

霍乱弧菌毒素 (CT) 基因探针的制备及应用

徐永强 苏国富 刘传暄

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

摘要 用氯化铯-溴化乙锭密度梯度超离心法,分离纯化包含 CT 基因的重组质粒 pCT 332,以限制性核酸内切酶 Xba I + Bg III 酶切,在琼脂糖凝胶电泳后,从凝胶中回收 CT 基因,然后用 [α - 32 P] dATP 经 DNA 缺口翻译标记该基因。将 CT 基因探针与霍乱弧菌及其它细菌菌株杂交。试验指出,该探针与大肠杆菌 C 600, RR 1 和包含质粒 pBR 322 或 pBR 325 的 C 600 没有同源性;与痢疾杆菌和猪源、人源的 ETEC 杂交也呈阴性反应;当与 Y-1 肾上腺细胞和 GM 1 酶联免疫吸附试验阳性的霍乱弧菌杂交时,呈阳性反应。实验结果表明,CT 基因探针试验灵敏可靠,特异性好,它不仅在实验室内可用于筛选重组子和 CT 基因缺失突变体,而且可用于流行病学调查。

关键词 霍乱弧菌;霍乱毒素基因;基因探针;菌落原位杂交

目前发展起来的 DNA 探针技术不仅在实验室内用于检测重组子和研究基因间的关系,而且已用于临床诊断和流行病学调查。 Monj-

ardino 等^[1]用乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 基因

E. Coli C 600 (pCT 332) 由中科院微生物研究所陆德如同志馈赠,特此致谢。

探针检测肝炎病人的血清和肝脏标本, 研究肝炎和肝癌的关系。Echeverria^[2] 和 Seriwatana^[3] 等先后用 LT (不耐热肠毒素) 和 ST (耐热肠毒素) 基因探针对产毒性大肠杆菌 (ETEC) 进行了流行病学调查。Rubin 等^[4] 建立了测定 *Salmonella typhi* 的基因探针。最近 Mauvelli 等^[5] 把与弗氏痢疾杆菌 (*Shigella flexneri*) 浸入 Hela 细胞有关的基因片段克隆至大肠杆菌, 并用于选择重组子和研究不同种痢疾之间的关系。我们从包含 CT 基因的重组质粒 pCT 332 制备 CT 基因探针, 用它检测霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*), 大肠杆菌 (*E. coli*), 猪源和人源的 ETEC, 获得满意的结果。目前, 我们正在用该基因探针筛选 CT 基因缺失突变体。

材料和方法

(一) 试剂

[α -³²P]dATP (Amersham), dCTP、dGTP 和 TTP (均为 Boehringer 产品) DNase I (Sigma), 大肠杆菌 DNA 多聚酶 I (BRL), 牛血清白蛋白 (Servac laboratories), 葡聚糖 G-50 (Pharmacia), 硝酸纤维素滤膜 (上海第十制药厂), 小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司), 聚蔗糖 (Pharmacia), 聚乙烯吡咯烷酮 (Fluka AG.) 限制性核酸内切酶 Xba I 和 Bgl II (华美公司)。

(二) 菌种

本实验使用的主要菌株见表 1。E. coli C 600 (pCT 332) 为大肠杆菌 C 600 内存在一个包含 CT 基因的重组质粒 pCT332。该菌株由中科院微生物所陆德如同志馈赠。

(三) 制备 CT DNA 片段

用氯化铯-溴化乙锭密度梯度超离心法^[6] 分离纯化质粒 pCT 332, 用 Xba I + Bgl II 酶切 (按厂家的推荐条件), 用制备琼脂糖凝胶电泳法^[7] 从凝胶中回收 CT 基因片段。

(四) [α -³²P]dATP 标记 CT 基因

基本参照苏国富等^[8] 报道的 DNA 缺口翻译法, 用 [α -³²P]dATP 标记 CT DNA, 在 100

表 1 细菌菌株

菌株	肠毒素基因	来源
霍乱弧菌		
RV79	CT+	Mekalanos
569B	CT+	生物制品检定所
18001	CT+	生物制品检定所
18003	CT+	生物制品检定所
82178	CT+	生物制品检定所
82179	CT+	生物制品检定所
16186	CT+	生物制品检定所
16187	CT+	生物制品检定所
吴江 2	CT+	生物制品检定所
滨 43	CT+	生物制品检定所
E. coli C600(pCT332)	CT+	Gennaro
大肠杆菌 E. coli K12		
C600	LT-	中科院微生物所
RR 1	LT-	澳大利亚联邦科学院分子生物室
C600 (pBR 322)	LT-	中科院微生物所
C600 (pBR 325)	LT-	本院王家玺提供
44813	LT-	生物制品检定所
44814	LT-	生物制品检定所
C600 (EUD299)	LT-	美国 Falkaw 教授提供
C600 (p 307)	LT+ST+	美国 Maas 教授提供

μ l 反应液内, 含 50—100 μ l [α -³²P]dATP, 50 m M Tris-HCl (pH 7.9), 50 m M MgCl₂, 10 m M β -巯基乙醇, 5 μ g 牛血清白蛋白, dGTP、dCTP 和 TTP 各为 20 μ m, 1 μ g CT DNA, 100 ng DNase I, 室温反应 1 分钟, 加入 10—20 单位大肠杆菌 DNA 多聚酶 I, 14 $^{\circ}$ C 反应 3 小时, 加入 60 μ l 0.25 M Na₂EDTA (pH 8.0) 终止反应。过 Sephadex G-50 柱, 部分收集, 从各管取 1 μ l 于 LKB 1215 液体闪烁计数器计数, 收集第一个放射性峰。

(五) 菌落原位杂交

先在硝酸纤维素滤膜上用铅笔划成一定尺寸的方格, 在紫外光灭菌后置于 LB 平皿上, 以灭菌牙签将待测菌株点种于该滤膜上, 置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从平皿上揭下滤膜, 置于用 0.5 N NaOH 浸湿的二层新华滤纸上 5 分钟, 再重复一次。用同法以 1 M Tris-HCl (pH 7.6) 处理二次, 每次 7 分钟, 这时应使滤膜变成中性 (可用 pH 试纸测试)。再以 1.5 N NaCl-0.5 M Tris-HCl (pH 7.6) 处理 10 分钟。在空气中

晾干后,置 80℃ 2 小时。然后在 37℃ 予杂交 4 小时(或过夜),再杂交 24 小时。取出滤膜,以 2×SSC-0.5% SDS 在 56℃ 漂洗 2 小时,晾干后,置 80℃ 2 小时,于 -60℃ 放射自显影。

(六) Y-1 肾上腺细胞试验

测定 CT 毒素按照 Sack 等^[9]报道的 Y-1 肾上腺细胞法进行。

结果和讨论

(一) CT 基因探针的纯度

含 CT 结构基因的重组质粒 pCT 332 由 Gennaro 等^[10]构建。他们将霍乱弧菌染色体的 Pst I + Eco R I 片段(该片段为 4.3 kb,与 ETEC 的 LT 基因杂交有交叉反应)重组入质粒 pBR 322 的衍生质粒 pAT 153 得重组质粒 pCT 332,并进一步证实了 CT 结构基因包含在 4.3kb 片段的 Xba I + Bgl II 片段内, Xba I + Bgl II 片段为 1.8kb。

我们用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法纯化重组质粒 pCT 332,然后按材料与方法部分所述,以 Xba I + Bgl II 酶介 pCT 332,琼脂糖凝胶电泳后,从凝胶中回收 1.8kb 的 DNA 片段,用 [α -³²P] dATP 经 DNA 缺口翻译将它制成 CT 基因探针。

为了试验用上述方法制备的 CT 基因探针用于菌落原位杂交是否足够纯,我们将它分别与霍乱弧菌 RV 79、大肠杆菌 C 600、RR 1 和含质粒 pBR 322、pBR 325 或 pCT 332 的 C600 杂交,杂交结果见图版 I-1。由图版 I-1 可见,该 CT 基因探针与霍乱弧菌 RV 79 和包含质粒 pCT 332 的 C 600 杂交阳性,与大肠杆菌 C 600、RR 1 和包含质粒 pBR 322 或 pBR 325 的 C 600 杂交阴性,与予计的完全一致。结果表明用本文所叙述的方法制备的 CT 基因探针,用于菌落原位杂交是足够纯的,它既不包含大肠杆菌的染色体成分,也没有质粒 pAT 153 成分的污染。在理论上当用 Xba I + Bgl II 酶介重组质粒 pCT 332 时有可能会产生一个包含部分载体或与毒素无关的霍乱弧菌染色体

DNA 片段,其大小与 1.8kb 接近,琼脂糖凝胶电泳无法将它们分开,从而影响了探针的纯度。但是由于重组质粒 pCT 332 本身不大,只有几个 kb 大小,所以存在这种情况的可能性很小,我们的试验证实了这一点。

(二) 用 CT 基因探针检测霍乱弧菌的可靠性和特异性

为了证明用本法制备的 CT 基因探针用菌落原位杂交法检测霍乱弧菌的可靠性,将该探

表 2 三种不同方法测定 9 株 CT⁺ 霍乱弧菌结果

菌株	毒素基因	菌落原位杂交	Y-1 细胞	GM1 酶联免疫吸附试验
吴江 2	CT ⁺	+	+	+
滨 43	CT ⁺	+	+	+
16186	CT ⁺	+	+	+
16187	CT ⁺	+	+	+
18001	CT ⁺	+	+	+
18003	CT ⁺	+	+	+
82178	CT ⁺	+	+	+
82179	CT ⁺	+	+	+
569 B	CT ⁺	+	+	+

针与 9 株已知产毒素的霍乱弧菌杂交(图版 I-2),并用 Y-1 肾上腺细胞和 GM 1 酶联免疫吸附试验对这 9 株霍乱弧菌的产毒能力进行测定,并将这三种方法获得的结果进行比较(见表 2)。由表 2 可知,CT 基因探针与 9 株 CT⁺ 的霍乱弧菌杂交均为阳性。从表 2 的数据可以看出 CT 基因探针杂交结果与 Y-1 肾上腺细胞和 GM 1 酶联免疫吸附试验的结果完全一致。在尔后对大量流行株的检测表明,凡能产毒的霍乱弧菌与探针杂交均为阳性。由此可见,用 CT 基因探针进行菌落原位杂交检测霍乱弧菌可获得可靠的结果。

由于 LT 基因与 CT 基因有 75% 同源^[11],为了试验 CT 基因探针是否与 LT 基因有交叉反应,将该基因探针与 LT⁺ 的人源和猪源的大肠杆菌 44813、44814、EWD 299 和 Entp 307 进行菌落原位杂交。结果表明(图版 I-3),当在严谨的条件下杂交时即杂交液内甲酰胺的浓度为 50% 时,CT 探针与 LT⁺ 菌株杂交结

果为阴性,因此 CT 基因探针是非常特异的,可以鉴别 LT 基因与 CT 基因。一般说来,当杂交液内甲酰胺的浓度低于 30% 时,CT 与 LT 杂交呈弱阳性反应。但在我们的试验中,当甲酰胺的浓度下降至 25% 时仍未出现阳性结果。

(三) 用 CT 基因探针检测基因型和表型未知的霍乱弧菌

我们用本实验制备的 CT 基因探针检测 25 株基因型和表型未知的霍乱弧菌(图 4)(由浙江省卫生防疫站和本院五所提供)。由图 4 可见,第 5、7、9 和 19 号菌株与 CT 基因探针无同源性,其余 21 株杂交结果均为阳性。同时用 Y-1 肾上腺细胞和 GM1 ELISA 分别对这 25 株菌进行测定,后二方法所得结果第 5、7、9 和 19 号菌也是阴性,与杂交试验完全相符。所不同之处是 GM1 ELISA 试验第 8 号菌也呈阴性,这可能是该法的灵敏度低于 Y-1 细胞和基因探针技术。当 CT 基因探针与一些痢疾杆菌 (*Shigella sonnei*, *S. flexneri* 和 *S. dysenteriae*) 和一些猪源及人源的 ETEC 进行杂交时,没有发现它们之间有同源性。

总之,实验证明,按本文所述的方法制备的 CT 基因探针与大肠杆菌 C 600、RR 1 和质粒

pBR 322、pBR 325 没有同源性;与痢疾杆菌也不杂交;在 50% 甲酰胺系统中,与人源及猪源的 ETEC 也无交叉反应,只专一地与 CT⁺ 的霍乱弧菌杂交。当用该探针检测基因型和表型未知的霍乱弧菌时,所得结果与用 Y-1 肾上腺细胞和 GM1 ELISA 测得的结果相符,证明基因探针技术不仅灵敏,而且特异可靠。鉴于基因探针技术有上述优点,本方法不仅适用于实验室内筛选重组子和研究基因间的关系,而且可用于临床诊断及流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] Monjardino, J. et al.: *Medical Virology*, 9: 189—199, 1982.
- [2] Echeverria, P. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 1086—1090, 1982.
- [3] Seriwatana, J. et al.: *Infect. Immun.*, 42: 152—155, 1983.
- [4] Rubin, F. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 22(4): 600—605, 1985.
- [5] Maurell, A. T. et al.: *Infect. Immun.*, 49: 164—171, 1985.
- [6] Bazaarae, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 36: 185, 1968.
- [7] 徐永强等: *军事医学科学院院刊*, 5: 487—489, 1983.
- [8] 苏国富等: *遗传*, 6: 35—37, 1984.
- [9] Sack, D. A. et al.: *Infect. Immun.*, 11: 334—336, 1975.
- [10] Gennaro, M. L. et al.: *Nucleic Acids Research*, 10: 4883—4890, 1982.
- [11] Mekalanos, J. J. et al.: *Nature*, 306: 551—557, 1983.