

# 大肠杆菌不同菌株基因组 DNA 的多态性分析

王 瑛 郭永志 沈孝宙

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

Leung F. C.

(香港大学动物学系 香港)

**摘 要** 从大肠杆菌 K12 菌株 JM109 基因组克隆了两段 DNA 重复序列, 长度为 0.9 和 0.6kb, 分别命名为 ECR-1 和 ECR-6。以 ECR-1 和 ECR-6 重复序列作 DNA 多态性分析的探针, 可以鉴别大肠杆菌非常相近的菌株。表明 ECR-1 和 ECR-6 DNA 序列可用于大肠杆菌菌株的分类、流行病学和微生物生态学研究以及大肠杆菌各种致病菌株的临床诊断。

**关键词** 大肠杆菌, DNA 重复序列, 基因组 DNA 多态性

大肠杆菌和其他细菌一样, 传统分类主要是依据形态学、生化反应或免疫血清学特性等。然而在某些情况下, 这些方法难以区分同一种类中极为相近的菌株。新近发展了几种 DNA 分型 (DNA typing) 的分子生物学技术, 为细菌的分类提供了有力的工具, 例如限制性酶谱法<sup>[1]</sup>, 特异探针杂交法<sup>[2]</sup>, 聚合酶链反应即 PCR 法<sup>[3]</sup>, 扩增片断长度多态性即 AFLP 法<sup>[4]</sup>和 DNA 指纹谱法<sup>[5, 6]</sup>等。这些方法虽各有其优点和不足, 但在大肠杆菌菌株的 DNA 分型上尚未采用。

高等生物的限制性片断长度多态性 (RFLP) 分析和 DNA 指纹谱分析是探测动植物基因组 DNA 序列微小变化的精确方法。这些方法需有合适的重复序列作为探针。在本研究中, 我们从大肠杆菌 JM109 菌株基因组 DNA 中克隆了大肠杆菌所特异的两种重复序列, 以这两段序列作为探针, 对不同的大肠杆菌菌株基因组 DNA 的多态性进行了分析, 证明所克隆的两种重复序列探针, 能区分非常相近的大肠杆菌菌株和一些肠道致病菌株。这对大肠杆菌的分类学、流行病学和微生物生态学研究以及临床诊断无疑具有较大的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌工程菌共 9 株, 天然大肠杆菌及肠道菌共 11 株 (表 1)。限制性内切酶和修饰酶购于 Promega 公司。化学发光试剂来自 Boehringer Mannheim 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 大肠杆菌基因组 DNA 的制备:** 将大肠杆菌 JM109 菌株用 LB 培养基培养过夜, 基因组 DNA 用 CTAB 试剂分离<sup>[5]</sup>, 然后加入 RNA 酶, 使终浓度为 30 $\mu$ g / ml, 在 37 $^{\circ}$ C 保温

表1 实验菌株及来源  
Table 1 Tested strains and source

细 菌	菌 株	来 源
Bacteria	Strain	Source
大肠杆菌	JM109, DH5 $\alpha$ , NW554,	Battelle, Pacific Northwest
( <i>E. coli</i> )	LE392, C600Hf, AG-1,	Laboratories, USA
	Y1090, KW251, DH10B	
大肠杆菌	猪 K88: C83901 (Q $\phi$ : K $\phi$ 76: K $\phi$ 88ab)	中国兽药监察所
( <i>E. coli</i> )	猪 K99: C83914 (O $\phi$ 101: K $\phi$ 30: K $\phi$ 99)	中国兽药监察所
	猪 987P: C83915 (O $\phi$ 9: K $\phi$ 103: 987P)	中国兽药监察所
	羊 F41: C83919 (O $\phi$ 101: K $\phi$ 30: F41)	中国兽药监察所
大肠杆菌	H23: 44446 (H $\phi$ 23: O $\phi$ 85)	中国药品生物制品检定所
( <i>E. coli</i> )		
肠侵袭性大肠菌	44155	中国药品生物制品检定所
(Enteroinvasive <i>E. coli</i> )		
绿脓假单胞菌		
( <i>P. pyocyanea</i> )	10211	中国药品生物制品检定所
肺炎克雷伯氏菌		
( <i>K. pneumoniae</i> )	46114	中国药品生物制品检定所
痢疾志贺氏菌51255		
( <i>S. dysenteriae</i> )		中国药品生物制品检定所
宋内氏志贺氏菌	51334	
( <i>S. sonnei</i> )		中国药品生物制品检定所
金黄色葡萄球菌	26112	中国药品生物制品检定所
( <i>S. aureus</i> )		

30min, 酚抽提、乙醇沉淀, 干燥后加 10mmol / L Tris-1 mmol / L EDTA, pH8.0 缓冲液, 置 4℃ 备用。

1.2.2 重复序列 DNA 的制备<sup>[6]</sup>: 上述 DNA 经超声波处理, 直至多数断裂成长度为 0.5~1.0kb 范围的片段。取 25 $\mu$ g DNA 溶在 1ml 0.18mol / L NaCl 中, 60℃ 复性 14h, 再用羟基磷灰石吸附回收双链 DNA, 所获得的 DNA 经计算其 Cot 值为 5.0<sup>[7]</sup>。

1.2.3 基因克隆: 质粒载体 pUC18 用 Sma I 酶切, 经碱性磷酸酶脱磷后备用。将上述大肠杆菌重复序列 DNA 用 Mung bean 核酸酶及 Klenow 酶制成平端, 最后用 T4 DNA 连接酶将平端的大肠杆菌重复 DNA 插入载体 pUC18 的 Sma I 位点, 再转化 JM109 感受态菌, 获得大量含插入片段的重组子。

1.2.4 重组质粒 DNA 的提取及分子杂交: 随机选取 38 个重组子, 提取质粒 DNA, 用 EcoR I 和 BamH I 酶切, 电泳分离, 再转移至正电荷的杂交尼龙膜 (Boehringer Mannheim 公司提供) 上。杂交探针分别用 DIG 标记的大肠杆菌 JM109 基因组 DNA。

1.2.5 大肠杆菌特异 DNA 片段探针的制备: 选定的重组质粒 DNA 作为模板, 在 dNTP 核苷酸前体中加入 DIG-dUTP, 用 PCR 反应扩增制备 DIG 标记的大肠杆菌特异 DNA 片段探针。PCR 反应所用的引物系 pUC18 载体的正向和反向万用引物 (GIBCO-BRL 公司

产)。

**1.2.6 DNA 多态性分析:** 大肠杆菌基因组 DNA 用各种限制性内切酶消化, 0.9% 琼脂糖凝胶电泳分离 (电压 40v, 16h), 用真空转移法将胶上的 DNA 转移到尼龙膜上, 转移缓冲液及工作条件为: 0.2mol / L HCl, 30min; 0.5mol / L NaOH (含 0.5mol / L NaCl), 20min; 1 mol / L Tris-HCl, pH7.5 (含 1.5mol / L NaCl), 20min; 20 × SSC, 1h, 然后将膜放在 2 × SSC 中摇动 10min, 用紫外交联仪 (Bio-Rad 公司产) 固定。杂交温度为 65℃。杂交完毕用 65℃ 的 0.1 × SSC (含 0.1% SDS) 洗膜三次, 再用 DIG 化学发光检测系统检测, 化学发光底物用 CSPD 试剂。

## 2 结 果

### 2.1 大肠杆菌重复序列克隆的筛选与鉴定

在低浓度长时间的复性条件下, 从大肠杆菌 JM109 菌株基因组分离出 Cot 值为 0~5.0 的重复序列混合物, 再将重复序列混合物的 DNA 片段克隆在 pUC18 载体上, 形成一个以 0~5.0Cot 值为主的重复序列基因库。从该基因库中随机挑选出 38 个克隆。通过 Southern 印迹分析, 筛选出两个重组体, 其插入片段具有较强杂交信号, 分别命名为 ECR-1 和 ECR-6。这两个克隆的插入片段长度分别为 0.9kb 和 0.6kb (图 1)。其他克隆的插入片段, 杂交信号较弱或探测不出杂交信号。强杂交信号显示克隆中存在的 DNA 序列在大肠杆菌基因组中具有较高的拷贝数, 属于重复序列。本文系利用克隆 ECR-1 和

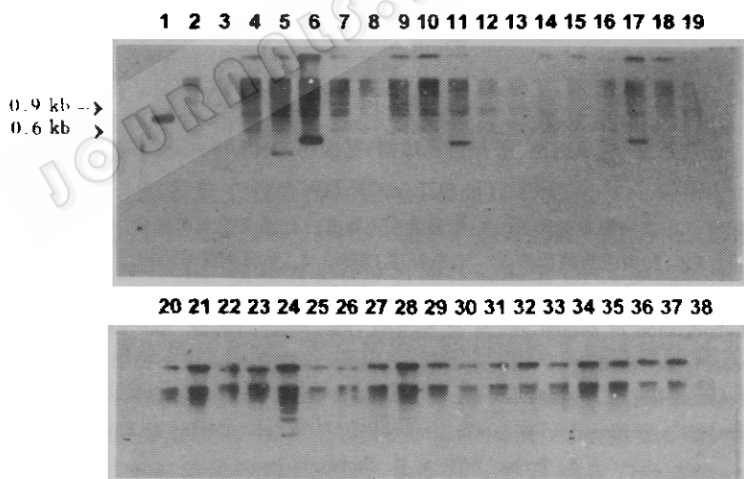


图 1 用 Southern 印迹筛选含有大肠杆菌 JM109 菌株基因组 DNA 重复序列的重组子 (分离的重组质粒 DNA 用 Eco RI 和 Bam HI 双酶切下插入片段, 电泳分离后转移至尼龙膜上, 再与 JM109 基因组 DNA 探针杂交)

Fig.1 Screening of the clones harbored the genomic repetitive sequences of *E. coli* JM109 by Southern blotting. (The plasmid DNA isolated from the clones were digested with Eco RI and Bam HI and then run on agarose gel. After transfer on Nylon membrane, it was hybridized with genomic DNA probe prepared from JM109)

ECR-6的重复序列作探针对大肠杆菌基因组 DNA 多态性进行研究的結果。

## 2.2 大肠杆菌重复序列 ECR-1和 ECR-6的种属特异性

从大肠杆菌所属的真细菌中选出几类有代表性的细菌,提取它们的基因组 DNA,与 ECR-1和 ECR-6进行斑点杂交以检验大肠杆菌重复序列 ECR-1和 ECR-6序列的特异性。所选用的细菌包括假单胞细菌目的绿脓假单胞菌(*Pseudomonas pyocyanea*)、肠杆菌科的几种细菌如肠侵袭性大肠菌(*Enteroinvasive Escherichia coli*)与大肠杆菌相近的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)以及另一类重要的肠道致病菌—痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)和宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*),此外还有球菌类的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。从图 2 斑点杂交结果可以发现,我们所克隆的大肠杆菌两种重复序列是非常特异的,特别是 ECR-6序列,它只与各种大肠杆菌杂交(图 2-A),而不与上述其他任何细菌杂交。ECR-1序列与肠侵袭性大肠菌和宋内氏志贺氏菌均发生杂交,而与肺炎克雷伯氏菌只有很弱的杂交。这一结果同肠侵袭性大肠菌与宋内氏志贺氏菌之间系统关系比较密切是一致的。此外,我们还证明 ECR-1和 ECR-6重复序列在其他几种细菌中也不存在同源序列,这几种细菌为多种假单胞菌(*P. putida*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*)和产碱杆菌类(*Alcaligenes* sp.)。

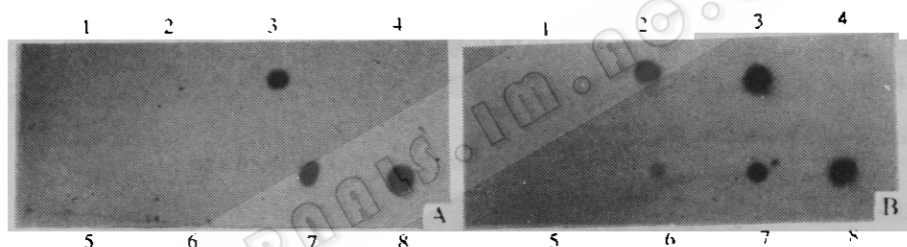


图 2 几类细菌(假单胞菌、肠杆菌和球菌)基因组 DNA 与大肠杆菌重复序列 ECR-1和 ECR-6的同源性分析

1. 痢疾志贺氏菌; 2. 宋内志贺氏菌; 3. 肠侵袭性大肠菌; 4. 金黄色葡萄球菌; 5. 绿脓假单胞菌;
6. 肺炎克雷伯氏菌; 7. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ; 8. 大肠杆菌 Y1090.

A. 基因探针: ECR-6; B. 基因探针: ECR-1.

Fig. 2 Dot hybridization of several groups of bacteria (*Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, and *Micrococcaceae*) probed with the repetitive sequences (ECR-1 or ECR-6) from *E. coli*

1. *Shigella dysenteriae*; 2. *Shigella sonnei*; 3. *Enteroinvasive E. coli*; 4. *Staphylococcus aureus*;
5. *Pseudomonas pyocyanea*; 6. *Klebsiella pneumoniae*; 7. *E. coli* DH5 $\alpha$ ; 8. *E. coli* Y1090.

A. Probe: ECR-6; B. Probe: ECR-1.

## 2.3 大肠杆菌不同菌株基因组 DNA 的多态性

先选择大肠杆菌两种实验室菌株 JM109 和 DH5 $\alpha$  的 DNA 用不同限制性内切酶处理,再分别与 ECR-1(图 3-A)和 ECR-6(图 3-B)探针杂交。从图 3 的 DNA 多态性分析可以发现:(1)在所用的限制性内切酶中多数都能在两种菌株中产生不同的电泳带型。如图 3-A 中的 *Alu* I, *Hinf* I, *Eco* RI + *Bam* HI, 图 3-B 中的 *Alu* I, *Hae* III, *Eco* RI + *Bam* HI;(2)比较图 3-A 和图 3-B,可以发现两种探针所探测的 DNA 条带迥然不同,说明这两种重复序列彼此各不相同。由于 *Eco* RI + *Bam* HI 双酶切以及用

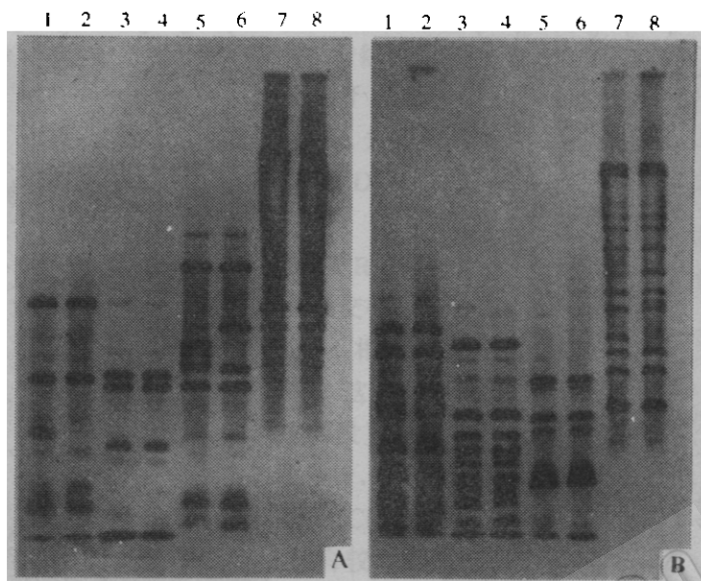


图3 两种相近的大肠杆菌菌株 JM109(1,3,5,7行)和 DH5 $\alpha$ (2,4,6,8行)的基因组 DNA 电泳带型分析

基因组 DNA 用不同的内切酶水解:1和2用 Alu I 酶,3和4用 Hae III 酶,5和6用 Hinf I 酶,7和8用 Eco R I 加 Bam H I 双酶。探针分别用 ECR-1(A)和 ECR-6(B)。

Fig. 3 Characterization DNA band pattern of two closed strains of *E. coli*, JM109(Lanes 1,3,5, and 7) and DH5 $\alpha$  (Lanes 2,4,6, and 8).

*E. coli* genomic DNA were digested by Alu I (Lanes 1 and 2), Hae III (Lanes 3 and 4), Hinf I (Lanes 5 and 6), and Eco R I + Bam H I (Lanes 7 and 8). The probes were ECR-1(A) and ECR-6(B).

ECR-1和 ECR-6混合探针能产生更多的信息,因此我们用此条件分析了大肠杆菌 K-12 中 9 种十分相近的实验菌种,即 JM109, DH5 $\alpha$ , NW554, LE392, C600Hf, AG-1, Y1090, KW251 和 DH10B。结果表明在 9 种菌株基因组 DNA 多态性图谱中,除一部分共享带外,每种菌株均存在数目不等的各自独特的条带(图 4)。从而可将大肠杆菌 K-12 中这些非常相近的菌株区分开来。实验还进一步对一些人和兽致病性大肠杆菌进行了分析,其中包括人的肠侵袭性大肠菌,猪的致病菌株 K103, K88 和 K99,羊、牛的致病菌 K30 菌株等。从它们基因组 DNA 的多态性分析,可以看到这些致病菌也具有互不相同并可资区别的独特 DNA 指纹图谱(图 5)。由上述实验证明我们所克隆的大肠杆菌重复序列 ECR-1和 ECR-6可以作为探针应用于大肠杆菌各种菌株的分型。

### 3 讨 论

真核生物基因组含有大量的重复序列,这些重复序列很易发生变化,因而存在个体间或物种间的差异。利用重复序列探针探测基因组 DNA 序列的细微变化则是 DNA 多态性分析的基础。原核生物的重复序列至今研究较少,因而在原核生物中 DNA 分型研究很少采用来源于自身的重复序列。已发现大肠杆菌也含有 20~40bp 的短重复序列和数 kb

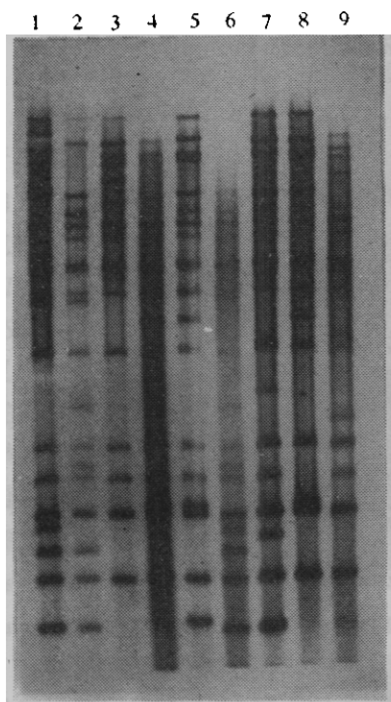


图4 大肠杆菌 K12 不同菌株基因组 DNA 的多态性

分离的基因组 DNA 用 Eco RI 加 Bam HI 双酶水解, 琼脂糖凝胶电泳分离后转移至尼龙膜上, 再用 DIG—标记的 ECR-1 和 ECR-6 混合探针杂交。各种菌株在图上的编号为: 1. JM109; 2. DH5 $\alpha$ ; 3. NW554; 4. LE392; 5. C600Hf; 6. AG-1; 7. Y1090; 8. KW251; 9. DH10B。

Fig. 4 Genomic DNA polymorphism of various *E. coli* K12 strains

Genomic DNA were digested with Eco RI and Bam HI and run on agarose gel. After transfer on Nylon membrane, it was hybridized with mixed DIG-labelled probes of ECR-1 and ECR-6. Lane 1. JM109; Lane 2. DH5 $\alpha$ ; Lane 3. NW554; Lane 4. LE392; Lane 5. C600Hf; Lane 6. AG-1; Lane 7. Y1090; Lane 8. KW251; Lane 9. DH10B.

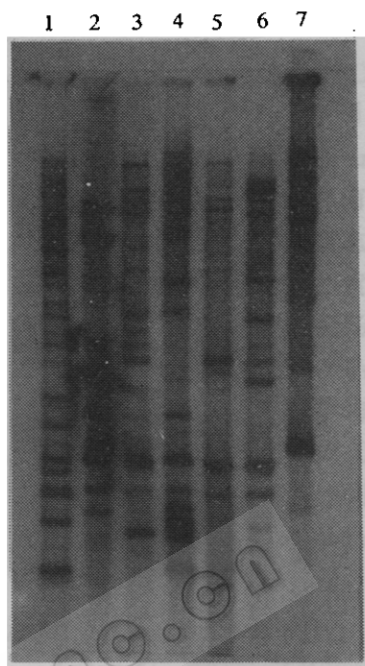


图5 大肠杆菌的几种人、畜致病菌株的基因组 DNA 多态性分析

细菌基因组 DNA 用 Eco RI 加 Bam HI 双酶水解, 探针用 DIG-标记的 ECR-1 和 ECR-6 混合物。各种菌株在图上的编号为: 1. 作为参照的实验室菌株 JM109; 2. 大肠杆菌血清型 H23; 3. 羊大肠杆菌 C83919, K30 菌株; 4. 猪大肠杆菌 C83915, K103 菌株; 5. 猪大肠杆菌 C83914, K99 菌株; 6. 猪大肠杆菌 C83901, K88 株; 7. 人的肠侵袭性大肠菌 44155 菌株。

Fig. 5 Genomic DNA polymorphism of various pathogenic *E. coli* strains from human and domestic animals

Genomic DNA were digested with Eco RI and Bam HI and run on agarose gel. After transfer on Nylon membrane, it was hybridized with mixed DIG-labelled probes of ECR-1 and ECR-6. Lane 1. *E. coli* JM109, a laboratory strain as the control; Lane 2. *E. coli* serotype H23; Lane 3. *E. coli* strain C83919 (K30) from goat; Lane 4. *E. coli* strain C83915 (K103) from pig; Lane 5. *E. coli* strain C83914(K99) from pig; Lane 6. *E. coli* strain C83901 (K88) from pig; Lane 7. Enteroinvasive *E. coli* strain 44155 from human.

的长重复单元,遍布基因组<sup>[9]</sup>。因此,利用原核生物的重复序列作为探针,显然也可作为原核生物基因组 DNA 多态性研究和 DNA 指纹谱分析提供有价值的工具。我们选择大肠杆菌分离重复序列制备探针,一方面是由于大肠杆菌是一个庞大的“家族”,具有众多抗原类型和实验室菌株,是一个很好的 DNA 分型研究模型系统;另一方面还由于大肠杆菌存在许多致病的突变株,利用其基因组 DNA 多态性作为分型的依据,在应用上具有很大的潜力。

本研究所克隆的大肠杆菌 ECR-1 和 ECR-6 两段序列,各自在大肠杆菌基因组 DNA 限制性酶切片段多态性图谱上均存在许多杂交带,表明所克隆的这两段 DNA 确为多拷贝的重复序列, DNA 序列测定证明它们虽互不相同,但都与大肠杆菌微卫星体 (Microsatellite) DNA 和转座基因同源 (作者待发表资料)。这与文献记载的有关原核生物转座子元件含有重复序列这一发现是符合的<sup>[9]</sup>。利用这两段重复序列作探针,我们选择了近 20 种不同的大肠杆菌菌株进行基因组 DNA 多态性分析,发现它们的 DNA 电泳图谱中的带型均互不相同。这一结果很有意义,表明 ECR-1 和 ECR-6 探针对于大肠杆菌菌株分类鉴定、流行病学和微生物学研究以及病原论断无疑是有较大的应用价值。这一模型系统,对建立其他微生物的 DNA 分型研究也具有参考意义。

**致 谢** 承蒙中国科学院微生物学研究所郭兴华研究员帮助,北京康复中心金学源教授惠赠菌种,罗善忠参加部分工作,特此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Murray B, Singh K V, Heath J D *et al.* *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 2059~2063.
- [2] Amann R I, Krumholz L, and Stahl D A. *J Bacterial*, 1990, **172**: 762~770.
- [3] Smith, N H, Selander R K. *J Bacterial*, 1990, **172**: 603~609.
- [4] Bassam B J, Anolles G C, Gresshoff P M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **38**: 70~76.
- [5] Groenen P M A, Bunschoten A E, Soolingen D V *et al.* *Mol Microbiol*, 1993, **10**: 1057~1061.
- [6] Salzano G. *Res Microbiol*, 1993, **144**: 381~387.
- [7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. 2nd. New York: Greene Publishing Associate, and John Wiley and Sons. 1992. 2.10~2.12.
- [8] 王 瑛. 动物学杂志, 1996, **31**(2) 28~30.
- [9] Singer M, Berg P. *Gene and Genomes, A Changing Perspective*. California: University Science Books, 1989. 624~625.

## DNA POLYMORPHISM IN THE GENOMES OF DIFFERENT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Wang Ying Guo Yongzhi Shen Xiaozhou

(Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Leung F. C.

(Department of Zoology, University of Hong Kong, Hong Kong)

**Abstract** Bacteria have been traditionally classified on the basis of their morphology, biochemical reaction, serology and etc. However, in some case these methods could not authenticate the closely related bacteria strains. In this study, we cloned two repetitive DNA sequences with 0.9 and 0.6 kb in length from *Escherichia coli* K12 strain JM109 and designated as ECR-1 and ECR-6 respectively. Using ECR-1 and ECR-6 sequences or their combination as the probes for DNA polymorphism analysis, we were be able to develop a molecular method of biotyping for the identification of very closely related strains of *Escherichia coli*. Both of ECR-1 and ECR-6 probes could be applied for the taxonomy, epidemiological and microecological studies, and clinical diagnosis for pathogenic *Escherichia coli* strains.

**Key words** *Escherichia coli*, DNA repetitive sequence, Polymorphism of genome