

一、前言：

DNA 重組的技術，近年來已逐漸居於重要地位，尤其利用遺傳工程，將 DNA 重組，並製造出大量的 probe (探針)，其對病毒感染及癌症有很大的助益。並由於其高度專一性 (specificity) 及敏感度 (Sensitivity)，將來很可能會引起檢驗技術上的一大革命。

二、Restriction endonuclease

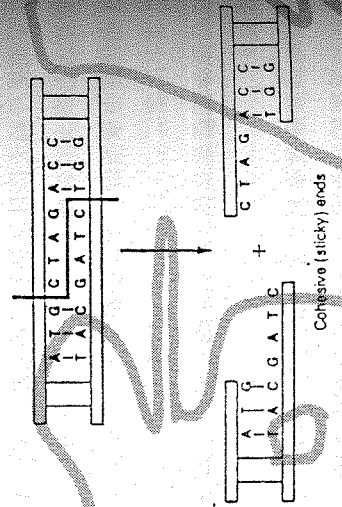
在製 DNA probe，使 DNA hybridization or recombinant 的時候，首先就是要取得一段想要的 DNA Sequence。而在取下來步驟中，就需要靠 Restriction endo-nuclease 的完成，將 cell lysis 後，就可以使用 REase 將 DNA 切成數段，不同的 REase 有不同的切割位置，而其切割法及位置如表一、圖一：

【表一】 TABLE I - SOME COMMONLY USED RESTRICTION ENDONUCLEASES AND THEIR SPECIFICITIES.

Enzyme	Sequence cleaved
BamHI	G↓GATCC CCTAG↑G
BglII	GCCNNNNN↓GGCC+ CCGGKNNNN↑CCG
EcoRI	G↓AATTC CTTAA↑G
HocIII	GGCC CCGG
HindIII	A↓AGCTT TTCGAA↑
MspI	C↓CGG GGC↑C
pssI	CTGCAG GACGTC
ToqI	T↓CGA AGCT↑
XbaI	T↓CTAGA AGATC↑

The sequence recognised and cleaved by a restriction enzyme is typically a palindrome - ie, it reads the same from left to right or, when inverted, from right to left + = any base and N' = its pairing counterpart

FIGURE 1
Cleavage by a restriction endonuclease

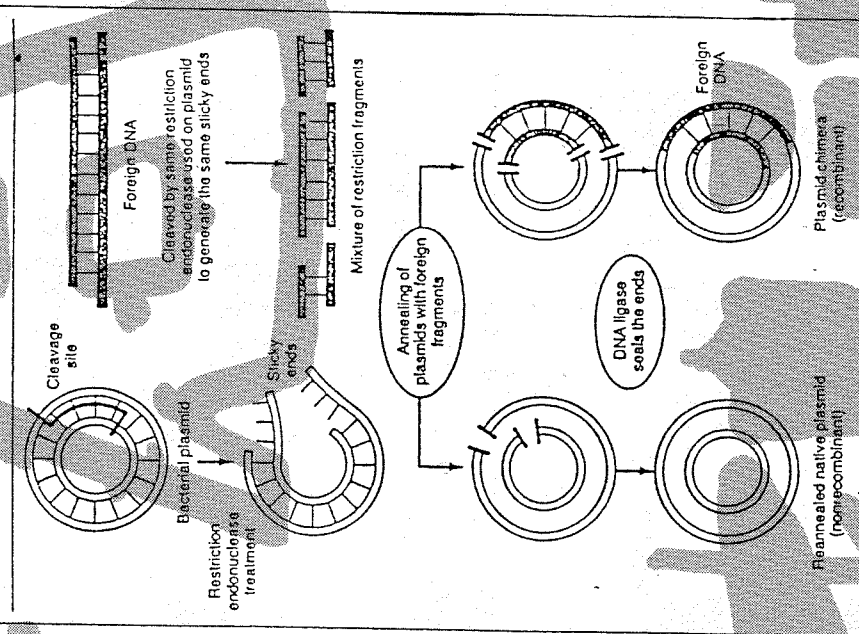


三、植入

利用 REase 取得之 DNA fragment，將之植入 (-) plasmid (E. coli 雙染色體之外，另外環形 DNA，專管藥 resistance 的 DNA。) 或 (-) bacteriophage (可利用 transduction 來大量製造) 或 (-) Cosmid (一種新的工程 plasmid，將一段 plasmid 接至 plage 上 eg. Lamde selgws site.)。植入後，利用不同性質以複雜。

植入的法則，就是利用同一種 REase，將 plasmid 切開，原來 DNA fragment 的 sticky ends 和切開 plasmid 之 sticky ends 之間的互補關係，利用 ligase 可再使其 recombinant 如圖

FIGURE 2
Construction of a recombinant cloning vector



四、Selection 選擇，篩選：

當將 Plasmid 植入 (or transform) 時常有一來 transform (-) 入沒有接上 DNA fragment 的 plasmid (transformant) 有 DNA fragment 的 plasmid，此時就需要 selection 利用 ampicillin 和 tetracycline resistance 的 medium 來篩選，由於當植入這段 fragment 到這兩個 gene 之一中間，就使其 inactive → 不產生 resistance 而利用 selective medium 篩選，如

【圖三】

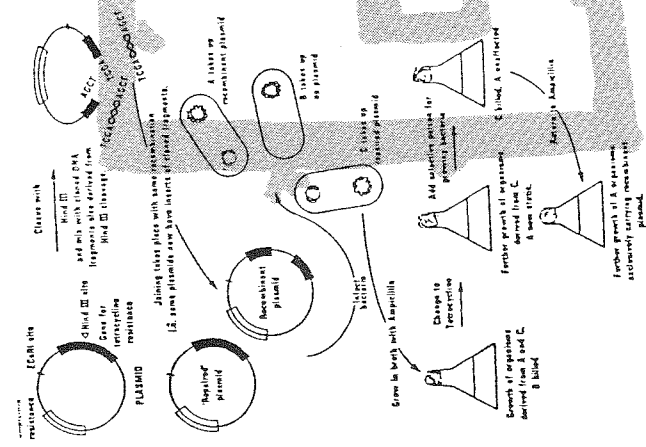
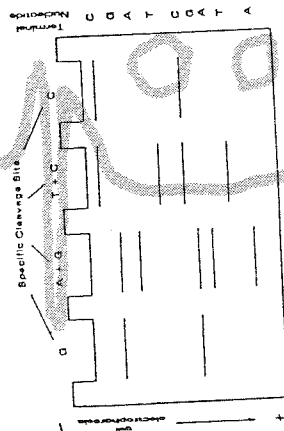


Fig 3—Selection for recombinant plasmids.

五、Determination of DNA sequence.

常使用的方法，是利用不同位置之 restriction endonuclease 切出不同的尾巴，接上標示物，而讓他在 electrophoresis 由跑出來的圖形，讀出 sequence。如圖四

【圖四】



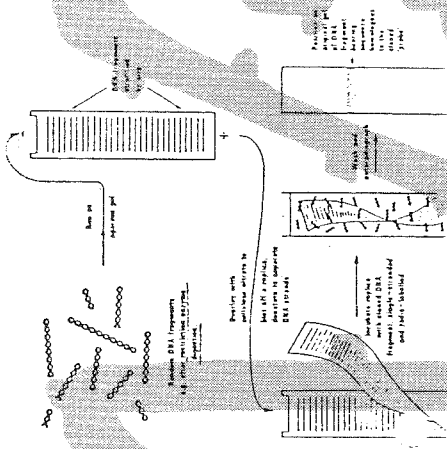
—DNA sequencing (Maxam and Gilbert technique).
 DNA sequence, radiolabeled at one end, is partly digested under four different reaction conditions, each of which cleaves nucleotide chain at specific base guanine, adenine or guanine, thymine or cytosine and the products, respectively, are in four parallel tracks of gel, and the products are read off from below several sequence of bases starting from the one adjacent to the point of labeling. Thus in the example above the sequence is 5'-ATAGCTAGC, where 'X' is the unknown labeled nucleotide. This Sanger technique is similar in principle but in that step a new labeled DNA strand is synthesized in one direction under four different conditions such that the chain is terminated at each of the four bases in turn.

六、Selective of Sequence.

常使用 Southern blotting 的方法，將 DNA，用 restriction endonuclease 切斷後，在 agarose gel 中擴散開來，用另一 cellulose nitrate, blot 上去，並分開這兩段，加入標示

的 probe，就可在原散開位置處有相同 Sequence 的『probe』。如圖五

【圖五】



七、Detector

(+) picking bacterial colonies

用無菌濾紙複製 colony map，加入 proe (含 radiolabeled) 測 c p m，知 colonies 位置，再將原 colonies 挑出純化，如圖六

【圖六】

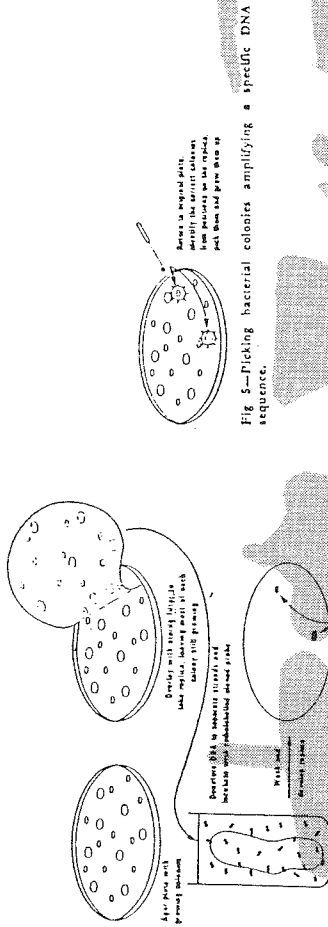
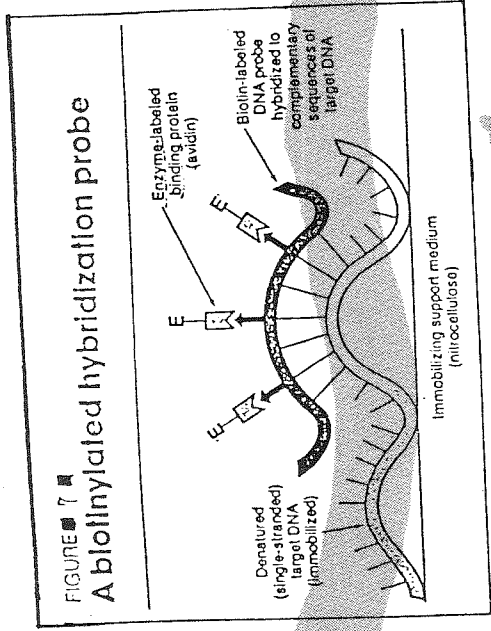


Fig 5—Picking bacterial colonies amplifying a specific DNA sequence.

(-) Biotinylated hybridization probe.

除了使用放射元素，也可使用 Biotin-labeled 的 DNA probe，其原理和 EHLISA 類似，如圖七

【圖七】



八、DNA probe 的優缺點

【 Advantage 】

- (一) eg. 流行性感官變異很大，Ag/Ab 方法則不能使用，但 DNA hybridization probe 却永遠有效。
- (二) rapid & Sensitivity
- (三) 目前已使用的範圍：

1. Hepatic B virus 2. CMV 3. herpes 4. E - B virus 5. HTLV- III 6. human papilloma virus 7. T.B. 8. chlamydia 9. other pathogen eg. chlamydia Ab 大家都有，測 titer 沒有意義，但測 DNA 則有重大意義，T.B 要 6 星期，太慢了，用 D.N.A.。

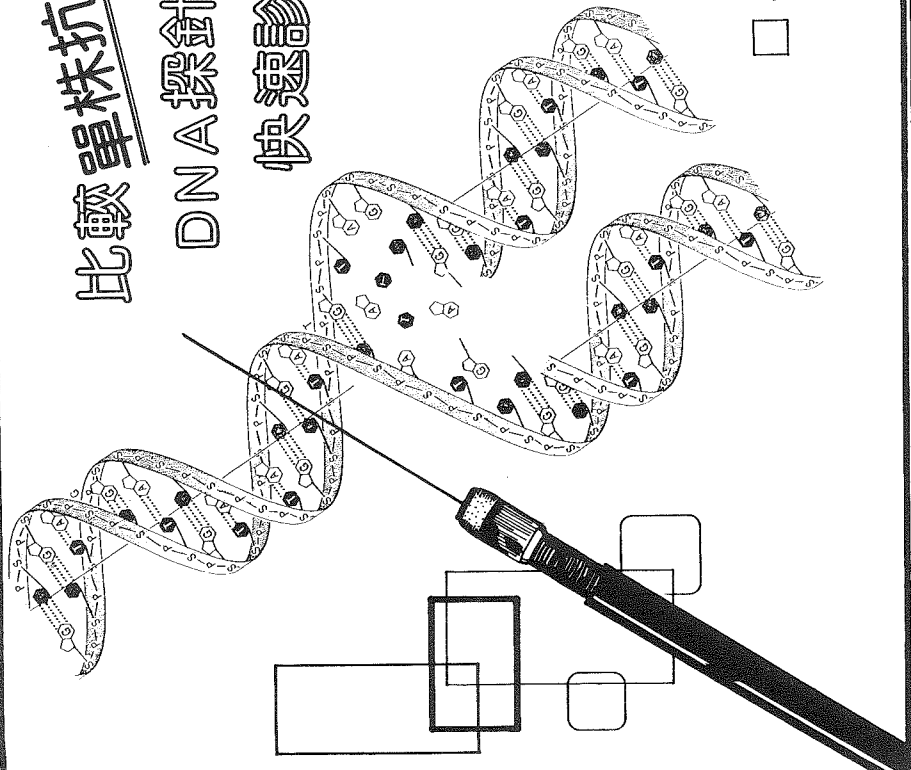
【 Disadvantage 】

- (一) P³² labeled 放射性很快消失，且 iso-tope 很多人不願去做。
- (二) DNA 不能診斷 pass infection 只能在 present infection
- (三) sensitivity error ↓

九、Reference

- (一) C.M. Steel ; DNA in Medicine ; The Lanat 1984, volume 1 p 908 ~ 911, p 966 ~ 968
- (二) A.J. Beary . RhD, and James B , petor. MD PhD: DNA probe for infection disease, Diagnostic Medicin.
- (三) Patricia M. Mickelsen, PhD :Molecular Biology- y Technique in the clinical Microbiology. Laboratory J of M.T 1985 2 : 3 p 161 ~ 165

比較單株抗體
DNA 探針
以及
快速診斷疱疹病毒



前言：DNA 探針及單株抗體同為目前偵測病原體的最佳利器，本文將討論以此二種方法與傳統培養方法做一比較。

取 167 個檢體直接以免疫螢光法 (immunofluorescence assay IFA) 及 DNA 探針 (probe) 測疱疹病毒 (herpes simplex virus HSV)，且以病毒培養做為 control 我們得到以下結果。

method	sensitivity	specificity	predictive positive	value negative
IFA	77.1	100	100	94
DNA probe	71.4	90.6	67.6	92

Table 2

本文，生殖形疱疹 (HSV) 感染在 20 年來有升高的趨勢，而嬰兒在生產時的感染率為 5 ~ 50 %，就檢驗方法而言；傳統的病毒培養需 2 天而 Pap smear 其 Sensitivity 為 26 ~ 75 %，快速準確的偵測方法於婦女生產時對 HSV 感染的篩檢是必須的，此外快速診斷能立即對於擴散性 HSV 感染及 HSV 腦炎，採取抗病毒治療。

原理：見 Fig 1