

产志贺毒素大肠杆菌 O18 XZ113 株主要毒力基因 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 突变株的构建及其对小鼠的致病作用

薛涛, 陈先亮, 高崧*, 刘秀梵

扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009

摘要: 【目的】探讨毒力基因 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 与产志贺毒素大肠杆菌 O18 致病力的关系。【方法】利用 λ -Red 重组系统, 构建 STEC XZ113 株 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 基因缺失突变株并进行一系列生物学特性的研究。【结果】细胞粘附试验表明突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 对 HEp-2 细胞的粘附能力明显降低; Vero 细胞毒素试验表明突变株 XZ113 $\Delta stx2$ 失去了使 Vero 细胞发生病变的能力; 溶血活性试验表明突变株 XZ113 $\Delta ehxA$ 无法在血平板上产生溶血圈, 丢失了溶血能力。回复株在以上表型方面与野生株 XZ113 一致; 与亲本株的体外竞争试验结果表明, 突变株竞争力减弱, 体内竞争结果表明突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 被中度致弱; 突变株 XZ113 $\Delta stx2$ 和突变株 XZ113 $\Delta ehxA$ 被高度致弱。【结论】*stx2*、*ehxA* 基因在 STEC O18 XZ113 株的致病过程中发挥着更为重要的作用。

关键词: 产志贺毒素大肠杆菌, O18, *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 基因, 突变株, 致病性

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)12-1655-08

由产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 所引起的人类疾病不断被报道。据统计, 从患病人体内已经分离到了 472 种血清型的 STEC^[1]。其中 O157:H7 是典型的致病血清型, 但在某些地区, 非 O157 STEC 菌株比 O157 STEC 菌株更容易从腹泻或 HUS 病人体内分离到^[2]。据 WHO 统计显示, 从患有 HUS 病人样本所分离的 STEC 中, 非 O157 STEC 所占的比例为 7% - 90%^[3]。由于非 O157 STEC 在动物中的带菌率比较高, 因此对食物污染的机率比 O157 更大^[4]。但对非 O157 STEC 的监测仅局限于少量的实验室, 对它们的认识水平也比较低^[5]。

近年来, 肠出血性大肠杆菌 (entero-hemorrhagic *E. coli*, EHEC) O157:H7 毒力基因的研究取得了

突破性进展。据对 GenBank 中 O157:H7 分离株的全基因组序列进行的不完全统计, 迄今至少有 19 株 O157:H7 分离株完成了全基因组测序工作。研究表明 O157:H7 的主要毒力基因包括染色体上原噬菌体编码的志贺毒素基因 (*stx*)、LEE 致病岛上决定 A/E 表型的基因和质粒编码的肠溶血素基因^[6]。志贺毒素是一种决定 EHEC 特性的最为重要的毒力因子, 是导致 O157 感染病人出现 HC、HUS 的主要原因^[7]。Stx 毒素按照抗原性和免疫原性的不同, 分为 Stx1 和 Stx2 两种类型。LEE 是位于染色体上编码毒力因子的基因群, 它所编码的毒力因子是引起肠黏膜黏附与脱落 (attaching and effacing, A/E) 损伤所必需的。许多研究认为, 引起 A/E 损伤最主要的一个基因就是 *eae* 基因^[8]。几乎所有的 EHEC

基金项目: 国家自然科学基金 (30972196, 30771460, 30471281); 国家“863 计划” (2003AA222141); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者。Tel: +86-514-87991448; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 薛涛 (1982-) 女, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事产志贺毒素大肠杆菌相关方面的研究。E-mail: netbf1982@sina.com

收稿日期: 2011-06-22; 修回日期: 2011-09-25

O157:H7 均含有一个约 90 kb 的大质粒 pO157。肠溶血素基因就位于这个大质粒上,它由 4 个片段构成,即 *hlyA* *hlyB* *hlyC* 和 *hlyD*。尽管 HUS 病人能够产生肠溶血素抗体,但肠溶血素在 EHEC 致病过程中所扮演的角色现在研究的还不是很清楚^[9]。

虽然非 O157 STEC 和 O157 STEC 同属特定的致病大肠杆菌类型,但它们在毒力、组织嗜性及致病力的分子机制方面仍然存在一定的差异^[10]。本文以从健康奶牛分离的对小鼠具有高致病力的 STEC XZ113 (O18:H-) 株主要毒力基因 *eaeA* *stx2* *ehxA* 为研究对象,运用分子生物学的方法构建 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 基因缺失突变株,评价其致病性,探讨 *eaeA* *stx2* *ehxA* 基因与 STEC XZ113 株致病性的关系,为研制相应疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:实验所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: Agarose Gel DNA Purification Kit 购自大连 TaKaRa 公司; Taq DNA Polymerase、T4 连接酶购自 Fermentas 公司;博来霉素 (Zeocin)、卡那霉素 (Kanamycin)、氯霉素 (Chloramphenicol) 购自 Invitrogen 公司;萘啶酮酸 (nalidixic acid, Nal), 上海生工生物工程技术有限公司进口分装。PCR clean up kit 购自杭州 AXYGEM 公司; IPTG、X-gal、氨苄青霉素 (Ampicillin) 购自德国 Roche 公司;抗生素使用浓度为:氨苄青霉素 60 μ g/mL、卡那霉素 50 μ g/mL、博来霉素 25 μ g/mL、氯霉素 30 μ g/mL、萘啶酮酸 50 mg/L。核酸蛋白检测仪,德国 Eppendorf 公司;恒温金属浴 (CHB-100 型),杭州大和热磁电子有限公司;PCR 仪 2400 型,美国 Applied biosystem 公司;BIO-RAD3000XI 型电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;UV-2000 紫外分析仪,天能科技(上海)有限公司;电穿孔仪,德国 Eppendorf 公司;Spectrophotometer (NanoDropR ND-1000)。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Source
bacteria		
XZ113	cattle-origin STEC serotype O18:H-	this study
DH5 α	endA1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^R) RelA1 Δ (lacIZYA-argF) U169deoR (ϕ 80d lac Δ (lacZ) M15) Stable	Invitrogen
XZ113 Δ <i>eaeA</i>	<i>eaeA</i> mutant of XZ113, Zeo ^R	this study
XZ113 Δ <i>stx2</i>	<i>stx2</i> mutant of XZ113, Kan ^R	this study
XZ113 Δ <i>ehxA</i>	<i>ehxA</i> mutant of XZ113, Cam ^R	this study
plasmids		
pGEM-T ^R EasyVector	TA cloning Vector, Ap ^R	Promega
pT- <i>eaeA</i>	<i>eaeA</i> cloned into pGEM-T ^R Easy Vector	this study
pT- <i>stx2</i>	<i>stx2</i> cloned into pGEM-T ^R Easy Vector	this study
pT- <i>ehxA</i>	<i>ehxA</i> cloned into pGEM-T ^R Easy Vector	this study
pBluescript II SK (-)	cloning vector	Fermentas
pS- <i>eaeA</i>	<i>EcoR</i> I- <i>EcoR</i> V <i>eaeA</i> fragment cloned into SK (-)	this study
pS- <i>stx2</i>	<i>EcoR</i> I <i>stx2</i> fragment cloned into SK (-)	this study
pS- <i>ehxA</i>	<i>Pst</i> I <i>ehxA</i> fragment cloned into SK (-)	this study
pEM7/Zeo	Zeocin-resistant cassette	Invitrogen
pUC4K	Kanamycin-resistant cassette	Invitrogen
pKD3	Chloramphenicol-resistant cassette	Invitrogen
pS- <i>eaeA</i> -Zeo	Zeocin-resistant gene inserted into pS- <i>eaeA</i>	this study
pS- <i>stx2</i> -Kana	Kanamycin-resistant gene inserted into pS- <i>stx2</i>	this study
pS- <i>ehxA</i> -Cam	Chloramphenicol-resistant gene inserted into pS- <i>ehxA</i>	this study
pGEX-6p-1	expressing vector for use with <i>E. coli</i>	Pharmacia
pGEX-6p-1- <i>eaeA</i>	<i>BamH</i> I- <i>Sal</i> I <i>eaeA</i> fragment cloned into pGEX-6p-1	this study
pGEX-6p-1- <i>stx2</i>	<i>BamH</i> I- <i>Sal</i> I <i>stx2</i> fragment cloned into pGEX-6p-1	this study
pGEX-6p-1- <i>ehxA</i>	<i>BamH</i> I- <i>Sal</i> I <i>ehxA</i> fragment cloned into pGEX-6p-1	this study

1.1.3 试验动物:清洁级 BALB/c 小鼠,雌性,3 周龄,体重 10 g - 12 g,由扬州大学实验动物中心提供。

1.2 分子生物学及数据分析软件

Primer Premier 5.0 引物设计软件;Lasergene 序列分析软件;SPSS 13.0 数据分析软件。

1.3 质粒 pS-*eaeA*-Zeo, pS-*stx2*-Kana 及 pS-*ehxA*-Cam 的构建

用引物 *OeaeA*-F/R、*Ostx2*-F/R、*OehxA*-F/R (见表 2) 分别扩增 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 基因,并将其分别插入到 pBSK 载体的多克隆位点中,再运用基因重组的方法将三种抗性基因 *Zeo*、*Kan*、*Cam* 分别插入到各自的基因中,构建出带抗性基因标志的重组质粒 pS-*eaeA*-Zeo、pS-*stx2*-Kan 和 pS-*ehxA*-Cam^[11]。

表 2 引物序列

Table 2 Nucleotide sequences of synthetic oligonucleotide primers

Primer code	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp / °C
<i>OeaeA</i> -F	GCAGTCGACTTGGTAGCCAGCTCCAGT <i>Sal</i> I	55
<i>OeaeA</i> -R	TCAGGATCCTTTCGGTCATAGGCGCGA <i>Bam</i> H I	55
<i>Ostx2</i> -F	CGCGTCGACAAATGGTACTGTGCCTG <i>Sal</i> I	55
<i>Ostx2</i> -R	TCAGGATCCGAAACGCTGCAGCTGTAT <i>Bam</i> H I	55
<i>OehxA</i> -F	TCAGTCGACATCAGGCATGGCTCTTGA <i>Sal</i> I	55
<i>OehxA</i> -R	CGCGGATCCGATGCTCCTGTGCATCA <i>Bam</i> H I	55
<i>eaeA</i> -Re-F	TCAGGATCCATGATTACTCATGGTTTT <i>Bam</i> H I	52
<i>eaeA</i> -Re-R	GCAGTCGACTTATTTTACACAAACAGA <i>Sal</i> I	52
<i>stx2</i> -Re-F	TCAGGATCCATGAAGTGATATATTATT <i>Bam</i> H I	55
<i>stx2</i> -Re-R	GCAGTCGACTTATTTACCCGTTGTATA <i>Sal</i> I	55
<i>ehxA</i> -Re-F	TCAGGATCCATGACAGTAAATAAAATA <i>Bam</i> H I	50
<i>ehxA</i> -Re-R	GCAGTCGACTCAGACAGTTGTCGTTAA <i>Sal</i> I	50

1.4 运用 Red-重组功能构建基因缺失突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA*

将 PCR 扩增的片段 *eaeA*-Zeo、*stx2*-Kan 及 *ehxA*-Cam 分别电转化到含有 pKD46 的感受态细胞 XZ113 中,通过 λ -Red 重组系统产生了 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 基因缺失突变株^[11]。

1.5 突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 生物学特性的研究

1.5.1 细菌生长曲线的测定:LB 肉汤中过夜培养的野生株 XZ113 和突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 加入 10 mL 的 LB 肉汤中(调节 OD_{600} = 0.05)。在 37°C 恒温摇床中,以 220 r/min 振荡培养;在培养后的 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 和 4 h 测定培养物的 OD_{600} 值,并绘制细菌的生长曲线。

1.5.2 体内外竞争试验:细菌的培养:将细菌在麦康凯平板上 37°C 静置培养 18 h,挑取 10 个菌落在 LB 固体培养基上划线,37°C 静置培养 4 h;用 1 mL 含 15% 甘油的 PBS 将 LB 平板上的所有菌落刮下,将细菌浓度调至 10^{10} CFU/mL。

在体外竞争试验时,将 XZ113 野生株与突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 分别以 1:1 的比例混匀,接种于 LB 肉汤 37°C 静置培养 4 h。分别用有 Zeocin、Kanamycin 或 Chloramphenicol 抗性的和无抗性的 LB 固体培养基进行细菌计数,18 h 后观察结果。

在体内竞争试验时,对 XZ113 野生株与突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 分别进行萘啶酮酸的抗性诱导^[11]。每组 10 只 3 周龄 BALB/c 雌鼠,共分为 3 组。将 XZ113 野生株与突变株 XZ113 Δ *eaeA*、XZ113 Δ *stx2* 及 XZ113 Δ *ehxA* 分别以 1:1 的比例混匀,每只小鼠灌胃接种 0.2 mL 的混合菌液(每只小鼠最终接种野生株、突变株各 5×10^9 CFU)。接种 24 h 和 48 h 后,分别扑杀 4 只小鼠,无菌取心血及内脏器官中的肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、盲结肠称重后研磨,经稀释后用有 Zeocin、Kanamycin 或 Chloramphenicol 抗性的和 Nal 抗性的 LB 固体培养基进行细菌计数,18 h 后观察结果。

竞争指数 (CI) 的计算方法是:输出量的比率(突变株/野生株)除以输入量的比率(突变株/野生株)。如 CI 值在 0.1 - 1 之间,说明突变株的毒力被轻度致弱;若 CI 值在 0.01 - 0.1 之间,说明突变株的毒力被中度致弱;若 CI 值在 0 - 0.01 之间,说明突变株的毒力被高度致弱^[12]。

1.6 突变株的回复拯救试验

1.6.1 重组质粒 pGEX-6p-1-*eaeA*、pGEX-6p-1-*stx2* 和 pGEX-6p-1-*ehxA* 的构建:用引物 *eaeA*-Re-F/R、*stx2*-Re-F/R、*ehxA*-Re-F/R (见表 2) 扩增完整的

eaeA、*stx2*、*ehxA* 基因,克隆入 pGEX-6p-1 载体中,构建重组质粒 pGEX-6p-1-*eaeA*、pGEX-6p-1-*stx2* 和 pGEX-6p-1-*ehxA*。

1.6.2 电转化受体菌获得回复拯救株:将重组质粒 pGEX-6p-1-*eaeA*、pGEX-6p-1-*stx2* 和 pGEX-6p-1-*ehxA* 分别电转化入感受态细胞 XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 中,电转化菌液涂布于含 Ampicillin 的 LB 平板上,37°C 培养 24 h 后,挑取单菌落进行 PCR 鉴定,获得的回复拯救株命名为 Re-XZ113 $\Delta eaeA$ 、Re-XZ113 $\Delta stx2$ 、Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 。

1.6.3 回复株生长曲线的测定:测定方法同 1.5.1。

1.7 表型鉴定试验

1.7.1 XZ113、XZ113 $\Delta eaeA$ 及 Re-XZ113 $\Delta eaeA$ 对 HEp-2 细胞的黏附试验:将新鲜培养的菌株 XZ113、XZ113 $\Delta eaeA$ 、Re-XZ113 $\Delta eaeA$ 的细菌量调为 2×10^7 个活菌(菌落计数法定量),接种于 HEp-2 细胞上,在 37°C 培养 3 h。吸去营养液,固定、染色、干燥镜检^[13]。

1.7.2 XZ113、XZ113 $\Delta stx2$ 和 Re-XZ113 $\Delta stx2$ 对 Vero 细胞毒性试验:用 10% 的 DMEM 培养 Vero 细胞,待 24 h 长满后,经胰酶消化 30 s - 1 min,分瓶扩大培养,将未经诱导的 XZ113、XZ113 $\Delta stx2$ 和 Re-XZ113 $\Delta stx2$ 细菌培养液的滤液接种已长成单层的 Vero 细胞后,观察细胞病变^[14]。

1.7.3 XZ113、XZ113 $\Delta ehxA$ 、Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 溶血

活性的检测:将菌株 XZ113、XZ113 $\Delta ehxA$ 、Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 和 *E. coli* K12 分别涂布含 5% 洗涤后的绵羊红细胞的血平板,37°C 培养 16 h,观察溶血圈^[15]。

3 结果

3.1 质粒 pS-*eaeA*-Zeo、pS-*stx2*-Kana 及 pS-*ehxA*-Cam 的鉴定结果

经 O_{eaeA}-F/R 引物扩增鉴定,得到阳性质粒 pS-*eaeA*-Zeo,条带大小为 1350 bp。用 O_{stx2}-F/R 引物鉴定得到阳性质粒 pS-*stx2*-Kana,条带大小为 1900 bp。经 O_{ehxA}-F/R 引物扩增鉴定,得到阳性质粒 pS-*ehxA*-Cam,条带大小为 2100 bp。将 3 个重组质粒 pS-*eaeA*-Zeo、pS-*stx2*-Kana 和 pS-*ehxA*-Cam 分别进行测序,证实 3 个重组质粒构建正确。

3.2 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 的鉴定

3 个突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 经 PCR 鉴定后,条带大小分别为 1350、1900 和 2100 bp,与预期的结果相符。

3.3 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 的生物学特性

3.3.1 生长曲线:由绘制的生长曲线可以看出突变株的生长速度与亲本株 XZ113 株基本一致(图 1)。

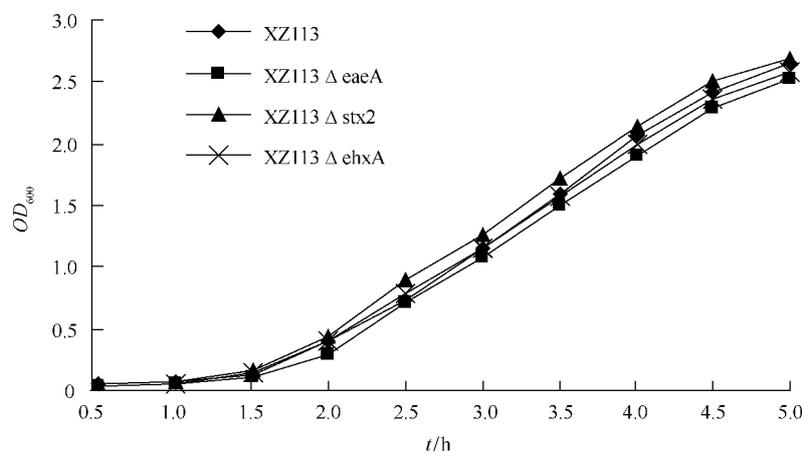


图 1 XZ113、XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 株生长曲线

Fig. 1 Growth curves of STEC wild-type strain XZ113 (◆), XZ113 $\Delta eaeA$ (■), XZ113 $\Delta stx2$ (▲) or XZ113 $\Delta ehxA$ (*) in LB broth at 37°C, respectively, and their optical density was checked at different times.

3.3.2 体外和体内竞争结果:按 1.5.2 的方法计算获得 CI 值, XZ113 和 XZ113 $\Delta eaeA$ 的 CI 值为 0.85, XZ113 和 XZ113 $\Delta stx2$ 的 CI 值为 0.42, XZ113 和 XZ113 $\Delta ehxA$ 的 CI 值为 0.65。结果表明, 在体外突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 、XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 的毒

力被轻度致弱。

攻毒后 24 小时扑杀鼠各突变株和野生株体内竞争的 CI 值, 见表 3。攻毒后 24 h 的体内竞争结果表明, 与亲本株相比, 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 的毒力被中度致弱, XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 的毒力被高度致弱。

表 3 野生株 XZ113 和突变株 24 h 体内竞争结果

Table 3 Competition assay between the wild-type strain XZ113 and its mutants 24h in vivo

Strains	Tested organs						
	Heart	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Small intestine	Cecocolon
XZ113 and XZ113 $\Delta eaeA$	0.028	0.047	0.021	**	0.05	0.028	0.033
XZ113 and XZ113 $\Delta stx2$	0.0094	0.0025	0.0029	**	**	0.0024	0.0053
XZ113 and XZ113 $\Delta ehxA$	0.0193	0.0079	0.0055	**	**	0.0034	0.0081

** , no wild and mutant strains were isolated.

攻毒后 48 小时扑杀鼠各突变株和野生株体内竞争的 CI 值, 见表 4。48 h 的体内竞争结果表明, 与亲

本株相比, 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 的毒力被中度致弱, XZ113 $\Delta stx2$ 、XZ113 $\Delta ehxA$ 的毒力被高度致弱。

表 4 野生株 XZ113 和突变株 48h 体内竞争结果

Table 4 Competition assay between the wild-type strain XZ113 and its mutants 48h in vivo

Strains	Tested organs						
	Heart	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Small intestine	Cecocolon
XZ113 and XZ113 $\Delta eaeA$	0.073	0.039	0.017	**	0.031	0.047	0.016
XZ113 and XZ113 $\Delta stx2$	0	0	0	**	**	0.000154	0.0013
XZ113 and XZ113 $\Delta ehxA$	0	0.0014	0	**	**	0.0029	0.001

** , no wild and mutant strains were isolated.

3.4 突变株回复拯救及回复株生长曲线的测定

回复株 Re-XZ113 $\Delta eaeA$, Re-XZ113 $\Delta stx2$, Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 的 PCR 鉴定和测序结果均正确。

由绘制的生长曲线可以看出回复株的生长速度与亲本株 XZ113 株基本一致(图 2)。

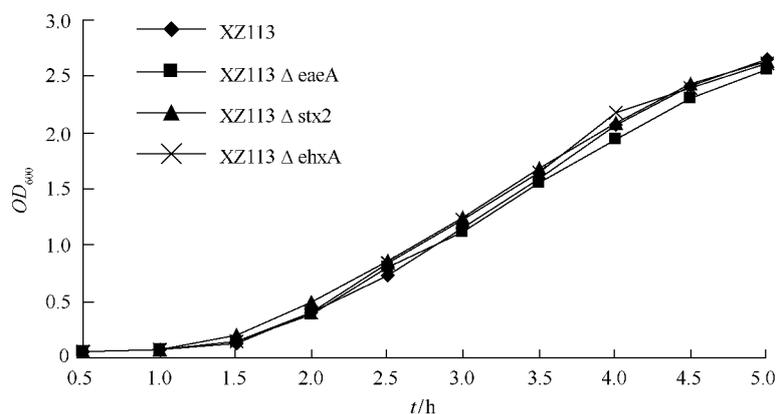


图 2 XZ113、Re-XZ113 $\Delta eaeA$ 、Re-XZ113 $\Delta stx2$ 、Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 株生长曲线

Fig. 2 Growth curves of STEC wild-type strain XZ113 (◆), Re-XZ113 $\Delta eaeA$ (■), Re-XZ113 $\Delta stx2$ (▲) or Re-XZ113 $\Delta ehxA$ (*) in LB broth at 37°C, respectively, and their optical density was checked at different times.

3.5 表型鉴定的结果

3.5.1 HEP-2 细胞粘附试验的结果: XZ113 和 Re-XZ113 $\Delta eaeA$ 对 HEP-2 细胞呈局灶性粘附作

用, 而突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 对 HEP-2 细胞的粘附能力明显降低, 呈现少量弥散性黏附的状态(图 3)。

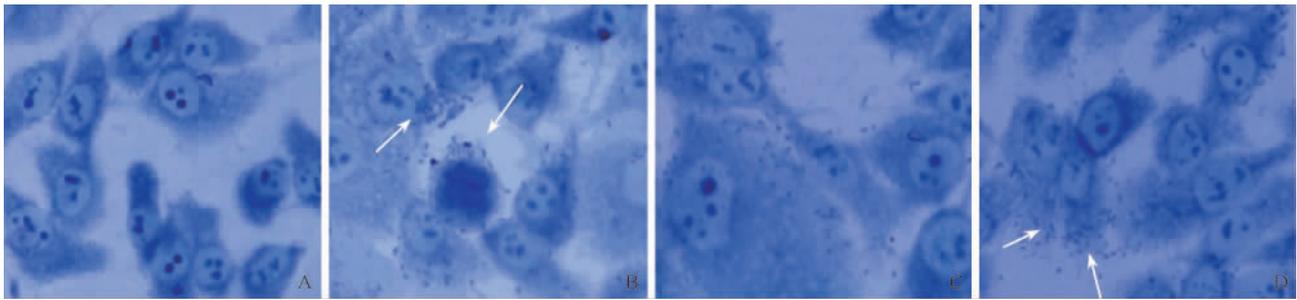


图3 HEp-2 细胞粘附试验 (400 ×)

Fig. 3 HEp-2 cells adherence test (400 ×). A: HEp-2 cells, B: HEp-2 cells inoculated with STEC XZ113, C: HEp-2 cells inoculated with XZ113 $\Delta eaeA$, D: HEp-2 cells inoculated with Re-XZ113 $\Delta eaeA$ (The arrows pointed to the bacteria attached to HEp-2 cells).

3.5.2 Vero 细胞毒性试验的结果: 10 μ L XZ113 和 Re-XZ113 $\Delta stx2$ 培养上清即可使培养的 Vero 细胞变

圆 脱落死亡, 而 200 μ L 缺失突变菌株 XZ113 $\Delta stx2$ 培养上清作用于 Vero 细胞 细胞仍能正常生长 (图 4)。

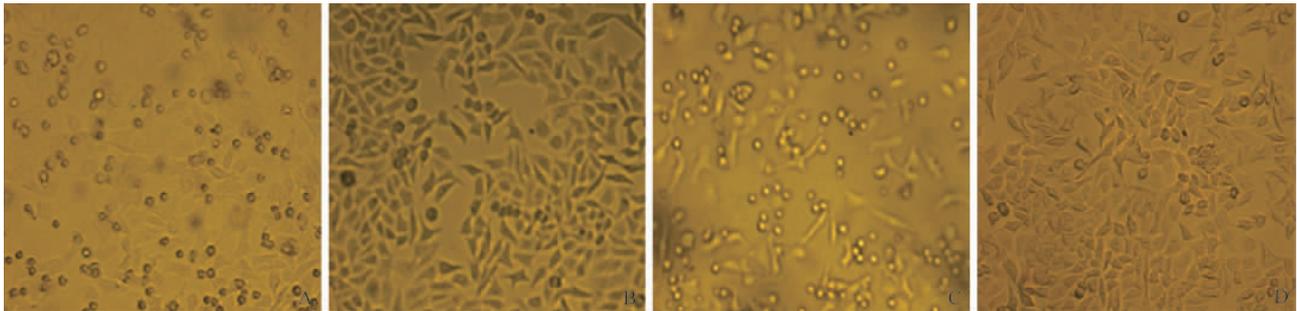


图4 Vero 细胞毒性试验 (200 ×)

Fig. 4 Vero cytopathic assay (200 ×). A: Vero cells inoculated with the culture supernatant of STEC XZ113, B: Vero cells inoculated with the culture supernatant of XZ113 $\Delta stx2$, C: Vero cells inoculated with the culture supernatant of Re-XZ113 $\Delta stx2$, D: Vero cells.

3.5.3 溶血素活性检测结果: 突变株 XZ113 $\Delta ehxA$ 在血平板上不能形成溶血圈, 而 XZ113 和 Re-XZ113 $\Delta ehxA$ 可以在血平板上产生溶血圈。

4 讨论

非 O157 STEC (如血清型 O26, O111 等) 近年来日益引起人们的关注, 它们不仅可以引起人类的腹泻, 而且严重的患者会出现 EHEC 感染后的典型症状, 如出血性腹泻和溶血性尿毒综合征 (HUS) [5]。有报道称非 O157 STEC 血清型 (O8, O18, O127) 和人类的出血性肠炎和血性腹泻有关 [16-17], 并且 Gioffre 等 [18] 从阿根廷的牛群粪便样品中分离到了相应的血清型。本文从江苏某奶牛场分离到了 O18 血清型的 STEC XZ113 株, 经鉴定其对小鼠的致病性和毒力基因的丰富程度仅次于 STEC O157。但对于 O18 血清型的 STEC 分离株毒力基因的研究目前报道的很少。

STEC 感染最关键的一步是能引起肠道的粘附和脱落 (Attaching and effacing, A/E) 损伤 [19]。引

起 A/E 损伤最主要的一个基因就是编码紧密素蛋白的 *eae* 基因 [8]。我们对 XZ113 株的 *eae* 基因做了突变, 并将突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 进行了细胞粘附实验, 发现突变株虽然对 HEp-2 细胞的粘附能力较野生株有所下降, 但仍然呈现少量弥散性粘附的状态。体内竞争实验表明, 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 被中度致弱。攻毒后 24 h 和 48 h, 突变株 XZ113 $\Delta eaeA$ 在各脏器中的细菌数量较野生株有所下降, 但仍有一定数量的细菌存在。Tatsuno 等 [20] 对 O157 的紧密素做了突变后, 也发现虽然突变株丢失了产生 A/E 损伤的能力, 但在体外仍然可以粘附组织培养细胞。表明 EHEC 对肠上皮细胞的粘附作用不是一种毒力因子能起决定性作用的, 应该是多种毒力因子共同作用的结果。

志贺毒素和溶血毒素也是决定 EHEC 特性的最为重要的毒力因子。为了更好地研究 *stx* 和 *ehx* 基因与 O18 血清型的 STEC XZ113 致病力的关系, 我们对上述两种毒素基因分别做了突变, 构建了突变株 XZ113 $\Delta stx2$ 和突变株 XZ113 $\Delta ehxA$ 。Vero 细胞毒性试验中 20 μ L 野生株 STEC XZ113 的培养上清

就能使培养的 Vero 细胞变圆,脱落死亡,而 200 μ L 缺失突变株培养上清作用于 Vero 细胞,细胞仍能正常生长,这说明所构建的基因缺失突变菌株 XZ113 Δ *stx2* 已不能产生 Stx 毒素。溶血活性检测实验中,突变株 XZ113 Δ *ehxA* 在血平板上不能形成溶血圈,说明我们构建的突变株 XZ113 Δ *ehxA* 不能产生溶血毒素。体内竞争实验表明,突变株 XZ113 Δ *stx2* 和突变株 XZ113 Δ *ehxA* 被高度致弱。在攻毒后 24 h 和 48 h,突变株 XZ113 Δ *stx2* 和突变株 XZ113 Δ *ehxA* 在各脏器中的细菌数量较野生株显著下降,特别是攻毒后 48 h,突变株 XZ113 Δ *stx2* 在心、肝、肺均分离不到相应的突变株;突变株 XZ113 Δ *ehxA* 在心、肺分离不到相应的突变株。综上所述,志贺毒素和溶血毒素在 STEC XZ113 的致病过程中起着更为重要的作用,为最终研制 STEC O18 的基因工程疫苗提供了参考。

虽然已明确 *stx*、*eae*、*ehx* 基因是 EHEC O157:H7 的毒力基因,XZ113 株的上述 3 个基因与后者的同源性也高达 96% - 99%,但对非 O157 STEC 的毒力基因研究仍然有一定意义。2011 年 5 - 6 月德国 STEC O104:H4 爆发案例告诉我们,流行株 STEC O104:H4 是在肠聚集性大肠杆菌 EA_gEC55989 基因组中插入了 *stx2* 前噬菌体以及引入含 CTX-M-15 的大质粒的基础上形成的,作为其标志毒力基因的 *stx2* 与 EHEC O157:H7 EDL933 株的 *stx2* 的序列也仅为 1 个核苷酸之差,但其毒力远远超过后者^[21],说明就 STEC 毒力而言,*stx* 固然重要,但基因组、毒力质粒等相关毒力基因同样重要,因而对不同基因组背景的 STEC 的毒力进行研究,有一定意义。

参考文献

- [1] Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Clinical Microbiology*, 2004, 42: 645 - 651.
- [2] Leotta G, Miliwebsky E, Chinen I, Espinosa E, Azzopardi K, Tennant S, Robins-Browne R, Rivas M. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiology*, 2008, 46: 1 - 8.
- [3] World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization—Berlin, Berlin, Germany, 1998, 6: 23 - 26.
- [4] Reilly A. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. *Bull World Health Organ*, 1998, 76: 245 - 255.
- [5] Bettelheim KA. The non-O157 Shiga-toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated Pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 2007, 33: 67 - 87.
- [6] Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20: 5 - 14.
- [7] Bitzan M. Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157:H7. *Kidney International*, 2009, 75: S62 - S66.
- [8] Khare S, Alali W, Zhang S, Hunter D, Pugh R, Fang FC, Libby SJ, Adams LG. Vaccination with attenuated *Salmonella enterica* Dublin expressing *E coli* O157:H7 outer membrane protein intimin induces transient reduction of fecal shedding of *E coli* O157:H7 in cattle. *BMC Veterinary Research*, 2010, 6: 35.
- [9] Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2009, 73: 750 - 774.
- [10] Diemen-van PM, Dziva F, Stevens MP, Wallis TS. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 1735 - 1743.
- [11] 薛涛,高崧,刘秀梵. 某奶牛场产志贺毒素大肠杆菌分子流行病学调查及 STEC O18 毒力基因对小鼠的致病作用. 扬州大学博士学位论文 2011.
- [12] Li G, Laturmus C, Ewers C, Wieler LH. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 2818 - 2827.
- [13] 孙洋,刘军,郭学军,张勇,祝令伟,周博,冯书章. 肠出血性大肠杆菌 O157 *ler* 基因缺失突变株的构建及其特性. 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2008, 28: 1269 - 1272.
- [14] Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM and Guth BEC. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Clinical Microbiology*, 2004, 42: 903 - 905.
- [15] Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS, Gomes TAT, Vieira MAM, Guth BEC. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105: 29 - 36.
- [16] Chinen I, Rivas M, Caffer MI, Cinto RO, Binsztein N. Diagnosis of entero-invasive *Escherichia coli* associated

- with diarrhea. *Revista Argentina de Microbiologia* , 1993 , 25: 27 – 35.
- [17] Rivas M , Miliwebsky E , Balbi L , Garcia B , Leardini N , Tous M , Chillemi G , Baschkier A , Strugo L. Intestinal bleeding and occlusion associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127:H21. *Medicina* , 2000 , 60: 249 – 252.
- [18] Gioffre A , Meichtri L , Miliwebsky E , Baschkier A , Chillemi G , Romano MI , Estani SS , Cataldi A , Rodriguez R , Rivas M. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina. Evaluation of two procedures. *Veterinary Microbiology* , 2002 , 87: 301 – 313.
- [19] Mckee ML , Melton-Celsa AR , Moxley RA , Francis DH , O'Brien AD. Entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity* , 1995 , 9: 3739 – 3744.
- [20] Tatsuno I , Kimura H , Okutani A , Kanamaru K , Abe H , Nagai S , Makino K , Shinagawa H , Yoshida M , Sato K , Nakamoto J , Tobe T , Sasakawa C. Isolation and characterisation of min-Tn5Km2 insertion mutants of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to CaCo-2 cells. *Infection and Immunity* , 2000 , 68: 5943 – 5952.
- [21] Mellmann A , Harmsen D , Cummings CA , Zentz EB , Leopold SR , Rico A , Prior K , Szczepanowski R , Yongmei J , Wenlan Z , Mclaughlin SF , Henkhaus JK , Leopold B , Bielaszewska M , Prager R , Brzoska PM , Moore RL , Guenther S , Rothberg JM , Karch H. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE* , 2011 , 6 (7) : e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.

Construction of the XZ113 $\Delta eaeA$, XZ113 $\Delta stx2$ and XZ113 $\Delta ehxA$ mutants of STEC O18 XZ113 and their pathogenicity in mice

Tao Xue , Xianliang Chen , Song Gao* , Xiufan Liu

Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Agriculture Ministry , College of Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China

Abstract: [Objective] To study the contribution of virulence genes of STEC O18 XZ113 isolate to the pathogenicity in mice. [Methods] The *eaeA* , *stx2* and *ehxA* knock-out mutants of STEC strain XZ113 were generated using λ -Red recombination system. [Results] Bacterial adherence test showed that the *eaeA* mutant adhered to HEp-2 cells in a diffuse manner with no microcolony formation. Vero cells assay showed that the *stx* mutant had no cytotoxicity to Vero cells. Enterohemolytic activity test showed that the *ehxA* mutant lost the ability to express the enterohemolytic activity. Competition assay between the wild-type strain XZ113 and its mutants *in vivo* and *in vitro* showed that all mutants were mildly attenuated *in vitro* , but *in vivo* , XZ113 $\Delta eaeA$ was moderate attenuated , XZ113 $\Delta stx2$ and XZ113 $\Delta ehxA$ were all highly attenuated. [Conclusions] These results indicate that the virulence factors encoded by the *stx2* and *ehxA* genes were important for the pathogenesis of STEC O18 in mice.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* , O18 , *eaeA* , *stx2* , *ehxA* , virulence genes , pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972196 , 30771640 , 30471281) , by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA222141) and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding authors. Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-0514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 22 June 2011 / Revised: 25 September 2011