

志贺毒素 2 型噬菌体 Φ Min27 的 *stx2* 基因突变株构建及其感染特性

苏良科¹, 严亚贤¹, 陆承平^{1,2*}

(¹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)

(²南京农业大学动物医学院, 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】通过构建一株 *stx2* 基因突变的志贺毒素 2 型噬菌体, 来观察它对不同血清型大肠杆菌的感染特性。【方法】利用 λ 噬菌体的 Red 重组系统, 将氯霉素抗性基因 (*cat*) 插入到大肠杆菌 O157:H7 Min27 株的 *stx2* 基因中, 获得 O157:H7 Min27 的突变菌株 Min27(Δ *stx2::cat*)。用丝裂霉素对该突变菌株进行诱导, 结合抗性标记和 PCR 方法筛选出一株突变的志贺毒素 2 型噬菌体, 命名为 Φ Min27(Δ *stx2::cat*)。采用双层琼脂平板法和氯霉素抗性筛选的方法, 观察 Φ Min27(Δ *stx2::cat*) 感染 21 株不同血清型大肠杆菌后的裂解和溶原转换情况。【结果】2 株血清型分别为 O60 和 O138 的大肠杆菌可以被 Φ Min27(Δ *stx2::cat*) 溶原感染, 表现出对氯霉素的抗性, 但没有形成噬菌斑, 而大肠杆菌 MG1655 株既可以被溶原又可以被裂解。溶原的菌株经丝裂霉素诱导后, 能释放出感染性的 Φ Min27(Δ *stx2::cat*) 颗粒, 并对大肠杆菌 MC1061 进行裂解形成噬菌斑。【结论】 Φ Min27(Δ *stx2::cat*) 可以感染和溶原特定的大肠杆菌, 且溶原菌株能释放出原感染性的噬菌体, 显示出 Φ Min27 噬菌体具有携带外源基因在若干不同血清型的大肠杆菌间水平转移的能力, 为进一步研究 Stx 噬菌体的感染机理和志贺毒素表达调控奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌 O157:H7; Stx2 噬菌体; Φ Min27(Δ *stx2::cat*); 感染特性

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)09-1227-07

产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin producing *Escherichia coli*, STEC) 是一类重要的食源性致病菌, 包括 100 多种不同血清型的大肠杆菌^[1]。O157:H7 是 STEC 中的一个主要的血清型, 由它引发的食物感染事件在全球范围内一直有零星暴发或散发, 影响较大的事件有 1996 年日本发生的 9000 多人集体感染事件, 2000 年中国的安徽、江苏等地发生的 O157 中毒感染事件和 2006 年 9 月美国多个州发生的因生食被 O157 污染的“毒菠菜”中毒事件^[2-5]。O157:H7 感染人后引起的主要临床 (出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征和血栓性血小板减少性紫癜) 与它所产生的志贺毒

素 (Shiga toxin, Stx) 密切相关^[6,7]。Stx 有两种主要的形式: Stx1 和 Stx2, 它们的核酸序列和免疫原性有所差别^[8]。Stx1 和 Stx2 分别由整合在大肠杆菌染色体上前噬菌体的 *stx* 基因编码, 携带 *stx1* 和 *stx2* 基因的噬菌体分别称为 Stx1 和 Stx2 噬菌体。Stx 前噬菌体在 O157:H7 的进化中起着重要的作用, 是引起宿主菌基因组多样性的主要因素^[9-11]。

要了解噬菌体介导的基因转移在致病菌进化中的作用, 就必需了解和研究介导基因转移的噬菌体自身。携带有标记基因 (如 *GFP*, 抗性基因) 的重组噬菌体是一个非常有用的工具。自杀性质粒是常用的突

基金项目: 国家自然科学基金(30571384)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介: 苏良科(1978-), 男, 江西人, 博士研究生, 研究方向为预防兽医学与畜禽产品安全。E-mail: suliangke@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-03-26; 修回日期: 2008-05-26

变载体,如 PJP5603、pCVD442、pKNG101 和 pFH10 等,在文献中都有描述^[12~15],它们都是以环状质粒的形式转入宿主菌进行基因重组交换的,而近年来发展起来的依赖 λ 噬菌体的 Red 重组系统,可以直接利用含同源臂的 PCR 线性片段,替换出同源臂内的目的基因,而且效率较传统的同源重组方法高几十倍^[16]。在本文利用 Red 重组酶系统突变了 O157:H7 Min27 株 Stx2 噬菌体 Φ Min27 的 *stx2* 基因,利用抗性和 PCR 筛选出突变噬菌体 Φ Min27(Δ stx::cat),并研究了该突变噬菌体对不同血清型大肠杆菌的感染与裂解情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 DH5 α 和用作噬菌体指示的大肠杆菌 MC1061 株由本实验室保存;大肠杆菌 O157:H7 Min27 株分离自上海某猪场腹泻仔猪粪便,含 Stx2 噬菌体,由本实验室鉴定并保存;大肠杆菌 MG1655 株由上海交通大学生命科学技术学院赵立平教授惠赠;20 株不同血清型的大肠杆菌由上海市动物疫病预防控制中心王健博士和扬州大学兽医学院高崧教授惠赠;携带 pKD46 质粒(含 *exo*、*red β* 和 *red γ* 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 $^{\circ}$ 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 λ 噬菌体重组酶;质粒 pLacI 购自 Merk 公司,用于扩增氯霉

素抗性基因(*cat*);连接了一条 Adaptor DNA 片段的 pMD18-T 质粒是本实验室构建,用于获取 pMD18-T 质粒上的 *Sal* 和 *Xba* 的酶切位点,用来连接同源重组 DNA 片段。

1.1.2 主要试剂和仪器:pMD18-T 载体、DNA 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶,购自 TaKaRa 公司;2 \times pfu Taq PCR MasterMix、DL2000 DNA Marker、胰 DNase、RNase、蛋白酶 K、质粒提取试剂盒和 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒,均购自北京天为时代科技有限公司;氨苄青霉素、氯霉素和丝裂霉素 C 购自上海阿敏生物公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。电击仪为美国 Bio-Rad 公司的 GenePulserII 型。

1.2 PCR 引物的设计

扩增突变用线性 DNA 的左右同源臂引物是根据 Stx2 噬菌体 933W 的全基因组序列(GenBank 录用号:AF125520)设计的。扩增左同源臂的上、下游引物是 S-Larm33 和 A-Larm510,5'端分别添有 *Sal* 和 *Xba* 酶切位点,拟扩增的是 Stx2 噬菌体 933W 的 *stx2* 基因的 33~510 bp 范围内长 478 bp 的 DNA 片段。扩增右同源臂的上、下游引物是 S-Rarm912 和 A-Rarm1419,5'端分别添有 *Bam*H 和 *Kpn* 酶切位点,拟扩增的是 Stx2 噬菌体 933W 的 *stx2* 下游的基因,即从 912~1419 bp 范围内长 508 bp 的 DNA 片段。引物 S-PlacI 和 A-PlacI 扩增的是 pLacI 质粒的氯霉素抗性基因,片段长 1313 bp,引物的 5'端分别添有 *Xba* 和 *Bam*H 酶切位点。各引物的序列见表 1。

表1 本研究所使用的引物

Table 1 PCR primers used in this study

| Primer | Sequence(5' \rightarrow 3') | Linkers | Target gene | Product size/ bp |
|------------|--------------------------------|--------------|-------------|------------------|
| S-Larm33 | GGTGTTCGACCTGTACTGGGTTTTTCTT | <i>Sal</i> | L-arm | 478 |
| A-Larm510 | GGTTCTAGAAATTACCACTGAAGTCCATTA | <i>Xba</i> | | |
| S-PlacI | GATTCTAGAGTAAGAGTTCCAACCTTCA | <i>Xba</i> | cat | 1313 |
| A-PlacI | GACGGATCCATTAGGAAGCAGCCAGTAG | <i>Bam</i> H | | |
| S-Rarm912 | ATGGGATCCAGCGTTTCTGAACAGAAAGT | <i>Bam</i> H | R-arm | 508 |
| A-Rarm1419 | GGAGGTACCGAACCCGTGTCGATAATGAA | <i>Kpn</i> | | |

1.3 同源重组线性 DNA 的制备

以大肠杆菌 O157:H7 Min27 株过夜培养的菌液为模板,用引物 S-Larm33 和 A-Larm510、S-Rarm912 和 A-Rarm1419 分别扩增 L-arm 和 R-arm 片段;以 pLacI 质粒 DNA 为模板,用引物 S-PlacI 和 A-PlacI 扩增 *cat* 基因。按常规的酶切及连接方法将 L-arm、*cat* 基因和 R-arm 片段逐步串联到 pMD18-T 质粒,转

化 DH5 α 感受态,阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。以携带上述 3 个 DNA 片段的 pMD18-T 质粒 DNA 为模板,用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 进行 PCR,所得的产物切胶回收纯化,获得同源重组的线性 DNA。

1.4 电击转化

提取大肠杆菌 BW25113 菌株所含的 pKD46 质

粒,电转入大肠杆菌 O157:H7 Min27 株细菌中,涂布于含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基平板,30 培养过夜,接种 Min27 株/pKD46 菌落 30 培养至 $A_{600}=0.25$ 时,加入 L-阿拉伯糖至 100 mmol/L ,诱导 1h (A_{600} 不能超过 0.6),使 pKD46 上的 *Exo*、*Bet* 和 *Gam 3* 个蛋白充分表达,按常规方法制成所需的电击感受态细胞,存放于 -80°C 冰箱待用。

将同源重组的线性 DNA 片段约 300 ~ 500 ng 加入 Min27 株/pKD46 感受态细胞,混匀,转入 0.1 cm 电击杯中,用 Bio-Rad 电击仪作电转化。电击条件:200 Ω , 25 μF , 电压 1.8 kV, 电击时间为 4 ~ 5 ms, 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(氯霉素浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 培养 18 h 后用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 PCR 鉴定平板上生长的克隆,阳性的克隆接种液体 LB 培养基 42 培养 12 h,以去除 pKD46 质粒,便获得携带 *cat* 基因的 O157:H7 Min27 突变株。

1.5 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$) 噬菌体的诱导及纯化

参照张慧英等的方法,从 O157:H7 Min27 突变株中进行突变噬菌体的诱导和纯化^[17]。LB 液体培养基的氯霉素终浓度为 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 丝裂霉素 C 的终浓度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 大肠杆菌 MC1061 作指示菌,用双层琼脂平板法纯化噬菌体,在噬菌斑分布均匀的双层琼脂平板上挑取单个噬菌斑,置于含 1mL LB 液体培养基的 Eppendorf 管中,37 振荡 2 ~ 3 h 后,按上述双层琼脂平板法对单个噬菌斑进行 5 次的纯化,直至获得形态和大小完全一致的噬菌斑,即获得了纯化的噬菌体。

1.6 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)噬菌体 DNA 提取及验证

挑取 1.5 中纯化的单个噬菌斑,置于 1mL LB 液体培养基的 Eppendorf 管中,37 振荡 2 ~ 3 h 后,用大肠杆菌 MC1061 作指示菌,用双层琼脂平板法进行噬菌体的繁殖扩增,待平板上噬菌斑相互接触,相邻噬菌斑结合部位只剩轻薄透明的细菌边缘带时,向每块平板内加 5 mL SM 液(每升含 5.8 g NaCl, 2.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mL 1M Tris-HCl, pH7.5), 4 摇床轻晃动数小时,以使平板上层琼脂中的噬菌体颗粒充分释放到 SM 液中,然后将平板内的 SM 洗液合并起来,加入终浓度 0.1%氯仿后再振荡 15min, 4000 \times g 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,便获得高效价的噬菌体裂解液,取少量用于 1.7 中的感染试验,其余的用于提取噬菌体 DNA,方法参照 Sambrook 等

的进行^[18]。噬菌体 DNA 用酒精沉淀后溶解于 TE(pH 8.0) 中,用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 进行 PCR 鉴定,并以从 Min27 菌株中直接诱导出的 *Stx2* 噬菌体 Φ Min27 DNA 作为阴性对照。产物经 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后连接 pMD18-T vector, 转化入 DH5a, 送上海生工生物工程有限公司测序,结果与 GenBank DNA 数据库的核酸序列比较,来验证所提取噬菌体 DNA 的 *stx2* 中是否插入了 *cat* 基因及位置是否与设计的相符。

1.7 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)对不同血清型大肠杆菌的感染试验

Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)对大肠杆菌的裂解感染采用常规的双层琼脂平板法进行。以待测的大肠杆菌作指示菌,取 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$) 噬菌体液 200 μL 作 10 倍递减稀释,与等体积的待测菌混合加入上层琼脂中,再浇入 LB 琼脂平板上 37 培养 24 h 后观察是否有噬菌斑形成。

Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)对细菌的溶原感染试验根据 James 等(2001)的方法进行^[19]。取 100 μL 的细菌 (10^7 CFU)与 100 μL 稀释的 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$) 噬菌体液 (10^4 PFU)混合,37 温育 4 h 后,全部转入 4 mL LB 液体培养基(35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素)中,37 180 r/min 振荡培养 48 h,用于筛选并富集溶原了 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)的细菌。菌液 8000 g 离心 5 min,菌体涂布在 LB 琼脂平板上(35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素),37 培养过夜。挑取平板上长出的菌落,用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 进行 PCR 鉴定,产物电泳后含有一条约 2.3 kb 条带的细菌可确认为溶原了 Φ Min27 ($\Delta\text{stx}::\text{cat}$)。对溶原菌再按照 1.5 中的方法用丝裂霉素进行诱导,用大肠杆菌 MC1061 作指示菌,检测是否能够诱导出 Φ Min27($\Delta\text{stx}::\text{cat}$) 噬菌体及裂解指示菌,同时提取噬菌体的 DNA,用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 进行 PCR 鉴定。

2 结果

2.1 线性打靶 DNA 的制备

采用全菌 PCR 的方法,以 O157:H7 Min27 菌液作模板,用左、右同源臂的引物可扩增出 478 bp 和 508 bp 长的 DNA 片段,以 pKD46 质粒为模板,可扩增出大小 1313 bp 的 *cat* 基因。将左同源臂、*cat* 基因、右同源臂逐步连接到 pMD18-T 载体上,用引物 S-Larm33 和 A-Rarm1419 进行 PCR,可得到长 2300 bp

左右的条带(图1)。测序结果表明左、右同源臂的DNA与NCBI中Stx2噬菌体933W、VT2-Sakai、VT2-Sa和stx2Φ-I对应的stx2基因100%相同,扩增的cat基因与质粒pLacI也完全相同,而且上述3个DNA片段的连接顺序都正确。

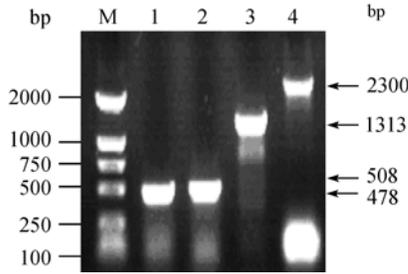


图1 线性打靶DNA的PCR产物

Fig. 1 PCR products of the targeting genes. M. DL2000 Marker; 1. Left arm; 2. Right arm; 3. cat gene; 4. Ligated targeting gene.

2.2 ΦMin27(Δstx::cat) 噬菌体的验证

用突变的Min27株菌体和从该突变菌中诱导出的Stx2噬菌体DNA作为模板,以引物S-Larm33和A-Rarm1419进行PCR,都能扩增出一条长约2300bp的条带,而从未突变的Min27株菌中诱导出的Stx2噬菌体ΦMin27只能扩增出一条约1400bp左右的条带(图2)。对从突变菌中所诱导的Stx2噬菌体扩增出的长约2300bp片段进行测序,结果证实了cat基因已插入噬菌体的stx2基因中,即获得了ΦMin27(Δstx::cat)突变噬菌体。对该突变噬菌体连续5次传代,cat基因依然能稳定存在。以MC1061作为ΦMin27(Δstx::cat)和ΦMin27的指示菌,两者形成的噬菌斑的形态、大小和数量没有明显的区别,

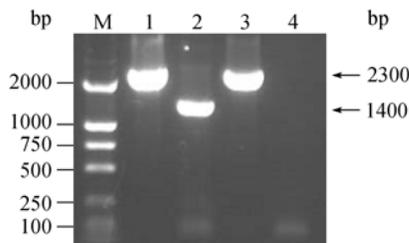


图2 引物S-Larm33和A-Rarm1419 PCR鉴定ΦMin27(Δstx::cat)

Fig. 2 PCR identification of ΦMin27(Δstx::cat) with primers S-Larm33 and A-Rarm1419. M. DL2000 Marker; 1. The fragment amplified from ΦMin27(Δstx::cat); 2. The fragment amplified from ΦMin27; 3. The fragment amplified from mutant E.coli Min27 strain; 4. ddH2O control.

说明氯霉素基因的插入并没有影响到噬菌体的复制和裂解功能。

2.3 ΦMin27(Δstx::cat) 对细菌的感染

21株不同血清型的大肠杆菌中,有2株血清型分别为O60和O138的大肠杆菌,可以被ΦMin27(Δstx::cat)溶原,并表现出对氯霉素的抗性,以它们作为指示菌进行裂解试验时,都没有观察到噬菌斑。实验室菌株MG1655被用来作ΦMin27(Δstx::cat)裂解和溶原的阳性对照,该菌株在被ΦMin27(Δstx::cat)感染后,既可以被裂解形成噬菌斑又可以被溶原(表2)。对2株溶原的大肠杆菌和MG1655的溶原菌用丝裂霉素诱导后,都能够释放出感染性的噬菌体,并裂解指示菌MC1061形成噬菌斑。分别提取它们所释放噬菌体的DNA,然后用引物S-Larm33和A-Rarm1419进行PCR扩增后,产物电泳后都能观察到2.3kb的清晰条带。说明从溶原的细菌中都能诱导出ΦMin27(Δstx::cat)。ΦMin27(Δstx::cat)上携带的cat基因赋予溶原菌对氯霉素的抗性,但经过氯霉素的富集筛选过程后,能在氯霉素平板上生长的不一定是成功溶原的细菌,有些是自发突变产生了抗性。21株大肠杆菌感染ΦMin27(Δstx::cat)后,经过氯霉素的富集筛选过程,有3株可以在氯霉素平板上长出克隆,分别是1株O1、1株O11和1株O88,从这些克隆中未能鉴定到溶原的ΦMin27(Δstx::cat)。

表2 ΦMin27(Δstx::cat)对大肠杆菌的溶原

Table 2 Infection of E.coli strains with ΦMin27(Δstx::cat) and production of lysogens

| Serotype of E.coli strains | Total number of strains | MIC(μg/mL) ^b | No. of lysogens infected by ΦMin27(Δstx::cat) |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| O1 | 1 | 6.0 | 0 |
| O2 | 4 | 6.0 | 0 |
| O11 | 3 | 1.0~7.0 | 0 |
| O26 | 1 | 2.0 | 0 |
| O45 | 1 | 7.0 | 0 |
| O60 | 1 | 6.5 | 1 |
| O78 | 1 | 7.0 | 0 |
| O88 | 1 | 7.0 | 0 |
| O115 | 1 | 6.0 | 0 |
| O125 | 1 | 1.5 | 0 |
| O138 | 3 | 2.5~7.0 | 1 |
| O157:H7 | 1 | 6.5 | 0 |
| ATCC25922(NK) ^a | 1 | 1.0 | 0 |
| MG1655(NK) ^a | 1 | 1.5 | 1 |

(NK)^a, the serotype of this strain was not known.

(μg/mL)^b, MIC of chloramphenicol for E.coli strains.

3 讨论

在本试验中,课题组利用 λ -Red 重组系统,成功地将大肠杆菌 O157 Min27 株上的 *stx2* 基因置换成 *cat* 基因,并筛选出了携带 *cat* 基因的 Stx2 噬菌体 Φ Min27(Δ stx::*cat*)。实验表明该系统的重组效率的确比较高,每 300 ng 线性 DNA 片段可以得到约 200 个转化子,其中阳性重组率能达到 90%,获得高效重组的主要原因可能有如下几点:首先,突变的目的是基因是在大肠杆菌中。因为 Red 重组系统在不同菌株中的作用效果并不一样,在大肠杆菌中基因敲除的效率要高于痢疾杆菌^[20],但即使同为大肠杆菌,它对不同品系的菌株突变效率也有差别,在 BW25113 中最高,在 Origami (DE3) 中最低,原因还不清楚^[21]。其次,线性打靶 DNA 的同源臂长度约为 500 bp,能很好地与目的基因的同源序列发生同源重组,虽然 Datsenko 等最早应用 Red 重组系统时,线性 DNA 片段两端与靶基因两侧的同源序列仅有 36 bp 和 50 bp 长,但长的同源臂更有利于提高重组效率^[22]。电转化的条件很关键,本实验主要参照 Serra-Moreno 等摸索的条件进行^[23],终止培养感受态细胞前 1 h 加入终浓度为 100 mmol/L 的 L-阿拉伯糖,筛选突变菌时培养基中氯霉素浓度为 5 μ g/mL,线性打靶 DNA 的量是在 300~500 ng/次。另外,在实验中发现,电击后迅速加入 SOC 培养基要比加入 LB 培养基所获得的阳性转化子要多。

选择大肠杆菌 O157 Min27 株上的 *stx2* 基因为突变的靶点,是因为细菌的毒素或抗性基因(如括 A 群链球菌产生的耐热外毒素 A、霍乱弧菌的霍乱毒素和 β 内酰胺酶基因等),经常是细菌基因组上的非结构基因,它们完整性的破坏,对细菌不会产生致死性的影响,所以这些基因往往是人工突变的热点。携带 *cat* 基因的 Stx2 噬菌体 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 溶原感染细菌后,可以赋予细菌对氯霉素的抗性能力。但是,若细菌自身具有对氯霉素的抗性,那么就无法通过抗性来筛选溶原菌。为此,在开展噬菌体的溶原试验前,首先测定了这 21 株不同血清型的大肠杆菌对氯霉素的 MIC 值,它们的值在 1.0~7.0 μ g/mL,因此在筛选溶原菌时采用 35 μ g/mL 的氯霉素浓度,该浓度足以抑制非溶原菌的生长。

噬菌体要成功溶原一个宿主细胞,首先要同宿主菌表面的受体相结合,然后将其核酸注入宿主细胞内,噬菌体 DNA 在自身编码的整合酶和宿主的 IHF

等因子的作用下,以位点特异性重组的方式整合到宿主菌染色体上合适的基因中,并随着宿主菌的繁殖而复制。大肠杆菌染色体中往往含有许多前噬菌体样的成分,缺失 *stx2* 基因的噬菌体 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 可以感染并溶原 1 株 O60 和 1 株 O138 的大肠杆菌,表明 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 与这些细菌中存在的前噬菌体的整合位点或受体并不相同,否则超感染免疫将阻止它的感染。但是,它对其它 18 株大肠杆菌既不能溶原也不能裂解,说明它的宿主范围还是很窄。我们推断可能是这些不能溶原的大肠杆菌菌株缺少针对 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 的表面受体,或染色体中没有适合 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 的整合位点,也有可能是整合位点被宿主菌的前噬菌体占据,这些情况都将导致噬菌体溶原感染的失败^[24, 25]。至于 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 既能裂解又可以溶原实验菌株大肠杆菌 MG1655 的机理,目前还是未知,也正是本实验室目前的研究内容之一。

Stx2 噬菌体 Φ Min27 是诱导自大肠杆菌 O157, 突变了 *stx2* 基因的标记噬菌体 Φ Min27(Δ stx::*cat*) 可以溶原 MG1655、O60 和 O138 的大肠杆菌,证实了 Stx2 噬菌体能够在不同血清型大肠杆菌中水平转移外源基因。Kimmitt 等(2000)报道,除了丝裂酶素外,其它可以抑制细菌 DNA 复制的药物,如喹诺酮类、甲氧苄氨嘧啶和呋喃唑酮等,同样可以诱导 STEC 释放 Stx 噬菌体^[26]。鉴于畜禽携带 STEC 的现象很普遍,而且这些药物在养殖场仍然在应用,这无疑地加速了 Stx 噬菌体在环境中的释放和对其它菌株的溶原,从而形成新的 STEC 基因型和表型,增强了菌株的致病力。因此,如何控制 Stx 噬菌体的释放和溶原感染将是防控 STEC 所致疾病的一个新思路。

参 考 文 献

- [1] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11: 142-201.
- [2] Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, et al. Outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet*, 1996, 348: 831-832.
- [3] 汪华, 景怀琦, 李红卫, 等. 江苏省淮北市肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 感染性腹泻并急性肾衰的研究. *中华流行病学杂志*(*Chinese Journal of Epidemiology*), 2004, 25: 938-940.
- [4] 陆美娟, 胡万富, 陶陶, 等. 安徽省 1999~2003 年 O157: H7 大肠杆菌实验监测及其意义. *疾病控制杂志*(*Chinese Journal of Disease Control & Prevention*), 2005, 9(5): 441-443.

- [5] <http://news.sina.com.cn/w/2006-10-25/092311327811.shtml>.
- [6] Cohen MB, Giannella RA. Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Adv Int Med*, 1991, 37: 173–195.
- [7] Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Rev*, 1991, 13: 60–98.
- [8] O'Brien AD, Tesh VL, Donohue RA, *et al.* Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 180: 65–94.
- [9] Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, *et al.* Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res*, 2001, 8: 11–22.
- [10] Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, *et al.* Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *PNAS*, 2002, 99(26): 17034–17048.
- [11] Perna NT, Plunkett III G, Burland V, *et al.* Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409: 529–533.
- [12] 严亚贤, 陆承平. 大肠杆菌 VT 噬菌体受体基因重组质粒的构建. 上海交通大学学报(农业科学版)(*Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*), 2002, 20(2): 85–89.
- [13] Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*, 1991, 59(12): 4310–4317.
- [14] Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 1991, 109(1): 137–141.
- [15] Fenghua Hu, Annette A, Alcasabas, *et al.* Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev*, 2001 15: 1061–1066.
- [16] Potetee AR. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 9–14.
- [17] 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与鉴定. 中国病毒学(*Virologica Sinica*), 2005, 20(6): 668–672.
- [18] Sambrook J, Friston E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [19] James CE, Stanley KN, Allison HE, *et al.* Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4335–4337.
- [20] 胡堃, 史兆兴, 王恒暉, 等. Red 重组系统在痢疾杆菌基因敲除中的应用研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(6): 740–746.
- [21] 白光兴, 孙志伟, 黄莹, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除. 中国生物化学与分子生物学报(*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2005, 21(1): 35–38.
- [22] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [23] Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, *et al.* Use of the lambda red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7(31): 1–12.
- [24] Tirumalai R, Heatey E, Landy A. The catalytic domain of lambda site-specific recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6104–6109.
- [25] Strauch E, Lurz R, Beutin L. Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. *Infect Immun*, 2001, 69: 7588–7595.
- [26] Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6(5): 458–465.

Construction of a *stx2* deletion mutant of Shiga toxin 2 phage Φ Min27 and its infectious properties

Liangke Su¹, Yaxian Yan¹, Chengping Lu^{1,2*}

⁽¹⁾Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

⁽²⁾Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: [Objective] To construct an *stx2* gene mutant phage Φ Min27(Δ stx::cat) and to observe its infectiousness of various serotypes *Escherichia coli* strains. [Methods] With the help of Red recombinant system, the *stx2* gene of the *E. coli* O157:H7 Min27 strain isolated from intestinal feces of piglet with diarrhea at a swine farm of Shanghai, was replaced by the chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene from plasmid pLacI. Phage Φ Min27(Δ stx::cat) was isolated after induction of *E. coli* Min27(Δ stx::cat) strain with mitomycin C. Twenty-one *E. coli* strains with various serotypes were infected with Φ Min27(Δ stx::cat), and plaque formation and lysogenic conversion of them were investigated. [Results] Of the 21 *E. coli* isolates, 2 with the serotypes of O60 and O138 integrated the Φ Min27(Δ stx::cat) in their chromosomes and expressed resistance to chloramphenicol. With the exception of one laboratory *E. coli* strain MG1655, none of the tested *E. coli* strains supported the formation of plaques and lysogenization when used as indicators for Φ Min27(Δ stx::cat). Following induction with mitomycin C, these lysogenic strains released infectious particles of Φ Min27(Δ stx::cat) that formed plaques on a lawn of *E. coli* laboratory strain MC1061. [Conclusion] These results demonstrated that Φ Min27(Δ stx::cat) was able to infect and lysogenize particular *E. coli* strains and that the lysogens could produce infectious phage progeny. It could be inferred that Stx bacteriophages were able to spread exogenous genes among *E. coli* strains. The work provided a basis for further study on mechanisms of Stx phages infection and control of Stx expression.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; Stx2 bacteriophage; Φ Min27(Δ stx::cat); infectious property

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

*Corresponding author. Tel/ Fax: +86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

Received: 26 March 2008/ Revised: 26 May 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问：我想知道我的稿件的处理状态，如何查询？

答：您可以登录网上查稿区，输入您的用户名、密码，即可查询到审稿状态；如果不是太明白远程中获取的信息，您可以通过 e-mail 询问，请注意务必要提示稿件编号，编辑部会在收到您的来信的当天或者次日及时给予回复。

问：我想尽早得到审稿结果，或者提前发表，有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法？

答：如上述所言，我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前，应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章，并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以，作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部，以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复，5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表，请在投稿的同时提出书面报告，说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性，经过我刊编委会讨论并通过后，可予提前刊出，无需另加任何费用。

问：我的文章现已审查完毕，并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询，如果文章修改后，再次投递，是否还需要交稿件受理费？是否仍然用原论文编号提交？

答：这要分两种情况。

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了，那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理，从程序上来讲和新投稿件是一样的，仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理，请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”，则不作为新稿处理，请作者直接将修改稿上传到远程系统中，不再另交稿件受理费。