

## 霍乱弧菌产毒株的形成

张萍 阙飙 王多春

【关键词】 霍乱弧菌; 产毒株; 毒力相关基因

**The formation of toxigenic *Vibrio cholerae*** ZHANG Ping, KAN Biao, WANG Duo-chun. State Key Laboratory for Infectious Diseases Control and Prevention, National Institute for Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Corresponding author: WANG Duo-chun, Email: wangduochun@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Funds of China (No. 30872260) and the State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control Project (No. 2011SKLID201).

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Toxigenic strain; Virulence-associated genes

在细菌进化过程中,非致病菌向致病菌进化的一个主要策略是由携带毒力基因的噬菌体进入宿主菌,并在宿主细菌中进行基因交流,改变宿主菌的表型或增加宿主菌的毒力,使无致病力的菌株转变为致病菌。本文就致病性霍乱弧菌的分子进化、CTX $\Phi$ 和VPI基因家族的结构、功能和基因组的多样性,以及CTX $\Phi$ 基因组整合的分子生物学机制进行综述。

1. 致病性霍乱弧菌的产生:霍乱弧菌在其进化过程中,已有超过200个O抗原的血清群,其中产毒的O1和O139血清群菌株可引起霍乱流行和大流行<sup>[1]</sup>。根据其生物学、血清学及分子生物学特征,O1群霍乱弧菌分为不同亚群,并在流行病学上的意义具有很大差异<sup>[2]</sup>。致病性霍乱弧菌的菌株染色体上携带有噬菌体CTX $\Phi$ 毒力基因簇,其中包括霍乱肠毒素基因*ctxAB*,能够编码产生霍乱肠毒素(CT),而CT则是引起严重的水样腹泻,导致感染者脱水、酸中毒甚至死亡等症状的主要致病因子。1996年Waldor和Mekalanos<sup>[3]</sup>在研究中发现,*ctxAB*基因并不是霍乱弧菌基因组自身的固有成分,而是CTX $\Phi$ 基因组的一部分。CTX $\Phi$ 是一个具有单链DNA的温和噬菌体,CTX $\Phi$ 在感染并侵入霍乱弧菌体内后,整合到霍乱弧菌的基因组中,成为霍乱弧菌基因组的一部分。

自然环境中的霍乱弧菌并非都感染了CTX $\Phi$ ,只有那些感染CTX $\Phi$ 并整合了CTX $\Phi$ 基因组的霍乱弧菌(即产毒株)才有可能引发霍乱。引起典型霍乱的霍乱弧菌(产毒株)必须

具备两个条件,一是其基因组中插入了*ctxAB*基因,二是能够分泌CT。由致病性霍乱弧菌产生的CTX $\Phi$ 又可以感染环境中非致病性的霍乱弧菌菌株(非产毒株),将*ctxAB*基因插入其基因组中,使非致病菌株获得致病性。包括霍乱弧菌、大肠埃希菌等在内的一些致病菌的基因组中,均有许多与其致病性相关的基因簇伴生在一起,称为致病毒力岛(VPI)<sup>[4]</sup>。在霍乱弧菌致病株的VPI基因簇中含有一个基因编码TCP菌毛。霍乱弧菌可依赖该菌毛定植在人体肠道壁的黏膜上,同时TCP菌毛又是CTX $\Phi$ 侵入霍乱弧菌的受体,即只有CTX $\Phi$ 与TCP菌毛结合后,CTX $\Phi$ 核酸才能侵入霍乱弧菌。

### 2. CTX $\Phi$ 及VPI基因家族的结构和功能:

(1)CTX $\Phi$ 基因家族的结构和功能:CTX $\Phi$ 基因组的基本结构由核心区区和RS2区两部分组成。核心区包括*psh*、*cep*、*pIII<sup>CTX</sup>*、*ace*、*zot*和*ctxAB*等基因,前4个基因与噬菌体颗粒的组装及结构形成有关,即*cep*编码核心菌毛,*pIII<sup>CTX</sup>*编码产物与CTX $\Phi$ 颗粒识别霍乱弧菌细胞上的受体有关,*zot*和*ace*基因编码的两种毒素蛋白在噬菌体颗粒形成中发挥功能;*ctxAB*基因与噬菌体形成无关,但编码CT毒素的A亚单位和B亚单位,是霍乱的致病因子。另外我们<sup>[5]</sup>发现有不携带*ctxAB*的CTX $\Phi$ 前体形式nct-CTX $\Phi$ ,或称为pre-CTX $\Phi$ <sup>[6]</sup>。RS2区包括*rstR*、*rstA2*和*rstB2*基因,*rstA2*基因编码的RstA蛋白与CTX $\Phi$ 的复制与整合有关<sup>[7]</sup>; *rstB2*基因的编码产物与CTX $\Phi$ 在细菌染色体基因组特异位点的整合有关;*rstR*的转录方向与*rstA2*和*rstB2*相反,它编码一种抑制蛋白RstR,可以结合于*rstA*之前的ig-2启动子序列而抑制*rstA*的转录,因此具有噬菌体免疫的作用,即RstR蛋白可以防止CTX $\Phi$ 的转入或阻止转入的CTX $\Phi$ 进行复制与整合。有些菌株中的CTX $\Phi$ 基因组内还含有重复序列RS1区域,Davis等<sup>[8]</sup>曾经报道过RS1控制着噬菌体颗粒的产生。该序列只是比RS2多*rstC*基因,其编码的RstC蛋白可以与RstR结合起到拮抗抑制作用,控制着CTX $\Phi$ 的溶原现象、CTX $\Phi$ 的颗粒产生和CT毒素的表达。RS1通常出现于CTX $\Phi$ 的相邻两侧,中间无其他染色体间隔位点。

(2)VPI基因家族的结构和功能:霍乱弧菌的主要定居因子之一是TCP菌毛,TCP合成基因存在于一段40 kb的DNA片段,被命名为VPI,但在一些非产毒株中也存在<sup>[9]</sup>。CTX $\Phi$ 利用TCP作为受体,并且VPI编码的ToxT调节蛋白能够调控TCP基因和霍乱毒力基因的转录以适应不同的宿主与外界环境。

VPI可分成3个功能区域(图1)。VPI左侧区域包括编码一个转座酶和几个功能未知的ORFs;VPI中心区域包括许多编码TCP的*tcp*基因簇,还包括*tcpPH*基因,参与TCP的调

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.02.022

基金项目:国家自然科学基金(30872260); 传染病预防控制国家重点实验室项目(2011SKLID201)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:王多春, Email: wangduochun@icdc.cn

控和霍乱弧菌毒素的表达;VPI 右侧区域包括 TCP 的转运和组装基因、毒素调控 *toxT* 元件(是 TCP 的产物)、*tcpJ* 基因(加工)、*acf* 基因(与定植作用有关)、*int*(与噬菌体样整合酶高度同源)。

3. CTXΦ 及 VPI 基因家族的多样性:

(1)CTXΦ 家族基因组的多态性:在不同来源的霍乱弧菌中,CTXΦ 基因组的差异主要是由于抑制基因 *rstR* 和 *ig-2* 序列在 DNA 序列上的明显变化所致。根据菌株 *rstR-ig-2* 序列的差异,可将 CTXΦ 分为不同类型,包括古典型来源的 CTX<sup>Cl</sup>Φ, El Tor 型来源的 CTX<sup>ET</sup>Φ, 部分 O139 霍乱菌株中发现的加尔各答型的 CTX<sup>Gc</sup>Φ, 以及在部分非 O1、非 O139 菌株中发现的 *rstR-4\**、*rstR-4\*\** 和 *rstR-5* 基因, *rstR6* 以及 *rstR-232*。本研究组曾在我国珠江河口水体霍乱弧菌监测中,发现一种与上述 *rstR* 和 *ig-2* 序列不同新的 CTXΦ 类型,命名为 *rstR<sup>2</sup>*, 相对应的 CTXΦ 类型命名为 CTX<sup>2</sup>Φ 型。

(2)VPIΦ 家族基因组的多态性:霍乱弧菌 VPI 毒力岛为可移动元件,其多态性主要表现在 *tcpA* 及 *tcpH-tcpA* 间隔区。目前根据 *tcpA* 基因所推测出的蛋白序列的差异,将霍乱弧菌大致分为 5 类,即 *tcpA-env*、*tcpA-cla*、*tcpA-El Tor*、*tcpA-Nandi*、*tcpA-Novais*<sup>[10]</sup>。此外在产毒的非 O1 群、非 O139 群(O141、O8、O37)霍乱弧菌中存在新的 *tcpA* 等位基因<sup>[11]</sup>,且对丝状噬菌体 CTXΦ 敏感,提示产毒非 O1 群、非 O139 群菌株的出现可能是非产毒株通过新型功能性的 TCP 菌毛获得 CTXΦ 进化而来。

4. CTXΦ 基因组在霍乱弧菌染色体上的整合机制:目前研究认为,CTXΦ 和其他一些丝状噬菌体的整合机制,是噬菌体利用了宿主菌染色体上的二聚体位点,从而整合到后者的一条或两条染色体上。由于 CTXΦ 的基因组为单链形式,目前的研究多倾向于噬菌体是以复制型双链的形式整合。CTXΦ 整合到霍乱弧菌基因组中需要两种宿主编码的酪氨酸重组酶 XerC 和 XerD<sup>[12]</sup>。在正常情况下 XerC 和 XerD 是通过 RecA 介导的同源重组,在 28 bp 的 *dif* 位点上的特定位置增加一个交叉,以解决其环状染色体二聚体的产生<sup>[13]</sup>。在霍乱弧菌的两条染色体上各含有一个二聚体位点(*dif1* 和 *dif2*), *dif* 位点由两个 11 bp 的特殊结合位点组成,分别结合两种 Xer 重组酶,并由一个 6 bp 的中心区隔开<sup>[14]</sup>。CTXΦ 中双链 DNA 的复制型包括 2 个类似于 *dif* 的反向序列,称为 *attP1* 和 *attP2*, 由噬菌体基因组上的一段 90 bp 的 DNA 片段隔开<sup>[15]</sup>。CTXΦ 在霍乱弧菌 *dif* 位点上的整合,依赖于一个 150 bp 的叉状发卡结构的形成,即噬菌体的单链核酸反向折叠形成发卡结构, *attP1* 和 *attP2* 在该发卡结构的茎部配对结合,暴露出噬菌体的结合位点 *attP*(+)。

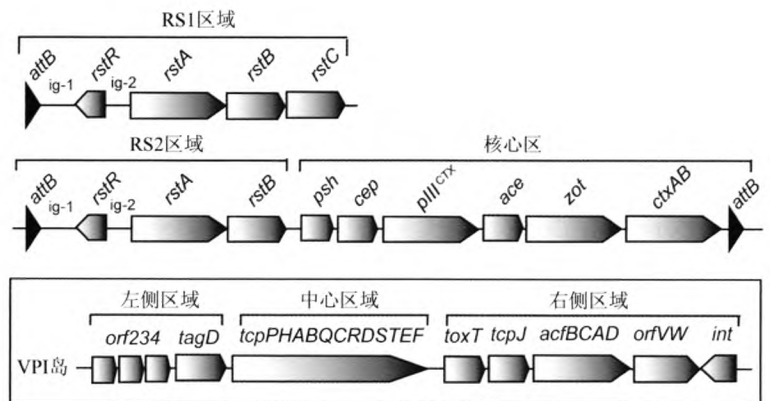
由核蛋白复合物启动整合反应<sup>[16]</sup>,该核蛋白复合物包括 CTXΦ 的 *attP*(+)、一个 *dif* 位点和一对 Xer 重组酶。其中 Xer 重组酶催化一对特殊链上从 3' 端到结合位点键的断裂,在一端

产生重组 DNA 的共价磷酸酪氨酸的连接,在另一端产生游离的 5' 羟基末端。CTXΦ 整合依赖于在噬菌体连接位点的重叠区和宿主染色体二聚体位点的同源区断裂处链上碱基对的互换,经 XerC 的催化,在紧邻 XerC 位点形成伪霍利迪(pseudo-Holliday)连接,经过复制可转化成产物。因为噬菌体的连接位点是掩藏在双链噬菌体 DNA 中,故此过程为不可逆。这样在宿主染色体上,噬菌体的整合就可以产生一个新的 *dif* 功能位点和两个非功能性类似于 *dif* 的位点序列,即 *attP1* 和 *attP2*。

有实验证实<sup>[13]</sup>,这种整合最初是通过 El Tor 变异型的 CTXΦ 在大肠埃希菌中和 *dif1* 相互作用,及在体外通过大肠埃希菌 Xer 重组酶作用得以完成。一项敏感的定量试验证实 CTX<sup>ET</sup>Φ 的单链 DNA(+)能够整合到霍乱 El Tor 型菌株的 *dif1* 位点<sup>[17]</sup>,该整合模式也明确了不同 CTXΦ 变异型所具有的整合位点与宿主二聚体位点之间的相容性,决定整合的惟一因素是可能形成的 Watson-crick 或者摆动碱基对,并以相互作用来稳定由 XerC 催化的噬菌体连接位点和其目标二聚体位点间的链交换。这就解释了为什么 CTX<sup>ET</sup>Φ 只在 *dif1* 位点整合, CTX<sup>Cl</sup>Φ 既可以在 *dif1* 位点上整合,又可以在 *dif2* 位点上整合。而且这种整合模式并不仅限于 CTXΦ,在另外一些丝状噬菌体上也发现整合在 *dif* 位点上,如 TLC、VEJ、VGJ、VSK、VSKK(AF452449)等均被整合在 *dif1* 或 *dif2* 位点<sup>[18,19]</sup>。

对于这个特殊的 CTXΦ 整合模式,仍存在亟待解决的问题。首先,CTXΦ 的惟一连接位点的环状单链 DNA 分子其整合效率很低<sup>[17]</sup>,但如果噬菌体的 RS 区存在时,整合效率则很高。这可能是由于噬菌体单链环状基因组的稳定性弥补了宿主菌中单链 DNA 的不稳定性,而单链 DNA 结合蛋白 RstB,在底物的稳定性方面也发挥了重要作用。其次,CTXΦ 的单链 DNA 和宿主的双链 DNA 交换,噬菌体利用弧菌的 Xer 重组酶系统,这是否与弧菌特定的生活环境和特定的基因组结构和排列有关尚需进一步研究。

5. 研究展望:WHO 分析报告显示,21 世纪霍乱仍处于高发态势,其中非洲一些地区已成为持续高发区,并依然在向全球扩散,如 2010 年拉丁美洲的海地出现了范围最大的暴



注:方框中显示 VPI 的 3 个功能区域

图 1 CTXΦ 和 VPI 基因簇的基本结构

发<sup>[20]</sup>。我国目前处于霍乱流行的间歇期,但仍不能忽视其所具有的潜在威胁。在自然环境中存在的霍乱非产毒株可在一定条件下捕获噬菌体 CTX $\Phi$ 而成为产毒株。目前虽已了解霍乱弧菌的 CTX $\Phi$ 整合机制,但是不同变异型的霍乱菌株对噬菌体的敏感度亦不同,何种变异型的霍乱弧菌更易捕获噬菌体而成为潜在的流行株,还需要进一步监测,以便从分子水平揭示霍乱弧菌毒力基因的进化及转移特征,这对于了解流行菌株变迁进化规律和发展趋势具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Sack DA, Sack RB, Nair GB, et al. Cholera. Lancet, 2004, 363 (9404): 223-233.
- [2] Aliabad NH, Bakhshi B, Pourshafie MR, et al. Molecular diversity of CTX prophage in *Vibrio cholerae*. Lett Appl Microbiol, 2012, 55(1): 27-32.
- [3] Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science, 1996, 272(5270): 1910-1914.
- [4] Karaolis DK, Somara S, Maneval DR Jr, et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity-island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. Nature, 1999, 399(6734): 375-379.
- [5] Kan B, Qi GM, Liu YQ, et al. Genome of bacteriophage CTX $\Phi$  without the presence of *ctxAB* exists in *ctxAB* strains of *Vibrio cholerae*. Chin J Microbiol Immunol, 1999, 19(3): 175-179. (in Chinese)  
 阚斌, 祁国明, 刘延清, 等. 霍乱弧菌中存在不含霍乱毒素基因的噬菌体 CTX $\Phi$ 基因组. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(3): 175-179.
- [6] Boyd EF, Heilpern AJ, Waldor MK. Molecular analyses of a putative CTX $\phi$  precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX( $\phi$ )s by toxigenic *Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 2000, 182(19): 5530-5538.
- [7] Cotter PA, DiRita VJ. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu Rev Microbiol, 2000, 54(1): 519-526.
- [8] Davis BM, Kimsey HH, Kane AV, et al. A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. EMBO J, 2002, 21(16): 4240-4249.
- [9] Gennari M, Ghidini V, Caburlotto G, et al. Virulence genes and pathogenicity islands in environmental *Vibrio* strains nonpathogenic to humans. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 82(3): 563-573.
- [10] Mukhopadhyay AK, Charkraborty S, Takeda Y, et al. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX  $\Phi$  prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 2001, 183(16): 4737-4746.
- [11] Kumar P, Thulaseedharan A, Chowdhury G, et al. Characterization of novel alleles of toxin co-regulated pilus a gene (*tcpA*) from environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Curr Microbiol, 2011, 62: 758-763.
- [12] Huber KE, Waldor MK. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. Nature, 2002, 417(6889): 656-659.
- [13] Das B, Bischerour J, Val ME, et al. Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4377-4382.
- [14] Barre FX, Sherratt DJS. Xer site-specific recombination: promoting chromosome segregation//Craig NL, Craigie R, Gellert M, et al. Mobile DNA II. Vol. 1. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2002: 149-161.
- [15] Das B, Bischerour J, Barre FX. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. Indian J Med Res, 2011, 133(2): 195-200.
- [16] Val ME, Bouvier M, Campos J, et al. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. Mol Cell, 2005, 19(4): 559-566.
- [17] Das B, Bischerour J, Barre FX. VGJ $\Phi$  integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(6): 2516-2521.
- [18] Campos J, Martinez E, Izquierdo Y, et al. VEJ $\Phi$ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. Microbiology, 2010, 156(1): 108-115.
- [19] Campos J, Martinez E, Suzarte E, et al. VGJ $\Phi$ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX $\Phi$ . J Bacteriol, 2003, 185(19): 5685-5696.
- [20] Centers for Disease Control and Prevention. Update: cholera outbreak—Haiti, 2010. Morb Mortal Wkly Rep, 2010, 59(45): 1473-1479.

(收稿日期: 2012-10-10)

(本文编辑: 张林东)