

大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇序列的破译及特异分子标识的鉴定

王 威 彭 霞 王 荃 程 剑 松 王 磊*

(南开大学泰达生物技术学院 天津 300457)

摘 要 : 大肠杆菌 O11 是一种可在人畜间交叉传染的强致病菌, 具有潜在流行性爆发的危险。现完成了 O11 O-抗原基因簇的破译, 筛选和鉴定了多种特异分子标识, 并实现了对大肠杆菌 O11 的快速、灵敏和准确的分子分型检测。利用鸟枪法测定大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇的序列全长为 14180bp, 生物信息学方法分析序列结构, 共发现 12 个基因: GDP-L 型岩藻糖合成途径基因 (*gmd*, *fcl*, *gmm*, *manC*, *manB*)、UDP-N 乙酰葡萄糖 C4 异构酶基因 (*gne*)、O-抗原转运酶基因 (*uzx*)、O-抗原聚合酶基因 (*uzy*) 和 4 个糖基转移酶基因; 用 PCR 方法筛选出 2 个针对大肠杆菌 O11 的特异基因和 4 对特异引物, 并进行环境样品检测实验鉴定了该 PCR 检测方法的灵敏度, 设计并筛选出 8 条针对大肠杆菌 O11 的特异探针。

关键词 : 大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇; 分子分型; 特异基因; 探针

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0341-06

大肠杆菌分为 170 余种 O 抗原血清型^[1], O-抗原由含 2~6 个单糖的寡糖单位重复连接组成, 是大肠杆菌等革兰氏阴性菌脂多糖的最外层结构。在大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌中, 大部分编码负责 O-抗原合成的酶的基因相邻排列于两个持家基因 *galF* 和 *gnd* 之间, 在染色体上形成一个基因簇^[2,3]。O-抗原的多样性, 使编码合成 O-抗原的基因簇成为筛选特异分子标识的最佳靶位点之一。

一些大肠杆菌具有较强致病性, 可引起腹泻及尿道炎、败血症等其他非肠道感染疾病, 并能引起人和动物间的交叉传染, 尤其在发展中国家非常流行。在食源性和水源性新发传染病病原中, 最重要的是致病性大肠杆菌, 近几年新发现多种非 O157 的致病性大肠杆菌, 已被证实引起小规模爆发, 并且具有潜在的大规模流行性爆发的危险性^[4,5]。快速、准确地鉴定这些致病菌是控制其传播的重要防御手段。传统的血清学检验方法耗时长、灵敏度低、漏检率高、准确性差, 而近年来 PCR 和基因芯片 (DNA 芯片) 技术等现代分子生物学方法的出现很大程度上弥补了传统方法的不足。其中, 基因芯片技术发展迅速, 并且由于其可实现对生物样品快速、并行、高效的检测, 而必将成为微生物检测鉴定的最佳手段之一。目前, 许多国家将大量的人力和物力投入到

快速鉴定致病菌的研究, 特别是特异 DNA 探针的筛选工作中^[6,21]。

本文研究的大肠杆菌 O11, 属于产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC), 可引起人肠道和尿道感染^[7]等疾病, 是一种人畜交叉传染的较强致病菌, 并且多次在某些地区的牛、猪及环境中被检测到^[8,9], 具有潜在的流行性爆发的危险。目前, 尚未有大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇序列破译及其相关研究的报道。本文在破译大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇序列的基础上, 筛选和鉴定了多种特异分子标识, 并实现了对大肠杆菌 O11 的快速、灵敏和准确分子分型检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 : 大肠杆菌 O11 菌株由澳大利亚悉尼大学 Reeves 教授实验室提供, 受体菌株 (大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α) 由本室保存, pGEM-T-Easy 购自 Promega 公司。

1.1.2 试剂和仪器 : Expand Long Template PCR 酶购自 Boehringer Mannheim 公司, PCR 纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶、Wizard PCR Preps 纯化试剂盒购自 Promega 公司, *Eco*RI、DNaseI、X-Gal、IPTG、氨苄青霉

基金项目: 国家 863 计划 (2002AA2Z2051), 国家杰出青年科学基金资助项目 (30125001)

* 通讯作者。Tel: 86-22-66229584; Fax: 86-22-66229596; E-mail: wanglei@nankai.edu.cn

作者简介: 王 威 (1977-) 男, 山东蓬莱人, 讲师, 博士。主要从事微生物基因组学和功能基因组学研究, 病原微生物的遗传进化和快速检测的研究。

收稿日期: 2005-11-24; 接受日期: 2006-01-09; 修回日期: 2006-02-07

素购自上海 Sangon 公司,引物和探针由北京奥科生物技术有限责任公司合成,dUTP-Cy3 购自 Amersham 公司,杂交液由中国军事医学科学院提供。醛基化玻片为美国 CEL 公司产品, Flexys 生物芯片点样仪为美国 GSI 公司产品,UV 交联仪为 Hoefer 公司产品。

1.2 O-抗原基因簇的鸟枪法测序

采用 Bastin^[10]法提取大肠杆菌 O11 的基因组 DNA。根据 *galF* 基因和 *gnd* 基因分别设计上、下游引物,用长距离 PCR 方法扩增 O-抗原基因簇,合并 6 管 PCR 产物,用 Wizard PCR Preps 纯化试剂盒纯化。用 DNaseI 消化 PCR 纯化产物,提取大小集中在 1.5 ~ 3kb 之间的片段,与 pGEM-T-Easy 载体在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃连接 12h。取连接产物电转化感受态大肠杆菌 DH5 α 涂布在含有氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,37℃培养 12h。筛选白色克隆,用 96 孔平板碱裂解法提质粒,用 *EcoR* I 酶切挑选插入片段在 1kb 以上的克隆。采用 T7/sp6

通用引物,用 ABI3730 型 DNA 自动测序仪测序。

1.3 序列拼接和分析

用英国剑桥 MRC 分子生物学实验室的 Staden package 软件包中 Pregap4/Gap4 软件拼接和编辑序列^[11]。用英国 Sanger 中心 Artemis(7.0 版)发现基因和完成序列注释^[12],用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 blast 软件搜索 GenBank 推测开放的阅读框架的功能,用 ClustalW 软件做序列间的全局比对,用 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜片段的分析。用 BlockMaker 发现基序,用 Pfam 和 Prosite 搜索蛋白质基序数据库。

1.4 特异基因的鉴定

在大肠杆菌 O85 O-抗原基因簇的 *wzx* 和 *wzy* 基因内部各设计 2 对引物(表 1),以所有的不同 O-抗原血清型的 166 株大肠杆菌和 43 株志贺氏菌(表 2)的基因组为模板进行 PCR。PCR 反应条件:95℃预变性 2min,95℃变性 30s,退火温度见表 1,退火 30s,72℃延伸 1min,共 30 个循环,72℃ 5min,反应体系为 25 μ L。

表 1 大肠杆菌 O11 的特异基因 PCR 反应

Table 1 The PCR results of *E. coli* O11 specific genes

Gene	Putative function	Forward primers(base positions), oligonucleotide sequence reverse primers(base positions), oligonucleotide sequence	Length of PCR fragments(bp)	No. of pools giving correct band	Annealing temperature of PCR(°C)
<i>wzx</i>	O-antigen flippase	wl-2162 (1573-1588), 5'-GCACGCTTACTTACAC-3' wl-2163 (1951-1967), 5'-TTCCTATTAGTACTGCT-3'	395	0*	48
		wl-2164 (1227-1243), 5'-TGAACCTACAGGATACG-3' wl-2165 (1888-1903), 5'-CGTGATGTTCCGCAAT-3'	677	0*	52
<i>wzy</i>	O-antigen polymerase	wl-2166 (3154 -3169), 5'-TTTGCCCTCTTGCTTTA-3' wl-2167 (3998-4013), 5'-TACTGCTCCGTTCTCA-3'	860	0*	52
		wl-2168 (3529-3544), 5'-AATAAGCGTAATCCCA-3' wl-2169 (4034-4051), 5'-TCAAATGAAGAAAACGAC-3'	523	0*	52

* Only the pools containing *E. coli* O11 gave the PCR products of correct size.

表 2 166 株大肠杆菌和 43 株志贺氏菌的分组及来源

Table 2 166 *E. coli* and 43 *Shigella* type strains and PCR pools used for testing

Pool No.	Strains of which chromosomal DNA included in the pool	Source
1.	<i>E. coli</i> type strains O1 ,O2 ,O5 ,O7 ,O8 ,O9 ,O12 ,O13 ,O14 ,O15 ,O16 ,O17 ,O18 , O19ab ,O20 ,O21 ,O22 ,O23 ,O24	IMVS ^a
2.	<i>E. coli</i> type strains O4 ,O10 ,O25 ,O26 ,O27 ,O28 ,O29 ,O30 ,O32 ,O33 ,O34 ,O35 ,O36 ,O37 ,O38 ,O40 ,O41 ,O42 ,O43	IMVS ^a
3.	<i>E. coli</i> type strains O6 ,O44 ,O45 ,O46 ,O48 ,O49 ,O50 ,O51 ,O52 ,O54 ,O55 ,O56 ,O57 ,O58 ,O60 ,O61 ,O62 ,O53	IMVS ^a
4.	<i>E. coli</i> type strains O63 ,O65 ,O66 ,O69 ,O70 ,O71 ,O74 ,O75 ,O76 ,O77 ,O78 ,O79 ,O80 ,O81 ,O82 ,O83 ,O68	IMVS ^a
5.	<i>E. coli</i> type strains O84 ,O85 ,O86 ,O87 ,O88 ,O89 ,O90 ,O91 ,O92 ,O98 ,O99 ,O101 ,O102 ,O103 ,O104 ,O105 ,O106 ,O97	IMVS ^a
6.	<i>E. coli</i> type strains O107 ,O108 ,O109 ,O111 ,O112ab ,O112ac ,O113 ,O115 ,O116 ,O118 ,O120 ,O123 ,O125 ,O126 ,O128 ,O117	IMVS ^a
7.	<i>E. coli</i> type strains O129 ,O130 ,O131 ,O132 ,O133 ,O134 ,O135 ,O136 ,O137 ,O138 ,O139 ,O141 ,O142 ,O143 ,O144 ,O145 ,O140	IMVS ^a
8.	<i>E. coli</i> type strains O146 ,O147 ,O148 ,O150 ,O152 ,O154 ,O156 ,O157 ,O158 , O159 ,O160 ,O161 ,O163 ,O164 ,O165 ,O166 ,O153	IMVS ^a
9.	<i>E. coli</i> type strains O168 ,O169 ,O170 ,O171 ,O172 ,O173 ,	b
	and <i>S. dysenteriae</i> type strains D1 ,D2 ,D3 ,D4 ,D5 ,D6 ,D7 ,D8 ,D9 ,D10 ,D11 ,D12 ,D13	d
10.	<i>S. boydii</i> type strains B1 ,B2 ,B3 ,B4 ,B6 ,B7 ,B8 ,B9 ,B10 ,B11 ,B12 ,B13 ,B14 ,B15 ,B16 ,B17 ,B18	d
11.	<i>S. flexneri</i> type strains F1a ,F1b ,F2a ,F2b ,F3 ,F4a ,F4b ,F5 (v 4) ,F5 (v 7) ,F6 ,DS ,DR	d
12.	<i>E. coli</i> type strains O3 ,O110 ,O39 ,O59 ,O64 ,O73 ,O96 ,O95 ,O114 ,O151 ,O155 , O124 ,O167 ,O162 ,O121 ,O127 ,O149 ,O119	IMVS ^a
13.	Same as pool 12 , with <i>E. coli</i> O11 added	IMVS ^a

a. Institute of Medical and Veterinary Science, Anelaide, Australia; b. Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark; c. O172 and O173 from Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark, the rest from IMVS; d. Institute of Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing, People's Republic of China.

1.5 环境样品的检测

1.5.1 基因组 将提取的基因组按 $10^1 \sim 10^9$ 分别做梯度稀释, OD 检测并换算成质量含量。分别取 $1 \mu\text{L}$ 稀释好的基因组为模板, 用 4 对特异引物进行 PCR 反应。PCR 反应条件同上。

1.5.2 掺入猪肉 分别在 5 份生猪肉馅(20g/份)中掺入 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、5 个和 0 个活菌, 搅拌均匀, 加入 200mL LB 培养基, 经纱布过滤, 滤液于 37°C 200r/min 培养 3~5h。分别取 $1 \mu\text{L}$ 培养的菌液水煮裂解上清液为模板, 按上述相同条件进行 PCR 反应。

1.5.3 掺入粪便 将 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、5 个和 0 个活菌分别掺入 5 份各 0.2g 的粪便样品中, 于 37°C 200r/min 培养 3~5h, 取 1.2mL 菌液用试剂盒提取基因组。取 $1 \mu\text{L}$ 基因组为模板, 按上述相同条件进行 PCR 反应。

1.6 基因芯片特异探针的筛选

1.6.1 探针设计 用 OligoArray2.1 在大肠杆菌 O11 O 抗原基因簇中的 *wzx* 和 *wzy* 基因内部的不同位置各设计 6 条探针。

1.6.2 芯片和样品制备 50% DMSO 溶解探针, 以醛基化玻片为载体, 利用 Flexys 生物芯片点样仪点样制备芯片。室温过夜, 在 UV 交联仪中 $60\text{mJ}/\text{cm}^2$ 下交联 2 次, 保存备用; 以基因组为模板, 特异引物一步扩增获得被 dUTP-Cy3 标记的双链 PCR 产物。

1.6.3 杂交和扫描 以无菌去离子水冲洗芯片, 置于杂交炉(Hybrid ST200, England)中 45°C 烘干并预热。将烘干的标记 PCR 产物, 用 $30 \mu\text{L}$ 杂交液-2 充分混合均匀, 取 $15 \mu\text{L}$ 于 PCR 仪中 98°C 变性 5min, 点至芯片上 40°C 杂交 16h。杂交结束后, 分别用洗液洗涤并烘干, 使用 Genepix 4100A 芯片扫描仪, 以 532nm 波长的通道扫描芯片, Genepix pro 4.1 软件分析结果。

2 结果和讨论

2.1 大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇的序列测定

以基于 *galF* 基因设计的上游引物(# w11523: 5'-ATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAAT-3')和基于 *gnd* 基因设计的下游引物(# w11524: 5'-TAGTCGCGTGNGCCTGGATTAAGTTCGC-3'), 采用长 PCR 方法扩增大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 15kb 附近的位置出现一条电泳带。根据帕松公式 $p^0 = e^{-mwl/L}$ (p_0 : 未测定序列的概率, m : 测定序列的克隆数, w : 序列平均

长度, L : 测序模板总长)^[13], 以序列平均读长 600bp 计算, 要保证每个碱基 3 倍覆盖的高质量序列并且获得对 15kb 测序模板的 95% 的覆盖率, 至少要进行 75 个克隆以上的测序反应。但实际上, 需要进行比理论计算更多的测序反应才能达到预期的效果。本文对 100 个插入片段在 1kb 以上的克隆进行单向(T7)测序, 并对部分克隆进行反向(sp6)测序打通序列缺口, 经 Pregap4 和 Gap4 软件拼接和编辑得到大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇的全序列, 序列全长 14180bp。

2.2 大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇的序列分析

大肠杆菌的 O-抗原基因簇一般含有 3 类基因: 单糖合成酶基因、糖基转移酶基因和寡糖单位处理基因。我们用 orffinder 在大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇中发现基因, 共找到 12 个开放的阅读框(除 *galF* 和 *gnd*)(图 1)。采用生物信息学方法对大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇中基因的功能进行了预测(表 3)。

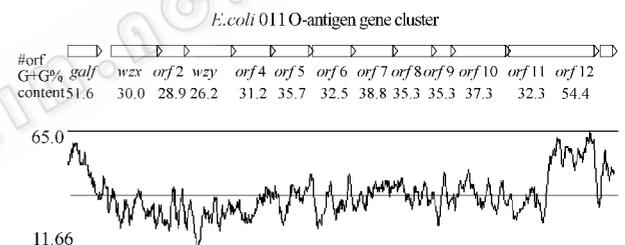


图 1 大肠杆菌 O11 O-抗原基因簇结构

Fig.1 Structure of *E. coli* O11 O-antigen gene cluster.

2.2.1 单糖合成酶基因 大肠杆菌中的常见糖由于它们为细菌基础代谢底物, 其合成酶基因存在于基因组的其它位置, 一般不在 O-抗原基因簇里重复出现, 而罕见糖需由 O-抗原基因簇的单糖合成酶基因负责合成。单糖合成酶基因由于有极高的同源性, 很容易通过与已知功能基因的序列进行比较而鉴定。通过检索和比较, 在大肠杆菌 O11 的 O-抗原基因簇中发现 UDP-N 乙酰葡萄糖 C4 异构酶基因和一套编码 GDP-L 型岩藻糖合成酶的基因, 我们推测在大肠杆菌 O11 的 O-抗原的结构中可能存在两种罕见单糖。

orf5 编码的蛋白与小肠结肠耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica* type O:8)中编码的 UDP-N 乙酰葡萄糖 C4 异构酶(由 *gne* 基因编码)有 61% 的氨基酸序列一致性, 75% 的相似性, 通过对 Pfam 蛋白质序数据库的搜索, 发现 *orf5* 编码的蛋白与已知的 UDP-N 乙酰葡萄糖 C4 异构酶的共有序列的同源性

预期值为 $1.1e^{-136}$, 因此我们将这个基因命名为 *gne*。UDP-N 乙酰葡萄糖 C4 异构酶催化 UDP-N-乙

酰葡萄糖中的第四位碳异构化, 形成 UDP-N-乙酰半乳糖。

表 3 大肠杆菌 O11 O 抗原基因簇中基因的功能

Table 3 Function of genes in *E. coli* O11 O antigen gene cluster

Gene	Location in sequence	No. of aa	(G + C) %	Similar proteins (accession no. of aa in GenBank)	% Identical/% similar (aa overlap)	Putative function
<i>wzx</i>	1138 - 2373	411	30.0	putative O-antigen transporter <i>Escherichia coli</i> K12 (AAC75098)	38/62 (403)	O-antigen flippase
<i>orf2</i>	2382 - 3107	241	28.9	putative glycosyl transferase <i>Escherichia coli</i> (AAG41755)	35/62 (224)	glycosyl transferase
<i>wzy</i>	3104 - 4339	411	26.2	O-antigen polymerase <i>Wzy Escherichia coli</i> (AAD50486)	23/46 (398)	O-antigen polymerase
<i>orf4</i>	4341 - 5408	355	31.2	putative glycosyltransferase <i>Campylobacter jejuni</i> (AAM90643)	28/49 (344)	glycosyl transferase
<i>gne</i>	5429 - 6445	338	35.7	Gne <i>Yersinia enterocolitica</i> (type 0 8 X AAC60777)	61/75 (336)	glcNAc 4-epimerizase
<i>orf6</i>	6514 - 7521	335	32.5	mannosyltransferase-like protein <i>Yersinia pestis</i> (CAB63280)	51/69 (337)	glycosyl transferase
<i>gmd</i>	7532 - 8653	373	38.8	GDP-mannose-4 β -dehydratase <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (type 0 1b X CAB63300)	84/91 (372)	GDP-mannose-4 β -dehydratase
<i>fcl</i>	8657 - 9622	321	35.3	Fcl <i>Yersinia enterocolitica</i> (type 0 8 X AAC60774)	72/86 (320)	GDP-L-fucose synthetase
<i>gmm</i>	9625 - 10080	151	35.3	GDP-mannose mannosylhydrolase <i>Klebsiella pneumoniae</i> (BAD03940)	50/72 (146)	GDP-mannose mannosylhydrolase
<i>manC</i>	10092 - 11477	461	37.3	mannose-1-phosphate guanylyltransferase <i>Salmonella enterica</i> (AAB49390)	59/78 (463)	mannose-1-phosphate guanylyltransferase
<i>orf11</i>	11561 - 12307	248	32.3	putative glycosyl transferase <i>Escherichia coli</i> (AAG41755)	100/100 (326)	glycosyl transferase
<i>manB</i>	12332 - 13702	456	54.5	phosphomannomutase <i>Shigella sonnei</i> (AAC80270)	98/99 (456)	phosphomannomutase

orf7, *orf8*, *orf9*, *orf10*, *orf12* 分别与 *gmd*, *fcl*, *gmm*, *manC*, *manB* 基因有很高的序列一致性。Gmd, Fcl, ManC, ManB 是负责合成 GDP-L 型岩藻糖的重要酶。6-磷酸果糖在焦磷酸甘露糖异构酶(ManA)、磷酸甘露糖变位酶(ManB)及 1-磷酸甘露糖鸟苷酸转移酶(ManC)的作用下形成 GDP-甘露糖, GDP-甘露糖在 GDP-甘露糖 C4 β 位脱水酶(GMD)和 GDP-L-岩藻糖合成酶(Fcl)的作用下通过 3 步反应得到 GDP-L 型岩藻糖^[14, 15]。*manB* 和 *manC* 基因一般位于 O 抗原基因簇中, 而 *manA* 基因在基因组的其他位置。Gmm 是 GDP-甘露糖水解酶, 普遍存在于含有 GDP-L 型岩藻糖的 O 抗原的基因簇中, 其在 GDP-L 型岩藻糖合成途径中的具体功能未知。因此我们推测大肠杆菌 O11 的 O 抗原中含有 GDP-L 型岩藻糖, 并将 *orf7*, *orf8*, *orf9*, *orf10*, *orf12* 相应命名为 *gmd*, *fcl*, *gmm*, *manC*, *manB*。

2.2.2 寡糖单位处理酶基因: 寡糖单位处理酶基因包括 O-抗原转运酶基因(*wzx*)和 O-抗原聚合酶基因(*wzy*), 其编码的蛋白由于有典型的 10 ~ 14 个跨膜片段, 可以用生物信息学方法鉴定^[16, 17]。*orf1* 和 *orf3* 是大肠杆菌 O11 中仅有的两个编码存在跨膜片段的蛋白的基因。*orf1* 编码的蛋白与大肠杆菌 K12 的 O-抗原转移酶有 38% 的序列一致性, 62% 的相似性, 并且有 12 个均匀的跨膜片段(*Wzx* 蛋白的典型特征), 所以命名为 *wzx*。*orf3* 编码的蛋白与大肠杆菌(AAD50486)的 O-抗原聚合酶有 23% 的一致性, 46% 的相似性, 并且有 10 个跨膜片段和 1 个大的胞质内亲水环(*Wzy* 蛋白的典型特征), 所以命名为 *wzy*。

2.2.3 糖基转移酶基因: *orf2*, *orf4*, *orf6*, *orf11* 4 个基因编码的蛋白与其他已知的糖基转移酶有较高的序列一致性和相似性。通过对 Pfam 中糖基转移酶基序数据库的搜索, 这 4 个基因编码的蛋白与已知的糖基转移酶家族 1 和 2 的共有序列具有较高的同源性, 我们推测这 4 个基因编码糖基转移酶, 命名为 *orf2*, *orf4*, *orf6*, *orf11*。通常情况下每个糖基转移酶特异性催化形成一种二糖键, 因此我们推测大肠杆菌 O11 的 O-抗原的寡糖单位可能由 5 个单糖组成。

2.3 大肠杆菌 O11 特异基因的鉴定

大肠杆菌的 O-抗原基因簇中的寡糖单位处理基因和糖基转移酶基因有很高特异性^[18]。我们针对这两个基因设计 PCR 引物, 在每个基因内设计两对引物, 每对引物分布在相应基因内的不同区域, 以确保其检测的准确性。对所有 166 株大肠杆菌和 43 株志贺氏菌分组进行 PCR 反应, 并以含有大肠杆菌 O11 的第 13 组菌作为正对照(表 1)。每对引物除了第 13 组中得到了正确大小的一条带, 在其他组中都没有扩增到任何电泳可见产物, 所以大肠杆菌 O11 的 *wzx* 和 *wzy* 基因对大肠杆菌 O11 是高度特异的(表 3)。本文提供的引物, 以及基于这两个基因设计的其他引物和探针可作为特异分子标识, 用于快速准确地检测人体、畜类和环境中大肠杆菌 O11 型菌。

2.4 在环境样品中检测大肠杆菌 O11

传统方法检测食品、粪便、污水等样品中致病菌的步骤繁琐费时, 需经富集培养、分离培养、形态特征观察、生理生化反应、血清学鉴定以及必要的动物

试验等过程,并且无法对那些难以人工培养的微生物进行检测。1998年在美国国家传染病控制中心召开的世界各国专家和官员参加的讨论如何改进传统的血清学鉴定方法的会议,其主要结论便是必须尽快研究可靠的基于DNA分子的细菌鉴定方法。

本文在采用特异引物的PCR检测方法针对基因组及掺入猪肉、掺入粪便两种模拟环境样品中的大肠杆菌O11进行检测,得到检测灵敏度分别为 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 0.25cfu/g 和 $2.5 \times 10^3\text{cfu/g}$,检测时间为6~10h。实验结果表明,该方法检测灵敏度高、速度快,相比传统检测方法具有明显的优势。

2.5 大肠杆菌 O11 特异探针的筛选

基于探针 T_m 值和长度的考虑,通过软件共设计出12条探针。经过3次稳定杂交,筛去4条杂交无信号或信号弱的探针(编号PX2,5和PY1,4),最后筛选鉴定出针对大肠杆菌O11特异的探针8条(表4,图2)。

表4 大肠杆菌 O11 特异探针的筛选

Table 4 Selection of *E. coli* O11 specific probes

Target gene	No. of probes	Location	Length /bp	$T_m/^\circ\text{C}$	Result of hybridization
uuz	PX1	1320-1358	39	79.2	+
	PX2	1391-1430	40	80.0	-
	PX3	1505-1544	40	80.1	+
	PX4	1723-1762	40	79.6	+
	PX5	1740-1776	37	78.9	-
	PX6	1814-1849	36	79.0	+
uzy	PY1	3291-3330	40	80.3	-
	PY2	3425-3464	40	80.2	+
	PY3	3488-3526	39	79.8	+
	PY4	3603-3641	39	80.0	-
	PY5	3810-3845	36	78.9	+
	PY6	3859-3896	38	79.2	+

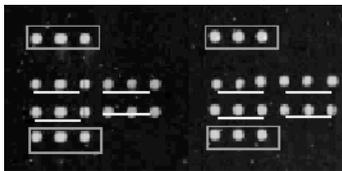


图2 大肠杆菌 O11 特异探针的杂交

Fig.2 Hybridization of *E. coli* O11 specific probes. Dots circled by frames are *E. coli* 16S rDNA probes. Underlined dots are *E. coli* O11 specific probes, PX1, PX3, PX4, PX6 (first row, from left to right); PY2, PY3, PY5, PY6 (second row, from left to right).

随着基因组学的飞速发展,大量动、植物和微生物的基因组信息相继获得,基因芯片(DNA芯片)技术得到广泛重视和快速发展,在食品安全、医疗检测、药物筛选、生物安全等领域具有巨大的应用价值^[19,20]。目前,在基于基因芯片技术对病原微生物

的检测领域,特异DNA片段或探针的筛选是最关键的环节。O-抗原是极强的抗原,是大肠杆菌和志贺氏菌重要的致病因素之一,同时它又具有极强的多样性,这启示我们可将其作为重要的研究对象。*stx*和*eae*基因是至今除O-抗原基因簇以外最好的靶基因^[21],但它们的特异性远远低于本研究所用的特异基因。本文筛选的大肠杆菌O11的探针具有很好的特异性和稳定性,为开发针对致病性大肠杆菌的快速检测基因芯片提供了必要的基础。

参 考 文 献

- [1] Whitfield C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol*, 1995, **3**: 178-185.
- [2] Reeves PR. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 1996, **4**: 495-503.
- [3] Curd H, Liu D, Reeves PR. Relationships among the O antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3. *J Bacteriol*, 1998, **180**(4): 1002-1007.
- [4] Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O111 and O128 isolated in the United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. *Epidemiol Infect*, 1993, **111**: 429-438.
- [5] Schmidt HGC, Tarr I, Frosch M, et al. Non-O157 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis*, 1999, **179**: 115-123.
- [6] Park CH, Vandel NM, Hixon DL. Rapid Immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**: 988-990.
- [7] Ramchandani M, Manges AR, DebRoy C, et al. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*, 2005, **40**(2): 251-257.
- [8] Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ, et al. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the national animal health monitoring system's swine 2000 study. *Appl Environ Microb*, 2004, **70**(12): 7173-7178.
- [9] Vermoey-Rozand C, Montet MP, Bertin Y, et al. Serotyping, *stx2* subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157: H7 strains isolated from the environment in France. *Appl Environ Microb*, 2004, **70**(4): 2556-2559.
- [10] Bastin DA, Reeves PR. Sequence and analysis of the O antigen gene (*rfb*) cluster of *Escherichia coli* O111. *Gene*, 1995, **164**: 17-23.
- [11] Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotech*, 1996, **5**: 233-241.
- [12] Rutherford K, Parkhill J, Crook J, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 2000, **16**(10): 944-945.

- [13] Frangeul L , Nelson KE , Buchrieser C , *et al.* . Cloning and assembly strategies in microbial genome projects. *Microbiology* , 1999 , **145** : 2625 – 2634.
- [14] Ginsburg V. Studies on the biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose. *J Biol Chem* , 1961 , **236** : 2389 – 2393.
- [15] Frick DN , Townsend BD , Bessman MJ. A novel GDP-mannose mannosyl hydrolase shares homology with the MutT family of enzymes. *J Biol Chem* , 1995 , **270** (41) : 24086 – 24091.
- [16] Wang L , Reeves PR. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect Immun* , 1998 , **66** : 3545 – 3551.
- [17] Wang L , Curd H , Qu WJ , *et al.* . Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111 Specific genes. *J Clin Microbiol* , 1998 , **36** (11) : 3182 – 3187.
- [18] Wang L , Reeves PR. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect Immun* , 1998 , **66** : 3545 – 3551.
- [19] Liu-Stratton Y , Roy S , Sen CK. DNA microarray technology in nutraceutical and food safety. *Toxicol Lett* , 2004 , **150** (1) : 29 – 42.
- [20] Dudda-Subramanya R , Lucchese G , Kanduc D , *et al.* . Clinical applications of DNA microarray analysis. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 2003 **3** : 297 – 304.
- [21] Fratamico PM , Sackitey SK , Wiedmann M , *et al.* . Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* , 1995 **33** : 2188 – 2191.

Sequence of *Escherichia coli* O11 O-antigen gene cluster and identification of molecular markers specific to O11

WANG Wei , PENG Xia , WANG Quan , CHENG Jian-song , WANG Lei*

(TEDA School of Biological Sciences , Nankai University , Tianjin 300457 , China)

Abstract : *Escherichia coli* O11 belongs to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) , which can cause food-borne disease , hemorrhagic colitis , and hemolytic-uremic syndrome (HUS) in humans. Because of its character of specificity , the O-antigen gene cluster provides the best material for the selection of molecular markers which can be used for rapid genotyping of bacterial strain. In this study , the *E. coli* O11 O-antigen gene cluster was amplified by Long-range PCR and was sequenced using Shotgun-sequencing approach. Twelve open reading frames were assigned functions on the basis of homology in the *E. coli* O11 O-antigen gene cluster , including UDP-N-acetyl glucosamine-4-epimerase gene (*gne*) , genes responsible for the biosynthesis of GDP-L-fucose (*gmd* , *fcl* , *gmm* , *manC* , *manB*) , glycosyl transferase genes , O-unit flippase gene (*wzx*) and O-antigen polymerase gene (*wzy*). By polymerase chain reaction against representative stains for all the 166 *E. coli* and 43 *Shigella* O serotypes , two genes and four pairs of primers were identified to be specific to *E. coli* O11. Further PCR was done to detect *E. coli* O11 from the environmental specimens , and the sensitivities for detecting *E. coli* O11 from the pork and dejecta specimens were 0.25cfu/g and 2.5×10^3 cfu/g , respectively. Moreover , eight probes were designed and proved to be unique to *E. coli* O11 , which provides the basis for a sensitive test of the rapid detection of *E. coli* O11 by DNA microarray method.

Keywords : *Escherichia coli* O11 ; O-antigen ; DNA microarray