

研究报告

EHEC O157:H7 α 3276 基因缺失株构建及其生物学特性张碧成^{1,2,3,4} 张雪寒^{1,2,3} 孙小涵^{1,2,3} 范红结⁴ 何孔旺^{1,2,3*}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心 江苏 南京 210014)

(2. 省部共建国家重点实验室培育基地—江苏省食品质量安全重点实验室 江苏 南京 210014)

(3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心 江苏 扬州 225009)

(4. 南京农业大学动物医学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是世界范围内重要的动物源性致病菌之一,可感染人。I 型菌毛是多种致病性大肠杆菌(如肾盂肾炎型大肠杆菌等)可表达的一种黏附结构,与细菌吸附黏膜表面密切相关。然而, O157:H7 *fim* 操纵子上几个核苷酸的缺失却导致其不能表达 I 型菌毛。BLAST 比对结果表明 O157:H7 独有的开放阅读框 α 3276 编码的氨基酸序列与其他大肠杆菌 I 型菌毛高度同源,这可能是对 O157:H7 不能表达 I 型菌毛的补偿机制,但确切功能尚不清楚。本文探究 α 3276 基因的生物学功能。【方法】利用 O157:H7 86-24 参考菌株构建 α 3276 基因缺失株($\Delta\alpha$ 3276),并构建其互补株($C\Delta\alpha$ 3276),进而比较亲本株、 $\Delta\alpha$ 3276 与 $C\Delta\alpha$ 3276 的生物学特性及对小鼠致病性差异。【结果】与亲本株相比, $\Delta\alpha$ 3276 进入对数生长期的时间延后,在半固体琼脂平板上的迁移直径明显缩小,生物被膜形成能力显著减弱。 $\Delta\alpha$ 3276 对 HEp-2 细胞的黏附和侵袭能力并无明显变化,但对 IPEC-J2 细胞的侵袭能力明显减弱。在小鼠攻毒试验中, $\Delta\alpha$ 3276 组排菌数量减少、排菌持续时间缩短。 $C\Delta\alpha$ 3276 各项特性均能回复到与亲本株一致的水平。【结论】 α 3276 基因可能是 O157:H7 重要的毒力相关因子。

关键词: O157:H7, α 3276 基因, 缺失株, 致病性

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31572503); Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (No. CX(15)1060)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84390748; E-mail: kwh2003@263.net

Received: July 14, 2017; **Accepted:** September 06, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 08, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31572503); 江苏省自主创新基金项目(No. CX(15)1060)

*通讯作者: Tel: 86-25-84390748; E-mail: kwh2003@263.net

收稿日期: 2017-07-14; **接受日期:** 2017-09-06; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-08

Construction and characterization of ζ 3276 gene knocked-out mutant of EHEC O157:H7

ZHANG Bi-Cheng^{1,2,3,4} ZHANG Xue-Han^{1,2,3} SUN Xiao-Han^{1,2,3}
FAN Hong-Jie⁴ HE Kong-Wang^{1,2,3*}

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products of Agricultural Ministry, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

(2. Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

(3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a worldwide important zoonotic pathogen that causes foodborne infections in humans. Type I fimbriae are important bacterial adhesion organelles present in various types of pathogenic *E. coli* (e.g. Uropathogenic *E. coli*) that facilitate bacterial colonization. However, EHEC O157:H7 cannot express type I fimbriae because of base deletion in the *fim* operon. BLAST analysis shows that the open reading frame ζ 3276, a specific genetic marker of EHEC O157:H7, encodes a sequence with high amino acid identity to other *E. coli* type I fimbriae. It is possible that ζ 3276-encoding protein is a compensatory mechanism for type I fimbriae, but its definitive function in EHEC O157:H7 remains unclear. We explore the biological function of ζ 3276 gene. [Methods] We targeted the reference EHEC O157:H7 86-24 strain to construct a ζ 3276 mutant ($\Delta\zeta$ 3276) and its complement strain (C $\Delta\zeta$ 3276), and the biological characteristics and pathogenicity of $\Delta\zeta$ 3276 in mice were compared with the parental strain. [Results] Motility and biofilm formation assays revealed a smaller twitching motility zone for $\Delta\zeta$ 3276 on the agar surface and significantly decreased biofilm formation by $\Delta\zeta$ 3276 compared with the parental strain. The adhesion and invasion ability of $\Delta\zeta$ 3276 to HEP-2 cells showed no significant change, but the invasion ability of $\Delta\zeta$ 3276 to IPEC-J2 cells was attenuated. During mouse colonization, we observed shortened and lower fecal shedding for $\Delta\zeta$ 3276 compared with the parental strain. [Conclusion] Thus, ζ 3276 appears to be a crucial virulence factor of EHEC O157:H7.

Keywords: O157:H7, ζ 3276 gene, Knocked-out mutant, Pathogenicity

肠出血性大肠杆菌 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 是一种十分重要的食源性致病菌^[1], 感染可能引起人的轻微腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征, 甚至死亡^[2-5]。近年来, 在我国、美国、日本、德国等多个国家和地区引起大规模的食物中毒事件, 具有十分重要的公共卫生意义。

许多菌毛及菌毛基因群已被证实与 EHEC O157:H7 对宿主细胞的黏附及其毒力有关^[6]。IV 型菌毛 HCP 与 EHEC O157:H7 对肠道的黏附和侵袭有关, 并诱导肠道细胞分泌促炎细胞因子^[7-9]。I 型菌毛也是多种致病性大肠杆菌(如肾盂肾炎型大肠

杆菌等)及其他很多革兰氏阴性菌均可表达的一种黏附结构, 它们能够促进细菌对黏膜表面的吸附^[6]。然而, EHEC O157:H7 却因其在编码 I 型菌毛的 *fim* 操纵子存在部分核苷酸的缺失及点突变, 导致无法表达 I 型菌毛^[10-11]。 ζ 3276 基因是 EHEC O157:H7 高度保守的开放阅读框^[12], BLAST 分析结果表明其编码的氨基酸序列与其他大肠杆菌 I 型菌毛高度同源, 可能具有 I 型菌毛相同或相似的功能, 但是否在黏附和定殖肠道中发挥重要作用, 有待阐明。

本文通过同源重组构建了 EHEC O157:H7 ζ 3276 基因缺失株, 并对其在生物被膜形成能力、运动性等生物学特性和致病性方面与亲本株进行

比较研究,以期探索 $\Delta z3276$ 的生物学功能。

1 材料

1.1 菌种、质粒和细胞

EHEC O157:H7 86-24 菌株,由扬州大学朱国强教授惠赠。质粒 pMEG375、C118 菌株和宿主菌 sm10,由扬州大学焦新安教授惠赠。HEp-2、IPEC-J2 细胞,本研究室保存。抗 Z3276 兔血清,效价为 1:12 800,本实验室制备保存。

1.2 主要试剂和仪器

TaKaRa PCR Thermal Cycler PCR 仪, TaKaRa Bio Inc.公司; Centrifuge 5415 R 离心机, Eppendorf 公司; DYY-11 型电泳仪,北京市六一仪器厂; GelX1650 型凝胶成像分析系,上海欧翔科学仪器有限公司; ECM630 电转化仪,美国 BTX 公司; 电极杯(2 mm 规格),美国 Bio-Rad 公司。

pMD19-T、*Bam*H I、*Eco*R I 和 *Sal* I, TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒, Axygen 公司; Tryptone Soya Broth (TSB)培养基, OXOID 公司; 蔗糖和 D-环丝氨酸, Sigma 公司; 甲醇、无水乙醇、冰乙酸等试剂均为进口或国产分析纯。实验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, 卡那霉素(Km) 50 μ g/mL, 头孢曲松钠 10 μ g/mL。10%的蔗糖培养基(g/L): 蔗糖 100.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0。LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0。

1.3 实验动物

6-8 周龄 BALB/c 小鼠,清洁级,购自扬州大学。

2 方法

2.1 EHEC O157:H7 $\Delta z3276$ 基因缺失株($\Delta z3276$)及其互补株(C $\Delta z3276$)的构建

利用自杀性质粒 pMEG375 构建 $\Delta z3276$ ^[13], 主要步骤如下:根据 GenBank 中 EHEC O157:H7 $\Delta z3276$ 的基因序列及 FastbacTM 序列(序列号为 AY598466.1), 利用 DNASTar 软件和 Primer Premier 5.0 分析,设计合成 PCR 引物,以 O157:H7 86-24 菌

株基因组 DNA 为模板,分别扩增 $\Delta z3276$ 基因 5'端上游 343 bp (P1-F/R)、3'端下游 407 bp (P2-F/R)序列和 811 bp Gm 表达盒(P3-F/R), 各引物序列如表 1 所示。将这三个基因片段串联后与自杀性载体 pMEG375 连接,构建了 pMEG375 $\Delta z3276$ 自杀性质粒。

将测序正确的阳性质粒 pMEG375 $\Delta z3276$ 转化 sm10 感受态细胞,将供体菌 sm10 (pMEG375 $\Delta z3276$)和受体菌 O157:H7 菌株以 2%的比例分别接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。然后按照 4:1 (体积比)的比例取其过夜培养物, 混匀,过滤器过滤后将菌体收集到滤膜上,然后将滤膜平放于无抗性的 LB 琼脂板上(滤膜含细菌菌体的一面朝上), 37 °C 正置培养过夜。用无菌生理盐水将滤膜上的菌体洗下后,进行适当的倍比稀释,将稀释后的菌液涂布于含有链霉素和氯霉素抗性 (Strep^RCm^R)的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜。

将上述筛选出的链霉素和氯霉素耐药性杂交菌株接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜,再以 2%的比例转接于新鲜 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 1-2 h, 加入氯霉素(30 mg/mL)继续培养 1-2 h 后加入 D-环丝氨酸(1 mg/mL),再迅速置于 37 °C、220 r/min 继续培养 1-2 h, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用无菌生理盐水洗一次,稀释至适当的浓度涂布于 10%蔗

表 1 引物
Table 1 Primers used in this study

| 引物 Primer | 核苷酸序列 Nucleotide sequences (5'→3') | 酶切位点 Restriction sites |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| P1-F | TAA <u>GGATCCT</u> CGGGAATTTCTAAG | <i>Bam</i> H I |
| P1-R | GGG <u>GAAATTC</u> GTGAAATACGATTAA | <i>Eco</i> R I |
| P2-F | GGG <u>GAAATTC</u> ATTCTGAACATCAT | <i>Eco</i> R I |
| P2-R | TAA <u>ATCGAC</u> GACGGACTGACACCTTA | <i>Sal</i> I |
| P3-F | <u>GAATTC</u> ACCGTGGAACGCATGAAG | <i>Eco</i> R I |
| P3-R | <u>GAATTC</u> ACGGCTTGAACGAATTGTT | <i>Eco</i> R I |
| P4-F | GCC <u>GAAATTC</u> ATTTTATCATCGCTAA | <i>Eco</i> R I |
| P4-R | ATAGGATCCGCGGTCGTTCTGGTTGAT | <i>Bam</i> H I |
| $\Delta z3276$ -F | CGCGGATCCTTTAGTAAAAGTGTC | |
| $\Delta z3276$ -R | GGCAAGCTTAATCGTATTTCACGTT | |

糖平板上, 30 °C 静置培养 16–20 h。长出的菌落分别接种含氯霉素的 LB 平板、含链霉素的 LB 平板及含庆大霉素的 LB 平板, 筛选氯霉素敏感、链霉素和庆大霉素耐药的菌株, 经 DNA 和蛋白水平鉴定, 成功获得 $\Delta z3276$ 菌株。

利用引物 P4-F/R PCR 扩增得到 $\Delta z3276$ 互补序列 Com- $\Delta z3276$, 与 pMD19-T 载体连接。将 2 μ L 连接成功的阳性质粒(400 μ g/mL)电转(2 200 V, 0.5 ms)进入 80 μ L $\Delta z3276$ 感受态细胞, 电击后迅速加入 1 mL 预热的 LB 液体培养基, 37 °C、100 r/min 培养 2 h, 取 200 μ L 培养物涂布于氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂板上, 37 °C 静置培养过夜。经 PCR 鉴定后成功获得 $\Delta z3276$ 的互补株(C $\Delta z3276$)。

2.2 生长曲线的测定

挑取 EHEC O157:H7 亲本株(Wild type, WT)、 $\Delta z3276$ 和 C $\Delta z3276$ 单菌落分别接种于 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 分别取 1 mL 过夜培养物适当稀释, 调整其 $OD_{600}=0.05$, 接种于 50 mL LB 液体培养基, 置于 37 °C、220 r/min 振荡培养, 每隔 1 h 取 1 mL 样品, 测其 OD_{600} 值并记录, 绘制细菌的生长曲线, 观察比较生长速度的差异。

2.3 生物被膜形成能力的测定

生物被膜形成试验按照 Pratt 等^[14]的方法稍加改动进行。主要步骤如下: 将 WT、 $\Delta z3276$ 和 C $\Delta z3276$ 菌株接种于液体 TSB 培养基中, 37 °C 静置培养过夜。次日, 稀释过夜培养物至 $OD_{600}=0.05$ 后, 各吸取 300 μ L 至 96 孔板, 每种菌株做 3 个重复, 37 °C 静置孵育 10 h, 以 630 nm 波长测其细菌密度。弃去培养基, 无菌 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 然后每孔加 300 μ L 0.1% 结晶紫溶液, 室温孵育 20 min 后, 弃去结晶紫溶液, 无菌 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。最后, 每孔加 300 μ L 无水乙醇, 测其在 570 nm 处的吸光度。 OD_{570}/OD_{630} 值的大小即可表示每种菌株的生物被膜形成能力强弱。

2.4 细胞黏附与黏附抑制

将单层细胞用含 2% 血清的 DMEM 细胞培养液

制成细胞悬液(细胞密度为 1.2×10^6 个/mL), 将细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL, 置 37 °C、5% CO_2 培养成单层细胞后, 吸尽培养液, 用不含血清的 DMEM 液洗 5–6 次, 将 1 mL WT、 $\Delta z3276$ 和 C $\Delta z3276$ 菌液(含细菌 1.0×10^7 CFU/mL)接种至细胞板孔内, 每个菌株 3 个重复, 无细菌细胞孔作为阴性对照。37 °C、5% CO_2 孵育 3 h, 弃上清, 无菌 PBS 洗 5–6 次, 胰酶消化吹散后山梨醇麦康凯平板计数。

将已灭菌的兔抗血清(1:12 800)与细菌培养物预先在 37 °C、5% CO_2 条件下共感作 45 min, 这期间轻轻地混匀 3 次, 抗血清加入量占黏附培养基终浓度的 50%、10%、1%。混合培养物 4 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 无血清 DMEM 液轻轻吹打重悬菌体, 然后接种于细胞, 培养时间和方法按照黏附试验步骤进行, 每个样品设 3 个重复。

2.5 细胞侵袭

与细胞黏附试验步骤基本相同, 唯一不同在于最后涂板计数前加入头孢曲松钠(10 μ g/mL)与细胞作用 3 h, 杀死细胞表面的细菌。

2.6 小鼠排菌监测

40 只 6–8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 随机分为 3 个试验组(WT 组、 $\Delta z3276$ 、C $\Delta z3276$)和空白对照组, 每组 10 只。所有组均给予 5 g/L 链霉素溶液饮用 3 d, 然后全部断水、断食 12 h, 灌胃攻菌, 10^{10} CFU/只, 同时腹腔注射丝裂霉素(2.5 mg/kg), 攻菌 2 h 后恢复饮水(0.5 g/L 的链霉素水)、饮食。

隔天采集粪便样品进行排菌监测, 主要步骤如下: 每只小鼠采集粪便 3–5 颗, 于 1 mL 无菌 PBS 中破碎、溶解, 500 r/min 离心 6 min, 取上清 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 1 mL 无菌 PBS 重悬菌体, 适当稀释后涂布于链霉素抗性的山梨醇麦康凯平板, 37 °C 静置培养过夜, 计数。

2.7 动力学试验

分别将 WT、 $\Delta z3276$ 和 C $\Delta z3276$ 菌株等量接种于 TSB 液体培养基中, 37 °C 静置培养过夜, 次日, 将过夜培养物分别接种于 0.3% LB 半固体琼脂板

上, 37 °C 静置培养 18 h, 观察比较细菌迁移范围的大小。

3 结果与分析

3.1 $\Delta z3276$ 的构建和鉴定

3.1.1 自杀性质粒 pMEG375 $\Delta z3276$ 的构建: 以 EHEC O157:H7 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1-F/R、P2-F/R 扩增出 $z3276$ 基因的上游片段 $z3276$ -U (343 bp) 和下游片段 $z3276$ -D (407 bp), 同时用引物 P3-F/R 扩增出 Gm 基因(811 bp), 如图 1 所示。在相应限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 将 $z3276$ -U 和 $z3276$ -D 片段串联后与 pMD19-T 进行连接, 如图 2 所示, 再与 Gm 片段进

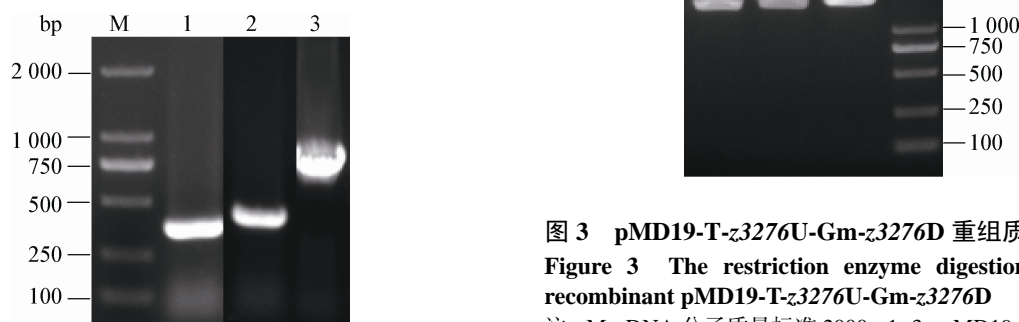


图 1 EHEC O157:H7 $z3276$ 基因上、下同源臂及 Gm 表达盒的扩增

Figure 1 The amplification of Gm and EHEC O157:H7 $z3276$ gene homologous arm

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1: $z3276$ U 基因片段; 2: $z3276$ D 基因片段; 3: Gm 基因片段。

Note: M: DNA 2000 marker; 1: $z3276$ U; 2: $z3276$ D; 3: Gm.

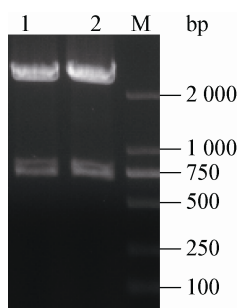


图 2 pMD19-T- $z3276$ U- $z3276$ D 重组质粒酶切鉴定

Figure 2 The restriction enzyme digestion analysis of recombinant pMD19-T- $z3276$ U- $z3276$ D

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1, 2: pMD19-T- $z3276$ U- $z3276$ D 重组质粒。

Note: M: DNA 2000 marker; 1, 2: Recombinant pMD19-T- $z3276$ U- $z3276$ D.

行连接, 对构建的重组质粒用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切验证, 酶切片段为 2 692 bp 和 1 561 bp, 与预期大小一致, 结果见图 3。

将获得的阳性质粒 pMD19-T- $z3276$ -U-Gm- $z3276$ -D 和 pMEG375 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后再连接, 得到自杀性质粒 pMEG375 $\Delta z3276$, 双酶切鉴定, 酶切片段为 8 142 bp 和 1 561 bp, 与预期条带大小相同, 见图 4, 将 pMEG375 $\Delta z3276$ 送至南京斯普金公司进行测序, 用 DNASTar 软件进行分析比较。

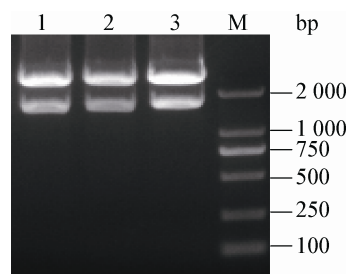


图 3 pMD19-T- $z3276$ U-Gm- $z3276$ D 重组质粒酶切鉴定
Figure 3 The restriction enzyme digestion analysis of recombinant pMD19-T- $z3276$ U-Gm- $z3276$ D

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1-3: pMD19-T- $z3276$ U-Gm- $z3276$ D 重组质粒。

Note: M: DNA 2000 marker; 1-3: Recombinant pMD19-T- $z3276$ U-Gm- $z3276$ D.

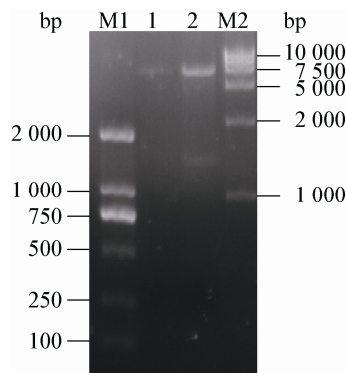


图 4 pMEG375 $\Delta z3276$ 重组质粒酶切鉴定

Figure 4 The restriction enzyme digestion analysis of recombinant pMEG375 $\Delta z3276$

注: M1: DNA 分子质量标准 2000; M2: DNA 分子质量标准 15000; 1: pMEG375 空载体; 2: 自杀性质粒 pMEG375 $\Delta z3276$ 。

Note: M1: DNA 2000 marker; M2: DNA 15000 marker; 1: pMEG375 vector; 2: pMEG375 $\Delta z3276$ plasmid.

3.1.2 DNA 水平的鉴定: 以待检基因缺失株 DNA 为模板, 用引物 $z3276$ -F/R 未扩增出任何条带(亲本株扩增出 916 bp 的条带, 与预期大小相同), 见图 5, 结果表明已获得 $\Delta z3276$ 菌株。

3.1.3 蛋白水平的鉴定: 亲本株和缺失株过夜培养物各取 1 mL, 以 1/5 体积无菌双蒸水重悬, 裂解后取上清用于 SDS-PAGE 分析。按照常规方法进行半干转印, Western blot 显示, EHEC O157:H7($\Delta z3276$) 不能与兔源抗 Z3276 多抗反应, 而亲本株有清晰而特异的反应条带, 见图 6。

3.2 $C\Delta z3276$ 的构建和鉴定

3.2.1 互补质粒 pMD19-T-Com- $z3276$ 的构建: 以 O157:H7 亲本株 DNA 为模板, 用引物 P4-F/R 扩增 Com- $z3276$ 片段, 1 344 bp, 见图 7; 将 Com- $z3276$ 片段与 pMD19-T 连接、转化、双酶切鉴定, 得到 2 692 bp 和 1 344 bp 的片段, 见图 8, 与预期大小一致, 成功获得阳性互补质粒。

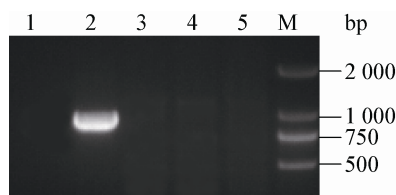


图 5 引物 $z3276$ -F/R 扩增产物

Figure 5 PCR products with $z3276$ -F/R

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1: 阴性对照; 2: O157:H7 亲本株扩增产物; 3-5: 待检缺失株扩增产物。

Note: M: DNA 2000 marker; 1: Negative control; 2: $z3276$ -F/R PCR amplification using the DNA of O157:H7 WT; 3-5: $z3276$ -F/R PCR amplification using the DNA of candidate mutant.

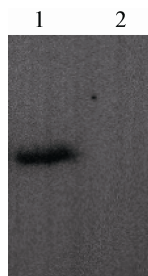


图 6 $\Delta z3276$ 的 Western blot 验证

Figure 6 Western blot confirmation of $\Delta z3276$

Note: 1: WT; 2: $\Delta z3276$.

3.2.2 O157:H7 $C\Delta z3276$ 的鉴定: 以电转后 $\Delta z3276$ DNA 为模板, 用引物 $z3276$ -F/R 进行 PCR 扩增, 得到 916 bp 的片段, 见图 9, 与预期大小相同, 证明成功获得 $C\Delta z3276$ 菌株。

3.3 细菌生长曲线的测定

WT 和 $C\Delta z3276$ 在 4 h 即进入对数生长期, 而 $\Delta z3276$ 则在 12 h 才进入对数生长期, 但三者进入平台期后的菌体数量基本一致, 见图 10, 这表明 $z3276$ 基因对 O157:H7 的早期生长有重要影响。

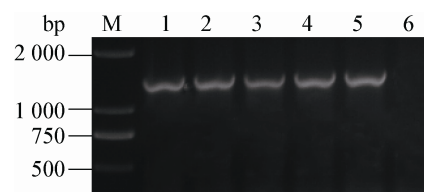


图 7 引物 P4-F/R 扩增产物

Figure 7 PCR products with P4-F/R

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1-5: Com- $z3276$ 基因片段; 6: 阴性对照。

Note: M: DNA 2000 marker; 1-5: Com- $z3276$; 6: Negative control.

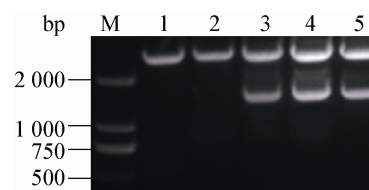


图 8 pMD19-T-Com- $z3276$ 重组质粒酶切鉴定

Figure 8 The restriction enzyme digestion analysis of recombinant pMD19-T-Com- $z3276$

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1, 2: pMD19-T 空载体; 3-5: pMD19-T-Com- $z3276$ 质粒。

Note: M: DNA 2000 marker; 1, 2: pMD19-T vector; 3-5: pMD19-T-Com- $z3276$ plasmid.

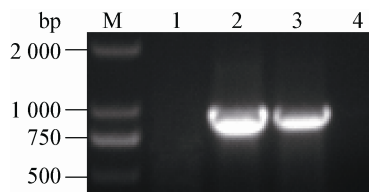


图 9 O157:H7 $C\Delta z3276$ 的 PCR 鉴定

Figure 9 PCR confirmation of O157:H7 $C\Delta z3276$

注: M: DNA 分子质量标准 2000; 1: $\Delta z3276$ 扩增产物; 2: $C\Delta z3276$ 扩增产物; 3: WT 扩增产物; 4: 阴性对照。

Note: M: DNA 2000 marker; 1: $z3276$ -F/R PCR amplification using the DNA of $\Delta z3276$; 2: $z3276$ -F/R PCR amplification using the DNA of $C\Delta z3276$; 3: $z3276$ -F/R PCR amplification using the DNA of WT; 4: Negative control.

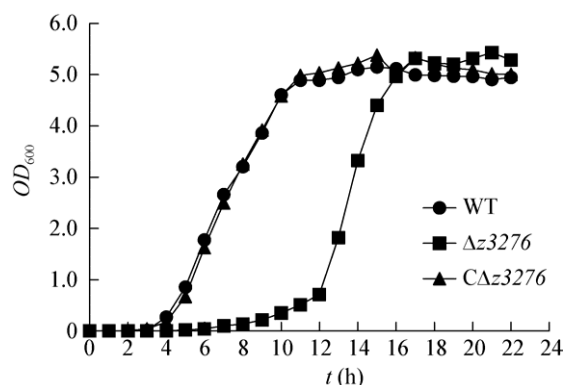


图 10 不同菌株的生长曲线

Figure 10 Growth curves of different strains

3.4 生物被膜形成能力的测定

$\Delta z3276$ OD_{570}/OD_{630} 值为 WT 的 86.1%，即 $\Delta z3276$ 生物被膜形成能力明显减弱 ($P < 0.05$)， $C\Delta z3276$ 生物被膜形成能力回复到略高于 WT 的水平，但并无显著差异 ($P > 0.05$)，见图 11。

3.5 对 HEp-2 和 IPEC-J2 细胞的黏附和侵袭作用

与 WT 菌株相比， $\Delta z3276$ 菌株仅对 IPEC-J2 的侵袭能力显著减弱 ($P < 0.05$)，而对 IPEC-J2 细胞的黏附及对 HEp-2 细胞的黏附和侵袭能力均无明显变化 ($P > 0.05$, $P > 0.05$)， $C\Delta z3276$ 菌株对 HEp-2 和 IPEC-J2 细胞的黏附和侵袭能力均与 WT 菌株相当，如图 12 和 13 所示。这表明 $z3276$ 只参与 O157:H7 对某些特定细胞的致病过程。

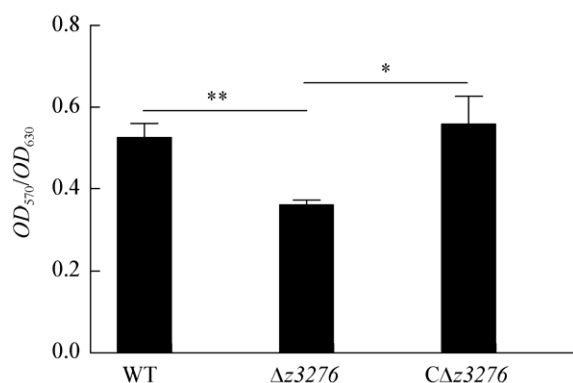
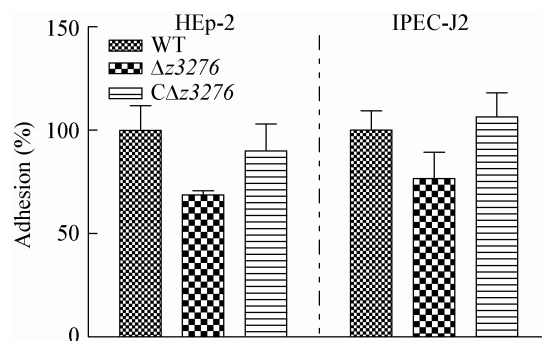


图 11 生物膜形成能力

Figure 11 Biofilm formation

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

图 12 WT、 $\Delta z3276$ 和 $C\Delta z3276$ 菌株对 HEp-2 和 IPEC-J2 细胞的黏附Figure 12 Qualitative comparison of adhesion among WT, $\Delta z3276$ and $C\Delta z3276$ strains into HEp-2 and IPEC-J2

3.6 黏附抑制试验

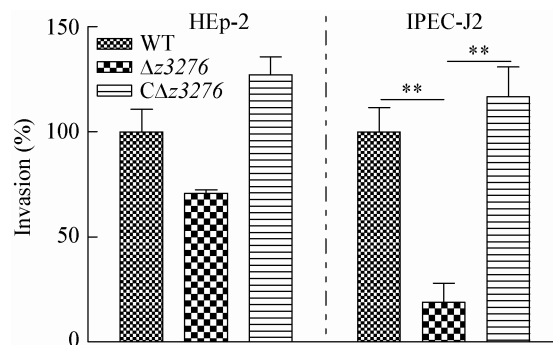
与阴性对照相比，加入 1:2 和 1:10 稀释的抗血清作用后，WT 对 HEp-2 和 IPEC-J2 细胞的黏附能力均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)，但在抗血清稀释度为 1:100 时则无明显变化 ($P > 0.05$)，如图 14 所示。

3.7 小鼠粪便排菌情况

在整个观察期内，各组小鼠粪便排菌量均日渐减少，每天排菌量 $C\Delta z3276$ 组 $>$ WT 组 $>$ $\Delta z3276$ 组，见图 15。由此可见， $z3276$ 参与 EHEC O157:H7 的体内定殖。

3.8 细菌动力学试验

在 TSB 半固体琼脂板上，WT 迁移直径为 15 mm， $\Delta z3276$ 迁移直径为 9 mm， $C\Delta z3276$ 迁移直径为 17 mm。与 WT 相比， $\Delta z3276$ 迁移能力降低

图 13 WT、 $\Delta z3276$ 和 $C\Delta z3276$ 菌株对 HEp-2 和 IPEC-J2 细胞的侵袭Figure 13 Qualitative comparison of invasion among WT, $\Delta z3276$ and $C\Delta z3276$ strains into HEp-2 and IPEC-J2

Note: **: $P < 0.01$.

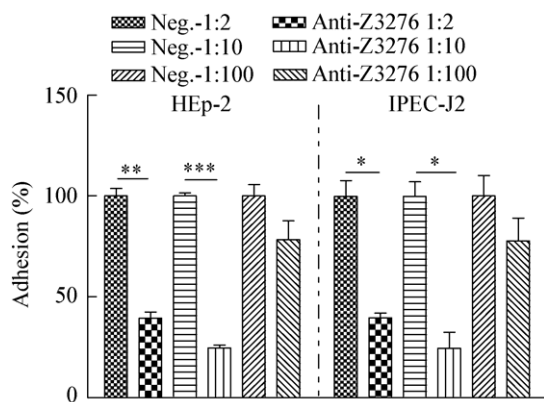


图 14 与 Z3276 抗血清孵育后 WT 黏附能力的变化
Figure 14 Inhibition of different strains adherence to HEp-2 and IPEC-J2 cells by anti-Z3276 antibodies
Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

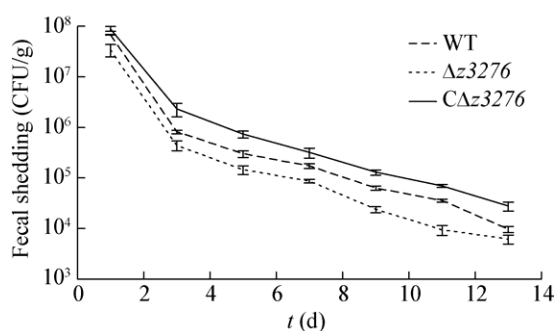


图 15 小鼠粪便排菌量变化趋势
Figure 15 The trendgraph of changing shedding in mice

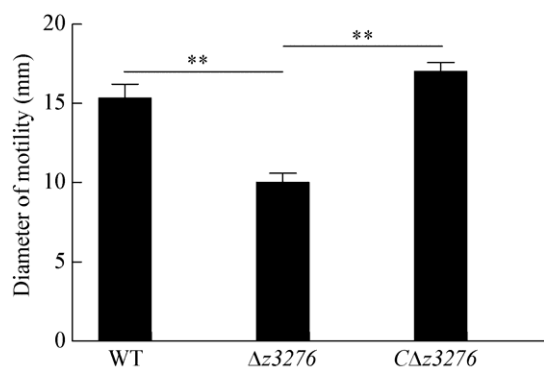


图 16 WT 及 $\Delta z3276$ 在 TSB 半固体平板上的迁移距离
Figure 16 Twitching motility for EHEC O157:H7 and $\Delta z3276$ strains on TSB
Note: **: $P<0.01$.

40% ($P<0.05$), 而 $C\Delta z3276$ 无显著变化($P>0.05$), 如图 16 所示。

4 结论与讨论

EHEC 是一种动物源性致病菌, 其最重要的血清型 O157:H7 能够引起世界范围内动物和人大规模暴发感染, 造成严重的公共健康问题。EHEC O157:H7 公认的致病因子包括志贺毒素和LEE毒力岛: 志贺毒素导致人的溶血性尿毒综合征, 并促进病原菌定植肠粘膜; LEE毒力岛编码与宿主定殖相关的毒力因子, 造成黏附-抹去(Attaching and effacing, A/E)损伤^[15-16]。此外, 还有一些其他因子可能与EHEC O157:H7的致病性有关, 如蛋白酶EspP可以通过剪切胃蛋白酶A和人凝血因子V加剧肠道出血, 同时还可以保护EHEC O157:H7免受免疫系统的清除^[17-18]。目前, 越来越多的研究表明菌毛在EHEC O157:H7感染的初始阶段发挥着重要作用^[7], 如I型菌毛尖端黏附素FimH就能够促进致肾盂肾炎型大肠杆菌侵袭膀胱上皮细胞^[19]。 $\Delta z3276$ 是EHEC O157:H7独有的开放阅读框, 其编码的氨基酸序列与其他大肠杆菌的I型菌毛表现出高度的同源性, 而EHEC O157:H7本身并不能表达I型菌毛。因此, $\Delta z3276$ 基因编码的蛋白可能是对I型菌毛的补偿机制。

生物被膜有助于细菌在惰性表面定殖, 同时保护菌体细胞减轻宿主免疫系统及抗生素药物的伤害^[20]。本研究通过结晶紫染色发现, $\Delta z3276$ 生物被膜形成能力明显弱于亲本株, 这就说明 $\Delta z3276$ 基因与细菌生物被膜形成密切相关, 从而可能对EHEC O157:H7的耐药性造成一定影响, 这与国外一些学者的推测是一致的。本研究以 OD_{570}/OD_{630} 值来判断生物膜形成能力的强弱, 将结晶紫的吸光度平均到单个细菌, 排除了由于细菌数量不同引起的误判, 结果更加可信。

黏附是致病菌入侵宿主细胞的第一步。本文通过比较WT和 $\Delta z3276$ 对HEp-2及IPEC-J2细胞黏附能力的差异来研究 $\Delta z3276$ 基因是否在EHEC O157:H7的定殖过程中发挥作用。定量分析结果显

示,与亲本株相比, $\Delta z3276$ 对两种细胞的黏附能力均无明显变化,这可能是因为HEp-2和IPEC-J2细胞表面没有能够与 $z3276$ 编码蛋白相互作用的受体,后续研究中我们会尝试来自人和牛的多种不同类型的细胞进一步进行黏附分析。侵袭试验结果发现 $\Delta z3276$ 对IPEC-J2细胞的侵袭数较亲本株减少了81%,这可能是某个基因能特异性识别 $z3276$,从而将菌体“搬运”进入细胞。

动物实验显示, $\Delta z3276$ 接种小鼠无论在日粪便排菌量,还是在排菌持续时间上均低于亲本株接种小鼠。除了作为一种重要的定殖因子, $z3276$ 还与EHEC O157:H7的运动性有关。已有研究表明,鞭毛/菌毛介导的运动对加强致病菌与宿主的相互作用、促进持续黏附与定殖发挥着重要作用^[21-24],这就进一步佐证了 $z3276$ 编码蛋白与EHEC O157:H7致病密切相关。

本研究表明, $z3276$ 基因编码的多功能结构很可能能够促进EHEC O157:H7对宿主的定殖,并且可以提高该病原菌在环境中的存活能力。

参 考 文 献

- [1] Munns KD, Zaheer R, Xu Y, et al. Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151673
- [2] Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(4): 465-487
- [3] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 123-140
- [4] Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(Suppl 1): 3-30
- [5] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(4): 822-880
- [6] Low AS, Holden N, Rosser T, et al. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(6): 1033-1047
- [7] Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(11): 3519-3529
- [8] Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, et al. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12127
- [9] Mazariego-Espinosa K, Cruz A, Ledesma MA, et al. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(11): 2791-2800
- [10] Durno C, Soni R, Sherman P. Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type 1 fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49[J]. Clinical and Investigative Medicine, 1989, 12(3): 194-200
- [11] Li BG, Koch WH, Cebula TA. Detection and characterization of the *fimA* gene of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Molecular and Cellular Probes, 1997, 11(6): 397-406
- [12] Ravan H, Amandadi M. Analysis of *yeh* fimbrial gene cluster in *Escherichia coli* O157:H7 in order to find a genetic marker for this serotype[J]. Current Microbiology, 2015, 71(2): 274-282
- [13] Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(6): 2575-2583
- [14] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 285-293
- [15] Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(5): 729-745
- [16] Sjogren R, Neill R, Rachmilewitz D, et al. Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits[J]. Gastroenterology, 1994, 106(2): 306-317
- [17] Brunder W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(4): 767-778
- [18] Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, et al. EspP, a serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5[J]. Infection Immunity, 2010, 78(10): 4294-4301
- [19] Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(12): 2803-2812
- [20] Göçer H, Emir D, Önger ME, et al. Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation: an *in vitro* study[J]. Eklemler Hastaliklan ve Cerrahisi, 2017, 28(1): 13-18
- [21] La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model[J]. Epidemiology and Infection, 2000, 124(3): 351-363
- [22] Mahajan A, Currie CG, Mackie S, et al. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(1): 121-137
- [23] Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1269-1273
- [24] Allen-Vercos E, Woodward MJ. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype enteritidis to chick gut explant[J]. Journal of Medical Microbiology, 1999, 48(8): 771-780