

大肠杆菌 VT 噬菌体受体(*vpr*)基因突变株的鉴定*

严亚贤^{1,2} 孙建和¹ 陆承平² Heather E Allison³

(¹ 上海交通大学农业与生物学院 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)

(³ 英国利物浦大学生物科学院环境与分子微生物系 利物浦 L697ZB)

关键词: VT 噬菌体, *vpr* 基因, 突变, 鉴定

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)06-0745-03

近年来大肠杆菌 O157 引起的人和动物的发病率呈上升趋势^[1-3], O157 的强致病性与很多因子有关, 如粘附因子、肠溶血素(Enterohaemolysin, Ehx)、Vero 毒素(Vero toxin, VTs)等。VT 可致人和动物的腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒综合征、血栓、血球减少性紫癜等疾病^[4], 是 O157 主要的致病因子。大量的研究表明 VT 是由 λ 家族具有 VT 基因的噬菌体(VT-phage)编码的^[5], 且在噬菌体感染宿主菌的裂解状态时由晚期调节基因调控毒素的产生。可见大肠杆菌 O157 所产的 VT 与 VT 噬菌体的感染有关。大肠杆菌表面是否存在噬菌体的受体为众多科学工作者所关注, 1999 年 Saunders 等在大肠杆菌染色体中克隆出一段与 VT2 噬菌体敏感性有关的基因^[6], 将其定名为 *vpr*(verotoxin phage receptor)。为了进一步确定 *vpr* 基因的功能, 本试验利用同源重组的方法, 将已经构建的含 *vpr* 基因片段的重组自杀性质粒 pYY*vpr*, 转化到含全长 *vpr* 基因的大肠杆菌 MC1061 经 PCR 和 southern blot 鉴定, 获得一株染色体同源基因突变株, 并对其进行生物学特性研究, 初步证实该基因与噬菌体的裂解性感染有关。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和探针

大肠杆菌 MC1061(含有全长 *vpr* 基因, 不含 λ *pir* 基因)、VT2 重组噬菌体 C431(VT2 噬菌体自大肠杆菌 O157:H7 分离), 含有氯霉素抗性基因(CM^R), 均由利物浦大学环境与分子微生物系提供。重组自杀性质粒 pYY*vpr*, 含有卡那霉素抗性(Kan^R)基因和 778bp *vpr* 基因片段^[7]。*vpr* 和 Kan^R 的探针自行制备。

1.2 MC1061 基因同源重组突变株的构建

提取自杀性重组质粒 pYY*vpr* DNA 转化 MC1061 感受态细胞^[8], 采用含 50 μ g/mL Kan 的 LB 琼脂平皿 20°C 培养。48 h 内在含 Kan 的 LB 琼脂平皿上生长的菌落可疑为发生同源重组的突变株。

1.3 PCR

将平皿上筛选到的菌落稀释后直接进行 PCR, 分别针对两对引物, 一对为 FOR3(5' TTCTCGGTCCG-TATGG 3') 和 REV2(5' TGCTGGAACCACCGGC 3'), 扩增 1kb *vpr* 基因。另一对为 FOR(5' AAAGCCACGTTGTGTCTC 3') 和 BACK(5' CAGCGTAATGCTCTGCC 3'), 扩增 1kb Kan^R 基因。PCR 结束后进行电泳。

1.4 Southern blot

将 1.3 实验结果为阳性的菌落及亲本 MC 1061 提取染色体 DNA, 取等量的 DNA 经 *Hinc* II 彻底消化后进行常规电泳, 然后按 Boehringer Mannheim 的方法进行转印、杂交、检测和显影。第一次为 *vpr* 探针,

* 上海交通大学首批农科合作基金和国际校际合作交流项目

作者简介: 严亚贤(1966-), 女, 江苏启东人, 上海交通大学农业与生物学院副教授, 在职博士生, 主要从事兽医微生物学与免疫学的研究。

收稿日期: 2001-12-29, 修回日期: 2002-07-08

显影后将转印尼龙膜 37℃ 孵育在碱性探针剥离溶液(0.2mol/L NaOH 0.1% SDS)中 2 次,每次 10min,然后再用 Kan^R 探针进行杂交、检测和显影。

1.5 VT2 噬菌体的感染试验

参照 James 等(2001)的方法测定亲本株 MC1061 和突变株对 VT 噬菌体 C43b 的敏感性^[7]。首先制备含 0.01mol/L CaCl₂ 的 LB 噬菌体缓冲液和含 0.01mol/L CaCl₂、0.4% Difco 琼脂的 LB 顶层琼脂。噬菌体(1 × 10⁷ pfu/mL)作连续的 10 倍稀释,当新鲜培养的细菌 A₆₀₀ 达到 0.6 左右时,分别进行裂解性试验和溶源性感染试验。裂解性试验中取 200μL 的细菌与 1mL 各稀释度的噬菌体进行 37℃ 孵育 30min,然后加入到 6mL 顶层琼脂,混匀后倾注琼脂平皿。亲本株 MC1061 的顶层琼脂中不加任何抗生素,突变株的顶层琼脂中含 50μg/mL 的 Kan。溶源性试验中取 200μL 的细菌与各稀释度的噬菌体进行 37℃ 孵育 2h,取 0.5mL 涂布琼脂平皿,亲本株 MC1061 的琼脂中含 30μg/mL 的 CM,突变株的琼脂中含 50μg/mL Kan 和 30μg/mL 的 CM。感染菌的培养条件为 50% CO₂ 37℃ 过夜,计算细菌感染噬菌体后的噬斑(裂解性试验)和菌落数(溶源性试验)。

2 结果

2.1 MC1061 *vpr* 同源重组突变株的 PCR

将含 Kan 的琼脂平皿上生长的菌落进行 PCR,结果显示有一个菌落既扩增出的 *vpr* 特异性条带,又扩增出 1kb 的 Kan^R 基因的特异性条带。将该突变株定名为 MC1061Δ*vpr*。

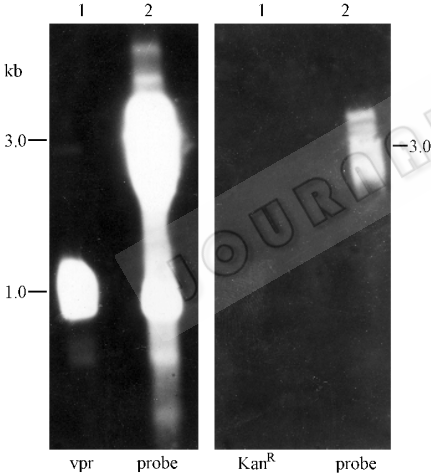


图 1 两种探针 *vpr* 和 Kan^R 对 MC1061 和突变株 MC1061Δ*vpr* 的染色体 DNA 的 Southern blot

blot

1. MC1061 2. Mutant MC 1061Δ*vpr*.

2.2 Southern blot

Southern blot 表明 MC1061 Δ*vpr* 与亲本 MC1061 的染色体 DNA 发生了变化(图 1),亲本株经 *vpr* 探针检测只显示一条 1kb 的主带,而 MC1061Δ*vpr* 除了具有与亲本相同的条带外,在 3.0kb 处还有一条主带。Kan^R 探针检测出突变株 MC1061Δ*vpr* 在 3.0kb 处显示一条主带,而亲本株 MC1061 无特异性条带出现。

2.3 VT2 噬菌体的感染

在噬菌体裂解性试验中,亲本 MC1061 感染 VT 噬菌体 C43b 后过夜培养,在上层琼脂中形成大量的形态较小的噬菌斑,而 MC 1061Δ*vpr* 不再对该噬菌体敏感,无噬菌斑。但在噬菌体溶源性试验中,MC1061 与 MC 1061Δ*vpr* 之间无显著差别,在琼脂平皿上均有大量的菌落。

3 讨论

实验将自行构建的自杀性重组质粒 DNA 转化亲本株感受态细胞,该自杀性质粒含有 Kan^R 基因和 778bp *vpr* 基因片段,且只能在含有 λ*pir* 基因的菌株中复制,由于亲本株不含 Kan^R 基因和 λ*pir* 基因,因此在理论上转化后能在含 Kan 的 LB 琼脂平皿上生长的菌落就是发生染色体重组的突变株。为了对突变株进行鉴定,采用了 PCR 扩增获得了一个突变株既含有 *vpr* 基因又含有 Kan^R 基因,即 MC 1061Δ*vpr*,Southern blot 进一步证实该突变株的 *vpr* 基因发生了突变,确定了 MC 1061Δ*vpr* 为 *vpr* 基因的同源突变株。

噬菌体感染宿主菌后有两种表现形式,一种为裂解性(lysis),另一种是溶源性(lysogens)。VT 噬菌体属于 λ 家属的噬菌体,在一定条件下可表现为裂解性或溶源性^[9]。本试验中 VT2 噬菌体敏感性试验结果表明,裂解性试验中突变株 MC1061Δ*vpr* 不再对 VT2 噬菌体敏感,但溶源性试验中空变株与亲本株敏

感性无差异。因此可以推论 *vpr* 基因与 VT2 噬菌体的裂解性感感的敏感性有关,可能是编码 VT2 噬菌体受体蛋白的基因,而 Watarai 等早在 1998 年报道了大肠杆菌表面存在噬菌体受体^[10]。同时实验的结果也提示噬菌体的裂解和溶源可能有两个不同的路径。关于突变株所表达的蛋白特性及突变株 *vpr* 基因恢复株的研究正在进行。

参 考 文 献

- [1] Law D. *J Appl Microbiol* ,2000 ,**88** :729 ~ 745.
- [2] Porter P ,Mobbs K ,Hart C A , et al . *J Appl Microbiol* ,1997 **83** :297 ~ 306.
- [3] 顾宝柯,王春宴,李生,等. 疾病监测,2000,15(6):219~210.
- [4] Keusch G. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* ,1998 **51** :5 ~ 22.
- [5] Saunders ,J R ,Allison ,H E ,James ,C E , et al . *J Chem Tech Biotech* ,2001 **76** :1 ~ 5.
- [6] Saunders J R ,Sergeant M ,McCarthy A J , et al . Genetics and Molecular Ecology of *Escherichia coli* O157. In Stewart C S , Flint H J .ed. *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. London :CAB International ,1999.1 ~ 25.
- [7] 严亚贤,陆承平. 上海交通大学学报(农业科学版)2002,20(2):85~89.
- [8] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 2nd ed. New York :Cold Spring Harbour Laboratory ,1989.19 ~ 680.
- [9] James ,C E ,Stanley K N ,Allison H E , et al . *Appl Environ Micro* ,2001 **67** :4335 ~ 4337.
- [10] Watarai M ,Sato T ,Kobayashi M , et al . *Infect Immun* ,1998 ,**66** :4100 ~ 4107.

Identification of a *E. coli* VT Phage Receptor (*vpr*) Gene Mutant Strain^{*}

Yan Yaxian^{1,2} Sun Jianhe¹ Lu Chengping² Heather E Allison³

(¹ College of Agriculture , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 201101 ,China)

(² Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic & Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjiang 210095 , China)

(³ School of Biological Sciences ,Environmental and Molecular Microbiology Group , University of Liverpool , Liverpool , L69 7ZB UK)

Abstract : The recombinant suicide plasmid pYY*vpr* contained a Kan resistant cassette and a 778bp internal piece of the *vpr* gene. It was transformed into the wild type *E. coli* strain ,MC 1061 ,which possessed the full-length *vpr* gene and did not contain the λ_{pir} gene. The recombinant suicide plasmid could not replicate in MC 1061. Colonies grew on the plates of Kan were analysed by PCR and Southern blot with two different Dig-probes ,*vpr* and *Kan^R* probes. One colony was detected *vpr* and *Kan^R* gene by PCR and Southern blot showed the mutant had the different *vpr* map with the wild type. The isogenic knockout mutant , named MC1061 Δvpr ,was confirmed. The mutant supported lysogenic infection of VT2 recombinant phage ,but did not support lytic infection. All results showed that the *vpr* gene should be related to the lytic infection of VT2 phage.

Key words : VT phage ,*vpr* gene mutant , Identification

^{*} Project Granted by Agricultural Collaboration Foundation of Shanghai Jiao Tong University.