

肠出血性大肠杆菌 O157: H7 $\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$ 基因缺失株的构建

张雪寒,何孔旺,赵攀登,栾晓婷,叶青,温立斌,倪艳秀,周俊明,
李彬,王小敏,郭容利,俞正玉,茅爱华,吕立新

(江苏省农业科学院 兽医研究所,农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

摘要: 肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) O157: H7 是食源感染的人兽共患病原菌。志贺毒素(Shiga toxin, Stx)、溶血素(haemolysin, Hly)和ToxB是O157: H7重要的毒力因子。选用自杀性质粒pMEG375,体外构建具有同源臂的重组自杀性质粒,借助于sm10宿主菌获得O157: H7杂交菌株,通过同源重组,依次获得O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$)基因缺失株, $\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$ 接种HEp-2细胞和感染链霉素处理的Balb/c小鼠,明确缺失株粘附定植的能力。经PCR鉴定,*hly*、*stx*和*toxB*基因分别被壮观霉素(Spc⁺)、庆大霉素(Gm⁺)和卡那霉素(Kan⁺)基因表达盒所代替,Western blot鉴定结果显示,O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$)检测不到相应的Stx、Hly和ToxB蛋白。O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$)生长特性与亲本株无明显差异。对于HEp-2细胞的粘附能力明显降低。Balb/c小鼠排菌时间和排菌量明显减少和降低。本研究成功获得O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$),并且明确Stx、Hly和ToxB的缺失导致了O157: H7对HEp-2细胞和Balb/c小鼠的粘附和定植能力降低。本研究旨在为研制EHEC O157: H7基因缺失疫苗奠定物质基础。

关键词: 肠出血性大肠杆菌 O157: H7; *hly*; *stx*; *toxB*; 缺失株; 小鼠; 粘附

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0076-07

Construction and Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Deficient in Stx, Hly and ToxB Expression

ZHANG Xue-han, HE Kong-wang, ZHAO Pan-deng, LUAN Xiao-ting, YE Qing,
WEN Li-bin, NI Yan-xiu, ZHOU Jun-ming, LI Bin, WANG Xiao-min, GUO Rong-li,
YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, LU Li-xin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of
Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture National Center for
Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 is a foodborne and zoonotic pathogen. Shiga toxin (Stx), haemolysin (Hly) and ToxB are the major virulent factors of O157: H7. Therefore, the objective of this study is to construct the *stx hly toxB*-knockout strain for develop O157: H7 attenuated vaccine. The O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) was constructed by choosing the sm10 complement cells and the suicide plasmid pMEG375 containing homologous arms of *stx hly* and *toxB* upward and downward genes to study their effect on O157: H7 intestinal colonization of streptomycin-treated mice and adherence to HEp-2 cells. The results from PCR and Western blotting methods showed that *stx hly* and *toxB* genes were successfully replaced with the Gentamicin, Spectinomycin and Kanamycin gene cassettes by allelic exchanges. Also, the O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) was found to be no differences compared with the parent O157: H7 in growth feature. For Balb/c mice, the fecal shedding of O157: H7($\Delta toxB$) was only 1.1×10^5 CFU on the third day after oral infection, whereas the parent O157: H7 was 4.03×10^7 CFU. Al-

收稿日期: 2011-07-20

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2010068); 江苏省农业科技自主创新资金(cx(09)106); 江苏省农业科学院后备人才基金(6510804)

作者简介: 张雪寒(1977-),女,河北高碑店人,副研究员,博士,主要从事人兽共患病机理和防控技术研究。

so the mice infected with O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) shed the bacteria for 9 days, whereas the parent O157: H7 for above 14 days. O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) successfully constructed in this study was found to be attenuated in HEp-2 cells of adherence for four times and in mouse models of colonization for shortened and lower fecal shedding in contrast with the parent O157: H7.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7; *hly* *stx* *toxB* gene; Knockout strain; Mouse; Adherence

肠出血性大肠杆菌(Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157: H7 是重要的食源性人兽共患病原。20 余年来, EHEC O157: H7 引发的食物中毒在世界各地包括中国都有不同规模的暴发流行^[1-3]。O157: H7 感染患者和无症状携带者可作为传染源。在动物宿主范围非常广泛, 其中反刍动物带菌率较高。相对来讲, 动物作为传染源要比人类更为重要, 它往往是动物源食品污染的根源^[4-6]。EHEC O157: H7 的感染因具有暴发流行趋势、强烈的致病性与致死性以及抗生素治疗会加剧病情等特点, 已经成为全球性的公共卫生问题。目前对其感染缺乏有效的防治方法, 对其致病机理尚需要深入研究。

研究表明, O157: H7 粘附和致病相关因子有(Locus of enterocyte effacement, LEE) 毒力岛编码的Ⅲ型分泌系统蛋白, 前噬菌体编码的志贺毒素 I 和 II(Stx I 和 II), 大质粒 pO157 编码的诸如溶血素(Hly) 和 ToxB 等一些毒力因子^[4-13]。在细菌体内, Stx II 为分泌型表达, Stx I 为胞内表达。两种毒素均由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成, A 亚单位具有细胞内毒性, 能与 28S rRNA 作用导致蛋白质合成停止, 是 EHEC O157: H7 引起临床表现的病理基础; B 亚单位具有细胞结合特性, 能与具有特定受体(Gb3) 的细胞结合, 从而引导 A 亚单位发挥作用。Stx 能引起被感染的人腹泻, 并可能出现出血性结肠炎(Hc) 或溶血性尿路综合征(Hus) 等全身性并发症。几乎所有 O157 菌株都编码 EHEC 溶血素蛋白, 而 O157 可以以血红蛋白和血红素为原料, 快速生长繁殖产生更多的毒素引起病变。Hly 产生需要 4 种相连的基因 HlyC、A、B、D 的产物, 其中 HlyA 是结构基因。Hly 与大肠杆菌 α -溶血素(α -Hly) 同属 RTX(Repeat toxin) 毒素家族, 碱基序列有 60% 的相似性。由 O157: H7 的大质粒 pO157 编码, 因与艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*) 毒素 B 有同源性, 命名为 ToxB, 整个阅读框 9 501 bp。ToxB 通过某些机制间接的影响 LEE 毒力岛编码蛋白的合成和分泌, 从而降低 O157: H7 的粘附作用^[12]。

针对 *stx* *hly* 和 *toxB* 3 个全基因上下游序列分别设计 2 对引物, 扩增上下游同源臂, 同时选取庆大

霉素、壮观霉素和卡那霉素基因表达盒作为筛选标记, 先后构建 3 个基因缺失株, 即 O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 基因缺失株。选取 HEp-2 细胞和链霉素处理的 Balb/c 小鼠分别从体外和体内两个方面评价缺失株对粘附和定植的影响, 为研制用于防控 EHEC O157: H7 的基因缺失疫苗奠定基础 and 提供物质保障。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 EHEC O157: H7($stx1-stx2+$) 菌株, pET32a 质粒和 pET28a 质粒, 本室保存。质粒 pMEG375 和宿主菌 sm10, 扬州大学焦新安教授惠赠。Stx2、Hly 和 ToxB 多克隆抗体均为本室制备。
1.1.2 试剂 ExTaqTM (5 U/ μ L, TaKaRa 公司), Agarose(Promega 公司); 胰蛋白胍(Tryptone), 酵母抽提物(Yeast extract) (OXOID 公司); pMD18-T、BamH I、EcoR I、Sal I、Sph I 和 Not I (TakaRa 公司); DNA 纯化试剂盒(Axygen 公司); 蔗糖和 D-环丝氨酸(Sigma 公司)。所用抗生素工作浓度为: 氨苄青霉素(Ap) 100 μ g/mL, 链霉素(Sm) 100 μ g/mL, 氯霉素(Cm) 30 μ g/mL, 庆大霉素(Gm) 50 μ g/mL, 壮观霉素(Spc+) 100 μ g/mL, 卡那霉素(Km) 50 μ g/mL; 10% 的蔗糖培养基: 100 g 蔗糖、10 g 蛋白胍、5 g 酵母粉, 加水至 1 000 mL。

1.1.3 试验动物 Balb/c 小鼠购自扬州大学。

1.2 引物设计和基因克隆

1.2.1 O157: H7(Δhly) 根据 GenBank 中 EHEC O157: H7 菌株 *hlyA* 基因序列(NC_007414), 利用 DNASTAR 软件和 Primer Premier 5.0 分析, 设计两对特异性引物, 分别扩增 *hlyA* 基因 5'端上游和 3'端下游 655-834 bp 序列。其中 *hlyA*-NR 包括 *hlyA* 基因 5'端上游 1~5 个碱基, *hlyA*-CF 包括 *hlyA* 基因 3'端下游最后 2 个碱基。

hly-NF: 5'-tcgggactctctaatgcttttgacgtc-3'

hly-NR: 5'-gccgaattcgtcatattagttttcttc-3'

hly-CF: 5'-gctgaattcagactaaaagaggaggt-3'

hly-CR: 5'-aatgcattgtagcaccagttcagcgt-3'

hly-NF、*hly*-NR、*hly*-CF 和 *hly*-CR 引物两端分别

加限制性酶切位点 *Bam*H I、*Eco*R I、*Sal* I 和及保护性碱基,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,以双蒸水为阴性对照。

根据 GeneBank 登陆的 pSET4s 序列 (AB055650),设计一对特异性引物 *spc*-F 和 *spc*-R,扩增整个 *spc* 表达盒,137 bp。

spc-F: 5'-cgtgaattcgcgttcgtaatacatgttat-3'

spc-R: 5'-atggaattcgcgcttaccattagaatga-3'

spc-F 和 *spc*-R 引物两端加限制性酶切位点 *Eco*R I 及保护性碱基,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 1.2 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min,以双蒸水为阴性对照。

1.2.2 O157: H7 (△*stx*) 根据 GenBank 中 EHEC O157: H7 菌株 *stx2A* 基因序列 (NC_007414),利用 DNASTar 软件和 Primer Premier 5.0 分析,设计两对特异性引物,分别扩增 *stx2A* 基因 5'端上游和 3'端下游 397 bp 和 229 bp 序列。其中 *stx2A*-NR 为 *stx2A* 基因 5'端上游 1~3 个碱基,*stx2A*-CF 为 *stx2A* 基因 3'端最后 3 个碱基。

stx2A-NF: 5'-aatggatcctacaatccagcaagggcc-3'

stx2A-NR: 5'-gccgaattcgcgaaagtctatcgtaaac-3'

stx2A-CF: 5'-ttagaattcgcggcggttgctaaag-3'

stx2A-CR: 5'-cccgcattgcattattaaactgcacttca-3'

stx2A-NF、*stx2A*-NR、*stx2A*-CF 和 *stx2A*-CR 引物两端分别加限制性酶切位点 *Bam*H I、*Eco*R I、*Sal* I 和及保护性碱基,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,以双蒸水为阴性对照。

根据 GeneBank 登陆的 FastbacTM 序列 (序列号为 AY598466.1),设计一对特异性引物 Gm-F 和 Gm-R,扩增整个 Gm 表达盒,811 bp。

Gm-F: 5'-gaattcacggtggaacgcataag-3'

Gm-R: 5'-gaattcacggttgaaacgaattgtt-3'

Gm-F 和 Gm-R 引物两端加限制性酶切位点 *Eco*R I,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 50 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,以双蒸水为阴性对照。

1.2.3 O157: H7 (△*tox*B) 根据 GenBank 中 EHEC O157: H7 菌株 *tox*B 基因序列 (NC_007414),利用 DNASTar 软件和 Primer Premier 5.0 分析,设计

两对特异性引物,分别扩增 *tox*B 基因 5'端上游和 3'端下游 831 bp 和 863 bp 序列。其中 *tox*B-NR 为 *tox*B 基因 5'端上游 36~54 个碱基,*tox*B-CF 为 *tox*B 基因 3'端下游 32~50 个碱基。

*tox*B-NF: 5'-ttaggatccatccatcaggcgttggtgc-3'

*tox*B-NR: 5'-ggggaattcttgattagcacaacct-3'

*tox*B-CF: 5'-gccgctgactaatcttaccagcatca-3'

*tox*B-CR: 5'-attcggcgccgcgagttatcagcccgctcat-3'

*tox*B-NF、*tox*B-NR、*tox*B-CF 和 *tox*B-CR 引物两端分别加限制性酶切位点 *Bam*H I、*Eco*R I、*Sal* I 和 *Not* I 和及保护性碱基,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,58℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,以双蒸水为阴性对照。

根据 GeneBank 登陆的 pET28 序列 (序列号为 EF442785.1),设计一对特异性引物 Kan-F 和 Kan-R,扩增整个 kan 表达盒,192 bp。

Kan-F: 5'-ccggaattcacggctacactagaaggac-3'

Kan-R: 5'-agagtcgacaaatgtgcgcggaaccctca-3'

Kan-F 和 Kan-R 引物两端加限制性酶切位点 *Eco*R I 和 *Sal* I 及保护性碱基,下划线部分均为酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 1.2 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min,以双蒸水为阴性对照。

1.3 基因克隆

1.3.1 *hly* 基因和 *stx* 基因的克隆 *hly*-NF 和 *hly*-NR、*hly*-CF 和 *hly*-CR、*spc*-F 和 *spc*-R 3 对引物扩增获得相应大小的目的片段 HN、HC 和 Spc PCR 产物,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离,紫外灯下切割目的条带,用 DNA 纯化试剂盒回收上述 3 个 PCR 片段,备用。首先将 HN 和 HC 酶切串联,再与 pMD18-T 连接,获得阳性克隆后,与 Spc PCR 产物再次连接,成功构建 pMD18-T-HN-Spc-HC 重组质粒,转化 Top10 感受态细胞,37℃ 培养 16 h,挑取平板单菌落进行鉴定。将鉴定阳性的重组质粒和 pMEG375 载体分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切后,4℃ 连接过夜,转化感受态细胞 sm10,37℃ 培养 20~24 h,挑取平板单菌落进行鉴定,成功获得 pMEG375-HN-Spc-HC 重组质粒。*stx* 基因按照 *hly* 基因的方法进行克隆,成功构建和获得 pMEG375-SN-Gm-SC 重组质粒。

1.3.2 *tox*B 基因 *tox*B-NF 和 *tox*B-NR、*tox*B-CF 和 *tox*B-CR、Kan-F 和 Kan-R 3 对引物扩增获得相应大小的目的片段 BN、BC 和 Kan PCR 产物,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离,紫外灯下切割目的条带,用

DNA 纯化试剂盒回收上述 3 个 PCR 片段,并依次串联到 pET32a 载体中,构建 pET32a-BN-Kan-BC 重组质粒,转化 Top10 感受态细胞,37℃ 培养 16 h,挑取平板单菌落进行鉴定。将鉴定阳性的重组质粒和 pMEG375 载体分别用 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切后,4℃ 连接过夜,转化感受态细胞 SM10,37℃ 培养 20~24 h,挑取平板单菌落进行鉴定,成功获得 pMEG375-BN-Kan-BC 重组质粒。

1.4 细菌固相交配

依次构建 Δhly , Δstx 和 $\Delta toxB$ 3 个基因缺失株,采用固相滤膜杂交方法。分别接种受体菌 O157: H7 和供体菌 sm10(pMEG375-HN-Spc-HC)、sm10(pMEG375-SN-Gm-SC) 和 sm10(pMEG375-BN-Kan-BC) 到 5 mL LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养过夜。然后按 4:1 比例分别取 sm10 和 O157: H7 的过夜培养物,混匀,用滤器过滤,细菌被收集到滤膜上,将滤膜放置于无抗性的 LB 琼脂平板上(滤膜有细菌的一面向上),于 37℃ 培养过夜,注意不要倒置平板。然后用生理盐水洗下滤膜上的细菌进行倍比稀释后,分别涂布于具有链霉素和氯霉素抗性(*Strep*^R *Cm*^R) LB 琼脂平板上,37℃ 培养过夜。

1.5 氯霉素富集法

氯霉素富集法主要按参考文献方法[14]进行。接种上述筛选的氯霉素耐药性的杂交株于 LB 液体培养基中,37℃ 培养过夜,以 2% 接种量转接新鲜 LB 液体培养基中,37℃ 培养 1~2 h,加入氯霉素继续培养 1~2 h,加入 D-环丝氨酸(1 mg/mL),再迅速置 37℃ 继续培养 1~2 h,8 000 r/min 离心收集菌体,用生理盐水洗 1 次,稀释至适当的浓度涂布于 10% 蔗糖平板上,30℃ 培养 16~20 h。长出的菌落分别接种含氯霉素的 LB 平板及普通 LB 平板,筛选氯霉素敏感株。

1.6 细胞试验

1.6.1 粘附试验 细菌 O157: H7 预先接种于 3 mL LB 培养基(含 NaI 150 mg/L)中,于 37℃ 振荡培养 16~20 h。取该适量培养物加到细胞粘附培养液(1% D-甘露糖、不含抗生素的 DMEM 细胞培养液)中,调节细菌数为 2×10^7 cfu/mL,37℃ 静止培养 30 min。细菌 O157: H7 对 HEp-2 细胞的粘附性试验按照文献[15,16]方法进行,主要操作步骤:将上述处理的 O157: H7 细菌培养液 1 mL 加入到 24 孔板中,37℃、5% CO₂ 条件下孵育 2 h 后,吸出培养液,弃去,用 Hank's 液洗涤 1 次,加入新的无菌 DMEM 培养液,再次孵育 2 h 后,弃液,用 Hank's 液洗涤 4 次,每次洗涤要动作轻。

1.6.2 粘附计数 用胰酶消化细胞 15 min,进行适当稀释后涂布于麦康凯培养板上,计算粘附的菌数,求 3 个重复的平均值和标准差。

1.7 动物试验

1.7.1 试验前动物处理 离乳小鼠对 O157: H7 不易感,本试验参考[17]等的方法,在攻毒前所有组均给予 5 g/L 链霉素溶液饮用 3 d,3 d 后粪检肠道排菌少于 10^3 cfu/g,灌胃攻菌后全部给予 0.5 g/L 的链霉素溶液饮用。以排除肠道正常菌群,为 O157: H7 在小鼠体内驯化一个定居和生长的环境,在肠道中成为优势菌群,增加小鼠的易感性。并在攻毒前断水断食 12 h,攻毒后 6 h 恢复饮水饮食,防止攻毒后细菌快速排出动物肠道,延长在其体内作用时间。

1.7.2 攻毒 40 只 Balb/C 小鼠,随机分成 2 个大组。I 组接种 O157: H7 亲本株;II 组接种 O157: H7 缺失株($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$),两组分别设置 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 cfu/只 4 个梯度(表 1)。选取攻毒剂量为 10^9 cfu/只的小鼠,从粪便中检测带菌和排菌情况。

2 结果与分析

2.1 重组自杀性质粒的构建和鉴定

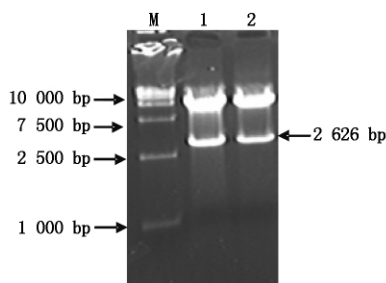
以 O157: H7 为模板分别扩增 HN 和 HC、SN 和 SC、BN 和 BC 片段,长度分别为 655,834 bp、397,229 bp、831,863 bp;以 pSET4s、pFastBac 和 pET28 为模板扩增分别扩增 Spc、Gm 和 Kan 片段,长度分别为 1 137,811,1 192 bp。通过与 pMEG375 自杀性质粒的连接,成功获得 3 个阳性重组质粒 pMEG375-HN-Spc-HC、pMEG375-SN-Gm-SC 和 pMEG375-BN-Kan-BC(图 1~3)。

2.2 O157: H7 缺失株的筛选和鉴定

分别挑取受体菌 O157: H7 和供体菌 sm10(pMEG375-BN-Kan-BC)、sm10(pMEG375-HN-Spc-HC) 和 sm10(pMEG375-SN-Gm-SC),进行细菌固相交配,获得 O157: H7 重组菌(含有 pMEG375-HN-Spc-HC、pMEG375-SN-Gm-SC 和 pMEG375-BN-Kan-BC 质粒的 O157: H7 细菌,具有 Sm^R 和 Cm^R 表型)。将 O157: H7 重组菌进行氯霉素富集,在 10% 的 Sm 蔗糖平板上筛选氯霉素敏感株,以 *rfbE*-F/R、*fliC*-F/R、*hly*-F/R、*stx*-F/R、*toxB*-F/R 和 *spc*-F/R、*gm*-F/R 和 *kan*-F/R 引物进行 PCR,筛选 O157: H7 基因缺失突变株。结果显示, O157: H7 ($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 分别扩增出 O 抗原基因(*rfbE*)、H7 鞭毛基因(*fliC*) 和抗性标记 Spc、Gm 和 Kan 基因,未扩增出 *hly*、*stx* 和 *toxB* 基因,表明 O157: H7 基因缺

失株缺失了 *hly*、*stx* 和 *tox**B* 基因片段。

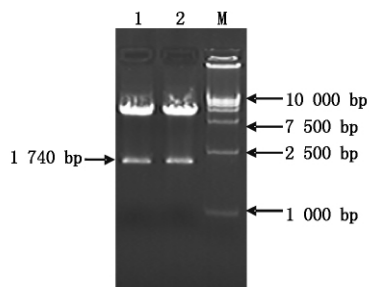
Western blot 方法从蛋白水平进行鉴定。单菌落培养物离心收集菌泥, $1 \times$ 上样缓冲液重悬, 煮沸, 上清 SDS-PAGE 电泳, 并电转印到 NC 膜上, O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 不能和 Hly、Stx 和 ToxB 的多抗反应(图 4~6)。



M. DL-45000 Marker; 1 2. pMEG375-HN-Spc-HC.

图 1 pMEG375-HN-Spc-HC 的酶切

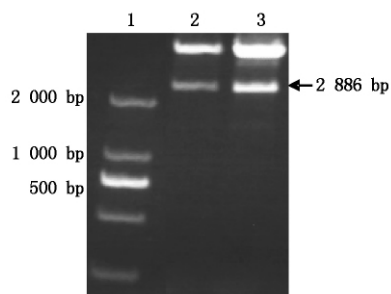
Fig. 1 Digestion of pMEG375-HN-Spc-HC with BamH I /Sal I



M. DL-45000 Marker; 1 2. pMEG375-SN-Gm-SC.

图 2 pMEG375-SN-Gm-SC 的酶切

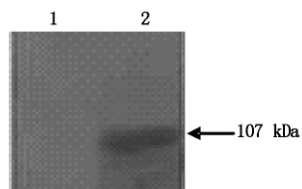
Fig. 2 Digestion of pMEG375-SN-Gm-SC with BamH I /Sal I



1. DL-2000 Marker; 2 3. pMEG375-BN-Kan-BC.

图 3 pMEG375-BN-Kan-BC 的酶切

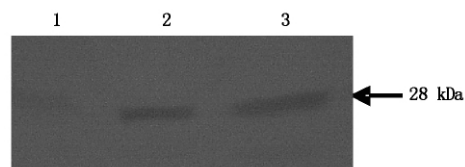
Fig. 3 Digestion of pMEG375-BN-Kan-BC with BamH I /Not I



1. O157:H7(Δhly); 2. O157:H7.

图 4 O157:H7(Δhly) Western blot 鉴定

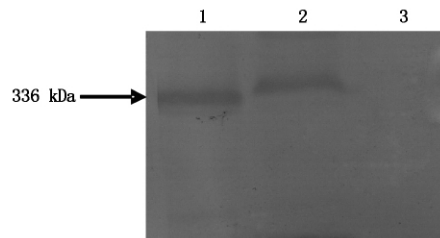
Fig. 4 Western blotting assay for O157:H7(Δhly)



1 2. O157:H7; 3. O157:H7($\Delta hly \Delta stx$).

图 5 O157:H7($\Delta hly \Delta stx$) Western blot 鉴定

Fig. 5 Western blotting assay for O157:H7($\Delta hly \Delta stx$)



1 2. O157:H7; 3. O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$).

图 6 O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) Western blot 鉴定

Fig. 6 Western blotting assay for O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$)

2.3 O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 的生长特性

取 2 4 6 8 10 12 16 20 24 和 30 h 的 O157:H7($\Delta toxB$) 和 O157:H7 培养物测定 OD₆₀₀, 监测细菌的生长情况。O157:H7($\Delta toxB$) 与亲本株 O157:H7 生长速度和细菌浓度没有明显差异(图 7)。

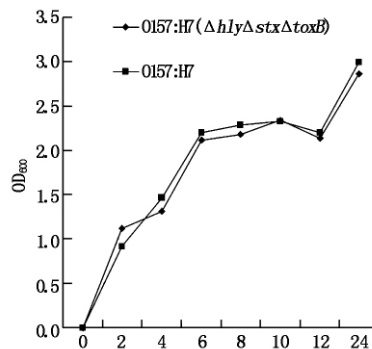


图 7 亲本株 O157:H7 与缺失株

O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 生长特性比较

Fig. 7 Comparing growth features of O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) to parent O157:H7

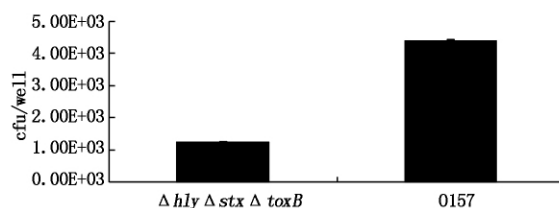


图 8 亲本株 O157:H7 与缺失株

O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 粘附能力的比较

Fig. 8 Comparing adherent features of O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) to parent O157:H7

2.4 O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 的细胞粘附

O157:H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 相比亲本株 O157:H7 对 HEp-2 细胞的粘附能力有着明显的降低($P =$

0.000 2) (图 8)。

2.5 O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 对小鼠的致病性

O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 缺失株对小鼠的致死能力有一定降低,表 1。缺失株和亲本株在小鼠体内定植的能力有较为明显的差异,缺失株在小鼠体定植能力降低,排菌量少,排菌时间缩短(图 9)。

表 1 缺失株与亲本株对 Balb/c 小鼠的致病性

Tab.1 Comparing virulence of O157: H7 ($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) and parent O157: H7 to Balb/c mice				
$\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$				
剂量 Dose	10^{10}	10^9	10^8	10^7
总数 Total	5 只	5 只	5 只	5 只
死亡/总数 Death/Total	0/5	0/5	0/5	0/5
亲本株 Parent strain				
剂量 Dose	1 010	109	108	107
总数 Total	5 只	5 只	5 只	5 只
死亡/总数 Death/total	3/5	0/5	1/5	0/5

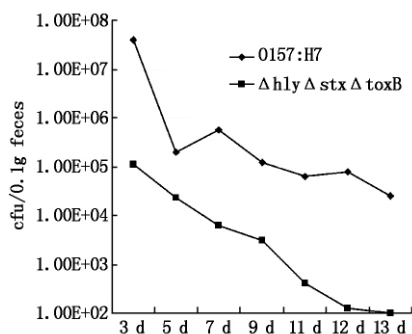


图 9 O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 排菌动态检测

Fig.9 Detection the shedding of O157: H7
($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$)

3 讨论

在世界范围内,由食源性病原微生物引发的食品安全和突发性公共卫生事件占 85% 以上,其中 EHEC O 157: H7 是主要病原之一^[18]。O157 几乎可以感染所有的温血动物,带菌动物的粪便是污染环境、水源以及食品等的主要来源^[1-3, 20]。目前,对 EHEC 的防控,没有商品化的防控制剂。我们前期尝试研制 EHEC O157: H7 的全菌灭活疫苗,高达 10^9 CFU 的抗原量才能有一定保护作用,低于 10^9 CFU 与对照组相比没有明显差异,无保护作用,灭活疫苗用于防控 EHEC 不适合,因此,研制用于防控 EHEC O 157: H7 的基因工程疫苗成为国内外研究的热点。

本研究中选取 O157: H7 的主要毒素基因和粘附相关基因,通过体外重组自杀性质粒的介入敲除主要的致病性基因,在菌株的致病性和免疫原性之间建立一个平衡,构建基因缺失菌株。Hly 和 Stx 为

两个主要的毒素蛋白,ToxB 具有调控 T3SS 的功能。对于 hly 和 toxB 是全基因的缺失,而对于 stx 基因只是缺失了其毒力功能基因 A 亚基,保留了其免疫原性基因 B 亚基,这对于成功构建具有良好免疫原性而毒性降低的基因缺失菌株来讲,是至关重要而必要的。从理论设计上,O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$) 的致病力和体内定植能力都会有大大的降低,本研究的结果恰恰印证这一结论。对链霉素处理的小鼠几乎没有了致死能力,在其体内的定植时间明显缩短,尤其是定植菌的数量降低了近 3 个 CFU,这大大降低了对食品和环境污染的机会。冯书章等报道成功构建了 O157: H7($\Delta stx \Delta ler$) 基因缺失菌株,并且研究结果显示该基因缺失株具有良好保护作用^[19],佐证了研制基因缺失疫苗用于防控 EHEC 是可行的,是有效的。与本研究相比,更多的缺失了与粘附相关蛋白,可能会更加安全,但从本研究结果表明,安全性是毋庸置疑的。相比之下,由于多的粘附因子被保留,免疫原性可能会优于 O157: H7($\Delta stx \Delta ler$)。因此,本研究选取 O157: H7 多个功能基因,成功构建了基因缺失菌株 O157: H7($\Delta hly \Delta stx \Delta toxB$),为后续基因缺失疫苗的成功研制奠定了基础和提供了坚实的物质保障。

参考文献:

- [1] Centers for Disease Control and Prevention(CDC) . Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states , 2008 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report , 2009 57(14) : 366 - 370.
- [2] Peter Feng. *Escherichia coli* Serotype O157: H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants [J]. Emerging Infectious Diseases 2005 1(2) : 47 - 52.
- [3] Doyle M P , Erickson M C. Summer meeting 2007-the problems with fresh produce: an overview [J]. Journal Applied Microbiology 2008 , 105(2) : 317 - 30.
- [4] Girard F , Frankel G , Phillips A D *et al.* Interaction of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 with mouse intestinal mucosa [J]. FEMS Microbiology Letters , 2008 , 283(2) : 196 - 202.
- [5] Mark A H , Christian M , Thomas A C , *et al.* Bovine Immune Response to Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Clinical Vaccine Immunology , 2006 , 11: 1322 - 1327.
- [6] Yuhng L , Elizabeth F , Andrew M. Human response to *Escherichia coli* O157: H7 infection antibodies to secreted virulence factors [J]. Infection and Immunity , 2000 , 68 (9) : 5090 - 5095.

- [7] IJiu H ,Magoun L ,Luperehio S. The Tir-binding region of enterohemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signaling [J]. *Molecular Microbiology* ,1999 ,34(1) : 67 – 81.
- [8] McKee M L ,Melton-Celsa A R ,Moxley R A. *Escherichia coli* O157: H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells [J]. *Infection and Immunity* ,1995 ,63: 3739 – 3744.
- [9] Torres A G ,Kaper J B. Multiple elements controlling adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 to HeLa cells [J]. *Infection and Immunity* 2003 ,71: 4985 – 4995.
- [10] Meng J ,Zhao S ,Doyle M P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food ,animals and humans [J]. *International Journal of Food Microbiology* ,1998 ,45: 22 – 25.
- [11] Ebel F ,Podzadel T ,Rohde M. Initial binding of Shiga toxin-producing *Eschedchia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA containing surface appendage [J]. *Molecular Microbiology* ,1998 ,30(1) : 147 – 161.
- [12] Ichiro T ,Masanori H ,Hiroyuki A ,*et al.* *ToxB* Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype [J]. *Infection and Immunity* ,2008 ,69 (11) : 6660 – 6669.
- [13] 张雪寒 ,何孔旺 ,赵攀登 ,等. 出血性大肠杆菌 O157: H7 2B-Tir-1B 多价融合蛋白表达及免疫原性研究 [J]. *华北农学报* 2010 ,25(4) : 1 – 6.
- [14] Sack D A ,Huda S ,Neogi P K. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin [J]. *J Clinical Microbiology* ,1980 ,11(1) : 35 – 40.
- [15] Benga L ,Friedl P ,Valentin-Weigand P. Adherence of *Streptococcus suis* to Porcine Endothelial Cells [J]. *Journal of Veterinary Medicine* 2005 ,B 52: 392 – 395.
- [16] Stephen M W ,Pam Norton ,Karin Haverson ,*et al.* Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 2007 ,117: 116 – 123.
- [17] Fujii J ,Kita T ,Yoshida S. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in mitomycin-treated mice [J]. *Infection and Immunity* ,1994 ,62(8) : 3447 – 3453.
- [18] Terrance M A ,Dayna M B ,Joseph M B ,*et al.* Super shedding of *Escherichia coli* O157: H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination [J]. *Meat Science* 2010(86) : 32 – 37.
- [19] Jun Liu ,Yang Sun ,Shuzhang Feng ,*et al.* Towards an attenuated enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 vaccine characterized by a deleted ler gene and containing apathogenic Shiga toxins [J]. *Vaccine* 2009(27) : 5929 – 5935.