

专论与综述

多位点酶电泳在禽病原性大肠杆菌

遗传相关性研究中的应用

高 崧 刘秀梵

(扬州大学农学院动物医学系, 扬州 225009)

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是引起人和家畜肠道外感染的常见病原。在禽类, 它们通常首先感染呼吸道, 透过粘膜后进入血液, 并引起包括大肠杆菌败血症、气囊炎和心周炎在内的各种疾病。家禽大肠杆菌病中常分到 O1、O2 和 O78 等几个有限的血清型^[1]。最近发现对禽病原性大肠杆菌进行血清学分型很难反映菌株间的遗传相关性。Whittam 和 Wilson 对 79 株鸡病原性大肠杆菌进行多位点酶电泳 (multilocus enzyme electrophoresis) 分析时发现, 82% 受试菌株属 A 和 B 克隆群 (clusters of clones), 且各自均包含了一定数量的 O2: K1 分离株, 说明 O2: K1 分离株在染色体背景下发生了分化^[2]。多位点酶电泳为分析禽病原性大肠杆菌的染色体基因型, 进一步揭示其遗传相关性, 提供了一条新的途径。现就这方面的报道, 综述如下:

1 多位点酶电泳法的基本原理

多位点酶电泳法, 起初应用于真核生物同工酶的研究, 基于细菌亦能产生多种水溶性酶类, 近十余年来, 该技术便在细菌遗传多样性 (genetic diversity) 的研究中得到应用。

多位点酶电泳法常涉及到的水溶性酶类有: (1) 氧化还原酶类 (如酒精脱氢酶即 ADH 等); (2) 转移酶类 (如谷草转氨酶即 GOT 等); (3) 水解酶类 (如 β -半乳糖苷酶即 BGA 等); (4) 裂解酶类 (如顺乌头酸酶即 ACO 等); (5) 异构酶类 (如甘露糖磷酸异构酶即 MPI 等)。

多位点酶电泳, 是根据细菌的上述各种水溶性酶的相对电泳迁移率 (relative electrophoretic mobility) 测定其遗传相关性

的。氨基酸序列决定了该蛋白质所带的静电荷的多少, 从而决定了该蛋白质的电泳迁移率。因此, 某种酶的迁移率变体 (mobility variants), 即异型酶 (allozyme), 直接反映了相应结构基因位点上等位基因的变异情况。依据菌株间某种异型酶的不同迁移率条带的数目, 就可推测结构基因上决定该酶的等位基因的变异次数。每一变异, 均属该位点的一个等位态 (allelic state)。对多态性位点, 电泳所得条带的编号, 是按其向正极迁移逐渐减少的顺序排列的, 所有受试位点每一条带的不同组合 (多位点基因型), 称为一个电泳型 (electrophoretic type, ET), 或称一个克隆, 电泳型相近 (受试位点中只个别出现变异的) 的克隆, 称为 1 个克隆群 (cluster of clones)。

值得一提的是, 上述各种水溶性酶类的显色所采用的底物、偶合酶 (Coupling enzyme)、辅酶 (Coenzyme)、缓冲液和盐以及染料, 不仅在上述 5 类酶间不同, 而且在每一类酶中的各种酶间亦不同, 即每种酶均为专一性染色^[3]。

表 1 5 个分离株电泳型举例

菌株号	酶位点上的等位基因			
	A	B	C	D
1	1	3	4	2
2	1	3	3	2
3	1	3	5	1
4	1	2	1	3
5	1	1	2	3

国家自然科学基金及江苏省教委自然科学基金资助项目
1994-11-28 收稿

2 多位点酶电泳的结果分析

假定对 5 个菌株的 4 种(同种)异型酶进行分析,结果如表 1。

由表 1 可知,对等位基因 A,1 号条带在 5 个菌株中出现 5 次,故其出现频率为 $5/5=1.00$;对等位基因 B,1 号条带出现 1 次,其出现频率为 $1/5=0.20$,2 号条带出现 1 次,其出现频率为 $1/5=0.20$,3 号条带出现 3 次,其出现频率为 $3/5=0.60$,依此类推。于是,我们得到表 2。

表 2 5 个菌株中等位基因的出现频率

酶位点	等位基因出现频率				
	1	2	3	4	5
A	1.00				
B	0.20	0.20	0.60		
C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
D	0.20	0.40	0.40		

为求得各酶位点(A 至 D)的遗传多样性,可采用公式: $h = 1 - \sum X_i^2 [n / (n-1)]$ 。这里 X_i 代表酶位点上第 i 等位基因的出现频率, n 为分离株的数目, $n / (n-1)$ 是对少量样品所产生偏差(bias)的校正^[3]。

A 位点,只有 1 个等位态,其 $h_A = 0$

B 位点,有 3 个等位态, $h_B = 1 - (0.20^2 + 0.20^2 + 0.60^2) \times 5 / 4 = 0.45$;

C 位点,有 5 个等位态, $h_C = 1 - (0.20^2 + 0.20^2 + 0.20^2 + 0.20^2) \times 5 / 4 = 0.75$

D 位点,有 3 个等位态, $h_D = 1 - (0.20^2 + 0.40^2 + 0.40^2) \times 5 / 4 = 0.55$

4 个位点平均遗传多样性 \bar{h} 为:

$$\bar{h} = \frac{0 + 0.45 + 0.75 + 0.55}{4} \approx 0.437$$

而 Nei 则提出,上述公式应略加完善,即:

$h = n(1 - \sum p_i^2) / (n - 1)$, p_i 与上式 X_i 含义相同,他还认为,平均遗传多样性(\bar{h})应取各个位点遗传多样性的标准差^[4]。

为考察分离株间遗传差异的大小,必须计

算分离株对(pairs of isolates)间的遗传距离。任两个分离株就构成了分离株对,所谓分离株对间的遗传距离,则是指上述两个分离株之间受试酶位点上等位基因的变异率。如 1 号分离株与 1 号分离株间所有 4 个酶位点上等位基因均相同,故其遗传距离为 0;1 号分离株与 2 号分离株间,4 个酶位点中有一对等位基因不同,故其遗传距离为 $1/4=0.25$;1 号分离株与 3 号分离株间,4 个酶位点中有两对等位基因不同,故其遗传距离为 $2/4=0.50$,依此类推,得出表 3。

表 3 分离株对间的遗传距离

菌株	1	2	3	4	5
1	0.00				
2	0.25	0.00			
3	0.50	0.50	0.00		
4	0.75	0.75	0.75	0.00	
5	0.75	0.75	0.75	0.50	0.00

从表 3 我们可以看出,1 号分离株与 3 号分离株间、2 号分离株和 3 号分离株间的遗传距离均为 0.50,前者文中已述及,后者亦可通过同样方法推算而来。由表 1 可查知,2 号分离株和 3 号分离株在 4 个酶位点中也有 2 对等位基因(C、D)不同,故其遗传距离为 $2/4=0.50$;同理,我们亦可算出 4 号分离株和 5 号分离株间的遗传距离亦为 0.50。

3 多位点酶电泳对禽病原性大肠杆菌遗传相关性的分析

whittam 和 wilson 应用多位点酶电泳法对分离自美国宾州 Delmarva 地区病鸡的 79 个分离株的 15 个酶位点进行了分析,发现这些分离株属 37 个多位点基因型,2/3 分离株属其中的 10 个基因型,而其中的 1 个多位点基因型竟包括了约 1/3 的分离株,由遗传距离相近的克隆组成的 A、B 克隆群包括了 82% 的分离株,且 A、B 群中有超过一半的分离株是从气囊和心包中分离到的,故推测 A、B 克隆的成员可能与引起气囊炎和心周炎的局部感染有关。A、B 群中均包括了 O2:K1 菌株,表明该血清

型可能在染色体背景下发生了分化。上述结果显示,该地区禽大肠杆菌病是由以至少 2 个不同克隆群为代表但数量相对有限的病原性克隆引起的^[2]。

White 等还对引起火鸡败血症的 80 株大肠杆菌的遗传差异性作了评价。他们共测定了 20 个酶位点的等位基因的变异情况,发现分离株在 17 个酶位点上是多态性的,并可将其划分为 32 个多位点基因型(ETs)。在所有 80 个分离株中,29 个分离株(占 36%)属于 2 个克隆,这两个克隆紧密相关,因为在受试的 20 个酶位点上,二者之间只有 1 个酶位点的等位基因不同。多数分离株属于 4 个完全不同的克隆群(遗传距离接近或大于 0.3),其中 3 个已见报道^[2],而第 4 个克隆群则是火鸡败血症特异的。这些结果表明多数火鸡败血症病例亦由数量相对有限的克隆群引起的。他们还发现,whittam 和 wilson 当初认为与气囊炎和心周炎有关的 A、B 克隆群中的 B 群成员,除了与上述局部感染有关外,受试的火鸡败血症分离株的 40% 亦属该群,而且可从欧洲和北美鸡大肠杆菌病和肉鸡肿头综合症中分离到。因此,B 群为一遗传上相关的世界分布性克隆群,能造成鸡和火鸡的许多急性疾病^[5]。

鸡肿头综合症(Swollen-Head Syndrome, SHS)是 1 个病原学尚未完全确定的新的疾病,一般认为它是由大肠杆菌和病毒混合感染引起^[6]。white 等应用多位点酶电泳技术,测定了来自西班牙和加拿大的 22 个 SHS 中的大肠杆菌分离株,以及包括文献[2]所试菌株在内的来自其他大肠杆菌病的 93 个分离株,在 20 个酶位点上的遗传相关性(图 1)。

为说明来自 SHS 的 18 个 ETs 克隆和来自其他禽大肠杆菌病的 41 个 ETs 克隆间等位基因出现频率的差异性,通过 56 个 ETs(SHS 和其他大肠杆菌病分离株有 4 个 ETs 是共同的)的分析发现,SHS 和其他大肠杆菌病的分离株在 17 个多态位点(polymorphic loci)的遗传多样性接近一致。此外,在每一克隆群内的等位基因出现率也是类似的。

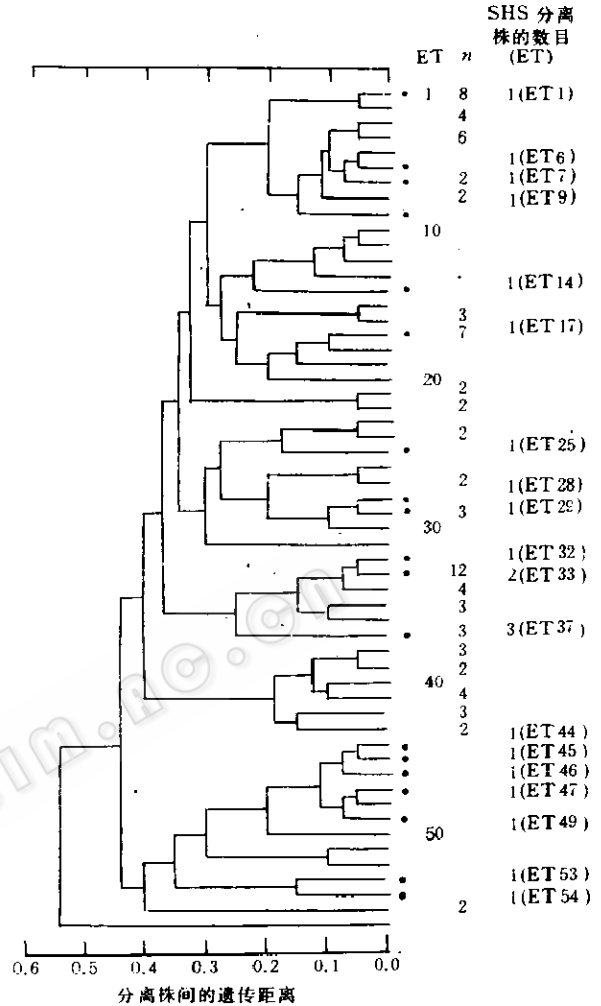


图 1 禽大肠杆菌分离株的 56 个 ETs 间遗传关系的树状图

注:“ET”表示禽大肠杆菌分离株的电泳型;“●”表示 SHS 中的大肠杆菌分离株的 ETs,克隆间的遗传距离是根据多位点酶电泳法测定 20 个酶位点的不同等位基因所占的比例计算而得;“n”表示拥有同一 ET 的多个分离株的数目,未标明数目的 ET 只含 1 个分离株;22 个 SHS 大肠杆菌分离株和来自其他大肠杆菌病的 93 个分离株,共计 115 个分离株是 n 的总和

图 1 还显示,SHS 感染鸡所分离到的大肠杆菌菌株出现于多数主要的克隆群中,且有常出现于树状图底部的克隆群中的趋势,因为在底部的 11 个 ETs 中有 7 个与 SHS 有关,来自加拿大的 5 株 SHS 相关菌株,有 1 株(ET44)即在其中,另 4 株为 ET32 或 ET37,位于树状

图中部的克隆群中^[7]。

White 等还将来自西班牙和加拿大的 SHS 和其他大肠杆菌病的大肠杆菌分离株与来自美国宾州 Delmarva 地区病禽大肠杆菌分离株的 ETs 作了比较。通过对两者 72 个分离株的电泳分析,结果仍然出现了以前即已鉴定出的 6 个主要克隆群^[8],并将其 ETs 与这里报告的 56 个 ETs 作了比较,发现其中的 35 个 ETs 可划分到 6 个主要克隆群中。表明这些克隆群的成员可存在于西班牙和 Delmarva 地区的禽群中,所以,以 ETs 标志的,来自禽大肠杆菌病分离株的这 6 个主要克隆群是洲际间分布的^[7]。

值得注意的是,树状图底部的克隆群(图 1)即 ET44~49,与引起人败血症和脑膜炎的代表菌株的 ETs 有极强的相关性,其遗传距离小于 0.15。事实上,SHS614 大肠杆菌分离株(ET46)血清型为 O18:H7,它与引起人败血症和脑膜炎的代表菌株 O18:K1:H7 间只在单一酶位点上有差别,而 SHS751 大肠杆菌分离株(ET45)的血清型为 O2:H2,在电泳型上与来自人的代表菌株 RK297(血清型 O2:K1:H5)完全一致。表明这些分离株是从一共同祖先刚分化开来,因为存在染色体编码的毒力因子,这些菌株也许在致病机理上具有相似性^[7]。

综上所述,引起 SHS 感染的一些大肠杆菌分离株,属于一个在人和动物的侵袭性疾病中有特殊功能的克隆群,这个群的成员是洲际间分布的,而且这个群的成员与引起禽其他大肠杆菌病的分离株间在遗传多样性上接近一致。

上述学者几乎全部发现,O 血清学分型不能完全反映分离株间的遗传相关性。Whittam 和 Wilson 报道,同一克隆(ET19)同时含有 O2:K1 或 O78:K⁻分离株,而 O2:K1 亦可存在于不同的克隆中^[2];White 等发现,22 株 SHS 相关的大肠杆菌菌株的血清型中,O2(4 株)、O78(3 株)是其最常见 O 血清型,在 SHS 和其他鸡大肠杆菌病共有的 4 个 ETs 中,同样的 ET 分离株可能具有不同的 O 抗原,两个不同的 ETs(ET17 和 ET33)都具有 O78 抗原^[7];White 等对火鸡败血症的 80 个分离株的研究

结果亦显示,拥有同样 ET 的分离株常具有不同的 O 抗原型,而在不同的 ETs 中又常发现同样的 O 血清型(如 ETs 1, 2 和 13 的分离株都可表达 O78 抗原)^[5]。

出现该现象的部分原因是具有特定血清型的常见病原性克隆的广泛分布,但一些遗传距离相距很远的克隆,如 O2 和 O78 等常见血清型的频频出现,表明这些细胞表面的多糖(LPS)有利于这些病原性克隆对禽类宿主的定居、繁殖及其扩散^[5],尽管细胞表面的 LPS 在禽病中的作用尚未明确^[7]。

综上,多位点酶电泳法,是研究禽病原性大肠杆菌遗传相关性的一种新的手段。有些分离株常出现于 1~2 个相对集中的克隆群^[2,5],该法可作为分离株病原性鉴定手段之一;多位点酶电泳法测得 SHS 大肠杆菌分离株与禽其他大肠杆菌病分离株在遗传多样性上基本一致,为 SHS 病原学研究提供了参考,而 SHS 相关的大肠杆菌菌株与人败血症和脑膜炎代表菌株之间的遗传相关性,又为该病发病机理的研究开辟了新的途径。当然,多位点酶电泳法在操作上还比较烦琐,如能对试验过程和结果进行自动化或半自动化处理,无疑将给该法注入新的活力。

参 考 文 献

- [1] Gross W B. Colibacillosis. In: M S Hofstad, H J Barnes, B W Calnek, C F Beard, W M Reid, and H W Yoder, Jr. (Editors) Disease of Poultry. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1984, 270~278.
- [2] Whittam T S, R A Wilson. Infect Immun, 1988, **56**: 2458~2466.
- [3] Selander R K, D A Caugant, H Ochman, et al. Appl Environ Microbiol, 1986, **51**: 873~884.
- [4] Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 1987, 135~136.
- [5] White D G, R A Wilson, D A Emery, et al. Vet Microbiol, 1993, **34**: 19~34.
- [6] Fraser C M. Merck veterinary manual. 6th ed. Merck & Co. Inc. Rahway, N. J. 1986, 1317.
- [7] White D G, R A Wilson, A S Gabriel, et al. Infect Immun, 1990, **58**: 3613~3620.
- [8] Whittam T S, I K Wachsmuth, R A Wilson. J Infect Dis, 1988, **157**: 124~133.