

霍乱毒素 (CT) 基因探针的构建 及其对霍乱弧菌的检测

周建光 马清钧 周建新* 熊凌霄

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

用体外 DNA 重组技术构建了 CT 基因重组质粒 pMM-CTII。应用 *Xba*I/*Eco*RI 双酶解, 琼脂糖凝胶制备电泳回收含 CT 基因的片段, 以 DNA 缺口转译技术用 α -³²P 标记的 CT 基因探针与 O1 群霍乱弧菌经典型及埃尔托生物型产毒株杂交为阳性, 与 O1 群霍乱弧菌非产毒株及非 O1 群无毒株杂交为阴性。对从临床及外环境分离的埃尔托霍乱弧菌进行了检测, 流行株 52 株, 检出率为 92%; 抗性株 50 株, 检出率 16%。显示利用 CT 基因分析较噬菌体分类更确切可靠。

关键词 基因探针; 霍乱毒素; 霍乱弧菌

霍乱是世界性流行病, 霍乱的发病是感染霍乱弧菌后所产生的霍乱毒素 (CT) 引起的。霍乱毒素基因位于染色体上, 它与肠源性大肠杆菌质粒编码的不耐热肠毒素 (LT) 基因核苷酸序列有 76% 的同源^[1], 因此应用 LT 基因探针在非严格的杂交条件下也可检测霍乱毒素基因。但应注意的是非严格的杂交条件有时会带来假阳性结果。

我们应用遗传工程技术成功地在大肠杆菌中获得了 CT 基因重组质粒 (pMM-CT) 的克隆和表达。为了 CT 基因探针操作的方便, 改建了 pMM-CT, 获得了重组质粒 pMM-CTII, 它含有 CT 基因, 但不能产生毒素, 因此可安全、方便地用来制备 CT 基因探针, 并用此 CT 基因探针成功地检测了临床和外环境分离菌株及工程菌的筛选鉴定。

材料和方 法

(一) 材料

O1 群霍乱弧菌 569B, 埃尔托型霍乱弧菌 178, 吴江 2, 非 O1 群霍乱弧菌 O37, N53 由卫生

部药品生物制品鉴定所提供。临床和外环境分离的 O1 群埃尔托弧菌流行株、抗性株由浙江省防疫站鲍行豪先生、浙江省医学院江德果先生、本院微生物流行病学研究所鉴定并供给。带有 LT 基因重组质粒 EWD299 的大肠杆菌; O1 群霍乱弧菌无毒株 1196-78, 1074-78 及 O1 群霍乱弧菌产毒株 O395 由美国纽约大学 W. K. Mass 教授惠赠。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、脱氧核糖核酸酶 DNA 酶 I、DNA 聚合酶 I 均为 Biolab 产品。

放射性同位素 [α -³²P] dATP 为 Amersham 产品。

(二) 方法

1. DNA 制备、重组质粒的构建及分析: 霍乱弧菌 569B 菌株的染色体 DNA 制备参照 Marmor 方法^[2]制备。

质粒提取、限制酶酶解、DNA 体外连结和转化、菌落杂交、琼脂糖凝胶电泳分子杂交均按文

本文于 1986 年 5 月 26 日收到。

此课题由中国科学院基金资助。

* 第三军医大学生化教研室。

本工作承黄翠芬教授指导、浙江省防疫站鲍行豪先生和浙江省医学院江德果先生的支持和帮助, 特此致谢。

献 [3] 进行。

LT 基因探针制备与 CT 基因杂交条件按文献 [4] 进行。

2. 毒素的生物活性检测：霍乱毒素的 Y₁ 肾上腺细胞检测参照文献 [5,6] 进行。

霍乱毒素的家兔肠攀试验：2 kg 左右的健康家兔，剖腹取出空肠迴肠部分，每 5—6 cm 结扎一段，每段间隔 1 cm，每段注入试验标本 1 ml，然后将肠放回，缝合腹部，16 小时后再剖腹检查各段肠的液体贮留量，每厘米肠段平均积液 ≥ 1.0 ml 者为阳性反应，表示该菌株能产生肠毒素。

3. 毒素的抗原性检测：菌落原位放射免疫参照 Kemp 方法 [7] 进行。

结果和讨论

(一) 重组质粒 pMM-CTII 的构建

在含有 CT 毒素基因的重组质粒 pMM-CT 中，有一特异的 XbaI 位点，XbaI 酶解将切去 CT 基因的启动子和编码 CTA 亚单位的起始信号 ATG，利用此酶切位点分离无 CT 自身启动子的 CT 基因片段与含有大肠杆菌乳糖启动子的质粒 pUC18 反向连接，这样构建的重组质粒 pMM-CTII 具有 CT 基因序列，但不能表达生物活性。

按设计(图 1)将 pMM-CT 重组质粒及 pUC18 质粒分别用 XbaI/EcoRI 双酶解后，琼脂糖凝胶电泳分离 pMM-CT 的 2.4 kb 酶解片段，pUC18 的 2.7 kb 片段，经电泳洗脱，酚提取和乙醇沉淀，各取 500 ng，用 800 单位 T4 连接酶在连接反应条件下进行连接，转化至大肠杆菌 RR1 菌株，在氨苄青霉素固体培养基平板上获得转化子，经菌落原位杂交(图 2)，重组质粒琼脂糖凝胶电泳及分子杂交检测(图 3)，获得重组质粒 pMM-CTII 的克隆。将此克隆株的细胞培养液及细胞裂解液经兔肠攀结扎实验和 Y₁ 细胞测定证实确无毒性表达。

(二) CT 基因探针的制备及对 O1 和非 O1 群霍乱弧菌的检测

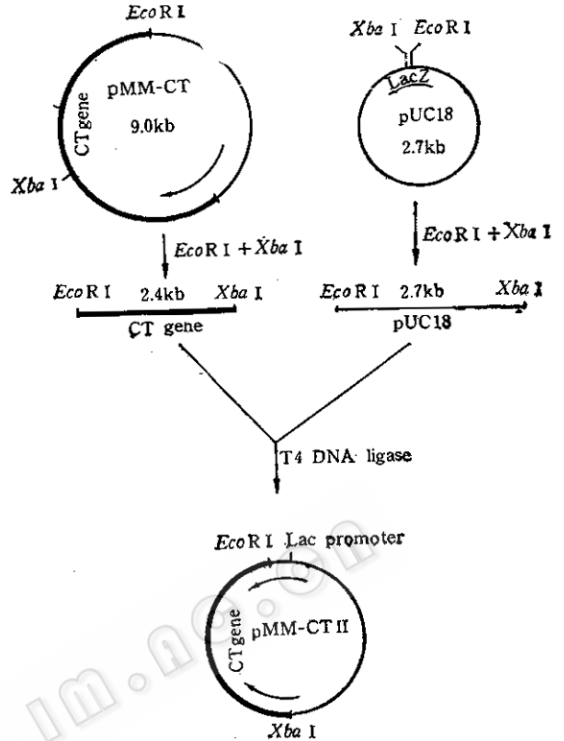


图 1 重组质粒 pMM-CTII 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pMM-CT II

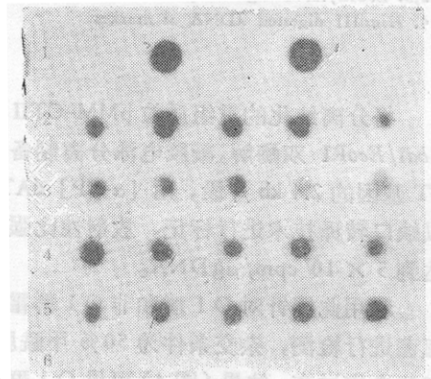


图 2 含重组质粒 pMM-CTII 转化子的菌落原位杂交

- 1. 霍乱弧菌 569B 标准菌株
- 2—5. 含重组质粒 pMM-CTII 的大肠杆菌
- 6. 大肠杆菌 pUC18; 大肠杆菌 RR1

Fig. 2 In situ colony hybridization of transformants containing pMM-CTII recombinant plasmid using CT gene probe

- 1. *V. cholerae* 569B; 2—5. *E. coli* (pMM-CTII); 6. *E. coli* (pUC18)

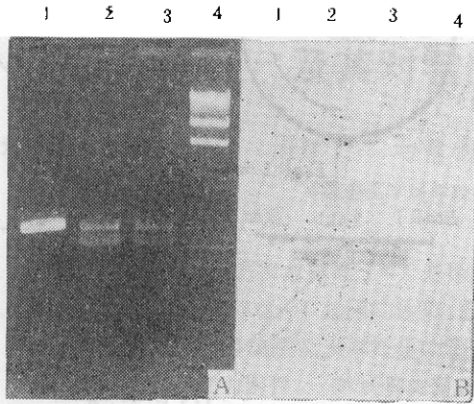


图3 pMM-CTII DNA 的电泳分析

- A. EB 染色
- B. 同一样品用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ CT DNA 杂交的结果
- 1. *EcoRI/XbaI* 双酶解的 pUC18 DNA
- 2,3. *EcoRI/XbaI* 双酶解的 pMM-CTII DNA
- 4. *HindIII* 酶解的 λ DNA 作为分子量标准

Fig. 3 Gel electrophoresis of pMM-CT II DNA and its southern autoradiogram

- A. Ethidium Bromide stain
- B. The same sample hybridized with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ CT DNA
- 1. *EcoRI/XbaI*-digested PUC18 DNA
- 2,3. *EcoRI/XbaI*-digested pMM-CTII DNA
- 4. *HindIII* digested λ DNA as marker

将分离纯化的重组质粒 pMM-CTII 以 *XbaI/EcoRI* 双酶解,凝胶电泳分离制备含 CT 基因的 2.4 kb 片段,用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP 以缺口转译技术进行标记,放射性比强可达到 5×10^7 cpm/ μg DNA。

利用此探针针对 O1 群和非 O1 群霍乱弧菌进行检测,杂交条件为 50% 甲酰胺,42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜,结果(图 4)可见 O1 群产毒株不论是经典型还是埃尔托生物型,也不论是稻叶型还是小川型血清型,都显示黑色印迹,与应用免疫探针进行的原位固相放射免疫分析结果一致(资料未列,另文发表)。表明基因探针特异性强,可用于霍乱毒素基因的检测。

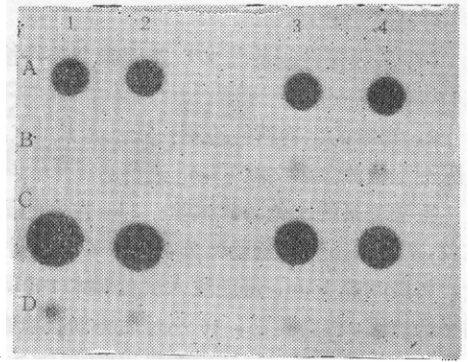


图4 CT 基因探针针对 O1 和非 O1 群霍乱弧菌的检测

- A. O1 群经典型霍乱弧菌
 - 1,2: 569B 经典生物型,稻叶血清型
 - 3,4: O395 经典生物型,小川血清型
- B. 非 O1 型弧菌
 - 1,2: O37; 3,4: N53
- C. O1 群埃尔托霍乱弧菌
 - 1,2: 178;3,4: 吴江 2
- D. O1 群不产毒霍乱弧菌
 - 1,2: 1196-78;
 - 3,4: 1074-78

Fig. 4 Detection of *V. cholerae* O1 and non O1 strains using CT gene probe

- A. *V. cholerae* O1 group
 - 1,2: Strain 569B classical biotype Inaba serotype
 - 3,4: Strain O395 classical Ogawa Serotype
- B. *V. cholerae* non O1 group
 - 1,2: O37; 3,4: N53
- C. *V. cholerae* O1 Eltor
 - 1,2: 178; 3,4: 吴江 2
- D. *V. cholerae* O1 non toxigenic
 - 1,2: 1196-78; 3,4: 1074-78

(三) 对临床和外环境分离的霍乱弧菌菌株检测

对临床和外环境分离的霍乱弧菌 102 株进行了检测。按噬菌体分型,其中 52 株为流行株,50 株为抗性株,检测结果(图 5)说明在 52 株流行株中有 48 株具有毒素基因,占检测菌株的 92%,在 50 株抗性株中检测到具有 CT 基因的有 8 株,占 16%。由此说明应用噬菌体分型对霍乱弧菌产毒和非产毒株的区分是较粗略的,利用毒素基因探针的分析较噬菌体分型更为确切和可靠。

以上结果表明,我们成功地构建了 CT 基因克隆株,不产毒,可方便地将 CT 基因

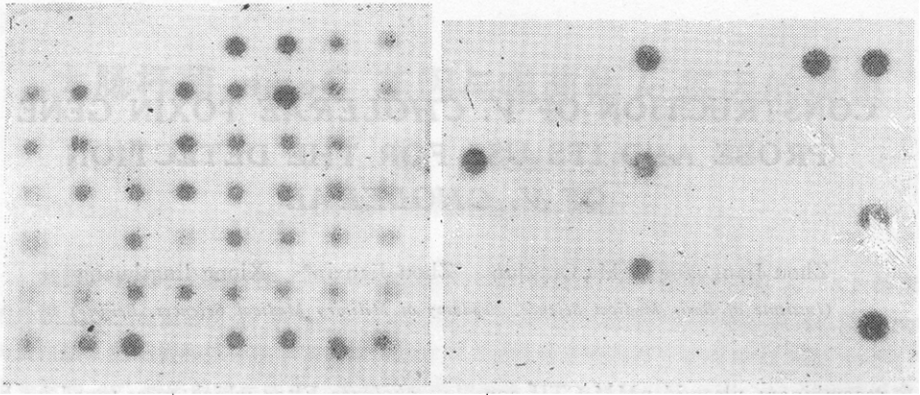


图 5 CT 基因探针 for 临床和外环境分离的霍乱弧菌的检测

1. 52 株流行株 2. 50 株抗性株

Fig. 5 Detection of *V. cholerae* strains from patients and environment using CT gene probe
1. 52 epidemic strains 2. 50 resistant strains

DNA 制成基因探针, 用于产毒株霍乱弧菌的检测。这种检测最大的优点是直接检出毒素基因, 检出结果准确可靠。阳性表示有毒株, 阴性表示无毒株, 同时它不受污染的其它杂菌和细胞毒素的干扰。应用毒素基因探针检测比 Y_1 肾上腺细胞敏感 10^4 倍, 不仅可做为实验诊断, 而且在流行病学调查中是非常有效的工具^[9]。

参 考 文 献

[1] 马清钧: 国外医学微生物分册, 4: 145, 1984。

- [2] Marmur, J.: *Mol. Biol.*, 3: 206, 1961.
- [3] 马清钧等: 生物化学杂志, 1(2): 7, 1985。
- [4] 熊凌霄等: 中华微生物学和免疫学杂志, 5(6): 379, 1985。
- [5] 唐红娣等: 家畜传染病, 3: 28, 1985。
- [6] Sack, D. A.: *Injec. Immun.*, 11: 334, 1975.
- [7] Kemp, D. J.: et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78: 4520, 1961.
- [8] Echeverria, P. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 1086, 1982.
- [9] Kaper, J. B. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 129, 1982.

CONSTRUCTION OF *V. CHOLERAE* TOXIN GENE PROBE AND ITS USE FOR THE DETECTION OF *V. CHOLERAE*

Zhou Jianguang Ma Qingjun Zhou Jianxin* Xiong lingshuang

(*Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

A recombinant plasmid pMM-CTII containing cholerae toxin (CT) gene was constructed *in vitro*. The specific DNA fragment from CT gene was obtained by *Xba*I and *Eco*RI double digestion of pMM-CTII followed by agarose gel electrophoresis and then labelled with α -³²P using nick translation technique. The labelled CT probe showed positive hybridization results with classical *V. cholerae* O1 group and Eltor toxigenic strains and negative hybridization results with O1 group nontoxigenic strains. We also identified 52 epidemic and 50 resistant strains of *V.*

cholerae Eltor which were typed by bacteriophages and isolated from clinical specimens and environment. The detection ratio of toxigenic strains were 92% and 16% respectively. It shows that CT gene analysis is more accordance and confident than bacteriophage classification method.

Key words

Gene probe; Cholerae toxin; *V. cholerae*

* Department of Biochemistry, The third Military Medical University.