

03型伪结核杆菌毒力基因的研究

包 毅

(福建省农业厅畜牧局)

林 颖 芬

(福建省卫生学校)

郑 玲 林应骞 程锦珍 包幼迪

(福建医学院基因工程研究室)

摘 要

用质粒消除技术, 从03型伪结核杆菌毒力株中筛选出同宗的质粒治愈株, 后者在缺失了一个分子量约为66kb (43.3MD) 的大质粒的同时, 丧失了对动物的侵袭性, 细菌毒力消失。证实03型伪结核杆菌的毒力基因是位于染色体外的环状质粒DNA上, 该质粒还编码了细菌的两个表型, 1. 外膜蛋白的产生; 2. 依赖钙离子生长。本文提示: 要判定从临床上分离的03型伪结核杆菌是否具有毒力, 应以检测其是否具有66kb的毒力质粒为标准。

关键词 03型伪结核杆菌, 毒力基因, 质粒

材 料 和 方 法

一、菌株来源 (一) 03型致病性伪结核杆菌由福建省流行病研究所于恩庶所长提供, 命名为YP03VW⁺。(二) 测定质粒DNA分子量的标准株为大肠杆菌RTS (140 MD质粒), R621 (65MD质粒), V517 (35.8MD、4.8MD、3.7MD、2.6MD、2.0 MD、1.8MD、1.4MD 质粒), RP4 (36MD 质粒)。由福建医学院基因工程研究室保存菌株。

二、细菌侵袭力测定 参照Sereny^[1]试验方法并加以改良, 用三只400克雄性、健康豚鼠, 观察三天其眼结膜无病变后, 刮取在26℃含血的中国蓝平板培养18~24小时的伪结核杆菌菌苔1/3白金耳环, 涂布于豚鼠右眼结膜的上、下穹窿部, 左眼结膜不涂菌为对照, 次日开始观察并记录结果, 连续三天, 每次试验均重复一次。

三、细菌钙离子依赖性生长的表型测定 将03型伪结核杆菌接种于2 ml普通肉汤, 26℃培养24小时, 10倍稀释, 取10⁻³稀释度的菌液涂布于乏钙培养基, 37℃培育48小时后转26℃继续培育24小时, 观察生长出的菌落形态。凡经37℃培育48小时生长的大菌落在转入26℃培养后能继续生长者, 为钙离子非依赖性(-); 凡经37℃培育未见菌落生长, 转入26℃培育后, 出现小菌落生长者, 为钙离子依赖性(+)。

四、外膜蛋白的测定 将细菌接种于2 ml的RPMI-1640^[2]组织培养液数管, 分别置37℃和26℃培养24小时, 出现凝集者, 为外膜蛋白阳性, 记录为(+), 否则为(-)。

五、质粒治愈株的筛选 将带有质粒的03型伪结核杆菌置LB肉汤, 30℃播育18小时, 取1/10菌液, 涂布于乏钙培养基上, 37℃培育24小时, 挑取乏钙培养基上出现的单个的大菌落, 于LB肉汤中扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 证实质粒消除, 将该菌命名

* 本文于1988年1月20日收稿。

为YP03VW⁻。

六、质粒DNA的提取、电泳、拍照等技术 均按包幼迪所介绍的方法和程序〔8〕。

七、标准质粒分子量计算机程序系统和质粒分子量的测定 按包幼迪所介绍的方法〔4〕。

结 果

一、具有毒力的03型伪结核杆菌经质粒DNA检测证实有一条分子量约为43.3 MD的质粒带，而其质粒治愈株，随着这条质粒带的消失而丧失毒性。

二、YP03VW⁺和它的同宗质粒治愈株YP03VW⁻的钙离子依赖性和外膜蛋白表型的测定结果见表。

表 YP03VW⁺和YP03VW⁻钙离子依赖性和外膜蛋白的测定

	乏 钙 培 养		外膜蛋白自凝现象	
	26°C	37°C	26°C	37°C
YP 03 VW ⁺	+	-	-	+
YP 03 VW ⁻	+	+	-	-



图1 接种YP03VW⁺有质粒的毒力株

图2 接种同采的质粒治愈株

图3 无接种的阴性对照

三、细菌对豚鼠眼结膜侵袭性的毒力试验结果见图1、图2、图3。从图中看出YP03VW⁺有质粒的毒力株接种豚鼠眼结膜24小时后，球结膜出现充血、水肿，伴有大量分泌物和脓性渗出物，而其质粒治愈株VW⁻接种豚鼠眼结膜后未见任何病变。

讨 论

一、伪结核杆菌是啮齿动物，家畜和禽类的致病菌，它与鼠疫杆菌、小肠结肠炎杆菌同属耶尔森菌属。目前已知它有5个型。本实验仅对Ⅲ型的伪结核杆菌的毒力基因进行了研究。

二、质粒为细菌染色体外能自我复制和遗传的闭环DNA，近代分子遗传学研究表明许多畜禽重要病原菌的毒力、毒素产生、与免疫有关的抗原表达，耐药性等的基因均位于质粒DNA上。本实验用质粒消除技术，获得了03型伪结核杆菌的质粒治愈株，该株丧失了对动物的侵袭作用，致病性消失，证实了03型伪结核杆菌的致病性是由一个分子量约为66kb的毒力质粒所介导，在一定的外界条件下，细菌会丢失该质粒，由致病性转变为非致病性，因此检测质粒可作为该菌是否有致病性的依据。

三、本实验参照了标准的痢疾杆菌侵袭力测定的豚鼠眼结膜试验方法, 检测了03型致病性伪结核杆菌的毒力质粒, 试验结果表明该法迅速、准确、可靠, 可作为测定细菌侵袭性毒力质粒的常规方法。

四、03型伪结核杆菌的毒力质粒还编码的两个表型: (1)外膜蛋白; (2)钙离子依赖性生长, 它们与细菌致病性之间的关系, 目前还不清楚, 有待于今后用专一基因的分克隆方法来进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Sereny, B., 1957. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta Microbiol. Hung.* 4: 367~376.
- [2] 包幼迪, 1984, 小肠结肠炎耶氏菌V/W抗原DNA的检测。福建医学院学报(增刊), 109~110。
- [3] 包幼迪, 1984, 质粒的快速电泳检测法。福建医学院学报(增刊), 107~108。
- [4] 姚瑞金、包幼迪, 1987, 人源产肠毒素大肠杆菌(ETEC)定居因子抗原I和II(CFA/I和CFA/II)的检测及其质粒分子生物学研究。中华微生物学和免疫学杂志, 7(5)。

A STUDY ON THE VIRULENCE GENE(S) FROM 03 SEROTYPE STRAIN OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

Bao Yi

(*Animal Husbandry Bureau of Fujian Province*)

Lin Yinfen

(*Fujian Hygienical Academy*)

Zheng Ling, Lin Yinqiang, Cheng Jinzhen, Bao Youdi

(*Laboratory of Genetic Engineering of Fujian Medical College*)

Abstract

The plasmid-cured strains selected from 03 serotype virulent strain of *Yersinia Pseudotuberculosis* did not express tissue invasion after losing the 66 kb plasmid and showed avirulent in an appropriate animal model.

The result showed that the virulence gene(s) of 03 serotype strain of *Yersinia Pseudotuberculosis* was located on the circular plasmid which was self-replicating extra-chromosomal element, in addition, there were two plasmid-encoded traits: (1) expression of plasmid-mediated outer membrane proteins; (2) the Ca^{++} -dependent growth. Our report suggests that the 66kb plasmid is essential for determining whether 03 serotype strain of *Yersinia Pseudotuberculosis* isolated from clinical case is virulent or not.

Key words 03 serotype *Yersinia Pseudotuberculosis*, Virulence gene(s), Plasmid