

· 实验室研究 ·

大肠埃希菌 O157:H7 携带 *stx2*::IS1203v 基因研究

罗霞 叶长芸 李芳 汪华 任军 景怀琦 徐建国

【摘要】 目的 了解中国部分地区大肠埃希菌 O157:H7 菌株携带志贺毒素基因变异状况。方法 采用聚合酶链反应扩增志贺毒素基因,使用核苷酸序列测定判断是否存在志贺毒素的新变种,用 HeLa 细胞毒性实验研究其细胞毒性的变化。结果 1992-2002 年中国部分地区分离到的 289 株产志贺毒素的大肠埃希菌 O157:H7 中有 3 株菌携带的志贺毒素 2 (*stx2*) 基因有 1.3 kb 的插入序列 (IS) 插入,且这段 IS 和 IS1203 变种 (IS1203 variant, IS1203v) 有 100% 的核苷酸序列同源性。IS1203v 插入到 3 株大肠埃希菌 O157:H7 *stx2* 基因的位置及开放性读码框 (ORF) 方向有所不同。除此之外,3 株菌原有的 *stx2* 基因序列完全一致且为 Stx2 原型毒素。和 Stx2 原型毒素相比,这 3 株携带 *stx2*::IS1203v 基因的菌株对 HeLa 细胞的毒性明显降低。结论 分离到 IS1203v 插入 *stx2* 基因的大肠埃希菌 O157:H7 菌株;IS1203v 的插入可导致对 HeLa 细胞的细胞毒性降低。

【关键词】 大肠埃希菌 O157:H7; 志贺毒素; 插入序列 1203v

Identification of harboring *stx2*::IS1203 *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in China LUO Xia*, YE Chang-yun, LI Fang, WANG Hua, REN Jun, JING Huai-qi, XU Jian-guo. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 **Objective** To understand the variation of Shiga toxin (*stx*) genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in China. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the types of *stx* genes and the nucleotide sequences of the amplified *stx* variants genes were determined. Compare to the cytotoxicity of Stx, variants were tested by HeLa cell assay. **Results** We found novel *stx2* genes in 3 of 289 strains of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 isolated from 1999 to 2002 in China. The novel *stx2* genes were inserted by a 1.3-kb insertion sequence (IS) and the nucleotide sequences of IS showed 100% homology with that of IS1203 variant (IS1203v). The IS1203v inserted in the *stx2* genes of three *E. coli* O157:H7 strains at different sites and the direction of the open reading frames (ORFs) of IS1203v of each strain was different. In addition to the above mentioned findings, the nucleotide sequences of three *stx2* genes were completely identical and the type of the three Stx2 was Stx2 prototype. Compare to the cytotoxicity of Stx2 prototype, the novel Stx2 was found to be obviously lower. **Conclusion** *E. coli* O157:H7 strains harboring *stx2*::IS1203v genes were isolated in China. Consequently, the results of HeLa cell assay showed that the insertion of IS1203v could lead to low cytotoxicity of Stx2.

【Key words】 *Escherichia coli* O157:H7; Shiga toxin; Insertion sequence 1203v

肠出血性大肠埃希菌 (EHEC) O157:H7 能引起出血性肠炎 (HC)、血小板减少性紫癜 (TTP)、溶血性尿毒综合症 (HUS)^[1]。志贺毒素 (Stx) 是 EHEC O157:H7 主要致病性毒力因子,具有 N-端糖苷酶的活性,能导致蛋白质合成的终止。本研究对 1992-2002 年我国部分地区分离到的 289 株产志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株,使用 *stx1* 和 *stx2* 基因全

长序列的通用引物进行 PCR 扩增反应,来检测 *stx* 基因型别。

材料与方 法

1. 材料:实验菌株由江苏省徐州市、安徽省、山东省、云南省昆明市、西藏自治区、天津市和重庆市疾病预防控制中心提供 (表 1)。只携带 *stx2* 基因 (测序) EHEC O157:H7 菌株“人 248”、EHEC O157:H7 国际标准株 EDL933 和 *E. coli* K-12^[2]。细胞为 HeLa。主要试剂及 TaqDNA 聚合酶购自北京华美生物工程有限公司。细胞培养基购自

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(罗霞、叶长芸、景怀琦、徐建国);大连医科大学基础医学院(李芳);江苏省疾病预防控制中心(汪华);安徽省疾病预防控制中心(任军)

GIBCO 公司。细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放量检测试剂盒购自 Promega 公司 CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit。DNA 回收试剂盒购自 QIAGEN 公司 QIAquick® Gel Extraction Kit。PCR 仪为 MG 公司的 PTC-200。读胶仪为 Bio-Rad 公司的 Gel Doc XR。酶标仪为 Bio-Rad 公司。

表1 289 株 EHEC O157:H7 菌株的来源和携带志贺毒素型别

| 菌株来源 | 菌株数 | PCR 结果 | | | |
|-----------------|-----|--------------------------|---|--------------------------|--|
| | | <i>stx2</i> ^a | <i>stx1</i> , <i>stx2</i> ^b | <i>stx1</i> ^c | <i>stx2</i> :: IS1203v ^d |
| 江苏 | | | | | |
| 羊粪 | 66 | 63 | 1 | 0 | 2 |
| 牛粪 | 36 | 35 | 1 | 0 | 0 |
| 猪粪 | 37 | 33 | 4 | 0 | 0 |
| 鸡粪 | 26 | 23 | 3 | 0 | 0 |
| 腹泻患者 | 18 | 14 | 4 | 0 | 0 |
| 其他 ^e | 17 | 9 | 7 | 1 | 0 |
| 安徽 | | | | | |
| 羊粪 | 13 | 12 | 1 | 0 | 0 |
| 鸡粪 | 11 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 牛粪 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 猪粪 | 6 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| 其他 ^f | 13 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 昆明 | | | | | |
| 水、蔬菜、熟食 | 18 | 1 | 17 | 0 | 0 |
| 山东 | | | | | |
| 腹泻患者 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| 牛粪 | 5 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 天津 | | | | | |
| 羊粪 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 其他 ^f | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 重庆 | | | | | |
| 其他 ^f | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 西藏 | | | | | |
| 其他 ^f | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 | 289 | 239 | 44 | 1 | 3 |

注: ^a 只携带 *stx2* 基因的菌株数; ^b 携带 *stx1* 和 *stx2* 基因的菌株数; ^c 只携带 *stx1* 基因的菌株数; ^d 携带 *stx2*::IS1203v 基因的菌株; ^e 来源于苍蝇、兔粪、食品等; ^f 非牛、羊、猪、鸡等动物来源的菌株

2. 实验方法:

(1) PCR 扩增^[3,4]: ①志贺毒素基因: *stx1* 全长基因引物 1: 5'-TCG CAT GAG ATC TGA CC-3', 引物 2: 5'-AACTGACTGAATTGAGATG-3'。扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。目的片段为 1.47 kb。 *stx2* 全长基因引物 1: 5'-CCC GGA TCC ATG AAG TGT ATA TTA TTT AAA TGG-3', 引物 2: 5'-CCC GAA TTC TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC-3'。扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火

1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。目的片段为 1.26 kb。 ② O157 抗原 (*rfb*_{O157}) 基因引物 1: 5'-CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG-3', 引物 2: 5'-TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC-3'; 扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 59℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。目的片段为 259 bp。 ③ H7 鞭毛 (*fliC*) 基因引物 1: 5'-ACG ATG CAG GCA ACT TGA CG-3', 引物 2: 5'-GGG TTG GTC GTT GCA GAA CC-3'; 扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 64℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min; 目的片段为 534 bp。

(2) PCR 扩增产物 DNA 测序: 扩大 PCR 体系进行反应, PCR 产物经胶回收试剂盒进行 DNA 纯化, 回收纯化后产物送 TaKaRa 公司测序。

(3) 细胞毒性实验: 参照文献[5]介绍的志贺毒素提取和通过细胞 LDH 释放量来检测其对 HeLa 细胞毒性的方法^[2]。

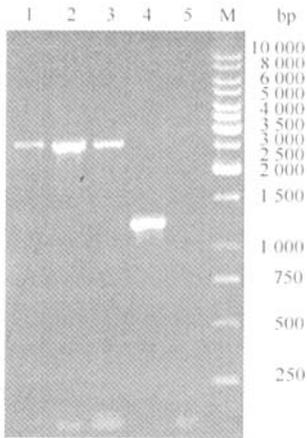
3. 统计学分析: 统计分析 *Stx2* 使细胞 LDH 释放量的值, 结果用平均值 ± 标准差表示。采用两样本 *t* 检验及单因素方差分析。

结 果

1. PCR 扩增结果: 经 O157 抗原 (*rfb*_{O157}) 和 H7 鞭毛 (*fliC*) 基因检测结果表明, 证实我国 1992 - 2002 年部分地区分离到的 289 株大肠埃希菌均为 EHEC O157:H7 菌株, 且携带不同型别 *stx* 基因 (表 1); 其中有 3 株 EHEC O157:H7 菌株 (2 株分离自江苏羊粪标本, 编号分别为 02F044、99B113; 1 株分离自安徽猪粪标本, 编号为 9) *stx2* 基因全长序列的 PCR 扩增结果在目的片段 1.26 kb 处均为阴性, 但在约 2.6 kb 处均有一阳性扩增条带 (图 1), 且它们均不携带 *stx1* 基因。为了进一步明确这 3 株菌是否存在 *Stx2* 变种, 进行了 DNA 测序。

2. DNA 测序结果: 这段长为 2554 bp 的 PCR 扩增产物是一种新型的 *stx2* 基因, 除具有 1242 bp 的 *stx2* 基因全长序列外, 还包括一长度为 1310 bp 的插入序列 (IS) 和因插入产生长度为 3 bp 的同向重复序列 (DR), 形成 *stx2*::IS1203v。这段 IS 与 1999 年日本学者发表的插入序列 1203 变种 (IS1203v) 具有 100% 的核苷酸序列同源性^[6], 暂分别命名为 IS1203v-02F044、IS1203v-99B113 和 IS1203v-9 (图 2)。然而, IS1203v 插入到 3 株 EHEC O157:H7 菌

株 *stx2* 基因的位置及开放性读码框(ORF)方向有所不同,与已发表的 *stx2*: :IS1203v 插入形式也不同(图3)。但3株菌原有的 *stx2* 基因序列完全一致,属 *stx2* 原型基因。



注: M: Marker DNA 相对分子质量标准(bp); 1~3: EHEC O157:H7菌株 02F044、99B113、9; 4: 阳性对照菌株 EDL933; 5: 阴性对照菌株 *E. coli* K-12

图1 新型 *stx2* 基因 PCR 产物电泳图

IS1203v 属于插入序列 IS3 家族,具有 IS3 家族的共有特征:序列两端拥有25 bp的末端反向重复序列(IRs),但存在3 bp的不完全一致;插入到 *stx2* 基因序列靶位点处形成3 bp的DR; IS1203v 基因编码的2个 ORF 在0和-1位置上存在重叠(图2)。

3. *Stx2* 的 HeLa 细胞毒性试验结果: EHEC

O157:H7菌株 02F044、99B113 和 9 的 *Stx2* 对 HeLa 细胞 LDH 相对释放量百分比(分别为25.16%、26.08%、26.07%)比阳性对照菌株(51.62%)降低了(表2)。①两样本 *t* 检验统计学分析细胞释放 LDH 值结果: EHEC O157:H7菌株 02F044、99B113 和 9 的 *Stx2* 对细胞释放 LDH 值均比阳性对照菌株低,并差异有统计学意义(*t* 值分别为10.10、7.40、7.97, $P < 0.05$),说明这3株菌 *Stx2* 对 HeLa 细胞的毒性均低于阳性对照菌株。②单因素方差分析: 这3株菌 *Stx2* 对 HeLa 细胞释放 LDH 值之间没有差异($P > 0.05$),说明3株菌 *Stx2* 对 HeLa 细胞的毒性未见差异(表2)。

表2 部分携带 *Stx2* 毒素的 EHEC O157:H7菌株对 HeLa 细胞 LDH 释放量的结果

| 菌株号 | 携带毒素 | HeLa | | | |
|---------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| | | LDH (490 nm) ^a | LDH% ^b | <i>t</i> 值 ^c | <i>P</i> 值 |
| 高对照(lysis solution) | 无 | 2.342 ± 0.159 | | | |
| 阳性对照(人 248) | <i>Stx2</i> | 1.360 ± 0.185 | 51.62 | | |
| 阴性对照(MG1655) | 无 | 0.313 ± 0.019 | 0.00 | | |
| 低对照(空白对照) | 无 | 0.313 ± 0.013 | | | |
| 02F044 | <i>stx2</i> : :IS1203v | 0.823 ± 0.149 | 25.16 | 10.10 | <0.05 |
| 99B113 | <i>stx2</i> : :IS1203v | 0.842 ± 0.241 | 26.08 | 7.40 | <0.05 |
| 9 | <i>stx2</i> : :IS1203v | 0.842 ± 0.221 | 26.07 | 7.97 | <0.05 |

注: ^a 490 nm 可见光波长下 HeLa 细胞释放 LDH 的读数值为“ $\bar{x} \pm s$ ”,每组值的变量均为20个; ^b 细胞 LDH 相对释放量百分比 = [(实验组值 - 低对照值)/(高对照值 - 低对照值)] × 100%; ^c 两样本 *t* 检验分析3株菌分别与阳性对照菌株细胞释放 LDH 值的 *t* 值

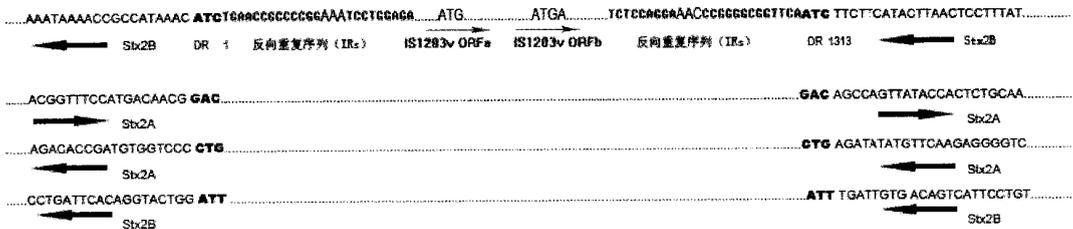


图2 O157:H7菌株 99B113、9、02F044 与日本分离株携带的 *stx2*: :IS1203v 核苷酸序列同源性比较

发表的 *stx2*: :IS1203v

IS1203v-9

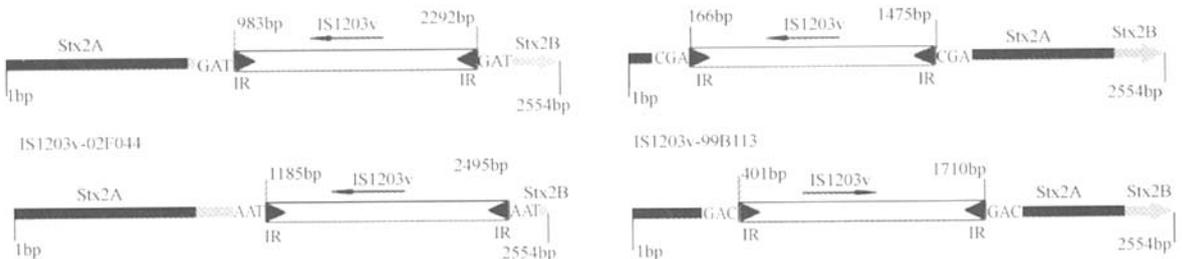


图3 O157:H7菌株 02F044、9、99B113 与日本分离株携带的 *stx2*: :IS1203v 序列模式图

讨 论

1992-2002 年我国部分地区分离到的 289 株 EHEC O157:H7 菌株携带不同型别的 *stx* 基因, *stx* 基因的存在及有功能活性的 Stx 是影响疾病发生、发展及转归的重要因素。众多研究表明, 仅携带 Stx2 的 EHEC O157:H7 菌株比仅携带 Stx1 或携带 Stx1 和 Stx2 的 EHEC O157:H7 菌株与严重疾病的发生有更密切联系^[1]。本研究发现的新型 *stx2* 基因有 IS1203v 的插入, 且具有三种不同的插入形式, 与日本学者报道的 6 株携带 *stx2::IS1203v* 的 EHEC O157:H7 菌株只有一种插入形式也不同。这是在我国第一次发现具有携带 *stx2::IS1203v* 的 EHEC O157:H7 菌株。

IS 是一大类存在细菌中、具有自我转位能力的 DNA 片段, 包括众多家族, 一般较短 (700~2000 bp), 只编码与转位功能有关的基因 (如转位酶) 而无其他任何无关基因。通过产物自身的转位能力可引起各种形式的细菌基因重排, 如缺失、倒位、重复或复制子融合等^[7]。IS3 家族是其中一类, 而 IS1203v 属于 IS3 家族的一员, 也具有相似的性质。IS1203v 包括 2 个 ORF, ORFa 及 ORFb, 分别编码 108 及 296 个氨基酸, 且这 2 个 ORF 部分重叠, 可在翻译水平上产生一具有转座酶活性的融合蛋白。到目前为止, 已经有多项报道发现多拷贝的 IS1203v 存在于大肠埃希菌 O157:H7 的染色体及致病性大质粒 (pO157) 中, 但 IS1203v 插入到具有明确功能的毒力基因-*stx2* 基因中还是由日本第一次报道^[6]。IS1203v 依靠自身编码的转座酶活性, 可能影响 *stx2* 基因的翻译和 Stx2 产物的表达, 进而使 Stx2 的产量或活性发生改变。

动物可能携带 *stx2::IS1203v* 的 EHEC O157:H7 菌株成为长期储存宿主, 而且也为 IS1203v 转位导致基因的突变提供了可能。我们发现此类分离株来自羊粪便和猪粪便标本, 且我国 EHEC O157:H7 菌株的感染多发生在卫生条件较差的农村地区, 而农村养猪、鸡等比较普遍且散养居多, 所以在环境中可能因 IS1203v 的转位使 *stx2* 基因发生插入突变, 导致携带此类基因的动物储存宿主。

同样, IS1203v 依靠自身编码的转位酶活性, 可能影响 *stx2* 基因的转录、翻译或 Stx2 产物的表达, 进而使 Stx2 的产量或活性发生改变, 细胞毒性实验就说明了这一点。3 株携带 *stx2::IS1203v* 的 EHEC O157:H7 菌株制备的 Stx2 对 HeLa 细胞 LDH 相对释放量百分比均比野生型 Stx2 的对照株降低了, 而且细胞释放 LDH 的值也具有显著性降低。这些结果说明 IS1203v 的插入可能通过影响 *stx2* 基因的表达, 引起 Stx2 产物的部分失活, 从而导致其细胞毒性的减低。这一结论也与日本学者的报道相一致^[6]。除此之外, 我们发现的 IS1203v 在 *stx2* 基因中具有三种不同插入形式, 但各个菌株对细胞的毒性未见差异, 说明不同插入形式对 Stx2 的细胞毒性可能并不起关键性的影响。至于携带 *stx2::IS1203v* 的大肠埃希菌 O157:H7 菌株在我国的流行病学意义, 还有待进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11 (3):450-479.
- [2] Roberts PH, Davis KC, Garstka WR, et al. Lactate dehydrogenase release assay from Vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non-verotoxin producing strains. *J Microbiol Methods*, 2001, 43:171-181.
- [3] Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(2):598-602.
- [4] Zhang W, Bielaszewska M, Kuczus T, et al. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4):1441-1446.
- [5] Karmali MA, Petric M, Lim C, et al. Sensitive method for detecting low numbers of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J Clin Microbiol*, 1985, 22(4):614-619.
- [6] Kusumoto M, Nishiya Y, Kawamura Y, et al. Identification of an insertion sequence, IS1203 variant, in a Shiga toxin 2 gene of *Escherichia coli* O157:H7. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(1):93-96.
- [7] Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3):725-774.

(收稿日期:2007-05-31)

(本文编辑:尹廉)