

· 实验研究 ·

产毒性和致病性大肠埃希菌中小肠结肠炎耶尔森菌强毒力岛分布的研究

王勇 王红 向前 孙素霞 俞守义

【摘要】 目的 了解小肠结肠炎耶尔森菌强毒力岛在产毒性(EPEC)和致病性大肠埃希菌(EPEC)中的分布。方法 用聚合酶链反应扩增和原位杂交方法。结果 在检测的 93 株 ETEC 和 10 株 EPEC 的毒力岛的检出率分别为 32.25%(32/93)和 30.00%(3/10),1 株肠聚集性大肠埃希菌(EAggEC)也检出了毒力岛,而且这些阳性菌株中的毒力岛大部分连接到天门冬氨酸 tRNA(*asn*tRNA)位点。结论 ETEC、EPEC 以及 EAggEC 是致病性较强的病原菌,而小肠结肠炎耶尔森菌强毒力岛在 ETEC 和 EPEC 中具有阳性率较高的分布,对于进一步研究大肠埃希菌毒力变化和毒力的调控以及细菌毒力的进化具有重要意义。

【关键词】 大肠杆菌;耶尔森菌;强毒力岛;聚合酶链反应

Study on the prevalence of the "high pathogenicity island" of *Yersinia enterocolitica* WA in Enterotoxigenic, Enteropathogenic and Enteraggregative *E. coli* strains WANG Yong*, WANG Hong, XIANG Qian, SUN Su-xia, YU Shou-yi. *The Epidemic Prevention Brigade of Health, General Logistic Department, People's Liberation Army, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To detect the "high pathogenicity island" of *Yersinia enterocolitica* WA in *E. coli* and the to provide evidence for theory base of bacterial evolution process and the different structures in different *E. coli*. **Methods** Polymease chain reaction (PCR), nucleic acid hybridization in situ were used to detect and identify HPI. DNA sequencing was used to compare the gene homology of HPI among *E. coli* with *Yersinia enterocolitica* (Yen). **Results** The *irp2* and *fyua* genes of Yen HPI were investigated in *E. coli* strains. Among them 30 strains were isolated from 93 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains and 3 strains were positive in 10 strains Enteropathogenic (EPEC). HPI was also detected in Enteraggregative *E. coli* (EAggEC) strain. In most of these isolates, HPI was bordered by an *asn*tRNA locus *as* in *Yersinia* sp. Through sequential comparasion the gene sequence homology was higher between in EPEC and EAggEC than ETEC and *Yersinia enterocolitica*. **Conclusions** ETEC, EPEC and EAggEC were pathogenicity bacterias and many of them harboring HPI of Yen and the HPI had the same position in *E. coli* chromosome as *Yersinia enterocolitica* but the diversity of structure and sequence in these *E. coli* might suggest that the HPI of these different serotype *E. coli* were from different ancient bacterias. At the same time, the high positivty rate of HPI in *E. coli* might be crucial to virulence change, virulence evolution and virulence regulation in *E. coli*.

【Key words】 *Escherichia coli*; *Yersinia*; High pathogenicity island; Polymerase chain reaction

毒力岛^[1,2](pathogenicity island)最早是用来描述泌尿道致病性大肠埃希菌(uropathogenic *E. coli*, UPEC)染色体上两个分子量很大、编码许多毒力相关基因的、不稳定的外源 DNA 片段。随着研究的不断深入,在许多病原性细菌中都发现有毒力岛,其中以耶尔森菌(*Yersinia* sp)的强毒力岛^[3](high

pathogenicity island, HPI)的分布较为广泛,在耶尔森菌中强毒力岛被认为是一个铁摄取系统,由一个 30 kb 的核心区发挥作用,即生物合成、摄取和鼠疫耶尔森菌素的调控。这个毒力岛插入到染色体的天门冬氨酸 tRNA(*asn*tRNA)位点,该位点和一个与 P4 噬菌体有同源性整合酶的基因(*intB*)相毗邻。本研究对产毒性大肠埃希菌(ETEC)、致病性大肠埃希菌(EPEC)及肠聚集性大肠埃希菌(EAggEC)中是否存在小肠结肠炎耶尔森菌强毒力岛,以及其结构和功能作一初步探讨。结果报道如下。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(NO. G1999054101)

作者单位:100039 北京,解放军总后勤部卫生防疫队疾病监控科(王勇),第一军医大学流行病教研室(王红、向前、孙素霞),热带医学研究所(俞守义)

材料与amp;方法

1. 菌株 :93 株 ETEC 和 10 株 EPEC 以及 1 株 EA_{gg}EC 标本采自某部队腹泻病人粪便 ,并经血清学鉴定 ,标准株 *Yersinia*-WA 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所徐建国教授馈赠。

2. 聚合酶链反应(PCR) :irp2 引物、fyua 引物和 asn-intB 引物均按小肠结肠炎耶尔森菌毒力岛为模板序列设计 ,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列 :irp2 :LP5 'AAGGATTCGCTGT TACCGGAC 3 ' ; RP 5 ' TCGTCGGGCAGCGTTTCT TCT3 ' ;fyua :LP5 'GCTTTATCTCTGGCCTT3 ' ;RP5 ' GGCATATTGACGATTAACG3 '和 asntRNA-intB :LP5 ' ATCGCTTTGCGGGCTTCTAGG3 ' ; RP5 ' GAACGGCGGACTGTTAAT3 '。Taq 酶和 dNTP 购自上海博彩生物工程公司。用 Biometra-PCR 仪 :预变性 94℃ 5 min ,变性 94℃ 1 min ,退火 52℃ 40 s ,延伸 72℃ 1 min ,32 个循环 ,最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳采用常规方法。

3. 原位杂交 :用地高辛标记的 PCR 扩增产物为探针 ,杂交试剂盒为 Roche 公司产品 ,按说明书操作。

4. DNA 分析 :基因测序由上海博彩生物工程公司测定 ;序列分析以 DNA MAN 分析。

结 果

1. 大肠埃希菌中 HPI irp2 和 fyua 基因的 PCR 检测 :在 93 株 ETEC 中有 30 株 irp2 阳性和 20 株 fyua 阳性 ,检出率为 32.25%(30/93)和 21.51%(20/93) ,irp2 和 fyua 同时存在的菌株为 20 株 ;10 株 EPEC 中有 3 株 irp2 阳性和 3 株 fyua 阳性 ,检出率均为 30.00%(3/10) ,irp2 和 fyua 同时存在的菌株为 3 株 ;EA_{gg}EC 中同时存在这两个片段(图 1,2) ,这提示在毒力岛的转移过程中 fyua 基因容易丢失 ,而在 EPEC 和 EA_{gg}EC 中 fyua 相对较为稳定。

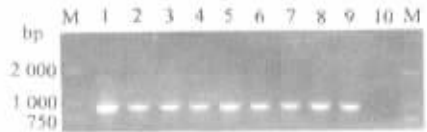


M. DNA Marker ; 1. *Yersinia* O :8WA irp2 ; 2 ~ 6. ETEC irp2 ; 7,8. EPEC irp2 ; 9. EA_{gg}EC irp2 ; 10. 阴性对照

图 1 PCR 扩增 irp2 图谱

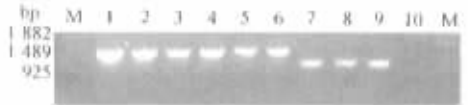
2. HPI 在阳性菌株中的定位鉴定 :在 *Yersinia* sp HPI 基因簇的右端有一个与 P4 噬菌体整合酶基因

有同源性的编码序列 intB ,它包含于 asntRNA 位点。为了进一步鉴定这 20 株阳性株中毒力岛的整合位点 ,本研究设计了一对位于 asntRNA 基因和 intB 基因中间部分的引物。这些 ETEC 和 EPEC 菌株中各有 15 株(15/20)和 3 株(3/10)扩增产物阳性 ,EA_{gg}EC 也扩增出阳性产物 ,这个结果说明 ETEC 和 EPEC 的毒力岛大多数连接到这两个位点。在这 15 株 ETEC 和 3 株 EPEC 以及 EA_{gg}EC 中 ,各有 7 株 ETEC 和 2 株 EPEC 以及 EA_{gg}EC 的扩增出如同阳性菌株 *Yersinia*-WA 相似长度(1 393 bp)的片段 ,而另外 8 株 ETEC 和 1 株 EPEC 的为 1 000 bp 左右(图 3) ,提示在这个区域大约有 300 bp 的缺失。2 株 ETEC 扩增结果阴性 ,这可能与毒力岛整合到染色体的其他位置或毒力岛的边缘被修饰有关^[4]。



M. DNA Marker ; 1. *Yersinia* O :8WA fyua ; 2 ~ 6. ETEC fyua ; 7,8. EPEC fyua ; 9. EA_{gg}EC fyua ; 10. 阴性对照

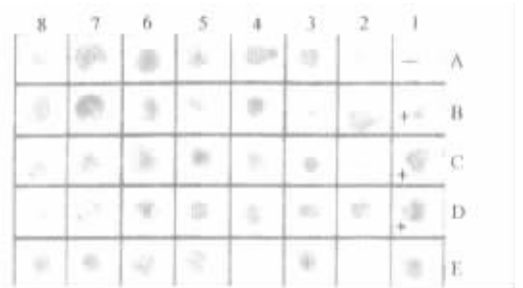
图 2 PCR 扩增 fyua 图谱



M. DNA Marker ; 1. *Yersinia* O 8WA asn-intB ; 2~4. ETEC asn-intB ; 5. EPEC asn-intB ; 6. EAEC asn-intB ; 10. 阴性对照

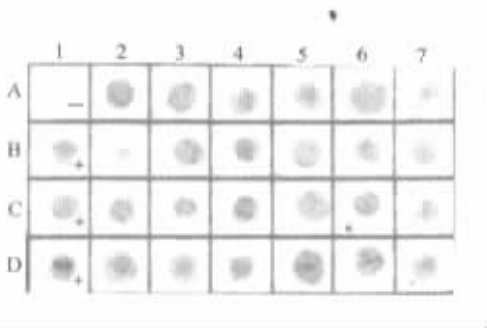
图 3 PCR 扩增 asn-intB 图谱

3. 杂交 :为进一步检测毒力岛在大肠埃希菌中分布的真实性 ,本研究以地高辛标记的 PCR 产物为探针 ,对 ETEC 菌株进行了原位杂交 ,结果与 PCR 检测结果一致(图 4,5)。



A1. 阴性对照 ; B1, C1, D1 为 *Yersinia* O :8WA ; E1 和其余为 HPI 阳性的 ETEC

图 4 ETEC 菌株 irp2 探针杂交图谱



AI. 阴性对照; B1, C1, D1 为 *Yersinia* O 8WA; 其余为 HPI 阳性的 ETEC

图 5 ETEC 菌株 *fyua* 探针杂交图谱

4. 基因序列分析 基因序列分析结果表明, 3 种大肠埃希菌中毒力岛与小肠结肠炎耶尔森菌中毒力岛的 *irp2* 基因的相似性为 95% ~ 97%, *fyua* 基因相似性为 98%, 进一步说明大肠埃希菌中 HPI 与 *Yersinia* sp HPI 相关联。由具体的分析结果显示: 不同的片段在不同的菌型之间的序列保守程度不同 (*fyua* 的保守程度较高), 而且与标准菌株 *Yersinia* sp 的同源性也有差异, 同源性比较可得出: EPEC 与 EA_{gg}EC 的同源性较高 (99% ~ 100%), 它们的毒力岛可能来自同一原始菌; ETEC 与 *Yersinia* sp 的同源性较低 (97% ~ 98%), 其毒力岛很可能是由不同的原始菌转移而来, 结果见表 1。

表 1 毒力岛不同基因片段的序列同源性 (%) 比较

菌株	<i>irp2</i>			<i>fyua</i>			<i>asn-intB</i>		
	ETEC	EPEC	EA _{gg} EC	ETEC	EPEC	EA _{gg} EC	ETEC	EPEC	EA _{gg} EC
<i>Yersinia</i> sp	97	95	95	98	98	98	89	95	95
ETEC		95	95		99	99		89	89
EPEC			100			99			99

讨 论

从检测的结果看, 本次研究的 ETEC 和 EPEC 中小肠结肠炎耶尔森菌 HPI 的检出率较高 (32.25% 和 30.00%), 而且 *irp2* 和 *fyua* 基因并不一定都同时存在于同一 ETEC 菌株 (20/30), 而在 EPEC 中却同时

存在 (3/3), 经过这些阳性菌株进行重复检测, 结果显示在 ETEC 中仍然存在 *fyua* 基因的丢失, 这可能与 HPI 在菌种之间水平转移过程中发生突变或基因重组使得 *fyua* 片段的丢失有关。另外毒力岛在 ETEC 中连接位点大多数连接到如同小肠结肠炎耶尔森菌的 *asntRNA-intB* 整合酶位点, 这说明在肠道菌群之间存在毒力相关基因的转移; 对于在一些毒力岛阳性的 ETEC 菌株中出现 *asn-intB* 基因的部分缺失, Rakin 等⁵ 提出可能是毒力岛在转移过程中发生丢失或者毒力岛在整合到宿主菌染色体上时被宿主菌修饰所致。测序结果显示, 在本次检测的 ETEC、EPEC 和 EA_{gg}EC 中毒力岛的同源性较高, 而且在所随机抽取的 EPEC2 和 EA_{gg}EC 之间毒力岛的同源性 (99% ~ 100%) 高于与 ETEC 的同源性 (89% ~ 99%), 我们可以初步推测 EPEC 和 EA_{gg}EC 所携带的毒力岛可能有不同于 ETEC 的来源。HPI 在 ETEC 和 EPEC 中的广泛分布, 提示我们进一步研究 HPI 在这类菌中的结构和功能, 为研究细菌毒力的进化提供有力的证据。

(第一军医大学流行病教研室陈清教授为本次实验提供菌株, 吴爱军、王雅贤及李建栋技师对本研究提供帮助, 一并致谢)

参 考 文 献

- 徐建国. 毒力岛和细菌毒力的进化. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19: 169-174.
- Hacker J, G-Blum-Oehler, Muhldorfer I, et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol, 1997, 23: 1089-1097.
- Scubert S, Rankin A, Karch H, et al. Prevalence of the "high pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. J Bacteriol, 1998, 166: 480-485.
- Sandrine B, Alzira de Almeida, Camiel E, et al. The *Yersinia* high pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. FEMS Microbiology Letters, 2000, 183: 289-294.
- Rakin A, Schubert S, Guilvout I, et al. Local hopping of IS3 elements into the A + T-rich part of the high-pathogenicity island in *Yersinia enterocolitica* 1B/O 8. FEMS Microbiology Letters, 2000, 182: 225-229.

(收稿日期 2002-02-10)

(本文编辑: 尹廉)