

福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株基因组中 SflI 和 Sfx 前噬菌体整合位点及排列方式研究

王艺婷 孙强正 刘凯 赵爱兰 王艳 金东 李振军 景怀琦 叶长芸 徐建国

【摘要】 目的 研究福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株中 SflI 和 Sfx 前噬菌体整合位点及排列方式。方法 根据 2b 血清型菌株基因组中 SflI 和 Sfx 前噬菌体可能的整合位点及排列方式,设计引物,对 50 株 2b 血清型菌株进行 PCR 扩增,并对扩增产物测序,根据扩增和测序结果判断噬菌体的整合位点和排列方式。结果 在 2b 血清型菌株中,SflI 和 Sfx 前噬菌体前后相连,整合于宿主菌染色体 *proA* 和 *yaiC* 基因间的 *thrW tRNA* 基因上;以 SflI 在前,Sfx 在后,或 Sfx 在前,SflI 在后两种方式排列;而以后一种方式为主,在共 50 株检测菌株中,有 49 株为此方式。结论 福氏痢疾杆菌血清型相关噬菌体的整合位点及排列方式,对研究福氏痢疾杆菌血清型转换及血清型相关噬菌体的整合机制具有重要意义。

【关键词】 福氏痢疾杆菌;血清型;前噬菌体;整合位点;排列方式

Study on the integration site and arrangement of SflI and Sfx prophages in *Shigella flexneri* serotype 2b strains WANG Yi-ting, SUN Qiang-zheng, LIU Kai, ZHAO Ai-lan, WANG Yan, JIN Dong, LI Zhen-jun, JING Huai-qi, YE Chang-yun, 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

Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujg@public.bta.net.cn

This work was supported by grants from the Beijing Science and Technology Commission to Guide Teachers of Outstanding PhD Article (No.YB20098450101) and State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control of China(No. 2008DFA31830).

【Abstract】 Objective To study the integration site and arrangement of SflI and Sfx prophages in *Shigella flexneri* serotype 2b strains. **Methods** A series of primers were designed based on potential integration site of SflI and Sfx prophages in *Shigella flexneri* serotype 2b strains, and PCR were performed for 50 serotype 2b strains to amplify special genes located in host and prophages. PCR products were sequenced to identify integration sites and arrangement of SflI and Sfx. **Results** In all the serotype 2b strains, prophage SflI and Sfx were adjacent to each other, and integrated into the *thrW tRNA* gene of the host, which were located between genes *proA* and *yaiC* of host. Prophage Sfx was located immediately upstream of prophage SflI in all the detected 50 serotype 2b strains exception for strain 51251. **Conclusion** This was the first report on the integration site and arrangement of serotype-converting prophages SflI and Sfx in *Shigella flexneri* 2b strains.

【Key words】 *Shigella flexneri*; Serotype; Prophage; Integration site; Arrangement

福氏痢疾杆菌是发展中国家细菌性痢疾的主要

病原菌之一^[1]。2b 血清型是引起福氏痢疾杆菌感染常见的血清型之一^[1,2]。2b 血清型菌株染色体基因组中有 SflI 和 Sfx 前噬菌体,这两个前噬菌体在基因组中的整合位点及排列方式尚无相关研究。研究 2b 血清型菌株中前噬菌体在基因组中的位置及排列方式,对防控福氏痢疾杆菌感染具有重要意义。本文采用 PCR 扩增和测序的方法,研究 50 株 2b 血清型菌株中 SflI 和 Sfx 前噬菌体的整合位点及在基因组中的排列方式。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.018

基金项目:北京市优秀博士学位论文指导教师科技项目(YB20098450101);传染病预防控制国家重点实验室自主研究重点项目(2008DFA31830)

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

王艺婷、孙强正和刘凯同为第一作者

通信作者:徐建国, Email: xujg@public.bta.net.cn

材料与方法

1. 菌株、培养条件和鉴定: 5 株福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株购自中国生物制品药品检定所(51251)或本室保存(Shi03XZ004, 2005010, Shi06HN011, Shi06QH15); 45 株福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株(北京市 6 株; 河南省 30 株; 山西省 4 株; 青海省 5 株)为临床分离株。痢疾杆菌在 LB 琼脂平板上培养, 挑取单菌落进行群抗原和型抗原的血清学鉴定。

2. 主要试剂及材料: Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; DNA 回收纯化试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品; 染色体 DNA 提取试剂盒为美国 Promega 公司产品; 福氏痢疾杆菌群抗原和型抗原单价抗血清购自日本生研公司(DENKA SEIKEN CO., LTD); DNA Marker(100~6000)为大连宝生物公司产品; 其他试剂均为分析纯。

3. DNA 的提取: 细菌染色体的提取按照试剂盒说明书操作。

4. PCR 引物设计: 根据 GenBank 上公布的痢疾杆菌以下基因: *proA*(NC_004337), *intII*(NC_004337), *intX*(AF056939), *gtrII*(AF021347), *gtrBAX*(AF056939), *yaiC*(NC_004337) 的序列, 结合前噬菌体 SflI 和 Sfx 在基因组中可能的排列方式, 采用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1), 引物由上海生物工程公司合成。

表 1 痢疾杆菌不同基因的引物及序列

引物	基因	引物序列(5'~3')
P1	<i>proA</i>	ACAAAGCGAAATCATCCTCAA
P2	<i>intII</i>	TACCAAACCAGACGGAACGAAA
P3	<i>gtrII</i>	TAGTTGCCACCATCCACCAAA
P4	<i>intX</i>	TACGGTGGCTGCGTGAGAA
P5	<i>gtrX</i>	GCAACCCATCCAACAGTAGCAC
P6	<i>yaiC</i>	GCAGGAAACCACCATCAACACC

5. PCR 扩增: 以 5 株福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株 51251、Shi03XZ004、2005010、Shi06HN011、Shi06QH15 的基因组 DNA 为模板, 采用上述引物进行 PCR 扩增, 引物组合见图 1。PCR 反应体系: 上下游引物各 1 μmol/L、dNTP 10 mmol/L、10×buffer

2.0 μl、Taq DNA 聚合酶和 Pfu DNA 聚合酶的混合物(1:1)0.2 μl(1 U)、DNA 模板 1 μl(1 mmol/L), 补充蒸馏水至 20 μl。PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 延伸 1~3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

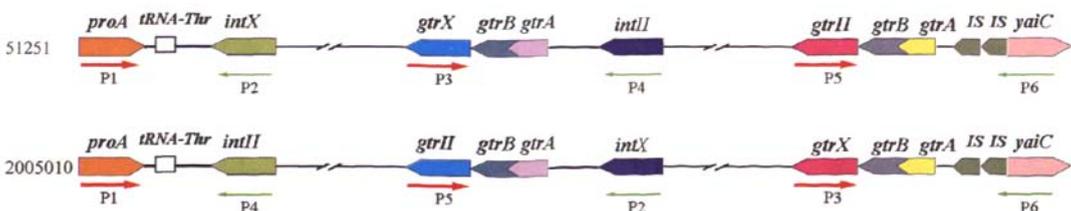
6. PCR 产物纯化、测序及序列比对: 上述 5 株菌的 PCR 产物经胶回收纯化后, 送上海生物工程公司测序。所测序列与目的基因序列进行比对, 以确定噬菌体的整合位点序列及排列方式。

7. 福氏痢疾杆菌 2b 血清型临床分离株整合位点及排列方式检测: 提取上述 45 株福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株的基因组 DNA, 以此 DNA 作为模板, 分别采用引物对 P1-P2、P3-P4、P5-P6、P1-P4、P5-P2、P3-P6 进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 根据条带长度判断菌株中前噬菌体 SflI 和 Sfx 的排列方式。

结 果

1. 5 株 2b 血清型菌株 PCR 扩增结果: 在 5 株 2b 血清型菌株中, 51251 菌株引物组合对 P1-P2、P3-P4、P5-P6 扩增阳性, P1-P4、P5-P2、P3-P6 引物对扩增阴性, 扩增阳性条带长度与预期片段长度相符; 其他 4 株 2b 菌株(Shi03XZ004, 2005010, Shi06HN011, Shi06QH15)引物组合对 P1-P4、P5-P2、P3-P6 扩增阳性, 而 P1-P2、P3-P4、P5-P6 引物对扩增阴性, 扩增阳性条带片段长度与预期片段长度相符, 因 4 株 2b 菌株噬菌体排列方式及整合位点一致, 以 2005010 作为代表菌株(图 2)。

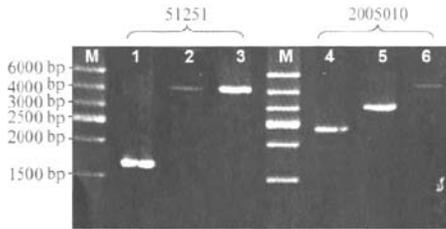
2. PCR 扩增产物验证及整合位点序列分析: 为验证 PCR 扩增产物, 分别对这 5 株菌的 PCR 扩增产物测序, 将所测序列与目的基因序列进行比对, 以确定噬菌体的整合位点序列及排列方式。经序列比对发现, 扩增产物为目的基因片段; 在 51251 中, 前噬菌体 SflI 和 Sfx 相连, 位于宿主基因 *proA* 和 *yaiC* 间, 而且 SflI 位于 Sfx 之前; 而在其他 4 株菌中, 2 个前噬菌体同样位于 *proA* 和 *yaiC* 间, 但是 Sfx 位于 SflI 之



注: 红箭头表示宿主和前噬菌体中特异基因及方向; 绿箭头表示 PCR 引物位置及方向

图 1 福氏痢疾杆菌 2b 血清型菌株 51251 和 2005010 前噬菌体整合位点、排列方式结构示意图

前,整合位点及排列方式如图3所示。51251中SfII的上游位点与sf301和2457T SfII前噬菌体上游位点序列完全一致;而在其他4株菌株中,SfX的上游位点与2002017中SfX的上游位点只有1个碱基不同(C→T,23)。在4株菌所有的SfII、SfX整合位点中(*attR*、*attL*),都含有相同的核心区序列“ATT CGT AAT GCG AAG GTC GTA GGT TCG ACT CCT ATT ATC GGC ACC A”,而且都保留一个完整的*thrW tRNA*基因序列。与sf301和2457T及2002017基因组中一样,在噬菌体基因组与*yaiC*基因之间,存在插入序列(IS600和IS629)。



注: M: DNA Marker(100~6000 bp); 1~6: 分别代表引物对P1-P2、P3-P4、P5-P6、P1-P4、P5-P2、P3-P6扩增产物

图2 福氏痢疾杆菌2b血清型菌株51251和2005010 PCR扩增结果

3. 45株2b血清型菌株前噬菌体排列方式检测: 为检测临床分离2b菌株中前噬菌体SfII和SfX的排列方式,选取本室保存的45株福氏痢疾杆菌2b血清型临床分离菌株,采用引物对P1-P2、P3-P4、P5-P6、P1-P4、P5-P2、P3-P6进行PCR扩增。结果发现,在所有45株2b血清型福氏痢疾杆菌菌株中,P1-P4、P5-P2、P3-P6扩增阳性,而P1-P2、P3-P4、P5-P6引物对扩增阴性,扩增产物长度与2005010菌株一致。

讨论

对福氏痢疾杆菌血清型相关噬菌体在宿主菌整合位点的研究,目前报道较少。Allison等^[3]根据整合酶及*attP*位点序列的相似性,推测福氏痢疾杆菌血清型相关噬菌体在宿主菌基因组上应具有相同的整合位点;早期的研究文献也报道,此类噬菌体整合在宿主菌的*pro-lac*区域^[4,5];对已经完成全基因组序列测定的福氏痢疾杆菌sf301(2a)^[6]、2457T(2a)^[7]、2002017(Xv)^[8]及部分测序的Y53(1a)^[9]、NCTC 8296(4a)^[10]等菌株基因组中血清型相关噬菌体整合位点分析发现,前噬菌体SfI、SfII、SfX、SfIV整合位点位于宿主菌*proA*基因下游的*thrW tRNA*基因。本文研究了2b血清型福氏痢疾杆菌基因组中SfII和



注:宿主及前噬菌体基因组中特异基因部分序列以小写字母表示,箭头代表基因方向;大写字母代表前噬菌体与宿主基因。前噬菌体与前噬菌体间序列,其中黑色字母为*attR*或*attL*序列;下划线及黑色字母代表整合位点的核心序列

图3 福氏痢疾杆菌2b血清型菌株51251和2005010中前噬菌体SfII和SfX整合位点碱基序列

SfX前噬菌体的整合位点,在所有检测的2b血清型菌株中,不管噬菌体是何种组合方式,SfII、SfX前噬菌体均整合于宿主菌基因组中*proA*和*yaiC*基因间的*thrW tRNA*基因上。本研究也发现,SfI和SfX噬菌体分别感染福氏痢疾杆菌Y血清型后,噬菌体基因组都整合在宿主菌的*proA*和*yaiC*基因间的*thrW tRNA*基因上(未发表资料),这表明*proA*和*yaiC*基因间的*thrW tRNA*基因位点为此类噬菌体的整合位点。本研究发现,在2b菌株基因组的*yaiC*基因前,存在IS629和IS600,而且对目前已完成测序的福氏痢疾杆菌sf301(2a)^[6]、2457T(2a)^[7]、2002017(Xv)^[8]*yaiC*基因前序列分析也发现各种IS,这表明福氏痢疾杆菌的*proA-yaiC*区也是IS的插入热点。在目前已知的6种福氏痢疾杆菌血清型相关噬菌体中,惟

一例外的是Sf6噬菌体,其血清转换基因结构及整合位点与前述的噬菌体不同。在大肠埃希菌(GenBank号:AE000323)*argW tRNA*基因位点存在1个隐性噬菌体,由于其整合酶基因与sf6的整合酶一致,因此Allison等^[3]推测Sf6整合到宿主菌的*argW tRNA*基因位点,但*argW tRNA*在福氏痢疾杆菌基因组上有多拷贝,具体位点目前还是未知的。

本研究发现,福氏痢疾杆菌2b血清型菌株中,前噬菌体SfII和SfX整合酶和O抗修饰基因簇的糖基转移酶基因总是以相反的方向位于前噬菌体两端,而且整合酶基因临近attR位点,这与SfII、SfX等血清型相关噬菌体具有的保守基因结构有关:噬菌体的attP位点位于整合酶和O抗修饰基因之间,当噬菌体基因组插入宿主菌attB位点时,整合酶基因和糖基转移酶基因分别位于前噬菌体基因组两端与宿主菌基因相邻。

本研究发现,在自然界分离的2b血清型菌株中,前噬菌体SfII和SfX基因组总是前后相连,连接方式有两种:SfII在前,SfX在后;或SfX在前,SfII在后,但是以SfX在前SfII在后方式为主,在50株所检测的2b血清型菌株中,共有49株为此方式(51251菌株为SfII在前,SfX在后)。当一个噬菌体整合入宿主菌的基因组后,在其上游的attR位点,宿主菌attB位点与噬菌体的attP位点序列重组,保留一个完整的*thrW tRNA*,第二个噬菌体将在此位点整合。菌株中噬菌体的排列方式反映了噬菌体的整合前后顺序即时序性,第二个噬菌体总是在第一个整合噬菌体的上游位点整合,邻近*proA*基因。以前的研究也发现,当SfX噬菌体感染2a菌株形成2b血清型时,SfX基因组整合到SfII前,形成SfX在前,SfII在后的排列方式(待发表);当SfI感染X血清型菌株形成一新的血清型I:X时,SfI整合到SfX前,形成SfI在前,SfX在后的排列方式(未发表)。2b菌株中SfX在前,SfII在后的排列方式提示2b血清型菌株主要是由2a血清型菌株通过感染SfX噬菌体转化而来。

本研究分析了福氏痢疾杆菌中多血清相关噬菌

体的整合位点及排列方式,该研究将对阐明福氏痢疾杆菌血清型转换及相关噬菌体的整合机制,福氏痢疾杆菌血清型变迁规律具有重要意义,根据噬菌体排列方式及整合时序性,结合当前流行血清型,就可以预测可能出现的优势血清型,从而对福氏痢疾杆菌的流行进行预警。

参 考 文 献

- [1] Wang XY, Tao F, Xiao D, et al. Trend and disease burden of bacillary dysentery in China (1991-2000). Bull WHO, 2006, 84 (7):561-568.
- [2] von Seidlein L, Kim DR, Ali M, et al. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLoS Med, 2006, 3(9):e353.
- [3] Allison GE, Verma NK. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. Trends Microbiol, 2000, 8(1):17-23.
- [4] Simmons DA, Romanowska E. Structure and biology of *Shigella flexneri* O antigens. J Med Microbiol, 1987, 23(4):289-302.
- [5] Petrovskaya VG, Licheva TA. A provisional chromosome map of *Shigella* and the regions related to pathogenicity. Acta Microbiol Acad Sci Hung, 1982, 29(1):41-53.
- [6] Jin Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. Nucleic Acids Res, 2002, 30 (20):4432-4441.
- [7] Wei J, Goldberg MB, Burland V, et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. Infect Immun, 2003, 71(5):2775-2786.
- [8] Ye C, Lan R, Xia S, et al. Emergence of a new multidrug resistance serotype X Variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. J Clin Microbiol, 2010, 48:419-26.
- [9] Adhikari P, Allison G, Whittle B, et al. Serotype 1a O-antigen modification: molecular characterization of the genes involved and their novel organization in the *Shigella flexneri* chromosome. J Bacteriol, 1999, 181(15):4711-4718.
- [10] Adams MM, Allison GE, Verma NK. Type IV O-antigen modification genes in the genome of *Shigella flexneri* NCTC 8296. Microbiol, 2001, 147(Pt 4):851-860.

(收稿日期:2010-01-17)

(本文编辑:万玉立)