

大肠杆菌 VT2 噬菌体的分离与溶源转染*

严亚贤^{1**}, 陆承平²

(1. 上海交通大学农业与生物学院动物科学系, 上海 201101; 2. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

Isolation and Lysogenic Transfection of Verocytotoxigenic Bacteriophage in *E.coli*YAN Ya-xian¹, LU Cheng-ping²

(1. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic & Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjiang 210095, China)

Abstract: 5 strains of verocytotoxigenic (VT) bacteriophage were isolated from *E.coli* O157 strains, cow feces, chicken feces, sewage and purified by two-layer agar assay. Gene *vr2* was amplified by PCR in these phage isolates. The plaques of these phages were 0.5-2mm in diameter and the titre of phages with lucidity plaques against host strain MC1061 was more than 10⁹ PFU/mL. A lysogen with *vr2* gene was obtained after transfecting MC1061 by VT2 phage SH ϕ W1 isolated from sewage. The cytopathic effect on Vero cells was produced after inoculating the filtrate from the above lysogen, while no cytopathic effect was appeared inoculating the filtrate from MC1061 cultured in the same condition. All these showed that VT2 phages were common in environment and VT2 virulent factor could transfer horizontally through the lysogenic infection by VT2 phage. VT2 phage is related to the virulence of bacteria.

Key words: Bacteriophage; *vr2* gene; Transfection; Cytopathic effect; Virulence transfer

摘要: 本试验利用指示菌 MC1061, 经双层琼脂法纯化和 PCR 扩增 *vr2* 基因, 分别从大肠杆菌 O157 菌株、牛粪、鸡粪和污水中分离获得 5 株含 *vr2* 基因的噬菌体。这些噬菌斑透明, 直径为 0.5-2 mm, 对指示菌的感染效价均在 10⁹ PFU/mL 以上, 抵抗氯仿和 56℃30min 的作用。将噬菌体分离株 SH ϕ W1 感染 MC1061 后, 经 PCR 鉴定获得一株溶源菌株(MC1061/SH ϕ W1)。溶源株的 LB 培养滤液对 Vero 细胞产生了显著的病变效应, 而 MC1061 在同等条件下培养的滤液无细胞病变, 表明 VT2 噬菌体通过溶源将 *vr2* 毒力基因水平转移, 证实了 VT2 噬菌体的转染与细菌毒力相关。

关键词: 噬菌体; *vr2* 基因; 转染; 细胞病变; 毒力转移

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0389-05

自 1982 年首次报道人的出血性肠炎以来, 大肠杆菌 O157 作为一种新的致病性血清型已被全世界所公认^[1]。尽管该病原菌的毒力因子有许多^[2,3], 但显著特征之一就是产生志贺毒素(Shiga toxin, ST), 由于该毒素能致 Vero 细胞病变, 因此也称为 Vero 毒素(Vero toxin, VTs), 它能引起肠上皮细胞的 AE 损伤(attaching and effacing lesion), 且与出血性大

肠炎、溶血性尿毒综合征直接相关^[4]。大量的研究认为 VT 是由温和噬菌体(VT 噬菌体)编码^[5-7]。VT 分为两种形式, VT1 和 VT2。VT1 与痢疾杆菌所产生的 ST 几乎完全一致, 主要作用于肠上皮。VT2 毒素与 ST 有一定的差别, 具有抗原的多样性, 主要作用于肠道以外的组织如肾。VT 与霍乱毒素具有相似的 AB 亚单位, 由一个 A 亚单位(32kDa)

收稿日期: 2004-02-12, 修回日期: 2004-04-02

* 基金项目: 上海市教委曙光计划(B2002186)

** 通讯作者: 严亚贤(1966-), 女, 江苏启东籍, 副教授, 博士, 主要从事兽医微生物学与免疫学的研究。

Corresponding author Tel:021-64785797, E-mail:yanyaxian@yahoo.com.

和一个五聚体 B 亚单位 (7.7 kDa 单聚体) 组成。B 亚单位是受体结合蛋白, 介导与靶细胞膜的结合, 致使毒素分子内在化。A 亚单位能酶解生成一个具有催化活性的 27kDa 的 A1 亚单位, A1 发挥 RNA N-糖苷酶的活性, 特异性裂解真核细胞 28S rRNA, 从而抑制细胞蛋白合成过程中的肽链的延伸, 致使细胞死亡。VT1 和 VT2 具有 60% 的 DNA 和氨基酸的同源性, 但免疫原性不同。同一种宿主菌可被编码不同 VT 毒素的噬菌体溶源, 从而表达多种类型的 VTs, 增强细菌的致病性。当今, 噬菌体作为基因克隆载体的应用较为普遍, 但噬菌体在病原菌中的毒力作用以及在细菌基因多样性的进化中的作用尚有很多未解之谜。大肠杆菌 O157 中 VT 噬菌体的研究在国内尚无人涉及, 因此为了揭示大肠杆菌 O157 的毒力基因传递的机理, 本试验从大肠杆菌 O157 菌株、牛粪、鸡粪及污水中进行 VT 噬菌体的分离和鉴定, 并对所获的噬菌体分离株进行了溶源转染和 Vero 细胞的毒力测定, 确定了 VT2 噬菌体的普遍存在以及 VT2 噬菌体的溶源可增强细菌毒力, 为从源头上控制大肠杆菌 O157 提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 菌株

大肠杆菌 O157: H7 ATCC 43889, 国家进出口检验检疫总局上海分局保存, 3 株大肠杆菌 O157 分离株由本研究室分离鉴定^[8]。噬菌体指示菌 MC1061 由英国利物浦大学提供, 遗传背景参照 Meissner 等^[9]。

1.2 菌株中噬菌体的分离

将复壮后的大肠杆菌 O157 ATCC 株和 3 株分离株分别接种 LB 培养液, 37℃ 培养 6h 后经直径为 0.45 μ m 滤膜过滤。分别取 0.5mL 滤液, 逐滴加到已在培养基表面均匀涂布有培养至对数期的指示菌 MC1061 的平板, 37℃ 培养 18h, 同时设滴加无菌生理盐水的平板作对照, 判定是否出现噬菌斑。

1.3 牛粪、鸡粪及污水中噬菌体的分离

将 5 mL MC1061 指示菌接种于 50 mL LB 培养基的中, 37℃ 培养 6h 后分别加入 10g 新鲜采集的牛粪或鸡粪(分别采自上海地区的奶牛场和养鸡场); 或将 5 mL 指示菌接种于 3 倍浓度的 50 mL LB 培养液, 37℃ 培养 6h 后, 加入 100mL 污水样本(采自上海交通大学农业与生物学院院内生活污水, pH 6.8), 继续培养 12h, 加 0.2mL 氯仿振荡培养 15min, 4℃ 10000r/min 离心 10min, 上清液经直径为 0.45 μ m

滤膜过滤, 滤液同 1.2.1 的方法, 检测滤液中是否存在噬菌体。

1.4 噬菌体的纯化^[10]

将上述含有噬菌体的滤液作 10 倍稀释, 利用双层琼脂法(平板底层用 1.5% 琼脂, 上层用 0.8% 琼脂)分离滤液中的噬菌体, 从蚀菌斑分布均匀的平板上挑取单个空斑, 接种到含有指示菌的 LB 培养液, 37℃ 培养 18h 后过滤, 再利用双层琼脂法进行克隆空斑, 重复 2~3 次, 直至获得形态和大小完全一致的蚀菌斑, 即获得了纯化的噬菌体。用无菌牙签挑取纯化的噬菌斑, 悬浮于 5~10 mL 的 LB 中。在摇床中室温孵育 2h 后加一滴氯仿, 继续孵育 15 min, 混合物 4℃ 10 000 r/min 离心 10min, 上清即为噬菌体分离株的原液, 4℃ 保存备用。

1.5 噬菌体 vt2 基因的检测

取纯化的噬菌体分离株培养液 10mL, 参照 Sambrook 等方法^[11], 利用 Promega 公司提供的噬菌体 DNA 试剂盒, 按产品说明, 提取噬菌体 DNA。参照 James 等^[12]设计一对引物, 扩增 1kb vt2 A 亚单位基因, 上游引物为 5' TACTGTGCCTGTTACTG G 3', 下游引物为 5' TCTGTTTCAGAAACGCTGC 3', 模板为提纯的噬菌体 DNA, 扩增条件为 94℃ 预变性 1min, 然后 95℃ 1min, 59℃ 1min, 72℃ 2min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 5min, MgCl₂ 浓度为 15mM, 设 ATCC43889 和 MC1061 的染色体 DNA 分别为阳性和阴性对照。扩增后 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.6 噬菌体的物理特性

将纯化的具有 vt2 基因的噬菌体分离株利用双层琼脂法进行蚀菌斑计数, 以获得噬菌体分离株的效价。并测定噬菌体分离株在 4℃、56℃、氯仿中的稳定性。将分离株分别接种 LB 培养液 37℃ 培养 16h, 等分 3 份, 一份 4℃、一份加氯仿(终浓度 1%)、一份 56℃ 水浴分别作用 30min。然后 4℃ 10000 rpm 离心 10min, 上清滴定噬菌体的感染效价。

1.7 溶源菌的制备和检测^[12]

取 0.5mL 污水中分离到的 VT2 噬菌体培养物, 加入到 0.2mL 的对数期的指示菌 MC1061, 轻轻混匀, 37℃ 作用 60min 后, 取 0.1mL 上述混合物均匀铺到 LB 平板, 37℃ 过夜培养, 作溶源性检测。挑起可疑菌落, LB 培养液过夜培养, 将所培养的细菌作为 VT2 噬菌体的裂解宿主菌, 利用双层琼脂法进行蚀菌斑检测, 如果没有蚀菌斑或菌苔周围没有透明圈, 该菌株就是可疑溶源菌。并将 VT2 噬菌体感染 MC1061 作对照。取可疑溶源菌 25 μ L 94℃ 孵

育 15min 作模板, 然后采用 1.3 的方法进行 PCR, 检测溶源菌中的 *vr2 A* 亚单位基因, 设 ATCC 43889 和 MC1061 分别为阳性和阴性对照, 凡检测出 *vr2* 基因的菌株即为 VT2 噬菌体感染后形成的溶源菌。

1.8 细菌滤液中 VT2 毒素效价的测定^[13]

将大肠杆菌 O157ATCC 株、MC1061 的 VT2 噬菌体的溶源菌、MC1061 在 10mL LB 培养液中 37℃ 培养 24h, 培养物经直径为 0.45μm 滤膜过滤, 滤液用含 10% 犊牛血清的 1640 进行 2 倍稀释, 加入到已长成单层的 Vero 细胞的 96 孔板中, 37℃ 培养 18h 后观察 CPE, 连续观测 48h, 以 50% 以上的细胞发生病变的最高稀释度为 VT 毒素的效价。

2 结果

2.1 VT2 噬菌体的分离与鉴定

4 株大肠杆菌 O157 菌株的滤液、牛粪、鸡粪和污水中均有大量蚀菌斑出现, 经反复纯化, 从每个样本的滤液中均纯化出形态和大小一致的噬菌体毒株, 蚀菌斑的直径为 0.5~2 mm, 蚀菌斑为完全透明的圆形 (图 1)。进一步 PCR 检测 *vr2* 基因, 获得 5 株能扩增出 1kb 特异性条带的噬菌体 (图 2), 鉴定出 5 株 VT2 噬菌体 (表 1)。

2.2 噬菌体的物理特性

5 株噬菌体分离株的原液的感染效价为 10⁷ PFU/mL 左右, 经过液体大量培养, 双层琼脂法测得噬菌体分离株的效价均在 10⁹PFU/mL 以上 (表 1)。噬菌体分离株经氯仿和 56℃ 水浴 30min 后, 对

指示菌 MC1061 的感染效价均有所下降, 但下降幅度为几倍到几百倍不等, 噬菌体的效价均还在 10⁷ PFU/mL 以上 (表 1), 可见本试验分离到的噬菌体对氯仿和 56℃ 均有较强的抵抗力。

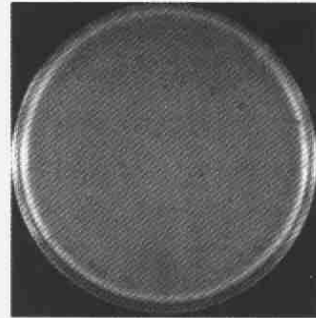


图 1 噬菌体分离株感染宿主菌 MC1061 形成的蚀菌斑

Fig. 1 The plaques of the phage infecting host strain MC1061

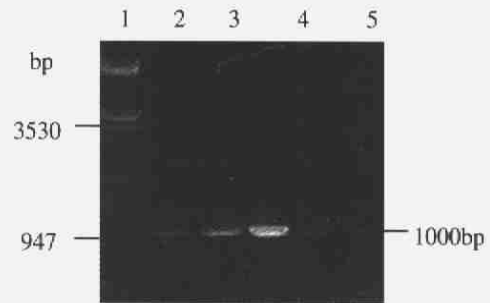


图 2 PCR 扩增噬菌体 *vr2* 基因

Fig. 2 Amplified *vr2* gene from bacteriophage isolates

1, Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker; 2, SHΦO1; 3, SHΦO2; 4, SHΦB; 5, SHΦC; 6, SHΦW1.

表 1 VT 噬菌体分离株的特性

Table 1 Characteristics of the isolation strains of VT bacteriophage

Bacteriophage isolates	Host strain	Sample source	Sample numbers	<i>vr2</i> gene	Titres PFU/mL	Titres (PFU/mL) after treatment with	
						Chloroform	56℃
SHΦO1		ATCC O157	1	+	5.2×10 ¹⁰	3.6×10 ¹⁰	4.5×10 ⁹
SHΦO2	MC1061	O157 isolates	3	+	6.7×10 ⁹	5.2×10 ⁸	2.6×10 ⁸
SHΦB		Cattle feces	20	+	8.5×10 ⁹	3.7×10 ⁸	0.7×10 ⁸
SHΦC		Chicken feces	20	+	4.3×10 ⁹	3.9×10 ⁸	6.5×10 ⁷
SHΦW1		Sewage	15	+	2.8×10 ¹⁰	7.2×10 ⁹	0.8×10 ⁹

2.3 溶源菌的获得和 *vr2* 基因的检测

利用来源于污水已分离鉴定的 VT2 噬菌体 SHΦW1 感染 MC1061, 培养后获得的菌落作为宿主菌, 再次接种噬菌体 SHΦW1, 未见有蚀菌斑或菌落周围有透明带出现, 可确定该菌落为噬菌体 SHΦW1 的溶源菌 (MC1061/SHΦW1)。经 PCR 扩增, 溶源菌和大肠杆菌 O157·ATCC 株均扩增出 1kb 的

主带, 而 MC1061 中无 1kb 的特异性主带出现 (图 3), 进一步证实了所获得的菌落为 VT2 噬菌体的溶源菌。

2.4 细菌滤液 VT 毒素效价的测定

细菌培养液的滤液接种已长成单层的 Vero 后, ATCC 株的滤液 18h 就产生细胞病变, 病变表现为细胞变圆、皱缩、脱落而后死亡。MC1061 的 VT2

噬菌体的溶源菌的滤液也致 Vero 细胞发生相似的细胞病变(图 4), 接种后 48h 的毒素效价分别为 2^{14} 、 2^{12} , 而 MC1061 的滤液与细胞作用 48h 未出现细胞病变。

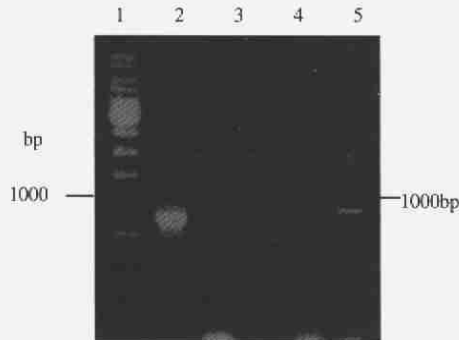


图 3 溶源菌和噬菌体的 vt2 基因的检测

Fig. 3 Detection of vt2 gene from the lysogen strain and phage
1, Marker; 2, ATCC; 3, MC1061; 4, SH φ W2; 5, MC1061/SH φ W1.

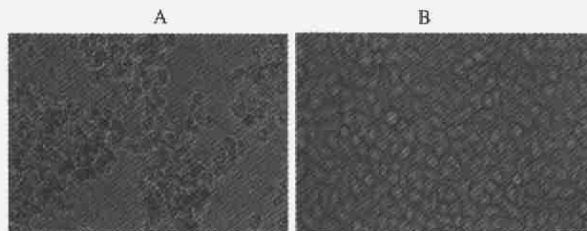


图 4 Vero 细胞接种细菌 (MC1061/SH φ W1) 滤液后的病变 (A) 和正常细胞 (B)

Fig. 4 The cytopathic effect of Vero cells after inoculating bacterial (MC1061/SH φ W1) filtrate(A) and normal cells(B)

3 讨论

大肠杆菌 O157 进入机体的肠道后, 能分泌大量的胞外产物, 其中最主要的是 VTs。据报道, 大多数只产生 VT2 的菌株的毒力较强, 而只产生 VT1 的菌株所引起的疾病较轻微^[14]。VT2 对人的肾脏微血管内皮细胞的毒性作用比 VT1 强 1000 倍^[3], 显示出 VT2 更容易损害肾小球血管, 反映了产 VT2 的菌株与人的溶血性尿毒综合征的相关性, 即 VT2 在 O157 致病中的重要作用。考虑到 VT 由噬菌体编码, 而我国对 VT 噬菌体的研究还是空白, 因此本试验设计分离含 vt2 基因的噬菌体, 以确定我国环境中是否存在 VT2 噬菌体, 实验结果表明了 VT2 噬菌体在菌株和外界环境中普遍存在。

通常噬菌体感染宿主菌后有两种表现形式, 一种为裂解 (lysis), 另一种是溶源 (lysogeny)。VT 噬菌体属于 λ 家属的噬菌体, λ 噬菌体感染宿主菌

后能形成溶源性细菌 (lysogenic bacteria)。在自然条件下一些溶源性细菌有少量可自发裂解^[15], VT 噬菌体也具有这种特征, 因此本试验中对同一 VT2 噬菌体采用不同的方法既可测定裂解蚀菌斑, 又可测定溶源菌落。

据报道 VT 噬菌体可引起溶源转变 (lysogenic conversion)^[6,16], 所谓溶源转变, 即噬菌体在感染宿主菌后, 能引起溶源性细菌除免疫原性外的表型特征的改变或致病性的改变。本试验中分离鉴定的 VT2 噬菌体, 感染指示菌 MC1061 后产生的溶源菌 (MC1061/SH φ W1), 不仅从基因水平上显示了 vt2 基因的转移, 而且经 Vero 细胞的毒力试验显示, 该溶源菌的培养滤液对 Vero 细胞产生了较强的毒力作用。由于 MC1061 不能使 Vero 细胞产生病变, 因此可以确定溶源菌对 Vero 细胞的毒力作用是由于 VT2 噬菌体的感染, 引起溶源转变表达 VT2 所致, 这就有力证实了 VT2 噬菌体与细菌毒力的相关性。据报道噬菌体不仅能引起细菌毒力的变化, 同时在大肠杆菌基因多样性中发挥巨大作用^[17], 因此对 VT 噬菌体的研究, 不仅能揭示大肠杆菌 O157 的致病机理, 同时也能解释细菌多样性的原因, 因此对噬菌体的研究具有重要意义。

参考文献

- Michino H, Araki K, Minami S, et al. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In *Escherichia coli* O157: H7 and Other Shiga-Toxin-Producing *E.coli* Strains [M]. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998, p59-81.
- 严亚贤, 华修国. 大肠杆菌 O157 的毒力因子的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35 (4): 37-40.
- 严亚贤, 华修国. 大肠杆菌 O157 和其它产志贺毒素大肠杆菌的毒力因子—粘附素[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24 (6): 480-483.
- Keusch G. The rediscovery of shiga toxin and it's role in clinical disease[J]. Jap J Med Sci Biol. 1998, 51:5-22.
- Rietra P J G M, Willshaw G A, Smith H R, et al. Comparison of Vero-cytotoxin encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin[J]. J Gen Microbiol, 1989, 135: 2307-2318.
- Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages[J]. Res Microbiol, 2001, 152: 687-695.
- Baroness J J, Beckwith J. A bacterial virulence determinant encoded by the lysogenic coliphage λ [J]. Nature, 1990, 346: 870-874.
- 严亚贤, 施慧源, 华修国. 牛肉中大肠杆菌 O157 的调查[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35 (2): 14-15.
- Meissner P S, Sisk W P, Bergman M L. Bacteriophage lambda cloning system for construction of directional cDNA libraries.

- Proceeding of the National Academy of Science, 1987, 84: 412-418.
- [10] O'Brien A D, Holmes R K. Shiga and shiga-like toxins[J]. Microbiol Rev, 1987, 51: 206-220.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn) [M]. 1989, Cold spring Harbour, N.Y: Cold spring Harbour Laboratory.
- [12] James, C E, Stanley N, Allison H E, *et al.* Lytic and Lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage [J]. Appl Envir Microbiol, 2001, 67: 4335-4337.
- [13] 彭奕冰, 郁燕萍, 支立民, 等. Vero 细胞毒性试验法检测大肠杆菌 O157: H7 毒素[J]. 上海商检科技, 1998, 2: 26-28.
- [14] Boerlin P, McEwen S A, Boerlin-Petzold F, *et al.* Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37:497-503.
- [15] 周德庆. 微生物学教程[M]. 2002, 北京: 高等教育出版社, 71-74.
- [16] Muniesa M, Recktenwald J, Bielasewska M, *et al.* Characterization of a Shiga Toxin 2e-converting Bacteriophage from an *Escherichia coli* Strain of Human Origin[J]. Infect Immun, 2000, 68: 4850-4855.
- [17] Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? [J]. TRENDS in Microbiol, 2001, 9(10): 481-485.