

猪水肿病大肠杆菌志贺样毒素 II 型突变体新基因的分子特征

冉雪琴¹ 王红珍² 艾 虎² 吴拥军² 王嘉福^{2*}

(¹ 贵州大学动物科学学院 贵阳 550025)

(² 贵州大学生物与环境科学学院 农业生物工程省级重点实验室 贵阳 550025)

摘 要 从仔猪水肿病样品中分离的一株大肠杆菌菌株 NP9621, 抽提染色体 DNA, 构建 NP9621 的总 DNA 文库, 经菌落原位杂交筛选、限制酶酶切和 Southern 印迹等分析, 获得含有志贺样毒素基因的重组质粒, 核苷酸序列分析表明, 该基因的 A 亚基与 SLT-IIes 的同源性为 97.6% ~ 98.1%, 与 SLT-IIc、SLT-IIId 及 EHEC O157:H7 产生的 SLT-II 的 A 亚基之间的同源性分别为 93.1%、93.0% 和 92.9% ; B 亚基与 SLT-IIes 的同源性为 99.62% ~ 100%, 与 SLT-IIc、SLT-IIId 及 SLT-II 的同源性分别为 81.5%、81.1% 和 81.5% ; 与 29 种已知序列的 SLT-II、SLT-I 及志贺毒素 STX 进行聚类分析, 结果证实大肠杆菌 NP9621 菌株中的志贺样毒素基因属于一种新的 SLT-IIe 亚型。SLT-IIe/NP9621 的 A 亚基与其它 SLT-IIe 之间存在 7 ~ 9 个氨基酸的差异, B 亚基的氨基酸序列完全相同, 与 A 亚基毒力活性密切相关的氨基酸分别为 Thr4、Glu167、Arg170 和 Arg176。

关键词 大肠杆菌, 猪水肿病, 志贺样毒素突变体基因

中图分类号 S852.61 文献标识码 A 文章编号 0001-6209 (2004) 02-0167-05

肠出血性大肠杆菌 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 可导致人及动物出血性腹泻, 出血性尿毒综合症以及猪的水肿病等, 曾在美国、日本等地多次爆发流行^[1]。EHEC 致病的原因是产生志贺样毒素 (Shiga-like toxins, SLTs), SLTs 由 A、B 亚基组成, A 亚基具有 N-糖苷酶活性, 特异性地攻击真核生物核糖体大亚基 28S rRNA, 使其 4324 位的腺嘌呤脱落, 阻止氨酰 tRNA 与核糖体 RNA 结合, 使多肽链的延伸不能继续^[2] ; B 亚基与细胞表面的受体三糖基神经酰胺糖酯 (Glycolipid globotriaosyl ceramide, Gb3) 或四糖基神经酰胺糖酯 (Glycolipid globotetraosyl ceramide, Gb4) 结合, 介导 A 亚基进入核糖体^[3]。志贺样毒素包括 SLT-I、SLT-II 及其突变体, SLT-I 可以被抗志贺毒素抗血清中和, 而 SLT-II 不能^[4]。SLT-II 的突变体有 SLT-IIe、SLT-IIId、SLT-IIc 几种类型^[5], 其中 SLT-IIe 又叫猪水肿病毒素, 与 SLT-II 的基因序列有 91% 的同源性^[6], 与 Gb4 受体的结合能力较强, 仅对 Vero 细胞有毒性 ; SLT-I、SLT-II 主要与 Gb3 受体结合, 对 Hela 和 Vero 细胞都有毒性^[4]。猪结肠、小脑、眼睑等处有丰富的 Gb4 受体分布^[4,7], SLT-IIe 致使仔猪产生眼睑水肿、出血性结肠炎、共

济失调等运动障碍, 病畜发病急、病程短, 死亡率高, 造成养猪业的重大经济损失^[8]。本文从猪水肿病的腹泻粪便中分离到产 SLT-IIe 菌株, 克隆了 SLT-IIe 基因, 并对基因的结构特征进行了分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 NP9621, 从本地仔猪水肿病腹泻粪便中分离^[9] ; 大肠杆菌 DH5 α 为本室保藏菌种。大肠杆菌 O157:H7 由北京流行病研究所提供。质粒 pBluescript-SK 为克隆载体。

1.2 主要试剂

质粒 DNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒为 Omega 产品 ; Ex Taq Polymerase、Kpn I、EcoR I、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa (Japan) 产品 ; 硝酸纤维素膜购自 PALL 公司 (USA) ; 地高辛标记与检测试剂盒为 Roche Applied Science (Germany) 公司产品 ; 测序试剂盒为 PE 公司产品 (USA), 寡核苷酸引物 P1: 5'-CCATGACAACGGACAGCACT-3', P2: 5'-CGTAAGGCT-TCGGCTGTGAC-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

基金项目 教育部优秀骨干教师基金 (9502000D-43) 贵州省优秀人才专项基金 (黔科合人字 20020203) 贵州省科学基金

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-851-3856374 ; E-mail: jiaff@hotmail.com

作者简介 冉雪琴 (1967 -), 女, 重庆人, 副教授, 博士, 研究方向为基因表达与调控。E-mail: ranxq@hotmail.com

收稿日期 2003-06-30, 修回日期 2003-10-21

1.3 DNA 探针的制备

以大肠杆菌 O157:H7 DNA 为模板,寡核苷酸 P1、P2 为引物,经 PCR 扩增得到 190bp 的 PCR 产物,位于 SLT-II 结构基因的 386 ~ 576 核苷酸区段,2% 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收试剂盒回收 190bp DNA 带,参照地高辛标记试剂盒说明程序通过随机引物标记法制备 190bp DNA 探针。

1.4 基因的操作

PCR 扩增、DNA 片段的酶切、连接、转化、菌落原位杂交和免疫印迹等参照《分子克隆实验指南》^[10],质粒的提取、DNA 片段的回收参照试剂盒说明程序进行。

1.5 DNA 序列测定

参照试剂盒说明程序,以四色荧光标记的 dNTP,M13 测序通用引物 P47 和 P48,双脱氧末端终止法,使用 PE 公司 Applied Biosystem Model 377 全自动 DNA 测序仪测定 DNA 序列。

2 结果

2.1 SLT-IIe/NP9621 基因的克隆

大肠杆菌 NP9621 总 DNA 经限制性内切酶 *Eco*R I 切割后,与载体 pBluescript-SK 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,建立 NP9621 总 DNA 文库。以地高辛标记的 190bp DNA 为探针,经菌落原位杂交筛选,从 NP9621 的总 DNA 文库中得到 2 个阳性克隆,经菌落 PCR 分析,阳性克隆可扩增出 190bp 片段。将其中一个质粒命名为 pED22,经 *Eco*R I 酶切,得到一条 6.5kb 的大片段和约 3kb 的载体片段;*Kpn* I 酶切,得到 3 个片段,分别为 1.48、3.8、4.22 kb,经 Southern 印迹分析,地高辛标记的 190bp DNA 探针可与 6.5kb 和 1.48kb 片段杂交产生阳性信号(图 1),表明这两个片段含有目的基因,胶回收 *Kpn* I 酶切的 1.48kb

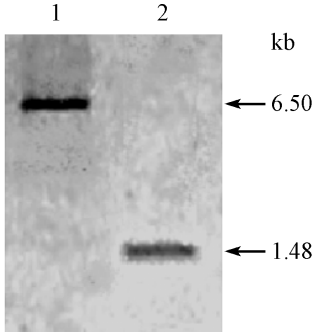


图 1 重组质粒 pED22 酶切后的 Southern 印迹分析

Fig.1 Southern blot of the restriction endonuclease analysis of the plasmid pED22
1. pED22/*Eco*R I ; 2. pED22/*Kpn* I .

DNA 片段,亚克隆到 pBluescript-SK 的 *Kpn* I 位点,转化大肠杆菌 DH5 α ,获得亚克隆质粒 pEK36。

2.2 DNA 序列测定

用通用测序引物 P47 和 P48 测定 pEK36 插入片段的正向和反向核苷酸序列,根据测定的 DNA 序列合成引物,测定其余部分序列,每一测序反应重复两次。测序结果表明,插入片段含有 SLT-II 的全基因序列(AY332411 [gi 33391899], GenBank, NCBI),在 A 亚基起始码 ATG 上游-10 区有核糖体结合位点 AGGA,A 亚基基因序列长 960bp,编码 319 个氨基酸,推导氨基酸序列中 N 端的前 22 个氨基酸为信号肽序列,成熟肽含 297 个氨基酸残基;B 亚基基因的

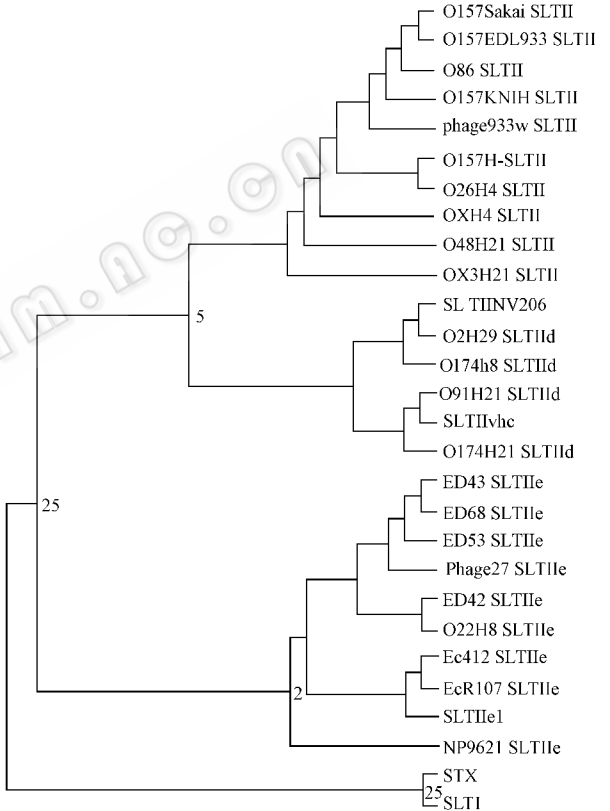


图 2 志贺样毒素 SLT-IIe/NP9621 核苷酸序列的聚类分析

Fig.2 The phylogenetic comparative analysis of the nucleotide sequence homology of SLT-IIe/NP9621 .
The software of Megalign in DNASTar was used to calculate the similarity with Clustal W method. The sequence number in GenBank was as follow : O86 SLTII : gi 12082286 ; O157Sakai SLTII : gi 7649819 ; O157KNIH SLTII : gi 5738238 ; Phage933W SLTII : gi 4499783 ; O157EDL933 SLTII : gi 12514307 ; O157H-SLTII : gi 23320676 ; O26H4 SLTII : gi 21636535 ; OXH4 SLTII : gi 21636529 ; O48H21 SLTII : gi 550333 ; OX3H21 SLTII : gi 304954 ; O91H21 SLTIIId : gi 22001108 ; SLTIIvhe : gi 42968 ; O174H8 SLTIIId : gi 25992106 ; SLTIINV206 : gi 14549665 ; O2H29 SLTIIId : gi 25992118 ; O174H21 SLTIIId : gi 25992113 ; ED43 SLTIIe : gi 1370080 ; ED68 SLTIIe : gi 1370086 ; ED53 SLTIIe : gi 1370083 ; Phage27 SLTIIe : gi 18152356 ; ED42 SLTIIe : gi 1370077 ; O22H8 SLTIIe : gi 15139859 ; Ec412 SLTIIe : gi 147827 ; EcR107 SLTIIe : gi 1669862 ; SLTIIe1 : gi 505044 ; NP9621 SLTIIe : this study ; SLT1 : gi 534988 ; STX : gi 4454334 .

核糖体结合位点 AGGA 紧随 A 亚基终止码 TGA 之后, B 亚基基因的起始码 ATG 与 A 亚基基因的终止码之间仅相隔 12 个碱基, B 亚基基因全长 264bp, 编码 87 个氨基酸, N 端的前 19 个氨基酸为信号肽, 成熟肽由 68 个氨基酸残基组成。

2.3 SLT-IIe/NP9621 基因的同源性分析

应用 NCBI 上的 Blast 软件搜索 GenBank 数据库,得到 9 个 SLT-IIe 核苷酸序列,其中一个为人源大肠杆菌噬菌体 Phage27 (gi 18152356),一个为兔源大肠杆菌 EcR107 (gi 1669862),其余 7 个来源于猪。SLT-IIe/NP9621 的核苷酸序列与这 9 个 SLT-IIe 基因的同源性分别为, A 亚基:97.6 ~ 98.1%, B 亚基:99.62 ~ 100%。

应用 DNASTAR 中的 Megalign 软件对 SLT-IIe/

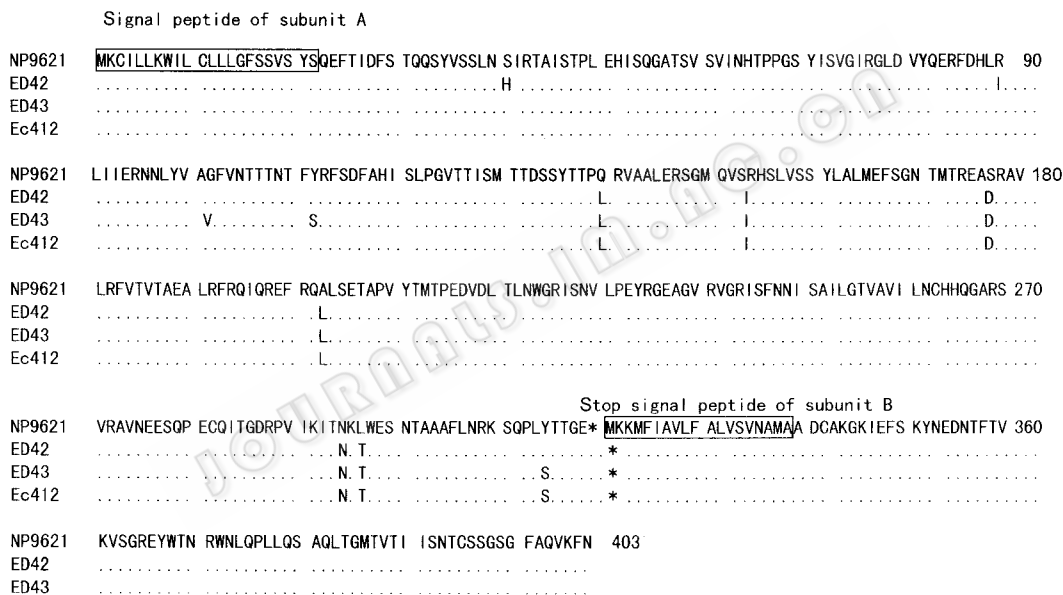


图3 SLT-IIe/NP9621 基因的推导氨基酸序列的同源性分析

Fig.3 The amino acid sequence of SLT-IIe/NP9621 compared with the other SLT-IIes

3 讨论

产 SLT-IIe 大肠杆菌主要感染仔猪,但产生 SLT-IIe 的 SLTEC 菌株 O101 从人和猪中均分离得到^[1],表明猪源的 SLT-IIe 也可感染人,并与人类 SLT 病有关。本文从仔猪水肿病腹泻粪样中分离的菌株 NP9621 中克隆了 SLT-IIe 毒素基因,序列分析表明,SLT-IIe/NP9621 属于 SLT-IIe 类群中一个新的亚型。

真核细胞内,内质网中的弗林蛋白酶(Furin)可识别 SLT A 亚基二硫桥附近的胰蛋白酶敏感位点 Arg-X-Arg/Lys-Arg,并将 SLT 的 A 亚基切割为 A1 和 A2 两部分,A1 为酶活性中心部分,A2 为 A 亚基与 B 亚基组装的结合部位,切割后的 A1 酶活性大

NP9621 的核苷酸序列和数据库中 29 种志贺毒素、志贺毒素的核苷酸序列进行聚类分析,得到毒素基因的系统进化树(图 2)。30 个核苷酸序列可分为四个类群,SLT-II 为第一类群,SLT-II 的突变体 SLT-IIe、SLT-IINV206、SLT-IIId 等为第二类群,所有已知的 SLT-IIe 为第三类群,SLT-I 和志贺毒素 STX 为第四类群。SLT-IIe/NP9621 基因属于 SLT-IIe 类群,但与其它已知的 SLT-IIe 之间存在一定的差异。

SLT-IIe/NP9621 基因的推导氨基酸序列与已知的 9 个 SLT-IIe 多肽序列相比, A 亚基存在 7 ~ 9 个氨基酸的差异, B 亚基完全相同, 将其中 3 个具有代表性的比较结果列于图 3。结果表明 SLT-IIe/NP9621 的氨基酸序列与其它 SLT-IIes 不完全相同, 属于一种新的 SLT-IIe 亚型。

增^[5]。本文克隆的 SLT-IIe/NP9621 的 A 亚基成熟肽中(图 3), 两个保守性 Cys 分别位于 241 和 260 位, 弗林蛋白酶的特异性识别序列位于两个 Cys 之间, 其氨基酸序列为 Arg247-Ser-Val-Arg250, 第三位氨基酸不是碱性氨基酸 Arg/Lys, 而是疏水的非极性氨基酸 Val, 故 SLT-IIe/NP9621 中 A 亚基的切割可能不是由内质网中的弗林蛋白酶(Furin)承担, 而是需要胞质中的蛋白酶才能完成。

对 SLT-II A 亚基氨基酸进行位点突变,发现特定部位的氨基酸突变会影响 A 亚基的酶活性。将 SLT-II A 亚基成熟肽的氨基酸从 Thr4 突变为 Met4 可使其口服毒性明显增强^[12],将 SLT-IIe 中 Glu167 和 Arg170 分别突变为 Asp167 和 Lys170,酶活力分

别下降 400 和 500 倍^[13]; Arg176 突变为 Gly176 使口服毒性明显下降^[14]。在 SLT-IIe/ NP9621 中分别为 Thr4、Glu167、Arg170、Arg176, 大部分为强毒活性的保守型氨基酸, 这与本实验室测定的 SLT-IIe/ NP9621 能引起 Vero 细胞产生明显病变的结果^[9]相一致。

Melton-Celsa 等^[15]的研究表明, 兔或人小肠粘膜可激活 SLT 毒素, 使 SLT 毒素的毒性增强, Ser291 和 Glu297 与这种激活作用有关。在 SLT-IIe/ NP9621 中, Glu297 是保守的, 但 Ser291 被 Pro291 代替, 这一改变可能会影响肠粘膜对 SLT-IIe/ NP9621 毒素的激活能力。这一现象在 ED42 (Gi 1370077)、ED68 (Gi 1370086)、ED53 (Gi 1370083)、O22 :H8 (Gi 15139859) 中也存在, 这些毒素可能属于另一种类型。在 SLT-IIe 中存在两种类型, 一种是 Pro291/Glu 297, 一种是 Ser291/Glu 297, SLT-IIe/ NP9621 属于前者, 在其它的 SLT-II, SLT-IIc, SLT-IId 中, SLT-II/O157 :H7、SLT-II/OX3 :H21、SLT-II/O48 :H21 等强毒毒素中为 Phe291/Lys297, 而 SLT-IId, SLT-II/O2 :H29, SLT-II/O174 :H21, SLT-II/vhc, SLT-IINV206 等较强毒素属于保守的 Ser291/ Glu 297 类型。

SLT-IIe 主要与靶细胞上的受体 Gb4 结合, 来自人和牛的 SLT-II 主要与 Gb3 受体结合。B 亚基的 64、66 位氨基酸与 Gb3/Gb4 的结合力有关^[16], 包括 SLT-IIe/ NP9621 在内的 SLT-IIe 均为 Gln64-X-Lys66, 与 Gb4 的结合能力强, SLT-I, Stx、SLT-IIc, SLT-IId 和 SLT-II/O157 :H7 均为 Glu64-X-Gln66, 与 Gb3 的结合能力强。对 SLT-IIe B 亚基基因进行位点突变可改变 SLT-IIe 与靶位点的结合, 将 SLT-IIe 上的 Gln64 突变为 Glu64, Lys66 突变为 Gln66, 可使 SLT-IIe 与 Gb3 结合, 而不是 Gb4, 并能产生相应的病变组织部位的改变, 引起更为严重的中枢神经微血管和消化道病变^[7]。

综上所述, 本文自贵州省致猪水肿病大肠杆菌 NP9621 染色体中克隆的毒素基因 SLT-IIe 属于一种新的 SLT-IIe 亚型, 其毒素通过受体 Gb4, 导致断奶仔猪出现水肿病。

参 考 文 献

- [1] Qadri S M, Kayali S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, a dangerous food-borne pathogen. *Postgrad Med*, 1998, **103** : 179 – 180.
- [2] Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, *et al.* Site of action of verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157 :H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Bio-*

chem, 1988, **171** : 45 – 50.

- [3] Lingwood C A. Verotoxins and their glycolipid receptors. *Adv Lipid Res*, 1993, **25** : 189 – 211.
- [4] De Grandis S, Law H, Brunton J, *et al.* Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem*, 1989, **264** : 12520 – 12525.
- [5] O'Loughlin E V, Robins-Browne R M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes and Infection*, 2001, **3** : 493 – 507.
- [6] Gyles C L, De Grandis S A, MacKenzie C, *et al.* Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microbiol Pathogen*, 1988, **5** : 419 – 426.
- [7] Boyd B, Tyrrell G, Maloney M, *et al.* Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *J Exp Med*, 1993, **177** : 1745 – 1753.
- [8] Schmitt C K, McKee M L, O'Brien A D. Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157 :H-strain E32511. *Infect Immun*, 1991, **59** : 1065 – 1073.
- [9] 王嘉福, 冉雪琴, 吴拥军, 等. 贵州猪、牛志贺样毒素大肠杆菌的检出与鉴定. *畜牧兽医学报*, 2000, **31** (5) : 448 – 452.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 科学出版社, 第二版, 1992.
- [11] Franke S, Hammsen D, Caprioli A, *et al.* Clonal relatedness of Shiga-Like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J Clin Microbiol*, 1995, **33** (12) : 3174 – 3178.
- [12] Paton A W, Manning P A, Paton J C, *et al.* Increased oral virulence of *Escherichia coli* expressing a variant Shiga-like toxin type II operon is associated with both A subunit residues Met4 and Gly102. *Microb Pathog*, 1995 a, **19** : 185 – 191.
- [13] Makinoa S I, Watarai M, Tabuchia H, *et al.* Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. *Microb Pathog*, 2001, **31** : 1 – 8.
- [14] Paton A W, Bourne A J, Manning P A, *et al.* Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect Immun*, 1995b, **63** : 2450 – 2458.
- [15] Melton-Celsa A R, Darnell S C, O'Brien A D, *et al.* Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91 :H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun*, 1996, **64** : 1569 – 1576.
- [16] Ling H, Pannu N S, Boodhoo A, *et al.* A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3 : structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. *Structure*, 2000, **8** (3) : 253 – 264.

Characteristics of A Novel Shiga-like Toxin II Variant Gene in
Escherichia coli from Swine With Edema Disease

RAN Xue-Qin¹ WANG Hong-Zhen² AI Hu² WU Yong-Jun² WANG Jia-Fu^{2*}

(¹ College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

(² Key Laboratory for Agricultural Biotechnology of Guizhou, College of Biology and Environment Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract : *E. coli* strain NP9621 was isolated from the feces of a swine with edema disease in Guizhou province. The fragment containing the Shiga-like toxin gene in NP9621 was cloned from the genome DNA library of NP9621. The recombinant plasmid pEK36 was subjected to nucleotide sequence analysis. It contained the whole genes of Shiga-like toxin II in the plasmid pEK36. The subunit A gene of SLTII in NP9621 presented 97.6 – 98.1% identity of nucleotide sequence with the published SLT-Ile A and its identity of nucleotide sequences with SLT-Ile, SLT-IId and SLT-II/O157:H7 was only about 93% or so. The subunit B gene of SLTII of NP9621 showed a single nucleotide difference from the nucleotide sequence of the published SLT-Ile B at position 187 but revealed 81% identity with subunit B genes of SLT-Ile, SLT-IId or SLT-II from the *E. coli* O157:H7. The phylogenetic analysis of the nucleotide sequence homology of Shiga-like toxin from NP9621 compared with 29 those of SLT-II, SLT-I and Shiga toxin genes showed that the Shiga-like toxin from NP9621 belonged to the group of SLT-Iles. Therefore the Shiga-like toxin from NP9621 was designated SLT-Ile/NP9621. The deduced amino acid sequence of the subunit B of SLT-Ile/NP9621 was completely identical to those of SLT-Iles submitted in the Genbank. There were seven to nine amino acids different from the other SLT-Iles in subunit A. The amino acids of Glu167, Arg170 and Arg176 were conserved in the subunit A of the SLT-Ile/NP9621, which were crucial to the catalytic activity of the subunit A. The threonine at position 4 in the amino acid sequence of the SLT-Ile/NP9621 might result in the virulence of the SLT-Ile/NP9621 less than the toxins contained Met4. In conclusion, SLT-Ile/NP9621 cloned from the chromosome of *E. coli* was a novel gene type of SLT-Ile that resulted in edema disease of Guizhou province.

Key words : *Escherichia coli*, Edema disease, Shiga-like toxin Ile

Foundation item : The Program for the Outstanding Teachers by the Ministry of Education of China (9502000D-43) ; Special Project for Excellent Young Scientists in Guizhou Province (No 20020203) ; The Nature Science Foundation of Guizhou Province

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-851-3865862 ; E-mail : jiaff@hotmail.com

Received date : 06-30-2003

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期,我刊一些综述类来稿存在一些问题,主要表现为篇幅庞大,罗列文献,内容空泛,缺乏观点。为使此栏目更加新颖并更具可读性,特提出几点说明,欢迎大家根据要求,踊跃投稿,并提出你们对该栏目的建议和想法。

1. 本刊主要刊登微型综述(Mini review),来稿字数最好控制在 5000 字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在 40 篇以内,近 3 年发表的文献不少于 10 篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 欢迎投送‘能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义’的述评类文章。