

抑制差减杂交筛选禽致病性大肠杆菌基因组差异片段及其分析

陈 祥 赵 娟 高 崧* 焦新安 刘秀梵

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 采用抑制差减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)对禽致病性大肠杆菌 E037 株(血清型 O78)与非致病菌株 K-12 MG1655 以及同一 O2 血清型高致病菌株 E058 与低致病菌株 E526 进行基因组差异片段克隆与分析。从 E037 株中共检出 17 个特异性差异片段, E058 株中共检出 32 个特异性差异片段。经同源分析, 这些序列可分为 4 类: 质粒相关序列、噬菌体相关序列、已知功能序列、未知功能序列。这些差异片段包含许多重要的大肠杆菌毒力相关基因, 如大肠杆菌素、气杆菌素受体、铁基因簇等。49 个片段中, 14 个片段与其它微生物基因组同源性较高。结果表明, 大肠杆菌高致病株与低致病菌株或非致病菌株基因组间存在较多差异基因, 其中包括毒力、毒力相关基因、代谢以及噬菌体等基因成分。

关键词 禽致病性大肠杆菌, 抑制差减杂交, 基因组差异

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)05-0680-05

禽大肠杆菌病(Avian Colibacillosis)指部分或全部由禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)所引起的局部或全身性感染的疾病, 可以引起胚胎死亡、脐炎、败血症、肉芽肿、卵黄性腹膜炎、全眼球炎、气囊病(Hjarre 氏病)、禽蜂窝织炎、肿头综合症、输卵管炎、滑膜炎及肺炎/卵黄囊感染等一系列病征^[1,2], 是 2 至 12 周龄鸡和火鸡的一种常见传染病, 给养禽业造成了严重的经济损失。大肠杆菌血清型复杂多样, 在禽类中致病性大肠杆菌最常见的血清型是 O1、O2 和 O78, 上世纪 90 年代高崧等^[2]对江苏等 18 个省、市、自治区禽大肠杆菌病进行了流行病学调查, 分离到的大肠杆菌以 O18、O78、O2、O88、O11、O26、O4、O1、O127 和 O131 等 10 个血清型为主。

遗传关系密切的同种细菌不同菌株的基因组差异分析对研究菌株分化与变异等方面具有重要意义。因此, 区分高致病株与低致病株或非致病株基因组差异对于分析大肠杆菌菌株遗传分化关系、毒力变异、分子流行病学分析等方面具有较高的应用价值。本文采用抑制差减杂交技术^[3,4]分别对 O78 血清型 APEC E037 株与 K-12 MG1655 及同一 O2 血清型高致病菌株 E058 与低致病菌株 E526 进行了基因组差异片段的研究与分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 禽致病性大肠杆菌高致病株 E037 (O78 血清型)、E058 (O2 血清型)及低致病株 E526 (O2 血清型)由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离、鉴定, 对 1 日龄 SPF 鸡的致死率: E037 为 83.3%(5/6), E058 为 100%(6/6), E526 为 0(0/6)^[2,5], K-12 MG1655 中国疾病预防控制中心病毒基因工程国家重点实验室金奇教授惠赠, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本实验室保存。菌株在 LB 液体或平板 37℃ 过夜培养, 必要时添加 Ampicillin 100 μ g/mL, IPTG 150 μ g/mL, X-Gal 15 μ g/mL。

1.1.2 试剂 抑制差减杂交试剂盒购自 BD Clontech 公司(产品分类号为 K1809-1), 寡核苷酸接头及 PCR 引物均由试剂盒提供。PCR 产物纯化试剂盒由大连 TaKaRa 公司提供。克隆载体为 pGEM-T easy Vector, 购自 Promega 公司。DIG 探针标记与检测试剂盒购自 Roche 公司。DNA 测序工作由上海联合基因科技有限公司完成。

1.2 抑制差减杂交文库的构建

试验菌株 DNA 的制备以 CTAB/NaCl 法进行^[6]。抑制差减杂交试验按照 BD Clontech 公司试剂盒说明书进行。基因组 DNA 经 *Rsa* I 酶切、杂交后, 进

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA222141)、国家自然科学基金(30471281)

* 通讯作者。Tel 86-514-7991448, Fax 86-514-7972218, E-mail: gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 陈 祥(1978-), 男, 江苏盐城人, 博士研究生, 主要从事病原微生物致病机理研究。E-mail: zhenxiangjs@126.com

收稿日期: 2005-01-30, 修回日期: 2005-06-09

行二轮 PCR 扩增 ,在总量为 25 μ L 的反应体系中加入 10 \times PCR 缓冲液(含 15mmol/L Mg²⁺) 2.5 μ L、2.5mmol/L 的 dNTP 2 μ L、PCR Primer1 1 μ L、DNA 模板 1 μ L(3ng) Taq DNA 聚合酶 1.5U ,加灭菌超纯水至 25 μ L。扩增条件 :94 $^{\circ}$ C 30s ,65 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 90s ,共进行 25 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 5min。取上述 PCR 产物 1 μ L 进行 1 :40 稀释 ,取 1 μ L 到 25 μ L 的 PCR 反应体系中 ,加入 10 \times PCR 缓冲液(含 15mmol/L Mg²⁺) 2.5 μ L、2.5mmol/L 的 dNTP 2 μ L、Nested Primer1/2R 各 1 μ L、Taq DNA 聚合酶 1.5U ,加灭菌超纯水至 25 μ L。扩增条件 :94 $^{\circ}$ C 30s ,67 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 90s ,共进行 12 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 5min。PCR 产物经纯化后与 pGEM-T easy Vector 连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 ,通过 AIX 平板筛选阳性克隆建立差减文库。挑选单个白色菌落 ,用含 Ampicillin 的 LB 培养基扩增培养 ,碱裂解法^[7]提取质粒 ,用差减杂交试剂盒内的一对 nested 引物扩增插入片段 ,走琼脂糖电泳。

1.3 Southern 杂交和斑点杂交

分别对 tester 及 driver 基因组 DNA Rsa I 酶切产物进行地高辛标记 ,调整二者探针浓度一致 ,将经 SSH 得到的差减文库克隆子的质粒 PCR 扩增产物进行 Southern 杂交和斑点杂交以鉴定被检菌差异片段特异性 ,具体操作步骤按地高辛试剂盒说明书。

1.4 DNA 测序

将鉴定的阳性克隆重组质粒纯化 ,DNA 测序工作由上海联合基因科技有限公司完成。DNA 同源比较通过 National Center for Biotechnology Information (NCBI)中的 BLASTN 进行检索。

2 结果

2.1 APEC E037 株的抑制差减杂交结果

按照 Clontech 公司差减杂交试剂盒说明书进行连接效率检测 ,连接效率大于 25% ,以 APEC E037 作为 tester ,K-12 MG1655 作为 driver 进行抑制差减杂交实验 ,基因组 DNA 经 Rsa I 酶切后 ,进行抑制差减杂交 ,差减后的 PCR 产物可见清晰、排列紧密的条带 ,大小分布在 200 ~ 2000bp。差减杂交后的 PCR 产物分别与 Dig-E037、Dig-K12 MG1655 进行 Southern 杂交 ,被检菌差异片段特异性良好(图 1) ,差减杂交后的 PCR 产物经纯化与 pGEM-T easy Vector 载体连接转化后获得数千个克隆子 ,从中随机挑取 300 个克隆 ,小提质粒 ,以 nested 引物进行 PCR 扩增 ,经斑点杂交分析后 ,共获得 17 个阳性克隆子 ,这些克隆子中 DNA 插入片段的大小为 180 ~ 1519bp ,差异片段 G + C 含量为 31.8% ~ 58.5%(表 1)。

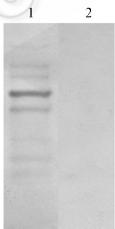


图 1 抑制差减杂交 PCR 产物分别与 Dig-E037 和 Dig-K12 MG1655 的 Southern 杂交

Fig.1 Southern hybridization analyses using E037 and K12 MG1655 Rsa I -digested genomic DNA as probes to secondary PCR of subtractive hybridization samples
Southern hybridization analysis of PCR product probed with diglabelled : 1. E037 Rsa I -digested genomic DNA ;2. K12 MG1655 Rsa I -digested genomic DNA.

表 1 APEC E037 株基因组差异片段

Table 1 Summary of BLAST search of avian pathogenic *E. coli* strain E037-specific clones

SSH fragment	Insert size/bp	Sequence homology	Score	E value	G + C% content	GenBank accession No.
ecs-1	765	Colicin , immunity proteinE6 , <i>E. coli</i>	632	e-178	46.1	M31808
ecs-2	629	mobA , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	662	0	50. 6	AF218051
ecs-3	409	mobA , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	803	0	50.1	AF218051
ecs-4	342	mobA , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	638	e-180	51.2	AF218051
ecs-5	736	mobA , pOSAK1 , <i>E. coli</i>	1150	0	50.8	AB011548
ecs-6	534	rrt , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	997	0	31.8	AF218051
ecs-7	1519	rrt , csp , unknown , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	1701	0	47.5	AF218051
ecs-8	984	Unknown , rrt , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	1772	0	39.4	AF218051
ecs-9	629	rep protein , pColE2 , <i>E. coli</i>	285	5e-74	58.5	D30057
ecs-10	649	Rep protein , pColE9 , <i>Shigella sonnei</i>	1122	0	54.9	D30061
ecs-11	594	Rom , pSFD10 , <i>S. choleraesuis</i>	916	0	55.6	AY048853
ecs-12	215	Unknown , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	266	2e-68	54.4	AF218051
ecs-13	689	Unknown , pCRP3 , <i>Citrobacter rodentium</i>	1179	0	51.1	AF311902
ecs-14	801	Unknown , pCRP3 , <i>Citrobacter rodentium</i>	1104	0	55.2	AF311902
ecs-15	180	BioA , <i>Shigella Flexneri</i>	317	6e-89	55. 6	AE015101
ecs-16	330	CysG , <i>E. coli</i>	630	e-178	53.3	AE000412
ecs-17	220	efp , elongation factor p , <i>E. coli</i>	396	e-108	50.9	X61676

对 17 个差异片段作同源分析 ,其中有 7 个差异片段与肠炎沙门氏菌低分子量质粒 DNA 同源性较高 ,有 2 个片段与枸橼酸菌基因组 DNA 片段同源性较高 ,另各有 1 个差异片段与猪霍乱沙门氏菌、宋内志贺氏菌、福氏志贺氏菌基因有较高同源性。

2.2 APEC E058 株的抑制差减杂交结果

从 E058 株共获得 32 个特异性阳性克隆子 ,插

入片段大小为 216 ~ 1201bp ,差异片段 G + C 含量为 34.6% ~ 56.1%(表 2)。32 个差异片段中 ,14 个差异片段与尿道致病性大肠杆菌基因组 DNA 片段同源性较高 ,2 个差异片段与福氏志贺氏菌基因同源性较高 ,2 个差异片段与新生儿脑膜炎相关大肠杆菌基因有较高同源性。

表 2 APEC E058 株基因组差异片段

Table 2 Summary of BLAST search of avian pathogenic *E. coli* strain E058-specific clones

SSH fragment	Insert Size/bp	Sequence homology	Score	E value	G + C % content	GenBank accession No.
aec-1	576	repA6 , repA1 , <i>E. coli</i>	1096	0	48.6	AF550679
aec-2	1144	sopA , sopB , plasmid F , <i>E. coli</i>	2189	0	46.3	AF550679
aec-3	721	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 transposase , plasmid F , <i>E. coli</i>	731	0	48.4	AF550679
aec-4	933	finP , traJ , traY , plasmid F , <i>E. coli</i>	1818	0	34.6	AF550679
aec-5	586	pColV-K30 , <i>E. coli</i>	1124	0	44.7	AJ223631
aec-6	697	p300 , iro gene cluster , <i>E. coli</i>	1350	0	47.6	AY205565
aec-7	412	p300 iro gene cluster , <i>E. coli</i>	817	0	42.5	AY205565
aec-8	652	traT lipoprotein , <i>E. coli</i>	979	0	49.2	X14566
aec-9	253	Aerobactin receptor gene , pColV , <i>E. coli</i>	486	e-134	53.8	X05874
aec-10	550	Colicin , plasmid ColIa-IHE3113 colicin , <i>E. coli</i>	1061	0	42.0	U15625
aec-11	321	Bacteriophage V , UPEC	589	e-165	56.1	AE016765
aec-12	792	Putative prophage T4-exclusion protein gene , <i>E. coli</i>	1172	0	41.9	AF493797
aec-13	616	orf15 , phage Mu DNA circulation protein N , <i>Shigella flexneri</i> ,	1047	0	54.1	U82619
aec-14	594	DNA damage inducible protein 1 , UPEC	301	8e-79	40.1	AE016764
aec-15	304	Cell division protein ftsk , UPEC	609	e-170	51.3	AE016758
aec-16	367	rnb , exoribonuclease II , degradation of RNA , UPEC	696	0	54.8	AE016760
aec-17	424	Hypothetical lipoprotein yddW precursor , UPEC	825	0	53.3	AE016760
aec-18	393	Nitrate sensor protein narX , UPEC	779	0	55.0	AE016760
aec-19	893	Pseudogene , UPEC	511	e-142	56.1	AE016761
aec-20	259	Pseudogene , UPEC	448	e-135	55.4	AE016761
aec-21	230	Putative adhesin , UPEC	432	e-118	53.5	AE016768
aec-22	478	melR , Melibiose operon regulatory protein , UPEC	928	0	50.0	AE016771
aec-23	321	Hypothetical protein yjjY , UPEC	597	e-168	34.9	AE016772
aec-24	270	serB , Serine biosynthesis , UPEC	511	e-142	55.6	AE016772
aec-25	639	TspE15.D11 neonatal meningitis , <i>E. coli</i>	418	e-114	44.3	AF222160
aec-26	603	E8 neonatal meningitis strain specific DNA sequence , <i>E. coli</i>	452	e-124	46.4	AF222088
aec-27	1024	cvaB , the secretion of colicin V , <i>E. coli</i>	678	0	53.4	X57524
aec-28	216	Sur E gene , <i>E. coli</i>	404	0	55.1	L07942
aec-29	465	Large terminase subunit , <i>Shigella flexneri</i>	884	0	53.1	U82619
aec-30	1201	Unknown , UPEC	2298	0	40.1	AE016759
aec-31	1199	Unknown , UPEC	2313	0	40.4	AE016759
aec-32	372	Unnamed protein , <i>E. coli</i>	674	0	51.1	D90750

3 讨论

APEC 除了引起鸡胚或鸡的死亡外 ,还未鉴定出某一单独的毒力因子可区分所有的致病菌株与非致病菌株^[1]。人们在致力弄清 APEC 已知毒力因子同时 ,将注意力转移到新的致病基因的分离与鉴定方面^[8]。我们在大量禽源大肠杆菌的致病性实验中 ,发现有相当比例的分离株并不具备已知的毒力

因子 ,如 I 型菌毛 ,却具有较强的致病性^[9,40] ,说明这些分离株还存在其他毒力因子。在同一优势血清型的分离株 ,其致病性也有高低之分^[2,5]。这使得我们在同一血清型的分离株中 ,挑选出低或无致病性分离株的 DNA 作为 driver ,以高致病株 DNA 作为 tester ,应用 SSH 技术 ,筛选高致病菌株中可能的毒力相关基因。

获得 17 个差异片段,经同源序列分析,这些差异片段分为 3 组,第 1 组主要为质粒相关序列,如 *ecs-9* 片段与 *pColE2* 同源性较高。*ColE2* 相关质粒较小(5~11kb),高拷贝(每个细胞 10~20 拷贝),高拷贝水平的 *ColE2* 相关质粒可导致相应毒力基因的高水平转录^[8]。*ecs-10* 片段与宋内志贺氏菌 *pColE9* 有较高同源性,其功能类似 *pColE2*。有 7 个差异片段与肠炎沙门氏菌低分子量质粒 I 同源性较高,低分子量质粒 I 中包含编码 Retron 反转录酶的基因,该反转录酶是原核生物中极少见的酶,可自我复制低分子量双链 DNA,低分子量质粒 I 可使肠炎沙门氏菌抵抗噬菌体的感染^[13];第 2 组主要为已知功能相关序列,如 *ecs-11* 与猪霍乱沙门氏菌的 RNA I 分子蛋白同源性较高,*ecs-17* 与延长因子 p 有较高同源性;第 3 组主要为未知功能序列,如 *ecs-13* 和 *ecs-14* 等。

以 APEC E058 株作为被检菌的差减杂交试验中,共获得 32 个差异片段,经同源序列分析,这些差异片段可分为 4 组,第 1 组主要为质粒相关序列,如 *aec-5*、*aec-6*、*aec-7* 和 *aec-9* 片段为 APEC 毒力因子 *pColV* 的遗传元件,*pColV* 可使细菌显著增加其在宿主组织中摄取铁的能力,使 APEC 的致病性增强。*aec-6*、*7* 片段为铁基因簇相关序列,铁基因簇可能编码铁结合性复合物的受体,其在持续感染和深部组织损伤中发挥着非常重要的作用^[8]。血清耐受涉及 APEC 致病机理之一,血清耐受与致病力相关,*aec-8* 为 *traT* 的基因片段,*traT* 基因调控 APEC 的血清抗性,该基因产物为 TraT 蛋白,存在于细菌的外膜蛋白,使血浆中补体和其它杀菌因子不能直接作用于菌体,使细菌表现出血清抗性;*tra* 基因和 F 质粒与 *aec-2*、*aec-3*、*aec-4* 同源性较高,编码 F 菌毛蛋白,该菌毛的输出和质粒转移由一个 IV 型分泌系统完成,IV 型分泌系统是许多细菌毒力因子的关键成分^[11];第 2 组主要为噬菌体相关序列,如 *aec-11*、*aec-12* 和 *aec-13* 差异片段为噬菌体的基因成分,细菌噬菌体相关基因可能编码许多毒力因子(比如毒素和黏附素),但在 E058 菌株中,噬菌体是否编码相应的毒力因子还需进一步鉴定;第 3 组主要为已知功能相关序列,如 *aec-25* 和 *aec-26* 片段是新生儿脑膜炎相关大肠杆菌的特异性 DNA 序列,*aec-27* 片段与 V 型大肠杆菌素的分泌系统相关;第 4 组主要为未知功能序列,如 *aec-30*、*aec-31* 和 *aec-32* 等。

大肠杆菌素基因片段(*ecs-1* 和 *aec-10*) 在 E037 和 E058 菌株中都被筛选到,培养液上清中存在的大

肠杆菌素能增加兔和豚鼠的血管通透性,产生炎症反应,此外 V 型大肠杆菌素是一种分子量小的可透性蛋白质,能抑制巨噬细胞活性^[12]。

我们以往对大肠杆菌毒力相关基因分布的检测及本实验结果都表明大肠杆菌高致病株中存在许多重要的外源基因片段,然而在细菌进化过程中高致病株与低致病株或非致病株的外源基因片段差异的内在机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Calnek B W. 禽病学. 第十版. 高 福, 苏敬良译. 北京: 中国农业出版社, 1999, 158-171.
- [2] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定. 畜牧兽医学报, 1999, 30(2): 164-171.
- [3] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [4] Stocki S L, Babiuk L A, Rawlyk N A, et al. Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis. *Microbial Pathogenesis*, 2002, 33(6): 289-298.
- [5] 高 崧, 吴长新, 文其乙, 等. 不同地区 101 个禽源性大肠杆菌分离株的致病性试验. 中国预防兽医学报, 1999, 21(1): 13-16.
- [6] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Dozois C M, Daigle F, Curtiss R III. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 247-252.
- [9] 高 崧, 姜 焱, 刘业兵, 等. 禽病原性大肠杆菌 I 型菌毛的分离与鉴定. 微生物学报, 1999, 39(6): 521-526.
- [10] 刘业兵, 高 崧, 彭大新, 等. 禽病原性大肠杆菌 I 型菌毛单克隆抗体的研制及其对分离株的检测. 中国兽医学报, 2000, 20(3): 148-151.
- [11] Christie P J, Vogel J P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 354-360.
- [12] Ozanne G, Mathieu L G, Baril J P. Production of colicin V *in vitro* and *in vivo* and observations on its effects in experimental animals. *Infect Immun*, 1977, 17(3): 497-503.
- [13] Rychlik I, Sebkova A, Gregorova D, et al. Low-molecular-weight plasmid of *Salmonella enterica* serovar enteritidis codes for retron reverse transcriptase and influences phage resistance. *J Bacteriol*, 2001, 183(9): 2852-2858.

Identification of genomic differences in avian pathogenic *Escherichia coli* using suppression subtractive hybridization analysis

CHEN Xiang ZHAO Juan GAO Song* JIAO Xin-an LIU Xiu-fan

(*Animal Infectious Diseases Laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*)

Abstract: To identify unique DNA fragments associated with avian pathogenic *Escherichia coli* strains, suppression subtractive hybridization (SSH) was used. The genome of nonpathogenic *E. coli* K-12 strain MG1655 was subtracted from the genome of avian highly pathogenic strain E037 (serotype O78) resulting in the identification of 17 specific fragments. And the genome of avian low pathogenic *E. coli* strain E526 (serotype O2) was subtracted from the genome of avian highly pathogenic strain E058 (serotype O2) resulting in the identification of 32 specific fragments. Sequence homology analysis was done and four types of fragments were identified: plasmid sequences, phage sequences, sequences with known function and sequences without any currently known function. And 12 specific fragments that were not found in *E. coli* K-12 were identified from two avian *E. coli* strains. The results suggested that there were some genetic differences between the highly pathogenic strains and low pathogenic or nonpathogenic strains.

Key words: Avian pathogenic *Escherichia coli*, Subtractive hybridization, Genomic differences

Foundation item: Chinese Program for High Technology Research and Development(2003AA222141); National Natural Science Foundation of China (30471281)

* Corresponding author. Tel 86-514-7991448; Fax 86-514-7972218; E-mail: jgsong@yzu.edu.cn

Received date 01-30-2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>