

大肠杆菌 O157:H7 中编码 *vt2* 基因的噬菌体的分离与鉴定*

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)

Isolation and Identification of Bacteriophage Verotoxin 2

Gene 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, two pairs of primers were designed, synthesized and used to amplify *vt1* and *vt2* in *Escherichia coli* O157:H7. The strain carrying only the *vt2* gene was induced by mitomycin C and the bacteriophage carrying *vt2* (VT2 phage) was released. The induced phage was isolated and purified by the two-layer agar assay. The plaques were small and cloudy from the host strain MC1061. The phage plaques were clear when first replicated in CC118(λ pir) then MC1061. Electron microscopy showed that purified phage had a hexagonal head, a thin and long tail and no caudal sheath. The *vt2* gene from the purified phage DNA was cloned and sequenced. It had a 99% identity with the nucleotide sequence the gene encoding VT2 toxin in GenBank (accession numbers X07865, NC_002655, BA000007, AF291819). The results confirmed that *vt2* gene was encoded by bacteriophage genome. The VT2 phage ϕ HY was obtained and identified.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7; VT2 bacteriophage; Morphologic characteristic; *vt2* gene; Sequence analysis

摘要:根据 GenBank 中 VT1、VT2 毒素的基因序列设计合成 2 对引物,以大肠杆菌 O157:H7 菌株 DNA 为模板,扩增 *vt1*、*vt2*。诱导只扩增出 *vt2* 的菌株释放噬菌体,利用多种指示菌经双层琼脂平板法来分离纯化 VT2 噬菌体,观察噬菌斑的特征,提纯病毒粒子进行电镜观察,并对噬菌体中 *vt2* 基因检测、克隆和序列分析。结果显示 VT2 噬菌体感染 MC1061 在双层琼脂平板上形成的噬菌斑小而混浊,多呈磨玻璃样;而首次感染大肠杆菌 CC118(λ pir),此后用 MC1061 分离的噬菌体,再以 MC1061 为指示菌,在双层琼脂平板上形成小而清晰透明的噬菌斑。电镜下噬菌体头部呈六边形外廓,尾部细长无尾鞘结构。以噬菌体 DNA 为模板进行 PCR 扩增,检测到 *vt2* 特异性 DNA 带,克隆的 *vt2* 基因序列与 GenBank 中编码 VT2 毒素的核苷酸序列(X07865, NC_002655, BA000007, AF291819)的同源性分别达到 99%,确定编码 VT2 毒素的基因位于噬菌体上,并获得 VT2 噬菌体 ϕ HY。

关键词:大肠杆菌 O157:H7; VT2 噬菌体; 形态特征; *vt2* 基因; 序列分析

中图分类号: Q939.48

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)06-0668-05

肠出血性大肠杆菌(EHEC)是一群重要的肠道致病菌,其中公认的能引起人出血性腹泻的血清型有 O157:H7, O26:H11 和 O111:H-, 而 O157:H7 是最主要的血清型,现已将大肠杆菌 O157 确定为新的人畜共患病原。该菌最显著的特点是产生志

贺毒素(Shiga toxin, STs),由于该毒素能致 Vero 细胞病变,也称为 Vero 毒素(Vero toxin, VTs),它具有细胞毒性,肠毒性,致死性(神经毒性)。国外有研究显示 *vt* 基因可能是由溶源性噬菌体编码(编码 *vt* 的噬菌体即为 VT 噬菌体)^[1,2],通过 VT 噬菌体

收稿日期: 2005-05-23, 修回日期: 2005-09-02

* 基金项目: 上海市农委重点攻关项目(沪农科攻字(2004)第 11-4 号); 上海市教委曙光计划项目(B2002186)

作者简介: 张慧英(1978-)女, 上海松江籍, 硕士, 专业: 预防兽医学; 现工作单位: 上海市松江区食用农产品安全监督检测中心

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

溶源作用将 *vt* 基因整合到宿主菌染色体上,使宿主菌获得产生相应毒素的能力。国内有关大肠杆菌 O157 的研究报道虽日益增多,但仍以流行病学,病原学及菌株毒力基因的分子水平检测等方面居多,有关细菌中噬菌体携带毒力基因的研究报道较少^[3,4]。噬菌体作为细菌的病毒,在细菌生活世代中的位置以及在细菌分型,致病因子基因传递方面具有独特的作用。因此,从大肠杆菌 O157:H7 中分离噬菌体并对其进行相应研究有着重要的意义。本文通过从大肠杆菌 O157 020324 株中诱导分离 VT2 噬菌体,电镜观察噬菌体形态特征,对噬菌体中 *vt2* 基因进行克隆和序列分析,确定该菌株中 *vt2* 基因由噬菌体编码,获得 VT2 噬菌体 φ 020324,为进一步研究大肠杆菌 O157 的毒力传递机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株

大肠杆菌 O157:H7 010920、020324、020403 株由本实验室自行分离鉴定^[5]。噬菌体指示菌大肠杆菌 MC1061、JM109、DH5 α 、CC118 (λ pir)、BL21 (DE3)、TG1 由上海交通大学生物技术研究所保存。

1.2 引物设计

参照 GenBank 中大肠杆菌 O157:H7 的 *vt1*、*vt2* 核苷酸序列 (Accession number: NC_002655), 设计 2 对引物。*vt1* 基因片断引物,扩增片段为 302bp, *vt1*-上游引物: 5'-CGCTGAATGTCATT CGCTCTGC-3', *vt1*-下游引物: 5'-CGTGGTAT AGCTACTGTCACC-3'。*vt2* 基因片断引物,扩增片段为 516bp, *vt2*-上游引物: 5'-CTTCGGTATCC TATTCCCGG-3', *vt2*-下游引物: 5'-CTGCTGTGA CAGTGACAAAACGC-3', 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 菌株 *vt* 基因检测

提取被检菌株的 DNA 作为 PCR 扩增模板,采用多重 PCR 法同时检测 *vt1*、*vt2* 基因。反应总体积 50 μ L: Premix Taq (TaKaLa 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, 模板 1.2 μ L。反应参数: 94 $^{\circ}$ C 2min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 记录结果。

1.4 噬菌体的诱导^[6]

将只检测到 *vt2* 基因的菌株接种 LB 液体培养

基, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 加入 4 倍体积的新鲜 LB 液体培养基, 加入丝裂霉素 C (SIGMA 公司产品) 至终浓度 1 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6h, 加入氯仿后再振荡 15 min, 离心后上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 滤液即为噬菌体液, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 噬菌斑的观察

分别以大肠杆菌 MC1061、JM109、DH5 α 、CC118 (λ pir)、BL21 (DE3)、TG1 作为指示菌, 利用双层软琼脂平板法 (底层用 1.5% 琼脂, 上层用 0.7% 琼脂) 观察噬菌斑形态, 于 37 $^{\circ}$ C 培养至 8~10h, 观察噬菌斑特征。

1.6 噬菌体的纯化与效价测定

在噬菌斑分布均匀的双层软琼脂平板上挑取单个噬菌斑于含 1mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 2h 后滴加一滴氯仿于 4 $^{\circ}$ C 保存。将该液体作 10 倍递减稀释, 以相应的指示菌采用双层琼脂平板法分离纯化噬菌体, 对单个噬菌斑进行 3~5 次的反复纯化, 直至获得形态和大小完全一致的噬菌斑, 即获得了纯化的噬菌体。纯化后的噬菌体作 10 倍连续稀释, 以 MC1061 为指示菌进行单斑培养, 每个稀释度做 3 个重复, 计算噬菌体效价 (PFU/mL)。并将该噬菌体作进一步观察和检测。

1.7 噬菌体形态观察

按参考文献^[7]稍作改良, 取含 10⁵ PFU/mL 的纯化的噬菌体裂解液 0.1mL 与指示菌 MC1061 0.2 mL 混匀, 加入到融化的 6mL 上层琼脂, 浇注平板, 平板于 37 $^{\circ}$ C 正面放置 12~16h。在噬菌斑分布均匀的平板上加入 SM (含 NaCl 5.8g/L, MgSO₄·7H₂O 5g/L, 50mL 1mol/L Tris-Cl, pH7.5), 在 4 $^{\circ}$ C 摇床上晃动数小时, 吸出含噬菌体的 SM, 4 $^{\circ}$ C 离心去除细胞碎片后, 上清即为噬菌体裂解液。在裂解液中加入 RNase I 消化 RNA, DNase I 消化 DNA, 加入氯化钠 (终浓度为 1mol/L) 冰浴 1h, 离心收集上清; 上清中再加入聚乙二醇 8000 至终浓度 100g/L 冰浴 1h, 离心后沉淀的噬菌体颗粒用 SM 悬浮, 用氯仿抽提, 回收含噬菌体颗粒的亲水相, 取少量亲水相用 2% 的磷钨酸 (pH 6.7) 负染 1 min, 透射电镜 (JEM-100XC) 观察病毒粒子形态。

1.8 噬菌体中 *vt2* 基因检测

在 1.7 收集的含噬菌体颗粒的亲水相中加入蛋白酶 K (Promega 公司产品) 和 10% SDS 孵育后, 用酚和氯仿抽提, 再用等体积的氯仿抽提以去除残留酚, 获取的亲水相用标准乙醇沉淀法回收噬菌体 DNA, 溶于适量 TE (pH7.6) 中, 作为 PCR 检测 *vt2* 基因的模板。反应参数同 1.3。

1.9 噬菌体 *vt2* 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)回收纯化 *vt2* 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℃ 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段。

1.10 噬菌体 *vt2* 基因的核苷酸序列分析

取 1mL 上述经 PCR 确定的转化子菌液进行测序(由上海基康生物技术有限公司测试),测序结果用 BLAST 进行序列分析。

2 结果

2.1 菌株 *vt* 基因检测

3 株 O157 菌株经 PCR 检测,结果显示 020324 株只具有 *vt2* 基因,而 010920 株同时具有 *vt1* 和 *vt2* 基因,020403 株均未检测到 *vt1* 和 *vt2* 基因(图 1)。

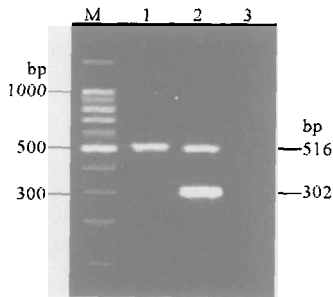


图 1 菌株 *vt1* 和 *vt2* 基因的检测

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 噬菌斑观察及效价测定

以 CC118(λ pir)为指示菌的双层琼脂平板在 37℃ 培养 3~4h 即有清晰的噬菌斑出现,此后对挑取的单个噬菌斑用 MC1061 进行双层琼脂分析噬菌斑特征,均能在 3~4h 形成清晰透明,边缘整齐,直径在 0.5~0.8mm 的噬菌斑,培养时间超过 10h 后,随着时间的延长,指示菌不断生长覆盖噬菌斑,使得噬菌斑逐渐模糊,边缘不清。测得的噬菌体效价为 1.0433×10^{10} PFU/mL。而直接以 MC1061 为指示菌分离到的噬菌体需培养 8~10h 时,才能观察到有噬菌斑的形成,噬菌斑表现为小而混浊,不透明,多呈磨玻璃样,边缘稍整齐,直径也在 0.5~0.8 mm,过夜培养不影响噬菌斑形态特征。测得的噬菌体效价为 3.3332×10^6 PFU/mL,将该纯化噬菌

体命名为 ϕ HY。而以 JM109、DH5 α 、BL21(DE3)、TG1 作为指示菌未观察到有噬菌斑的形成。

2.3 噬菌体形态观察

提纯的噬菌体颗粒负染后电子显微观察,可见头部呈六边形外廓(A),尾部细长(B),无尾鞘,尾端有吸附器结构(C)。如图 2 所示左上角是一个完整的噬菌体颗粒,视野中大多数颗粒丢失尾部及释放出核酸留下了空头壳(D)。将分离到的完整的噬菌体编号为 ϕ HY。经测量 ϕ HY 噬菌体头部为 63.1nm \times 57.4nm,尾部为 123.4nm \times 6.9nm,吸附器长 17.2nm,见噬菌体结构图(图 3)。

2.4 噬菌体中 *vt2* 基因检测

提纯的噬菌体 DNA 经 PCR 检测,电泳后可见

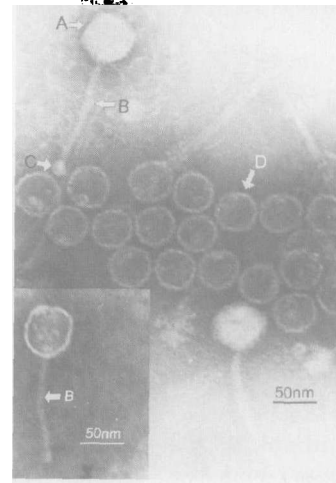


图 2 电子显微镜下噬菌体形态

Fig. 2 Morphology of bacteriophage under electron microscopy

A, Hexagonal head; B, Long tail; C, Adhesive disc; D, Hexagonal head without nucleic acid and tail.

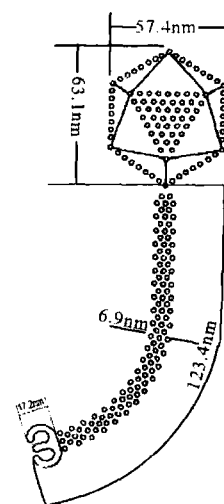


图 3 噬菌体结构模式图

Fig. 3 The mode structure of bacteriophage

清晰的特异性 DNA 带,片断大小与预期的 *vt2* 片断一致(图 4)

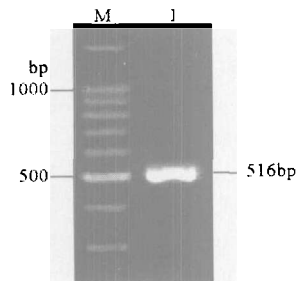


图 4 噬菌体 *vt2* 基因的检测

Fig. 4 Detection of *vt2* fragment gene
M, 100bp DNA Ladder Marker; 1, Bacteriophage.

2.5 噬菌体 *vt2* 基因的核苷酸序列分析

将克隆后的 *vt2* 基因所测定的序列与 GenBank 中的相关序列进行同源性分析,结果表明,本实验中 *vt2* 基因片断的核苷酸序列与 GenBank 上登录的 X07865(933W 噬菌体),NC_002655(O157 EDL933 株),BA000007(O157 Sakai 株),AF291819(O157 台湾株)编码大肠杆菌 O157:H7 VT2 毒素的基因序列的同源性均达到 99%。

3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 所产生的 VT 包括两类生物学相似而理化特性及免疫学特性有很大差异的 VT1 和 VT2。VT1 毒素存在于胞内,VT2 毒素分泌到菌体外,毒力较强。VT2 对人肾脏的微血管内皮细胞毒性作用比 VT1 强 1000 倍,其 LD_{50} 是 VT1 的 1/400,产 VT2 的大肠杆菌与人溶血性尿毒综合征相关性反映了 VT2 更容易损害肾小球血管,VT2 毒素被认为是大肠杆菌 O157 的重要毒力因子,因此本实验选择对编码 VT2 的噬菌体进行研究。严亚贤等^[4]通过 Vero 细胞毒力实验确定了 VT2 噬菌体的溶源菌株在溶源前后对 Vero 细胞的毒力发生了变化,但未进行 VT2 噬菌体的形态观察和基因序列测定。林业杰等^[3]探讨了 O157 菌株携带噬菌体状况,进行了噬菌斑特征观察和效价测定。本实验试图通过对 VT2 噬菌体的噬菌斑形成特征、形态特征、序列分析等研究,以期获得 VT2 噬菌体更详细和完整的基础信息。VT 噬菌体除了携带编码 VT 毒素的基因外,还可能携带其它与致病性有关的基因,能在许多菌株间水平转移,导致高致病力菌株的产生^[8]。对大肠杆菌噬菌体的研究,不仅能揭示细菌的致病机制,也能为揭示新的病原菌的产生提供理论依据,由此可见对噬菌体的研究具有重要意义。

溶源性噬菌体的释放包括自发释放和诱导释放。自发释放是指溶源性菌株不需要诱导物的作用而自发裂解释放噬菌体;诱导释放则需要采用物理方式(如紫外线照射)或化学方式(如丝裂霉素 C)诱导裂解释放噬菌体。本研究中发现大肠杆菌 O157 020324 株需要通过诱导才能释放噬菌体,自发裂解释放的噬菌体量极少。实验中分别以大肠杆菌 MC1061、JM109、DH5 α 、CC118(λ pir)、BL21(DE3)、TG 为指示菌,用双层琼脂平板法检测经丝裂霉素 C 诱导释放的噬菌体的噬菌斑,仅以 MC1061 和 CC118(λ pir)为指示菌时能观察到噬菌斑的形成,表明 VT 噬菌体对不同指示菌的敏感性不同。在噬菌斑观察试验中还发现一个值得注意的现象,从以 CC118(λ pir)为指示菌的双层琼脂平板上挑取的噬菌斑,此后再以 MC1061 作指示菌的噬菌斑非常清晰,而且只要 3h 左右就能见到噬菌斑形成。而直接用 MC1061 分离到的噬菌体的噬菌斑为混浊的呈磨玻璃样,且培养 9h 左右才能观察到噬菌斑。然而电镜观察这两种噬菌体的病毒粒子其形态完全相同,PCR 法也均检测到 *vt2* 基因。在试验过程中也设了阴性对照,直接对指示菌 CC118(λ pir)和 MC1061 作双层琼脂平板分析,未见有噬菌斑出现,可以排除指示菌 CC118(λ pir)自身释放噬菌体的可能。有报道这种特征由噬菌体的尾丝蛋白所决定^[9]。而 VT2-Sakai 噬菌体不能形成蚀菌斑,这是因为 IS629 插入到了在 *stx2* 下游、裂解基因 S、R 的上游,使得噬菌体终止了细胞裂解作用^[10]。VT1-Sakai 在编码头部蛋白基因区域发现一个 IS629 元件,在靠近 C 末端将基因 H0022 分隔,这一插入可能导致不能形成噬菌斑^[11],因此具体造成本试验这种现象的原因还有待于进一步研究。

迄今有报道将 VT 噬菌体归于长尾噬菌体科(Siphoviridae)或肌动噬菌体科(Myoviridae)^[12]。Willshaw 等(1987)^[13]从大肠杆菌 O26 中分离到 VT1 和 VT2 噬菌体,VT1 噬菌体(Φ H19)具有偏长的六边形头部,尾部不收缩、长而易弯曲。Scotland 等(1983)^[14]报道一株 VT1 噬菌体(Φ 30480)具有长和宽均为 74nm 的正六边形头部,尾部短。Rietra 等(1989)^[15]证实了从大肠杆菌 O26 分离的噬菌体形态与 Willshaw 等报道相似,而从 O157 和 O29 中分离的噬菌体具有正六边形和尾短的特征。Plunkett 等(1999)^[16]研究表明同一株大肠杆菌 O157 中 VT1 和 VT2 噬菌体的形态相似,且与 Φ H19 的形态一致,但 933W VT2 噬菌体具有宽为 70nm 的正六边形头部,尾部短、收缩。由此可见 VT 噬菌体的

形态存在很大差异,本实验分离到的 ϕ HY 噬菌体头部呈六边形外廓,实际应是 20 面体的头部,尾部较长,可归为长尾噬菌体科。电镜图中只见少数完整的颗粒和充满核酸的头部,多数为断尾的空头壳,这可能是由于噬菌体未装配完整或是由于制片过程造成了噬菌体尾部的丢失。

本次分离到的噬菌体经 PCR 检测在预期 516bp 处出现特异性的 DNA 带,克隆基因的序列分析显示与国外报道编码 VT2 毒素核苷酸序列的同源性均达到 99%。结合噬菌斑和形态特征,确定本试验分离的噬菌体编码 *vt2* 基因,从而确定 *vt2* 基因位于噬菌体上,获得了 VT2 噬菌体 ϕ HY,相关研究在国内还未见有报道,为进一步研究大肠杆菌 O157 的毒力机理提供了基础资料。

参考文献

- [1] Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage Φ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3855-3861.
- [2] Watarai M, Sato T, Kobayashi M, *et al.* Identification and characterization of a newly isolated Shiga toxin 2-converting phage from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(9): 4100-4107.
- [3] 林业杰, 郭维植, 林杰, 等. O157 大肠杆菌溶源性噬菌体的初步探讨[J]. *海峡预防医学杂志*, 2003, 9(5): 52-53.
- [4] 严亚贤, 陆承平. 大肠杆菌 VT2 噬菌体的分离与溶源转染[J]. *中国病毒学*, 2004, 23(4): 389-394.
- [5] 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.
- [6] 余茂效, 司樾东. 噬菌体实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 7-9.
- [7] 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.
- [8] Eisen J A. Gastrogenomics [M]. *Nature*, 2001, 409: 463-466.
- [9] Montag D, Hashemolhosseini S, Henning U. Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. The receptor-recognizing area of proteins 37 of phages T4 Tula and Tulh [J]. *J Mol Biol*, 1990, 216(2): 327-334.
- [10] Makino K., Yokoyama K., Kubota Y, *et al.* Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak[J]. *Genes Genet Syst.* 1999, 74: 227-239.
- [11] Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, *et al.* Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak[J]. *Gene*, 2000, 258: 127-139.
- [12] Schmidt H. Shiga toxin-converting bacteriophages[J]. *Res Microbiol*, 2001, 152: 687-695.
- [13] Willshaw G A, Smith H R, Scotland S M, *et al.* Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins; comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes[J]. *J Gen Microbiol*, 1987, 133: 1309-1317.
- [14] Scotland S M, Smith H R, Willshaw G A, *et al.* Vero cytotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage [J]. *Lancet*, 1983, 2: 216.
- [15] Rietra P J, 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.
- [16] Plunkett G, Rose D J, Durfee T J, *et al.* Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157: H7; Shiga toxin as a phage late-gene product[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 1767-1778.