其敏感性也可达到大约35个菌/ml粪便混悬液的水平。稳定性试验结果表明进口同位素探针(半衰期14天)经4.3个半衰期(69天)将自显影时间由24小时延长至72小时仍可继续有效,国产同位素探针经约3个半衰期(38天)自显时间48小时仍可有效使用,可惜更长存放时间我们没有进一步观察下去。仅从现有结果表明,该探针的效期至少可达1.5~2个月,国产同位素可代替进口同位素来制备探针。

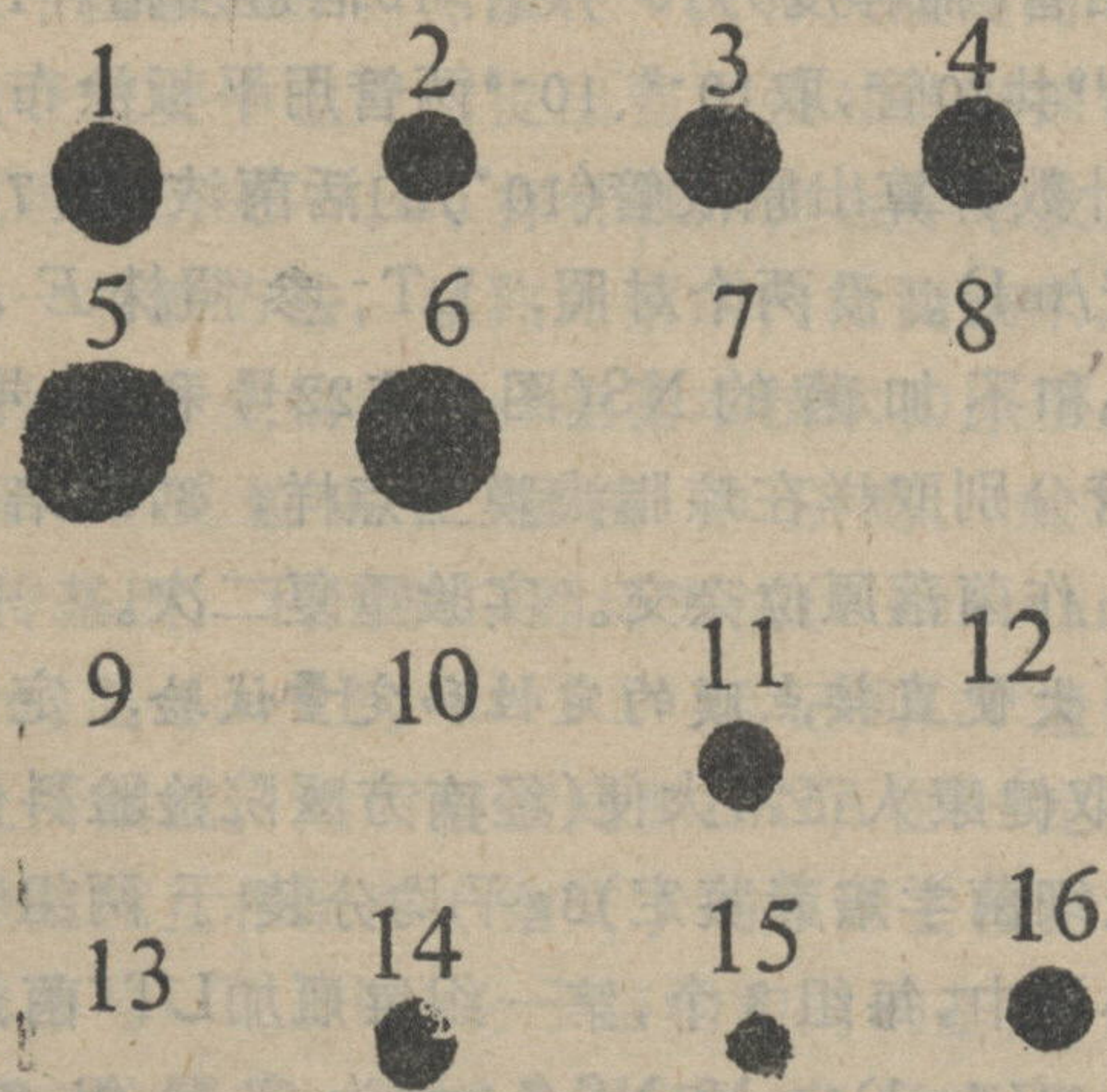


图1 特异性试验

编号说明:LT⁺菌株代号为1(403-1)、2(403-2)、3(403-3)、4(403-4)、5(34-1)6(55-2)、11(403-5)、14~15(403-1,~3)LT⁻菌株代号为7(枯草杆菌)、8(802)9(变形杆菌)、10(链球菌)、12(C600)13(802)。

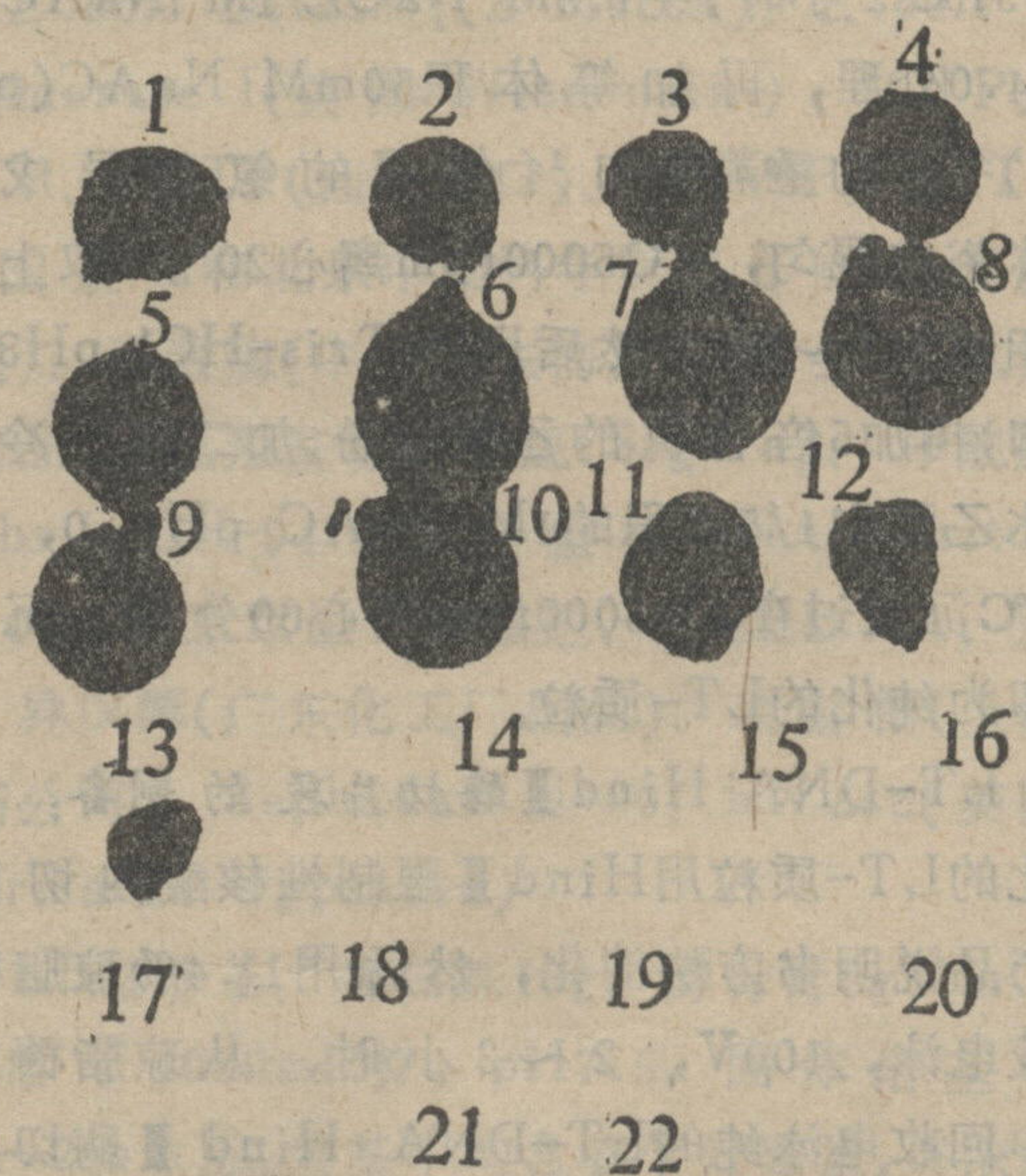


图2 敏感性试验

1→20号表示菌悬液的活菌浓度,由1号管(7.4×10^{12} 菌/ml)连续10倍稀释的管数。13号管的浓度约7个菌/ml,14号以下<1个菌/ml,21号:阴性大便加NS,22号:LT⁻株C600。

法，需超速离心连续50多小时，费用昂贵，耗时很多，一般实验室不具备条件。我们用琼脂糖凝胶电泳方法，时间节省10多倍，费用节省几十倍，而且不需特殊设备仍可得到电泳纯的LT-DNA质粒来满足工作需要。国产同位素探针的试制成功为进一步在国内开展探针技术创造了有利条件。基因探针一般由10~20个核苷酸组成，以检测样品中同源的核苷酸序列，只要制备探针的这段基因纯度很高，则出现假阳性的可能性就很小，它不易受样品中非特异性因素的影响，其它影响细菌产生肠毒素的各种因素也不会影响探针的检测，所以其特异性比较高。检测ETEC的其它方法都需要先分离鉴定可疑菌株，手续较繁，需几天时间，我们对粪便标本直接检测获得成功，大大节省了时间、试剂药品和器材，每份标本的费用比将粪便作细菌学培养、分离、鉴定的费用减少，而且一次可以检测数百份标本，便于现场大量人群标本的筛选和流行病学调查。因此基因探针虽然还存在同位素的半衰期短、有污染环境等问题，但一般仍公认为流行病学调查的一个有用工具。

摘 要

LT基因探针是新近发展起来检测ETEC-LT⁺菌的一个快速诊断方法。本文较详细地介绍了它的制作方法并对其特性作了进一步地探讨。结果表明LT探针的特异性较强、敏感性较高，可测定7个菌/ml菌悬液和35个菌/ml粪便悬液（直接在硝酸纤维素滤膜上点样，用DNA-DNA原位杂交法检测）。基因探针法操作比常规的粪便培养分离鉴定简单、经济，有效期可达45~60天，一次能检测大量标本，这些特点使它适用于现场的大量标本检测和流行病学调查，因此将为深入研究ETEC的流行病学提供一个有用的工具。

ABSTRACT

LT gene-probe is a new and rapid diagnostic method for detecting LT⁺-ETEC. In this paper preparation and characterization of LT gene-probe were described in detail. Its specificity and sensitivity are better than other assays. It is possible to detect LT⁺ strains containing about 7 cells per ml in

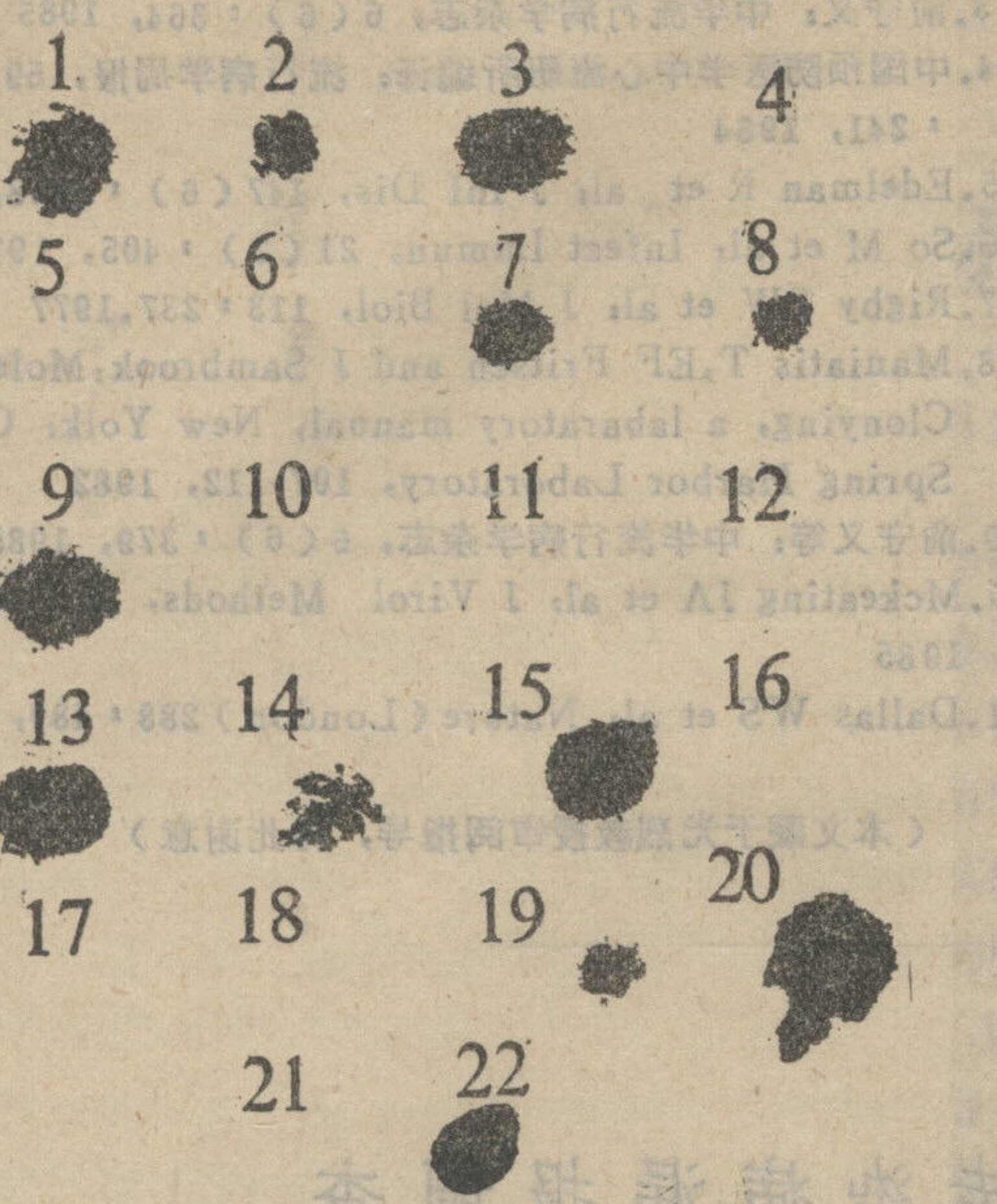


图3 粪便直接测定(定性试验)

1→3、7→9、13→15、19→20含LT⁺菌的粪便标本，4→6、10→12、16→18LT⁻粪便标本对照组21:LT⁻参照菌C₆₀₀、22:LT⁺参照菌55-2。

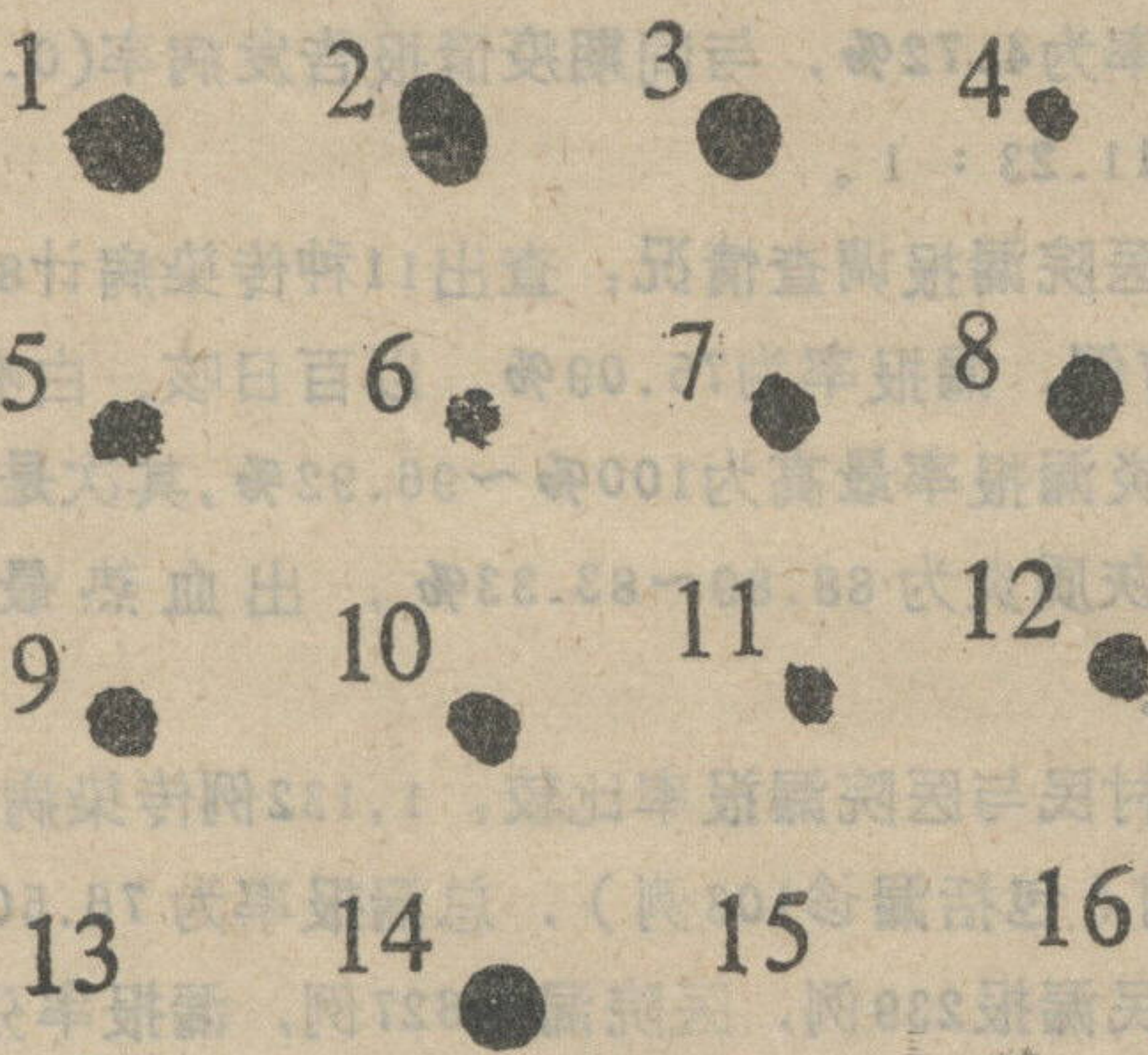


图4 粪便直接测定(定量试验)

1→13号表示LT⁺参照菌悬液(~6亿/ml)作10倍连续稀释的管数,第12号的活菌浓度为35个菌/ml粪便悬液,对照组;14号:LT⁺参照菌55-2,15号:LT⁻参照菌C₆₀₀,16号:LT⁻粪便加NS。

讨 论

八十年代以来国外已经开始应用探针技术在现场进行大量的病原菌筛选和流行病学研究。1985年我们首先在国内用LT探针在现场作初步的流行病学研究^[9]。本文介绍了LT探针的制备及其特性，一般文献在提取高纯度的LT-DNA质粒都采用蔗糖氯化铯梯度离心方

normal saline and 35 cells per ml in stool suspension respectively by direct DNA-DNA *in situ* hybridization on the nitrocellulose filters. The operation of the LT gene-probe is quite simple and cheap comparing with routine stool culture method. The effective period of the probe may last for 45-60 days and so makes it suitable for screening large numbers of sample during epidemiological survey. Therefore, the LT gene-probe will provide a useful tool for further epidemiological studying of the ETEC.

参 考 文 献

1. Lee CH et al: Infect Immun, 42(1): 264, 1983
2. Moseley SL et al: Inf Dis, 142(6): 892, 1980

3. 俞守义: 中华流行病学杂志, 6(6): 364, 1985
4. 中国预防医学中心流研所编译: 流行病学周报, 59(32): 241, 1984
5. Edelman R et al: J Inf Dis, 147(6): 1108, 1983
6. So M et al: Infect Immun, 21(2): 405, 1978
7. Rigby PW et al: J Mol Biol, 113: 237, 1977
8. Maniatis T, EF Fritsch and J Sambrook: Molecular Cloning, a laboratory manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 107-112, 1982
9. 俞守义等: 中华流行病学杂志, 6(6): 379, 1985
10. Mckeating JA et al: J Virol Methods, 11: 207, 1985
11. Dallas WS et al: Nature (London) 288: 489, 1980

(本文蒙于光烈教授审阅指导, 特此谢意)

耒阳县1985年法定传染病漏报调查

湖南省耒阳县卫生防疫站 徐秋贵 曹慧兰 伍开生 谢庭秀 朱和龙 刘后梓

1985年11月20日至12月5日对1个县医院10个乡41个村民小组1,487户6,295人进行了1~10月法定传染病漏报调查, 现将结果报告如下:

一、内容和方法:

1. 调查点的选择: 按照《全国漏报率调查方案》, 以县城为中心, 将全县划分为东、南、西、北、中五片, 每片随机抽取2个乡, 每个乡抽取4个村, 每个村抽取一个村民小组为调查单位。有当地正式户口的村民为调查对象, 每片调查村民1,000人以上。法定传染病总病例数不少于24例, 若低于上述两个数据, 要进一步扩大调查单位。县属医院为该次必查单位。

2. 村民漏报调查: 对点区村民采取挨户普查的方式, 根据患者或家属的回顾, 参照“法定传染病临床诊断参考依据”, 详细填写疫情漏报、漏诊登记表, 再与初诊医院和防疫站核对传染病登记簿和报告卡片, 凡未报告的病例属于漏报。

3. 医院漏报调查: 查门诊、住院部传染病登记簿的确诊病例, 进行逐个登记, 再与防疫站核对报告卡片, 无报告卡片者为漏报病例。病种构成与县传染病发病情况相符。

二、结果:

1. 村民漏报调查综合情况: 本次调查1,487户6,295人, 查出4种传染病(痢疾、肝炎、流脑、麻疹)297例, 其中就诊病例194例, 平均就诊率为65.32%。

各片就诊率有不同, 最高为92.86%, 最低为43.37%。总发病率为4.72%, 与同期疫情报告发病率(0.42%)之比为11.23:1。

2. 医院漏报调查情况: 查出11种传染病计835例, 漏报627例, 漏报率为75.09%。以百日咳、白喉、痢疾、肝炎漏报率最高为100%~96.92%, 其次是伤寒、麻疹、灰质炎为88.89~83.33%, 出血热最低为5.41%。

3. 村民与医院漏报率比较: 1,132例传染病, 漏报866例(包括漏诊103例), 总漏报率为76.50%。其中村民漏报239例, 医院漏报627例, 漏报率分别为80.47%和75.09%, 两者无显著差异($t=1.88$, $P>0.05$)。

4. 各种传染病就诊及漏报情况: 从11种1029例就诊病例看, 其中漏报763例, 就诊漏报率为74.15%, 以白喉、百日咳、肝炎、痢疾就诊漏报率最高为100%~90.31%, 其次是伤寒、灰质炎、麻疹、钩体为88.89~68.42%。痢疾(677例)、流脑(139例)病例较多。

鉴于上述情况, 笔者建议抓好疫情管理工作, 应加强对法定报告人《急性传染病管理条例》法制教育, 建立健全疫情报告、门诊病历日志制度, 提高各级医务人员的诊断水平, 定期检查疫情报告工作, 保证疫情报告准确无误。