

禽源大肠杆菌耶尔森氏菌强毒力岛核心基因的检测 及其 *irp2* 和 *int* 基因同源性

冀辉 邵长胜 涂健 黄博言 邵颖 周秀红 汪雪雁 祁克宗*

(安徽农业大学 安徽 合肥 230036)

摘要: 【目的】为了提高禽源大肠杆菌中耶尔森氏菌强毒力岛(HPI)的检测效率,了解高分子量铁调节蛋白 2 基因(*irp2*)和整合酶基因(*int*)在不同株禽源 HPI⁺大肠杆菌间的同源性,进一步揭示禽源大肠杆菌 HPI 的转移规律。【方法】利用 L₁₆(4⁴)正交试验设计,建立针对 HPI 核心基因 *irp2* 和 *fyuA* 的双重 PCR,运用双重 PCR 方法检测禽源大肠杆菌临床分离株,并对检出的 7 株 HPI 阳性(HPI⁺)大肠杆菌进行 *irp2* 和 *int* 基因测序及同源性分析,同时结合这 7 株大肠杆菌的 ERIC-PCR 分析结果,对比分析 *int* 基因的分布特点。【结果】结果显示,新建立的双重 PCR 能特异性扩增出 HPI 核心基因;ERIC-PCR 分析显示,HPI⁺大肠杆菌间差异均大于 5%;HPI⁺大肠杆菌 *irp2* 基因高度保守(同源性大于 99%),而 *int* 基因虽然都位于 *asn*-tRNA 位点,但基因序列在部分菌株间存在较大差异。【结论】建立了一种可以用于 HPI 的流行病学调查和实验室诊断的双重 PCR 方法,并推测区域外同源重组可能是 HPI 基因在大肠杆菌间水平转移的主要方式。

关键词: 禽源大肠杆菌,强毒力岛,高分子量铁调节蛋白 2 基因,整合酶基因,同源性分析

Core genes of high-pathogenicity island in avian *Escherichia coli* isolates

Ji Hui SHAO Chang-Sheng TU Jian HUANG Bo-Yan SHAO Ying
ZHOU Xiu-Hong WANG Xue-Yan QI Ke-Zong*

(Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] In order to improve the detection efficiency of high-pathogenicity island (HPI) in avian *Escherichia coli* isolates, investigate the homology of its *int* genes and *irp2* genes, and finally reveal the transfer regularity of HPI in avian *E. coli*. [Methods] Orthogonal experimental design was used to optimize multiple-PCR amplification system for *irp2* and *fyuA*, which belong to the core genes of HPI, and avian *E. coli* clinical isolates were detected with this method. The genetic homologies of *irp2* and *int* genes amplified from seven detected HPI-positive *E. coli* strains were analyzed. The distribution characteristic of *int* was analyzed comparing with the ERIC-PCR result of the seven HPI-positive *E. coli* strains. [Results] The core genes of HPI were specifically amplified by the multiple-PCR method. ERIC-PCR analysis shows that the degree of difference between the HPI-positive strains was higher than 5%. A great conservation (higher than 99% homology) of *irp2* genes in HPI-positive *E. coli* strains was found, and all of the *int* genes were located in the vicinity of *asn*-tRNA, but not all of them were highly conserved. [Conclusion] We have established a multiple-PCR method which can be applied to the laboratory diagnosis test and epidemiological investigation of HPI, and suppose that the way of HPI horizontal transfer may be mainly based on the homologous recombination in the HPI-adjacent sequences.

Keywords: Avian *Escherichia coli*, High-pathogenicity island, *Irp2*, *Int*, Homology analysis

耶尔森氏菌强毒力岛(HPI)^[1]最早发现于耶尔森菌属, 因与该属菌的小鼠致死表型密切相关而得名。HPI 约 102 kb, 由许多功能相关的基因组成, 核心基因由 *irp2*、*irp1*、*irp3*、*irp4*、*irp5* 和 *fyuA* 组成, 其中 *irp2* 编码的高分子量铁调节蛋白 2 (HMWP2)与耶尔森菌的铁摄取能力有关, 并且比较保守, 可作为 HPI 的检测标志^[2]; 而 *fyuA* 所编码的外膜蛋白 FyuA 对大肠杆菌的毒力起着关键作用, 有时存在缺失的情况^[3], 因此同时检测 *irp2* 和 *fyuA* 基因对研究 HPI 有着重要的意义。

ERIC 序列 (Enterobacterial repetitive inter-genic consensus)是在肠道细菌中普遍存在的一段长为 126 bp 的保守性反向重复序列, ERIC-PCR 分型技术是以散布在肠杆菌科整个基因组中的 ERIC 序列为模板进行 PCR 反应, 扩增出多态性 DNA 图谱的一种方法, 通过该技术可以对大肠杆菌进行基因型相似性分析^[4], 为研究大肠杆菌基因相关性提供基础。目前, 在不同来源和血清型的大肠杆菌(*Escherichia coli*)中均发现了 HPI 毒力岛^[5], 说明 HPI 可在大肠杆菌之间水平传播。

Antonenka 等^[6]研究表明, HPI 经常是通过整合酶基因(*int*)编码的整合酶插入到大肠杆菌基因组的 *asn*-tRNA 位点; Schubert 等^[7]发现大肠杆菌中 HPI 可借助 F 质粒以同源重组方式转移, 但关于 HPI 在大肠杆菌, 特别是禽大肠杆菌中的主要转移方式未见报道。因此, 设计针对 *asn*-tRNA 和 *int* 基因的引物, 既可确定 HPI 是否整合到 *asn*-tRNA 位点, 也可通过分析 *int* 的分布特点揭示 HPI 在基因组中的整合方式。

本研究通过正交实验, 建立针对 HPI 核心基因 *irp2* 和 *fyuA* 的双重 PCR 检测方法, 并用于禽大肠杆菌临床分离株的检测, 以期提高 HPI 的临床检测效率; 其次聚类分析检出的 HPI⁺大肠杆菌 *irp2* 和 *int* 基因序列及菌株 ERIC-PCR 分型结果, 比较 *irp2*、*int* 及菌株分型间聚类结果的差异性, 为揭示 HPI 在大肠杆菌中的主要转移方式提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验室临床分离并保存的 8 株禽源大肠杆菌(标记为: AE-1-AE-8 号株)。

1.2 试剂

基因组抽提试剂盒购于 AxyPrep 公司; 胶回收试剂盒、琼脂糖、LB 液体培养基、5×TBE 缓冲液等均购自上海生工生物工程技术有限公司; PCR Mix、DNA Marker 购于大连宝生物公司。

1.3 引物合成

根据文献合成 4 对引物分别用于 HPI *irp2*、*fyuA* 基因、*int* 基因^[8]及 ERIC-PCR 基因^[4]的扩增, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

1.4 菌体培养与基因组提取

用接种环在无菌条件下分别挑取大肠杆菌菌

表 1 PCR 反应所用引物

Table 1	Primers used for PCR amplifications
引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>irp2</i> F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC
<i>irp2</i> R	AACTCCTGATACAGGTGGC
<i>fyuA</i> F	GCTTTATCCTCTGGCCTT
<i>fyuA</i> R	GGCATATTGACGATTAACG
<i>int</i> F	GAACGGCGGACTGTTAAT
<i>int</i> R	ATCGCTTTGCGGGCTTCTAGG
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

液, 划线接种于 LB 琼脂平板培养基上, 37 °C 培养 12 h, 挑取单菌落接种到 LB 液体培养基, 37 °C 培养至 10⁸–10⁹ CFU/mL。分别取纯培养物按 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA, –20 °C 保存, 备用。

1.5 HPI 核心基因 *irp2* 和 *fyuA* 双重 PCR 方法建立及禽大肠杆菌临床分离株的检测

1.5.1 正交实验建立 HPI 双重 PCR 检测方法: 为了确定 PCR 反应中 4 个因素(模板浓度、退火温度及 2 对引物浓度)的最佳水平, 采用 L₁₆(4⁴) 正交设计在 4 个水平上进行实验, 引物 (10 μmol/mL)上、下游均等体积添加。PCR 扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 对应退火温度 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增体系为: 2×PCR Mix 12.5 μL, 两对上、下游引物及模板 DNA (157 mg/L)量按表 2 添加, 补水至 25 μL。L₁₆(4⁴)设计方案见表 2。PCR 产物上样 5 μL 于琼脂糖凝胶中电泳。

1.5.2 禽大肠杆菌临床分离株 HPI 的单、双重 PCR 检测: 分别对 8 株临床分离株基因组 DNA 进行 *irp2* 和 *fyuA* 基因的普通 PCR 扩增, 然后用优化的双重 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增, 检测 8 株禽大肠杆菌临床分离株的 HPI 阳性率, 同时验证双重 PCR 的特异性及稳定性。

表 2 双重 PCR 正交试验 $L_{16}(4^4)$ 因素水平表 Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment in multiple-PCR				
处理 Constitutions	引物 <i>irp2</i> Primers of <i>irp2</i> (μL)	引物 <i>fyuA</i> Primers of <i>fyuA</i> (μL)	模板浓度 Template concentration (μL)	退火温度 Annealing temperature (°C)
1	0.5	0.5	0.5	52.0
2	0.5	1.0	1.0	54.5
3	0.5	1.5	1.5	57.0
4	0.5	2.0	2.0	59.5
5	1.0	0.5	1.0	57.0
6	1.0	1.0	0.5	59.5
7	1.0	1.5	2.0	52.0
8	1.0	2.0	1.5	54.5
9	1.5	0.5	1.5	59.5
10	1.5	1.0	2.0	57.0
11	1.5	1.5	0.5	54.5
12	1.5	2.0	1.0	52.0
13	2.0	0.5	2.0	54.5
14	2.0	1.0	1.5	52.0
15	2.0	1.5	1.0	59.0
16	2.0	2.0	0.5	57.0

1.6 HPI⁺ 禽大肠杆菌临床分离株的 ERIC-PCR 检测及相关性分析

ERIC-PCR 反应体系: 2×Mix (TaKaRa) 12.5 μL, 引物 ERIC1 和 ERIC2 各 10 pmol, 模板 DNA 1 μL, 最后用灭菌双蒸水补充至 25 μL。反应参数: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 40 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定反应产物, 电泳结果在紫外分析仪上拍照。利用该 PCR 扩增体系, 对 7 株 HPI⁺ 禽大肠杆菌进行 ERIC-PCR 分型分析, 每组试验重复 3 次, 对多态性和重复性较好的扩增指纹进行分析, 将相同指纹图谱的分离株归为同一分子型别。对于不同菌株相同引物扩增出的条带, 在同一电泳迁移位置上有扩增条带的记为“1”; 没有出现扩增条带的记为“0”。用电泳图象分析软件(Gel Image System, Version 4.00)自动生成矩阵图。采用非加权对数算术平均法(UPGMA), 利用

NTSYS pc2.10 软件构建聚类树状图, 进行聚类分析。

1.7 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株中 *irp2* 和 *int* 基因的序列测定及相关性分析

分别 PCR 扩增 7 株 HPI⁺禽大肠杆菌的 *irp2* 和 *int*, 胶回收纯化后, 将回收的 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。利用 DNASTAR 5.01 将测得序列与 GenBank 中已发表的 *Escherichia coli* 042、*Escherichia coli* APEC O1、*Escherichia coli* NA114、*Yersinia pestis* Antiqua、*Yersinia pestis* biovar *Microtus* str. 910、*Yersinia pestis* CO92、*Yersinia pestis* D182038 (登录号分别为: FN554766.1、CP000468.1、CP002797.2、CP000308.1、AE017042.1、AL590842.1、CP001589.1) 7 株菌相应基因序列按照 J. Hein 法进行序列比对, 构建进化树。

2 结果与分析

2.1 HPI 核心基因 *irp2* 和 *fyuA* 双重 PCR 方法建立及禽大肠杆菌临床分离株的检测结果

2.1.1 HPI 核心基因 *irp2* 和 *fyuA* 双重 PCR 正交实验结果: 不同组合的 PCR 结果如图 1 所示, 16 个 4 因素处理组合存在明显的差异。处理组合 16、12 效果较好, 其中处理组合 16 的条件最优, 即在 25 μL 反应体系中, *irp2* 和 *fyuA* 基因上、下游引物

各 2 μL , 模板为 0.5 μL , 退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.2 禽大肠杆菌临床分离株 HPI 的单、双重 PCR 检测: 8 株分离株的 HPI 阳性率检测结果如图 2 所示。由图 2A 可知, *fyuA* 基因除 AE-2、AE-8 以外均为阳性; 由图 2B 可知, *irp2* 基因除 AE-8 以外, 其余均为阳性。由图 2C 可知, 除 AE-2、AE-8 以外, 均扩增 2 条目的片段, 而 AE-2 仅有 1 条目的条带。因此, 8 株大肠杆菌临床分离株中有

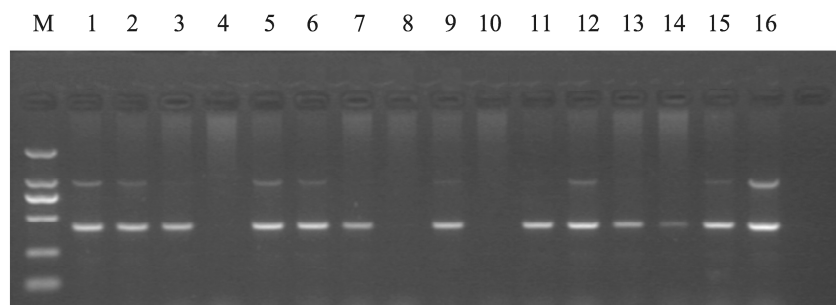


图 1 HPI 双重 PCR 结果

Fig. 1 Result of the HPI multiple PCR products

注: M: DNA 分子质量标准; 1-16: 不同处理组合的 PCR 产物。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-16: PCR products of different constitutions.

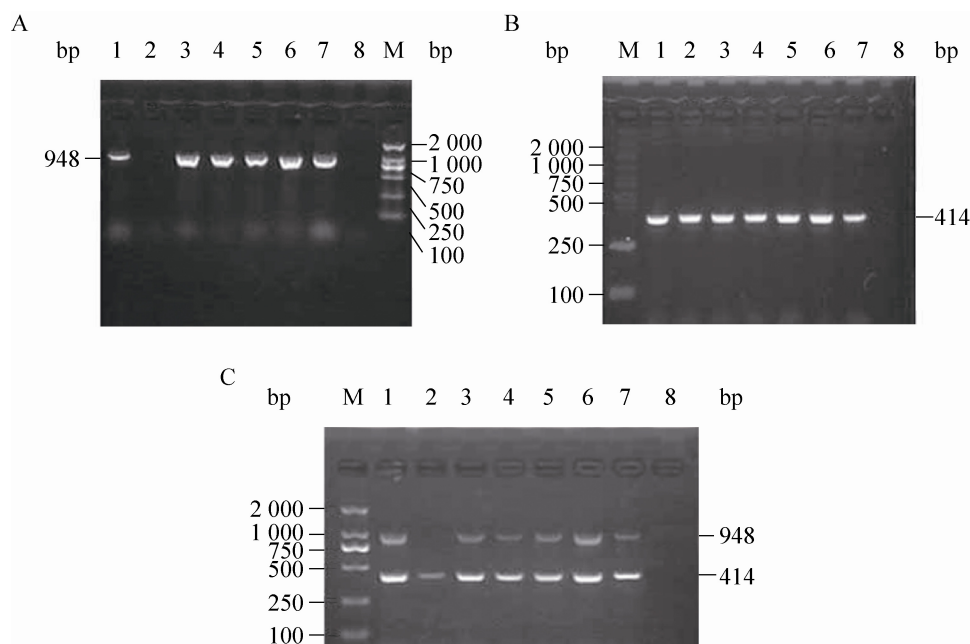


图 2 *fyuA* 基因(A)、*irp2* 基因(B)及双重(C) PCR 结果

Fig. 2 PCR products of *fyuA* gene (A), *irp2* gene (B) and multiplex (C)

注: M: DNA 分子质量标准; 1-8: PCR 模板分别为 AE-1、AE-2、AE-3、AE-4、AE-5、AE-6、AE-7 和 AE-8 的基因组 DNA。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-8: Templates of PCR are the genome DNA of AE-1, AE-2, AE-3, AE-4, AE-5, AE-6, AE-7 and AE-8 respectively.

7 株为 HPI⁺, 该多重 PCR 检测方法与普通 PCR 具有相同的特异性, 可用于 HPI *irp2* 和 *fyuA* 基因的同时检测。

2.2 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株 ERIC-PCR 相关性分析

HPI⁺株 ERIC-PCR 聚类分析结果如图 3 所示, 7 株大肠杆菌的基因型均存在差异性, 除 AE-5 和 AE-6 以外(7%), 其余菌株之间差异度均较大($\geq 16\%$), 揭示 7 株菌均为不同菌株。另外, AE-1、AE-2、AE-3、AE-4、AE-5 和 AE-6 遗传关系相对较近, 可以聚为一类, 而 AE-7 聚为另外一类, 说明 HPI 可存在于多个基因型的大肠杆菌中。

2.3 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株 *irp2* 和 *int* 基因同源性分析

用于同源性分析的 *irp2* 片段均为 388 bp; *int* 片段除 AE-5 为 938 bp 外, 其余均为 1 285 bp, 聚类结果如图 4 和图 5 所示。由图 4 可知, *irp2* 基因碱基差异数不超过 5 bp, 具有较高的同源性(大于 99%), 揭示了 *irp2* 基因的高保守性。由图 5 可知, 除 AE-5 外, *int* 基因也具有较高的同源性(大于 96%), 并均存在于 *asn*-tRNA 位点。结果显示, *irp2* 和 *fyuA* 基因总体表现出较高保守性的特点。同时, 两个基因均存在菌种间的同源性高于种

内的情况。

3 讨论

HPI 是一个编码毒力因子的基因岛,能在不同的大肠杆菌间转移,并且含有 HPI 的耶尔森菌、大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的分离株毒力要高于不含 HPI 的分离株, HPI 可能增强细菌的致病力。HPI 的主要结构基因为 *irp2*、*irp1* 和 *fyuA*、*irp1*、*irp2* 编码铁摄取相关蛋白, *fyuA* 编码鼠疫菌素受体参与鼠疫菌素的调控和转运^[9]。近年来,针对 HPI 某一种基因(如 *irp1*、*irp2*、*fyuA* 等^[10])的 PCR 检验方法已被广泛应用,但关于双重 PCR 方法同时检测 HPI 的两个基因的报道较少。本研究建立的双重 PCR 技术可以同时检测 HPI 中 *irp2* 和 *fyuA* 两个基因,不仅能检测 HPI 的有无,同时可以检测 HPI 的完整性,对研究细菌的致病性有重要意义,也是食源性致病菌快速检测技术的重要开发方向。本研究通过 4 因素 4 水平的正交试验,研究引物浓度、模板浓度及退火温度对双重 PCR 的影响,具有综合可比性,克服了单因素试验的缺陷,是筛选最优水平组合的较理想选择,为双重 PCR 方法的建立及优化提供了前提条件。

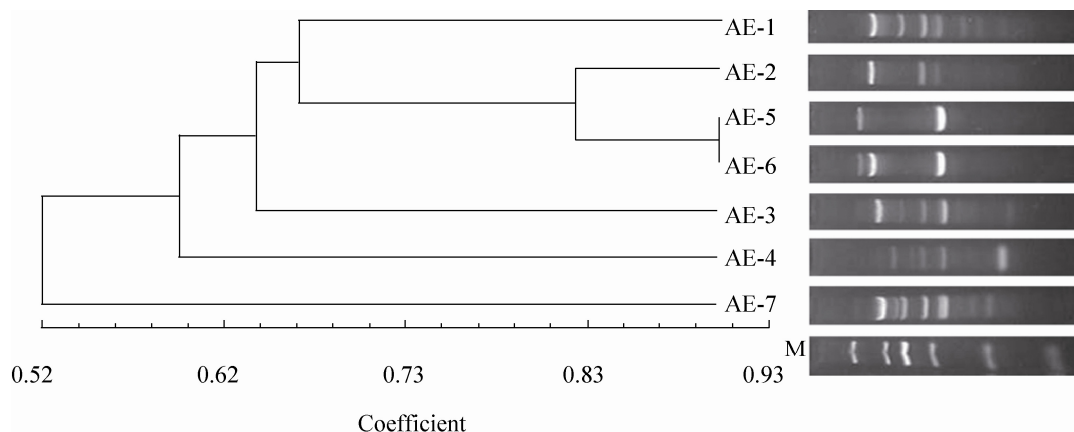
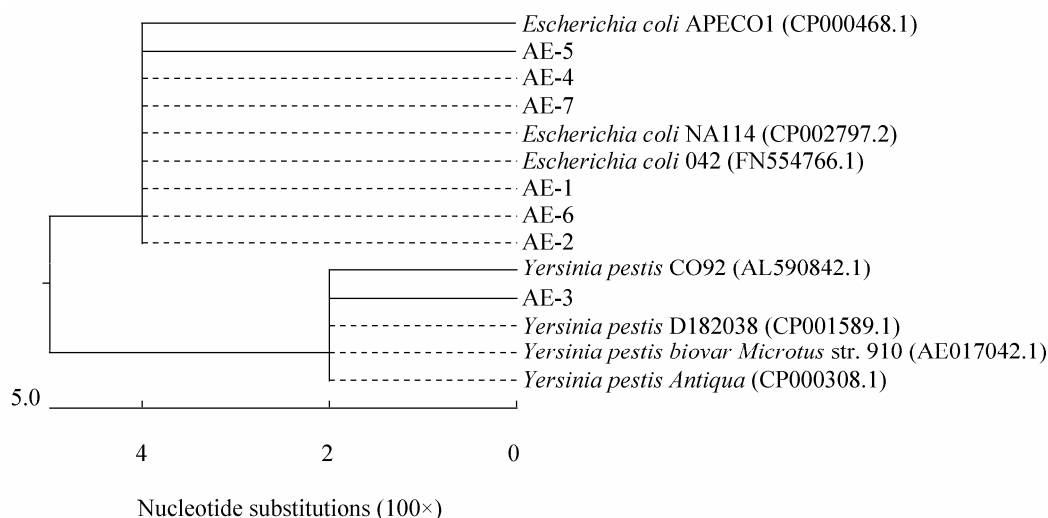


图 3 7 株禽源 HPI⁺大肠杆菌 ERIC-PCR 聚类分析图

Fig. 3 The dendrogram of seven HPI-positive *E. coli* isolates by ERIC-PCR

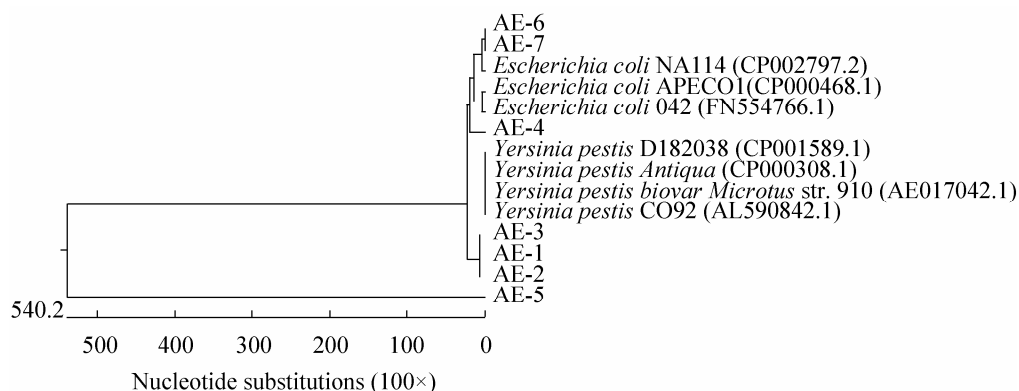
注: M: DNA 分子质量标准; AE-1-AE-7 为 7 株 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株; 刻度表示遗传距离。

Note: M: DL2 000 DNA marker; AE-1–AE-7 are seven HPI-positive clinical *E. coli* isolates. Scales denote genetic distances.

图 4 *irp2* 基因聚类分析图Fig. 4 Clustering analysis chart of *irp2* gene

注: AE-1–AE-7 为 7 株 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株; 其余为 GenBank 中登录数据, 括号内为基因的登录号; 分支长度代表遗传距离; 刻度表示差异碱基数。

Note: AE-1–AE-7 are seven HPI-positive clinical *E. coli* isolates; Others are the datas published in the GenBank, access numbers are in parenthesis. Branch lengths represent genetic distance. Scales denote numbers of different bases.

图 5 *int* 基因聚类分析图Fig. 5 Clustering analysis chart of *int* gene

注: AE-1–AE-7 为 7 株 HPI⁺禽大肠杆菌临床分离株; 其余为 GenBank 中登录数据, 括号内为基因的登录号; 分支长度代表遗传距离; 刻度表示差异碱基数。

Note: AE-1–AE-7 are seven HPI-positive clinical *E. coli* isolates; Others are the datas published in the GenBank, access numbers are in parenthesis. Branch lengths represent genetic distance. Scales denote numbers of different bases.

ERIC 序列分布于整个基因组中, 具有极强的保守性, 用 ERIC-PCR 得到的 DNA 条带特征能反映出细菌整个基因组结构的差异, 能区别包含有 ERIC 这些重复序列的不同细菌种和株, 因此具有很强的鉴别种乃至菌株的能力^[11]。另外, 由

于 ERIC-PCR 方法具有简易、快速、灵敏和可重复性等特点, 使得它在细菌分类、分子微生物生态学研究有着广阔的应用前景, 对发现新的菌株以及对已知菌株的进一步分析具有重要的现实意义。目前该方法已在多种致病菌的鉴别和诊

断中获得应用。本研究利用该技术对 7 株临床分离的 HPI⁺大肠杆菌进行分子分型, 并对其分子分型相关性进行分析, 发现 7 株 HPI⁺大肠杆菌的基因型存在明显的差异性, 说明 HPI 在大肠杆菌中的分布并无明显的基因型偏好性。

对 7 株大肠杆菌 *irp2* 和 *int* 的序列进行测定并与 GenBank 中的登录序列比对发现, *irp2* 在不同大肠杆菌和耶尔森菌中均有非常高的保守性, 这与 Petermann 等^[12]的研究结果相似。*irp2* 为 HPI 的核心基因, 其高度保守性也为 HPI 的功能发挥提供基础。*int* 是 HPI 中位于 *asn*-tRNA 后一段可编码整合酶的基因, 也是 HPI 的整合位点^[13], 因此研究该基因可以为研究 HPI 的转移机制提供基础。本研究通过对 *irp2* 及 *int* 的序列比对和基因组 ERIC-PCR 分型发现, 不同菌株之间基因型相关性并不与 *int* 基因相关性成对应关系, 但不同菌株 *int* 基因间相关性与 *irp2* 基因间相关性比较接近, 且 *int* 基因在不同菌种间的保守性比较高, 提示在大肠杆菌中 HPI 可能并不主要以在 *asn*-tRNA 位点整合的方式发生水平转移, 而是以一种在整个 HPI 以外区域同源重组的方式进行水平转移^[7,14]。但 HPI 的具体转移方式及其转移影响因素有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp.[J]. 2004, 40(1): 51–55.
- [2] Koczura R, Kaznowski A. Occurrence of the yersinia high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae*[J]. Microbial Pathogenesis, 2003, 35(5): 197–202.
- [3] Hancock V, Ferrières L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infections *Escherichia coli* in human urine[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 1): 167–175.
- [4] Yang JL, Wang MS, Cheng AC, et al. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection[J]. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2008, 14(18): 2872–2876.
- [5] Zhu SY, Lu H, Wang J. Isolation of avian *Escherichia coli* and PCR detection of their F1 and HPI genes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 795–799.
- [6] Antonenka U, Nölting C, Heesemann J, et al. Independent acquisition of site-specific recombination factors by *asn* tRNA gene-targeting genomic islands[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(6): 341–352.
- [7] Schubert S, Darlu P, Clermont O, et al. Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(1): e1000257.
- [8] Cheng DR, Sun HC, Xu JS, et al. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115(4): 320–328.
- [9] Paauw A, Leverstein-van Hall MA, Verhoef J, et al. Evolution in quantum leaps: multiple combinatorial transfers of HPI and other genetic modules in Enterobacteriaceae[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8662.
- [10] 李叶芳, 白灏, 彭开松, 等. 禽致病性大肠杆菌强毒力岛摄铁功能与致病性关系的研究[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(9): 906–910.
- [11] Jurkovic D, Krizková L, Sojka M, et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 82–87.
- [12] Petermann SR, Sherwood JS, Logue CM. The yersinia high pathogenicity island is present in salmonella enterica subspecies I isolated from turkeys[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 45(2): 110–114.
- [13] Ow MC, Kushner SR. Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*[J]. Genes & Development, 2002, 16(9): 1102–1115.
- [14] Lesic B, Carniel E. Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(10): 3352–3358.