

8 株动物源编码 Stx2 短尾噬菌体的生物学特性

夏炉明, 苏良科, 孙建和, 严亚贤*

(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 201101)

摘要:【目的】对 8 株源自大肠杆菌 O157 编码 Stx2 毒素的噬菌体生物学特性进行研究。【方法】丝裂霉素 C 诱导 8 株大肠杆菌 O157 菌株释放噬菌体, 采用 PCR 作初步鉴定, 分离、纯化噬菌体基因组, 随机引物法地高辛(DIG) 标记 *stx2* 基因片段作为探针, 对纯化的噬菌体采用 Southern blot 进行 Stx2 噬菌体再次鉴定, 透射电子显微镜观察纯化的 8 株 Stx2 噬菌体的形态特征, 通过限制性内切酶图谱分析, 确定噬菌体的核酸类型和基因组大小、以及限制性内切酶酶切片段多态性, 并分析噬菌体的蛋白质组成特征。【结果】Southern blot 证实分离的 8 株噬菌体为 Stx2 噬菌体, 电镜下观察的各株 Stx2 噬菌体形态一致, 头部均为正六边形, 尾部很短, 属于短尾噬菌体科, 各株噬菌体之间存在相同的蛋白结构模式, 基因组为双链 DNA, 限制性内切酶片段长度表现出一定的多态性, 噬菌体的基因组大小从 48.0 ~ 65.3 kb 不等。【结论】来源不同菌株的 8 株编码 Stx2 噬菌体均为短尾噬菌体, 其蛋白结构模式一致, 但基因组具有不同组成。

关键词: Stx2 噬菌体; 形态特征; 酶切多态性; SDS-PAGE

中图分类号: Q934 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 08-1121-05

大肠杆菌 O157 是产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 的主要血清型, 是人兽共患的食源性病原微生物^[1]。大肠杆菌 O157 的主要毒力因子为志贺毒素 (Shiga toxin, Stxs), 该毒素能导致 Vero 细胞产生细胞病变, 因此又称为 Vero 毒素 (VTs)^[2]。已知 *stx* 基因是由一组噬菌体 (Stx 噬菌体) 编码, Stx 噬菌体能够溶原转换至宿主菌的染色体中, 使得宿主菌获得产生相应毒素的能力, 从而增强宿主菌的致病力^[3]。Stx 噬菌体高度保守, 但免疫性差异很大, 这使得同一宿主菌可能同时被多种 Stx 噬菌体溶原, 从而表达多种不同类型的 Stx 毒素^[4]。有报道只产生 Stx2 的菌株毒力较强, 而只产生 Stx1 或产生 Stx1 和 Stx2 混合型的菌株致病力较弱^[5]。考虑到 Stx2 在细菌致病过程中的显著作用, 本试验分离、鉴定了 8 株 Stx2 噬菌体, 并对相关生物学特

性做了研究, 这将有助于揭示 Stx 噬菌体介导的毒力基因水平传播机制, 从一个全新的、本质的角度来监测、预防、控制大肠杆菌 O157 的感染、以及相关的高致病性菌株的出现。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 8 株溶原性大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) O157 菌株 (表 1)、大肠杆菌 MC1061 实验菌株由上海交通大学农业与生物学院兽医生物技术研究所有保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: Digoxigenin DNA Labeling Kit 和 Dig Nucleic Acid Detection Kit-HRP 均购自申能博采生物科技有限公司, *EcoR*、*EcoT22*、*Xho*、RNA 酶、DNA 酶购自宝生生物工程有限公司, PEG8000、

基金项目: 国家自然科学基金(30571384)

*通讯作者: Tel: +86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

作者简介: 夏炉明(1982-), 男, 江西省湖口人, 硕士研究生, 预防兽医学。E-mail: xialuming@tom.com

收稿日期: 2008-01-30; 修回日期: 2008-04-10

表 1 Stx2 噬菌体分离株
Table 1 Stx2 bacteriophages

Phage No	Host bacteria	Serotype	Germ resource	Isolation time
Φ PB0308-1	PB0308-1	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08
ΦPB0308-7	PB0308-7	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08
ΦC0308	C0308	<i>E. coli</i> O157	Beef	2003.08
ΦJS001	JS001	<i>E. coli</i> O157	Pork	2001.06
ΦPB0308-4	PB0308-4	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08
ΦPB0308-2	PB0308-2	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08
ΦPB0308-3	PB0308-3	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08
ΦPB0308-5	PB0308-5	<i>E. coli</i> O157	Pig feces	2003.08

尼龙膜购自上海生工生物工程有限公司,丝裂霉素 C 购自阿敏生物公司。MJ-PTC200 PCR 仪、JEM-1230 透射电子显微镜、himac CP80MX 超速离心机。

1.2 Stx2 噬菌体的诱导、纯化、鉴定^[6]

将 8 株大肠杆菌 O157 采用丝裂霉素 C 诱导,大肠杆菌 MC1061 作指示菌,分离细菌诱导上清中的噬菌体,并将单个空斑作连续 3 次纯化,纯化后的噬菌体利用 Stx2P1 (5'-TTCTTCGGTATCCTATTCC-3')/Stx2P2 (5'-TGACTCTCTTCATTCACGGCG-3') 引物 PCR 扩增 *stx2A* 亚单位,收集并保存 PCR 扩增为阳性的噬菌体,获得 8 株 Stx2 噬菌体(表 1)。

1.3 噬菌体中 *stx2* 基因的 Southern blot 鉴定

以大肠杆菌 MC1061 作指示菌增殖 Stx2 噬菌体,按照文献[7]提取噬菌体基因组,用适当体积 TE (pH7.6) 溶解 DNA。以其作为模板,利用 Stx2P1/Stx2P2 引物进行 PCR 扩增 *stx2A* 亚单位,对 PCR 产物进行割胶回收纯化。按 Digoxigenin DNA Labeling Kit 产品说明采用随机引物法标记 *stx* 基因探针。

提取的各株 Stx2 噬菌体基因组,采用 *EcoR* 酶切,反应总体积 40 μL ddH₂O 28 μL; 10×H Buffer 4 μL; 噬菌体基因组模板 6 μL; *EcoR* I 2 μL。37 温育 4 h,酶切产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,凝胶电泳电压 68 V 电泳 2 h,凝胶成像系统观察并记录实验结果。

按照文献[7]转膜步骤将凝胶中噬菌体基因组转移到尼龙膜上。将制备好的尼龙膜转移到杂交袋中,按照 Dig Nucleic Acid Detection Kit-HRP 试剂盒说明进行 Southern blot 杂交。用 DAB 进行显色,目标条带出现后,用水洗膜终止显色,杂交结果拍照分析和长期保存。

1.4 Stx2 噬菌体电镜观察

以 MC1061 作指示菌用双层琼脂平板法增殖 Stx2 噬菌体^[7,8],SM 液洗涤双层琼脂平板上的噬菌斑,在含有噬菌体的 SM 液中加入 RNA 酶消化 RNA, DNA 酶消化 DNA,氯化钠冰浴 1 h,离心收集上清;上清中加入 PEG8000 冰浴 1 h,离心后沉淀用 SM 过夜重悬,加入等体积的氯仿抽提噬菌体悬浮液的 PEG8000 和细胞碎片,回收含噬菌体的亲水相。取少量亲水相用 2% 的磷钨酸负染 1 min,在 JEM-1230 透射电子显微镜下观察病毒粒子形态。

1.5 Stx2 噬菌体 SDS-PAGE

Stx2 噬菌体经 1.4 初步纯化后,收集亲水相利用甘油分级梯度进一步纯化。取 3 mL 40%甘油的 SM,加至离心管管底;在 40%甘油溶液上小心加入 4 mL 5%甘油的 SM;在 5%甘油上层加入噬菌体悬浮液,分级梯度于 4 35000 r/min 离心 3 h,去上清加 1 mL SM 重悬沉淀,即为提纯的噬菌体颗粒。

纯化的 Stx2 噬菌体颗粒进行 SDS-PAGE 电泳,按照配方配制凝胶^[7,9]。浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。浓缩胶阶段电压为 80 V,分离胶阶段电压 120V,染料前沿迁移至凝胶底部停止电泳。考马斯亮蓝进行染色,更换脱色液脱色,在凝胶成像系统中观察并记录实验结果。

1.6 Stx2 噬菌体限制性内切酶酶切片断多态性

提取的各株的噬菌体基因组 DNA 分别采用单酶切和双酶切。*EcoR* 酶切此 8 株 Stx2 噬菌体的 DNA,反应总体积和酶切反应条件同 1.3。*EcoT22*、*Xho* 双酶切此 8 株 Stx2 噬菌体的 DNA,其中 *EcoT22* 和 *Xho* 各 1 μL。酶切结束后,分别进行琼脂糖凝胶电泳,观察并记录结果。

2 结果

2.1 Stx2 噬菌体 Southern blot

分离的 8 株 Stx2 噬菌体基因组 DNA 经过 *EcoR*

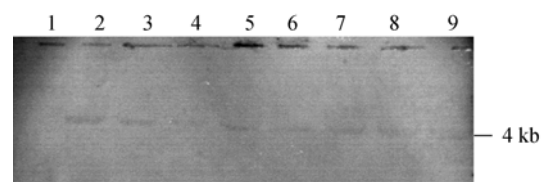


图 1 Stx2 噬菌体的 Southern blot 鉴定

Fig. 1 Southern blot identified Stx2 phages. 1.MC1061; 2. ΦPB0308-5; 3. ΦPB0308-1; 4. ΦPB0308-2; 5. ΦPB0308-7; 6. ΦPB0308-3; 7. ΦC0308; 8. ΦJS001; 9. ΦPB0308-4.

酶切、电泳、转印和 Southern blot 杂交, 8 株噬菌体均在同一位置显示单一条带, 大小约 4 kb (图 1), 进一步鉴定此 8 株噬菌体均为 Stx2 噬菌体。指示菌 MC1061 基因组 Southern blot 杂交未显示出相应条带, 证明制备的 *stx* 探针的特异性高。

2.2 Stx2 噬菌体形态观察

在 JEM-1230 透射电子显微镜下观察了 8 株 Stx2 噬菌体的形态, 这些噬菌体的头部均呈现正六边形轮廓 (A), 尾部 (B) 很短。经测量各株噬菌体的头部长和宽为 43~57 nm、尾部长为 13~19 nm、宽度为 4~7 nm, 噬菌体颗粒结构如图 2 所示。

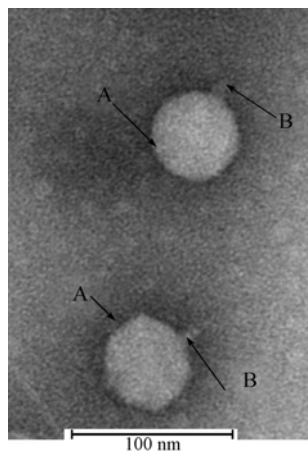


图 2 Stx2 噬菌体 ΦJS001 的透射电镜观察

Fig. 2 Transmission electron micrograph of Stx2 bacteriophages ΦJS001.

2.3 Stx2 噬菌体颗粒的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 对 8 株 Stx2 噬菌体蛋白组成进行分析, 图 3 显示 8 株 Stx2 噬菌体均有 8 条主要蛋白条

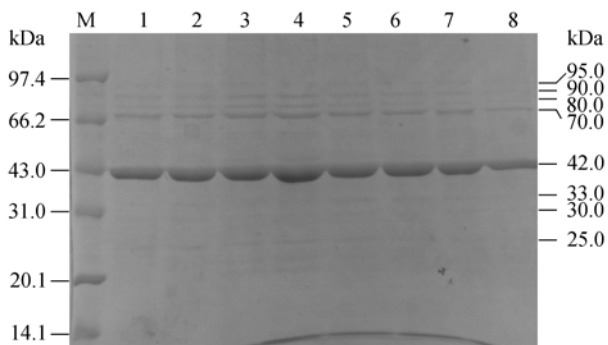


图 3 Stx2 噬菌体颗粒的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of protein profiles of Stx2 bacteriophages. M. Protein Marker; 1. ΦPB0308-5; 2. ΦPB0308-1; 3. ΦPB0308-2; 4. ΦPB0308-7; 5. ΦPB0308-3; 6. ΦC0308; 7. ΦJS001; 8. ΦPB0308-4.

带, 其中 42 kDa 的蛋白条带表达量最高, 虽然 8 株噬菌体来源不同菌株, 但是它们的 SDS-PAGE 图谱特征表现一致。

2.4 Stx2 噬菌体基因组限制性内切酶酶切片断多态性

提取的各株噬菌体的基因组能被双链 DNA 酶分解成不同的片段, 提示噬菌体基因组为双链 DNA。根据 *EcoR* I 单酶切噬菌体基因组 DNA 形成的不同的酶切片段, 可以将此 8 株 Stx2 噬菌体分为 3 组: ΦPB0308-5、ΦPB0308-2、ΦPB0308-7、ΦPB0308-3 为一组; ΦPB0308-1、ΦC0308、ΦJS001 为一组; ΦPB0308-4 单独为一组 (图 4)。根据 *EcoT22* 和 *Xho* 双酶切噬菌体 DNA 的图谱特征可将该 8 株 Stx2 噬菌体分为 4 组 (图 5): ΦPB0308-5 为一组; ΦPB0308-2 为一组; ΦPB0308-1、ΦPB0308-7、ΦPB0308-3、ΦC0308 为一组; ΦJS001、ΦPB0308-4 为一组。单酶切和双酶切的分组并不完全一致。根据 *EcoR* 的酶切片段计算出各噬菌体基因组大小: ΦPB0308-5、ΦPB0308-2、ΦPB0308-7、ΦPB0308-3 约为 53.5 kb; ΦPB0308-1、ΦC0308、ΦJS001 约为 48.0 kb; ΦPB0308-4 约为 65.3 kb。

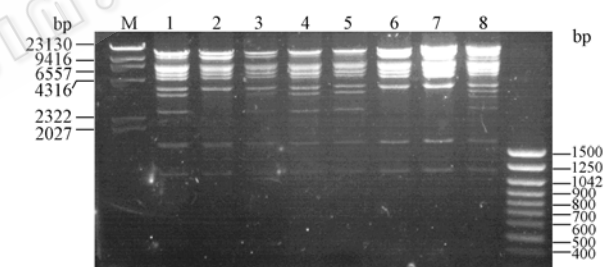


图 4 *EcoR* I 单酶切噬菌体基因组 DNA

Fig. 4 RFLP analysis of Stx2 phage genomic DNA (*EcoR* I-digested DNA). M. DNA Marker; 1. ΦPB0308-5; 2. ΦPB0308-1; 3. ΦPB0308-2; 4. ΦPB0308-7; 5. ΦPB0308-3; 6. ΦC0308; 7. ΦJS001; 8. ΦPB0308-4.

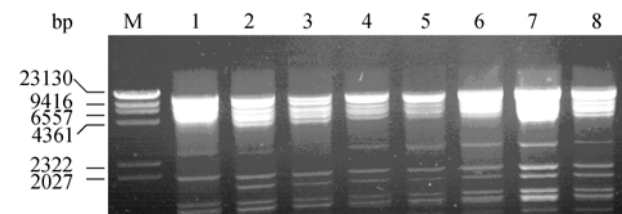


图 5 *EcoT22* I 和 *Xho* I 双酶切噬菌体 DNA

Fig. 5 RFLP analysis of Stx2 phage genomic DNA (*EcoT22* and *Xho* I digested DNA). M. DNA Marker; 1. ΦPB0308-5; 2. ΦPB0308-1; 3. ΦPB0308-2; 4. ΦPB0308-7; 5. ΦPB0308-3; 6. ΦC0308; 7. ΦJS001; 8. ΦPB0308-4.

3 讨论

本研究中电镜观察到的 Stx2 噬菌体均为正六边形头部、短尾的噬菌体,与 Shantini^[10]等报道的短尾 Stx2 噬菌体形态基本一致。但 Muniesa^[11]等从牛源的产志贺毒素大肠杆菌中分离到了多种形态特征的 Stx2 噬菌体。本实验室也曾分离到长尾的 Stx2 噬菌体^[6],该噬菌体头部为正六边形,尾部细长,无尾鞘,但有吸附器样的结构,属于长尾噬菌体科。可见 Stx2 噬菌体具有不同形态特征。对于 Stx2 噬菌体的病毒分类还没有明确,有报道分离的 Stx2 噬菌体是长尾噬菌体科,也有肌尾噬菌体科,也有认为是短尾噬菌体科^[12]。因此 Stx 噬菌体只是表示一大类编码 *stx* 毒力基因的噬菌体,而不是代表某一特定科的病毒,依靠病毒颗粒的形态特征,不能确定是否是 Stx 噬菌体,在研究 Stx 噬菌体时需特别注意形态特征的多样性。分离的各株 Stx2 噬菌体之间存在着相同的蛋白结构模式,但是限制性内切酶片段长度表现出一定的多态性,因此限制性酶切片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析更能反应不同噬菌体分离株的分子特征。同时也表明了噬菌体基因组的变化要比结构蛋白的变化复杂得多。对于每一个 DNA 限制性内切酶组合来说,产生的片段图谱是特异的,可作为某一 DNA 所特有的指纹。试验中 *EcoR* 单酶切与 *EcoT22* 和 *Xho* 双酶切的分组结果并无相关性,因此当选择到一个合适的内切酶时,单酶切也是能够反应出病毒的分子多态性的,且操作更为简单。本实验中根据酶切结果反映出各株噬菌体的基因组大小不尽相同,各分离株基因组大小存在明显差异,表明了所分离的噬菌体的基因组 DNA 具有不同组成,这种差异是如何进化形成、在毒力水平传播机制中发挥怎样的作用等一系列问题,将有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, et al. Stx2 subtyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional

virulence factors. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3060–3065.

- [2] Brien AD, Holmes RK. Shiga and shiga-like toxins. *Microbiology Reviews*, 1987, 51: 206–220.
- [3] Toshio S, Takeshi S, Masahisa W, et al. Distinctiveness of the genomic Sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. *Gene*, 2003, 309: 35–48.
- [4] Melton-Celsa AR, Brien AD. Structure,biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: *Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga Toxin-Producing *E.coli* Strains. Washington, DC, ASM Press, 1998, 121–128.
- [5] Sylvia H, Helge K, Herbert S. Shiga toxin-converting bacteriophages – genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294: 115–121.
- [6] 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(Virologica Sinica)*, 2005, 20(6): 668–672.
- [7] Joseph Sambrook, David W.Russel.分子克隆实验指南(第三版).黄培堂,等译.北京:科学出版社,2002,170–197.
- [8] Muniesa M, Jofre, J. Occurrence of phage infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 183: 197–200.
- [9] Heather EA, Martin JS, Chloe EJ, et al. Immunity profiles of wild-type and recombinant Shiga-Like Toxin-Encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infection and immunity*, 2003, 71(6): 3409–3418.
- [10] Shantini DG, Angela KP, James FH, et al. Diversity and host range of shiga toxin-encoding phage. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 7131–7139.
- [11] Muniesa M, Blanco MDS, et al. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiol*, 2004, 150: 2959–2971.
- [12] Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol*, 2001, 152: 687–695.

Biologic Characteristics of Eight *Podoviridae* Stx2-converting phage

Luming Xia, Liangke Su, Jianhe Sun, Yaxian Yan*

(Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: [Objective] We studied biologic characteristics of Stx2-converting phage induced from *Escherichia coli* O157 by mitomycin C. [Methods] Eight Stx2-converting phages were isolated from *E. coli* O157 and identified by PCR. The phage particles were purified and phage DNA was extracted. Random priming digoxin (DIG)-labeled *stx2*-specific gene probe was prepared for Southern blot. The morphology of these phages were studied by electron microscopy. Protein profiles were analyzed by Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to confirm the size, type, and polymorphism of the purified phage genome. [Results] These 8 phages were confirmed Stx2-converting phage and DIG-labeled probe was highly specific. All phages had a regular hexagonal head and a short tail, belonging to *Podoviridae* phage families. The Stx2 phages had genome sizes in the range of 48 to 65.3kb, consisting of double-stranded DNA. The restriction fragment length polymorphism of these phages showed different groups, although the SDS-PAGE protein profiles of these phages were similar. [Conclusion] These 8 Stx2-converting phages with similar morphology belonged to *Podoviridae* phage families. The protein profiles were highly identical. We could differentiate these Stx2-converting phages according to their restriction fragment length polymorphism patterns.

Keywords: Stx2-converting bacteriophages; morphological character; restriction fragment length polymorphism (RFLP); sodium dodecyl sulphate polyAcrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571384)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: 31 January 2008/ Revised: 10 April 2008

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介(2008-05)

医学实验动物学

刘恩岐 尹海林 顾为望 主编

978-7-03-021351-8 ¥ 38.00 2008年5月30日出版

实验动物学是生物医学研究的基础和前沿学科。在西安交通大学“985”工程项目资助下，作者结合在国内、外学习和工作的经验，并参照发达国家相关学科教学和培训的内容，组织一线教师编写了这本教材。

本书以学生利用实验动物进行生物医学研究为出发点，系统介绍了实验动物基础知识、动物实验基本技术及详细麻醉方法等；注重理论教授、实验操作和技术训练三结合；强调了动物伦理、福利和3R理论；突出了实验动物设计、组织和实施；阐述了实验动物学的新理论、新方法。

本书读者对象为高等院校医药、生物、农业相关专业的科研工作者及硕士、博士研究生。

本书适合从事生命科学相关领域研究的高年级本科生，研究生及科研工作者学习使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编：100717

联系人：周文宇 联系电话：010-64031535（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目