

痢疾杆菌弱毒株的选育

I. 用杂交法选育弱毒菌株的探索

王秉瑞 宋树珍 陈奇媛

(兰州生物制品研究所)

利用杂交法选育痢疾杆菌弱毒株,国外已有报道,如 Dupont 等用大肠杆菌高频重组株 W 1895 与福氏志贺氏菌 II 型及痢疾志贺氏菌 I 型杂交,得到一些无毒的杂交株^[1,2]。据观察,有的免疫力虽好,但反应较强(如 H 株),有的反应虽小,但免疫力不够理想(如 MH 株),因此均未用于预防细菌性痢疾。为了探索获得既无

毒力而又具有免疫原性的菌株的途径,我们对杂交方法作了进一步研究,现将初步结果报告如下。

材料与方 法

一、菌种(见表 1)

大肠杆菌(*E. coli*)菌株营养缺陷型的特征

表 1 菌种的来源、特性及用途

菌 号*	来 源	特 性**	用 途
<i>E. coli</i> Hfr C	复旦大学遗传研究所	met ⁻ try ⁻ str ^r	杂交时用作给体
<i>E. coli</i> K ₁₂ W1485F ⁺	同上	his ⁻ ileu ⁻ -val ⁻ str ^r	同上
HF _{3a} 3-13	本实验室用 Hfr C 与 F _{3a} 3 杂交所得	III:6,7 str ^r	再杂交时用作给体
F _{1a}	甘肃省卫生防疫站	I:3,4 str ^r	杂交时用作受体
F _{2a} 1,6,9	同上	II:3,4 str ^r	同上
F _{3a} 3,4	同上	III:6,7 str ^r	同上
F ₄ 2404	同上	VI:3,4 str ^r	同上
S1	同上		同上

* "H"代表杂交。"F"代表福氏志贺氏菌。"S"代表宋内氏志贺氏菌。阿拉伯数字代表菌号及菌落号。

** III:6,7 等表示该菌的血清抗原式。met⁻表示甲硫氨酸缺陷型。try⁻表示色氨酸缺陷型。his⁻表示组氨酸缺陷型。ileu⁻表示异亮氨酸-缬氨酸缺陷型。str^r表示耐链霉素。str^s表示对链霉素敏感。

用补充培养基和基本培养基对照鉴定。痢疾杆菌与大肠杆菌均按常规方法作链霉素敏感性、生化特性、形态特征等方面的鉴定。

二、血清

各种诊断血清均为兰州生物制品研究所生产,大肠菌的 OK 血清及 O 血清系用上述大肠菌株由本实验室自制。

三、培养基

1. 出发菌株均用适合于痢疾杆菌生长的 Hottinger 固体培养基。配方为:牛肉胰酶消化液(含 AN7-8 毫克/毫升) 100 毫升, NaCl 0.5

克, Na₂HPO₄ 0.2 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 900 毫升, 灭菌前 pH 7.4—7.6。

2. 杂交用牛肉汁培养基, pH 同上。

3. 选择培养基(%): K₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 0.6, (NH₄)₂SO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.07, 柠檬酸钠 0.1, 乳糖 0.5。

指示剂用伊红、美蓝(100 毫升培养基中加 2% 伊红和 0.5% 美蓝各 1 毫升)加尼克酰胺(0.3 毫克/1 升) pH 调至 7.4—7.6。

四、杂交方法

在探索的过程中,试用大肠杆菌的营养缺

陷型和福氏痢疾杆菌不发酵乳糖作指标,以基本培养基上发酵乳糖菌落出现的频率,对以下几个条件作了比较。因给体菌大肠杆菌菌株为营养缺陷型,在基本培养基上不能生长,受体菌福氏痢疾杆菌菌株虽能生长,但不能发酵乳糖,故利用这一特点,选取发酵乳糖的菌落,用玻片凝集试验进行初筛。

1. 出发菌株的培养时间: 给体菌与受体菌在培养 16、20、24 小时之后进行杂交。

2. 杂交时两菌的混合比例: 等量混合或受体菌为给体菌的 4 倍。

3. 杂交时间: 混合后立即接种或混合后于 37℃ 放置 2—3 小时后接种。

4. 接种平板浓度: 以本实验室得出的杂交频率, 比较每毫升含 10^{10} 、 10^9 、 10^8 菌的三个不同接种浓度(以便于挑选单颗菌落为前提)。

根据以上结果得出如下杂交方法: 先将两个出发菌株分别接种在厚金格尔琼脂斜面上, 培养 16—20 小时, 将菌落刮入少量盐水中, 以标准比浊管进行比浊, 然后以牛肉汁稀释至 10^{10} /毫升, 两菌等量混合, 于 37℃ 放置 2—3 小时, 取 0.1 毫升, 以 L 形棒涂于选择平板上, 2—3 日后如有杂交菌落即可挑出。

五、再杂交方法

基本同杂交方法, 但选择标记不同。所用痢疾杆菌的给体菌菌号为 HF_{3a} 3-13, 是链霉素敏感株, 与耐链霉素的痢疾杆菌杂交, 在选择培养基中加入链霉素(每毫升 400 微克), 在选择平板上挑选发酵乳糖的菌落, 并以血清学试验, 检定是否为广谱痢疾菌株及有无其它变化。

实验结果

一、杂交条件的比较

Hfr C 与 F_{2a}1 菌株以不同杂交条件进行杂交, 接种浓度为 10^9 , 比较其结果见表 2。

通过比较可以看出, 出发菌株(原菌株)的培养时间在 16 至 20 小时, 杂交株出现的频率差别不大。两菌等体积混合或受体菌为给体菌四倍时亦无差别, 杂交时间在混合后立即涂平板与混合 2 至 3 小时后再涂平板相比, 以后者

表 2 不同条件杂交结果的比较

培养时间 (小时)	活菌率(%)		混合比例	杂交时间 (小时)	杂交株出现频率*
	Hfr C	F _{2a} 1			
				0	—
16	45.5	48	1:1	3	2×10^{-8}
16	45.5	48	1:4	3	2×10^{-9}
20	59	54	1:1	3	2.4×10^{-8}
24	68	44	1:1	3	0.16×10^{-8}

$$\begin{aligned} * \text{杂交株出现频率} &= \frac{\text{杂交株菌落数}}{\text{活菌率} \times \text{接种菌量}} \\ &= \frac{10}{50\% \times 10^9} = 2 \times 10^{-8} \end{aligned}$$

为好。两菌混合后立即涂抹的杂交试验, 重复三次以上均未出现杂交菌落, 这与 Luria 报告的杂交株出现频率很高的结果不同^[3]。其原因可能是性纤毛脱落所致。接种浓度经多次实验, 10^8 以下者未出现杂交菌落, 10^9 一般可出现 10 个左右。

浓菌苔混合涂平板, 也可出现杂交菌落, 但频率很低(0.5×10^{-10})。

二、杂交株的类型

杂交株的类型见表 3。

从表 3 可以看出, 杂交后以乳糖阳性为指标, 所得杂交类型较多, 有的无毒力, 有的有毒力, 无毒力者较多, 占 6/10。此外大部分杂交株只具群抗原而成为 Y 变种, 占 96.7%, 具型抗原的较少, 约占 16.7%。Falkow^[4]等人报告, 以乳糖为指标所选杂交株有毒力者居多, 而以鼠李糖为指标所得菌株则大部分不具毒力, 这与本实验结果不同。

用大肠杆菌诊断血清检查杂交株, 未发现与其凝集者, 但有大肠杆菌的其它特性如产气、动力等转移到痢疾杆菌。

三、再杂交

用 HF_{3a}3-13 与 F_{2a}6 及 F_{2a}9 两菌再杂交, 结果见表 4, 再杂交的第一代具有亲代型抗原及群抗原, 为两价广谱株, 但于第二代即发生了分离。分离结果, 一种只保留了亲代群抗原, 成为不具型抗原的菌株, 另一种则成为福氏志贺氏 3b 型菌株。此种变化可以概括为:

表 3 杂交株的类型*

菌株**		HF _{1a}	HF _{2a} 1-2	HF _{3a} 2-1	HF _{3a} 2-3	HF _{3a} 4-17	HF _{3a} 4-19	HF _{3a} 3-13	HF _{3a} 3-15	HF ₆ 2404	HST	HfrC × F _{2a} 1 (50株)	各类阳性百分率 (%)
产气		-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	5
动力		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1.7
痢菌 疾抗 杆菌	型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	16.7
	群	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	96.7
毒力***		0	10亿	2.5亿	0	0	2.5亿	0	0	10亿	0	(未测)	

* “+”表示阳性,“-”表示阴性。

** 全部菌株均发酵乳糖,大肠杆菌抗原(血清)阴性,均非营养缺陷型。

*** 以豚鼠角膜最小感染量计。

表 4 再杂交菌株抗原分离情况

出发菌株	第 一 代							第 二 代															
	Lac	菌落 形态*	血清凝集					抗原式	型别	Lac	菌落 形态	血清凝集					抗原式	型别					
			型		群							F _{II}	F _{III}	3,4	6	7			F _{II}	F _{III}	3,4	6	7
			F _{II}	F _{III}	3,4	6	7																
HF _{3a} 3-13 × F _{2a} 6	+++	扁平,中 央紫黑, 边缘淡灰 R型	+	-	+	+	-	F _{II} : 3,4,6	待定	+	同第一代	-	-	+	+	-	3,4,6	待定					
										-	深红S型 小菌落	+	-	+	-	-	F _{II} : 3,4	F _{2a}					
HF _{3a} 3-13 × F _{2a} 9	+	同上	+	+	+	+	-	F _{III} : 3,4,6	待定	+	同第一代	-	+	+	+	-	F _{III} : 3,4,6	F _{3b}					
										-	深红S型 小菌落	+	-	+	-	-	F _{II} : 3,4	F _{2a}					
										-	淡红R型 小菌落	+	-	+	-	-	F _{II} : 3,4	F _{2a}					

* 菌落形态指在 EMB 平板上的情况: “+++”表示阳性,“-”表示阴性。

HF_{III}:6,7 × F_{II}:3,4 → F_{II,III}:3,4,6

(再杂交) (第一代)

→ F_{III}:3,4,6

(第二代)

同时两者均出现发酵乳糖阳性(Lac⁺)的返祖菌落。未发现第二代的菌落中仍具有两价型抗原的菌株。

讨 论

1. 杂交时间问题: 大肠杆菌的染色体于菌液混合后 8 分钟开始逐渐进入受体细胞, 历时大约 90 分钟。因此在 2 至 3 小时将混合菌液涂抹平板是适宜的。菌液混合后立即涂抹, 杂交尚未进行, 因此在平板上看不到杂交菌落。但是以浓菌苔混合涂抹选择平板, 也可出现杂交株(如本实验室 HF₆2404 株即用此法所得)。

这主要因浓菌苔混合后, 可使亲代细胞有紧密接触的机会而产生接触感染。但用此法杂交, 频率很低。杂交时间如为大肠杆菌染色体全部进入的时间, 也有其缺点, 即不能有选择地选取某个染色体片段, 因此所得结果多样, 工作量增加。但其优点是 *E. coli* Hfr C 菌株染色体的易断裂点在乳糖段之前^[5], 用乳糖作为指标(即末端标记), 选出的杂交株(HF_{3a}3-13)能与其它痢疾杆菌杂交成功。但 *E. coli* Hfr C 是否为高频重组株, 还有待研究。

2. 血清学检查发现经杂交后受体菌的型抗原容易丢失, 群抗原一般都保留, 由福氏志贺氏 2a 变为 Y 变种, 这一点在探讨痢疾菌型变迁问题上是值得注意的。我们在这些试验中也未曾获得大肠菌血清型抗原的菌株。

3. 若在选择用平板上乳糖阳性菌落中, 只

选择有痢疾抗原者,则应注意被淘汰的乳糖阳性菌落中可能存在的两种情况:一是虽未获得痢疾菌特异性抗原,但已得到了痢疾菌的某个或几个性状,这也是杂交株;二是个别大肠菌发生了由营养缺陷型突变为原养型。所以在选择用指标问题上,还需要深入探讨。

4. Тимаков 等报告福氏志贺氏血清型抗原结构的变化与原噬菌体的存在和丧失有关^[6]。从我们的实验来看,用再杂交法也可使痢疾菌发生血清型抗原结构的变化,如福氏志贺氏 3a 菌的杂交株与福氏志贺氏 2a 菌杂交得到了福氏 3b 菌株。这从另一角度提供了有关痢疾菌株血清型变异的线索。

从再杂交的结果还可看到,利用杂交法得到广谱菌株是可能的,但是需要解决菌株发生分离的问题。

参 考 文 献

- [1] Dupont, H. et al.: *J. Infect. Dis.*, **125**: 5—11, 1972.
- [2] Dupont, H. et al.: *ibid*, **125**: 12—16, 1972.
- [3] Luria, S. E. et al.: *J. Bact.*, **74**: 461—476, 1957.
- [4] Falkow, S. et al.: *J. Bact.*, **86**: 1251—1258, 1963.
- [5] Hayes, W.: *The Bacterial Chromosome, Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, Vol. 10 (ed. by Hayes, W. and C. Clowes), Cambridge University Press, London, 1960, p. 12—38.
- [6] Тимаков, В. Д. и др.: *Вестн. АМН СССР.*, **7**: 18—27, 1976.