

• • • • •
综 述
 • • • • •

多位点酶电泳法在细菌的群体遗传学、分类学及分子流行病学研究中的应用

河南医科大学流行病学教研室 段广才*

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 刘延清 祁国明

长期以来,细菌的分类和流行病学研究主要靠其生理、生化及免疫学等特征来进行,如血清学分型、生物分型、鞭毛分型、噬菌体分型等〔1〕。这些表型很难与细菌的多位点基因或等位基因的变异情况直接联系起来。随着分子生物学的发展和对细菌的认识逐步深入,这些分类方法显得越来越不能满足需要。核酸酶切图谱分析、染色体DNA分子杂交技术等已较多用来研究细菌菌株间的遗传异同性及分子流行病学〔2,3〕但由于这些方法仍有一些明显的不足,使其应用受到一定的限制〔4〕。如染色体DNA分子杂交的主要缺点是:(1)用DNA分子杂交获得的结果是来自一组细菌与一个或几个参考菌株之间的相似程度,而不能获得所有被测菌株间的遗传关系系数,给分类造成一定困难,且参考菌株选择不当也易造成错误分类。(2)染色体外DNA的存在是错误估计遗传关系的原因之一。(3)实验误差相对较大,不同实验室甚至同一实验室的重复结果有时很不一致〔5〕。核酸酶切图谱分析的不足之处是:(1)无明确统一的图谱阅读方法。(2)无法从基因水平分类。(3)染色体外DNA的影响。根据一个基因一个酶的学说发展起来的多位点酶电泳(Multilocus Enzyme Electrophoresis,简称MEE)法,其所分出的Electrophoretic Type(简称ET)可以相当于基因型(genotype)〔6〕,因而近年来广泛地应用于细菌的群体遗传结构、分类及分子流行病学研究〔7~9〕。

MEE法的发展及应用简史

五十年代以来,各项电泳技术的发展,可以对生物大分子物质(蛋白质和酶等)的分子量和电荷进行精确的电泳分离分析。六十年代初,遗传学工作者开始探讨应用同功酶凝胶电泳技术来研究真核生物的遗传多态现象。Hubby和Lewonti等〔10,11〕于1966年

应用MEE法来研究和阐述果蝇的群体遗传结构。此后,MEE法很快成为研究真核生物进化及其群体遗传结构和分类的标准方法〔12〕。应用MEE法系统地对细菌自然群体进行群体遗传学研究是Milkman等从1973年开始的〔13〕。他们通过对自然群体的几百株大肠杆菌的五个酶位点的研究,取得了大肠杆菌的遗传多态度和某些位点的等位基因频率的一些数据,并以此对细菌分子进化中的中性学说〔14〕进行验证,提出了不同的观点。八十年代以来,Selander等在电泳、染色方法及资料处理方面加以改进,使其广泛应用于大肠杆菌、脑膜炎球菌、痢疾杆菌等的群体遗传学和分类学研究〔15~17〕。Musser等〔18〕于1985年将MEE法应用于流行病学研究,对美国几十年来的流感嗜血杆菌的MEE分型发现,不同年流行的ET不同,并发现了ET的变迁趋势。这在阐明细菌的遗传变异规律和疾病流行特点方面前进了一步,同时也扩大了MEE法的应用范围。其后,又有在脑膜炎球菌、出血性大肠杆菌等病原菌变异规律及流行病学方面的进一步研究和探讨〔19~21〕。MEE法的应用使我们认识到细菌群体的进化过程,并为其分类和流行病学研究提供了新的手段〔22〕。

MEE法原理和方法

一、原理: 根据一个基因一种酶的学说,编码酶的染色体结构基因的多态性也表现为酶的多态现象。通过对酶分子量和电荷的变异情况进行研究,可以推算出其对应的基因位点的多态度,并通过多个酶基因位点的综合分析,可以获得细菌的基因型〔1〕。酶分子量和电荷变异情况的研究可以通过各种电泳方法来实现,常用的是聚丙烯酰胺凝胶和淀粉凝胶电泳。最近

* 现在中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

的研究表明,酶的氨基酸取代其80~90%都可以被电泳所测出。Selander和Ochman等〔5〕对大肠杆菌和军团菌的研究表明,用MEE法所推算的菌株间的遗传距离与全染色体DNA分子杂交所测出的非同源性结果是一致的,存在极强的相关性($r=0.8$)。多年的研究证实,酶电泳迁移率的变化,可以相当于其对应的基因位点的等位基因。因而MEE法是一个有效的用来研究等位基因频率和遗传型的方法〔4〕。

二、方法:

1.酶的提取和保存:首先要选择适当的检测酶。对于一般的分类和流行病学应用,选择C~8种有效的酶已可满足,但对于群体遗传学研究,常选择15种酶以上〔1〕。酶类型的选择应能反映染色体不同基因位点的酶,包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异位酶等。同时酶活性应达到检测的基本要求,且不随保存或培养条件的改变而发生变化。为了获取足够的酶浓度,一个菌株一般要求细菌数达 10^{11} 左右,然后悬于2ml裂解液(10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 6.8)。裂解方法常用的有两种:超声击碎法和冻融法。超声击碎法选用10-15KHz的超声波,在冰浴条件下,连续超声一般不超过30~60秒,以免温度过高导致酶活性下降。冻融法可-25℃, 48~72小时,然后室温下快速融解。反复冻融提高酶的释放率,但酶活性会减低甚至丧失。裂解后,对裂解液进行离心1500r/min,除去未破碎的细胞及碎片,上清液即可进行电泳或-70℃保存待用。

2.电泳:电泳介质选用聚丙烯酰胺或淀粉凝胶。电泳在C~4℃条件下进行,电流不可太大,以防酶失活。

3.染色:不同的酶选用特异的底物和合适的染料对凝胶进行染色。较多用的方法是四唑盐法和偶氮色素法〔4〕。其优点是灵敏度高,定位较准确。

4.结果记录及编号:因每次电泳的菌株样品有限,所以要获得大量菌株样本多个酶位点的全部资料,就必须进行多次电泳。为保持结果的可比性,除严格控制实验条件外,每次电泳都要有一个参考株样品。染色后记录样品菌株主带的迁移距离(M_x)和参考菌株的迁移距离(M),求出相对迁移率(R_m)值,即 $R_m=M_x/M$,每一个酶的所有菌株按其 R_m 值由小到大排序1,2,3……, R_m 值相同者编号相同,酶缺失者为“0”,这样每个菌株在每个酶位点均获得一个数值(即等位基因),将多个酶位点综合起来就构成了各个菌株的独特性状,然后进行数值分类。

5.资料处理: MEE法所获资料,由于样本较大,数据众多,所以一般需计算机处理。目前国内外已有专门的软件。

①群体遗传学分析:群体遗传学分析基本的有以下几项指标:

等位基因频率: $F_{ij}=T_{ij}/N$ F_{ij} —第*i*个酶位点第*j*个等位基因的频率; T_{ij} —第*i*个酶位点第*j*个等位基因的频数; N —细菌总数。

平均杂合度(h): $h = \sum_{i=1}^T N_i/T$ N_i —第*i*个酶位点的等位基因数; T —所测酶位点数。

遗传多态度(H_i): $H_i = (1 - \sum_{j=1}^{N_i} F_{ij}) N / (N - N_i)$
1) H_i —第*i*个酶位点遗传多态度; F_{ij} 、 N_i 、 N 的意义同上。

平均遗传多态值(H): $H = \sum_{i=1}^T H_i/T$ H_i 和 T 的意义同上。

上述指标如进行群体间的比较,可进行统计学检验。

②数值分类法〔23〕:将细菌的各种性状,包括基因和各种表型,用一定的数值符号规定和表示。如两级分类法0, 1或多级分类法 0,1,2, 3……。每个菌株所获得的多种性状符号结合起来,就构成了众多具有独特性状的细菌小群体(性状相同合并)或细菌个体。在此基础上进行聚类分析(可用相似系数法或距离法),则这些具有独特性状的小群体或个体,就成为最初级运算分类单元(Operational Taxonomy Unit, 简称OTU)。对于MEE法的资料,这样的最初级OTU就相当于ET。然后计算任意两个ET间的遗传距离 D (或不相似系数 U),求出距离矩阵。 D 值的意义是任两个ET间或菌株间的相对差异大小,可以用酶位点的错配率来表示。即 $D=r/t$, D —遗传距离; r —错配酶位点数; t —酶位点总数。由此可得出距离矩阵(表示任两个菌株或ET间的遗传距离),聚类树状图(表示整个聚类过程,可用单连接或平均连接法)等结果。

举例如下:假设有5株细菌,共测了4个酶位点,其获得的编号如表1,等位基因频率见表2,其平均杂合度 $h=3$,每个酶位点的遗传多态度分别是: $A(0)$, $B(0.70)$, $C(1.0)$, $D(0.80)$ 。平均遗传多态值 $H=0.625$ 。表3为距离矩阵,附图是聚类树状图,

表1 5株细菌的ET

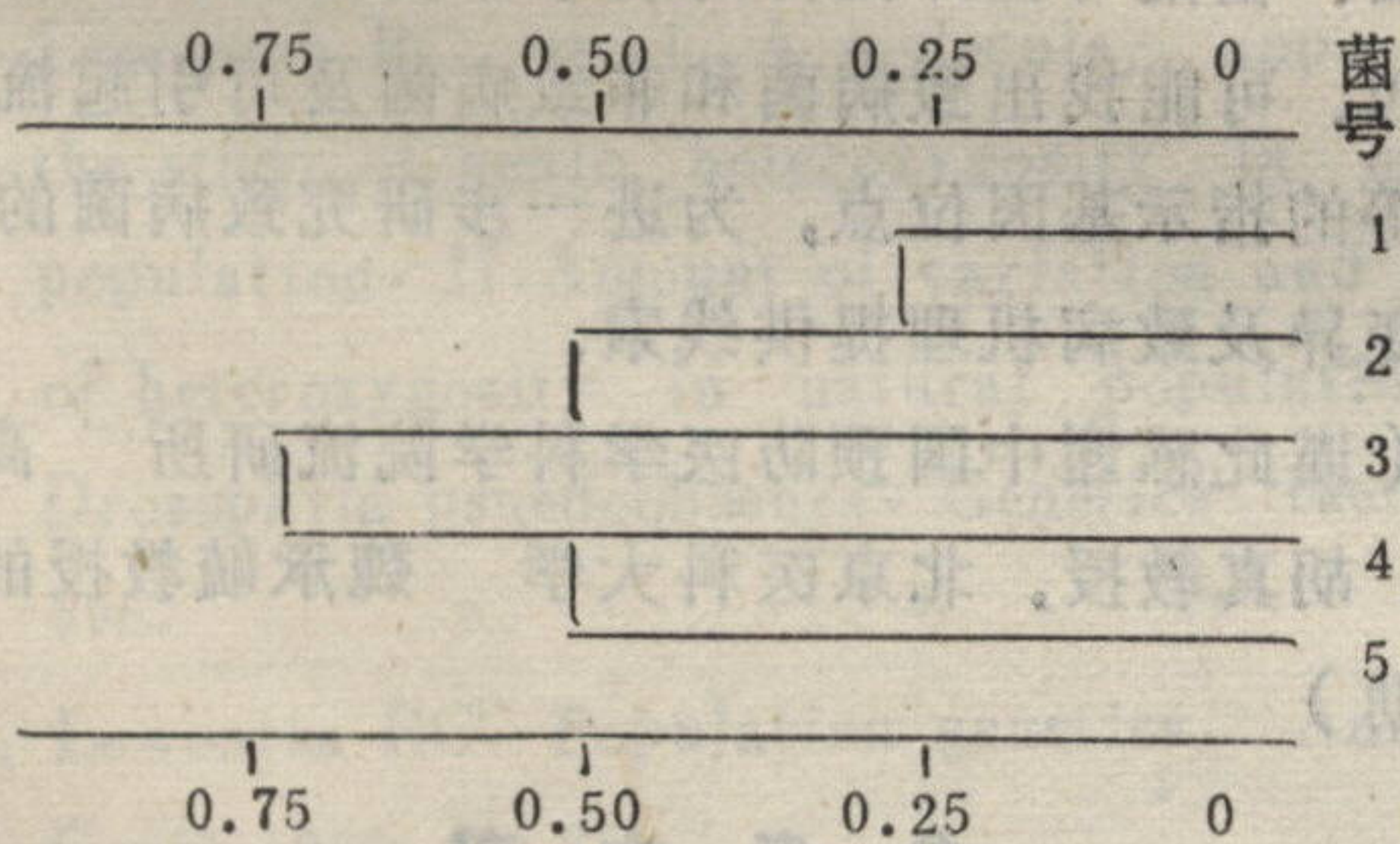
菌号	酶位点			
	A	B	C	D
1	1	3	4	2
2	1	3	3	2
3	1	3	5	1
4	1	2	1	3
5	1	1	2	3

表2 5株细菌的等位基因频率

酶位点	等位基因				
	1	2	3	4	5
A	1.00				
B	0.20	0.20	0.60		
C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
D	0.20	0.40	0.40		

表3 菌株(ET)间遗传距离

菌号	1	2	3	4
2	0.25			
3	0.50	0.50		
4	0.75	0.75	0.75	
5	0.75	0.75	0.75	0.50



附图 上述资料的聚类树状图

MEE法在细菌群体遗传学上的应用

MEE法在细菌学中的最早应用是细菌自然群体的遗传结构的研究[13]。至今已有许多种细菌如大肠杆菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌、链球菌、霍乱弧菌等应用MEE法进行群体遗传结构的研究,所测酶类已从开始时的5、6种到现在的十几种,菌株样本逐

渐扩大,而且已由过去一个地区的研究,扩展到研究许多国家和地区分离的菌株。这对全面认识和了解细菌尤其是致病菌的群体遗传结构提供了依据。这些研究表明:(1)细菌的进化变异不仅有中性突变,而自然选择也起很大作用[12, 13]。(2)大多数细菌存在明显的遗传多态现象,但细菌是以克隆系存在的,提示不同细胞系的染色体重组率是很低的[15]。(3)在自然群体中,大多数致病菌的克隆数相对来说是有限的[21]。现在已可应用统计学方法通过随机抽样来估计自然群体中的细菌克隆数[1]。(4)虽然致病菌多克隆存在,但引起严重病情或引起流行的菌株常是极少几个克隆[19]。研究还表明,不同种细菌的群体遗传多态值是不同的,同一细菌群体在不同酶位点其遗传多态度差异也很大。

MEE法在细菌分类学中的应用

在细菌的分类学研究中,MEE法与传统的分类方法如血清分型、生物分型、噬菌体分型等比较有以下一些优点:(1)对所有被测的菌株都可分出型别。(2)ET相当于基因型,从遗传学上揭示菌株间的异同。(3)可获得任两型或两株细菌间的遗传距离。由于这些优点使其在细菌分类学中应用越来越广泛[6, 7]。MEE法不仅使我们认识到细菌遗传型的分布,而也揭示了整个群体中优势克隆的存在,并也表明有些致病菌其不同年代和不同地区优势型可以发生变化。

MEE法在流行病学上的应用

近年来,MEE法作为分子流行病学手段之一显示着重要作用,如1985年Musser等[18]对美国近40年来分离的流感嗜血杆菌b群菌株进行分析,发现近年来美国发生的由侵袭性流感嗜血杆菌引起的发病大多由两个非常接近的ET所引起。同时还发现1939~1954年间,有一个ET的出现频率快速增长。为阐明美国流感嗜血杆菌引起发病的流行规律及防治提供了重要资料。再如1987年Olyheok等[9]对联邦德国1915~1963年分离的A群脑膜炎球菌进行MEE分型,共分为55个型,21个克隆系。结果表明,绝大多数一次流行和爆发是由一个克隆系引起的,或有一个优势克隆系。自1915年以来,多次的流行都是由其中7个优势克隆系引起。MEE法用于流行病学研究主要在以下几个方面:

一、确定引起新的流行或新类型疾病的病原体克

隆：自70年代中期以来，从挪威北部开始向南部发展，并开始进入西欧的流脑大流行，经过MEE分析发现，其是由22个遗传关系非常相近的ET所引起(称为ET-5群)〔19〕。这一ET群还可追踪到南非、南美、古巴以及迈阿密、佛罗里达等地的流脑爆发。这些地区的流行和爆发很明显是古巴难民引起的。很重要的一点是这个ET群与脑膜炎球菌的其他型遗传差异很大，经群体遗传学分析，其是一组很独特的脑膜炎球菌群体，而不是来自挪威以前流行的脑膜炎球菌的突变或重组修饰。

大肠杆菌O157:H7菌株近年来已被发现是一种新的病原体，其在北美和英国等地已引起多次的出血性肠炎和出血性泌尿道综合征的爆发。其毒力主要来自志贺氏样毒素和质粒编码的粘附因子。为了查明其病原体及O157:H7菌株的群体遗传结构，Whittam等〔20, 24〕对北美分离的O157:H7菌株进行MEE分析。结果表明，所有北美分离的O157:H7菌株同属一个克隆。并且这个克隆与产生志贺样毒素的其他血清型的大肠杆菌克隆系之间没有明显的关系，与能够表达O157:H7脂多糖的其他克隆也没有密切关系。

二、从群体遗传学上揭示造成流行的菌株间的异同：在许多国家和地区，甚至在一次流行过程中，可以观察到脑膜炎球菌2a和2b菌株检出的相对频率常发生变化。因为2a和2b菌株的抗原在结构上很相似，所以过去的假设认为这种变化是由当时存在的菌株经抗原的微小修饰所致。但近年来用MEE研究的结果表明〔25〕：这两个血清型菌株分属不同的克隆系，其在多个酶位点上是不相同的。因此可以认为，近年来两个血清型检出率的变化，不是由原来优势克隆菌株的抗原修饰所引起，而是原来的优势克隆被新的优势克隆所取代。用MEE法研究的结果还表明〔9〕：过去六十余年来，世界范围内所有主要的流脑流行仅由11个克隆系引起，并且其中三个克隆系的菌株是造成六十年代以来大流行的病原体。

三、研究带菌者菌株群体与病人菌株群体的关系：在研究脑膜炎球菌的带菌者菌株和病人菌株的关系时，长期以来未取得明显进展，其主要原因之一是大多数从带菌者分离的菌株无法进行血清分群和分型。近来通过MEE研究发现〔17〕，在挪威有两个克隆群(ET-5群和ET-37群)近年来引起的流脑发病病例占80%，但在健康带菌者菌株中却仅占7%和9%，而在带菌者中广泛存在(19%)的带菌菌株，在流脑病人中却一株也没有发现。另外的研究也表明〔21〕：在

爱斯基摩人和阿拉斯加的居民中检出的流感嗜血杆菌b血清型菌株，大多为一个克隆，但这个克隆的菌株并不是阿拉斯加及其他地区引起发病的病原体，其极少在侵袭性病人中发现。这说明这个克隆的菌株虽可产生b型荚膜这一主要毒力因子，但其他毒力因子的基因可能发生了变化，因此为进一步进行分子水平的分析提供了重要的线索。

结 语

MEE法在细菌学研究中的应用虽已有十几年的历史，但近几年来才达到了迅速发展，在我国则刚刚开始。实践证明，MEE法是一种有效的分子生物学手段，可以用来研究细菌(尤其是致病菌)的群体遗传结构，进行基因水平上的分类，并也可应用于分子流行病的研究，以解决目前用其他表型方法所不能解决的问题。综观MEE法的应用历史及细菌性疾病的一些现实问题，今后MEE法用于致病菌研究可能集中在以下几个方面：

一、用MEE法进一步研究多种病原体的带菌菌株(或环境菌株)和病人菌株及可能造成流行(或大流行)的菌株相互间的遗传关系。并以MEE法为分子流行病学手段，进行传染源和传播途径的查踪。

二、通过一个地区致病菌的群体遗传结构及变化规律的研究，为疾病流行的预测和防治提供重要依据。

三、通过广泛合作，阐明几种世界流行的传染病如流脑、霍乱等世界流行的病原体演变规律。

四、可能找出致病菌和非致病菌及可引起流行的菌株等的指示基因位点，为进一步研究致病菌的致病基因变异及致病机理提供线索。

(谨此感谢中国预防医学科学院流研所 高守一教授、胡真教授，北京医科大学 魏承毓教授的指导和帮助)

参 考 文 献

1. Selander RK, et al. Genetic structure and variation in natural population of *Escherichia coli*. *Cell Mol Biol* 1987; 2: 1625.
2. Schleifer KH, et al. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann Rev Microbiol* 1983; 37: 143.
3. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigation of outbreaks. *Rev Infect*

- Dis 1986; 8 : 682.
4. Selander RK, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51 : 873.
 5. Selander RK, et al. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 1985; 163 : 1021.
 6. Caugant DA, et al. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1986; 132 : 641.
 7. Porras O, et al. Application of multilocus enzyme gel electrophoresis to *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1986; 53 : 71.
 8. Achtman M, et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2 : K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect Immun* 1986; 51 : 268.
 9. Olyheok T, et al. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis* 1987; 9 : 665.
 10. Hubby JL, et al. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1966; 54 : 577.
 11. Lewontin RC, et al. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1966; 54 : 595.
 12. Lewontin RC. Population genetics. *Ann Rev Genet* 1985; 9 : 81.
 13. Milkman R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 1973; 182 : 1024.
 14. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 1968; 217 : 624.
 15. Selander RK, et al. Genetics diversity and structure in population of *Escherichia coli*. *Science* 1980; 210 : 545.
 16. Baltran P, et al. Toward a population genetic analysis of *Salmonella* : Genetic diversity and relationships among strains of serotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 7753.
 17. Caugant DA, et al. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun* 1988; 56 : 2060.
 18. Musser JM, et al. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strain of *Haemophila influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 : 5078.
 19. Caugant DA, et al. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 : 4927.
 20. Whittam TS, et al. Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157 : H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1988; 157 : 1124.
 21. Selander RK, et al. Molecular basis of bacterial pathogenesis. Academic Press, 1988 : 1~42.
 22. Selander RK, et al. Population genetics of pathogenetic bacteria. *Micriobiol Pathogenesis* 1987; 3 : 1.
 23. Goodfellow M. CRC handbook of microbiology. CRC Press, 1977 : 579~596.
 24. Whittam TS, et al. Genetic relationships among pathogenic *E. coli* serogroup O157 : H7. *Infect Immun* 1988; 56 : 2467.
 25. Caugant DA, et al. Genetic relationships and clonal population structure of serotype 2 strains of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1987; 55 : 1503.