

志贺氏菌属 *virG* 基因半抗原——Digoxigenin 标记探针的制备及其同源性分析*

余菲菲 包幼迪

(福建医学院基因工程研究室, 福州 350004)

用半抗原——Digoxigenin 标记的福氏 2a YSH6000 的 1.4kb *virG* DNA 探针, 检测 73 株痢疾杆菌(宋氏 64 株、福氏 5 株、志贺氏 4 株)、32 株 EIEC、17 株耶氏菌属菌、5 株伤寒杆菌和 5 株大肠杆菌的 DNA 同源性。前 3 种菌同时作 Sereny 试验, 以进行比较。结果表明, 痢疾杆菌及 EIEC 中均含 *virG* 同源区, 其它被测菌则无此同源区。*virG* DNA 仅与痢疾杆菌及 EIEC 的 Sereny 试验相关, 而与耶氏菌属的 Sereny 试验无关。用 *virG* DNA 探针检测宋氏痢疾杆菌及 EIEC 的毒力, 与 Sereny 试验结果比较, 符合率分别为 87.5% 和 90.9%。

关键词 *virG* DNA 探针; 痢疾杆菌; Sereny 试验

日本学者报道^[1], 福氏 2a 痢疾杆菌 YSH6000 菌株的大质粒, 经限制性核酸内切酶 *SalI* 酶切, 可获得 23 个片段, 其中 *SalIG*, *SalIF* 和 *SalIB-P-H-D* 与细菌的毒力有关, 分别从不同角度决定阳性的 Sereny 反应。*SalIG* 中仅 4.5kb DNA 片段为功能表达区, 它决定细菌在受侵细胞内的播散^[2]。作者利用 *SalIG* 功能区中的 1.4kb DNA 片段为探针, 经半抗原——Digoxigenin 标记后, 检测痢疾杆菌、EIEC 及引起 Sereny 反应的另一肠道致病菌——耶氏菌的 DNA 同源性。以揭示 *virG* DNA 在各菌中的同源性情况, 并证明以 *virG* DNA 为探针检测宋氏痢疾菌及 EIEC 毒力的可能性。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

痢疾杆菌、EIEC、小肠结肠炎耶氏菌、假结核杆菌、伤寒杆菌和大肠杆菌。以上菌株部分系福建省卫生防疫站赠送, 部分系本室保存。

(二) 质粒

CS1457 (含 6.1kb *virG* DNA) 由日本 Sasakawa 教授赠送。pBR322 为本室常规使用的载体质粒。

(三) 限制性核酸内切酶

EcoRV, *HindIII*, *SalI*, *BamHI* 系 Boehringer Mannheim 公司产品。

(四) Digoxigenin 试剂盒

Boehringer Mannheim 公司产品。

本文于 1991 年 10 月 22 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

(五) 质粒的提取和纯化

采用 Birnboim 和 Doly 的碱变性法^[3], 并略加改进。

(六) 质粒的酶切及探针片段的回收

CS1457 用 *EcoRV* 和 *HindIII* 进行双酶切, 酶切片段经琼脂糖凝胶电泳分离, 采用低熔点琼脂糖挖块法^[4]回收 1.4kb *virG* DNA。

(七) DNA 片段的 Digoxigenin 标记

参照 Digoxigenin 试剂盒中说明书, 采用随机寡核苷酸引物法进行。

(八) 菌落原位杂交

杂交膜制备参照文献 [4] 进行, 滤膜经预杂交、杂交、洗膜后, 用抗 Dig-Ap 及底物 BCIP-NBT 作用, 显色。

(九) Southern blot

DNA 在琼脂糖凝胶上电泳, 待各条带分开后, 按文献 [5] 方法将凝胶进行变性、中和处理, 后将凝胶上的条带吸印至尼龙膜, 与探针进行杂交。

(十) Sereny 试验

参照 Sereny 试验方法^[6]并加以改良。选用 500g 左右的健康豚鼠, 刮取一环经 LB 平板 37℃ 培养后的菌苔, 涂布于一只眼内, 另一眼作为对照, 观察 5 天, 5 天后未出现炎症反应即为阴性。

结 果

(一) 福氏 2a pMYSH6000 1.4kb *virG* DNA 的鉴定

将提取的含 6.1kb *virG* DNA 的重组质粒 CS1457(载体为 pBR322, 6.1kb 片段酶切物理图谱见图 1)用 *EcoRV* 和 *HindIII* 双酶切, 酶解产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。CS1457 被切成 3 个片段, 以 λ DNA/*HindIII*-*EcoRI* 的酶解片段为标准对照系, 推算出最小片段位于 1.4kb 处, 该片段即为 *virG* 功能区中的 1.4kb 片段, 回收该片段。

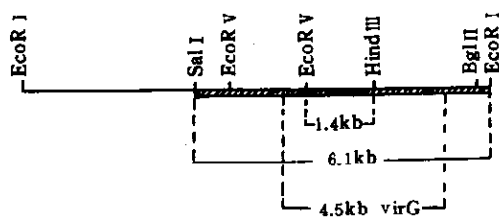


图 1 CS1457 酶切物理图谱
Fig. 1 Restriction Map of CS1457

(二) 探针的敏感性检测

回收的 1.4kb *virG* DNA 以随机寡核苷酸引物法将 Dig 标记上制成 DNA 探针。从中取少量标记物经逐级稀释后点到硝酸纤维素膜上, 经用抗 Dig-Ap 作用后, 由底物显色检测标记效果。结果表明, 探针的显色敏感度达 0.1pg。

(三) 菌落原位杂交及质粒检测结果

用 1.4kb *virG* DNA 探针, 以菌落原位杂交法检测 73 株痢疾杆菌, 32 株 EIEC, 12 株小肠结肠炎耶氏菌, 5 株假结核杆菌, 5 株伤寒杆菌及 5 株大肠杆菌 DNA 的同源性。CS1457 寄主菌为阳性对照, pBR322 寄主菌为阴性对照。阳性对照出现深紫蓝色杂交信号, 阴性对照无杂交信号出现, 表明所设对照可靠。小肠结肠炎耶氏菌、假结核杆菌、伤寒

杆菌及大肠杆菌杂交试验均为阴性,证明 1.4kb *virG* DNA 具有高度特异性。痢疾杆菌及 EIEC 大质粒丢失的菌株杂交为阴性,含大质粒的菌株杂交试验部分阳性部分阴性(表 1)。

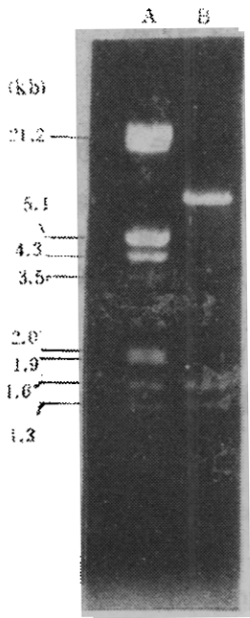


图 2 质粒 CS1457 酶切图谱

- A. λ DNA/Hind III-EcoRI 酶切片段;
B. CS1457 Hind III-EcoRV 酶切片段。

Fig. 2 Restriction patterns of plasmid CS1457

- A. Hind III-EcoRI digest of Lambda;
B. Hind III-EcoRV digest of CS1457.

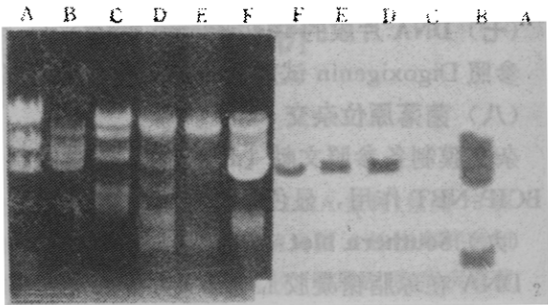


图 3 1. 质粒 DNA 及 DNA 的酶切片段电泳图谱
2. CS1457 的 1.4kb 探针的 Southern 杂交结果
A. λ DNA/Hind III 酶切片段; B. CS1457 质粒 DNA;
C. 小肠结肠炎耶氏菌质粒 BamHI 酶切片段;
D、E. 宋氏痢疾杆菌质粒 SalI 酶切片段;
F. EIEC 质粒 SalI 酶切片段。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of restriction fragment of plasmid DNA and plasmid DNA (1), Southern hybridization with the 1.4kb probe (2)

- A. Hind III digest of lambda; B. CS1457 DNA; C. BamHI digest of plasmid of *Y. enterocolitica*; D and E. SalI digest of plasmid of *S. sonnei*; F. SalI digest of plasmid of EIEC.

表 1 1.4kb DNA 探针菌落原位杂交结果

Table 1 Conolly hybridization with the 1.4kb probe

细菌 Bactria	株数 Strains	含质粒株数 Strains containing plasmid	阳性 Positive	阴性 Negative
宋氏痢疾杆菌 <i>S. sonnei</i>	64	36	14	50
福氏痢疾杆菌 <i>S. flexeri</i>	5	4	3	2
志贺氏痢疾杆菌 <i>S. dysenteriae</i>	4	3	2	2
肠侵袭性大肠杆菌 EIEC	32	22	20	12
假结核杆菌 <i>Y. pseudotuberculosis</i>	5	3	0	3
小肠结肠炎耶氏菌 <i>Y. enterocolitica</i>	12	10	0	12
伤寒杆菌 <i>S. typhi</i>	5	Nd *	0	5
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	5	Nd *	0	5

* 未检 Undetected

(四) Sereny 试验结果

49 株痢疾杆菌及 22 株 EIEC 作 Sereny 试验。结果见表 2、表 3。用 Sereny 试验和原位杂交方法检测痢疾杆菌及 EIEC 毒力的符合率分别为 85.7% 和 90.9%，两种方法检测宋氏痢疾杆菌毒力的符合率为 87.5%。含大质粒的耶氏菌 Sereny 试验均为阴性。

表 2 痢疾杆菌探针杂交与 Sereny 试验结果比较*

Table 2 Comparison of DNA hybridization and Sereny test for *Shigella*

		菌落原位杂交 Conoly hybridization						总计 Total
		志贺氏痢疾杆菌 <i>S. dysenteriae</i>		福氏痢疾杆菌 <i>S. flexeri</i>		宋氏痢疾杆菌 <i>S. sonni</i>		
Sereny 试验		+	-	+	-	+	-	
Sereny	+	1	0	2	0	9	0	12
test	-	1	2	1	2	5	26	37
总计 Total		2	2	3	2	14	26	49

* 总符合率 Coincidence rate of *Shigella* 85.7%, $P > 0.05$ 。

宋氏痢疾杆菌符合率 Coincidence rate of *S. sonni* 87.5%, $P > 0.05$ 。

表 3 EIEC 探针杂交与 Sereny 试验结果比较*

Table 3 Comparison of DNA hybridization and Sereny test for EIEC

	菌落原位杂交 Conoly hybridization		总计 Total
Sereny 试验	+	-	
Sereny test	18	0	18
	2	2	4
总计 Total	20	2	22

* 符合率 Coincidence rate 90.9%, $P > 0.05$ 。

(五) Southern blot

选择 Sereny 试验为阳性的耶氏菌 1 株, 宋氏痢疾杆菌 2 株, EIEC1 株, 其大质粒经限制性核酸内切酶 BamHI 或 SalI 酶切, 酶解物以 λ DNA/Hind III 酶切片段为标准分子量对照系, CS1457 质粒为阳性对照, 在同一琼脂糖凝胶电泳板上电泳 (图 3-1)。凝胶上的 DNA 作碱变性处理后, 将单链 DNA 吸印至尼龙膜上, 与 DNA 探针杂交, 出现紫蓝色的区带即为杂交阳性片段 (图 3-2)。Southern 杂交结果进一步证明了宋氏痢疾杆菌及 EIEC 有 *virG* 同源区, 而小肠结肠炎耶氏菌则无此同源区。本次试验在宋氏痢疾杆菌及 EIEC 中找到了单一的杂交片段。CS1457 质粒具有不同的构型, 电泳时会出现多条带, 因而杂

交出现多个阳性区带。

讨 论

痢疾杆菌和 EIEC 的毒力质粒具有高度的不稳定性^[7], 在多次培养或菌种保存过程中容易产生脱失体或质粒丢失成为无毒株。由于本研究所用菌株为非新分离株, 部分菌株质粒已丢失或出现脱失体, 毒力丧失, 杂交试验为阴性。结合探针杂交试验, Sereny 试验和质粒检测结果可以证明痢疾杆菌和 EIEC 上存在 *virG* 同源区。Southern 杂交试验还在宋氏痢疾杆菌和 EIEC 大质粒上找到了单一的 *virG* 同源片段, 为两菌 *virG* 基因的进一步研究奠定了基础。

痢疾杆菌和 EIEC 的探针杂交与 Sereny 试验结果比较表明, 凡杂交试验为阴性的菌株, Sereny 试验也为阴性; 杂交阳性的菌株, Sereny 试验部分阳性, 部分阴性。这是因为 DNA 探针探测的片段并不等于完整的 *virG* 和 (或) 其有关的基因。两种方法检测宋氏痢疾杆菌和 EIEC 毒力株的符合率分别为 87.5% 和 90.9%。过去人们常利用 Sereny 试验或细胞侵入试验来测定痢疾杆菌和 EIEC 的毒力, 这两种方法, 前者需用动物, 后者则需要细胞培养设备和技术, 两者均费时, 且一次仅能进行少量菌株的测定。近年来, 由于分子生物学技术的发展, 使得以毒力 DNA 片段为探针检测痢疾杆菌和 EIEC 的毒力成为可能。在生化和血清学试验尚不能为 EIEC 的鉴定提供可靠依据的情况下, 应用 DNA 探针鉴定 EIEC 及其毒力显得尤为重要, 特别是对于新血清型 EIEC 的鉴定 (福建省已发现新血清型 EIEC)。目前, 国内应用最为普遍的探针是福氏 5 型 17kb 侵袭性基因。然而由于 17kb DNA 分子量较大, 且携带 *IS₁* 序列^[8], 特异性必然受到影响, 人们在实践中已观察到, 该探针能与某些非侵袭性大肠杆菌产生阳性反应^[9]。本研究所应用的 1.4kb *virG* DNA 是一种与 Sereny 反应相关的毒力基因片段, 它分子量小, 特异性甚高, 在实际应用中将成为一个比 17kb DNA 更具优越性的诊断探针。

小肠结肠炎耶氏菌和假结核杆菌均能引起阳性的 Sereny 反应, 但它们的 DNA 与 1.4kb *virG* DNA 不存在同源性, 表明耶氏菌引起 Sereny 反应的物质基础及其机制可能与痢疾杆菌和 EIEC 的不同。

本试验标记 DNA 探针使用的半抗原 Dig, 采用随机寡核苷酸引物法进行标记。其显色敏感度达 0.1pg。半抗原标记探针较同位素标记安全、稳定、快速、方便, 是一种值得推广应用的标记方法。本试验首次将其用于肠道致病菌研究, 获得满意结果。

参 考 文 献

- [1] Sasakawa, C. et al.; *Infect Immun.*, **54**: 32-40, 1986.
- [2] Sasakawa, C. et al.; *J. Bacteriol.*, **171**: 353-357, 1988.
- [3] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, p. 90; p. 170, Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the United States of America, 1982.
- [4] 严世方、包幼迪: 微生物学报, **31** (2): 128-132, 1991.
- [5] 彭秀玲、袁汉英: 基因工程实验技术 (彭秀玲、袁汉英编著), 第 133 页, 湖南科学技术出版社, 长沙, 1987 年.
- [6] Sereny, B.; *Acta Microbiol. Hung.*, **4**: 367-376, 1957.

- [7] Sasakawa, C. et al.; *Infect Immun.*, **51**: 470—477, 1986.
[8] Buysse, J. M. et al.; *J. Bacteriol.*, **169**: 2561—2569, 1987.
[9] 林万明等: 中华流行病学杂志 (特刊 11 号), **10**: 171—174, 1989.

PREPARATION OF DIGOXIGENIN LABELED *virG* DNA PROBE OF *SHIGELLA* AND ITS HOMOLOGY ANALYSIS

She Feifei Bao Youdi

(Laboratory of Genetic Engineering, Fujian Medical College, Fuzhou 350004)

Using hapten digoxigenin labeled 1.4 kb *virG* DNA probe of *S. flexneri* 2a YSH6000. We examined the DNA homology among 73 strains of *Shigella*, 32 strains of EIEC, 17 strains of *Yersinia*, 5 strains of *S. typhi* and 5 strains of *E. coli*. At the same time strains of *Shigella*, EIEC and *Yersinia* were tested by Sereny assay. We concluded that *virG* DNA is conserved both in *Shigella* and EIEC and is related to Sereny test only in *Shigella* and EIEC but not in *Yersinia*. The coincidence rate of hybridization and Sereny test was 87.5% and 90.9% for *S. sonnei* and EIEC respectively.

Key words *virG* DNA probe; *Shigella*; Sereny test