

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (7) :737 - 745; 4 July 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.003

## Stx2 噬菌体溶原对大肠杆菌运动性及其相关基因表达的影响

曹冬梅<sup>1</sup>, 吉文汇<sup>1</sup>, 严亚贤<sup>1\*</sup>, 王恒安<sup>1</sup>, 孙建和<sup>1</sup>, 陆承平<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240

<sup>2</sup>南京农业大学动物医学院, 农业部动物疫病诊断与免疫开放重点实验室, 江苏 南京 210095

**摘要:** 【目的】通过基因缺失和噬菌体溶原转换研究大肠杆菌运动相关基因 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 对 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 溶原菌的影响。【方法】本实验利用 Red 重组酶系统, 构建了大肠杆菌 MG1655 的缺失株 MG1655  $\Delta$ *flhDC*、MG1655  $\Delta$ *fliA*、MG1655  $\Delta$ *fliD* 及 MG1655  $\Delta$ *fliE*, 并将 *flhDC* 片段、*fliA* 片段、*fliD* 片段和 *fliE* 片段连接 pUC18 后分别转化相应的突变株, 得到相应的互补菌株。通过 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 的感染获得各缺失株的溶原株 MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliA* $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliD* $\Phi$ Min27 及 MG1655  $\Delta$ *fliE* $\Phi$ Min27。随后测定了野生株、缺失株、互补株和溶原株的运动能力, 并通过荧光定量 PCR 分析了 *flhDC* 缺失前后野生株和溶原株其他运动相关基因表达量的变化。【结果】Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 溶原感染可促进 MG1655 的 *fliA* 和 *fliD* 基因的表达, 增强宿主菌 MG1655 的运动特性; MG1655 在 *flhDC* 基因缺失的状态下, *fliA* 和 *fliD* 基因的表达同步出现上调, 但运动性未发生变化, 而 MG1655  $\Delta$ *flhDC* 溶原菌丧失了运动特性, 基因转录水平检测发现 MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27 与 MG1655  $\Delta$ *flhDC* 相比, *fliA* 和 *fliD* 基因的表达同步出现显著下调, 而对 *fliE* 基因的表达几乎没有影响。 *fliA*、*fliD* 和 *fliE* 单个基因的缺失对大肠杆菌 MG1655 和 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 溶原菌的运动性几乎没有影响。【结论】提示 *fliA* 和 *fliD* 基因共同参与了鞭毛运动的调控, *flhDC* 基因可影响噬菌体溶原菌株的运动性, 为进一步研究噬菌体溶原与宿主基因之间的相互调节作用提供理论依据。

**关键词:** 大肠杆菌, Stx2 噬菌体, 溶原菌, *flhDC*, 运动性

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209 (2014) 07-0737-09

产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 是一种常见的可以引起人和动物腹泻、出血性肠炎和溶血尿毒综合征的食源性人兽共患病原菌, 其中以血清型 O157:H7 最具有代表性。该菌最显著的特点是能够产生志贺毒素 (Shiga toxin, Stx)。Stx 具有很强的细胞毒、肠毒和神经毒, 分为 Stx1 和 Stx2 两大类。研究显示 *stx* 基

因由溶原性噬菌体编码 (Stx 噬菌体), 通过噬菌体的溶原转换将 *stx* 基因整合到宿主菌的染色体上, 使宿主菌获得产生相应毒素的能力<sup>[1-2]</sup>。噬菌体不仅可作为基因转移载体使细菌获得新的功能, 还可改变细菌脂多糖特性, 利于病原菌抵抗宿主的内源性免疫因子, 另外宿主菌的某些基因也可影响噬菌体的裂解周期, 如宿主菌所编码的与  $\lambda$  噬菌体的抗

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272580); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金 (SKLVEB2011KFKT002)

\* 通信作者。Tel: +86-21-34206003, +86-25-84396517; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn, luep@njau.edu.cn

作者简介: 曹冬梅 (1979-), 女, 江苏扬中人, 博士研究生, 研究方向为分子病原细菌学。E-mail: caodmei@163.com

收稿日期: 2013-10-17; 修回日期: 2014-01-02

终止蛋白 N 相互作用的蛋白,在调节噬菌体延迟和晚期基因的短暂表达中起重要的作用<sup>[3]</sup>,因此噬菌体与宿主菌复杂的相互关系,促进了细菌的基因多样性、致病多样性。噬菌体  $\Phi$ Min27 是从引起仔猪腹泻的大肠杆菌 O157:H7 Min27 菌株中用丝裂霉素诱导出的 Stx2 噬菌体,其形态与 1983 年分离自美国的 Stx2 噬菌体 933W 非常相似<sup>[4]</sup>。之前的研究提示  $\Phi$ Min27 的溶原转换改变了宿主菌的运动性,Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 ( $\Delta$ stx::cat) 的溶原感染可以提高宿主鞭毛合成基因的表达,从而增强了宿主菌在柔软半固体介质中的游泳运动性<sup>[4-5]</sup>。那么宿主菌的运动相关基因在噬菌体溶原感染中发挥怎样的作用,以及对溶原菌的运动性有着怎样的影响?这正是本实验所探索的研究内容。

鞭毛的生成以及细菌的运动通过 3 个等级基因进行调控,*flhDC* 为鞭毛调控系统的主调控基因,*fliA* 和 *fliD* 为第二等级调控基因,*fliE* 为第三等级调控基因<sup>[6-7]</sup>。本实验分别选择了运动调节子 3 个等级调控系统的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因,通过基因敲除和噬菌体溶原转换,以研究宿主运动相关基因对 Stx2 噬菌体溶原菌株运动性所产生的影响,为进一步揭示噬菌体溶原与宿主菌遗传多样性、毒力和致病性变异的影响提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 含 Stx2 噬菌体的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 Min27 株、大肠杆菌 MC1061、MG1655 均由本实验室提供。携带 pKD46 质粒 (含 *exo*、*red $\beta$*  和 *red $\gamma$*  基因) 的大肠杆菌 BW25113 株由西班牙巴塞罗那大学 Muniesa 教授惠赠,该质粒为同源重组的协助质粒,是温度敏感复制子,高于 37°C 该质粒会丢失,阿拉伯糖诱导后表达能表达 Gam、Bet 和 Exo 3 个  $\lambda$  噬菌体重组酶。质粒 pKD4 含卡那霉素抗性基因和 FRT 位点 (FLP 重组酶识别位点)。pCP20 是含氨苄抗性和氯霉素抗性基因的温度敏感型复制子,携带能够表达 FLP 重组酶质粒,由南京农业大学陆承平教授惠赠。pUC18 质粒为低拷贝质粒,用于缺失蛋白互补表达,由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 2  $\times$  Taq PCR MasterMix、

DL2000 DNA Marker 购自广州东胜生物科技有限公司;氨苄青霉素、卡那霉素、丝裂霉素 C 购自上海阿敏生物技术有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。质粒提取试剂盒和 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒,均购自天根生化科技(北京)有限公司。普通 DNA 产物纯化试剂盒、RNase Inhibitor、RNase-Free DNase、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Perfect Real Time) 购自宝生物工程(大连)有限公司。E. Z. N. A. bacterial RNA isolation kit 购自 Omega Bio-Tek Inc。PCR 仪为德国 Biometra 公司产品;ECM630 电穿孔仪是美国 BTX (BTX The Electroporation Experts) 品牌产品;荧光定量 PCR 仪 PTC-200 为 BIO-RAD 品牌产品。

### 1.2 运动相关基因缺失突变株的构建

**1.2.1 PCR 引物的设计:** 为构建 MG1655 的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因缺失突变株,参照文献 [7] 报道的方法,依据 MG1655 (GenBank accession No. NC\_000913) 序列,设计合成引物对 PflhDCup/PflhDCdown, PfliAup/ PfliAdown, PfliDup/ PfliDdown 和 PfliEup/ PfliEdown,其上下游 5'端加划线序列分别与预突变目的基因两翼序列同源,靠近 3'端未加下划线的序列与质粒 pKD4 上 kan 基因两侧序列互补。在 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因两翼,设计引物 PflhDCL/ PflhDCR, PfliAL/ PfliAR, PfliDL/ PfliDR 和 PfliEL/ PfliER,用于检测各基因缺失突变株。引物 k1 与 k2 用于卡那霉素抗性消失的鉴定。各引物序列见表 1。

**1.2.2 同源重组片段的制备:** 以质粒 pKD4 为模板, PflhDCup/ PflhDCdown, PfliAup/ PfliAdown, PfliDup/ PfliDdown 和 PfliEup/ PfliEdown 为引物分别进行 PCR 扩增带有目的基因同源臂的重组片段。PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化,测定 DNA 浓度后,用于与 MG1655 菌株 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因进行同源重组。

**1.2.3 缺失株的构建:** 参照文献 [8] 报道的方法,提取大肠杆菌 BW25113 菌株所含的 pKD46 质粒,电转入大肠杆菌 MG1655 株细菌中。接种 MG1655/pKD46 菌株 30°C 培养至  $A_{600} = 0.25$  时,加入 L-阿拉伯糖至 10 mmol/L,诱导 1h,使 pKD46 上的 Exo、Bet 和 Gam 3 个蛋白充分表达,制备感受态细胞。取 5  $\mu$ L 同源重组片段 (约 500 ng) 电击转化 60  $\mu$ L

表 1. PCR 引物序列及片段大小

Table 1. The primer sequences and product size

primer	sequence (5'→3')	product size/bp
PflhDCup	TGCTGGAATGTTGGCCCTCACCGTATCAGTTAAACAGCCTGTACTCTCTGgttagctggagctgette	1572
PflhDCdown	TCACGGGGTGCGGTGAAACCGCATAAAAATAAAGTTGGTTATTCTGGGTGgaatatectcttagttee	1572
PfliAup	AAGTTAAAGTGGCGCATTTACTGACGTTATAACTTACCCAGTTTACTGCGgttagctggagctgette	1572
PfliAdown	AAACGGATAATCATGCCGATAACTCATATAACGCAGGCTGTTTATCGTGgaatatectcttagttee	1572
PfliDup	ATAACCCCGGTATTCTGTTTACGTGTCGAAAGATAAAAGGAAATCGCATGZgttagctggagctgette	1572
PfliDdown	TACATGACCTGTCTCCCGATGAATATTGCTTACTTGAATTAAGTTGTTgaatatectcttagttee	1572
PfliEup	CGGATGTAATTAACAACAGGTTACAAAACCTACACCTGCATGCTCATCACgttagctggagctgette	1572
PfliEdown	TGACTTACTGGTAGGCTTTTGCTACCAGAAATATCCGGGAGACGAGAATGgaatatectcttagttee	1572
PflhDCL	GTACCGAGAACAACCAGG	1207/377
PflhDCR	GCTTATCGCAACTATTCTAATG	1207/377
PfliAL	GCCAGCCATTTTCATCAA	1157/539
PfliAR	CCCGGATAAGGCCTTTAC	1157/539
PfliDL	TTCCACCCGTCGGCTCA	1903/598
PfliDR	TTGGTTAGTTCGTCTTTGCTC	1903/598
PfliEL	TGCGTCTGTGGTCGTAAC	893/680
PfliER	GCTGAATAATGTGCGGTAG	893/680
PflhDC1	CGCGGATCCttaaacagctgtactctet	950
PflhDC2	CCCAAGCTTatgcaactctccagttget	950
PfliA1	CGCGGATCCgtgaattcaactctataacegc	738
PfliA2	CCCAAGCTTtataacttaccagtttag	738
PfliD1	CCGGAATTCatggaagtagtctcagct	1425
PfliD2	CCCAAGCTTtacttgaattactgtgt	1425
PfliE1	CGCGGATCCatgcaagega tacaggggat	333
PfliE2	CCCAAGCTTctacacctgeatgetcatca	333
Pstx2A	acgatagactttlegacceca	1088
Pstx2B	tgtaactgagcaacttgeca	1088
k1	attgtctactgactggcacaaca	690
k2	ggagcatgcataccgtaaageac	690
PfliART1	CCGCTGAAGGTGTAATGG	100
PfliART2	CACTGCGTAAAGTTGTAATGC	100
PfliDRT1	AGTAATACCGTCACTTCTTCCA	177
PfliDRT2	TGAGTTTGTCCGCATCCA	177
PfliERT1	TATCGGTCATCACATCGTTT	197
PfliERT2	GCTTATCAGCCAGTTACAGG	197

MG1655/pKD46 感受态细胞,电击后迅速加入 1 mL 的 SOC 培养基,30℃ 静止培养 4 h 后离心,将菌体涂于 LB 平板(卡那霉素浓度为 30 μg/mL),长出的单菌落即为理论上的阳性重组菌。以 PflhDCL/PflhDCR, PfliAL/PfliAR, PfliDL/PfliDR 和 PfliEL/PfliER 为引物进行 PCR 验证 flhDC、fliA、fliD 和 fliE 基因的缺失,阳性的克隆接种液体 LB 培养基 42℃ 培养 12 h,以去除 pKD46 质粒。

将 pCP20 质粒电转化入前面筛选到的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变株,30℃ 培养 8 h 后再 42℃ 培养过夜,去除质粒 pCP20。将培养后的菌液划线接种于无抗生素的 LB 平板,37℃ 培养 24 h 后挑取

单个菌落同时点种于 LB 平板以及含有卡那霉素的 LB 平板上,在卡那霉素的 LB 平板上未生长的细菌进一步用引物 k1/k2 及 PflhDCL/PflhDCR, PfliAL/PfliAR, PfliDL/PfliDR 和 PfliEL/PfliER 进行 PCR 鉴定。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收后,用鉴定引物进行测序,以确定获得基因缺失并去除卡那抗性的突变株。

**1.2.4 回复株的构建:** 以 PflhDC1/PflhDC2, PfliA1/PfliA2, PfliD1/PfliD2 和 PfliE1/PfliE2 为引物分别进行 PCR 扩增 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因,用 BamH I 和 Hind III 酶切回收后连接经同样酶切回收的 pUC18 质粒,得到重组质粒 pUC*flhDC*、

pUC*fliA*、pUC*fliD* 和 pUC*fliE*。将重组质粒电转化入突变株及突变株的溶原株,以获得各菌株的回复株。

### 1.3 Stx2 噬菌体 $\Phi$ Min27 对大肠杆菌 MG1655 各突变株的溶原感染

参照张慧英等<sup>[2]</sup>的方法,从 O157:H7 Min27 株中进行噬菌体的诱导和纯化,获得噬菌体  $\Phi$ Min27。 $\Phi$ Min27 对宿主菌 MG1655 及 MG1655 的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变株的溶原感染试验根据 James 等<sup>[9]</sup>的方法进行,以引物 Stx2A/Stx2B 采用 PCR 方法验证是否溶原成功。将 PCR 验证为阳性菌株继续震荡培养 48h 至获得稳定的溶原株,并进行 LB 琼脂平板划线培养再次验证稳定的纯化溶原株,对溶原菌再用丝裂霉素(0.5  $\mu$ g/mL)进行诱导,用大肠杆菌 MC1061 作指示菌,采用双层琼脂法检测是否能够诱导出  $\Phi$ Min27 噬菌体及裂解指示菌,将溶原成功的菌株分别命名为 MG1655 $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *flhDC $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliA* $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliD* $\Phi$ Min27 及 MG1655  $\Delta$ *fliE* $\Phi$ Min27。*

### 1.4 运动性实验

将大肠杆菌 MG1655、MG1655 的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变株及各菌株的溶原株分别接种在 37  $^{\circ}$ C LB 培养基培养过夜。取 50  $\mu$ L 过夜培养的菌液接种在 5 mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 再培养 5 h 后,测定细菌  $OD_{600}$  的光密度值,并用新鲜的 LB 培养基将  $OD_{600}$  值调到 0.3。取 5  $\mu$ L 细菌(约含  $10^6 - 10^7$  CFU),枪头轻轻接触平板,滴在游泳运动培养基和爬行运动培养基平板的中央,待菌液吸干后放入一个湿盒中,同时设 3 个重复<sup>[10-11]</sup>。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后观察菌落形态,测量菌落的直径。游泳运动培养基是含 0.3% 琼脂的 LB 培养基,爬行运动培养基是含 0.5% 琼脂和 0.5% D-(+) -葡萄糖的 LB 培养基<sup>[12-13]</sup>,因培养基中的琼脂含量低、水份大,在接种细菌前需要在室温放置 5-6 h。

### 1.5 qRT-PCR

按 E. Z. N. A. bacterial RNA isolation kit (OMEGA) 说明,将 MG1655、MG1655 $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *flhDC* 和 MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27 在 LB 培养基中相同条件下培养至  $OD_{600}$  约为 0.6,分别提取 RNA,按照 RNase-free DNase I (TaKaRa) 说明书除去基因组 DNA 污染,并测定 RNA 浓度。获得无 DNA 污染的细菌 RNA 之后,参照 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) 试剂盒使用说明书对 RNA 进行反转录

合成 cDNA 第一链,引物设计见表 1 (P*fliART1*/P*fliART2*, P*fliDRT1*/P*fliDRT2*, P*fliERT1*/P*fliERT2*)。

根据 SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 说明进行荧光定量 PCR,每个反应管做 3 次重复,同时设立空白对照。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 10 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s,53 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。每个 PCR 产物的融解曲线及 Ct 值均由仪器及自带的软件自动生成。统计各个反应的 Ct 值,数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算<sup>[14]</sup>。得出 *flhDC* 缺失前后,野生株、溶原株及突变株和突变溶原株中 *fliA*、*fliD*、*fliE* 相对表达量的差异。

## 2 结果

### 2.1 大肠杆菌 MG1655 的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因缺失株的鉴定

大肠杆菌 MG1655 的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因在与同源片段重组之后,经卡那霉素抗性初步筛选到疑似缺失株。通过引物 P*flhDCL*/P*flhDCR*, P*fliAL*/P*fliAR*, P*fliDL*/P*fliDR* 和 P*fliEL*/P*fliER* 进行 PCR 鉴定,分别筛选到 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因缺失株,质粒 pCP20 导入疑似缺失株后,表达的 FLP 重组酶可消除 FRT 位点间的卡那霉素抗性基因。通过卡那霉素抗性初步筛选到疑似卡那霉素基因消除株;经 k1/k2 及 P*flhDCL*/P*flhDCR*, P*fliAL*/P*fliAR*, P*fliDL*/P*fliDR* 和 P*fliEL*/P*fliER* 为引物进行双重 PCR 扩增,分别获得不携带卡那霉素抗性基因的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因缺失株,扩增条带分别为 377、539、598 和 680 bp,与预期一致,经普通 DNA 产物纯化试剂盒回收后,由宝生物工程(大连)有限公司测序,比对结果显示 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因已被敲除,分别命名为 MG1655  $\Delta$ *flhDC*、MG1655  $\Delta$ *fliA*、MG1655  $\Delta$ *fliD* 及 MG1655  $\Delta$ *fliE* (图 1)。

### 2.2 回复株的构建

根据表 1 的引物,以 MG1655 菌株为模板,扩增出 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 互补片段。pUC18 质粒与互补片段经 T4 连接酶连接后,将重组质粒电转入 MG1655  $\Delta$ *flhDC*、MG1655  $\Delta$ *fliA*、MG1655  $\Delta$ *fliD*、MG1655  $\Delta$ *fliE*、MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliA* $\Phi$ Min27、MG1655  $\Delta$ *fliD* $\Phi$ Min27 及 MG1655  $\Delta$ *fliE* $\Phi$ Min27 中,在氨苄青霉素平板上筛选阳性转化株,筛选到的互补株分别称为 MG1655 ( $\Delta$ *flhDC*/

*flhDC* +)、MG1655 ( $\Delta fliA / fliA$  +)、MG1655 ( $\Delta fliD / fliD$  +)、MG1655 ( $\Delta fliE / fliE$  +)、MG1655 ( $\Delta flhDC\Phi Min27 / flhDC$  +)、MG1655 ( $\Delta fliA\Phi Min27 / fliA$  +)、MG1655 ( $\Delta fliD\Phi Min27 / fliD$  +) 及 MG1655 ( $\Delta fliE\Phi Min27 / fliE$  +)。

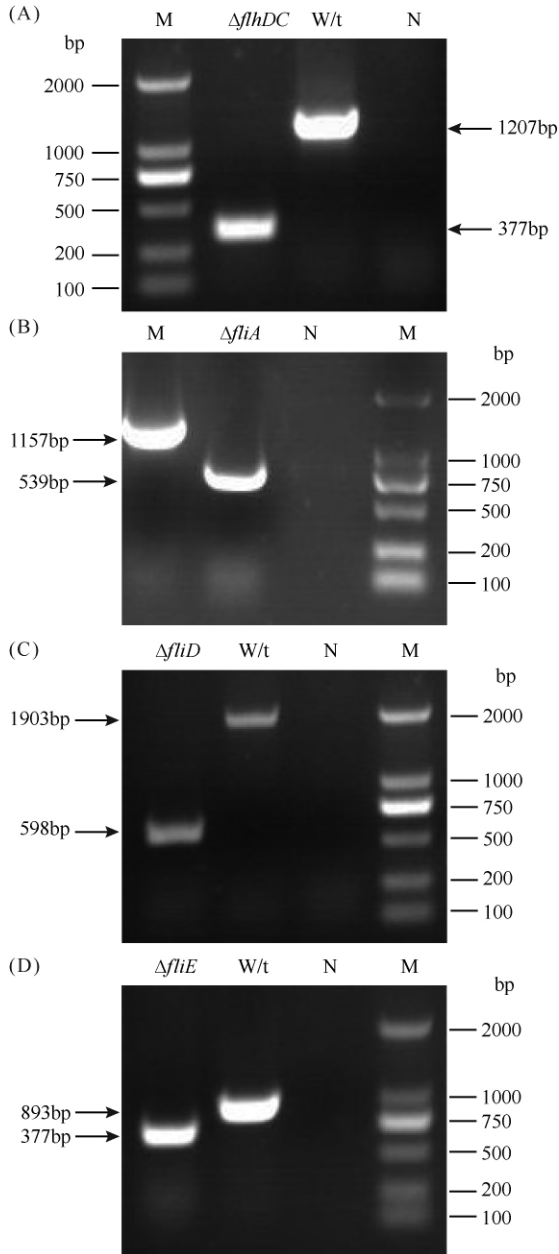


图 1. *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变株的构建及 PCR 验证

Figure 1. Construction of *flhDC*, *fliA*, *fliD* and *fliE* mutants and PCR confirmation of the mutant constructed. W/t, wide type; N, negative control by  $dH_2O$  as template; M, DL2000 DNA Marker.

### 2.3 Stx2 噬菌体 $\Phi Min27$ 对大肠杆菌 MG1655 各突变株的溶原感染

挑取可疑被 Stx2 噬菌体溶原的 MG1655  $\Delta flhDC$ 、MG1655  $\Delta fliA$ 、MG1655  $\Delta fliD$  及 MG1655  $\Delta fliE$  菌落进行 PCR 检测,结果显示可疑菌落中检测出 *stx2* 基因,片段大小为 1088bp (图 2),即该菌落为 Stx2 噬菌体溶原菌。而 MG1655  $\Delta flhDC$ 、MG1655  $\Delta fliA$ 、MG1655  $\Delta fliD$  及 MG1655  $\Delta fliE$  各突变株中未检测到 *Stx2* 基因。稳定的溶原菌经丝裂霉素 C 诱导后,以 MC1061 作为指示菌,采用双层琼脂平板法,同时以各突变株作为对照。结果显示未溶原株诱导滤液在双层琼脂平板上没有出现肉眼可见的噬菌斑,而 MG1655  $\Delta flhDC\Phi Min27$ 、MG1655  $\Delta fliA\Phi Min27$ 、MG1655  $\Delta fliD\Phi Min27$  及 MG1655  $\Delta fliE\Phi Min27$  诱导滤液在平板上则形成了许多噬菌斑。证明已经获得了稳定的 MG1655 突变株溶原菌。

### 2.4 细菌运动性实验结果

MG1655 和 MG1655  $\Phi Min27$  在含 0.3% 琼脂的半固体的 LB 培养基上长出的菌落为不整齐的锯齿状边缘, MG1655  $\Phi Min27$  菌落直径为 13mm, 而 MG1655 的菌落直径为 10mm, 显示 Stx2 噬菌体  $\Phi Min27$  溶原了 MG1655 后,可以增强宿主的游泳运动能力 (图 3)。然而, *flhDC* 基因突变后, MG1655  $\Delta flhDC\Phi Min27$  菌落边缘整齐,未出现有鞭毛菌落的特征性锯齿状边缘,菌落直径为 6mm, 而 MG1655  $\Delta flhDC$  的菌落仍为锯齿状边缘,直径为 10mm, 显示 *flhDC* 基因突变后,溶原菌株 MG1655  $\Delta flhDC\Phi Min27$  丧失了游泳运动能力。这 4 株细菌在含 0.5% 琼脂的半固体的 LB 培养基上长出的菌落直径大小相同,显示其具有相似的爬行运动速度。大肠杆菌 MG1655 的 *fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变株及其回复株与溶原株在含 0.3% 琼脂和 0.5% 琼脂的半固体的 LB 培养基上长出的菌落直径大小相同,均为不整齐的锯齿状边缘,显示 *fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因突变及突变后 Stx2 噬菌体  $\Phi Min27$  的溶原均未影响其运动能力, *flhDC* 的基因突变株及其回复株的运动能力也未发生改变。

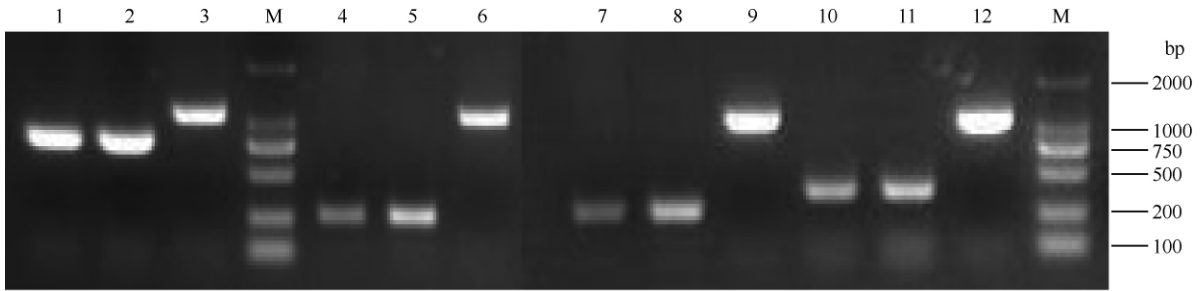


图 2. PCR 验证 Stx2 噬菌体在 MG1655 各突变株中的溶原转换

Figure 2. PCR confirm the Stx2 bacteriophage succeed converting the MG1655. M, DL2000 DNA Marker; lane 1, MG1655  $\Delta fliA$  (*fliA*, 539bp); lane 2 and 3, MG1655  $\Delta fliA\Phi$ Min27 (*fliA* and *stx2*, 539bp and 1088bp); lane 4, MG1655  $\Delta flhDC$  (*flhDC*, 377bp); lane 5 and 6, MG1655  $\Delta flhDC\Phi$ Min27 (*flhDC* and *stx2*, 377bp and 1088bp); lane 7, MG1655  $\Delta fliD$  (*fliD*, 598bp); lane 8 and 9, MG1655  $\Delta fliD\Phi$ Min27 (*fliD* and *stx2*, 598bp and 1088bp); lane 10, MG1655  $\Delta fliE$  (*fliE*, 377bp); lane 11 and 12, MG1655  $\Delta fliE\Phi$ Min27 (*fliE* and *stx2*, 377bp and 1088bp).

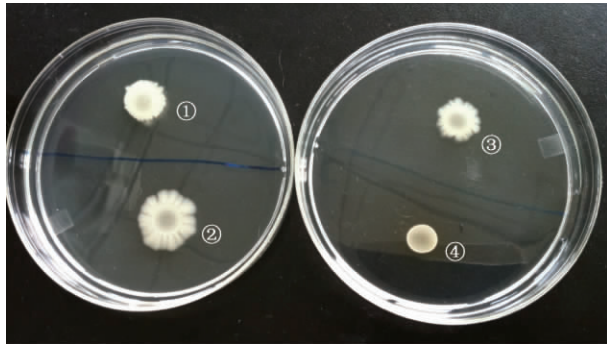


图 3. 大肠杆菌 MG1655 (①) 和 MG1655 $\Phi$ Min27 (②), MG1655  $\Delta flhDC$  (③) 和 MG1655  $\Delta flhDC\Phi$ Min27 (④) 在 0.3% 琼脂的 LB 培养基 37°C 培养 24 h 的运动性结果  
Figure 3. Motility of *E. coli* MG1655 (①) and MG1655 $\Phi$ Min27 (②), MG1655  $\Delta flhDC$  (③) and MG1655  $\Delta flhDC\Phi$ Min27 (④) cells grown on semisolid agar (0.3%) at 37°C for 24 h.

## 2.5 *flhDC* 突变对大肠杆菌 MG1655 及 $\Phi$ Min27 溶原前后 *fliA*, *fliD*, *fliE* 基因转录水平的影响

RT-PCR 结束后, 读出每个基因的 Ct 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行数据分析 (表 2), 溶原株 MG1655 $\Phi$ Min27 中 *fliA* 的转录水平是 MG1655 中的 12.96 倍, *fliD* 为 8.81 倍, *fliE* 的相对转录水平几乎没有变化, 为 1.02 倍。但在 *flhDC* 基因突变后, 溶原株 MG1655  $\Delta flhDC\Phi$ Min27 中 *fliA* 的转录水平是突变株 MG1655  $\Delta flhDC$  的 0.21 倍, *fliD* 为 0.36 倍, *fliE* 的相对转录水平几乎没有变化, 为 1.04 倍。而 MG1655  $\Delta flhDC$  中 *fliA* 是野生株 MG1655 的 9.06 倍, *fliD* 为 3.54 倍, *fliE* 的相对转录水平几乎没有变化, 为 1.02 倍。

表 2. 运动基因相对表达率的变化

Table 2. The relative expression rate for motility genes

gene	relative expression rate (lysogens/wild strain)	relative expression rate ( <i>flhDC</i> mutant lysogens/ <i>flhDC</i> mutant strain)	relative expression rate ( <i>flhDC</i> mutant strain /wild strain)
<i>fliA</i>	12.96	0.21	9.06
<i>fliD</i>	8.81	0.36	3.54
<i>fliE</i>	1.02	1.04	1.02

## 3 讨论

运动对于细菌的生存十分重要, 70 年代中期以来的许多报道认为, 细菌的运动性在致病早期过程具有重要的作用<sup>[15]</sup>。噬菌体可作为基因转移载体使细菌获得新的功能, 如可产生一些毒素和毒力因

子, 如白喉毒素和霍乱毒素<sup>[22]</sup>。大肠杆菌中存在许多噬菌体的整合位点, Serra-Moreno 等发现 Stx 噬菌体对大肠杆菌 K-12 序列菌株 (如: DH5 $\alpha$ 、MC1061、MG1655 等) 的整合位点偏爱 *wrbA* 基因, 当该基因被其它噬菌体占据时, *yehV* 基因通常是它的候选位点<sup>[23]</sup>。Su 等 (2010) 研究表明 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 在大肠杆菌中 Min27 中的整合位点是 *wrbA* 基因, 本课题组已证实  $\Phi$ Min27 对 MG1655 的整合位点也是在

*wrbA* 基因(数据未发表),这就说明噬菌体在溶原过程中理论上不会破坏细菌的运动相关基因。Su 等(2010)研究还表明 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 ( $\Delta$ stx::cat) 溶原感染可以提高宿主在半固体介质表面的游泳运动<sup>[4]</sup>。本研究发现 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 溶原感染可增强宿主的游泳运动,进一步验证了这一结果,初步研究发现溶原感染可促进宿主菌 *fliA* 和 *fliD* 基因的表达。*fliA* 基因是一个鞭毛特异性的 sigma 因子  $\sigma^{28}$ , 调控运动基因的转录起始,*fliD* 则在鞭毛组装中起着关键作用。由 *fliA* 和 *fliD* 基因编码的调控蛋白位于鞭毛运动调节子三级调控系统的第二等级,第一等级的基因处于整个调控体系顶端的 *flhDC*, *flhDC* 表达 FlhD4C2 复合物。它是第二等级基因的转录激活因子。*fliE* 位于第三等级编码一种鞭毛基体蛋白<sup>[7]</sup>。本研究利用 Red 酶重组系统获得的 *flhDC*、*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因的单个基因缺失株在游泳运动和爬行运动培养基上的运动能力均未发生变化,揭示运动基因之间的调控是一个复杂有序的过程,单个基因的缺少,可能会出现一些其他相关基因的补偿。*fliA*、*fliD* 和 *fliE* 基因的缺失也未影响 Stx2 噬菌体的溶原转换。然而,在 *flhDC* 基因缺失状态下,大肠杆菌 MG1655  $\Delta$ *flhDC* 的 *fliA* 和 *fliD* 基因表达同时出现上调,这也部分解释了 MG1655  $\Delta$ *flhDC* 运动能力未发生变化的原因。但 Stx2 噬菌体  $\Phi$ Min27 的 MG1655  $\Delta$ *flhDC* 溶原株运动性丧失,基因转录水平检测发现宿主菌 *fliA* 和 *fliD* 基因的表达同时出现下调。噬菌体溶原后宿主菌 *fliA* 和 *fliD* 基因表达同时出现上调,并观察到宿主菌游泳运动性增强,而鞭毛运动一级调控基因 *flhDC* 缺失后,缺失株运动性未发生变化,但检测到 *flhDC* 缺失株 *fliA* 和 *fliD* 基因表达同时出现了上调,以及 *flhDC* 缺失溶原株 *fliA* 和 *fliD* 基因表达下调及观察到的菌株运动性丧失,这一系列菌株运动变化与 *fliA* 和 *fliD* 基因表达差异之间的相关性,揭示了噬菌体溶原与宿主菌运动相关基因的相互调节作用,但其调控机制还未见有相关报道。

近年来的研究表明,FlhDC 除参与细菌鞭毛运动相关基因的调控外,还具有其他多种功能,如在 *E. coli* 中参与调控厌氧呼吸以及脱氧酮糖酸途径(Entner-Doudoroff 途径)<sup>[18-19]</sup>;在小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. Enterocolitica*)<sup>[20]</sup>和液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)<sup>[21]</sup>中调节磷脂酶的表达和分泌,也是嗜

线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)<sup>[22]</sup>中脂解和溶血相关基因表达所必需。此外还在 *Y. enterocolitica* 中参与调节嘌呤和嘧啶生物合成途径的一系列代谢基因包括 *hut*、*carAB*、*pyrBI* 的表达,也参与 Yop 致病基因的表达调控<sup>[23]</sup>。FlhDC 所参与的众多功能表明其不仅仅作为调控细菌鞭毛基因表达的主调控因子,而且有可能是一个具有广泛调节功能的调控蛋白。*flhDC* 基因的缺失导致溶原株运动性丧失表明 *flhDC* 基因对于溶原株的运动稳定性具有重要意义,也说明了噬菌体溶原与菌株的多种基因有密切的相关性,也是造成自然界菌株多样性的一个重要方面,但 *flhDC* 对于溶原菌的稳定性是否是必需的以及与溶原感染之间的相互关系还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Sylvia H, Helge K, Herbert S. Shiga toxin-converting bacteriophages genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294 (2-3): 115-121.
- [2] Zhang H, Sun J, Yan Y. Isolation and identification of bacteriophage verotoxin 2 gene from *Escherichia coli* O157:H7. *Virologica Sinica*, 2004, 20 (6): 668-672. (in Chinese)  
张慧英,孙建和,严亚贤. 大肠杆菌 O157:H7 中编码 VT2 基因的噬菌体的分离和鉴定. 中国病毒学,2004, 20 (6): 668-672.
- [3] Hewetson JT. The bacteriology of certain parts of the alimentary canal and of the inflammatory processes arising therefrom. *British Medical Journal*, 1904, 2 (2291): 1457-1460.
- [4] Su LK, Lu CP, Wang Y, Cao DM, Sun JH, Yan YX. Lysogenic infection of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage changes host gene expression, enhances host acid resistance and motility. *Molecular Biology (Mosk)*, 2010, 44 (1): 54-66.
- [5] Su L, Yan Y, Lu C. Construction of a *stx2* deletion mutant of Shiga toxin 2 phage phiMin27 and its infectious properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (9): 1227-1233. (in Chinese)  
苏良科,严亚贤,陆承平. 志贺毒素 2 型噬菌体  $\Phi$ Min27 的 *stx2* 基因突变株构建及其感染特性. 微生物学报,2008,48 (9): 1227-1233.
- [6] Wang S, Fleming RT, Westbrook EM, Matsumura P, McKay DB. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC

- complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 355 (4) : 798-808.
- [7] Macnab RM. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annual Review of Genetics*, 1992, 26 : 131-158.
- [8] Datsenko KA, Wanner BL. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12) : 6640-6645.
- [9] James CE, Stanley KN, Allison HE, Flint HJ, Stewart CS, Sharp RJ, Saunders JR, McCarthy AJ. Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (9) : 4335-4337.
- [10] Wolfe AJ, Berg HC. Migration of bacteria in semisolid agar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86 (18) : 6973-6977.
- [11] Dzinic SH, Luercio M, Ram JL. Bacterial chemotaxis differences in *Escherichia coli* isolated from different hosts. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54 (12) : 1043-1052.
- [12] Zorzano MP, Hochberg D, Cuevas MT, gómez-gómez JM. Reaction-diffusion model for pattern formation in *E. coli* swarming colonies with slime. *Physical Review E (Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics)*, 2005, 71 (3 Pt 1) : 903-908.
- [13] Gómez-Gómez JM, Manfredi C, Alonso JC, Blázquez J. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biology*, 2007, 5 : 1-15.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25 (4) : 402-408.
- [15] Lai S, Hou H, Jiang W. Bacterial motility and its role during initial stage of pathogenesis. *Journal of Microbiology*, 2006, 26 (5) : 68-70. (in Chinese)
- 赖世龙,侯浩,姜伟. 细菌的运动性及其在致病初期过程中的作用. *微生物学杂志*, 2006, 26 (5) : 68-70.
- [16] Chapman P. A, Siddons C. A, Cerdan-Malo A. T, Harkin M. A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection*, 1997, 119 (2) : 245-250.
- [17] Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (18) : 6645-6654.
- [18] Prüss BM, Liu X, Hendrickson W, Matsumura P. FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and lacZ gene fusions. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 197 (1) : 91-97.
- [19] Prüss BM, Campbell JW, Van Dyk TK, Zhu C, Kogan Y, Matsumura P. FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (2) : 534-543.
- [20] Schmiel DH, Young GM, Miller VL. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *ypfA* is part of the flagellar regulon. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (8) : 2314-2320.
- [21] Givskov M, Eberl L, Christiansen G, Benedik MJ, Molin S. Induction of phospholipase and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Molecular Microbiology*, 1995, 15 (3) : 445-454.
- [22] Givaudan A, Lanois A. *FlhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: Requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis and full virulence in insects. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (1) : 107-115.
- [23] Blevess S, Marenne MN, Detry G, Gornelis GR. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* *yop* regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (12) : 3214-3223.



# Effect of Stx2-encoding phage on the motility and gene expression involved in moving of *Escherichia coli* lysogen

Dongmei Cao<sup>1</sup>, Wenhui Ji<sup>1</sup>, Yaxian Yan<sup>1\*</sup>, Heng'an Wang<sup>1</sup>, Jianhe Sun<sup>1</sup>,  
Chengping Lu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

<sup>2</sup>Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] The effect of *flhDC*, *fliA*, *fliD* and *fliE* genes involved in moving of *Escherichia coli* (*E. coli*) on the motility of lysogenized strain by Stx2-encoding phage  $\Phi$ Min27 was explored by gene knockout and phage lysogenic conversion. [Methods] Using the lambda Red recombinase system, the mutant strains of *E. coli* MG1655 named MG1655  $\Delta$ *flhDC*, MG1655  $\Delta$ *fliA*, MG1655  $\Delta$ *fliD* and MG1655  $\Delta$ *fliE* were constructed. Then the corresponding complemented strains by ligating amplified targeted genes into the low copy vector pUC18 at the *Bam*HI and *Hind*III sites and transforming these plasmids into mutant strains were acquired. By lysogenic infection of Stx2-encoding phage  $\Phi$ Min27, the lysogens for mutants named MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27, MG1655  $\Delta$ *fliA* $\Phi$ Min27, MG1655  $\Delta$ *fliD* $\Phi$ Min27 and MG1655  $\Delta$ *fliE* $\Phi$ Min27 were achieved. Subsequently, the motility of wild strain, the mutants, the complemented strains and the lysogens were detected. The changes of expression of the other genes involved in motility between wild strain and the lysogens before and after *flhDC* deletion by qRT-PCR were analyzed. [Results] Lysogenic infection of Stx2-encoding phage  $\Phi$ Min27 could promote the expression of *fliA* and *fliD* gene and enhance the motility of MG1655. For *flhDC* deletion, higher expression of *fliA* and *fliD* gene of MG1655 appeared, but the motility had no change. However, lysogen for MG1655  $\Delta$ *flhDC* lost the swimming motility. By gene transcriptional level detection, the expression of *fliA* and *fliD* gene of MG1655  $\Delta$ *flhDC* $\Phi$ Min27 was down-regulated significantly compared with MG1655  $\Delta$ *flhDC*, and no marked variation was observed for *fliE* gene. The single deletion of *fliA*, *fliD* and *fliE* gene had no effect on the motility of *E. coli* MG1655 and lysogenized strain by Stx2-encoding phage  $\Phi$ Min27. [Conclusion] The results show that *fliA* and *fliD* gene together participated the regulation for flagella motility and *flhDC* gene could affect the motility of the lysogenized strain by phage. It provides the theoretical basis for further research on the mutual regulation between phage lysogenization and host genes.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Stx2-encoding phage, lysogen, *flhDC*, motility

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31272580) and by the State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology (SKLVEB2011KFKT002)

\* Corresponding author. Tel: +86-21-34206003, +86-25-84396517; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn, lucp@njau.edu.cn

Received: 17 October 2013/ Revised: 2 January 2014