

El Tor 型 CTX Φ 对 O1 群不同霍乱弧菌的转染性研究

刘广文 闫梅英 祁国明 高守一 阚 飙*

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 国家传染病预防控制重点实验室 北京 102206)

摘 要 :研究丝状噬菌体 CTX Φ 对 O1 群不同霍乱弧菌的水平转移效率及菌株的噬菌体免疫能力。利用带有氯霉素抗性基因遗传标记的 CTX^{ET} Φ 感染颗粒对 O1 群的 4 株不同霍乱弧菌进行体外和体内转染实验,根据氯霉素抗性筛选转染子,通过 Southern Blot 等方法进行验证并判断 CTX Φ 基因组的存在形式,计算比较不同菌株的转染率,分析转染及噬菌体免疫机制。带有遗传标记的 CTX^{ET} Φ 对古典型霍乱弧菌 1119 的体内转染率高于体外,体内转染实验中,古典菌株 1119 的转染率远高于其它 3 株 El Tor 型霍乱弧菌;在 El Tor 型霍乱弧菌中,不含 *rstR* 基因的 IEM101 的转染率高于另外两株带有 *rstR* 基因的霍乱弧菌 2~3 个数量级。古典型霍乱弧菌比 El Tor 型菌株对 CTX^{ET} Φ 噬菌体颗粒更敏感,TCP 菌毛的表达和 *rstR* 基因介导的噬菌体免疫影响 CTX Φ 在霍乱弧菌中的水平转移。

关键词 :霍乱弧菌,CTX Φ 转染

中图分类号 :Q852 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)05-0757-06

霍乱毒素(Cholera toxin,CT)是霍乱的主要致病因子,它由霍乱弧菌的毒力基因 *ctxAB* 编码。*ctxAB* 基因是由霍乱弧菌中的溶原性丝状噬菌体 CTX Φ 携带^[1],CTX Φ 基因组包括核心区(Core region)和重复序列 RS2 区,核心区区长约 4.6kb,含有编码 CT 和与噬菌体颗粒形成相关蛋白的基因;RS2 区长为 2.4kb,包括 *rstA2*、*rstB2* 及 *rstR* 基因,*rstA* 与 CTX Φ 基因组的复制有关,*rstB* 与整合有关,*rstR* 基因编码的 RstR 蛋白为阻遏蛋白,抑制 *rstA2* 基因的表达,使 CTX Φ 维持溶原状态^[2]。整合在染色体上的 CTX Φ 基因组可被诱导成为具有感染性的 CTX Φ 颗粒^[3],它能以霍乱的毒素共调菌毛(TCP)为受体进入新的菌体内^[4,5],从而造成 *ctxAB* 基因在有毒株与无毒株之间的水平扩散。霍乱弧菌对 CTX Φ 的噬菌体免疫是由 *rstR* 基因介导的,而且单独的 RstR 即可完成这种免疫功能^[6]。

为了深入了解噬菌体免疫力的具体程度以及 *rstR* 基因在阻止同型 CTX Φ 感染的过程中所发挥的作用大小,我们利用带有氯霉素抗性基因遗传标记的 El Tor 型 CTX Φ 对 O1 群霍乱弧菌包括古典型菌株 1119 和 3 株 El Tor 型菌株 IEM101、IEM108 及吴江-2 进行了体内、体外转染实验。体外转染便于实验条件的设定和控制,体内转染则更接近自然感染过程,两实验结合能更好地说明噬菌体对宿主菌的

侵袭力。

我们选用的 IEM101 是天然不含 CTX Φ 基因组的 El Tor 型霍乱弧菌。IEM108 是本室构建的霍乱菌苗候选株,它以 IEM101 为出发株,加入了高效表达的 *ctxAB* 基因,同时导入 EVC 流行株的 *rstR* 基因,并采用以管家基因 *thyA* 为选择压力的质粒-染色体致死平衡系统使之稳定表达^[7-9]。吴江-2 为携带 CTX^{ET} Φ 基因组的自然菌株,对同型噬菌体具有免疫能力。在先前的实验中,我们已经对噬菌体颗粒进行了遗传标记^[10];通过自杀质粒介导的 DNA 同源重组技术将 El Tor 型霍乱菌株 N16961 染色体上 CTX Φ 基因组中的 *ctxAB* 基因缺失掉,替换以氯霉素抗性基因(*cat*),筛选得到了重组菌株 N- Φ C,利用丝裂霉素 C 可以诱导出带有氯霉素抗性基因标记的噬菌体颗粒 CTX Φ C,并且具有感染活性。

本实验就是利用 El Tor 型的 CTX Φ C 对 4 株 O1 群霍乱弧菌进行体内、体外的转染,计算各菌株的转染率,分析研究霍乱弧菌对 CTX Φ 的噬菌体免疫能力及其影响因素。由于 *ctxAB* 基因只是为噬菌体在肠道内宿主菌中的生存提供有利条件,而不直接参与 CTX Φ 噬菌体颗粒的形成,缺失掉部分 *ctxAB* 基因并不影响噬菌体的形态发生^[1,11],实验能够反映出 CTX Φ 携带毒素基因在霍乱弧菌中进行水平转移的情况,可以评价霍乱菌苗候选株 IEM108 的生物安

基金项目 :国家 973 项目 (G1999054102) ;国家 863 计划 (2001AA215191-2)

* 通讯作者。Tel :86-10-61739458 ; Fax :86-10-61739156 ; E-mail :kanbiao@icdc.cn

作者简介 :刘广文(1974-)男,山西阳泉人,博士研究生,从事病原生物学研究。E-mail :jgw424@126.com

收稿日期 :2005-03-15,修回日期 :2005-06-28

全性,同时为探讨产毒型霍乱菌株的进化提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:实验用菌株见表1。

表1 实验用菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

Strains	Description	Source
N-Φc	N16961 derived, El Tor, Inaba, <i>ctxAB</i> :: <i>cat</i> , <i>CAF</i> ^r	[10]
1119	classical, Inaba, <i>CTX</i> ^{ET} Φ ⁻ , <i>CTX</i> ^{class} Φ ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺	Our lab
Wujiang-2	El Tor, Inaba, <i>CTX</i> ^{ET} Φ ⁺ , <i>CTX</i> ^{class} Φ ⁻ , <i>tcpA</i> ⁺	Our lab
IEM101	El Tor, Ogawa, <i>CTX</i> ^{ET} Φ ⁻ , <i>CTX</i> ^{class} Φ ⁻ , <i>tcpA</i> ⁺	[9]
IEM108	IEM101 derived, <i>ctxB</i> ⁺ , <i>rstR</i> ⁺ , <i>thyA</i> ⁻	[7]

1.1.2 培养基和抗生素:LB培养基和庆大霉素琼脂选择培养基按常规配制。CFB培养基:每升含1.5g酵母粉,10g水解酪蛋白,50mg的MgSO₄,5mg的MnCl₂,pH为6.8,121℃、103kPa高压灭菌。抗生素按以下浓度加入:氯霉素(CAF)为15μg/mL,庆大霉素(Get)为0.5U/mL。

1.1.3 实验动物:新西兰纯种大白兔,体重约2kg,由本所动物室提供,合格证号为01-3063。

1.1.4 主要试剂和仪器:Taq DNA聚合酶、限制性核酸内切酶等购自华美生物工程和TaKaRa公司;地高辛(DIG)标记与检测试剂盒购自德国Roche公司;D-环丝氨酸(D-cycloserine)为Sigma公司产品;0.22μm一次性过滤器为Millipore公司;其它试剂均为分析纯。PCR扩增仪为PE公司Gene Amp PCR system 9600型;凝胶成像仪为英国UVP公司GDS7500型;高速冷冻低温离心机为日本日立公司CR 20B3型。

1.2 霍乱弧菌N-Φc中噬菌体CTXΦc的诱导^[10]

接种N-Φc单菌落于3mL LB中,30℃摇菌2~3h至稀薄,集菌,洗两次后加到200mL含丝裂霉素(20ng/mL)和氯霉素的LB中,30℃振荡培养6~7h,将培养液低温高速离心3次后上清过0.22μm孔径的除菌过滤器,滤液中加入1/4体积的含20%PEG8000和10%NaCl的液体并混匀,冰浴40min,离心沉淀噬菌体CTXΦc,用少量TES溶解,4℃保存。TES的配置为:2mL 1mol/L的Tris(pH < 7.5),20μL

0.5mol/L的EDTA(8.0),0.2mL 5mol/L的NaCl,用三蒸水定容到100mL,用于噬菌体CTXΦc的溶解和保存。

1.3 体内、体外转染实验^[12]

将受体菌接在CFB液体培养基中,30℃静止培养18~24h,然后把具有感染性的噬菌体与受体菌按1:4的比例混合。体外实验时,把混合液加到新鲜的LB中30℃静置培养3h,然后做10倍的梯度稀释,再将稀释液分别涂Get和CAF/Get抗性培养基,37℃培养12~36h,细菌长出后进行菌种鉴定和菌落计数,计算转染率;体内实验时,先用生理盐水把噬菌体与受体菌的混合液扩容至1mL,再用注射器将液体注入结扎好的兔子肠段内,8~10h后取出肠段,吸取肠液,稀释后进行涂板,方法同上计算转染率。对照为单噬菌体液及单种菌液。

1.4 兔子肠段结扎试验

把健康大白兔禁食(不禁水)24h后,固定于实验动物固定板上,用乙醚麻醉,腹部脱毛,消毒腹部皮肤并盖上消毒敷布后,以脐为中线纵向切开,剪开腹膜后取出肠管。找到回盲部,沿回肠向上约10cm处开始结扎肠段,实验段长约5cm,每两段之间留约1cm长的间隔段。肠段结扎完毕后,在实验段中分别注入实验样品,然后将肠管送回腹腔,缝合腹壁,消毒皮肤伤口。作用时间结束后,耳缘静脉气体栓塞处死兔子,取出肠段。

1.5 PCR

模板的制备是用接种环挑取单菌落于60μL灭菌去离子水中,置沸水中10min,冰浴10min,高速离心取上清。扩增体系:buffer(Mg²⁺ plus),dNTP(各0.2mmol/L),引物(各0.5μmol/L),Taq DNA聚合酶(0.025U/μL),用三蒸水补足20μL的总体系。

1.5.1 以*cat*引物的扩增:扩增产物长800bp(初始模板为质粒cosmid5),引物为P₁:5'-CGTAGCACCAGGCGTTAAAG-3',P₂:5'-GATCGGCACGTAAGAGGTTTC-3'。扩增条件:94℃ 5min,94℃ 30s,55℃ 40s,72℃ 1min,30个循环,72℃ 7min。

1.5.2 以*ctxB*引物的扩增:扩增产物长749bp,是本实验中缺失片段内部的一段序列,引物为P₁:5'-ATTTTGAGGTGTTCCATGTG-3',P₂:5'-ATAAAGCAGTCAGGTGGTCT-3'。扩增条件:94℃ 5min,94℃ 30s,55℃ 40s,72℃ 1min,30个循环,72℃ 7min。

1.6 酶切、Southern blot等分子生物学操作

碱法提取质粒、染色体的提取等按文献[13]进

行。核酸的纯化、酶切等操作按照公司试剂的说明书进行。DNA 探针的制备采用 DIG 标记随机引物法,显色按照试剂盒说明进行。杂交方法包括原位杂交、打点杂交和 Southern blot,采用含 50% 甲酰胺的杂交液 42℃ 预杂交 4~5h,杂交 12h。

1.7 统计学分析方法

分别计算出各菌株每次的转染率,然后数据汇总进行正态性检验,如不服从正态性分布则取对数进行数据转换,检验水准为 $P < 0.05$,最后计算出各自的平均转染率并进行相互比较,统计处理软件为 SPSS10.0。

2 结果

2.1 体内转染实验结果

2.1.1 转染子的鉴定:在 CAF/Get 双抗培养基中筛选抗性克隆子,随机挑取进行鉴定。凝集反应:转染子的霍乱 O1 血清凝集反应均为阳性,且与相应受体菌的血清型一致;PCR 结果,cat 引物扩增 1119、IEM101、IEM108、吴江-2 等出发菌株时均为阴性,而各自的转染子则都变为阳性,ctxB 引物的 PCR 中转染子与相应的出发株结果一致;打点杂交结果,cat 基因作探针时出发菌都为阴性,转染子为阳性,ctxB 作探针时转染子与相应的出发株结果一致。表明转染子源于相应的出发株,并且具有了出发株所没有的 cat 基因,cat 标记的 CTX Φ c 成功转入了相应的受

体菌中。

2.1.2 Southern blot: Mlu I 是 CTX Φ c 基因组上的单一酶切位点,如果转染子中的 CTX Φ c 以复制型质粒的形式存在,酶切后则变为线性 DNA,大小约 7.5kb;如果 CTX Φ c 整合到染色体上,酶切后与 cat 探针杂交得到的片段约为 11kb,据此可以判断 CTX Φ c 在转染子中的存在形式。结果见图 1,根据条带大小可以看出在 1119 和吴江-2 的转染子中 CTX Φ c 以质粒形式存在,没有与染色体发生整合;在 IEM101 和 IEM108 的转染子中,CTX Φ c 则与染色体基因组发生了整合。

2.1.3 转染率:CTX Φ c 对 1119、吴江-2、IEM101 和 IEM108 的体内平均转染率及 95% 可信区间见表 2。

表 2 CTX Φ c 对 O1 群霍乱弧菌的体内平均转染率

Strains	Mean of infection rate	95% Confidence interval
1119	1.61×10^{-2}	$5.61 \times 10^{-3} \sim 4.63 \times 10^{-2}$
IEM101	2.02×10^{-6}	$6.73 \times 10^{-7} \sim 6.07 \times 10^{-6}$
IEM108	3.05×10^{-9}	$1.06 \times 10^{-9} \sim 1.03 \times 10^{-8}$
Wujiang-2	2.73×10^{-8}	$1.10 \times 10^{-8} \sim 6.60 \times 10^{-8}$

2.2 体外转染实验结果

体外转染实验,只有古典型菌株 1119 被 CTX Φ c 转染,其它 3 株菌均未筛到阳性克隆子。

2.2.1 1119 转染子的鉴定:转染子与霍乱 Inaba 型血清凝集反应呈阳性,与出发菌株一致;cat 基因的 PCR 和打点杂交结果均为阳性;ctxB 基因的 PCR 和打点杂交结果与出发菌株一致。

2.2.2 Southern blot:结果表明(图 2),1119 转染子的质粒酶切后的片段约为 7~8kb,与 CTX Φ c 长度的理论值相近,全 DNA 的杂交结果与质粒一致,并无新带型出现,表明 CTX Φ c 转移到 1119 中后是以质粒的形式存在,没有与染色体发生整合。

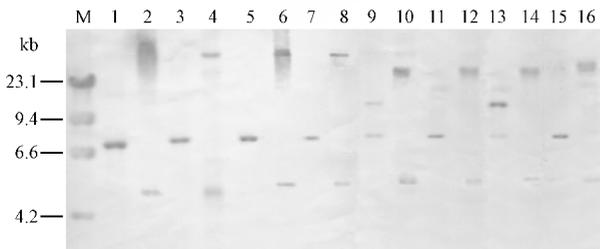


图 1 不同菌株转染子的 cat 探针 Southern blot 鉴定结果

Fig.1 Southern blot hybridization of infected strains of different *V. cholerae* with *cat* probe

M: λ DNA/*Hind*III; 1: Total DNA of infected strains of 1119/*Mlu*I; 2: Total DNA of infected strains of 1119; 3: Plasmid of infected strains of 1119/*Mlu*I; 4: Plasmid of infected strains of 1119; 5: Total DNA of infected strains of wujiang-2/*Mlu*I; 6: Total DNA of infected strains of wujiang-2; 7: Plasmid of infected strains of wujiang-2/*Mlu*I; 8: Plasmid of infected strains of wujiang-2; 9: Total DNA of infected strains of IEM101/*Mlu*I; 10: Total DNA of infected strains of IEM101; 11: Plasmid of infected strains of IEM101/*Mlu*I; 12: Plasmid of infected strains of IEM101; 13: Total DNA of infected strains of IEM108/*Mlu*I; 14: Total DNA of infected strains of IEM108; 15: Plasmid of infected strains of IEM108/*Mlu*I; 16: Plasmid of infected strains of IEM108.

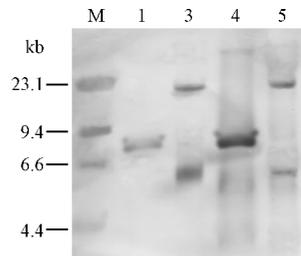


图 2 1119 转染子的 cat 探针 Southern blot 结果

Fig.2 Southern blot hybridization of infected strains of 1119 with *cat* probe

M: λ DNA/*Hind*III; 1: Total DNA of infected strains of 1119/*Mlu*I; 2: Total DNA of infected strains of 1119; 3: Plasmid of infected strains of 1119/*Mlu*I; 4: Plasmid of infected strains of 1119.

2.2.3 CTX Φ c 对 1119 的体外平均转染率:平均转染率为 1.57×10^{-7} 转染率的 95% 可信区间为 $8.17 \times 10^{-8} \sim 3.02 \times 10^{-7}$ 。

2.3 转染率的比较

在体内转染实验中,不同菌株转染率的比较见图 3。SPSS 统计学分析结果为:CTX Φ c 对古典型菌株 1119 的体内转染率均高于 3 株 El Tor 型菌株吴江-2、IEM101 和 IEM108;El Tor 菌株中,IEM101 的体内转染率为最高;CTX Φ c 对吴江-2 的体内转染率高于 IEM108,差异均具有统计学意义。表明古典型菌株 1119 比其它 3 株 El Tor 型菌株对 CTX Φ c 更易感,El Tor 型菌株中含有 *rstR* 基因的吴江-2 和 IEM108 比不含 *rstR* 基因的 IEM101 具有更高的抵抗 CTX Φ c 的噬菌体免疫力。

古典型菌株 1119 的 CTX Φ c 体内转染率高于体外转染率(图 4),差异具有统计学意义。表明 1119 菌株在体内环境中对 CTX Φ c 更易感。其它 El Tor 型菌株的体外实验均未筛选到转染子,提示可能比体外能够测到的 1119 菌株的转染率还低,超出实验的检测极限。

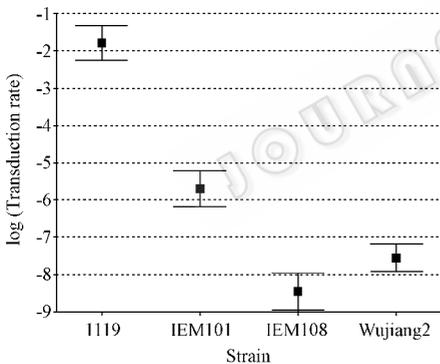


图 3 不同霍乱菌株的体内转染率

Fig.3 Transduction rate of different *V. cholerae* strains in vivo

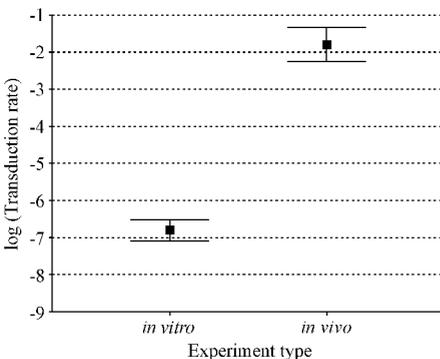


图 4 菌株 1119 的体内、外转染率

Fig.4 Transduction rates of strain 1119 in vitro and in vivo

3 讨论

3.1 转染子中 CTX Φ 基因组的存在形式

溶源性噬菌体 CTX Φ 颗粒转染进入霍乱弧菌后,有两种存在方式,一是位点特异性地整合于受体菌染色体上,形成稳定的溶原态;二是以质粒的形式存在于染色体外。位点特异性整合是通过 CTX Φ 基因组中 18bp 的末端重复序列与受体菌染色体上序列与之几乎一样的 *attRS* 位点间的同源重组实现的^[14]。本实验对 El Tor 型 CTX Φ c 在转染子中的存在方式进行了定位研究,发现在 1119 和吴江-2 的转染子中 CTX Φ c 是以质粒形式存在,而在 IEM101 和 IEM108 中则可以整合到染色体上。国外研究发现^[1,15]来源于 El Tor 菌株的 CTX Φ 感染古典型菌株后不发生整合,噬菌体 DNA 以质粒形式复制,这与实验中古典型菌株 1119 的结果一致,但这并不是因为古典型菌株中缺乏 CTX Φ 整合的 *attRS* 位点,相反古典型菌株中存在两个整合位点^[16],其原因有待进一步研究;同时 Mekalanos 等曾报道^[16,17]El Tor 型菌株中的多拷贝 CTX Φ 在染色体上以串联形式排列,而古典型菌株中则没有串联。本实验结果与之是否有联系,有待进一步探讨。

El Tor 型菌株的转染子中,CTX Φ c 以质粒的形式存在于菌株吴江-2 中,而在 IEM101 和 IEM108 中则可以与染色体发生整合。自然菌株吴江-2 中已存在完整的 CTX^{ET} Φ 基因组,菌株具有完全的噬菌体免疫作用,能够抵抗 CTX^{ET} Φ 的再次转染,而且可以抑制 CTX Φ 基因组与染色体发生整合;IEM101 菌株中不含 CTX Φ ,染色体上存在 CTX Φ 整合所需的 *attRS* 位点,所以 CTX Φ c 可以整合到染色体上;IEM108 来源于 IEM101,虽然加入的 *rstR* 基因能够有效抵抗 CTX Φ c 的转染,但依然存在 *attRS* 位点,如果 CTX Φ c 一旦转入仍有可能与染色体发生整合。

3.2 转染率的比较

El Tor 菌株的体内转染实验表明,IEM101 对 CTX Φ c 的噬菌体免疫力较弱,源于 IEM101 但加入了 *rstR* 基因的 IEM108 则有很强的抵抗力,甚至高于具有自然免疫力的吴江-2 菌株。在噬菌体免疫的过程中 *rstR* 基因表达的抑制蛋白 RstR 起重要作用,它能够抑制与 CTX Φ 基因组复制功能有关的 *rstA* 的转录,而且可以单独介导噬菌体免疫^[6]。*rstR* 基因的这种噬菌体免疫作用,得以使 CTX Φ c 向 IEM108 的水平转移能力比出发菌株 IEM101 降低了 1000 倍。IEM108 中导入的 *rstR* 基因是以 nHC18 为载体的质

粒形式存在, 吴江-2 中则含有溶源性 CTX^{ET} Φ 基因组, 其 *rstR* 基因在于染色体上。 *rstR* 在质粒中的表达量可能高于存在染色体上时, 所以 IEM108 的 RstR 蛋白含量可能高于吴江-2, 其发挥的噬菌体免疫作用也就会更大, 导致转染率更低; 另外一个原因, 也可能是由于菌株吴江-2 中含有 *rstC* 基因, 该基因编码的 RstC 蛋白能够与 RstR 蛋白结合, 从而抑制 RstR 介导的噬菌体免疫作用, 而在 IEM108 中没有 *rstC*, RstR 可以充分发挥其噬菌体免疫作用。因此, IEM108 中 *rstR* 基因发挥的噬菌体免疫功能甚至强于携带 CTX^{ET} Φ 基因组的自然 El Tor 菌株。

实验结果中还测得 CTX^{ET} Φ 标记噬菌体感染古典型霍乱弧菌 1119 的体内转染率比体外高约 10⁵ 倍, 差异具有统计学意义; El Tor 型弧菌的体外转染实验没有得到转染子; 体内实验中, 古典型菌株 1119 的转染率比 El Tor 菌株高 4~7 个数量级, 这与 Faruque 新近报道的古典型生物型菌株比 El Tor 和 O139 型菌株更易被噬菌体感染结果一致^[18]。 *rstR* 基因介导噬菌体免疫作用具有特异性, 1119 中的古典型 *rstR* 对 CTX^{ET} Φ 没有免疫力, 它只针对 CTX^{class} Φ 造成转染率不同的原因, 除了这种同型噬菌体免疫作用外, 还可能与 TCP 菌毛的表达有关。 TCP 菌毛是 CTX Φ 转染霍乱弧菌的受体, 由 *tcp* 基因簇编码, 它的表达状况直接影响噬菌体转染的效率。 体外生长时 O1 群霍乱弧菌两个生物型菌株的 TCP 菌毛表达存在差异, 古典型菌株的 TCP 菌毛比 El Tor 型菌株表达好^[19], 所以古典型菌株 1119 比 El Tor 型菌株更容易受 CTX Φ 的感染。 Waldor 等报道^[1], El Tor 型菌株的体内转染率是体外的 10⁶ 倍, 推测可能是由于 *tcp* 基因在体内的表达远远高于体外环境。 本实验中, 古典型菌株 1119 的体内外转染结果也是如此。 考虑到菌株和环境的因素, El Tor 型霍乱弧菌的 TCP 菌毛在体外的表达可能会更差, 转染率也更为降低, 超出筛选的灵敏度以至实验中没有检测到 El Tor 菌株体外转染的发生。

早先在构建完成 IEM108 后, 本实验室曾应用一简化的转染模型考核了 IEM108 中引入的 *rstR* 对 CTX Φ 的转染抑制作用^[20]。 该模型是将 CTX^{ET} Φ 的 RS 序列克隆到自杀质粒 pKTN701 中, 然后进行接合转移, 根据 *rstR* 抑制具有同型 RS 区的重组自杀质粒的复制来反映其噬菌体免疫作用。 此模型相当于检测 CTX Φ 基因组进入 IEM108 细胞内后, *rstR* 对其复制整合的抑制作用。 结果证明, 由于引入了 *rstR*, 使 IEM108 对 CTX Φ 的抑制作用比其出发株 IEM101

提高了 100 倍。 在本研究中, 使用带有遗传标记的完整噬菌体颗粒 CTX Φ c 做转染, 被替换掉的 *ctxAB* 基因并不直接参与 CTX Φ 噬菌体颗粒的形成, 不影响噬菌体的形态发生^[1, 11], 因此本实验能够更加直接、客观地反映不同霍乱菌株抵抗 El Tor 型 CTX Φ 的免疫能力以及 CTX Φ 的水平转移情况。

参 考 文 献

- [1] Waldor M K, Mekalanos J J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 1996, **272**: 1910 - 1914.
- [2] Waldor M K, Rubin E J, Pearson G D N, et al. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX Φ are encoded by region RS2. *Mol Microbiol*, 1997, **24**: 917 - 926.
- [3] Boyd E F, Moyer K E, Shi L, et al. Infectious CTX Φ and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect Immun*, 2000, **68**(3): 1507 - 1513.
- [4] Karaolis D K, Somara S, Maneval D R J, et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*, 1999, **399**: 375 - 379.
- [5] Dalsgaard A, Serichantalergs O, Forslund A, et al. Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(11): 4086 - 4092.
- [6] Kimsey H H, Waldor M K. CTX Φ immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 7035 - 7039.
- [7] Liang W, Wang S, Yu F, et al. Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *American Society for Microbiology*, 2003, **71**: 5498 - 5504.
- [8] Liu Y, Qi G, Wang S, et al. A natural vaccine candidate strain against cholera. *Biomed Environ Sci*, 1995, **8**: 350 - 358.
- [9] Maria R F, Elisabetta M, Liu Y, et al. IEM101, a naturally attenuated *Vibrio cholerae* strain, as carrier for genetically detoxified derivatives of cholera toxin. *Vaccine*, 2001, **19**: 75 - 85.
- [10] 刘广文, 闫梅英, 祁国明, 等. 霍乱弧菌溶源性噬菌体 CTX Φ 的氯霉素抗性基因标记及诱导. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, **24**: 253 - 257.
- [11] Faruque S M, Albert M J, Mekalanos J J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1301 - 1314.
- [12] 梁未丽, 阚 飙, 祁国明, 等. O139 群霍乱弧菌中溶源性噬菌体 CTX Φ 的诱导及转染性研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, **23**: 53 - 56.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [14] Pearson G D N, Woods A, Chiang S L, et al. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3750 - 3754.
- [15] Davis B M, Kimsey H H, Chang W, et al. The *Vibrio cholerae* O139 Calcutta bacteriophage CTX Φ is infectious and encodes a novel repressor. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 6779 - 6787.
- [16] Mekalanos J J. Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 1983, **35**: 253 - 263.
- [17] Tricksis M, Michalski J, Deng Y K, et al. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **24**: 14464 - 14469.

- [18] Faruque S M , Asadulghani , Kamruzzaman M , *et al.* RS1 Element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTX Φ . *Infect Immun* , 2002 , **70** :163 – 170.
- [19] Thomas S , Williams S G , Manning P A. Regulation of *tcp* genes in classical and El Tor strains of VC 01. *Gene* , 1995 , **166** :43 – 48.
- [20] 梁未丽, 阚 飙, 祁国明, 等. El Tor 型霍乱弧菌菌苗候选株 IEM108 抵抗 CTX Φ 转染的生物安全性试验. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003 **23** :534 – 535.

Study on infection of different strains of *Vibrio cholerae* O1 by El Tor CTX Φ

LIU Guang-wen YAN Mei-ying QI Guo-ming GAO Shou-yi KAN Biao*

(State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control , National Institute for Communicable Disease Control and Prevention , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China)

Abstract : To study the horizontal transfer efficiencies of filamentous bacteriophage CTX Φ in different *V. cholera* O1 strains and the phage immunities of these strains. The infectious El Tor CTX Φ particles genetic marked by chloramphenicol resistance gene were used to infect four different *V. cholerae* O1 strains *in vivo* and *in vitro*. Selected the infected clones based on its character of chloramphenicol resistance and identified and judged the exist form of CTX Φ genome through Southern bolt and other hybridization methods. Calculated the infection rates of different strains and compared each other. Then we analyzed the mechanism of infection and phage immunity. The infection rate of classic strain 1119 with the genetic marked CTX^{ET} Φ *in vivo* is much higher than that *in vitro*. *In vitro* experiment , the rate of 1119 is higher than other three El Tor strains. And in El Tor strains , the infection frequency of IEM101 that had no *rstR* gene is 100 to 1000 times higher than other two strains containing *rstR*. Classical biotype strain is more susceptible to CTX^{ET} Φ particles than El Tor strains. Expression of TCP and the phage immunity mediated by *rstR* gene affect the horizontal transfection of CTX Φ in *V. cholerae* strains.

Key words : *Vibrio cholerae* , CTX Φ , Infection

Foundation item : Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999054102) ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2001AA215191-2)

* Corresponding author. Tel : 86-10-61739458 ; Fax : 86-10-61739156 ; E-mail : kanbiao@icdc.cn

Received date : 03-15-2005

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