

## 利用菌落雜交技術偵測蝦病菌 *Vibrio harveyi*

### Detection of Shrimp Pathogenic Bacterium *Vibrio harveyi* by Colony Hybridization

蔡珊珊\* · 王西華\*\* · 謝玉玲\*

San-San Tsay,\* H. H. Wang\*\* and Yu Ling Shieh\*

#### Abstract

The recent application of nucleic acid probes to detect bacteria found in environmental samples shows great promise. The application of preexisting DNA hybridization techniques was investigated for potential in determining populations of specific gene sequences in environmental samples. In this study, we use shrimp pathogenic bacterium *Vibrio harveyi* as tested organism. Since this organism is a luminescent bacterium and the structural genes controlling of luminescent system has been studied and cloned to several plasmids. Having obtained a plasmid containing *Lux A* and *Lux B* genes, we have transformed the plasmid into *Escherichia coli*. After growing in LB broth, the plasmid was isolated and cut by restriction endonuclease *Hind III* to prepare probe. Colony hybridization experiment was performed by the probe with *Vibrio* spp. and *E. coli*; positive result only obtained with *V. harveyi*.

#### 緒 言

要了解自然界的微生物社會的構造和功能，以往都是採用培養、生理、生化等技巧來分析，但是這些方法既不準確，且又相當花時間 (Litchfield & Seyfried, 1979)，尤其是計算環境中特殊細菌的數目時，經常受到篩選方法的阻礙，雖然假設生物能夠生長於含環境污染物的培養基上時，這些微生物必需能將這些基質代謝，但是這種假設往往包含嚴重的錯誤，因而影響到這種方法的可信度和實用性。主要影響這些方法的因子，包括：(1)由於基質量太少造成生長緩慢；(2)由於基質的毒性或營養需求或基質的利用必需與其他基質同時代謝或同時氧化造成菌種不能生長；(3)由於有些菌種對培養基的污染物或微量營養成份的低營養生長 (oligotrophic growth) 造成干擾生長；(4)交叉供養 (cross feeding)；(5)菌種在整個羣落中所占的比例少較缺乏敏感度；(6)菌落間的抑制作用 (Sayler *et al.*, 1985)。此外有些菌種在實驗室的培養基不易培養，如果能夠直接偵測生物中的特殊 DNA 較能確定所篩選的菌種。現在由於分子生物學的進展，可以將這方面的技巧應用到微生物鑑定方面的研究。Grunstein 和 Hogness (1975) 首先發展出應用核酸雜交技術偵測出細菌菌落上的特殊 DNA 序列。這種菌落雜交技術已被用來偵測多種不同的細菌 (Moseley *et al.*, 1980; Kaper *et al.*, 1981; Echeverria *et al.*, 1982; Fitts *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1983a; Hodgson *et al.*, 1983;

\* 國立臺灣大學植物系 (Department of Botany, National Taiwan University)

\*\* 國立臺灣大學農化系 (Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University)

Barkay *et al.*, 1985; Sayler *et al.*, 1983; Festl *et al.*, 1986; Pettigrew & Sayler, 1986; Sayler *et al.*, 1987; Hazen & Jimenez, 1988; Ogram & Sayler, 1988), 在短時間之內, 可以了解微生物社會中, 微生物的種類及特性, 且準確度相當高。利用基因探針分析環境中的微生物, 比以往利用微生物鑑定的方法, 可以減少一半的時間。

養殖池中的魚、蝦、貝類經常會被各種微生物感染引起疾病, 如能採用菌落雜交實驗來幫助診斷, 將可減少許多時間。本實驗以蝦病菌 *Vibrio harveyi* 為實驗菌種, 此菌會產生螢光, 控制螢光產生的基因 (*Lux gene*) 已經被研究出來 (Meighen, 1988; Miyamoto *et al.*, 1988; Miyamoto *et al.*, 1988a; Martin *et al.*, 1989), 且已純系化到質體上並能表現出來 (Baldwin *et al.*, 1984; Miyamoto *et al.*, 1987; Showalter *et al.*, 1990), 我們將利用螢光基因當做探針以菌落雜交技術來偵測此菌。

## 材料與方法

### 1. 細菌和質體

蝦病菌 *Vibrio harveyi* FG881011H<sub>4</sub>I<sub>1</sub> 和 *Vibrio harveyi* ATCC 14126 由臺大動物系宋延齡教授提供。*Vibrio fluvialis* 為本實驗室所保存的菌種。*Escherichia coli* RR1 和 *E. coli* HB101 由中央研究院分生室提供。質體 pBR<sub>322</sub> 帶有一段 3.9 Kbp 由 *Vibrio harveyi* 經 *Hind* III 切割後含 *Lux A* 和 *Lux B* 的片段 (Miyamoto *et al.*, 1988) 是由加拿大 McGill 大學的 Meighen 教授所提供。

### 2. 培養基

L. B. 培養基 (Luria-Bertani) (Maniatis *et al.*, 1982); 一升水含 10 g tryptone, 5 g NaCl 和 5 g yeast extract。

TSB+2% NaCl 培養基; 每升中含 30 g Tryptic Soy Broth 和 20 g NaCl。

### 3. 轉型作用 (transformation)

#### (1) 勝任細胞 (competent cells) 的製備

依照 Mandel 和 Higa (1970) 的方法加以修飾, 將 *Escherichia coli* 自菌體保存液中吸出 100  $\mu$ l 塗於 LB 培養基中, 以 37°C 培養隔夜, 取單一菌落接入 10 ml LB 培養基中以 37°C, 250 rpm 振盪培養 16 hr~18 hr。取上述培養液 1 ml 注入 100 ml LB 培養基中, 以 37°C, 250 rpm 培養到 OD<sub>600</sub>=0.5 (約 2.5 hr)。將菌液用 5,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘, 除去上清液。將沉澱懸浮在 50 ml 包含 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MnCl<sub>2</sub>, 40 mM NaOAc, pH 5.5 事先預冷的溶液中。將溶液置冰上 30 分鐘後, 以 5,000 rpm, 4°C 離心 10 分鐘, 除去上清液。將沉澱懸浮在 10 ml 事先預冷包含 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 70 mM MnCl<sub>2</sub>, 40 mM NaOAc, pH 5.5 的溶液中。

#### (2) 轉型作用

取 100  $\mu$ l 勝任細胞的溶液, 加入 1  $\mu$ l 的索取來的質體 DNA 溶液, 混合均勻, 置冰上作用 20 min 後, 轉移到 42°C 水浴作用 20 分鐘。加入 0.9 ml LB 培養基以 37°C, 200 rpm 振盪培養 60 分鐘。取菌液 1  $\mu$ l、10  $\mu$ l、100  $\mu$ l 及剩下菌液以塗布法塗在選擇性固體培養基 (LB 固體培養基加入 100  $\mu$ g/ml ampicillin) 上, 放入 37°C 培養箱中培養 16 hr。

### 4. DNA 探針的製備

#### (1) 質體 DNA 的萃取

將帶有質體的保存菌液 0.5 ml 放入 10 ml 包含 100  $\mu$ g/ml ampicillin 的 LB 培養基中, 以

37°C 250 rpm 振盪培養 16 hr 後，取 5 ml 培養菌液置入 250 ml LB 培養基中，以 37°C 250 rpm 振盪培養 16 hr。以 5,000 rpm，10 min 在 4°C 下將菌體離心下來。依照德國 Diagen BmbH 的 QIAGEN>plasmid<protocols 萃取 DNA。

#### (2) 洋菜膠電泳法，分析 DNA

使用 0.7% agarose gel (Sigma, electrophoresis grade)，以 TAE 緩衝溶液 (40 mM Tris-acetate, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8.0) 當溶劑，在 TAE 緩衝溶液中作電泳分析，電壓固定為 70 Volts。然後放入 0.5 μg/ml 的 Ethidium bromide 溶液染色 5 min 於 300 nm 紫外燈下觀察及照相。

#### (3) 回收 DNA 片段

利用德國 Diagen BmbH 的 QIAEX>gel extraction<kit 回收質體 DNA。

#### (4) 用 digoxigenin-11-dUTP 標識 DNA

利用 Boehringer Mannheim 的 nonradioactive DNA labelling and detection kit 標識 DNA。

### 5. 菌落雜交實驗 (colony hybridization)

從菌體保存液中取適量以塗佈法塗在含 TSB+2% NaCl 的固體培養基上，以 30°C 培養隔夜，取得單一菌落再整齊點在另一固體培養基上，以 30°C 恆溫箱培養，直到菌落生長至直徑約 1~2 mm 後，根據 Grunstein 和 Wallis (1979) 的方法進行菌落雜交實驗。

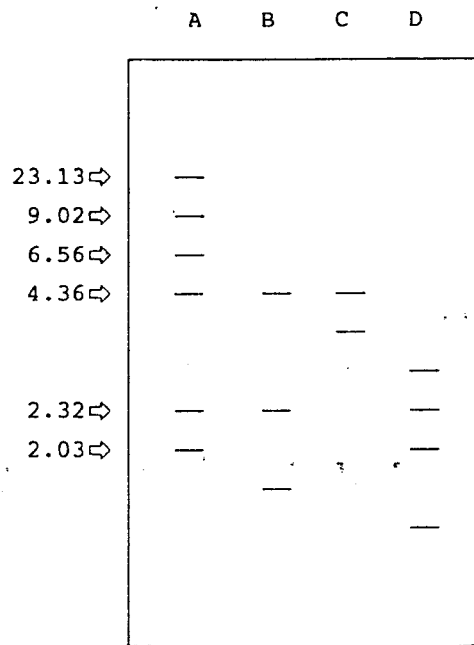
## 結 果

本實驗所採用的質體是向國外要來已帶有 *lux* 基因的質體 (Miyamoto *et al.*, 1988)，故只以 ampicillin 來篩選轉型株而已，並沒有使用 tetracycline 來篩選。所得菌落經數次更新後，再依照材料與方法所述萃取質體，再用不同的核酸限制酶切割，以 *Hind* III 作用後可得 4.3 Kbp 和 3.9 Kbp 片段，其中 3.9 Kbp 的片段包含 *lux A* 和 *lux B* 基因；以 *Hind* III 和 *Pvu* II 作用後可得 2.7 Kbp，2.2 Kbp，2.1 Kbp 和 1.2 Kbp 的片段，其中 2.7 Kbp 的片段包含 *lux A* 和 *lux B* 基因；以 *Hind* III 和 *Eco*-RI 切割可得 4.3 Kbp，2.3 Kbp 和 1.6 Kbp 片段，其中 1.6 Kbp 的片段包含 *lux A* 基因，而 2.3 Kbp 包含 *lux B* 基因 (圖一、圖二)。

取上述電泳所得的 3.9 Kbp 和 2.7 Kbp 包含 *lux A* 和 *lux B* 基因的 DNA 片段做探針，和 *Vibrio harveyi*、*V. fluvialis* 以及 *E. coli* 進行菌落雜交實驗。圖三顯示只有 *V. harveyi* 與探針呈現正反應。

## 討 論

利用菌落雜交技術偵測菌種時，可用做基因探針的 DNA 包括：1. 特殊的基因 (Sayler *et al.*, Barkay *et al.*, 1985)。2. 隨意的基因 (random gene) (Fitts *et al.*, 1983)。3. 整個基因體 (Hodgson *et al.*, 1983)。如能找到特殊的基因，其特異性最高。本實驗所用的實驗菌株為 *V. harveyi*，此菌會產生螢光，在細菌中會產生螢光的只有 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas* 和 *Xenorhabdus* (Meighen, 1988; Braumann *et al.*, 1983; Hastings *et al.*, 1985)，其中 *Xenorhabdus* spp. 非水生細菌，而前三者為不同屬的菌種鑑定較容易；至於放光細菌 *V. harveyi* 和 *V. fischeri* 雖同屬 *Vibrio*，但是比較其放光基因的構造，可以發現到二者間雖很相似，但並不相同 (Cohn *et al.*, 1985; Engebrecht & Silverman, 1984)，故應用螢光基因當探針還是可將二者區分。



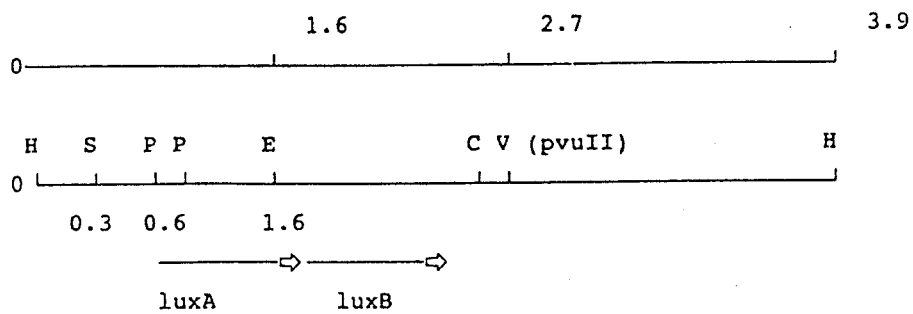
圖一 *Vibrio harveyi* 一段包含 *lux A* and *lux B* 構造基因的 DNA 片段的電泳圖。

lane A: marker:  $\lambda$ /*Hind* III

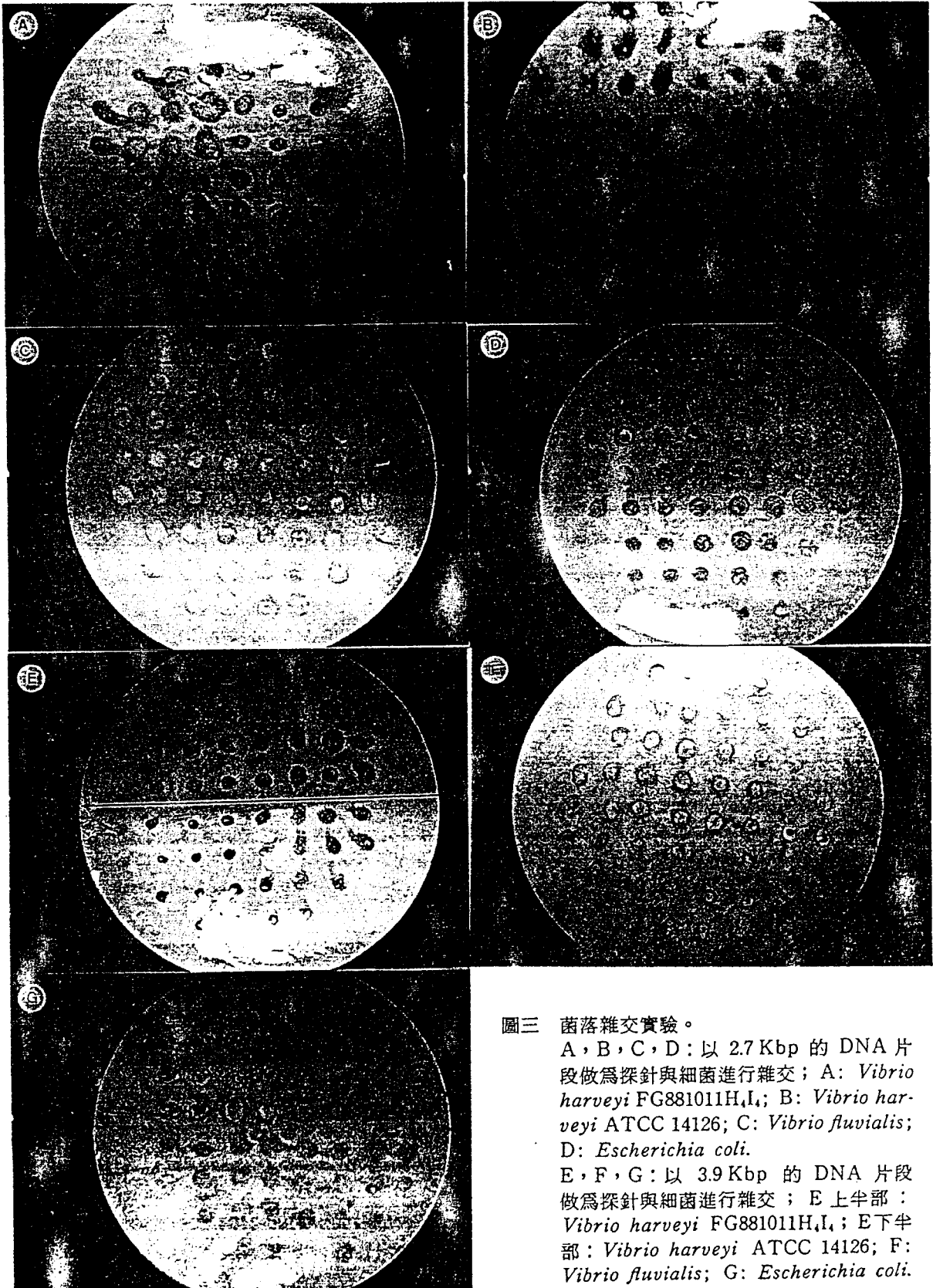
lane B: *Hind* III + *Eco* RI 作用

lane C: *Hind* III 作用

lane D: *Hind* III + *Pvu* II 作用



圖二 *Vibrio harveyi* 一段 3.9 Kbp 包含 *lux A* and *lux B* 構造基因 DNA 片段的限制酶圖譜。E, *Eco* RI; H, *Hind* III; P, *Pst* I; S, *Sal* I; V, *Pvu* II; C, *cl* I.



圖三 菌落雜交實驗。

A, B, C, D: 以 2.7 Kbp 的 DNA 片段做為探針與細菌進行雜交；A: *Vibrio harveyi* FG881011H,I; B: *Vibrio harveyi* ATCC 14126; C: *Vibrio fluvialis*; D: *Escherichia coli*.

E, F, G: 以 3.9 Kbp 的 DNA 片段做為探針與細菌進行雜交；E 上半部：*Vibrio harveyi* FG881011H,I; E 下半部：*Vibrio harveyi* ATCC 14126; F: *Vibrio fluvialis*; G: *Escherichia coli*.

## 摘 要

要由自然界中篩選及鑑定微生物是一件相當花時間，且準確度並不高的工作。自然界中經常含有許多未知的菌種，應用實驗室發展出來的鑑定方法可能會鑑定錯誤。此外自然界和實驗室的環境差異頗大，譬如自然環境較稀釋，營養較缺乏，物理狀況較極端，因此在自然界所發現的細菌在不同的生理狀況下會和其它的菌種共存。最近的報告顯示有些病原細菌在稀釋且受壓制的環境下，只是存活而不能培養，因此發展出一套專門用來鑑定自然界中微生物的方法是非常需要的。現在由於分子生物學的進展，可以將這方面的技巧應用到微生物生態方面的研究。在短時間之內，可以了解微生物社會中，微生物的種類及特性，且準確度相當高。利用基因探針分析環境中的微生物，比以往用利用微生物鑑定的方法，可以減少一半的時間。本實驗以蝦病菌 *Vibrio harveyi* 為實驗菌種，此菌會產生螢光，控制螢光產生的基因 (*Lux* gene) 已經被研究出來且已純系化到質體上，我們已向國外索取到一個帶 *Lux A* 和 *Lux B* 兩個基因的質體，已將其轉型到 *E. coli* 上，大量培養後，將質體抽取出來，經限制酶 *Hind III* 切割後，用非放射性標定做探針，可以和 *V. harveyi* 的菌落進行雜交，但不會和其它 *Vibrio* 或 *E. coli* 雜交。

## 誌 謝

本研究承農委會之經費補助，加拿大 McGill 大學的 Meighen 教授提供質體使本實驗得以完成，謹此誌謝。

## 參 考 文 獻

- Baldwin, T. O., T. Berends, T. A. Bunch, T. F. Holzman, S. K. Rausch, L. Shamansky, M. L. Treat and M. M. Ziegler (1984). Cloning of luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli*. *Biochem.* 23: 3663-3667.
- Barkay, T., D. L. Fouts and B. H. Olson (1985). Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in Gram-negative bacteria communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 686-692.
- Braumann, P., L. Braumann, M. Woolkalis and S. Bang (1983). Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 369-398.
- Cohn, D. H., A. J. Mileham, M. I. Simon and K. H. Nelson (1985). Nucleotide sequence of the *lux A* gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the  $\alpha$  subunit of bacterial luciferase. *J. Biol. Chem.* 260: 6139-6146.
- Echeverria, P., J. Seriwatana, O. Chityothin, W. Chaicumpa and C. Tirapat (1982). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by filter hybridization with three enterotoxin gene probes. *J. Clin. Microbiol.* 16: 1086-1090.
- Engbrecht, J. and M. Silverman (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4145-4158.
- Festl, H., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1986). DNA hybridization probe for *Pseudomonas fluorescens* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1190-1194.
- Fitts, R., M. Diamond, C. Hamilton and M. Neri (1983). DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1146-

- 1151.
- Grunstein, M. and D.S. Hogness (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 3961-3965.
- Grunstein, M. and J. Wallis (1979). Colony hybridization. In: *Methods in Enzymology*, ed. by Wu, R. 68: 379-389. Academic Press., N. Y.
- Hastings, J. W., C. J. Potrikas, S. C. Gupta, M. Kurfurst and J. C. Makemson (1985). Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26: 235-291.
- Hazen, T. C. and L. Jimenez (1988). Enumeration and identification of bacteria from environmental samples using nucleic acid probes. *Microbiol. Sci.* 5: 340-346.
- Hill, W. E., J. M. Madden, B. A. Mccardell, D. B. Shah, J. A. Jagow, W. L. Payne and B. K. Boutin (1983). Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: detection and enumeration by DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1324-1330.
- Hill, W. E., W. L. Payne and C. C. G. Aulisio (1983a). Detection and enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica* in food by DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 636-641.
- Hodgson, A. L. M. and W. P. Roberts (1983). DNA colony hybridization to identify *Rhizobium* strains. *J. Gen. Microbiol.* 129: 207-212.
- Kaper, J. B., S. L. Moseley and S. Falkow (1981). Molecular characterization of environmental and nontoxigenic strains of *Vibrio Cholerae*. *Infect. Immun.* 32: 661-667.
- Litchfield, C. D. and P. L. Seyfried (ed.) (1979). Methodology for biomass determination and microbial activities in sediments. ASTM. Philadelphia.
- Mandel, M. and A. Higa (1970).  $\text{CaCl}_2$  dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 154.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
- Martin, M., R. Showalter and M. Silverman (1989). Identification of a locus controlling expression of luminescence genes in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 171: 2406-2414.
- Meighen, E. A. (1988). Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 151-176.
- Miyamoto, C. M., M. Boylan, A. F. Graham and E. A. Meighen (1988). Organization of the *Lux* structural genes of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* 263: 13393-13399.
- Miyamoto, C. M., D. Byers, A. F. Graham and E. A. Meighen (1987). Expression of bioluminescence by *Escherichia coli* containing recombinant *Vibrio harveyi* DNA. *J. Bacteriol.* 169: 247-253.
- Miyamoto, C. M., A. F. Graham and E. A. Meighen (1988). Nucleotide sequence of the *lux C* gene and the upstream DNA from the bioluminescent system of *Vibrio harveyi*. *Nucl. Acids Res.* 16: 15551-1562.

- Moseley, S. L. I., Huq, A. R. M. Alim, M. Samadpour-Motalebi and S. Falkow (1980). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J. Infect. Dis.* 142: 892-898.
- Ogram A. V. and G. S. Sayler (1988). The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities. *J. Ind. Microbiol.* 3: 281-292.
- Pettigrew, C. A. and G. S. Sayler (1986). The use of DNA-DNA colony hybridization in the rapid isolation of 4-chlorobiphenyl degradative bacteria phenotypes. *J. Microbiol. Methods* 5: 205-213.
- Sayler, G. S., R. K. Jain, L. Houston, A. Ogram, C. Pettigrew, J. Blackburn and W. Riggsby (1987). Applications for DNA probes in biodegradation research. In: Proceedings of the 4th International Conferences on Microbiology and Ecology.
- Sayers, A. A., S. P. Lynn and J. Gardner (1983). Use of randomly cloned DNA fragments for identification of *Bacteriodes thetaiotamicron*. *J. Bacteriol.* 154: 287-293.
- Sayler, G. S., M. S. Shields, E. T. Tedford, A. Breen, S. W. Hooper, K. M. Sitotkin and J. W. Davis (1985). Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1295-1303.
- Showalter, R. E., M. O. Martin and M. R. Silverman (1990). Cloning and nucleotide sequence of *lux R*, a regulatory gene controlling bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 172: 2946-2954.