

波摩那血清群钩端螺旋体 限制性内切酶分析*

朱士盛

(农业部动物检疫所, 青岛 266032)

罗德·查普尔 利娜·艾莫恩

(维多利亚州动物科学研究所, 澳大利亚)

应用 EcoRI 和 HhaI 内切酶, 对波摩那血清群钩端螺旋体各型标准株的 DNA 作限制性内切酶分析 (Restriction Endonuclease Analysis 简称 REA), 证明所获的各型标准株 (Pomona, Mczdok, Proechimys, Tropica) 的酶切图谱均不相同。与以前经显微镜凝集试验 (MAT) 鉴定为波摩那血清群的 27 个猪肾标本分离株的酶切图谱比较, 所有分离株均可判定为波摩那血清型钩端螺旋体。

关键词 钩端螺旋体; REA

钩端螺旋体为钩端螺旋体病的病原菌。目前, 已将钩端螺旋体分为 23 个血清群, 212 个血清型^[1]。常规的分类方法是用群特异抗血清作显微镜凝集试验 (MAT)^[2], 以确定不同的血清群; 用交叉吸收凝集试验^[3], 以确定血清型。然而, 上述方法的不足之处是: 第一, 试验的可靠性与钩端螺旋体生长质量密切相关, 而钩端螺旋体生长的丰盛程度受营养条件和环境的影响。第二, 费时, 用于试验的钩端螺旋体需培养 5 天。第三, 在不同的实验室, 有时对某些菌株难以获得重复结果^[4-7]。

Marshall 等人^[4,8]提出, 用酶切图谱分析法进行钩端螺旋体的分类。该方法与交叉凝集吸收试验相比, 省时、省力, 且重复性好。此法已被广泛应用于病毒和细菌的鉴定^[9-13]。试验结果表明一些菌 (毒) 株间的差异, 而应用常规的血清学方法是难以区别的^[3,5,14]。

作者选用 EcoRI、HhaI 酶, 应用 REA 方法, 将从澳大利亚猪场获得的 27 个分离株, 与波摩那血清群中的标准型株作酶切图谱比较, 现将结果报告如下。

材料和方 法

(一) 钩端螺旋体

1. 血清型参考株: 波摩那型 (Pomona)、莫兹多克型 (Mozdok)、普鲁奇密斯型 (Proechimys)、热带型 (Tropica) 系从澳大利亚布里斯班国际钩端螺旋体参考实验室获得。

2. 27 个分离株: 从澳大利亚维多利亚州屠宰场收集的猪肾中分离获得 (分别来自 5

本文于 1992 年 11 月 2 日收到。

* 本试验在澳大利亚维多利亚州动物科学研究所 (VIAS) 进行。

个猪场: THI 猪场分离株为 149; ABS 猪场分离株为 241、242、246、248、250、256; GLI 猪场分离株为 258、269; FEV 猪场分离株为 218、220、221、222、223、224、226、227、228、229、230、231、232; BTT 猪场分离株为 383、384、387、389、395)。

(二) DNA 的制备

将在 80ml EMJH 液体培养基中生长旺盛的钩端螺旋体培养物离心, 收集菌体, 用 0.01mol/L pH7.0 PBS 液洗 2 次, 沉淀菌体悬浮于 1ml 溶解缓冲液中 (100 mmol/L Tris, 100mmol/L EDTA pH 7.5), 加 100 μ l 溶菌酶 (10mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 培养 15 分钟, 直至菌体溶解。然后, 加 100 μ l SDS 液 (0.1g/ml) 和 50 μ l 链霉菌蛋白酶 (20mg/ml), 内容物轻轻混合后, 放 50 $^{\circ}$ C 培养过夜。

加 5mol/L 高氯酸钠 250 μ l, 放 50 $^{\circ}$ C 培养 1 小时, 加 RNA 酶 40 μ l (10mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时, 然后加 4ml STE (1mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris-HCl, 0.01mol/L EDTA pH7.5), 其混合物相继用等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 和氯仿-异戊醇 (24:1) 浸出, 收集水相层, 放入透析袋, 用 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl pH7.5 1mmol/L EDTA pH8.0) 于 4 $^{\circ}$ C 下透析 24 小时 (每 8 小时更换一次 TE 液), 将 DNA 浓缩, 然后应用紫外分光光度计检查 DNA 制备物的纯度, A_{260}/A_{280} 的比值不得小于 1.8。

(三) DNA 消化

限制性内切酶消化混合物含有 2 μ g DNA, 10 倍消化缓冲液 5 μ l, 酶 2.5 μ l (酶浓度调节为 1 倍消化缓冲液中含酶 1 单位/ml), 加入蒸馏水至 50 μ l, 其混合物于 37 $^{\circ}$ C 作用 1.5 小时, 再放入 60-65 $^{\circ}$ C 水浴箱中 10 分钟, 消化后的 DNA 液加入 5mol/L NaCl, NaCl 的终浓度调节为 0.3mol/L, 加两体积的冷乙醇, 放 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30-40 分钟, 然后以 13000 \times g 离心 5 分钟, 去除乙醇, 干燥 DNA 后加 20 μ l STE 缓冲液, 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜溶解 DNA, 加 10 倍追踪染料 5 μ l。

(四) 凝胶电泳及照相

用 0.66% 琼脂糖、TBE 缓冲液, 在 18mA 下电泳 16 小时, 以 0.5 μ g/ml 溴乙锭染色 1-1.5 小时, 经蒸馏水漂洗后, 在紫外光下照相。

结 果

波摩那血清群中所有参考血清型株 (即波摩那、普罗奇密斯、莫兹多克、热带型), 分别用 EcoRI 和 HhaI 两种内切酶酶切, 每个参考型株均具有明显不同的电泳图谱 (图版 I-A)。27 个分离株的酶切图谱与标准型波摩那参考株的酶切图谱相同, 可判定为波摩那血清型。各猪场部分分离株与波摩那参考株的酶切电泳图谱比较见图版 I-B、C。

讨 论

基因 DNA 酶切图谱分析目前已应用于细菌性传染病分子流行病学的研究, 直接核酸分析对不同株的鉴别和分类具有特殊意义。

本研究结果表明, RFA 方法可用于波摩那血清群钩端螺旋体分类定型。我们认为, 在本研究中核酸的浸出程序和电泳技术具有快速、重复性好等特点。限制性内切酶 EcoRI 和 HhaI 是被选择的有效酶, 它们能完全消化, 并可得到十分清晰的高分子量碎片的电泳

图谱 (图版 I -A-C)。

我们的研究结果还表明,用 EcoRI 和 HhaI 酶,27 个分离株间的酶切图谱没有不同,与波摩那血清型参考株的酶切图谱基本一致。然而,有趣的是,波摩那参考株(实验室株)有一额外带(约 20kb),而在分离株中则未见,这一结果与 Robinson 等人报道的一致^[14],是否波摩那血清型可区分为基因 I 和 I,还需待进一步研究。

参考文献

- [1] Ellis, W. A. et al. : *Res. Vet. Sci.*, **44**: 375-378, 1988.
- [2] Cole, J. G. et al. : *Appl. Microbiol.*, **25**: 976-980, 1973.
- [3] Hathaway, S. C. et al. : *Res. Vet. Sci.*, **39**: 151-156, 1985.
- [4] Marshall, R. B. et al. : *J. Med. Microbiol.*, **14**: 163-166, 1981.
- [5] Thiermann, A. B. et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 585-587, 1985.
- [6] Thiermann, A. B. et al. : *Proceedings 89th Meeting of the U. S. Animal Health Association*, pp. 193-206, Milwaukee, Wisconsin, 1985.
- [7] Thiermann, A. B. et al. : *Am. J. Vet. Res.*, **47**: 61-66, 1986.
- [8] Bllis, W. A. et al. : *J. Clin. Microbiol.* **29**: 957-961, 1991.
- [9] Buchman, T. G. et al. : *J. Inf. Dis.*, **138**: 488-498, 1978.
- [10] Blackall, P. J. et al. : *Vet. Microbiol.*, **27**: 39-47, 1991.
- [11] Harel, J. et al. : *Can. J. Vet. Res.*, **54**: 422-426, 1990.
- [12] Macinnes, J. I. et al. : *Can. J. Vet. Res.*, **54**: 244-250, 1990.
- [13] Smart, N. L. et al. : *ibid.*, **52**: 319-324, 1988.
- [14] Robinson, A. J. et al. : *J. Med. Microbiol.*, **15**: 331-338, 1982.

RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF POMONA SEROGROUP OF *LEPTOSPIRA INTERROGANS*

Zhu Shisheng

(Animal Quarantine Institute Ministry of Agriculture, Qingdao 266032)

Rod Chappel Lilla Amon

(Victoria Institute of Animal Science, Australia)

Restriction Endonuclease Analysis (REA) was performed on DNAs from the type strains of the Pomona serogroup of *Leptospira interrogans* by using EcoRI and HhaI restriction enzyme, and the electrophoretic patterns obtained were compared with patterns obtained from 27 isolates from pig kidneys collected at abattoirs in Victoria, which belong to Pomona serogroup previously identified by MAT. All of the isolates were identified as serovar Pomona.

Key words *Leptospira*; REA