

不携带霍乱毒素基因的 CTX Φ 类前噬菌体 基因组克隆与分析*

阚 飙 刘延清 祁国明 章丽娟 高守一

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 卫生部医学分子细菌学重点实验室 北京 102206)

摘 要 霍乱弧菌的霍乱毒素基因 *ctxAB* 由其溶源性噬菌体 CTX Φ 编码,由此携带毒素基因在产毒株与非产毒株间水平转移。从无 *ctxAB* 的 El Tor 型菌株中,发现不同时间、地点来源的部分菌株仍带有 CTX Φ 基因组的其它基因,在研究菌株染色体上呈双拷贝串联排列。克隆后测序发现基因组全长 5708bp,其抑制基因 *rstR* 却与古典型菌株来源 CTX Φ 的相同,因此从 El Tor 菌株中发现整合有古典型来源的这类噬菌体。其它各基因与 CTX Φ 序列基本一致,但 nct-CTX Φ 的 *zot* 基因末端及下游间隔区与 CTX Φ 的相差很大,进一步的序列测定与比较表明 nct-CTX Φ 中无 *ctxAB* 应是其固有结构,而不是 *ctxAB* 丢失所形成的。将这种独特的前噬菌体命名为 nct-CTX^{class} Φ 。研究菌株染色体上 nct-CTX Φ 基因组上下游也各存在 TLC 因子和 RTX 毒力基因簇的同源序列,揭示它们与 nct-CTX Φ 基因组有与 CTX Φ 相同的联系。从序列分析上认为 nct-CTX Φ 与 CTX Φ 在遗传分化上有不同,可能是 CTX Φ 的前体形式,这对 CTX Φ 的来源、分化以及新病原产生的研究具有重要意义。

关键词 霍乱弧菌,霍乱毒素,溶源性噬菌体,基因组

中图分类号:R516.5 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0573-09

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)是弧菌科弧菌属中致人疾病的重要病原菌,产霍乱毒素(CT, cholera toxin)的霍乱弧菌导致感染者剧烈的水样腹泻,严重者可致死亡。CT 为一种 A-B 型肠毒素,这两个亚单位的基因 *ctxAB* 在染色体上串联排列^[1]。近年来发现 *ctxAB* 由溶源性的丝状噬菌体(定名为 CTX Φ)编码^[2],该噬菌体基因组由同向重复序列 RS^[3,4]和核心区构成,核心区 *ctxAB* 上游依次排列着 *zot*、*ace*、*orfU* 和 *cep*^[1,3,4]。RS 序列编码位点特异的重组系统^[5,6]。CTX Φ 以霍乱弧菌的毒素共调菌毛为受体,染色体上 attRS 序列为特异整合位点,会导致毒素基因在产毒株和不产毒(无 *ctxAB*)的非致病性菌株间的水平转移^[6]。

CTX Φ 基因组的重复序列 RS 中的一个关键基因 *rstR* 编码抑制子,可使 CTX Φ 维持溶原状态;*rstR* 还在噬菌体免疫中起作用^[7]。古典型菌株与 El Tor 型菌株的 CTX Φ 中 *rstR* (各称作 *rstR*^{class} 和 *rstR*^{ET})序列有非常明显的差异,且没有相互的免疫能力^[7];另外在部分 O139 群霍乱弧菌中也发现另外一种独特的 *rstR* 序列(*rstR*^{calc})^[8],因此 *rstR* 使三种 CTX Φ 表现有差异(各称作 CTX^{class} Φ 、CTX^{ET} Φ 和 CTX^{calc} Φ),而基因组其它部分高度一致。

* 本研究受国家自然科学基金(39870031)和国家重大基础研究项目课题(G1999054102)资助。

作者简介 阚 飙(1969-)男,山东临沐人,医学博士,副研究员,现从事医学细菌分子遗传学研究。

收稿日期 2001-11-06,修回日期 2002-02-22

通常认为在 CTX Φ 中 *ctxAB* 与噬菌体中其它基因成分作为整体存在的。在所收集的 14 株国内分离的不产毒素 El Tor 型霍乱弧菌中,发现有 4 株虽不含 *ctxAB*,但具有 *zot*、*ace*、*cep* 和 RS,提示 CTX Φ 的一种不含 *ctxAB* 的新的存在形式^[9]。本文克隆了这种噬菌体的基因组,发现以双拷贝串联形式存在,DNA 测定发现其 *rstR* 基因与古典型菌株 CTX Φ 的 *rstR* 相同,虽然这种噬菌体基因组存在于 El Tor 型菌株中,而且 *zot* 基因的末端有较大改变。我们将这种噬菌体定名为 nct-CTX^{class} Φ (non-*ctxAB* CTX^{class} Φ),其基因组序列已录入 GenBank(Accession No. AF220606)。序列分析认为这种不携带毒素基因的 nct-CTX Φ 基因组可能是 CTX Φ 家族的前体形式,这对霍乱弧菌中毒素基因的来源、这种形式在 CTX Φ 家族和霍乱弧菌的进化与分化中的意义等研究具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 基因克隆用受体菌株和质粒

实验用菌株和质粒见表 1。

表 1 实验用菌株及重组质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strain and plasmid | Relative characteristic | Source |
|--------------------|---|-------------------------|
| Strains | | |
| 86015 | El Tor biotype of <i>V. cholerae</i> serogroup O1, <i>ctxAB</i> ⁻ <i>zot</i> ⁺ <i>ace</i> ⁺ <i>orfU</i> ⁺ <i>cep</i> ⁺ RS ⁺ | Our lab |
| 7743 | El Tor biotype of <i>V. cholerae</i> serogroup O1, CTX Φ ⁻ | Our lab |
| JM109 | <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>F</i> [<i>traD36proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15] | Our lab |
| HB101 | <i>supE44 hsdS20</i> (<i>rBmB</i>) <i>recA56 galK2 galT22 metB1</i> | Our lab |
| LE392 | <i>F hsdR574</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 supF58 lacY1</i> or Δ (<i>lacIZY</i>)6 <i>galK2 gal T22 metB1 trpR55</i> | Promega |
| Plasmids | | |
| pHC79 | Cosmid vector, <i>oriMB1 COS</i> , Amp ^r Tet ^r | Promega |
| pUC18 | Cloning vector, <i>oriMB1 lacZ'</i> , Amp ^r | Our lab |
| p11G + 4 | Double copies of nct-CTX Φ from strain 86015, cloned into pHC79, Amp ^r | This study |
| pncPH | <i>Hind</i> III fragment of p11G + 4 subcloned into pUC18, containing the Doublecopies of nct-CTX Φ genome, Amp ^r | |
| pnc PH-P | 5.5kb <i>Pst</i> fragment of pncPH, cloned into pUC18, Amp ^r | This study |
| pncPH-M | From pncPH, the 5.7kb <i>Mlu</i> I fragment is deleted, containing the hybridized single copy of nct-CTX Φ genome, Amp ^r | This study |
| pCTR5A11 | Containing CTX Φ genome of El Tor strain 1621, Amp ^r | Our lab ^[10] |
| pZCT5A | From pCTR5A11, containing end of <i>zot</i> and forepart of <i>ctxA</i> , Amp ^r | This study |
| Tat1 | 328bp fragment containing attRS of strain 7743, cloned into pGEM-T, Amp ^r | This study |

1.2 培养基及抗生素

1.2.1 LB 培养基:10g 胰蛋白胨、5g 酵母提取物和 5gNaCl,定容至 1L,调 pH 至 7.4,高压灭菌。

1.2.2 LBA 培养基:每升 LB 中加入 15g 琼脂粉,高压灭菌。

1.2.3 抗生素浓度:如无特别说明,则氨苄青霉素浓度为 100 μ g/ml。

1.3 以 Cosmid 载体构建染色体基因库

1.3.1 建基因库用染色体酶切片段制备:将玻璃棒缠绕制备的霍乱弧菌染色体 DNA 按文献 [11] 用 *Sau*3AI 进行部分酶切,采用倍比稀释内切酶的方式进行预试验,取染色体片段众数在 35 ~ 45kb 的酶浓度及时间进行目的片段的大量制备。

1.3.2 使用的限制性核酸内切酶分别购自华美生物工程公司、Takara 宝生物工程(大连)有限公司和中国医学科学院基础医学研究所,牛小肠碱性磷酸酶为 Promega 公司产品,T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品。

1.3.3 染色体基因库的构建参考文献 [12] 及 Promega 公司 Packagene[®] 包装系统试剂盒说明书,并略有改动,简述为:*Bam*HI 完全消化 pHC79 并用碱性磷酸酶去磷酸化,取约 2 μ g 并与约 3 μ g 的 *Sau*3AI 制备的染色体片段混合,加入 T4 DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 过夜连接。取一管 -70 $^{\circ}$ C 冻存的包装蛋白置冰块表面,待融化后立即加连接产物与之混合,22 $^{\circ}$ C 包装 3h,加 455 μ L 噬菌体缓冲液(20mmol/L Tris-HCl pH7.4,100mmol/L MgCl₂,10mmol/L MgSO₄)及一滴氯仿,待用时置 4 $^{\circ}$ C。LB 培养基中加入麦芽糖(终浓度 0.2%)及 MgSO₄(终浓度 10mmol/L),接种新鲜培养的受体菌 HB101,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 约 0.8,按约 1/50 比例再转种含麦芽糖及 MgSO₄ 的 LB,快速摇动培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 ~ 0.8。每次取包装物 100 μ L 与 0.2mL 感受态菌液混匀,37 $^{\circ}$ C 置 30min 进行吸附转染,转至 37 $^{\circ}$ C 摇床缓摇 45min 使氨苄青霉素抗性基因表达,涂氨苄青霉素平板培养。长出的菌落进行原位杂交,检测所需菌落。

1.4 质粒提取

按文献 [11],以碱裂解法提取质粒。

1.5 DNA 片段的回收

用低熔点琼脂糖或透析袋回收 PCR 产物或内切酶切质粒电泳分离的 DNA 片段,参考文献 [11]。

1.6 大肠杆菌感受态细胞的制备和连接物或质粒转化

按文献 [11],采用冷 CaCl₂ 法。

1.7 非放射性 DNA 探针标记及 Southern 杂交和菌落原位杂交检测

采用地高辛(Dig)非放射性 DNA 探针标记试剂盒(Roche 公司)以随机引物法对 DNA 片段进行标记和检测,按试剂盒说明书进行。检测 *ctxA*、*ctxB*、*zot*、*ace* 及 *cep* 基因所用探针片段均为 PCR 扩增产物,各扩增片段均位于其结构基因内,产物均经 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化。提取的质粒 DNA 经内切酶完全酶切,电泳后,凝胶变性、中和,转移片段至 0.45 μ m 硝酸纤维素膜,干烤 2h 固定 DNA 待杂交检测。菌落原位杂交过程为将待检菌用灭菌牙签点种于灭菌的平贴于固体培养基上的 0.45 μ m 硝酸纤维素膜上,培养至菌落直径 1 毫米后,将膜平贴于浸透 10% SDS 的滤纸上 15min,之后将膜揭起来,在一干净滤纸上吸去背面液体,将膜平贴于含 0.5mol/L NaOH 和 1.5mol/L NaCl 的变性液浸透的滤纸上 10min,再如此依次经含 1.5mol/L NH₄Ac 和 0.02mol/L NaOH 的中和液及 2 \times SSC 各作用 10min,用 2 \times SSC 以吸管轻吹去菌落,晾干后干烤备用。

1.8 限制性核酸内切酶图谱及基因组物理图谱的构建

根据已发表的 CTX Φ 基因组中的核酸内切酶(尤其特征性内切酶)选择部分识别六碱

基的内切酶进行单酶切及双酶切带基因组的重组质粒,电泳计算片段分子量,并参考 CTXΦ 基因组结构特点定位和构建基因组图谱。染色体上 CTXΦ 基因组的物理图谱用特征性内切酶酶切染色体。

1.9 DNA 序列测定和分析

含重组质粒的菌株交由赛百盛(北京)生物工程公司和 Takara 宝生物工程(大连)有限公司商业测序,对于长片段插入片段,采用设计引物自两端步进测序方式。测序结果用 DNASIS、以及 DNASTAR 软件中的 EDITSEQ、MAPDRAW、MEGALIGN 分析。

2 结果

2.1 用 cosmid 质粒 pHC79 克隆菌株 86015 株染色体上无毒素基因的 CTXΦ 基因组

CTXΦ 基因组特异片段探针杂交检测显示在我们收集的无毒素基因菌株中有一部分仍含有 CTXΦ 的其它基因同源序列^[9],选择其中一个菌株 86015,提取染色体后以 *Sau3AI* 部分酶切,经与载体连接和转染,构建了 86015 染色体文库。将这些克隆子用 *zot* 探针进行菌落原位杂交,筛选阳性克隆子。实验发现 86015 染色体经 *Hind*III 酶切,以 *zot*、*ace*、*cep* 和 RS 探针杂交后,在 21kb 片段的相同位置均出现杂交带^[9],因此对获得的阳性克隆子也用 *Hind*III 酶切作 Southern 转膜,用 *zot*、*cep* 和 RS 探针杂交作进一步验证,结果大多数重组质粒在 21kb 片段均出现杂交带。

选取一克隆子(重组质粒命名为 p11G+4)作为研究出发质粒,将其转化入受体菌 LE392,提该质粒后用 *Hind*III 完全酶切,回收约 21kb 片段,与 *Hind*III 酶切并去磷酸化的载体 pUC18 连接,转化受体菌 JM109,经蓝白斑筛选及 *zot* 探针菌落原位杂交,将其中一个阳性重组质粒命名为 pncT_{PH}。构建的该质粒的一部分内切酶的物理图谱,并与已发表的 CTXΦ 基因组图谱^[4,6]作比较(图 1),可见菌株 86015 染色体上 CTXΦ 基因组中没有携带毒素基因 *ctxAB*,我们把这种不同的基因组结构命名为 nct-CTX^{class}Φ,这是溶源性噬菌体 CTXΦ 的一种新的存在形式。从构建的物理图谱分析,nct-CTX^{class}Φ 在菌株 86015 染色体上呈串联的双拷贝存在,而且是紧连在一起的。

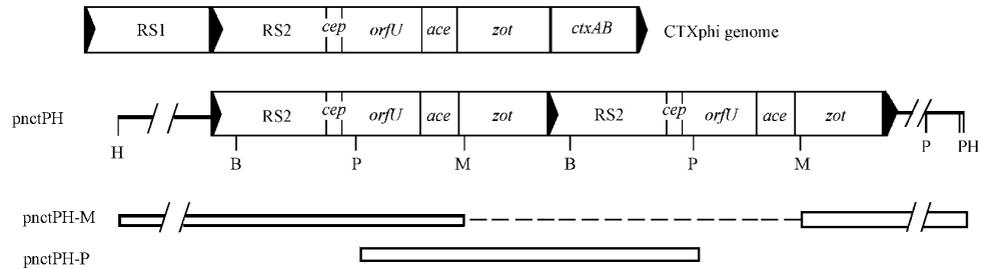


图 1 nct-CTX^{class}Φ 与 CTXΦ 基因组比较(上)以及重组质粒克隆片段(下)示意图

Fig.1 Comparison of the genomes' structure of nct-CTX^{class}Φ and CTXΦ (up) and schematic representation of cloned fragments in the recombinant plasmids

“CTX_{phi} genome” means the organization of single copy of CTXΦ genome. nct-CTX^{class}Φ genomes, which are tandem double copies, is in the cloned fragment in pncT_{PH}. Black triangles indicate integration site attRS or end repeat, ER. Broken line in map of sub-clone plasmid pncT_{PH}-M indicates the deleted *Mlu*I fragment from pncT_{PH}. pncT_{PH}-P contains 5.7kb *Pst*I fragment cloning into pUC18. H: *Hind*III; B: *Bgl*II; P: *Pst*I; M: *Mlu*I.

2.2 nct-CTX^{class}Φ 全基因组序列测定与分析

Pst I 在 CTXΦ 中的 *orfU* 基因内部有一个切点 ,而在其它区域没有。在 nct-CTX^{class} Φ 中也是这种情况 (见图 1)。*Pst* I 切 pnc1PH 获得 5.7kb 片段 ,由于 nct-CTX^{class} Φ 基因组为串联的双拷贝 ,则以 *orfU* 中 *Pst* I 为界 ,相当于 nct-CTX^{class} Φ 基因组的前半段接在了 *Pst* I 后半段的尾部。将此片段克隆入 pUC18 构建重组质粒 pnc1PH-P (图 1)作为模板进行测序 ,以从外侧向中间设计引物步进测序方式。测序结果与已发表序列进行比较和拼接 ,得到 nct-CTX^{class} Φ 的 5708bp 全基因组序列。分析可见在 nct-CTX^{class} Φ 中没有 *ctxAB* 基因 ,其 RS 序列为 RS2 ,含 *rstR*、*rstA* 和 *rstB* ,无 *rstC*。比较中发现 nct-CTX^{class} Φ 的 *rstR* 与来自 El Tor 菌株的 CTXΦ 中的 *rstR* 序列^[6]明显不同 ,DNA 同源性仅 33.3% ,进一步与已发表的来自古典型 569B 的 CTXΦ 中 *rstR* 开放读框序列^[7]比较 ,结果两者完全一致。在我们的结果中 ,此 El Tor 菌株溶原性的 nct-CTXΦ 的抑制基因 *rstR* 为古典型的 ,因此命名为 nct-CTX^{class}Φ。

nct-CTX^{class} Φ 和 CTXΦ 中 *rstA*、*rstB*、*cep*、*orfU*、*ace* 和 *zot* 基因的同源性比较 ,发现这些基因几乎一致 ,尤其 *rstA*、*rstB* 和 *ace* ,核苷酸的差异造成的结果只是静息改变 ,氨基酸序列完全相同。需注意的是 *zot* 基因 ,在末端的核苷酸序列以及以此推测的末端 20 个氨基酸残基发生了较大变化 (图 2) ,此肽段占 *Zot* 多肽链的 5%(20/400) 。质粒 pCT5A11^[10] 包含来自产毒的 El Tor 菌株 1621 的 CTXΦ 基因组 ,对之进行了亚克隆 ,含其中的 *EcoRV*-*Xba* I 片段 (包含 *zot* 开放读框的末端和 *ctxAB* 的前端) ,得到克隆子 pZCT5A ,测序获得 *zot* 与



图 2 菌株 86015 染色体上串联双拷贝 nct-CTX^{class} Φ 基因组的相邻区域序列

Fig.2 The contemrinous region sequence of the double copies of nct-CTX^{class} Φ genomes

The region containing the end of *zot* of the former copy and the forepart of RS of the later. Dots indicate the homologous bases , and broken lines mean gaps. Arrows indicate the end of *zot* or start of RS. The 7-base repea(TTTTGAT) in upstream of *ctxAB* is indicated with single underlines(curves and beelines),and ER is marked with double underlines.

ctxAB 之间的间隔区,与 *nct-CTX^{class}Φ* 基因组中 *zot* 末端及后面的间隔区比较,没有发现同源序列,而且在 *CTX^{ET}Φ* 的 *zot-ctxAB* 间隔区中作为增强 *ctxAB* 表达的七碱基重复序列,在 *nct-CTX^{class}Φ* 基因组 *zot* 末端及后面的间隔区中也不存在(图 2)。

2.3 *nct-CTXΦ* 在菌株 86015 中整合位点和两侧染色体序列

将含双拷贝 *nct-CTX^{class}Φ* 的重组序列 *pnc1PH* 以 *Mlu* I 切(*Mlu* I 在 *zot* 中有单一切点)大片段自连后得到了含单拷贝的 *nct-CTX^{class}Φ* 的重组质粒 *pnc1PH-M*(图 1),以此质粒为模板设计引物 RS 前部及 *zot* 末端向染色体方向测序,得到 *nct-CTXΦ* 在 86015 上整合部位的邻接染色体 DNA 序列。

2.3.1 菌株 86015 中 *nct-CTXΦ* 的整合位点和末端重复:分析其中的 *attRS* 及末端重复(ER)序列,得到 *attRS* 及 ER 在双拷贝 *nct-CTX^{class}Φ* 中分布为:第一个 *nct-CTXΦ* 拷贝为 17bp *attRS* 序列,第二个拷贝的开始端及 *zot* 末端为 18bp 的 ER 序列(图 1)。在不同菌株的 *CTXΦ* 及 *nct-CTX^{class}Φ* 位置,ER 表现为两种序列^[5,13],两者有一个碱基的差别。这些 ER 是由 *CTXΦ* 及 *nct-CTX^{class}Φ* 在通过 *attRS* 位点整合后造成整合位点倍增,以及噬菌体基因组在染色体上拷贝扩增时形成的。即使噬菌体基因组末端无 RS 序列,也存在 18bp 的 ER 序列。

2.3.2 *nct-CTXΦ* 在 86015 染色体上基因组两侧的染色体序列分析:经 BLASTN 同源性检索,在测序的范围内发现菌株 86015 的 *nct-CTX^{class}Φ* 基因组上游的染色体片段中含 TLC 的末端同源片段,同时含有 TLC 与 *CTXΦ* 间隔的 *eio* 区。TLC 是霍乱弧菌 4.7kb 静息质粒 *pTLC* 在染色体上整合的形式^[14],TLC 也与 *nct-CTX^{class}Φ* 在菌株 86015 染色体上串联排列。

86015 的这一染色体片段与霍乱弧菌 N16961 株 RTX 基因簇中 *rtxA* 基因末端序列以及 RTX 与 *CTXΦ* 之间的染色体序列^[15]也是几乎完全相同的,说明在 *nct-CTX^{class}Φ* 的下游也存在 RTX 基因簇。

2.3.3 菌株 86015 染色体上 *nct-CTX^{class}Φ* 基因组两侧的片段与 *CTXΦ⁻* 菌株 *attRS* 位点两侧序列相同:引物 CGC AGC AGA CGA ACT CTA TGT C 和 CAC TTT GGT GCA CAC AAT TGA CG^[4]位于染色体上整合的 *CTXΦ* 两侧,以此对引物扩增 *CTXΦ⁻* El Tor 菌株 7743 的染色体,得到预测的约 328bp 片段,将此扩增片段克隆(克隆子 *pTat1*)进行了测序,见图 2,其中含有 17bp 的 *attRS* 位点。

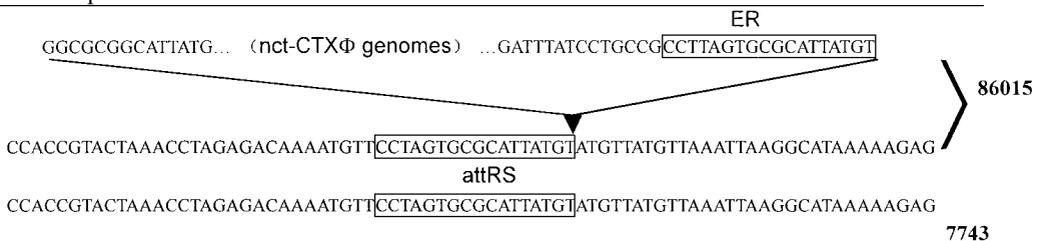


图 3 *CTXΦ⁻* 菌株 7743 的 *attRS* 整合位点两侧染色体序列与菌株 86015 的 *nct-CTX^{class}Φ* 基因组两侧染色体序列比较

Fig.3 Compare of the adjacent genome sequences of *attRS* of *CTXΦ⁻* strain 7743 to the adjacent regions of *nct-CTX^{class}Φ* genomes of strain 86015

The double copies of *nct-CTX^{class}Φ* are listed respectively on the top.

将测得的 86015 染色体上 *nct*-CTX^{class} Φ 基因组两侧的序列与所测得 CTX Φ ⁻ 菌株 7743 328bp 染色体序列相比较(图 3),发现两者几乎完全相同,与文献报道^[4]中 CTX Φ ⁻ El Tor 菌株 2240-80 attRS 两侧染色体短片段也相同。从这些结果分析 attRS 位点在 El Tor 型霍乱弧菌染色体上位置可能是相同的,也提示 86015 株中 *nct*-CTX^{class} Φ 是经感染其原本不含这一噬菌体的菌株整合上去的(图 3)。

3 讨论

3.1 根据 *nct*-CTX^{class} Φ 的结构特点,提示其基因组是固有结构,而不是 *ctxAB* 丢失形成的

CTX Φ 携带毒素基因在霍乱菌株中的水平播散造成产毒菌株在自然界的保存,并出现新的流行、产生新的病原菌。在发现 CTX Φ 时^[6]以卡那霉素抗性基因作为标记替换 CTX Φ 中的 *ctxAB* 基因,诱导和证明了 CTX Φ 的存在,这也表明 *ctxAB* 是作为 CTX Φ 的携带基因而存在的,在噬菌体形成、复制、整合及切离中并不起作用,由此 *nct*-CTX Φ 也是可以单独作为遗传因子而存在的。另外,细菌基因组中 G + C% 含量明显与染色体 DNA 其它区域不同的基因簇,往往提示与该菌株来源不同,是外来的成分。*ctxAB* 基因 G + C% 含量为 36.8%,明显低于霍乱弧菌染色体(平均 47%),而 *nct*-CTX Φ 的 G + C% 含量也为 47.3%,*ctxAB* 的 G + C% 含量也明显低于 CTX Φ 中其它各基因,这有可能表示 *ctxAB* 的来源与 CTX Φ 不同,甚至有可能 *ctxAB* 是 CTX Φ 从别的一种古老的细菌中另外整合携带上的。

在我们的研究中,发现没有 *ctxAB* 的有些菌株中仍检测到 CTX Φ 的其它基因,由于不带 *ctxAB* 基因,将这一独特的噬菌体基因组命名为 *nct*-CTX^{class} Φ 。含这种基因组的四株 El Tor 小川型菌株分离自不同时间和地区,对 *nct*-CTX^{class} Φ 全基因组的克隆与测序证实了这种结构存在于自然菌株中。我们分析了 CTX Φ 中 *ctxAB* 读码框架外侧的序列,寻找同向重复或反向重复、大的发夹结构等,并与 *nct*-CTX^{class} Φ 中 *zot* 结构基因两侧序列进行比较,比如在 CTX Φ 中重复了两个拷贝而在 *nct*-CTX^{class} Φ *zot* 下游中存在一个拷贝的类似结构,但没有发现有意义的序列,*ctxAB* 两侧间隔区有同向重复序列,但一般是简单序列的重复,复杂度很低。因此 CTX Φ 中 *ctxAB* 的携带是如何发生的,是本身固有的、还是 CTX Φ 作为移动因子插入另外的细菌染色体上时带下来的,还需进一步的证据。

nct-CTX^{class} Φ 的另一基因序列特点是 *zot* 基因末端。在基因大小及排列上,*zot* 基因类似于 M13 的基因 I^[6],M13 的基因 I 产物为内膜蛋白,在噬菌体组装中起作用,破坏了 *zot* 基因则 CTX Φ 也不会形成病毒颗粒^[6]。*nct*-CTX^{class} Φ *zot* 基因末端 54 个碱基(18 个氨基酸残基)与 CTX Φ 中的 *zot* 差别明显,由于这些差异表现于 3' 端,而且大多是相同性质的氨基酸残基替换,可能其功能没有改变。而来自古典型菌株 569B 的 CTX Φ 中 *zot* 末端与 El Tor 来源的 CTX Φ 是相同的,因此 *nct*-CTX^{class} Φ 的 *zot* 末端为其特异的结构。在 CTX Φ 中 *ctxAB* 连接于 *zot* 下游,*ctxAB* 基因受 *toxR* 的正性调控,*ToxR* 也与 DNA 结合,*ctxAB* 上游的七碱基串联重复 TTTTGAT 是 *ToxR* 结合然后激活 *ctxAB* 表达的部位^[16,17],这一短序列在高产毒株 569B 中重复了八次,而此短序列的第一个重复却是 *zot* 的末端,其中的 TGA 在 *zot* 基因中用作终止密码,因此在 CTX Φ 中看来 *ctxAB* 与 *zot* 基因在序列上有一定的联系(图 2)。*nct*-

CTX Φ 的 *zot3'*端没有这一结构(图2),这提示 nct-CTX Φ 不携带 *ctxAB* 有其结构基础。因此 nct-CTX Φ 不携带 *ctxAB* 原本就是这样的结构,而不是 CTX Φ 缺失 *ctxAB* 所形成的。基于以上分析,我们认为 nct-CTX Φ 的结构可能是 CTX Φ 的前体形式。

3.2 以 *rstR* 基因序列为标志分析 CTX Φ 家族成员在菌株间的传递

nct-CTX Φ 整合于 O1 群 El Tor 型霍乱弧菌中,然而其 *rstR* 基因与古典型菌株来源的 CTX Φ 中 *rstR* 相同,说明古典型来源的 CTX Φ 类成员转染进了 El Tor 型菌株中,因此并不是不同生物型的 CTX Φ 仅局限于在各自的生物型中播散。目前从基因组分布上看,CTX Φ 的转染表现为生物型特异倾向,但实验中来自 El Tor 的 CTX Φ 可以高频率地感染古典型菌株(古典型菌株 CTX Φ 因难以诱导而没有感染 El Tor 菌株的研究结果)^[6,7]。目前也已知 O139 群产毒菌株携带的 CTX Φ 为 El Tor 型来源的,一方面 O139 群菌株是在 El Tor 型菌株正在流行时出现的,很多的研究提示 O139 群菌株与 O1 群 El Tor 型菌株有密切的遗传关系,而且两种菌株的作为 CTX Φ 受体的毒素共调菌毛主要亚单位 *tcpA* 序列是相同的。这种 CTX Φ 基因组在不同型别菌株中的分布也许与菌株出现流行的年代不同、不同型菌株间接触机会极少有关。

霍乱毒素除了能引起宿主疾病,其对霍乱弧菌本身在宿主内的存活可能也是一个有利因素^[8]。在小肠环境内,产毒霍乱菌株从效果上讲能得到富集^[18],而在自然环境中,为什么产毒菌株能大量繁殖引起霍乱流行,此时在自然环境中霍乱毒素对霍乱弧菌来说又有什么作用,都还难以解释。无 *ctxAB* 基因而具有 TCP 的霍乱菌株在环境标本中并不被经常能分离到,这种霍乱菌株在自然界中保持较少的数量^[18]。相比较来说 nct-CTX Φ 与 CTX Φ 的区别在于不含 *ctxAB* 基因,可能因此而造成 nct-CTX Φ 在霍乱菌株中并不是广泛存在的。对其进行研究,为阐明 CTX Φ 的发生、不同型菌株间的水平传递以及霍乱病原体的产生、进化具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Lockman H, Kaper J B. *J Biol Chem*, 1983, **258**:13722 ~ 13726.
- [2] Waldor M K, Mekalanos J J. *Science*, 1996, **272**:1910 ~ 1914.
- [3] Mekalanos J J. *Cell*, 1983, **35**:253 ~ 263.
- [4] Goldberg I, Mekalanos J J. *J Bacteriol*, 1986, **165**(3):723 ~ 731.
- [5] Pearson G D N, Woods A, Chiang S L, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:3750 ~ 3754.
- [6] Waldor M K, Rabin E J, Pearson G D N, et al. *Mol Microbiol*, 1997, **24**(5):917 ~ 926.
- [7] Kimsey H H, Waldor M K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:7035 ~ 7039.
- [8] Davis B M, Kimsey H H, Chang W, et al. *J Bacteriol*, 1999, **181**(21):6779 ~ 6789.
- [9] 阚 飙, 祁国明, 刘延清, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, **19**(3):175 ~ 179.
- [10] Genaro M L, Gseenaway P J, Broadbent D A. *Nucleic Acids Res*, 1982, **10**(6):4883 ~ 4890.
- [11] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著(金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [12] Hohn B, Collins J. *Gene*, 1980, **11**(3~4):291 ~ 298.
- [13] Lebens M, Holmgren J. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **117**:197 ~ 202.
- [14] Rubin E J, Lin W, Mekalanos J J, et al. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(6):1247 ~ 1254.
- [15] Lin W, Fullner K J, Clayton R, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **96**(3):1471 ~ 1476.

- [16] Miller V L ,Taylor R K ,Mekalanos J J. *Cell* ,1987 **47** (2) 271 ~ 279.
- [17] Pfau J D ,Taylor R K. *Mol Microbiol* , 1996 **20** (1) 213 ~ 222.
- [18] Faruque S M ,Albert M J ,Mekalanos J J. *Mol Biol Rev* ,1998 **62** (4) :1301 ~ 1314.

Clone and Analysis of CTX Φ Prophage Genome Which not Carrying Toxin Genes of *Vibrio cholerae* *

Kan Biao Liu Yanqing Qi Guoming Zhang Lijuan Gao Shouyi

(The Priority Laboratory of Medical Molecular Bacteriology of Ministry of Health ,Institute of Epidemiology and Microbiology ,Chinese Academy of Preventive Medicine ,Beijing ,102206 ,China)

Abstract : Cholera toxin gene (*ctxAB*) is encoded by the lysogenic bacteriophage CTX Φ of *Vibrio cholerae* ,and can be transferred horizontally from toxigenic strains to non-toxigenic strains. In our study in the *ctxAB*⁻ El Tor strains ,some of different isolation regions and years were found possessing the isogenous sequences of the other genes of CTX Φ . Two copies of this novel *ctxAB*⁻ CTX Φ prophage genome linked tandemly in the chromosomal. The whole genome is 5708 bp in length. Its *rstR* is homologous to the classical-derived CTX^{class} Φ 's ,indicates that classical-derived member of CTX Φ family integrates in the chromosome of El Tor strains. The other genes of nct-CTX Φ are highly homologous to those of CTX Φ 's ,except for *zot* . The end 15 amino acid residues of *Zot* are different obviously from the CTX Φ 's. We have designated this prophage nct-CTX^{class} Φ . TLC element is also in the upstream of nct-CTX^{class} Φ genome ,which is considered to play some role in the biology of CTX Φ , and RTX virulence gene cluster in the downstream ,suggests their close relationship. In view of its genome characters ,it suggests that it has structural basis which does not carry *ctxAB* ,but not the result of the deletion of *ctxAB* from CTX Φ ,nct-CTX Φ should be the precursor of CTX Φ . This may give new proof for the study of the source and divergence of CTX Φ and the emergence of new pathogenic strains of *V. cholerae* .

Key words : *Vibrio cholerae* , Cholera toxin , Lysogenic bacteriophage , Genome

* Supported by Natural Science Fund of China(39870031) and National Basic Research Priorities Programm(G1999054102).