

金黄色葡萄球菌中 *PVL* 基因与噬菌体 DNA 的同源性\*邹 丹<sup>1</sup> 金子淳<sup>2</sup> 神尾好是<sup>2</sup>(东南大学基础医学院病原生物学与免疫学 南京 210009)<sup>1</sup>(东北大学农学部应用微生物学系 日本仙台 981-8555)<sup>2</sup>

**摘要:** 为了探讨金黄色葡萄球菌 *PVL* 基因与噬菌体的相关性, 从 4 株含有 *PVL* 基因的菌株中分离出 DNA, 用 *Hind*Ⅲ 或 *Eco*R I 酶切后, 分别与 *PVL* 和 *LukM-lukF-PV* 探针进行 Southern 印迹杂交, 以及对含有 *PVL* 基因及其下游区域的片段克隆、测序和同源性分析。结果表明 3 株菌的 *PVL* 基因及其下游区域的序列与 V8 菌株噬菌体  $\phi$ PVL 的 *PVL* 基因及其下游噬菌体 att site 的序列一致。另一菌株的 *LukM-lukF-PV* 基因与  $\phi$ PVL 的 *PVL* 基因有 78% 的同源性, 并且在 *LukM-lukF-PV* 基因的下游区域发现与金黄色葡萄球菌噬菌体  $\phi$ 11 整合位点有 98% 同源性的序列, 根据 *PVL* 基因存在于噬菌体的基因组上, 推测可通过噬菌体转导在金黄色葡萄球菌中传播。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌, 噬菌体, *PVL* 基因, *LukM-lukF-PV* 基因, att site

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0060-05

# HOMOLOGY OF BACTERIOPHAGE DNA AND PVL GENES IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

ZOU Dan<sup>1</sup> KANEKO Jun<sup>2</sup> KAMIO Yoshiyuki<sup>2</sup>

(Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009)<sup>1</sup>

(Department of Applied Microbiology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan)<sup>2</sup>

**Abstract:** This paper studies the correlativity of *PVL* genes and bacteriophages DNA in *Staphylococcus aureus*, chromosomal DNA from four strains containing *PVL* genes is digested by *Hind*Ⅲ or *Eco*R I, hybridized with *PVL* or *LukM-lukF-PV* probe. The segments including *PVL* genes and their downstream regions are cloned, sequenced and analyzed. They showed that the sequences of *PVL* genes and their downstream regions from the three strains are identical to that of *PVL* genes and att site in immediately downstream of *PVL* genes from  $\phi$ PVL. *LukM-lukF-PV* genes from the other strain have 78% homology to *PVL* genes, and in downstream of *LukM-lukF-PV* genes, a sequence that has 98% homology to the  $\phi$ 11 phage att site of *S. aureus* is found. According to the result that *PVL* genes are existed on the genome of bacteriophages, the genes transferred by bacteriophages are able to spread among *S. aureus* strains.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Bacteriophage, *PVL* genes, *LukM-lukF-PV* genes, att site

金黄色葡萄球菌能产生多种与化脓性感染相关的外毒素和酶, 其中杀白细胞素 (Panton-Valentine Leukocidin, PVL) 就是其产生的重要的外毒素之一。该毒素特异地吸附并作用于白细胞, 改变白细胞膜的通透性, 造成大量白细胞的损伤, 丧失其吞噬细

\* 国家教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 (No.6823001002)

东南大学新进博士启动基金资助项目 (No.9223002082)

日本文部省基金资助项目 (No.11460034, 11694191 和 11760050)

收稿日期: 2003-02-18, 修回日期: 2003-07-25

菌的能力。同时,由于白细胞的破坏,处理抗原和呈递抗原信息的能力下降,损害了机体的防御屏障和免疫应答,从而不能建立有效的特异性免疫。

PVL 毒素由两种蛋白质组分构成: LukS-PV (or LukM) 组分和 LukF-PV 组分,两种组分各具有不同的生物活性和功能<sup>[1]</sup>。1995 年法国科学家,从 V8 菌株中,克隆了 PVL 基因,并对该基因在临床标本中的分布进行了探讨。结果发现, PVL 基因存在于少数金黄色葡萄球菌中<sup>[2]</sup>,即该基因存在着偏在性,这种偏在性导致了我们对该基因在细菌染色体上的遗传学图谱进一步研究。我们从临床分离的 300 株金黄色葡萄球菌中,通过 PCR 扩增检测到 4 株含有 PVL 基因的菌株: P83、IID975、1069 和 CN4696,而且这些菌株中的 PVL 基因容易丢失。对 P83 的 PVL (LukM and LukF-PV, LukM-lukF-PV) 基因的上下游区域序列分析发现,该基因上游编码的 251 氨基酸开放读框序列的 N 末端 99 个氨基酸,与金黄色葡萄球菌噬菌体  $\phi 13$  碱性酶的上游有 34% 同源性,该基因的下游与  $\phi 13$  碱性酶的下游和  $\phi 11$  肽聚糖水解酶的下游也有很高的同源性<sup>[3]</sup>,是否该基因的存在与噬菌体有关,我们对含有 PVL 基因的 4 个菌株和 V8 菌株进行了噬菌体诱导。经丝裂霉素 C 诱导后,仅从 V8 菌株中获得含有 PVL 基因的噬菌体  $\phi$ PVL<sup>[4]</sup>。本文将以 V8 菌株中  $\phi$ PVL 基因组为模式,对 P83、IID975、1069 和 CN4696 4 株菌中的 PVL 基因与噬菌体的关系进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** IID975, 1069, CN4696 和 P83, 4 株金黄色葡萄球菌由日本宫城县卫生防疫站提供的 300 株临床分离、经 PCR 验证含有 PVL 基因的菌株, *E. coli* DH5 $\alpha$  由 TakaRa 公司提供。质粒载体 pUC118 和载体 Charomid 9-36 购自日本基因公司。pMWK1 是携带有金黄色葡萄球菌 P83 的 LukM-lukF-PV 基因的质粒<sup>[5]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 金黄色葡萄球菌的培养基为心脑浸液,大肠杆菌为 LB 培养基。

**1.1.3 主要试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 平端酶、T4 多核苷酸碱性酶、小牛肠碱性磷酸酶、ExTaq PCR 试剂盒和 RNA 酶、Achromopeptidase、蛋白酶 K 等分别购自 TakaRa 公司和 Sigma 公司。Charomid 9-36 的 MaxPlax Packaging Extract 由美国 Stratagene 公司提供。杂交用的 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜、DNA 标记和检测试剂盒购自美国 Amersham LIFE SCIENCE 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的制备:** 金黄色葡萄球菌接种于 100mL 心脑浸液培养液中,震荡过夜培养后,离心收集细胞。将收集的细胞悬浮于 20mL TE 缓冲液 (10mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1mol/L EDTA, pH 8.0) 中,加入 0.6mL 20mg/mL Achromopeptidase 37℃ 反应 1h 溶解细胞后,再加入 0.5 $\mu$ g/mL RNA 酶、1mL 20% SDS 和 0.05mL 20mg/mL 蛋白酶 K 37℃ 作用 1h。用等体积的苯酚:氯仿抽提两次后,用等体积的异丙醇沉淀染色体 DNA,再用 70% 的乙醇洗涤一次后,自然干燥。将干燥的染色体 DNA 溶解于 1mL TE 缓冲液,4℃ 保存。

**1.2.2 PCR 扩增:** 以细菌染色体 DNA 为模板,以日清纺织公司合成的下列序列为引物做 PCR。

PVL-F: 5'ATGCAAGGTTTTATCAA 3'

PVL-R: 5'ATCAACTTCATAAATTGATG 3'

att-R: 5'CATATCATCATAATGAGATGGT 3'

PCR 条件: 94℃ 5min 变性后, 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 2min, 循环 30 圈。

**1.2.3 Southern 印迹杂交:** *Hind* III 或 *Eco* R I 酶切的染色体 DNA, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后转印到 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜上。筛选克隆菌株的斑点印记杂交是将平板上的菌落转印到 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜上, 培养到肉眼可见的小菌落后, 尼龙膜浸润于 0.5mol/L NaOH 5min 破坏菌细胞, 用 5 × SSC (0.075 mol/L Na<sub>3</sub>citrate, 0.75 mol/L NaCl) 洗涤后再用于杂交。*PVL* 探针是以 V8 染色体 DNA 为模板, *PVL*-F 和 *PVL*-R 为引物, 通过 PCR 扩增得到 1.8 kb *PVL* 基因片段, 经标记而获得。*LukM-lukF-PV* 探针是质粒 pMWK1 经 *Cla* I-*Eco*T22 I 酶切后, 获得 1.4 kb 含有 *LukM-lukF-PV* 基因的片段, 经标记而得到 (图 1)。杂交条件为 50℃ 10h, 洗涤条件为 2 × SSC, 0.1% (w/v) SDS, 室温 15min 和 1 × SSC, 0.1% (w/v) SDS, 60℃ 15min 各一次。检测方法按试剂盒说明书进行。杂交后的尼龙膜, 用煮沸的 0.1% (w/v) SDS 洗涤 2h, 除去探针后, 可再重复使用。

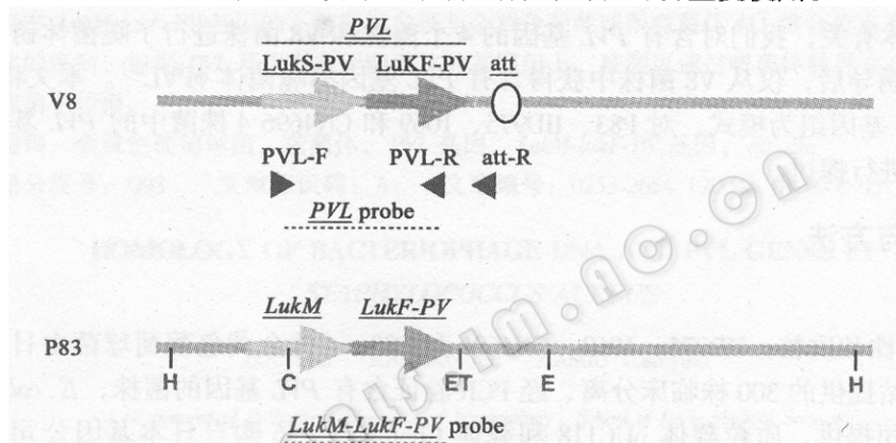


图 1 V8 和 P83 菌株 *PVL* 基因上下游区域遗传学模式图

H *Hind* III, C *Cla* I, ET *Eco*T22 I, E *Eco* R I

**1.2.4 核苷酸测序:** 以载有克隆片段的质粒 pUC118 为模板, 应用生物系统公司提供的 Big Dye Terminator Cycle Sequencing and FS kit 试剂, 用 Perkin Ermer Biosystems 公司提供的 ABI PRISM 377 Auto Sequencer 仪器测序。

**1.2.5 核苷酸同源性检索:** 核苷酸序列与 EMBL/GenBank/DDBJ nucleotide sequence databases 进行同源性检索。

## 2 结果

### 2.1 Southern 印迹杂交比较 *PVL* 基因及其上下游区域

提取 4 个含有 *PVL* 基因 P83、IID975、1069 和 CN4696 菌株的染色体 DNA, 用 *Hind* III 或 *Eco* R I 酶切, 转印到尼龙膜上。尼龙膜先后与 *PVL* 和 *LukM-lukF-PV* 探针进行杂交, 杂交图形与 V8 菌株相比较。杂交结果表明, 3 个菌株, IID975、1069、CN4696, 与 V8 菌株杂交带的清晰度相同, 其中 IID975 和 CN4696 菌株与 V8 菌株的杂交带型相同, 分别为 *Hind* III 的 7kb 和 *Eco* R I 的 16kb, 而另一株 P83, 杂交片段的大小和清晰度与以上 3 株不同, 分别为 *Hind* III 的 8.4kb 和 *Eco* R I 的 13kb。根据 V8 菌株的 *PVL* 基因上下游区域的内切酶谱, *Hind* III 和 *Eco* R I 酶切位点分别位于 *PVL* 基因的上游和下游区域。

因此，可推测 IID975、1069 和 CN4696 3 个菌株的 *PVL* 基因序列与 V8 菌株的 *PVL* 基因序列同源性很高，并且 IID975 和 CN4696 菌株 *PVL* 基因的上下游区域与 V8 菌株相应的区域有相似性，而 P83 的 *LukM-lukF-PV* 基因序列与这些菌株中的 *PVL* 基因序列有所不同，同源性较小（图 2）。

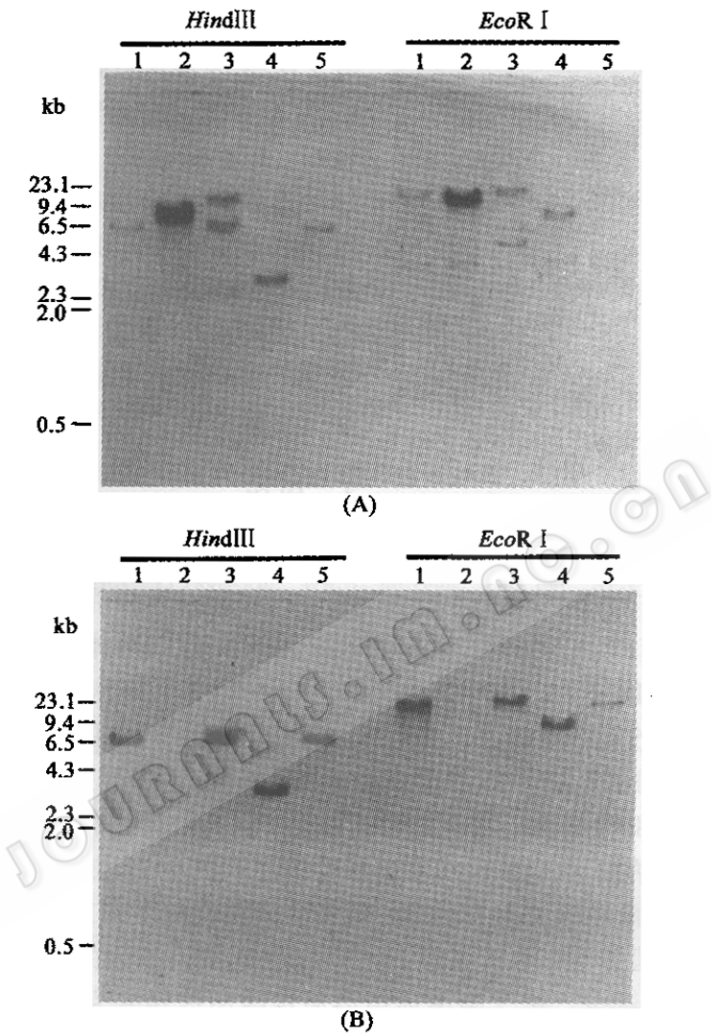


图 2 用 *PVL* 和 *LukM-lukF-PV* 探针的 Southern 印迹杂交分析  
A 金黄色葡萄球菌的 DNA 经 *Hind*III 或 *Eco*R I 酶切后与 *PVL* 探针的杂交图形，

B 金黄色葡萄球菌的 DNA 经 *Hind*III 或 *Eco*R I 酶切后与 *LukM-lukF-PV* 探针的杂交图形

1 V8, 2 P83, 3 IID975, 4 1069, 5 CN4696,  $\lambda$ DNA/*Hind*III 为分子量标记

## 2.2 *PVL* 基因及其下游区域克隆

以 V8、P83、IID975、1069 和 CN4696 的基因组为模板，用已知 V8 菌株的 *PVL*-F 和 *PVL*-R、*PVL*-F 和其下流区域的噬菌体整合位点（attachment site, att site）序列 att-R 为引物，分别对 *PVL* 基因和含有 *PVL* 基因及其下游区域的序列进行 PCR 扩增。3 个菌株，IID975、1069 和 CN4696，分别获得与 V8 菌株相同的 1.8kb *PVL* 基因和含有 *PVL* 基因及其下游 att site 序列 2-kb 的两个片段，而 P83 菌株只得到 1.8kb *LukM-lukF-PV* 基因一个

扩增产物(图3)。P83菌株 *LukM-lukF-PV* 基因下游区域的序列,以 Charomid 为载体,从 P83 染色体中提取含有 *LukM-lukF-PV* 基因及其下游区域的 *Hind* III 8.4kb 杂交片段克隆,并对克隆菌株用斑点印迹杂交方法进行筛选。

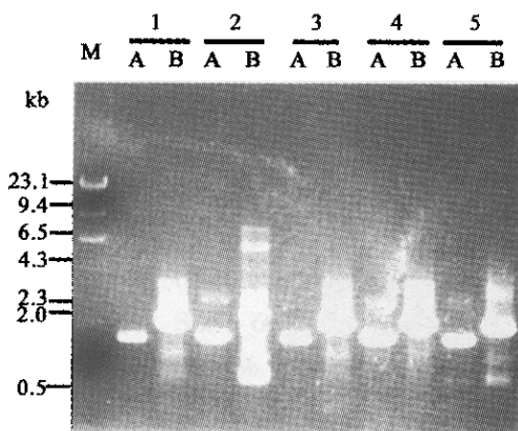


图3 *PVL* 基因及其下游区域的 PCR 扩增

1 V8, 2 P83, 3 IID975, 4 1069, 5 CN4696

$\lambda$ DNA/*Hind* III 为分子量标记

A 用 *PVL-F* 和 *PVL-R* 为引物的 *PVL* 基因 PCR 扩增产物,

B 用 *PVL-F* 和 *att-R* 为引物的 *PVL* 和其下游区域的基因 PCR 扩增产物

染色体上分离所特有的序列。IID975、1069 和 CN4696 3 个菌株中的 *PVL* 基因及下游区域的序列与 V8 菌株的该区域的序列相一致,这表明 3 个菌株中不仅存在 *PVL* 基因,而且该基因也存在于噬菌体  $\phi$ PVL 的基因组上。P83 菌株产生的 *LukM-lukF-PV* 毒素,虽然生物活性与 V8 的 *PVL* 毒素属于同一类型的毒素,但杂交图谱和测序结果都表明两个基因的不同,两个基因的下游也未发现有同源性的序列。在 *LukM-lukF-PV* 基因的下游 2kb 区域与金黄色葡萄球菌噬菌体  $\phi$ 11 *att* site 有 99% 同源性的序列,由此可推断 *LukM-lukF-PV* 基因是存在于噬菌体  $\phi$ 11 的基因组上,并且也证实该基因的 *att* site 被 1,070bp 的插入片段 ISSA1 分为两部分。由于噬菌体由溶源性噬菌体转变为毒性噬菌体的前提条件是 *att* site 完整性,因此,在 P83 菌株中,*att* site 的破坏是导致携带有 *LukM-lukF-PV* 毒素基因的噬菌体不被诱导的主要原因,即 *LukM-lukF-PV* 基因存在于不被诱导的溶源性噬菌体  $\phi$ 11 上。P83、IID975、1069 和 CN4696 菌株研究中也证实 *PVL* 基因与质粒无关,以上结果表明,金黄色葡萄球菌的 *PVL* 基因,存在于噬菌体基因组上,并推测可通过噬菌体转导在金黄色葡萄球菌中传播。

## 2.3 测序及同源性检索

将 P83、IID975、1069 和 CN4696 菌株含有 *PVL* 基因及其下游区域的序列 8.4kb 和 2-Kb 片段克隆,进行测序和同源性检索。结果表明, IID975、1069 和 CN4696 菌株有 *PVL* 基因及其下游区域与 V8 菌株相应区域的序列有 99% 的同源性。P83 菌株的 *LukM-lukF-PV* 基因与 V8 菌株的 *PVL* 基因有 78% 的同源性;而 *LukM-lukF-PV* 基因的下游区域未发现与 V8 菌株的相应区域有同源性的序列,与印迹杂交结果一致。

## 3 讨论

V8 菌株的 *PVL* 基因存在于噬菌体  $\phi$ PVL 上, *PVL* 基因的相邻下游存在着  $\phi$ PVL 的 *att* site, *att* site 是噬菌体与细菌染色体整合和从

## 参考文献

- [1] Woodin A M. Biochem J, 1960, 75 (2): 158-165.
- [2] Prevost G, Cribier B, Couppie P, et al. Infect Immun, 1995, 63 (10): 4121 ~ 4129.
- [3] Borchardt S A, Babwah A V, Jayaswal R K. Gene, 1993, 137 (2): 253 ~ 258.
- [4] Kaneko J, Muramoto K, Narita S, et al. Gene, 1998, 215 (1): 57 ~ 67.
- [5] Choerit W, Kaneko J, Muramoto K, et al. FEBS letters, 1995, 357 (3): 260 ~ 264.