

大肠杆菌 O157 噬菌体中 *vt2* 基因 A、B 亚单位的克隆与序列分析

张慧英, 孙建和, 严亚贤**

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

Cloning and Sequencing of *vt2* A and B Subunit of Bacteriophage

Isolated from *E. coli* O157:H7

ZHANG Hui-ying, SUN Jian-he, YAN Ya-xian**

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: According to the nucleotide sequences of the *vt1* and *vt2* toxin genes in GenBank, four pair of primers were designed and synthesized. *vt1* and *vt2* were detected in *E. coli* O157:H7 strains. Bacteriophage was induced and released from the strain only carrying *vt2*. Phage DNA was extracted and used as PCR template for the detection of the *vt2*, *vt2*-A and *vt2*-B genes. The purified *vt2*-A and *vt2*-B fragments were inserted into pMD18-T vector. Sequencing proved that two sequences were genes of subunit A and B of *vt2*. The homologies of two sequences compared to their corresponding sequences coding VT2 toxin in GenBank (accession numbers X07865, NC_002655, BA000007, AF291819) were 98% ~ 99%, 96% ~ 100%, respectively. Our results revealed that *vt2* gene was encoded by bacteriophage, which provides a foundation for further research on horizontal transmission of VT phage carrying virulent gene.

Key words: *E. coli* O157:H7; Bacteriophage; *vt2* gene; Clone; Sequence analysis

摘要: 根据 GenBank 中毒素基因 *vt1*、*vt2* 序列设计合成 4 对引物, 以大肠杆菌 O157 菌株 DNA 为模板, 扩增 *vt1*、*vt2*, 从只含有 *vt2* 的菌株中诱导释放噬菌体, 以噬菌体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 *vt2*、*vt2*-A、*vt2*-B 3 条特异性 DNA 带; 将 *vt2*-A、*vt2*-B 扩增产物纯化后, 分别插入 pMD18-T 载体, 测序结果与相应序列比较, *vt2*-A 和 *vt2*-B 亚单位的基因序列与 GenBank 中编码 VT2 毒素的 A、B 亚单位的核苷酸序列 (X07865, NC_002655, BA000007, AF291819) 的同源性分别为 98% ~ 99%、96% ~ 100%, 确定 *vt2* 位于噬菌体, 并为进一步研究大肠杆菌 O157 中 VT 噬菌体的毒力转导、VT2 毒素的表达和应用奠定基础。

关键词: 大肠杆菌 O157; 噬菌体; 毒素基因 *vt2*; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0075-04

1982 年美国亚特兰大疾病控制与预防中心首次报道了由一种罕见的大肠杆菌血清型即 O157:H7 引起的出血性肠炎^[1], 此后的 20 多年中由 O157 所致的疾病在全世界范围内都有散发和暴发, 尤其以 1996 年在日本的暴发流行最为大家熟知, 我国也有从患者、畜禽及肉制品中分离到该菌的报道^[2]。已知 Vero 毒素 (Vero toxin, VT) 为该菌的主要毒力因子之一, 包括两类生物学特性相似而理化特性及免疫学特性有很大差异的 VT1 和 VT2。流行病学调查结果显示^[3,4], 绝大多数临床分离的高毒力

O157:H7 菌株都单独或联合表达 VT2 毒素, 因此对大肠杆菌 O157 的毒素基因 *vt2* 的研究是尤为重要。据报道编码 VT2 毒素的基因可能位于温和噬菌体上 (编码 VT 的噬菌体称为 VT 噬菌体), 这些噬菌体具有毒力传递能力, 感染宿主菌后能将噬菌体基因整合到细菌染色体上, 使宿主菌获得产生相应毒素的能力^[5,6]。国外已有不少有关携带毒力基因噬菌体的研究^[7,8], 但目前国内对大肠杆菌 O157 的 *vt* 研究均集中在细菌的染色体, 而未涉及 VT 噬菌体。本文通过对 O157 菌株中噬菌体的

收稿日期: 2004-06-30, 修回日期: 2004-09-13

作者简介: 张慧英 (1978-), 女, 上海松江籍, 硕士生, 专业: 预防兽医学; 021-64789734, 021-64199675

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 021-64785797, E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

vt2-A, *vt2-B* 亚单位基因扩增、克隆及序列分析,确定了 *vt2* 基因位于噬菌体上,并为进一步研究噬菌体的毒力传导、毒素表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌 O157:H7 010920、020324、020403 株由本实验室分离鉴定^[9],大肠杆菌 TG1 由上海交通大学生物技术研究所以保存,pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中大肠杆菌 O157:H7 的基因的核苷酸序列 (Accession number: NC_002655),设计 2 对引物扩增 *vt1* 和 *vt2* 片断,根据 933W 噬菌体的 *slr-II* 基因的核苷酸序列 (Accession number: X07865) 设计扩增 *vt2-A* 亚单位、*vt2-B* 亚单位基因的引物,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

vt1 基因片断引物,扩增片段为 302bp, *vt1*-上游: 5'-CGCTGAATGTCA TTCGCTCTGC-3'; *vt1*-下游: 5'-CGTGGTATAGCTACTGTCACC-3'。*vt2* 基因片断引物,扩增片段为 516bp, *vt2*-上游: 5'-CTTCGGTATCCTATTCCCGG-3'; *vt2*-下游: 5'-CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC-3'。*vt2-A* 亚单位基因引物,扩增全长 A 亚单位基因为 1015bp,在两端引入限制性酶切位点 *XbaI* 和 *EcoRI*, *vt2-A*-上游: 5'-CCCCTCTAGACTTCA GCCAAAAGGAA-CACC-3'; *vt2-A*-下游: 5'-CGCCGAATTC CTTAACTCCTTTATTTACCCG-3'。*vt2-B* 亚单位基因引物,扩增全长 B 亚单位基因为 303bp,在两端引入限制性酶切位点 *XbaI* 和 *EcoRI*, *vt2-B*-上游: 5'-GGGCTCTAGAA TGAA GAA GA TGTTTATGGC-3'; *vt2-B*-下游: 5'-GCGGGAA TTCAA TCA GGTTA TGCCCTCA GTC-3'。

1.3 菌株 *vt* 基因检测

采用 DNA 粗提法获取大肠杆菌 O157 菌株的 DNA,采用多重 PCR 法同时检测 *vt1*, *vt2* 基因。反应总体积 50 μ L: Premix Taq (TaKaRa 公司产品) 25 μ L, 2 对引物各 1 μ L (60 μ mol/L), 去离子水 19.8 μ L, 菌株模板 DNA 1.2 μ L。反应参数: 94 $^{\circ}$ C, 2 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳,并记录结果。

1.4 噬菌体的诱导^[10]

将只检测到 *vt2* 基因的菌株接种 LB 液体培养

基,37 $^{\circ}$ C 振摇过夜,加入 4 倍体积的新鲜 LB 液体培养基,加入丝裂霉素 C,37 $^{\circ}$ C 120 r/min 继续振荡培养 6h,加入氯仿后再振荡 15 min,4 $^{\circ}$ C 4000g 离心 30 min,上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,滤液为噬菌体液,于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 噬菌体的提纯和 DNA 的制备

按参考文献稍作改良^[11]。在噬菌体滤液中加入 RNA 酶消化 RNA, DNA 酶消化 DNA,经氯化钠冰浴 1h,离心收集上清;上清中加入聚乙二醇 8000 冰浴 1h,离心后沉淀用 SM (每升含 5.8g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 50mL 1mol/L Tris-Cl, pH7.5) 重悬过夜,即为纯化的噬菌体。用氯仿抽提含噬菌体颗粒的亲水相,在收集的亲水相中加入蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,加入 10% SDS 56 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用酚和氯仿抽提,最后再用等体积的氯仿抽提以去除残留酚,获取的亲水相用乙醇沉淀法回收噬菌体 DNA, DNA 沉淀用适量 TE (pH7.6) 溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 噬菌体中 *vt2* 和 *vt2-A*、*vt2-B* 亚单位基因检测

反应总体积均为 50 μ L: Premix Taq 25 μ L, *vt2*, *vt2-A* 或 *vt2-B* 的引物各 1 μ L (60 μ mol/L), 去离子水 22 μ L, 噬菌体模板 DNA 1 μ L。扩增 *vt2* 的参数同 1.3, 扩增 *vt2-A* 的参数: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 80s, 56 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 75s 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增 *vt2-B* 的参数: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物检测同 1.3。

1.7 噬菌体 *vt2-A* 和 *vt2-B* 亚单位基因的克隆

利用小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)分别提纯 *vt2-A* 和 *vt2-B* 的 PCR 扩增产物(按试剂盒的操作说明进行)。与 pMD18-T 载体连接,将连接产物转化至制备的感受态受体菌 TG1 中,以含 Amp/ X-Gal/ IPTG 的 LB 琼脂平板筛选, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取白色菌落用 PCR 法鉴定以确认 T 载体中确实插入了外源基因片断。

1.8 测序与序列分析

分别取 1mL 上述菌液由上海基康生物技术有限公司负责测序,结果用 BLAST 进行序列分析。

2 结果

2.1 菌株 *vt* 基因检测

PCR 检测 3 株 O157 菌株中的 *vt1* 和 *vt2*,发现 020324 只具有 *vt2* 基因、而 010920 同时具有 *vt1* 和 *vt2* 基因,020403 株 *vt1* 和 *vt2* 均未检测到(图 1)。

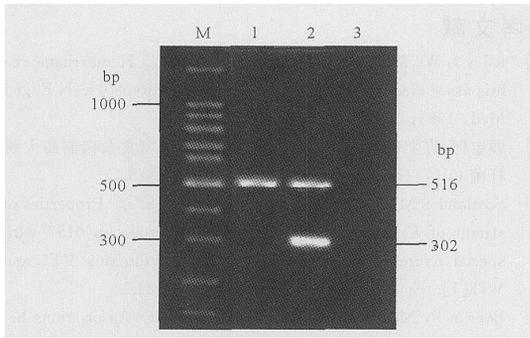


图 1 菌株 vt1 和 vt2 基因的 PCR 检测

Fig. 1 Detection of vt1 and vt2 gene in O157 strains

M, 100bp DNA Ladder marker; 1, *E. coli* O157 020324; 2, *E. coli* O157 010920; 3, *E. coli* O157 020403.

2.2 噬菌体 vt2、vt2-A 和 vt2-B 亚单位基因检测

选取 020324 菌株诱导释放噬菌体,提纯的噬菌体 DNA 进行 vt2 片断和 vt2-A, vt2-B 亚单位全基因的扩增,电泳后可见清晰的特异性 DNA 带,所得产物片段大小分别为 516bp, 1015bp 和 303bp,与引物设计的扩增片段相符(图 2)。

2.3 噬菌体 vt2-A 和 vt2-B 亚单位基因的克隆与核苷酸序列分析

vt2-A 和 vt2-B 亚单位基因 PCR 扩增产物克隆后进行测序,结果提交 Gen Bank(vt2-A 登录号 A Y 739670, vt2-B 登录号 A Y739671)并与 GenBank 中序列号为 X07865(933W 噬菌体),NC_002655

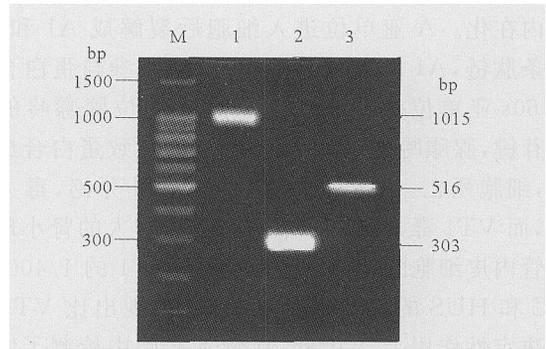


图 2 噬菌体 vt2、vt2-A 和 vt2-B 亚单位基因的检测

Fig. 2 Detection of vt2 gene for subunit A, B in phage
M, 100bp DNA Ladder Marker; 1, vt2-A subunit gene; 2, vt2-B subunit gene; 3, vt2 gene.

(O157 eDL933 株), BA000007 (O157 Sakai 株), AF291819(O157 台湾株)的编码 VT 毒素的 A、B 亚单位序列进行比较分析,发现 vt2-A 亚单位基因序列与 X07865 同源性为 98%,与 NC_002655 和 BA000007 同源性也均为 98%,与 AF291819 同源性为 99%;vt2-B 亚单位基因序列与 X07865 同源性为 96%,与 NC_002655 和 BA000007 同源性也均为 96%,与 AF291819 同源性达到了 100%。本实验诱导释放的噬菌体中 vt2-A 和 vt2-B 亚单位全基因序列与 X07865 的核苷酸序列具体的差异见图 3、图 4,推导出的氨基酸同源性分别为 98.8%和 96.7%,见图 5、图 6。

```

                21   70   97   118  133  249  340  414  510  778  790  814  856  892
vt2-A:  .....T.....C.....A.....T.....A.....G.....C.....C.....A.....G.....C.....T.....T.....C.....
X07865:  .....T.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....T.....A.....G.....C.....G.....T.....
    
```

图 3 vt2-A 全序列同源性比较

Fig. 3 Homology comparison of the vt2 subunit A complete sequence

vt2-A, vt2 gene for subunit A complete sequence from phage; X07865, Accession number of bacteriophage 933W vt2 gene for subunit A in GenBank; '.....', Meaning identical nucleotide sequence.

```

                38   66  103  108  114  120  123  126  128  132  138
vt2-B:  .....T.....C.....A.....T.....C.....A.....G.....C.....A.....G.....
X07865:  .....C.....T.....G.....C.....T.....G.....G.....T.....A.....G.....A.....
    
```

图 4 vt2-B 全序列同源性比较

Fig. 4 Homology Comparison of the vt2 subunit B complete sequence

vt2-B, vt2 gene for subunit B complete sequence from phage; X07865, Accession number of bacteriophage 933W vt2 gene for subunit B in GenBank; '.....', Meaning identical nucleotide sequence.

```

                75   131  132  277  320
vt2-A:  .....G.....T.....Q.....D.....-
X07865:  .....D.....M.....L.....E.....-
    
```

图 5 vt2-A 亚单位基因编码氨基酸序列比较

Fig. 5 Comparison of amino acid sequence of vt2 subunit A

vt2-A, Amino acid sequence of vt2 subunit A from phage; X07865, Amino acid sequence of vt2 subunit A from bacteriophage 933W; '.....', Meaning identical amino acid sequence; '-', Meaning stop codon

```

                13   35   43   90
vt2-A:  .....V.....N.....A.....-
X07865:  .....A.....D.....D.....-
    
```

图 6 vt2-B 亚单位基因编码氨基酸序列同源性比较

Fig. 6 Comparison of amino acid sequence of vt2 subunit B
vt2-B, Amino acid sequence of vt2 subunit B from phage; X07865, Amino acid sequence of vt2 subunit B from bacteriophage 933W; '.....', Meaning identical amino acid sequence; '-', Meaning stop codon

3 讨论

Vero 毒素是 O157:H7 及其他出血性大肠杆菌的主要致病因子,包括两类毒素:VT1 和 VT2,均为典型的 1A + 5B 生物毒素结构类型,即有一个 A 亚单位(32kDa)和一个五聚体 B 亚单位(7.7kDa 单聚体)组成。A 亚单位是毒素的活性部分,具有 N 糖苷

酶活性, B 亚单位与靶细胞特异性受体结合, 介导毒素内在化。A 亚单位进入细胞后裂解成 A1 和 A2 两条肽链, A1 链具糖苷酶作用, 切断参与蛋白合成的 60s 亚单位的 28s rRNA 中 4324 位腺嘌呤的 N 糖苷键, 腺嘌呤残基因此脱落, 从而导致蛋白合成受阻, 细胞死亡。VT2 毒素为细菌胞外分泌, 毒力较强, 而 VT1 毒素存在于胞内, VT2 对人的肾小球微血管内皮细胞的 50% 致死剂量是 VT1 的 1/400, 在 HC 和 HUS 的发展过程中 VT2 表现出比 VT1 更具决定性作用^[12]。因此, 尽管本实验中检测了实验菌株的 *vt1* 和 *vt2*, 但筛选只具有 *vt2* 基因的菌株进行噬菌体诱导, 对噬菌体 DNA 进行 *vt2*-A 和 *vt2*-B 亚单位基因的检测与克隆, 实验结果表明释放的噬菌体 DNA 中能扩增出 *vt2*-A 和 *vt2*-B 特异性 DNA 条带, 经测序和序列比较证实了扩增产物为 *vt2* 基因, 从而确定了 *vt2* 基因位于噬菌体上。

本实验噬菌体 DNA 中 *vt2*-A 和 *vt2*-B 序列与 Genbank 中对应基因的核苷酸序列相比发现, 与 O157 Sakai 株和 EDL933 株的 *vt2*-A 亚单位基因的同源性为 98%-99%, *vt2*-B 亚单位基因的同源性均为 96%, 而与台湾分离株的同源性略高, A、B 亚基的同源性分别为 99% 和 100%, 表明毒素的核苷酸序列也具有地区差异。在与登录号为 X07865 的 933W 噬菌体的 *vt2*-A 基因序列相比, 发现共有 14 个碱基发生变化, *vt2*-B 基因序列有 11 个碱基发生变化, 但其同源性均在 96% 以上; A 亚基编码的氨基酸仅在第 75、131、162、277 位发生改变, 同源性 98.8%, 而 B 亚基编码的氨基酸仅在第 13、35、43 位发生改变, 同源性 96.7%。由此推知, *vt* 基因序列具有相当的保守性, 这为疫苗研制和可能的免疫诊断试剂的开发提供理论依据。而在设计引物时两端加上常用的酶切位点, 为下一步的 VT2-A、VT2-B 蛋白的表达奠定了基础。

参考文献

- [1] Riley L W, Remis R S, Helgerson S D, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype[J]. *N Engl J Med*, 1983, 308:681-685.
- [2] 顾宝柯, 许学斌, 金汇明, 等. 上海地区家畜、家禽及肉制品大肠杆菌 O157:H7 监测[J]. *疾病监测*, 2003, 18:5-7.
- [3] Scotland S M, Willshaw G A, Smith H R, *et al.* Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2[J]. *Epidemiol Infect*, 1987, 99:613-624.
- [4] Boerlin P, McEwen S A, Boerlin P F, *et al.* Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:497-503.
- [5] Sato T, Shimizu T, Watarai M, *et al.* Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages[J]. *Gene*, 2003, 309:35-48.
- [6] Herold S, Karch H, Schmid H. Shiga toxin-encoding bacteriophages - genomes in motion[J]. *Int J Med Microbiol*, 2004, 294:115-121.
- [7] Muniesa M, de Simon M, Prats G, *et al.* Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak[J]. *Infect Immun*, 2003, 71:4554-4562.
- [8] Sato T, Shimizu T, Watarai M, *et al.* Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages[J]. *Gene*, 2003, 309:35-48.
- [9] 严亚贤, 施惠源, 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.
- [10] 余茂效, 司樾东. 噬菌体实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 7-9.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1999. 131-138.
- [12] Muhldorfer I, Harker J, Keusch G T, *et al.* Regulation of the Shiga-like toxin operon in *Escherichia coli*[J]. *Infect Immun*, 1996, 64(2):495-502.