

肠毒性大肠杆菌 (ETEC) 不耐热肠毒素 (LT) 基因探针的研制

陈锦光 李淑琴

(军事医学科学院基础医学研究所)

经氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心分离纯化重组质粒 pMM030 DNA, 琼脂糖凝胶电泳回收的 LT-DNA-HindIII 片段, 用 DNA 缺口转译技术制备 α - ^{32}P 标记的 LT 基因探针, 与标准 ETEC (LT⁺) 杂交为阳性, 与非 ETEC 杂交则无同源性。从腹泻儿童和腹泻病猪粪便中分离的、经兔肠段结扎试验和免疫沉淀测定 LT 呈阳性的 ETEC, 与基因探针杂交呈现阳性; 而且一个单菌落在硝酸纤维素滤膜上裂解的 DNA 印迹, 与探针杂交可以进行放射自显影。如果采用不同的杂交条件, 还可以鉴别测定 ETEC 的 LT 基因和霍乱弧菌的 CT 基因, 一次可以进行几百个菌落的测定。结果表明, 该探针可以用于实验室诊断和流行病学调查。

关键词 基因探针; 肠毒性大肠杆菌; 肠毒素; 不耐热肠毒素

基因探针技术已成为获取待检出的基因, 检测重组子, 研究基因间的相互关系等的一种重要实验方法。目前该技术已用于肠毒性大肠杆菌 (简称 ETEC) 的研究。Dallas^[1] 和 Moseley^[2] 等首先报道了用 LT (不耐热肠毒素) 基因探针与人源、猪源 ETEC 进行菌落杂交获得成功的结果。此后, Echverria^[3] 和 Seriwatana^[4] 等又先后用 LT 和 ST (耐热肠毒素) 基因探针, 测定了东南亚地区水源和腹泻病人粪便中的 ETEC, 为 ETEC 的流行病学调查提供了新的手段。Moseley^[5] 等还用 LT 基因探针进行了 LT 基因和 CT 基因分子同源性的分析。我们用质粒上带有 LT 基因的菌株 *E. coli* C600 (pMM030) 制备了 LT 基因探针, 测定了部分人源、猪源 ETEC 和非 ETEC。初步结果表明, 该探针不仅可以测定 ETEC 中的 LT 基因, 而且还可以用于 LT 基因和 CT 基因的鉴定。

材料和方法

(一) 试剂

[α - ^{32}P] dATP (Amersham), dCTP, dGTP, TTP (Boehringer), DNase I (Sigma), 聚乙烯吡咯烷酮 (Fluka AG), 硝酸纤维素滤膜 (北京化工学校), 牛血清白蛋白 (北京红星生化制药厂), 琼脂糖 (Serva), HindIII 核酸限制性内切酶 (Biolabs)。

(二) 菌种

所用菌株见表 1。

(三) 质粒 DNA 的分离和纯化

参照 Sol^[6] 等报道的方法, 氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心, 或参照 Zasloff^[7] 等报道的酸性苯酚法, 分离纯化质粒 DNA。

(四) LT DNA 片段的制备和同位素标记

经上述方法分离纯化的 pMM030 质粒 DNA, 用 HindIII 完全酶切, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下切下 LT DNA-HindIII 凝胶带。装入回收管中, 电泳洗脱至透析膜中, 乙醇沉淀, 溶于 10mM Tris-HCl pH8.0 的 1mM Na₂EDTA 中, 用于同位素标记。

参照 Rigby^[8] 和苏国富^[9] 等报道的 DNA 缺口转译方法, 用 [α - ^{32}P] dATP 标记 LT DNA 片段。在 100 μl 反应体积中, 含 1.5 μg LT DNA, 50mM

本工作是在黄翠芬教授指导下进行的。本文图片由徐秀英同志摄制, 特此致谢!

本课题由中国科学院基金资助。

表 1 参考标准菌株及测定菌株的来源

菌株名称	肠毒素基因	来 源
<i>E. coli</i> C600 (pMMC30)	LT ⁻ B ⁺	本实验室重组菌株
<i>E. coli</i> 711 (p307)	LT ⁺ , ST ⁺	美国 Maas 教授提供
<i>E. coli</i> C600 (EWD299)	LT ⁺	美国 Falkow 教授提供
<i>E. coli</i> 44813	LT ⁺	卫生部药品生物制品检定所
<i>E. coli</i> 44814	LT ⁺	卫生部药品生物制品检定所
霍乱弧菌 569B	CT ⁺	卫生部药品生物制品检定所
Eltor 178	CT ⁺	卫生部药品生物制品检定所
<i>E. coli</i> C600	LT ⁻	中国科学院微生物研究所
<i>E. coli</i> 802	LT ⁻	中国科学院微生物研究所
<i>E. coli</i> RR1	LT ⁻	澳大利亚联邦科学院分子生物室
人源 ETEC		北京市儿童医院、石家庄市卫生防疫站
猪源 ETEC		农业部兽药监察所

Tris-HCl (pH 7.9), 5mM MgCl₂, 10mM β- 巯基乙醇, 5μg 牛血清白蛋白, dCTP, dGTP, TTP 各 20μM, [α-³²P] dATP 80μCi, 100ng DNase I, 18°C 反应 1.5 分钟, 加入 40 单位大肠杆菌 DNA 多聚酶 I, 14°C 反应 3 小时。加入 50μl 0.25M Na₂EDTA pH 8.0 终止反应。过 Sephadex G 50 小柱 (0.7 × 22cm), 分管收集 (0.5 ml/管), 从各管取 1μl 于 LKB₄₁₅ 型液体闪烁计数器。

(五) 菌落原位杂交

参照 Moseley^[11] 和 Grunstein^[10] 等叙述的方法进行。取直径 60mm 0.45μm 灭菌硝酸纤维素滤膜, 平铺于含营养琼脂的平皿上, 用灭菌牙签点种待测菌和对照菌, 并于 37°C 培养过夜。取出滤膜置于经 0.5N NaOH 饱和的两层新华滤纸上 (菌落面向上), 静置 10 分钟, 如此重复二次。将滤膜移至经 1M Tris-HCl pH 7.4 饱和的双层新华滤纸上, 静置 2 分钟, 再重复二次。然后把滤膜移到经 1M Tris-HCl pH 7.4, 1.5M NaCl 饱和的双层滤纸上, 静置 10 分钟。空气中晾干, 于 80°C 烘干 2 小时。移至预杂交液中 [50% 甲酰胺, 0.1% SDS, 5 × SSC, 1 × Denhardt's 液 (0.02% 聚蔗糖 400), 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白], 100μg/ml 鲑鱼精 DNA (剪切, 热变性), 1mM Na₂EDTA], 37°C 保温 4 小时, 加入终浓度为 1 × 10⁶ cpm/ml 的探针 (变性), 37°C 杂交 24 小时, 用 0.5% SDS 和 2 × SSC, 55°C 漂洗 2 小时, 空气中晾干, 80°C 烘干 1 小时, 于 -20°C 进行放射自显影。

结果和讨论

(一) 制备探针的菌株

用于制备探针的 *E. coli* C600 (pMMC 030) 由本实验室组建。pMMC 030 质粒是在 pBR 322 的 *Hind*III 酶切位点插入了 0.5 × 10⁶ dal 的 LT DNA-*Hind*III 片段构成。其分子量为 3.3 × 10⁶ dal, 包括了整个 LT B 亚单位基因和部分 LT A 亚单位基因。带有该质粒的菌株经 B 亚单位免疫测定为阳性, 同 LT 基因探针杂交具有同源性。所以, 用 LT DNA-*Hind*III 片段制备的探针足以测定待测菌中的 LT 基因。

(二) 探针的纯度

制备探针的质粒 DNA 必须达到电泳纯, 如果含有细菌的其他核酸成分, 菌落杂交就可能出现交叉反应。氯化铯-溴化乙锭梯度离心纯化的 pMMC 030 质粒 DNA, 可以达到电泳纯。菌落杂交时无明显的交叉反应。

(三) DNA 缺口转译

采用上述 DNA 缺口转译系统标记的 LT DNA 片段放射性比强可达到 5 × 10⁷ - 1.0 × 10⁸ cpm/μg DNA。37°C 保温 18—24 小时, 即可达到很好的杂交效果。缺口转译中

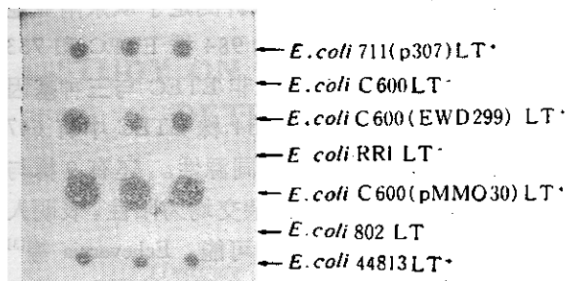


图1 LT 基因探针与标准 ETEC 及非 ETEC 菌株菌落杂交图

Fig. 1 Colony hybridization with standard ETEC and non-ETEC strains using LT⁺ gene probe

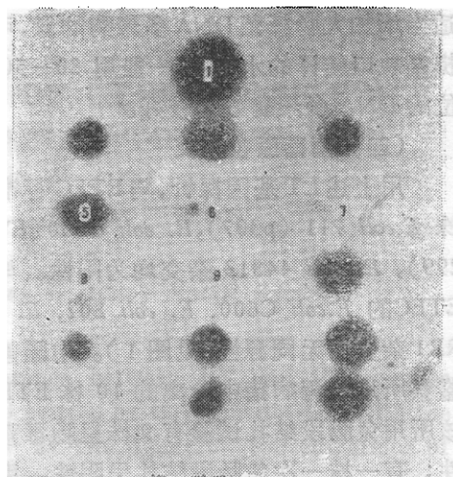


图2 LT 基因探针与猪源 ETEC 菌落杂交图。

Fig. 2 Colony hybridization with ETEC strains of pig origin using LT⁺ gene probe

1—*E. coli* C600 (EWD 299) LT⁺
5—猪源 ETEC, 一次兔肠段结扎 LT⁻ 阴性, 探针杂交为阳性。
6,7,8,9—*E. coli* C600 LT⁻
其他 9 株为猪源 ETEC, 兔肠段结扎为 LT⁺。
1—*E. coli* C600 (EWD299) LT⁺
5—ETEC of pig origin, rabbit intestine ligation test show LT negative while gene probe reveals positive result.
6,7,8,9—*E. coli* C600 LT⁻
The others are ETEC strains of pig origin with positive results in rabbit intestine ligation test.

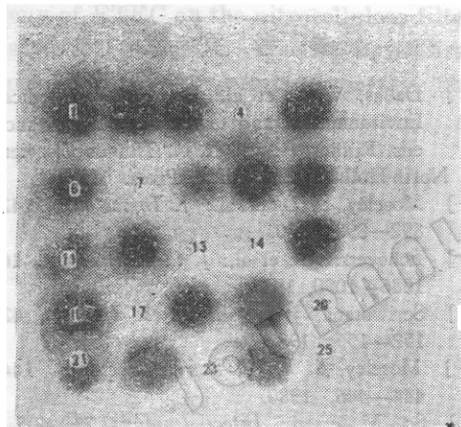


图3 LT 基因探针与人源 ETEC 及非 ETEC 菌落杂交结果

Fig. 3 Colony hybridization with ETEC & non-ETEC of human origin using LT⁺ gene probe

1,6—44813 和 44814 为 LT⁺ 标准菌株。
7—*E. coli* C600 LT⁻
11,16,21,25—从 120 个菌株中检测出来的 4 个 LT⁺ 菌株。
4,13,14,17,23—从 120 个菌株筛选出来的部分 LT⁻ 菌株。
其余均为北京市儿童医院从 9 个病人中分离出来的 LT⁺ 菌株。
1,6—44813 and 44814 LT⁺ standard strains.
7—*E. coli* C600 LT⁻
11,16,21,25—four LT⁺ strains selected from the 120 strains.
4,13,14,17,23—LT⁻ strains from 120 strains.
The others are LT⁺ strains collected from 9 children with diarrhea (Beijing Children Hospital).

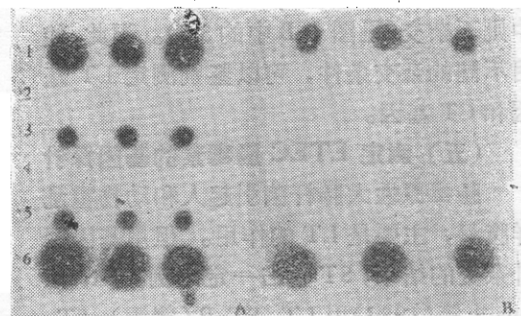


图4 在甲酰胺系统中, LT 基因探针与霍乱弧菌菌落杂交图

(A: 在 20% 甲酰胺中, B: 在 50% 甲酰胺中)

Fig. 4 Colony hybridization of *V. cholerae* with LT⁺ gene probe in formamide system

(A: in 20% formamide, B: in 50% formamide).

1—*E. coli* 711 (p307) LT⁺ 2—*E. coli* C600 LT⁻
3—*V. cholerae* 569B 4—*E. coli* 802 LT⁻
5—Eltor 178 6—*E. coli* C600 (EWD 299) LT⁺

适当增加大肠杆菌 DNA 多聚酶的量,可以提高缺口转译的水平。一般用 30—50 单位的 DNA 多聚酶效果较好。

(四) 菌落原位杂交

用上述 LT 基因探针,与 ETEC 标准菌株 *E. coli* 711 (p307), *E. coli* C600 (EWD 299), *E. coli* 44813 杂交均为阳性。与非 ETEC 的 *E. coli* C600, *E. coli* 802, *E. coli* RR1 杂交均无同源性(见图 1)。中国兽药监察所从腹泻病猪中分离的 10 株 ETEC,该所用兔肠段结扎试验有 9 株呈肠毒素阳性,有一株一次兔肠段结扎呈阴性。用探针杂交 10 株均有很好的同源性(见图 2)。北京市儿童医院肠道菌研究室从九个腹泻病人中分离了 38 个单菌落,经血清学测定为 LT 阳性。我们用探针杂交也呈现阳性(部分结果见图 3)。同时,还从石家庄市卫生防疫站提供的 120 株大肠杆菌(该站经生化测定为大肠杆菌)中,用基因探针杂交,检测出 4 株含 LT 基因的菌株。

采用 20% 甲酰胺系统,LT 基因探针与霍乱弧菌 569 B Eltor 178 杂交为阳性(见图 4-A 中的 3,5)。在 50% 甲酰胺系统中则不杂交(见图 4-B 中的 3,5)。因此,使用不同的杂交条件,可以鉴别测定 LT 基因和 CT 基因。

(五) 测定 ETEC 肠毒素的基因探针

肠毒原性大肠杆菌引起人和动物霍乱样腹泻,主要是 LT 的作用。但用基因探针杂交的结果,ST 也占一定比例。Seriwatana^[4]等(1983)用 LT, ST-P(猪源), ST-

H(人源)三种基因探针测定了从东南亚地区腹泻病人中分离的 984 株 ETEC 和 733 株非 ETEC。733 株非 ETEC 与三种基因探针没有同源性。984 株 ETEC 中有 647 株与 LT 基因探针有同源性。还有 9 株与 ST-P 和 ST-H 探针杂交均为阳性,表明人和动物有交叉感染的可能。Echeverria 等^[3]用 LT, ST-P, ST-H 基因探针测定 ETEC 的报道中指出,基因探针要比 Y-1 肾上腺细胞和乳鼠试验敏感 10^4 倍。在我国还未见有用基因探针测定 ETEC 的报道。如果能将该技术用于流行病学的研究,将可克服大量动物试验以及制备高效价的纯抗体的困难。

参 考 文 献

- [1] Dallas, W. S. et al.: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance. eds. Rühler, A. and K. N. Timmis Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1979.
- [2] Moseley, S. L. et al.: *J. Infect Dis.*, 142: 892—898, 1980.
- [3] Echeverria, P. et al.: *J. Clin Microbiol.*, 16: 1086—1090, 1982.
- [4] Seriwatana, J. et al.: *Infect Immun.*, 42: 152—155, 1983.
- [5] Moseley, S. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 144: 444—446, 1980.
- [6] So, M. et al.: *Infect Immun.*, 21: 405—411, 1978.
- [7] Zasloff, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5: 1139—1152, 1976.
- [8] Rigby, P. W. et al.: *J. Mol. Biol.*, 113: 237, 1977.
- [9] 苏国富等: 军事医学科学院院刊, 4: 387—390, 1983.
- [10] Grunstein, M. et al.: *Methods in Enzymology*, 68: 220, 1978.

STUDY ON THE PREPARATION OF GENE PROBE FOR DETECTION OF HEAT-LABILE TOXIN IN ENTEROTOXIGENIC *E. COLI*

Chen Jinguang Li Shuqin

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences)

Gene probes were prepared by means of nick translation of LT DNA fragments of plasmid pMM030. The specificity of the probes was demonstrated by the results of colony hybridization with ETEC and non-ETEC. The DNA lysed from a single colony of ETEC on the nitrocellulose filter was sufficient for an effective hybridization and a autoradiographic exposure. The

difference between LT and CT colonies could be seen by the hybridization with the probe at two different concentrations of formamide.

Key words

Gene probe; ETEC; Enterotoxin; LT-toxin