

产 Shiga 毒素噬菌体 ϕ 297 在大肠杆菌 K 12 染色体上整合位点的定位研究

曹奇志¹ 翟 静² 常维山^{3*}

(¹滨州医学院免疫微生物学教研室 滨州 256603) (²泰山医学院生物化学教研室 泰安 271000)

(³山东农业大学动物科技学院预防兽医学系 泰安 271018)

摘 要 鉴定大肠杆菌 O157 产生 Shiga 毒素 (Stx) 的噬菌体 ϕ 297 在大肠杆菌 K12 染色体上的插入位点。采用加接头 PCR 方法与噬菌体 933W 的整合酶基因 *int* 同源的核苷酸开始向未知区域进行步移测序,寻找目的基因。将获得的 DNA 序列与核苷酸数据库进行比较,确定了细菌性噬菌体 ϕ 297 的 *attL*、*attR* 和中心序列位于大肠杆菌 K12 的 *yecE* 基因内。噬菌体 ϕ 297 在宿主细胞 *E. coli* K12 染色体上的整合位点是 *yecE* 基因。

关键词 噬菌体 ϕ 297, 埃希氏大肠杆菌 K12, 特殊位点重组, Shiga 毒素

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2004) 05-0605-04

肠道出血性埃希氏大肠杆菌 (EHEC) 菌株 (如 O157) 是导致出血性腹泻和腹部绞痛的主要菌株。产生一种或多种 Shiga 毒素 (Stx) 是 EHEC 菌株的主要特征。这些毒素是由 λ 家族的溶源性细菌噬菌体编码的^[1-3]。这些 λ 噬菌体以特殊位点重组方式插入埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 染色体的不同位置。 λ 噬菌体与大肠杆菌 (*E. coli*) 染色体的重组位点叫附着位点 (Attachment sites, att)。在细菌染色体上的附着位点为 *attB*, 在噬菌体 DNA 上的附着位点为 *attP*, 插入细菌染色体的前噬菌体有两个边界位点, 分别叫做左边界 (*attL*) 和右边界 (*attR*)。 λ 噬菌体要求 *attB* 的长度是 21bp, 细菌要求 *attP* 的长度是 240bp, *attB* 和 *attP* 之间重组时, 需寻找一段同源的 DNA 序列, 这一段共有的序列叫中心序列^[4]。

本研究从比利时布鲁塞尔自由大学分子生物学与免疫学研究所病毒遗传学实验室已部分测序的噬菌体 ϕ 297 的一个 40 个核苷酸序列开始, 这段序列几乎与噬菌体 933W^[5] 的 *int* 基因是相同的, 我们根据这一序列设计了 PCR 引物, 并用加接头 PCR (Siebert PCR) 方法^[6] 在含有噬菌体 ϕ 297 的大肠杆菌 K12 株的 K514 的染色体 DNA 分子步移扩增其旁侧的未知序列, 从而确定了噬菌体 ϕ 297 的整合位点。

1 材料和方法

1.1 菌株

本研究使用的菌株为比利时布鲁塞尔自由大学

病毒遗传室保留的菌种 (表 1)。

表 1 本研究使用的菌种

Table 1 Overview of the used bacterial strains

Bacterial strain	Prophage	Origin
<i>E. coli</i> O157:H7 EH297	ϕ 297	AZ-VUB, clinical isolate
<i>E. coli</i> O157:H7 EH330	ϕ 330	AZ-VUB, clinical isolate
<i>E. coli</i> K514 (ϕ 297)	ϕ 297	H. De Greve, unpublished
<i>E. coli</i> C600 (933W)	933W	O'Brien <i>et al.</i> (1984) ^[7]
<i>E. coli</i> K514		Colson <i>et al.</i> (1965) ^[8]
<i>E. coli</i> DH5 α		Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> K514 (ϕ 345)	ϕ 345	H. De Greve, unpublished

1.2 试剂

The Sureclone Ligation Kit 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。DNA Blunting 和 Ligation Kit 购自 Fermentas Life Science 公司。QIAprep Spin Miniprep Kit 购自 Qiagen Life Science 公司。

1.3 培养基和细菌培养

埃希氏大肠杆菌 K514 (ϕ 297)、K514 (ϕ 345)、K514 和 DH5 α 在 LB 培养基中 37℃ 培养过夜。筛选的 *E. coli* K514 转化株培养在加有羧苄青霉素 (Cb, 100 μ g/mL)、X-Gal (40 μ g/mL) 和 IPTG (0.4 mol/L) 的 LB 培养基上。

1.4 Siebert PCR 方法

提取 K514 (ϕ 297) 菌株染色体 DNA, 分别用限制性内切酶 *Dra* I、*Ssp* I、*Eco*RV 和 *Hpa* I 消化染色体 DNA, 再将一个特殊接头连接到 DNA 片段末端^[6]。用少量已加接头的 DNA 作为模板, 用接头引

* 通讯作者。Tel: 86-538-8249169 E-mail: wschang@sdau.edu.cn

作者简介 曹奇志 (1970-), 女, 山东滨州人, 讲师, 2001 年获得比利时布鲁塞尔自由大学分子生物学硕士学位, 主要从事分子生物学和免疫学方面的研究。E-mail: qizhicao@hotmail.com

收稿日期 2004-02-12, 修回日期 2004-05-08

物 Oli112(API)和引物 297P1 进行 PCR,扩增可能含有右边界的 DNA 片段。根据已得到的右边界位于 *yecE* 基因的结果,用限制性内切酶 *Ssp* I 消化染色体 DNA,用引物 EC10 及接头引物 Oli112 进行 PCR,然后用 *yecE* 的特殊引物 EC12 和接头引物 Oli113 进行巢式 PCR,扩增含有左边界的 DNA 片段。

1.4.1 基因组 DNA 酶切和提取:核酸酶(*Dra* I, *Ssp* I, *Eco*RV, *Hpa* I)消化 K514(ϕ 297)染色体 DNA 2~4h,每 μ L 染色体 DNA 加入 3~5U 酶。150mmol/L 的 NaCl 和 2 倍体积的 100% 乙醇在 20℃ 过夜沉淀 DNA。16000r/min 离心 10min,用冰冷的 70% 乙醇洗涤一次,再次离心 10min,干燥并溶解 DNA。

1.4.2 DNA 人工接头连接:10 μ L DNA 与 10 μ L 连接酶混合物(2 μ L 10 $\times$ Siebert Buffer,1 μ L Adaptor,1 μ L of T4 DNA Ligase,6 μ L H₂O)在 16℃ 过夜。接头的一端是平端,可与限制性内切酶产生的任何 DNA 片段的任何一端相连。人工接头序列如下:

Adaptor:5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCC-GCCGCCCCGGGCAGGT-3'
3'-H2N-CCCCGTCCA-5'

1.4.3 PCR 方法:PCR 条件为 94℃ 50s;94℃ 10s,55℃ 30s,68℃ 1min/1kb,10 个循环;10 个循环以后,每增加一个循环,延伸时间延长 15s;72℃ 10min,4℃ 储存。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。PCR 所用引物见表 2。

表 2 PCR 引物序列		
Table 2 Overview of the used primers		
Primers	Sequence(5'-3')	Reference
297P1	GGAAGATTCTACTGTTTATAGGAAAGAT	AF125520(954-927)
297P3	GACTGGAGGGAAATTAG	AJ431361(1069-1052)
297P4	GCAACAAAAAGGCAATCT	AJ431361(1050-1032)
Oli112	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	API
Oli113	AATAGGGCTCGAGCGGC	AP2
EC10	GCCAGCGCCGAGCAGCACAATA	AE000280(9725-9746)
EC11	GGCAGGCAGTTGCAGCCAGTAT	AE000280(10125-10104)
EC12	CCCGTGTGCCTAGCGTGAAGA	AE000280(9777-9798)
EC13	GCGAAATGTCGCGCGAAACTTAA	AE000280(10022-9998)
AE000280: <i>E. coli</i> K-12 MG1655 section 170 of 400 of the complete genome. AF125520: Bacteriophage 933W complete genome.		

1.5 PCR 产物的克隆和序列分析

用 Sureclone Ligation Kit 将 PCR 扩增的 DNA 片段克隆到 pUC18 中,并转染质粒至 *E. coli* K514 或 DH5 α 感受态细胞,再通过 X-Gal 筛选细菌克隆,用限制性核酸内切酶消化筛选重组克隆,再通过 PCR 进一步筛选细菌克隆。用全自动 DNA 测序仪测序,

并用 Sequence Analysis Software Package 对核苷酸序列进行同源性分析。

2 结果和分析

2.1 ϕ 297 *int* 基因相邻的 DNA 片段的克隆

用限制性内切核酸酶 *Ssp* I 消化 *E. coli* K514(ϕ 297)菌株染色体 DNA,并将特殊接头连接到消化产物的钝端,以 Oli112 和 297P1 为引物 PCR 扩增得到 2 kb 的 DNA 片段(图 1)。用 QIAquick PCR Purification Kit 对 PCR 产物进行纯化,然后克隆至 pUC18 的 *Sma*I 位点,并转染至 *E. coli* K514 感受态细胞。

用引物 Oli112 和 297P1 通过 PCR 分析了 30 个克隆,用 QIAprep Spin Miniprep Kit 提取、纯化出含有插入目的基因的 5 个克隆的质粒 DNA,再通过限制性酶切分析,确定 pEHEC348 和 pEHEC349 两个质粒均含有 2kb 的 PCR 产物。

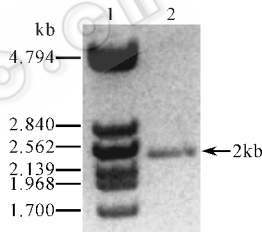


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification
1. Molecular weight marker (λ DNA digested with *Pst* I); 2. PCR product (2 kb) amplified by *Ssp* I digested DNA of K514(ϕ 297) with primer Oli112 and 297P1.

2.2 PCR 产物的 DNA 序列

对 pEHEC348 质粒进行测序,用反向测序引物从 pEHEC348 质粒测出了 832 个核苷酸序列,用正向引物测出了 878 个核苷酸序列。将正向引物获得的序列与核苷酸数据库进行比较,显示出从 231 到 441、702 到 848、464 到 516 与 *E. coli* O157:H7 Sakai 株(AE000400)^[9] 的 55201 到 55411,55671 到 55817 和 55434 到 55486 的同源性分别为 81%,82% 和 90%。*E. coli* O157:H7 的 54606 到 55892 (AE000400)序列相当于原噬菌体 VT1-Sakai 整合酶基因 *int* 的位置。因此证明,pEHEC348 质粒含有噬菌体 ϕ 297 *int* 基因。反向引物测出的 pEHEC348 的 832 个核苷酸序列,从第 62 位到 832 位与 *E. coli* K12 MG1655 染色体 *yecE* 基因序列同源性达 99%^[10]。

上述结果表明,pEHEC348 重组质粒的插入片段既含有噬菌体染色体 DNA 片段又含有细菌染色体

DNA 片段。正向测序引物和反向测序引物测出的 DNA 序列没有重叠,说明中间尚有部分 DNA 片段序列尚未测出,而且原噬菌体的附着位点就在其中。

2.3 pEHEC348 重组质粒亚克隆和右边界的确定

用限制性内切酶 *Hind* III 消化质粒 DNA,琼脂糖电泳可看到 4.0、0.5 和 0.2kb 的条带(图 2),用 T4 DNA 连接酶自连消化产物并将混合的连接产物转染至 *E. coli* K12,用限制性内切酶分析筛选含有 1.4 kb 插入片段的两个重组质粒,命名为 pEHEC351 和 pEHEC352。用正向测序引物从 pEHEC351 测得 581 个核苷酸的序列,DNA 序列分析显示从 1 到 187bp 与 VT1-Sakai 原噬菌体 *int* 基因^[9]序列相似,此段序列包含了噬菌体 297 的 *int* 基因和 *attR* 区。从 188 到 580 与 *E. coli* K12 (positions 9899 to 10291, AE000280)^[12]序列相似,此片段为 K12 的 *yecE* 基因,所以我们可以确定噬菌体 φ 297 的右边界位于 pEHEC351 的 188bp 附近。

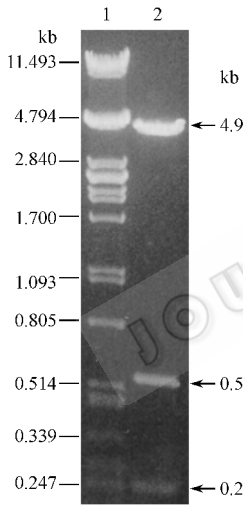


图 2 质粒 pEHEC348 的限制性酶切分析

Fig.2 Restriction analysis of the plasmid pEHEC348

1. Molecular weight marker (λ DNA digested with *Pst* I); 2. *Hind* III digestion with 2 mL plasmid DNA of pEHEC348.

2.4 左边界的确定

用 EC10 作为 *E. coli yecE* 的特殊引物和 Oli112 作为特殊接头引物,在用 *Ssp* I 处理的 DNA 中可获得 2kb 和 1kb 的两条带,用 QIAquick Gel Extraction Kit 分离提取 1kb 的 DNA 片段,然后将其连接到质粒 pUC18 的 *Sma* I 位点。用限制性内切酶消化,筛选出含有 1kb 插入片段的克隆,命名为 EHEC358、pEHEC359 和 pEHEC360。对质粒 pEHEC358 进行测序并与 DNA 数据库进行序列比较,显示从核苷酸第 12 到 142 位与 *E. coli* K12 (positions 9799 to

9906, AE000280)^[10]基因序列相似性为 98%,97%与 *E. coli* O157:H7 EDL933 (positions 2698 to 2827, AE005409)^[5]基因序列相似。从 144 到 913 显示 97%与 VT1-Sakai 原噬菌体 8069 到 8837 (AP000400) 的序列相同,因此证明 144 附近为原噬菌体 φ 297 的 *attL* 序列。

2.5 中心序列的确定

比较 pEHEC351 和 pEHEC358 得出 *attL*、*attR* 和中心序列:*attL* 序列是 CCGCCACTTTAACTGCATG, 而 *attR* 序列是 CCGTCACATTAAGTGGTG, 中心序列相当于 TTAAGTGC。

2.6 噬菌体 φ 297 重组位点的验证

用 EC10 和 EC11 作为与整合位点侧面相邻的基因 *yecE* 的特殊引物,*E. coli* 株 K514(φ 297)、K514 (φ 345)、C600(933W)、C600(φ 330)、K514 及 C600 的染色体 DNA 作为模板进行 PCR,其产物通过琼脂糖电泳分析发现:K514 (φ 345)、C600 (933W)、C600 (φ 330)、K514 和 C600 的 DNA 均出现了预期长度为 400bp 的高亮度条带,而 K514(φ 297)的长度为 400bp 的片段则非常浅(图 3)。因为噬菌体 933W 和 φ 330 在 *E. coli* 的整合位点不是 *yecE* 基因,而是 *WrbA* 基因^[5]。所以出现了清楚的 400bp 深色带,非溶源状态的 K514 和 C600 也有相同的 400bp 的 PCR 扩增产物。只有 K514(φ 297)几乎不能出现 400bp 的产物,原因是由于噬菌体 DNA 的插入使重组基因片段增大,不能通过 PCR 扩增。

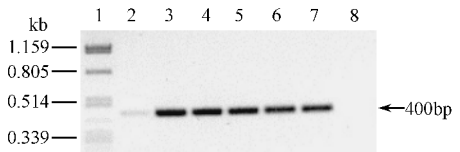


图 3 含有噬菌体 297 整合位点的染色体 DNA 片段的 PCR 扩增产物

Fig.3 PCR amplification of the genomic DNA fragment containing the phage 297 integration site

1. Molecular weight marker (λ DNA digested with *Pst* I); 2. K514 (φ 297); 3. K514 (φ 345); 4. C600(933W); 5. C600(φ 330); 6. K514; 7. C600; 8. H₂O.

3 讨论

噬菌体与细菌染色体的重组为特异位点重组,研究噬菌体与细菌染色体整合的机理和过程对研究真核细胞病毒对宿主细胞染色体的整合也有一定的参考价值。Wang^[4]研究表明, λ 噬菌体通过两个非常相似的 19 个核苷酸的序列 (CCGYCACWTTAA

CTGCRTG)与细菌染色体进行同源转换重组,此两段序列中共同含有 TTAAGTGC 中心序列,噬菌体基因组插入到细菌染色体后,此部分即成为原噬菌体的左右边界的一部分。本研究结果表明,噬菌体 $\phi 297$ 符合上述噬菌体与细菌染色体重组的规律。

以往的研究表明, λ 噬菌体与细菌染色体进行同源转换重组的同源片段(附着位点)位于 λ 噬菌体的 *int* 基因附近,噬菌体在大肠杆菌的附着位点通常在大肠杆菌 *bio* 和 *lac* 基因之间,不同噬菌体在大肠杆菌染色体上的附着位点不完全一致。 λ 噬菌体 933W 和 VT2-Sakai 的附着位点位于 *WtrbA*^[5], λ 噬菌体 VT1-Sakai 的附着位点位于 *yehV*^[6]。本研究通过 DNA 序列分析表明噬菌体 $\phi 297$ 的附着位点位于 *E. coli* K12 的 *yecE* 基因。由于噬菌体 DNA 的插入使 *yecE* 基因片段极度增大(λ 噬菌体基因组为 48.5kb),导致利用根据 *yecE* 设计的引物由于待扩增 DNA 片段过长而不能正常扩增。而少量的扩增产物的出现是由于少量的噬菌体从宿主 DNA 切离导致 *yecE* 基因恢复原长度的缘故。因此,我们可以确定噬菌体 $\phi 297$ 的整合位点在 *yecE* 基因。由于 *E. coli* K12 *yecE* 基因与 EHEC O157:H7 是完全相同的,因此可以推断,噬菌体 $\phi 297$ 在 EHEC O157:H7 上的整合位点应该在 *yecE* 基因上。

本研究表明 λ 噬菌体除可与细菌染色体在 *WtrbA* 或 *yehV* 基因片段进行同源转换重组,还可在 *yecE* 基因片段中重组。 λ 噬菌体附着位点的多态性表明,一个大肠杆菌有同时容纳多个溶源性噬菌体的可能性。

参考文献

- [1] Melton-Celsa A R, O'Brien A D. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper J B, O'Brien A D. eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Washington D C: ASM Press, 1998, 121 - 128.
- [2] Wagner P L, Acheson D W K, Waldor M K. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2001, **69**: 1934 - 1937.
- [3] Kozlov Y V, Kabishev A A, Lulyanov E V, et al. The primary structure of the operons coding for Shigella dysenteriae toxin and temperate phage H30 Shiga-like toxin. *Gene*, 1988, **67**: 213 - 221.
- [4] Wang H, Yang C H, Lee G, et al. Integration specificities of two Lambdaoid phages (21 and e14) that insert at the same *attB* Site. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 5705 - 5711.
- [5] Plunkett G III, 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 Bacteriol*, 1999, **181**: 1767 - 1778.
- [6] Siebert P D, Chenchik A, Kellogg D E, et al. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 1087 - 1088.
- [7] O'Brien A D, Newland J W, Miller S F, et al. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, 1984, **226**: 694 - 696.
- [8] Colson C, Glover S W, Symonds N, et al. The location of the genes for host-controlled modification and restriction in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 1965, **52**: 1043 - 1050.
- [9] Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene*, 2000, **258**: 127 - 139.
- [10] Blattner F R, Plunkett G III, Bloch C A, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, **277**: 1453 - 1474.

Identification of The *Escherichia coli* Chromosomal Insertion Sites of The Shiga Toxin-encoding Bacteriophages $\phi 297$

CAO Qi-Zhi¹ ZHAI Jing² CHANG Wei-Shan^{3*}

(¹ Department of Microbiology and Immunology of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China)

(² Department of Biochemistry of Taishan Medical College, Tai'an 271000, China)

(³ College of Animal Science and Technology of Shandong Agriculture University, Tai'an 271000, China)

Abstract: The specific integration site of prophage $\phi 297$ in the host of *E. coli* K12 chromosome was identified using molecular techniques. Siebert PCR run from the *int* gene of prophage $\phi 297$, which was similar to that of phage 933W to an unknown region in genomic DNA. A special adaptor was ligated to the ends of DNA fragments generated by digestion of genomic DNA with restriction enzymes that generates blunt ended fragments. Clone and reclone of PCR products, DNA sequencing and data analysis were used in this study. Comparison the sequence obtained with the nucleotide database was allowed to determine the *attL* and *attR* and the core sequence. The bacterial attachment site of phage $\phi 297$ was located in the *yecE* gene of *E. coli* K12. The phage $\phi 297$ integrates into the *yecE* gene of the *E. coli* K12 genome.

Key words: Phage $\phi 297$, *Escherichia coli* K12, Site-specific recombination, Shiga toxin, Attachment site

* Corresponding author. Tel: 86-538-8249169; E-mail: wchang@sdaa.edu.cn

Received date: 02-12-2004