

细菌 DNA-DNA 固相膜核酸分子杂交技术 在细菌同源性鉴定上的应用

林万明 李银太 郭兆彪 高树德

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

国外继细菌 DNA 鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)克分子百分比(G + C mol%)作为分子遗传学指征;用于细菌分类之后^[1], DNA 分子杂交技术作为细菌分类鉴定的新指标业已开始广泛应用^[2], 国内因受某些条件所限, 目前尚属起步。为了迅速提高我国细菌分类鉴定的研究水平, 我们初步建立了用 ³H-TdR 体内标记细菌 DNA, 通过固相膜分子杂交技术来鉴定细菌 DNA 的遗传同源性的方法, 现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 菌种

大肠埃希氏菌 (*Escherichia Coli*) K12, AS. 1.748, AS. 1.359, AS. 1.798 3 株;枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS. 1.88; 蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*) AS. 1.126; 地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*) AS. 1.269; 短小芽胞杆菌 (*B. pumilus*) AS. 1.272; 炭疽芽胞杆菌 (*B. anthracis*); 2 株(强毒株 10 株, 弱毒株 2 株); 鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 410050; 土拉巴斯德氏菌 (*Pasteurella tularensis*) 41010; 沙门氏菌属 (*Salmonella*) 5 株, 志贺氏菌属 (*Shigella*) 3 株; 弧菌属 (*Vibrio*) 6 株; 绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas pyocyanea*) AS. 1.512, 以上菌种由本室菌种组提供。

(二) DNA 的体内标记和提取

1. DNA 的体内标记^[3]: 细菌接种入 5ml 肉汤管中 37℃ 过夜, 再转种到含 100 ml 肉汤的 1000 ml 三角瓶中, 37℃ 振荡培养, 待细菌生长到对数生长期获得足量菌体后, 加入 150ml 肉汤, 同时加入 1mci ³H-TdR, 37℃ 继续振荡过夜后离心收集菌体。

2. DNA 的提取: 放射性 DNA 和无放射性 DNA 的提取方法相同, 使用苯酚氯仿混合提取法^[4]。

3. ³H-DNA 的放射性测定^[5]: 在含有 25 μ g ³H-DNA 的 1ml 1 × SSC 溶液中, 加入 10% TCA 1 ml 沉淀 ³H-DNA, 膜放过滤装置上, 加 5% TCA 5 ml 抽洗一次, 加上述沉淀过的 ³H-DNA 抽滤, 再加 5% TCA 5 ml 抽洗一次。取下膜放闪烁瓶中, 在干燥缸内 80℃ 抽气干燥 30 分钟, 加闪烁液 8 ml, 暗化过夜后测定放射活性。一般比放射强度达 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ cpm/ μ g。

(三) DNA-DNA 杂交^[5-7]

1. DNA 的变性: 在 50 μ g/ml DNA 的 1 × SSC (0.15M NaCl-0.015M 柠檬酸钠, pH7.0 称 1 × SSC, 稀释 10 倍为 0.1 × SSC; 浓缩 3 倍为 3 × SSC; 类推为 6 × SSC 12 × SSC) 中加 10N NaOH 至 0.1N, 煮沸 10 分钟, 立即放冰浴冷却, 用 5M NaH₂PO₄ 调 pH 7—8, 加等体积预冷的 12 × SSC, 成 25 μ g/ml 变性 DNA 的 6 × SSC 溶液。

2. DNA 膜的制备: 混合纤维素酯微孔滤

表1 细菌 DNA 在不同溶液中的 T_m 值

菌 名	在 1×SSC 的 T _m ℃	在 6 × SSC-50% 甲酰胺 中的 T _m ℃	比 1×SSC 降低的温度 (℃)
大肠杆菌(1.748)	91.0	65.8	25.2
绿脓杆菌(1.512)	97.0	71.3	25.7
霍乱弧菌(860104)	89.5	63.4	26.1
鼠疫杆菌(410050)	89.5	64.2	25.3
痢疾杆菌(480117)	91.3	65.4	25.9
土拉杆菌(41010)	82.8	57.6	25.2
腊状杆菌(170071)	84.0	57.9	26.1
枯草杆菌(170312)	87.9	62.5	25.4
炭疽杆菌(170045)	82.7	57.7	25.0
鼠伤寒沙门氏菌(50115)	91.0	65.2	25.8
平 均			25.5

膜(直径 25 mm, 孔径 0.45 μm, 国产)用蒸馏水充分浸泡, 再置 6 × SSC 30 分钟。膜放过滤器上, 加 5 ml 冷的 6 × SSC 抽洗一次。加上述变性 DNA 液 4 ml 抽滤, 流速 1—2 ml/分钟, 再加 5 ml 6 × SSC 抽洗一次。取膜放平皿内, 在室温干燥至少四小时, 再放干燥缸内 80℃ 抽气干燥 2 小时。

3. ³H-DNA 的剪切和变性: 取 20—30 μg/ml 的 1 × SSC ³H-DNA 液在冰浴中 50W 超声剪切 4 次, 每次 15 秒钟, 煮沸变性 10 分钟, 立即放冰浴中, 用 6 × SSC-50% FA (甲酰胺) 杂交反应液稀释成 1—1.5 μg/ml。

4. DNA 膜的预保温和杂交^[8]: 每个称量瓶(30 × 50 mm)放一片 DNA 膜, 加 1—2 ml PM (3 × SSC 中含 0.02% 的聚蔗糖 400, 0.02% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.02% 牛血清白蛋白) 液, 在 65℃ 水浴 6 小时 (至少 3 小时)。倒去 PM 液, 每个瓶加 ³H-DNA 杂交反应液 1 ml, 在最适复性温度 (TOR) 保温适当时间。

5. 杂交膜的放射性测定和杂交百分率的计算: 杂交完成后, 膜用 6 × SSC-50% FA 漂洗一次, 用 3m M Tris 缓冲液漂洗两次, 然后把膜放过滤装置上, 加 5 ml 3m M Tris 抽洗一次。取下膜放闪烁瓶中, 在干燥缸内 80℃ 抽气干燥 30 分钟, 加入闪烁液 8 ml 暗化过夜后, 在液体闪烁仪上进行放射性测定。以参考菌株杂交 (同源杂交) 的放射性计数为 100%, 可求出测定菌株与参考菌株杂交 (异源杂交) 的相对百分数 (杂

交百分率)。

结 果

(一) 杂交反应条件的确定

1. 杂交反应的 TOR: 在核酸分子杂交试验中, TOR 是一个重要的反应条件。TOR 通常与 DNA 中 G + C 含量和杂交介质有关, Marmur 等证明, 在 1SSC 中 TOR 比 T_m 值低 18—22℃, Gillis 等也发现, 在 2SSC 中 TOR 比 T_m 值低 22—26℃^[10]。我们首先观察不同细菌 DNA 在 1 × SSC 和 6 × SSC-50% FA 中 T_m 值的变化规律, 发现后者低 25.5℃ 左右 (表 1)。

Crosa 等^[13]比较了在 1SSC 中 TOR 低于 T_m 值 15℃ 和 30℃ 时的杂交结果, 发现低温 (T_m-30℃) 时, 碱基错配可达 20%, 而高温 (T_m-15℃) 时错配可减少到 8% 以下。Stanier 等^[9]也曾报道, TOR 低于 T_m 值 15℃ 比低于 30℃ 时碱基配对的特异程度更高。由此, 本实验选择低于相应 T_m 值 15℃ TOR。这样在 6 SSC-50% FA 杂交反应液中的 TOR 要比在 1SSC 中低 40.5℃ (15 + 25.5)。因大部分细菌的 G + C 含量可从文献中查到, 并可由 Marmur 等^[11]建立的公式 $T_m = 69.3 + 0.41(G + C)$ 计算 T_m 值。所以, 在本实验条件下, TOR 可由下式求出:

$$\begin{aligned} \text{TOR} &= (69.3 - 40.5) + 0.41(G + C) \\ &= 28.8 + 0.41(G + C) \end{aligned}$$

随后, 我们用 6SSC-50% FA 分别研究了大

肠杆菌和炭疽杆菌同源杂交与温度的关系,证明大肠杆菌的 TOR 为 45—50℃,炭疽杆菌为 37—42℃ (图 1) (两者均比在 1SSC 中的 TOR 低约 40℃)。这与用公式计算的结果 (大肠杆菌 TOR 49.7℃,炭疽杆菌 TOR 41.9℃) 是一致的。

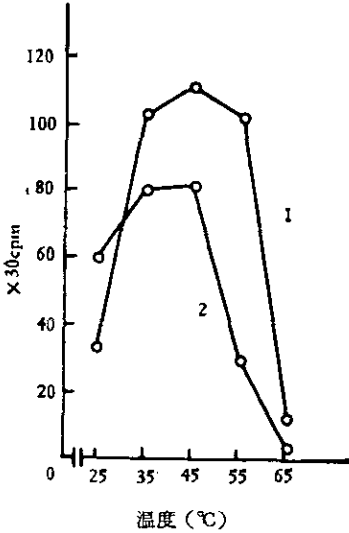


图 1 DNA-DNA 杂交反应最适温度曲线

2. 杂交最适比值(饱和)试验: 为了使 ^3H -DNA 充分杂交和减少自我复性,合理地选择 ^3H -DNA 与膜上 DNA 的浓度比值是十分重要的。以炭疽杆菌同源杂交为例。杂交液 1 ml (含 ^3H -DNA 1 μg), 与含不同量 DNA 的膜一起,在 41℃ 反应 45 小时。由图 2 可见,随着膜上固定 DNA 量的递增而计数增加,当膜上 DNA 达 50 μg 以上时,计数趋于水平(杂交饱和),即

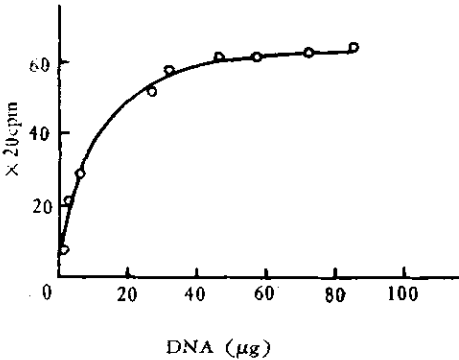


图 2 杂交最适比值曲线

^3H -DNA 与膜上 DNA 的最适比值为 1:50。

3. 杂交最适反应时间试验:在 41℃ 和 1:50 的比值条件下,试验表明,炭疽杆菌不同时间的同源杂交最适反应时间在 45 小时左右。反应时间过短,碱基配对不充分,反应时间太长,有可能增加非特异性。

(二) 杂交分子特异配对的检查

测定杂交分子的热稳定性,可以验证互补碱基特异配对的程度。若杂交分子配对完全,其 T_m 值应与天然 DNA 的 T_m 值相符,我们对炭疽杆菌同源杂交分子进行了 T_m 值测定,如图 3 所示,炭疽杆菌同源杂交分子的 T_m 值 (81.0℃) 与天然 DNA 分子的 T_m 值 (82.7℃) 基本一致。

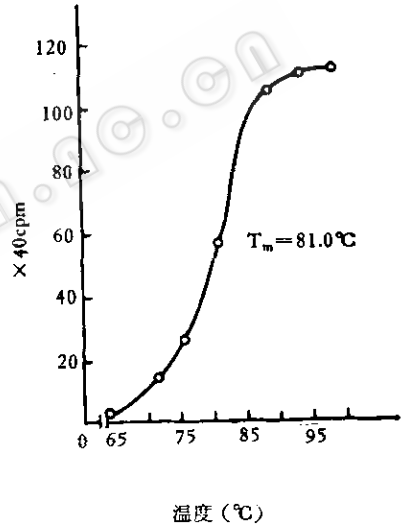


图 3 炭疽杆菌同源杂交 DNA 分子的热变性曲线

(三) 固相膜杂交技术在细菌分类鉴定上的应用

用本法对已知 5 个属 16 种 33 株细菌进行了杂交试验,结果是满意的。表 2—4 的结果表明,细菌种内 DNA-DNA 杂交都有较高的同源性,其杂交率多在 70% 以上;同时,也显示出某些菌种之间存在着比较密切的亲缘关系,如炭疽杆菌的某些菌株与蜡状杆菌有较高的同源性 (52%—100%),这与 Priest 等^[12]报道二者的同源性 (56% 和 96%) 是基本一致的。大肠杆菌与志贺氏菌有一定程度的同源性。

表 2 DNA-DNA 杂交对炭疽杆菌同源性的鉴定

试 验 细 菌	与标记菌株的杂交%	
	炭疽杆菌(强毒株 17003-54)	炭疽杆菌(弱毒株 170045)
炭疽杆菌(强毒株 17003-54)	100	100
炭疽杆菌(弱毒株 170045)	84	100
炭疽杆菌(强毒株)17003-67	98	98
炭疽杆菌(强毒株)17003-61	97	80
炭疽杆菌(强毒株)17003-49	91	99
炭疽杆菌(强毒株)17003-25	86	98
炭疽杆菌(强毒株)17003-28	83	89
炭疽杆菌(强毒株)17003-19	75	94
炭疽杆菌(强毒株)17003-62	75	82
炭疽杆菌(强毒株)17003-42	72	93
炭疽杆菌(强毒株)17003-15	64	80
炭疽杆菌(弱毒株)170046	83	78
蜡状芽孢杆菌 1.126	52	100
枯草芽孢杆菌 1.88	0	23
地衣芽孢杆菌 1.269	0	0
矮小芽孢杆菌 1.272	0	0

表 3 DNA-DNA 杂交对沙门氏菌和大肠杆菌同源性的鉴定

试 验 细 菌	与标记细菌的杂交(%)	
	B 群鼠伤寒沙门氏菌(50115)	大肠杆菌 K12 (1.748)
B 群鼠伤寒沙门氏菌 50115	100	34
伤寒沙门氏菌 50096	87	27
副伤寒沙门氏菌甲 50503	74	-
C 群汤姆逊沙门氏菌 50024	92	25
E 群鸭沙门氏菌 50083	84	-
大肠杆菌 K12 1.748	38	100
大肠杆菌 K12 1.359	28	92
大肠杆菌 K12 1.798	32	96
宋内氏痢疾杆菌 480253	48	72
福氏痢疾杆菌 4b 480117	42	78
福氏痢疾杆菌 2b 48009-12	29	-

3—5 次试验结果的平均值

表 4 DNA-DNA 杂交对霍乱弧菌同源性的鉴定

试 验 细 菌	与标记副霍乱弧菌(小川型 860104)的杂交(%)
副霍乱弧菌(小川型)860104	100
副霍乱溶源性敏感株 860115	60
霍乱非溶源性菌株 860114	53
霍乱弧菌(稻叶型) 860072	51
霍乱弧菌(彦岛型) 860091	62
不凝集弧菌 860117	52
大肠杆菌 K12 1.748	2
伤寒沙门氏菌 50096	5
副伤寒沙门氏菌甲 50503	6
C 群汤姆逊 50024	3

讨 论

1. ^3H -TdR 细菌体内标记技术操作简单,结果稳定。但 TdR 加入,可诱导磷酸化酶产生,影响 ^3H -TdR 的继续渗入菌体,所以培养基应尽量不含胸腺核苷,并加入 5-氟脱氧尿苷 1.5 $\mu\text{g/ml}$,可有效地抑制胸腺嘧啶合成酶。加入腺苷脱氧鸟苷 250 $\mu\text{g/ml}$,有时也可抑制磷酸化酶产生。此外对于那些 ^3H -TdR 渗入量少的菌(如假单胞菌属中的细菌和酵母菌等),可考虑换用 ^{32}P 或 ^{14}C 进行体内标记。

2. DNA-DNA 杂交百分率可反映核苷酸顺序的相似程度,进而可以阐明细菌之间的亲疏关系。杂交百分数与密切程度,目前还没有统一的标准,需根据具体试验结果综合判定。Priest^[12] 根据他们的试验结果认为;杂交百分率 $>75\%$ 为高重组,表示两个基因组差别非常小; $<25\%$ 为低重组,表示不相关分子。Owen 等^[3] 认为杂交百分率 $\geq 69\%$ 为同源性。我们取得的同源杂交百分率多数也在 70% 左右。

参 考 文 献

- [1] 林万明:《国外医学微生物学分册》, 2: 49, 1982.
- [2] 林万明:《国外医学微生物学分册》, 5: 19, 1983.
- [3] Owen, R. J. et al.: In Identification Methods for Microbiologists 2nd, No. 14, p. 277, eds Skinner, F. A. et al., Academic press, London and New York. 1979.
- [4] Zasloff, M. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 5(4): 1139, 1978.
- [5] Seki, T. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25(3): 258, 1975.
- [6] O'donnell, A. G. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30 (2): 448, 1980.
- [7] Gillespie, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 12: 829, 1965.
- [8] Denhardt, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23(5): 641, 1966.
- [9] Stanier, R. Y. et al.: In General Microbiology 4th Ed, p. 512, Macmillan press Ltd London and Basingstoke, 1977.
- [10] Gillis, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 12: 143, 1970.
- [11] Marmur, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 5: 109, 1962.
- [12] Priest, F. C. et al.: In the Aerobic Endospore-Forming Bacteria (Classification and Identification), p. 33, eds Berkeley, R. C. et al., Academic press, London and New York, 1981.
- [13] Crosa, J. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 115(1): 307, 1973.