

微小隐孢子虫DNA 探针的制备

郭步平¹ 张建斌¹ 连德润²

1 长治医学院寄生虫学教研室 长治 046000

2 中山医科大学寄生虫病研究所 广州 510089

提要 目的: 制备一种高度特异敏感的隐孢子虫检测探针。方法: 应用聚合酶链反应 (PCR) 扩增微小隐孢子虫的一段核苷酸片段, 扩增产物 452 bp DNA 用半抗原地高辛标记制备成探针。结果: 经敏感性试验, 该探针可检测 2 pg 水平的隐孢子虫 DNA。用该探针与隐孢子虫 DNA 和溶组织内阿米巴、贾第虫、大肠杆菌及痢疾杆菌等相关生物体的 DNA 和隐孢子虫宿主的 DNA 进行斑点杂交试验, 该探针只与隐孢子虫 DNA 杂交。结论: 该探针具有高度特异性和较高敏感性。

关键词 微小隐孢子虫 DNA 探针 杂交

隐孢子虫病为人、畜共患的寄生虫病。隐孢子虫可引起人和多种动物腹泻, 也是艾滋病致死性合并感染病症之一^[1]。目前, 隐孢子虫的实验诊断普遍采用粪便涂片染色、显微镜检查卵囊的方法。在标本中卵囊含量少时, 本法检出率低, 易漏检, 且粪便涂片常含有较多非特异性染色颗粒易与卵囊混淆, 非专业镜检人员较难区别; 标本量大可致镜检人员眼疲劳而影响检查结果的准确性。近年来, 核酸探针技术广泛用于疾病诊断, 在特异性和灵敏性方面显示出优越性。本文采用 PCR 产物制备微小隐孢子虫 DNA 探针, 为隐孢子虫实验诊断和生物学鉴定寻找高度特异、敏感的探针。

材料与方 法

虫株 人源微小隐孢子虫卵囊由徐州医学院寄生虫学教研室陈有贵老师提供。

主要试剂 Taq DNA 聚合酶, 蛋白酶 K (广州华美生化试剂公司产品), 地高辛 DNA 标记及检测试剂盒 (德国 Boehringer Mannheim 公司产品)。

DNA 抽提

溶组织内阿米巴、大肠杆菌、痢疾杆菌等对照材料 DNA 的抽提, 参照文献^[2]进行。微小隐孢子虫 DNA 采用酚/氯仿抽提、乙醇沉淀法获得。将已纯化的约 10^7 卵囊置 1.5 ml Eppendorf 管中。先用 STE 洗涤 3 次, 除去 2.5% 重铬酸钾保存液, 沉淀加 350 μ l TE 混合, 在冰浴中超声粉碎 (30 s \times 5, 22 μ m)。再加 100 μ l 蛋白酶 K (终浓度 2 μ g/ μ l), 50 μ l 10% SDS (使终浓度达 1%), 混匀后 58 $^{\circ}$ C 水浴 48 h, 其间振荡数次。用等体积饱和酚/酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇 (24 : 1) 各抽提 1 次, 移水相至新管中, 加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2), 2 倍体积无水乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷) 混匀, 置

-20 $^{\circ}$ C 4-5 h, 6 000 g 离心 10 min, 弃水相, 沉淀用 70% 乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷) 离心洗涤 2 次。低压泵抽干 30 min 后加适量 TE 溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

隐孢子虫 DNA 探针制备

452 bp DNA 片断 PCR 扩增 根据 Laxer 等^[3]克隆的 *C. parvum* 核苷酸序列设计一对特异性引物:

P1: 5' -GGAACTGCCGAGTTTGA TCC-3'

P2: 5' -TCATATGCCTTATTGAGTAT-3'

扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 45 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 次循环。

DNA 探针标记 将上述 PCR 扩增的 452 bp DNA, 经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀后, 溶解于 TE 中。经分光光度法测定, 浓度为 0.02 μ g/ μ l, 标记反应按地高辛标记试剂盒说明, 采用随机寡核苷酸引物法标记的 DNA, 溶于 TE 中保存备用。

斑点杂交试验

探针敏感性检测 取 0.02 μ g/ μ l 的隐孢子虫 DNA 溶液 1 μ l, 以 TE 液稀释 DNA 系列浓度为: 20 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, 200 pg/ μ l, 20 pg/ μ l, 2 pg/ μ l, 200 fg/ μ l 及 20 fg/ μ l。每管各取 1 μ l 经变性处理后点于硝酸纤维素膜上, 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2 h, 预杂交 2 h, 杂交过夜。洗膜后用抗 Dig-AP 及 BCIP-NBT 作用显色。

探针特异性测定 将抽提的隐孢子虫 DNA (2 ng/ μ l) 和溶组织内阿米巴、大肠杆菌及痢疾杆菌等相关生物材料的 DNA (5 ng/ μ l) 经变性处理后各取 2 μ l 点于杂交膜上, 杂交过程同上。

结果与讨论

本文采用 PCR 产物-地高辛标记制备探针方法

制备的隐孢子虫探针，具有较高的敏感性，可检测 2 pg 水平虫体 DNA (图 1)。特异性检测结果表明其仅与微小隐孢子虫 DNA 杂交，不与溶组织内阿米巴等相关生物材料及宿主 DNA 杂交，具有高度特异性 (图 2)。

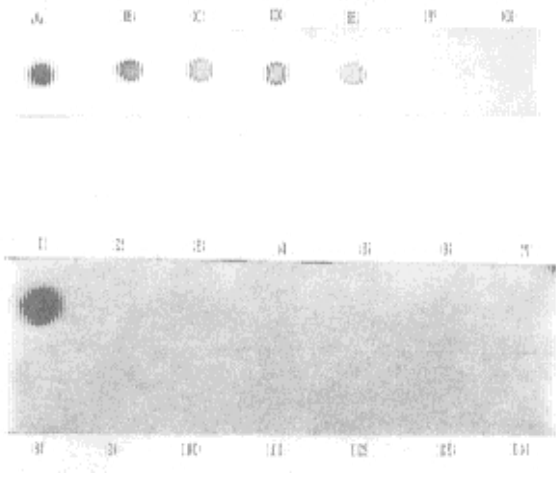


图 1 隐孢子虫地高辛标记探针敏感性检验结果 A 20 ng B 2 ng C 200 pg D 20 pg E 2 pg F 200 fg G 20 fg 图 2 隐孢子虫地高辛标记探针特异性检验结果 1 隐孢子虫 2 溶组织内阿米巴 3 大肠杆菌 4 痢疾杆菌 5 蛔虫 6 华支睾吸虫 7 人血 8 并殖吸虫 9 弓形虫 10 日本血吸虫 11 恶性疟原虫 12 贾第虫 13 牛血 14 鼠血

Fig. 1 Results of the sensitivity detection of dig-labeled probe of *C. parvum* A 20 ng B 2 ng C 200 pg D 20 pg E 2 pg F 200 fg G 20 fg Fig. 2 Results of specificity detection of dig-labeled probe of *C. parvum* Lanes 1- 14 *C. p.*, *E. h.*, *E. c.*, *D. b.*, *A. l.*, *C. s.*, human blood, *P. w.*, *T. g.*, *S. j.*, *P. f.*, *G. l.* bovine blood, rat blood, respectively

PCR 扩增产物标记制备探针方法是近年来发展的一种新的制备探针的方法。由于 PCR 的高效忠实性复制可用来大量生产 DNA 探针，从根本上解决了探针来源不足。人工合成方法只能制备 20-30 bp 寡核苷酸探针。而用 PCR 法制备探针方法简便，成本较低，制备的大片段核苷酸探针比寡核苷酸探针特异性和敏感性均高。

放射性同位素半衰期短，其标记探针寿命亦短，且射线对人体有一定损害。进口无机 ³²P 原料，费用昂贵，以及防护、稳定性和安全性等限制了该标记技术的广泛应用^[4]。非放射性标记技术可克服上述缺点，但用于隐孢子虫探针研究文献较少^[5]。本实验选择 PCR 扩增产物地高辛标记制备探针结果满意，可用于该虫感染时的实验室诊断。

参 考 文 献

- 1 Fayer R, Unger BL. *Cryptosporidium* spp and cryptosporidiosis *Microbiol Rev* 1986; 50 458
- 2 郭步平, 连德润 聚合酶链反应技术在隐孢子虫检测中的应用研究 *中国人兽共患病杂志* 1998; 14(2) 33
- 3 Laxer MA, Timblin BK, Petel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45 688
- 4 王申五主编 基因诊断技术 第 1 版 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1993 1
- 5 Ortega YR, Sheehy RR, Cama VA, et al Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin *J protozool* 1991; 38(6) 40 S

1998 年 4 月 27 日收稿 1998 年 8 月 24 日修回 (编辑: 富秀兰)

PREPARATION OF DNA PROBE FOR CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

GUO Buping¹, ZHANG Jianbin¹, LIAN Derun²

1 Department of parasitology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000
2 Institute of parasitology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089

ABSTRACT

AM: To prepare a probe with high specificity and sensitivity for the detection of *Cryptosporidium parvum*. **METHODS:** Using PCR method, a fragment from the DNA of *C. parvum* was amplified. The PCR product, 452 bp DNA, was labeled with hapten digoxigenin. **RESULTS:** Examination of sensitivity showed that the DNA probe could detect as low as 2 pg DNA from *C. parvum*. The dot-blot hybridization assay showed that the probe hybridized with the DNA of *C. parvum*, but not hybridized with DNA of *E. histolytica*, *G. lamblia*, *E. coli* and *D. bacilli*. **CONCLUSION:** The probe was highly specific and sensitive for the detection of *C. parvum*.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, DNA probe, hybridization