

本研究由国家自然科学基金项目(U1803109)、江苏省重点研发计划项目(BE2019304)、国家重点研发计划子项目(2018YFC1602500)资助。

This study was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (U1803109), Key research and development plan of Jiangsu province (BE2019304) and National Key R&D Program of China (2018YFC1602500).

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	V
本研究目的意义	IX
第一篇 文献综述	1
第一章 产志贺毒素大肠杆菌的研究进展	1
1 产志贺毒素大肠杆菌的发现	1
2 产志贺毒素大肠杆菌的流行病学	2
3 STEC 致病相关毒力因子	3
3.1 志贺毒素	3
3.2 紧密黏附素和肠溶血素	6
参考文献	8
第二章 噬菌体的研究进展	15
1 噬菌体种类	15
1.1 按照结构形态分类	15
1.2 按照生命周期分类	16
1.3 按遗传物质分类	17
2 噬菌体基因组	18
3 噬菌体应用	18
3.1 作为生物实验工具	18
3.2 噬菌体疗法	18
3.3 噬菌体衍生酶制剂	19
3 产志贺毒素大肠杆菌噬菌体的研究进展	20
3.1 Stx 噬菌体与 STEC	20
3.2 在食品方面的应用	21
第二篇 研究内容	27
第三章 羊源产志贺毒素大肠杆菌的毒力因子检测和强弱毒株评估	27
1 材料和方法	28
1.1 实验材料	28
1.2 STEC 亚型分型及毒力基因检测	29
1.3 体外模型 vero 细胞评估 Stx 毒性作用	29

2 结果.....	30
2.1 STEC 分型及毒力基因检测结果	30
2.2 STEC 菌株 Vero 细胞毒性和溶血活性检测结果	30
3 讨论	34
4 本章小结	35
参考文献	36
第四章 羊源产志贺毒素大肠杆菌噬菌体的分离和生物信息学分析	39
1 材料和方法	40
1.1 实验材料	40
1.2 噬菌体分离、纯化与富集	42
1.3 噬菌体 P762 基因组提取	43
1.4 P762 基因组测序	43
1.5 P762 基因组注释分析	44
1.6 41 株同属噬菌体泛基因组分析	44
1.7 41 同属噬菌体尾丝蛋白序列分析	44
2 结果	44
2.1 噬菌体的分离、纯化与富集	44
2.2 噬菌体 P762 的基因组测序结果	44
2.3 噬菌体 P762 的基因组注释结果	45
2.4 泛基因组分析结果	46
2.5 尾丝蛋白序列分析	47
3 讨论	48
4 本章小结	49
参考文献	50
第五章 噬菌体 P762 的生物学特性及体外抑菌实验	53
1 材料和方法	54
1.1 实验材料	54
1.2 噬菌体效价的测定	54
1.3 噬菌体宿主谱的测定	54
1.4 噬菌体的电镜观察	54
1.5 噬菌体最佳感染复数	55
1.6 噬菌体的温度稳定性	55
1.7 噬菌体的 pH 稳定性	55

1.8 噬菌体的一步生长曲线	55
1.9 噬菌体 P762 在生菜上的抑菌作用	55
2 结果	56
2.1 噬菌体的分离和纯化	56
2.2 噬菌体 P762 的电镜观察	57
2.3 噬菌体的宿主谱测定结果	57
2.4 噬菌体 P762 的最佳感染复数	60
2.5 噬菌体 P726 的的一步生长曲线	61
2.6 噬菌体 P762 的温度稳定性和 pH 稳定性	61
2.7 噬菌体 P762 在生菜上的抑菌作用	62
3 讨论	63
4 本章小结	64
参考文献	65
第六章 噬菌体 P762 解聚酶的研究	67
1 材料和方法	68
1.1 实验材料	68
1.2 P762 的解聚酶基因预测	68
1.3 解聚酶的二级结构预测	68
1.4 解聚酶 Dpo48 的三级结构预测	68
1.5 解聚酶 Dpo48 的表达	68
1.6 解聚酶 Dpo48 的诱导表达与纯化	69
1.7 解聚酶 Dpo48 的浓缩	69
1.8 解聚酶 Dpo48 的活性验证	69
1.9 生物被膜生成抑制实验	69
1.10 已生成生物被膜消除实验	70
2 结果	70
2.1 P762 的解聚酶基因预测结果	70
2.2 解聚酶 Dpo48 的二级结构预测	70
2.3 解聚酶 Dpo 的三级结构预测	71
2.4 Dpo48 的重组表达	72
2.5 Dpo48 的活性测定结果	72
2.6 生物被膜生成抑制实验	73
2.7 已生成生物被膜消除实验	73

3 讨论	74
4 本章小结	74
参考文献	76
全文总结	79
致 谢	81
已发表和待发表文章	83

羊源产志贺毒素大肠杆菌噬菌体 P762 的生物学特性及解聚酶的研究

摘要

产志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC), 具有致病性极强的志贺毒素, 贮藏于牛或羊的肠道内, 由牛羊粪便污染周围水源、蔬菜或在屠宰时污染了牛羊肉而造成 STEC 传播。人类由于食用了被 STEC 污染的食品而发病, 并曾造成全球各个国家多次公共卫生事件。因此, 在这种从农场到餐桌各个环节都可能面临污染的情况下, STEC 的防控成为难题。而使用抗生素防控 STEC, 一直存在争议, 即抗生素治疗使得 STEC 释放 stx 毒素会加重临床症状, 并且与当下限抗、减抗政策相悖。因此, 寻找一种覆盖全产业链、生态友好的消毒剂非常重要。而噬菌体因能够裂解细菌、不会造成环境污染的特点成为安全有效的消毒剂的候选。为了能够筛选到具有防控 STEC 潜力的噬菌体, 本研究从两方面入手: 一方面着手于使用 PCR 方法检测 16 株羊源分离株的 stx 等毒力因子、并对 stx 亚型区别鉴定, 以 Vero 细胞为模型评价其毒力强弱, 同时又利用生物信息学方法对 stx 蛋白质序列建立亚型分型搜索库, 尝试实现对二代测序的 STEC 菌株的 stx 亚型进行预测判断, 筛选出强毒力株是为分离能够裂解其的噬菌体做铺垫。另一方面, 本研究从 300 份养殖场污水、医院污水样品中分离可以裂解 STEC 的噬菌体 63 株, 并对一株宽谱且具有“晕圈”表型的噬菌体 P762 展开后续深入研究, 包括基因分析、生物特性、抑菌效果、衍生酶, 为 STEC 及 STEC 噬菌体的研究奠定理论基础。

1 羊源产志贺毒素大肠杆菌毒力因子检测和强弱毒株评估

产志贺毒素大肠杆菌是一种食源性致病菌, 主要的毒力基因包括 stx、eae、exhA 等。不同的 STEC 因毒力因子分布不同以及 stx 亚型不同而具有不同程度的致病作用。本研究使用 PCR 方法对 16 株羊源 STEC 分离株所携带的 stx 等毒力因子进行检测并对其 stx 亚型分型, 尝试使用生物信息学方法对 STEC 的 stx 毒素序列建立资源库, 并尝试对二代测序的 STEC 菌株进行 stx 亚型预测, 后期使用 vero 细胞对这些菌株的毒力强弱进行分析。结果表明: stx1a 亚型 4 株, stx1c 亚型 5 株, stx2a 亚型 1 株, stx2c 亚型 6 株, 1 株未测定出来; 4 株 STEC 毒力等级为++++, 1 株 STEC 毒力等级为+++ , 4 株 STEC 毒力等级为++ , 7 株 STEC 毒力等级为+。

2 羊源产志贺毒素大肠杆菌噬菌体的分离和生物信息学分析

由于生产链污染难以溯源,很难对 STEC 进行防控,而使用抗生素治疗 STEC 具有争议性。因此寻找新型防控工具极为重要。噬菌体作为一种可以覆盖全产业链、生态友好型的消毒剂可用于病原菌的预防和控制。在投入使用之前,通过对噬菌体基因组的研究,可以评估该噬菌体作为一种消毒剂的安全性。本研究从不同地区养殖场、医院污水共计 300 份样品中分离出 63 株噬菌体,并从这些噬菌体中筛选出一株能裂解来自不同地区、不同动物和不同种类致病性大肠杆菌的噬菌体 P762,且具有“晕圈”表型现象。提取 P762 的基因组,测序并上传至 NCBI 获得其序列号为 MW876471,通过 BLASTN, P762 与一株短尾大肠杆菌噬菌体 DY1 有 95.14%的同源性,同属于有尾科 Kayfunavirus 属。通过 VFDB 和 RAST 注释分析, P762 的基因组不编码毒力蛋白。随后从公共平台下载了 40 个同一属的噬菌体的全基因组并进行了泛基因组分析。这 41 个噬菌体的泛基因组属于开放泛基因组,为噬菌体基因水平研究奠定理论基础。

3 噬菌体 P762 的生物学特性及体外抑菌实验

噬菌体 P762 宿主谱测试实验结果发现,在 39 株 STEC 中,该噬菌体能裂解 18 株不同血清型的产志贺毒素大肠杆菌,血清型包括 O157: H7 和非 O157:H7,更为值得深入研究的是, P762 亦可以裂解禽致病性大肠杆菌(Avian Pathogenic Escherichia coli, APEC): 5 株血清型涵盖 O78、O83 和 O9 的 APEC,和其他致病性大肠杆菌(5/17)。其他基本生物学特性分析表明, P762 在 pH 3~11、温度 4℃~60℃范围内是稳定的,其最佳感染倍数 MOI 为 0.1。P762 的一步曲线表现出 3 个生长爆发阶段:2 个快速生长阶段和 1 个缓慢生长阶段。第一次快速爆发规模为 80 CFU/PFU,缓慢生长阶段增殖规模为 10 CFU/PFU,第二次快速爆发规模约为 990 CFU/PFU。体外抑菌试验表明, P762 在含生菜叶的 STEC 中具有较高的杀菌活性, P762 可以分别抑制 O157 和 O145 两种血清型的 STEC 生长,并在 1 小时内细菌数量分别下降 99.96%和 99.99%。

4 噬菌体 P762 解聚酶的研究

噬菌斑的“晕环”表型提示 P762 基因组中有解聚酶基因。Phyre2 分析表明, ORF48 与水解酶在功能和结构上具有相似性(99.3%;30%), ORF48 具有 3 个结构域,分别是 N 端的 T7-tail fiber、tail spike 和处于中间的鼠李糖苷酶。将噬菌体 P762 的 ORF48 基因克隆连接到 pET-28a 表达载体中,将重组表达载体导入感受态 BL21 中,表达纯化重组蛋白 Dpo48。纯化的重组蛋白 Dpo48 通过生物被膜实验证明具有抑制

P762 胞外多糖生长的功能，但在消除已形成的生物被膜上不表现出降解功能。

关键词：产志贺毒素大肠杆菌；Vero 细胞毒力模型评价；生物信息学；噬菌体疗法；解聚酶

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DEPOLYMERASE OF SHEEP-DERIVED SHIGA TOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI PHAGE P762

ABSTRACT

Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC), a highly pathogenic Shiga toxin stored in the intestines of cattle or sheep, contaminates surrounding water sources, vegetables or when slaughtered by cattle and sheep feces contaminated beef and mutton to cause STEC transmission. Humans get sick from eating contaminated food, and STEC have caused many public health incidents in various countries around the world. Therefore, the prevention and control of STEC has become a difficult problem in this situation where all links from farm to table may face pollution. The use of antibiotics to prevent and control STEC has always been controversial, that is, the release of stx toxins of STEC due to antibiotic treatment will aggravate clinical symptoms. Furthermore, using antibiotic limits and reduces resistance policies. Therefore, it is very important to find an eco-friendly disinfectant covering the whole industry chain. Phages are candidates for safe and effective disinfectants due to their ability to lyse bacteria without causing environmental pollution. In order to screen phages with the potential to prevent and control STEC, we started from two aspects: on the one hand, we started to use PCR method to detect virulence factors such as stx in 16 sheep-derived isolates, and type the stx toxin subtypes, Vero cells were used as a model to evaluate its virulence, and at the same time, bioinformatics methods were used to establish a subtype search library for stx toxin sequences, trying to predict and determine the stx subtype of STEC isolates by the next-generation sequencing, and screen out the stx subtypes of STEC isolates. The virulent isolates are the basis for the isolation of phages capable of lysing them. On the other hand, we isolated 63 phage strains that could lyse STEC from 300 farm and hospital sewage samples, and carried out follow-up in-depth studies on a broad-spectrum phage P762 with a "halo", including genetic analysis, biological characteristics, derivative enzymes. Those study lay a theoretical foundation for the research of STEC and STEC phage.

1 Detection and evaluation virulence of *Shiga toxin-producing Escherichia coli* from sheep

Shiga toxin-producing Escherichia coli is a food-borne pathogen with major virulence genes including *stx*, *eae*, *exhA*. Different STECs have different degrees of pathogenic effects due to different distribution of virulence factors and different *stx* subtypes. In this study, the virulence factors such as *stx* carried by 16 isolates were detected by PCR method and their *stx* subtypes were typed, and the bioinformatics method was used to establish a resource library for the *stx* toxin sequence of STEC, and the second generation The sequenced STEC strains were used for *stx* subtype prediction, and vero cells were used to analyze the virulence of these strains later. The results showed that: 4 strains of *stx1a* subtype, 5 strains of *stx1c* subtype, 1 strain of *stx2a* subtype, 6 strains of *stx2c* subtype, and 1 strain was not detected; 4 strains of STEC virulence grade were +++, 1 strain of STEC virulence The grade is ++, the virulence grade of 4 STEC strains is ++, and the virulence grade of 7 STEC strains is +. Based on these analyses, there were 5 virulent STEC strains, 4 of which were extremely virulent.

2 Isolation and Bioinformatics Analysis of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* Phage isolated from sheep

Due to the difficulty in tracing the source of pollution in the production chain, it is difficult to prevent and control STEC, and the use of antibiotics to treat STEC is controversial. Therefore, it is extremely important to find new prevention and control tools. As an eco-friendly disinfectant that can cover the entire industrial chain, bacteriophage can be used for the prevention and control of pathogenic bacteria. The safety of the phage as a disinfectant can be judged by studying the phage genome before it is put into use. In this study, we isolated 63 phages from the sewage of farms in different regions, and screened out a phage P762 from these phages that could lyse pathogenic *E. coli*. We extracted the genome of P762 and uploaded it to NCBI to obtain its serial number MW876471. According to BLASTN, P762 shares 95.14% homology with a short-tailed *E. coli* phage DY1, both belonging to the genus Kayfunavirus of the family Auridae. The genome of P762 does not encode a virulence protein by VFDB and RAST annotation analysis. Whole genomes of 40 phages of the same genus were subsequently downloaded from public platforms and subjected to pan-genome analysis. The pan-genomes of these 41 phages belong to the open pan-genomes, which lays a theoretical foundation for the

research at the phage gene level.

3 Biological characteristics and antibacterial experiments in vitro of bacteriophage P762

The results of the phage P762 host spectrum test showed that among 35 STEC strains, the phage could lyse 17 strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with different serotypes, including O157:H7 and non-O157:H7 serotypes, which are more worthy of further study is that P762 can also lyse *avian pathogenic Escherichia coli* (APEC): 5 strains of APEC with serotypes O78, O83 and O9, and other pathogenic *Escherichia coli* (5/17). Analysis of other basic biological characteristics showed that P762 was stable in the range of pH 3~11 and temperature 4°C~60°C, and its optimal multiplicity of infection, MOI, was 0.1. The one-step curve of P762 exhibited 3 growth burst stages: 2 fast growth stages and 1 slow growth stage. The scale of the first rapid burst was 80 CFU/PFU, the proliferation scale of the slow growth stage was 10 CFU/PFU, and the scale of the second rapid burst was about 990 CFU/PFU. The in vitro antibacterial test showed that P762 had high bactericidal activity in STEC containing lettuce leaves, in our test, P762 could inhibit the growth of STEC of two serotypes O157 and O145, respectively, and the number of bacteria in 1 hour were respectively Down 99.96% and 99.99%.

4 Study on the depolymerase of bacteriophage P762

The "halo" phenotype of the plaques suggests that the depolymerase gene is present in the P762 genome. Phyre2 analysis showed that ORF48 is functionally and structurally similar to hydrolase (99.3%; 30%), and ORF48 has three domains, which are N-terminal T7-tail fiber, tail spike, and intermediate rhamnosidase. The *orf48* gene of phage P762 was cloned into the pET-28a expression vector, and the recombinant expression vector was introduced into competent BL21 to express and purify the recombinant protein Dpo48. The purified recombinant protein Dpo48 has the function of inhibiting the growth of P762 exopolysaccharide through biofilm experiments, but it does not show the degradation function in eliminating the formed biofilm.

KEY WORDS: *Shiga toxin-producing Escherichia coli*; Pathogenic potential; Bacteriophage; Phage therapy ; Depolymerase

本研究目的意义

本研究一方面通过 PCR 检测分析 16 株羊源 STEC 分离株的 stx 等毒素的分布和 stx 亚型，Vero 细胞毒性试验法测试分离株对 vero 细胞的毒性，以初步了解分离到的 STEC 菌株的毒力，为后续筛选 STEC 噬菌体做铺垫。并使用生物信息学方法对已公布的 stx 亚型基因建立检索库，对二代测序的 STEC 的菌株直接检索以分析其携带的 stx 亚型，尝试提供另一种 STEC 亚型分类方法。

另一方面寻找能够防控 STEC 的噬菌体。在收集的 300 份养殖场、医院污水样品中共分离到 63 株能够裂解具有致病性的 STEC 的噬菌体，并对其中一株带有可扩散“晕环”的噬菌体 P762 深入研究，通过基因组测序及泛基因组分析证明 P762 作为 Kayfunavirus 属的新种噬菌体丰富了整个噬菌体的分类，并且证明 P762 不携带毒力、耐药基因，是一种安全的消毒剂候选；从生物学特性和体外生菜抑菌实验证明其作为一种消毒剂应用于各种环境下的潜力和效果；解聚酶的研究则更加深入的了解 P762 尾丝蛋白功能，为噬菌体衍生酶功能的研究提供基础案例。

第一篇 文献综述

第一章 产志贺毒素大肠杆菌的研究进展

致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 是一类可以感染人、多种动物的细菌^[1]。根据致病部位, 将其分为肠道内致病性大肠杆菌: 肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic E.coli*, EPEC)、肠出血性大肠杆菌(*Enterohaemorrhagic E.coli*, EHEC)、肠产毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic E.coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive E.coli*, EIEC)、肠聚集性大肠杆菌(*Enteraggative E.coli*, EAEC)、肠弥散黏附性大肠杆菌(*Dispersive Adherent E.coli*, DAEC)^[2]; 肠道外致病性大肠杆菌尿道致病性大肠杆菌(*Urethral pathogenic E.coli*, UPEC)、脑膜炎型大肠杆菌(*Neonatal meningitis E.coli*, NMEC)、禽致病性大肠杆菌(*Avian pathogenic E.coli*, APEC)^[3]。其中, EHEC 与产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)具有血清学上的交叉, EHEC 的血清型属于 STEC 的一部分。STEC 根据血清型不同被分为 O157: H7 和非 O157: H7。STEC 因毒力因子分布和 *stx* 类型不同会引起不同程度的临床症状。轻微症状有水样腹泻, 发烧等, 严重者会出现出血性肠炎、溶血性尿毒综合征 (Hemolytic Uremic Syndrome, HUS) 等临床病, 甚至危害周围神经系统 (Peripheral Nervous System, PNS)、中枢神经系统 (Central Nervous System, CNS) 继而引发运动、反射障碍和昏迷^[4~5]。更严重者将面临死亡。例如 1999 年国内爆发的 STEC 感染中, 2 万多人住院, 约 200 人患 HUS, 175 例病人去世。由于在反刍动物体内贮存却只引起人类感染的特点, 源头控制、快速检测成为了如今防控 STEC 感染的重点。因此, 检测分离株的毒力因子、*stx* 类型对于后续研究非常重要。

1 产志贺毒素大肠杆菌的发现

过去, 产志贺毒素大肠杆菌被称为产 vero (非洲绿猴肾细胞) 细胞毒素大肠杆菌。早在 1977 年 Konowalchuk 和他的同事在实验中有意识将大肠杆菌细菌滤液培养 Vero 细胞, 结果发现 Vero 细胞产生了皱缩、脱落等毒素作用的后果, 因此将这种大肠杆菌单独命名为产 Vero 细胞毒素大肠杆菌^[6]。1983 年, ALISON D. O'BRIEN 和 GERALD D. LAVECK 发现一株血清型为 O26: H1 的大肠杆菌 H30 产生的毒素与志贺氏痢疾杆菌 1 型菌株产生的志贺毒素非常相似^[7], 由于这些相似性, 志贺样毒素 (Shiga-like toxin, SLT) 被用来描述这种由大肠杆菌菌株产生的毒素^[8]。后来, VT 和 SLT 这两个术语都被广泛使用。因此, 产 vero 细胞毒素大肠杆菌现又被称为被产志

贺毒素大肠杆菌。

2 产志贺毒素大肠杆菌的流行病学

产志贺毒素大肠杆菌的贮藏宿主是反刍动物，包括牛和羊，但并不引起其发病。一旦反刍动物的排泄物污染到农庄的蔬菜、周围土壤和水源等，就非常容易导致人类感染，并且可以通过人与人传播（图 1-1）。本实验室前期收集了江苏等地区 2018-2020 年间的 334 份牛羊粪便，其中牛粪便占 64%，羊粪便占 36%，而羊源 STEC 分离株却远多于牛源 STEC。结合近些年的报道，例如新疆地区，羊源 STEC 的分离率高达 42%^[9]，结果表示羊作为 STEC 的贮存宿主，传播 STEC 的可能性越来越高。

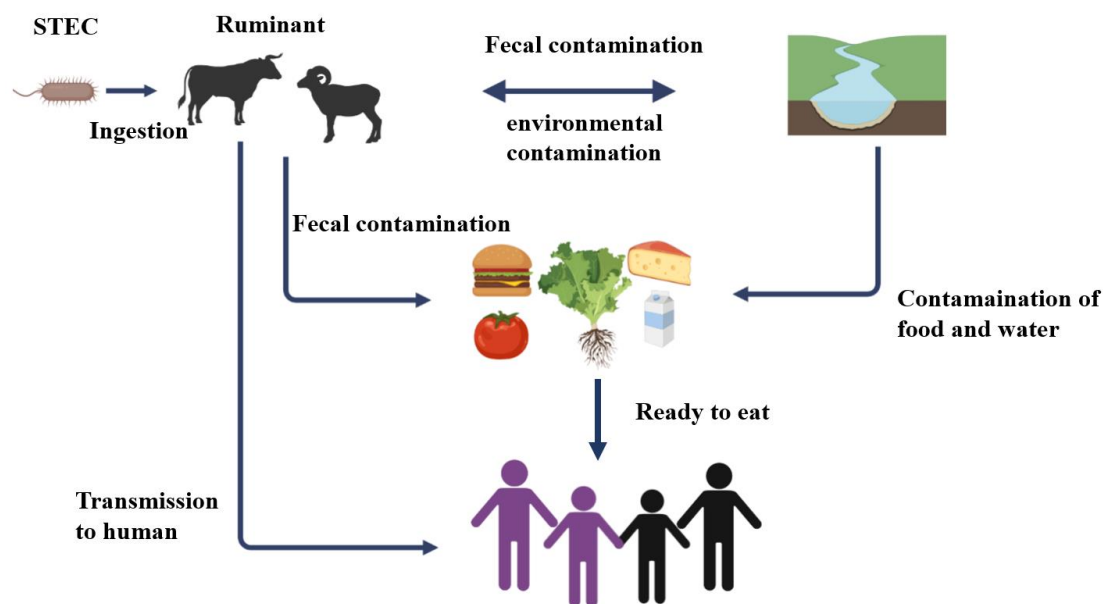


图 1-1 STEC 的传播途径

Figure1-1 Route of transmission of STEC

人们在提到 STEC 时总是最关注 O157: H7 血清型。O157: H7 作为致病性极强的 STEC 血清型之一曾造成多次公共卫生事件。例如，2007 年九月和十月，先后在荷兰和冰岛爆发了由于莴苣残留 STEC 导致的大规模感染^[10]。2016 年在英国爆发的“national outbreak”，溯源结果发现是由于未洗干净的沙拉蔬菜叶中的 STEC 导致的^[11]。经过分子血清型鉴定，这些 STEC 的血清型均是感染剂量极低的 O157: H7。然而，随着 STEC 中非 O157 的菌株引起的疾病流行或者爆发，因此笔者认为 STEC 中非 O157: H7 血清型亦应该受到关注。例如，2011 年西班牙爆发了血清型为 O104: H4 的 STEC 爆发事件，2019 年英国就有 32 例病例报道，这次的“元凶”也是由于三明治中各种类型的莴苣叶和菠菜叶的混合沙拉残留的 STEC，血清型为 O26: H11^[12]。

下图 1-2 记录了 1985-2017 年世界范围内 STEC 感染报道的 O157 和非 O157 肠出血性大肠杆菌重大暴发的比例圈图。蓝色和红色圆圈的大小分别与每次暴发中报告的腹泻和溶血性尿毒症综合征病例数成比例。虚线圆圈表示由非 O157 引起的疾病暴发，因此，结合此图，STEC 中非 O157 血清型的致病性亦应该受到重视。



图 1-2 O157：H7 和非 O157：H7 血清型导致的 STEC 感染大事件^[4]

Figure1-2 Major events of infection caused by O157: H7 and non-O157: H7 serotypes

3 STEC 致病相关毒力因子

STEC 毒力因子的相关研究报道很多，因此重要的毒力因子亦为研究人员熟知。例如，STEC 标志性毒素 stx，lee 岛，溶血素 ehxA，紧密黏附素 eae,各种黏附因子，菌毛基因，专存于 O157:H7 的 pO157 大质粒等。笔者在此篇综述中，重点展开介绍与后文研究密切相关的三种毒素。

3.1 志贺毒素

对志贺毒素(Shiga Toxins,Stx)第一次描述出现的时间点是 1903 年，Conradi 发现静脉注射志贺毒素可以导致兔死亡^[13]。志贺毒素主要作用于肠上皮与糖基神经酰胺受体相结合（globotriaosylceramide,Gb），引起的典型症状包括腹泻、出血性肠炎、HUS 等。人肠上皮细胞、肾细胞、vero 细胞、Hela 细胞和仔猪肠上皮细胞中含有 Gb3，Vero 细胞、猪小肠细胞、猪的平滑肌细胞和血管内皮细胞含有 Gb4,而 vero 细胞还含有 Gb5。这些都作为志贺毒素作用靶点导致疾病的发生^[14~15]。1955 年，Bridgwater, F. 和 Howard, J. G. 的研究中，描述志贺毒素不会导致神经症状^[16~17]。

1956 年, J B CAVANAGH 等发现了新的结论, 即接种志贺毒素后不同动物模型中表现出不同的临床症状, 只有兔和小鼠会表现出神经症状^[18]。关于志贺毒素与神经元的互作是具有争议的, 但确实有案例报道过^[4]。

志贺毒素是典型的 AB 型毒素, AB 型毒素包括 ab 型、ab₂ 型、ab₅ 型^[19]。ab 型毒素, 如梭状芽孢杆菌科的肉毒杆菌产生的肉毒杆菌神经毒素可能是对人类毒性最大的 ab 毒素, 可导致从说话不清、视力模糊到肌肉无力和瘫痪等症状。其中 b 亚基作为重链, 与突触前囊泡中的特定神经节苷脂和囊泡相关蛋白结合, 将作为轻链的 a 亚基转运到细胞质中, 随后 ab 亚基被切割, a 亚基发挥毒性作用^[20~21]。ab₂ 型毒素, 如细胞致死膨胀毒素(cytolethal distending toxin, CTD), 包含 a、b、c 三个亚基。CTD 全毒素于 1987 年由 Johnson 和 Lior 研究者首次发现, 被发现可针对多种哺乳动物细胞类型^[22]。弯曲杆菌、肠沙门氏菌、大肠杆菌和痢疾志贺氏菌的 CTD 均属于 ab₂。发病机制始于宿主细胞神经节苷脂受体与 CTDa 亚基和 CTDc 亚基结合^[23]。CTDb 亚基的内化会导致细胞程序性死亡。除了刺激细胞凋亡, CTD 还通过 IL-8 的分泌诱导肠道炎症^[24~25], 以及肠上皮细胞产生 CXCL8, 招募多形核中性粒细胞(PMNs) 的聚集^[26]。PMN 细胞穿过肠道上皮的易位增加了肠道上皮的通透性, 导致液体漏入肠腔, 最终导致水样腹泻。

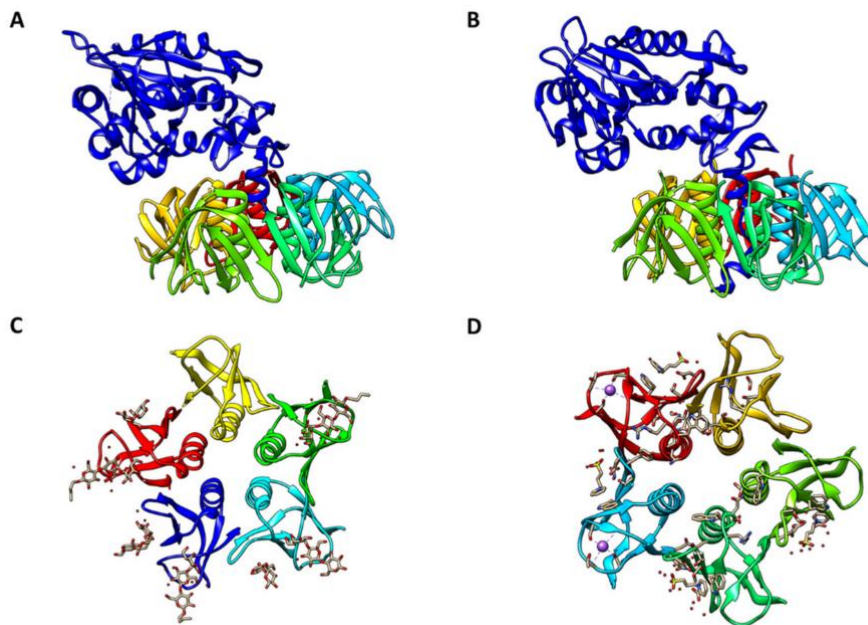


图 1-3 志贺毒素的晶体结构解析图^[27]

Figure 1-3 Crystal structure of Shiga toxin

ab₅ 型毒素包括百日咳毒素(Pertussis Toxin, Ptx)^[28]、霍乱毒素(Cholera Toxin)^[29]、微细胞毒素(Subtilase Cytotoxin)^[30~31]和志贺毒素。志贺毒素的晶体解析结构图如 1-3 所示, (A)stx1, 亮蓝色代表 a 亚基,黄色、绿色、淡蓝色、红色、亮蓝色分别代表 5 个相同的 b 亚基。(B)stx 2, 亮蓝色代表 a 亚基,黄色、绿色、淡蓝色、红色、亮蓝色分别代表 5 个相同的 b 亚基。(C)stx 1 b 亚基与 Gb3 受体结合位点。(D)stx 2 b 亚基与 Gb3 受体结合位点。5 个相同 b 亚基直接与主要位于内皮细胞上的 Gb3 或 Gb4 或 Gb5 受体结合, 内化后转运至内质网和细胞质^[32]。Stx a 则进一步传递到内质网引起内质网中折叠蛋白的积累而不输出, 从而刺激内质网应激反应, 导致宿主细胞凋亡^[33]。Stx a 结构域还能切割 60S 核糖体亚基, 从而抑制氨基酰基与转运 tRNA 结合, 进而抑制宿主蛋白的翻译合成^[27, 34]。核糖体的受损激活受影响细胞的核毒应激反应, 并刺激促炎症和促凋亡信号级联放大反应^[35~36]。促炎反应导致肾脏、结肠和中枢神经系统的微血管内皮细胞损伤。此外, 志贺毒素可改变宿主细胞信号转导, 降低胃肠道紧密连接的完整性, 最终导致电解质流失和水样腹泻, 甚至演发成 HUS^[27]。

志贺毒素受铁元素调控, 肉毒杆菌神经毒素依赖锌元素, AB 型毒素均受金属代谢的调控。虽然, stx 毒素在 STEC 感染致病时很重要, 但它们的演变尚未完全推断出来。然而, 一些研究表明, 通过噬菌体传递它们的遗传物质片段, 如毒素基因, 将其插入并不携带毒素的非致病性菌的基因组中, 促进了产志贺毒细菌的出现。例如, 在丝状噬菌体 CTX ϕ 上已经发现霍乱毒素的编码基因^[37], 而在其前噬菌体上发现肠球菌分泌的 ArtAB 基因^[38]。这些细菌与 STEC 获得 stx 毒素的方式非常一致。其他 AB 型毒素也可能来自水平基因转移或基因洗牌过程中的重组, 如插入、删除或点突变^[39]。虽然 AB 型毒素的进化仍然难以捉摸, 但它们的结构是众所周知的, 这是理解它们在细菌发病机制中的作用的关键。

志贺毒素分为 Stx1 和 Stx2, 通常认为, 含有 stx2 菌株的 STEC 毒力高于只含有 stx1 或者 stx1+stx2 的菌株。它们之间均包含不同的亚型, 每一种亚型的致病性也不同。Stx1 包括 stx1a、stx1c、stx1d, Stx2 包括 stx2a~stx2g。stx2 的变异度高于 stx1, 近年来还有 stx2h^[40]、stx2i^[41]、stx2j、stx2k^[42]的报道。Stx1c 和 stx1d 是 stx1a 的变异体, 其中 stx1c 与 stx1a 在 A 和 B 亚基分别只有 97.1%和 96.6%的氨基酸序列一致性^[43], 研究人员发现它们这种亚型的 STEC 几乎不具有致病性或者致病性很低^[44]。第一种被鉴定 Stx2a 毒素变体是 Stx2c, 虽然在 Vero 细胞毒性实验中表现低细胞毒性, 但是却作为一种造成人类疾病的重要的亚型。中和实验表明, stx2c 与 stx2a 具有不同的抗原性^[45]。另一种 Stx2a 变体 Stx2d, Stx2d 可被肠道粘液激活, 对 Vero 细胞的毒性增强^[46]。可激活的 Stx2d 与 STEC 感染最严重的表现——HUS 相关。将 Stx2c 和 Stx2d 的序列与 stx2a 比对发现, 它们的 B 亚基中有 2 个氨基酸不同, 整个因此,

前两者对 Vero 细胞的细胞毒性均有所降低，但 Stx2d 在动物体内的毒性与 Stx2a 相同^[47]。相比之下，Stx2c 被报道在小鼠体内的毒性比 Stx2a 低^[48]。另一种亚型 Stx2b，与 STEC 临床轻度症状相关^[49]。Stx2e、Stx2f 和 Stx2g 与动物感染 STEC 有关。这三种亚型中，只有 Stx2e 与动物宿主的疾病有关；会引起仔猪水肿病，严重的神经系统疾病，病死率极高^[50]。笔者在 Angela R. Melton-Celsa 的研究基础上整理了如下表格（Table 1-1）。

表格 1-1 stx 类型与致病性

Table 1-1 Stx types and Pathogenicity			
Stx 类型	原型菌株	是否与人类疾病相关	参考文献
Stx	3818T	是	[51]
Stx1a	EDL933	是	[52]
Stx1c	DG131/3	否	[53]
Stx1d	MHI813	否	[54]
Stx2a	EDL933	是	[52]
Stx2b	EH250	否	[54]
Stx2c	031	是	[55]
Stx2d	C165-02	是	[56]
Stx2e	S1191	否	[57]
Stx2f	T4/97	否	[58]
Stx2g	7v	否	[59]
Stx2h	STEC299	否	[40]
Stx2i	STEC300	否	[41]
Stx2k	STEC309	否	[42]

3.2 紧密黏附素和肠溶血素

STEC 基因组中带有一个与肠致病性大肠杆菌 (Enteropathogenic Escherichia coli,EPEC)中同源的致病基因岛,即Lee岛(locus for enterocyte effacement),会导致肠上皮细胞A/E（Attaching and effacing adherence,A/E）病变,其组织病理学特征是细菌与肠上皮细胞紧密黏附，进一步导致细胞骨架重排、丝状肌动蛋白聚集、形成细胞空泡等，最终脱落^[60~61]。Lee岛中包含一个外膜蛋白紧密黏附素eae (E.coli attaching and effacing)，是一个大小约为 103Kda的外膜蛋白，位于Lee岛的第 22 个开放阅读框，STEC中也含有这种蛋白，与EPEC中的eae具有 83%的同源性^[62]。Eae是Lee岛中编码的引起A/E损伤的最重要的基因，与HUS的形成有关。人们通过研究对比Eae⁺和Eae⁻

菌株的致病性，发现eae与仔猪A/E病变引起猪水肿病、人类HUS有关，例如。虽然也发现有例外的病例，eae⁻菌株也会导致HUS的发生^[63]，但是现在的研究结果普遍倾向于有关。

肠溶血素（alpha-plasmid carried enterohemolysin, ehxA）属于毒素(RTX)家族的重复序列，^[64]。ehxA 位于 pO157 毒力质粒上，ehxA 的存在与 stx 密切相关，因此被认为是 STEC 菌株快速鉴定中的流行病学标志物^[65]。EhxA 也与人类 HUS 密切相关^[66]，Hua Ying 等人的研究发现 ehxA + eae 和 ehxA + eae + stx2 的存在与 HUS 和 O157:H7 有统计学上的相关性，提示携带不止一种毒力因子可能与 STEC 感染更严重的临床结局有关^[65]。

参考文献

- [1] Gomes T A T, Elias W P, Scaletsky I C A, Guth B E C, Rodrigues J F, Piazza R M F, Ferreira L C S, Martinez M B. Diarrheagenic Escherichia Coli[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016,47:3-30.
- [2] Croxen M A, Finlay B B. Molecular Mechanisms of Escherichia Coli Pathogenicity[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010,8(1):26-38.
- [3] Ron E Z. Host Specificity of Septicemic Escherichia Coli: Human and Avian Pathogens Eliora Z Ron[M], 2005:28.
- [4] Adrien Joseph , Aurélie Cointe , Patricia Mariani Kurkdjian , Cédric Rafat and Alexandre Hertig. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review[J].Toxin, 2020, 12, 67.
- [5] Rosazza C, Cappellari A M, Gandini C, Scola E, Ardissino G. Steroid Pulse Therapy for Severe Central Nervous System Involvement in Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli-Related Hemolytic Uremic Syndrome[J]. Case Reports in Pediatrics, 2021,2021:1-4.
- [6] Konowalchuk J, Speirs J I, Stavric S. Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia Coli[J]. Infection and Immunity, 1977,18(3):775-779.
- [7] O'Brien A D, LaVeck G D. Purification and Characterization of a Shigella Dysenteriae 1-Like Toxin Produced by Escherichia Coli[J]. Infection and Immunity, 1983,40(2):675-683.
- [8] O'BRIEN A D, HOLMES R K. Shiga and Shiga-Like Toxins[J]. Microbiological reviews, 1987,51(2):206-220.
- [9] 张凌, 佟盼盼, 张毅, 马晓玉, 张萌萌, 刘璐瑶, 姚刚, 陈童锦悦, 苏战强. 羔羊Stec的耐药性、毒力基因和血清型分析[J]. 新疆农业科学, 2020,57(10):1921-1930.
Zhang L, Tong PP, Zhang Y, Ma XY, Zhang MM, Liu LL, Yao G, Chen TJY, Su ZQ. Analysis of drug resistance, virulence genes and serotype of Stec in lambs.[J]Xinjiang Journal of Agricultural Sciences, 2020,57(10):1921-1930.
- [10] Friesema I, Sigmondottir G, van der Zwaluw K, Heuvelink A, Schimmer B, de Jager C, Rump B, Briem H, Hardardottir H, Atladottir A, Gudmundsdottir E, van Pelt W. An International Outbreak of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157 Infection Due to Lettuce, September-October 2007[J]. Euro Surveill, 2008,13(50).
- [11] Gobin M, Hawker J, Cleary P, Inns T, Gardiner D, Mikhail A, McCormick J, Elson R, Ready D, Dallman T, Roddick I, Hall I, Willis C, Crook P, Godbole G, Tubin-Delic D, Oliver I. National Outbreak of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H7 Linked to Mixed Salad Leaves, United Kingdom, 2016[J]. Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles,

2018,23(18):1.

- [12] Butt S, Allison L, Vishram B, Greig D R, Aird H, McDonald E, Drennan G, Jenkins C, Byrne L, Licence K, Smith-Palmer A. Epidemiological Investigations Identified an Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Serotype O26:H11 Associated with Pre-Packed Sandwiches[J]. *Epidemiology and Infection*, 2021,149:e178.
- [13] Conradi H. Ueber Lösliche, Durch Aseptische Autolyse Erhaltene Giftstoffe Von Ruhr- Und Typhusbazillen[J]. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1903,29(02):26-28.
- [14] 潘虹. 产志贺毒素大肠杆菌毒素基因敲除及毒力测定的研究[D]: 甘肃农业大学, 2012.
Pang H. Study on toxin gene knockout and virulence determination of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*[D]: Gansu Agricultural University,2012.
- [15] Feitz W J C, Bouwmeester R, van der Velden T J A M, Goorden S, Licht C, van den Heuvel L P J W, van de Kar N C A J. The Shiga Toxin Receptor Globotriaosylceramide as Therapeutic Target in Shiga Toxin E. *Coli* Mediated Hus[J]. *Microorganisms*, 2021,9(10):2157.
- [16] HOWARD J G. Observations On the Intoxication Produced in Mice and Rabbits by the Neurotoxin of *Shigella Shigae*[J]. *Br J Exp Pathol*, 1955,36(5):439-446.
- [17] Bridgwater F A J R. The Neurotoxin of *Shigella Shigae* Morphological and Functional Lesions Produced in the Central Nervous System of Rabbits[J]. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1955,447-453(36).
- [18] CAVANAGH J B, HOWARD J G, WHITBY J L. The Neurotoxin of *Shigella Shigae*; A Comparative Study of the Effects Produced in Various Laboratory Animals[J]. *British journal of experimental pathology*, 1956,37(3):272-278.
- [19] Biernbaum E N, Kudva I T. Ab5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned From Shiga Toxins[J]. *Toxins (Basel)*, 2022,14(1).
- [20] Peng Chen Z, Morris J, Rodriguez R, Shukla A, Tapia-Núñez J, Okun M. Emerging Opportunities for Serotypes of Botulinum Neurotoxins[J]. *Toxins*, 2012,4(11):1196-1222.
- [21] Nowakowska-Gołacka J, Sominka H, Sowa-Rogozńska N, Słomińska-Wojewódzka M. Toxins Utilize the Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation Pathway in their Intoxication Process[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019,20(6):1307.
- [22] Production of Shiga Toxin and a Cytolethal Distending Toxin[J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987(48):235-238.
- [23] Méndez-Olvera E T, Bustos-Martínez J A, López-Vidal Y, Verdugo-Rodríguez A, Martínez-Gómez D. Cytolethal Distending Toxin From *Campylobacter Jejuni* Requires the Cytoskeleton for Toxic Activity[J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2016,9(10).
- [24] Hickey T E, McVeigh A L, Scott D A, Michielutti R E, Bixby A, Carroll S A, Bourgeois A L,

- Guerry P. *Campylobacter* Jejuni Cytolethal Distending Toxin Mediates Release of Interleukin-8 From Intestinal Epithelial Cells[J]. *Infection and Immunity*, 2000,68(12):6535-6541.
- [25] Lai C, Chen Y, Lin C, Lin H, Kao M, Huang M, Lin Y, Chiang-Ni C, Chen C, Lo U, Lin L, Lin H, Hsieh J, Lai C. Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications of *Campylobacter* Jejuni Cytolethal Distending Toxin[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016,6.
- [26] Jinadasa R N, Bloom S E, Weiss R S, Duhamel G E. Cytolethal Distending Toxin: A Conserved Bacterial Genotoxin that Blocks Cell Cycle Progression, Leading to Apoptosis of a Broad Range of Mammalian Cell Lineages[J]. *Microbiology*, 2011,157(7):1851-1875.
- [27] Kyung-Soo Lee, Yu-Jin Jeong, Moo-Seung Lee. *Escherichia coli* Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions [J]. *Toxins*, 2021, 13, 416
- [28] Saitoh M, Tanaka K, Nishimori K, Makino S, Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Kitano R, Kishima M, Sameshima T, Akiba M, Nakazawa M, Yokomizo Y, Uchida I. The *Artab* Genes Encode a Putative Adp-Ribosyltransferase Toxin Homologue Associated with *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Dt104[J]. *Microbiology*, 2005,151(9):3089-3096.
- [29] Qadri F, Svennerholm A, Faruque A S G, Sack R B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005,18(3):465-483.
- [30] Paton A W, Woodrow M C, Doyle R M, Lanser J A, Paton J C. Molecular Characterization of a Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 Strain Lacking Eae Responsible for a Cluster of Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999,37(10):3357-3361.
- [31] Paton A W, Srimanote P, Talbot U M, Wang H, Paton J C. A New Family of Potent Ab(5) Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2004,200(1):35-46.
- [32] Sandvig K, Garred Ø, Prydz K, Kozlov J V, Hansen S H, van Deurs B. Retrograde Transport of Endocytosed Shiga Toxin to the Endoplasmic Reticulum[J]. *Nature*, 1992,358(6386):510-512.
- [33] Lee S Y, Lee M S, Cherla R P, Tesh V L. Shiga Toxin 1 Induces Apoptosis through the Endoplasmic Reticulum Stress Response in Human Monocytic Cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2008,10(3):770-780.
- [34] ENDO Y, TSURUGI K, YUTSUDO T, TAKEDA Y, OGASAWARA T, IGARASHI K. Site of Action of a Vero Toxin (Vt2) From *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga Toxin On Eukaryotic Ribosomes. Rna N-Glycosidase Activity of the Toxins[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988,171(1-2):45-50.

- [35] Colpoys W E, Cochran B H, Carducci T M, Thorpe C M. Shiga Toxins Activate Translational Regulation Pathways in Intestinal Epithelial Cells[J]. *Cellular Signalling*, 2005,17(7):891-899.
- [36] Jandhyala D M, Thorpe C M, Magun B. Ricin and Shiga Toxins: Effects On Host Cell Signal Transduction[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012,357:41-65.
- [37] Waldor M K, Mekalanos J J. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin[J]. *Science*, 1996,272(5270):1910-1914.
- [38] Moreno S A, den Bakker H C, Cummings C A, Rodriguez-Rivera L D, Govoni G, Raneiri M L, Degoricija L, Brown S, Hoelzer K, Peters J E, Bolchacova E, Furtado M R, Wiedmann M. Identification and Characterization of Novel Salmonella Mobile Elements Involved in the Dissemination of Genes Linked to Virulence and Transmission[J]. *Plos One*, 2012,7(7):e41247.
- [39] Kumar R, Feltrup T M, Kukreja R V, Patel K B, Cai S, Singh B R. Evolutionary Features in the Structure and Function of Bacterial Toxins[J]. *Toxins*, 2019,11(1):15.
- [40] Bai X, Fu S, Zhang J, Fan R, Xu Y, Sun H, He X, Xu J, Xiong Y. Identification and Pathogenomic Analysis of an Escherichia Coli Strain Producing a Novel Shiga Toxin 2 Subtype[J]. *Scientific Reports*, 2018,8(1).
- [41] Baranzoni G M, Fratamico P M, Gangiredla J, Patel I, Bagi L K, Delannoy S, Fach P, Boccia F, Anastasio A, Pepe T. Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016,7.
- [42] Yang X, Bai X, Zhang J, Sun H, Fu S, Fan R, He X, Scheutz F, Matussek A, Xiong Y. Escherichia Coli Strains Producing a Novel Shiga Toxin 2 Subtype Circulate in China[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2020,310(1):151377.
- [43] Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (Stx1C) in Escherichia Coli Strains Isolated From Humans[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002(40):1441-1446.
- [44] Alexander W Friedrich J B M B. Shiga Toxin 1C-Producing Escherichia Coli Strains: Phenotypic and Genetic Characterization and Association with Human Disease[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,6(41):2448-2453.
- [45] Schmitt C K, McKee M L, O'Brien A D. Two Copies of Shiga-Like Toxin Ii-Related Genes Common in Enterohemorrhagic Escherichia Coli Strains are Responsible for the Antigenic Heterogeneity of the O157:H- Strain E32511[J]. *Infection and Immunity*, 1991,59(3):1065-1073.
- [46] Melton-Celsa A R, Darnell S C, O'Brien A D. Activation of Shiga-Like Toxins by Mouse and Human Intestinal Mucus Correlates with Virulence of Enterohemorrhagic Escherichia Coli O91:H21 Isolates in Orally Infected, Streptomycin-Treated Mice[J]. *Infection and Immunity*,

1996,64(5):1569-1576.

- [47] Lindgren S W, Samuel J E, Schmitt C K, O'Brien A D. The Specific Activities of Shiga-Like Toxin Type Ii (Stx-II) and Stx-II-Related Toxins of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Differ When Measured by Vero Cell Cytotoxicity but Not by Mouse Lethality[J]. *Infection and Immunity*, 1994,62(2):623-631.
- [48] Fuller C A, Pellino C A, Flagler M J, Strasser J E, Weiss A A. Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency[J]. *Infection and Immunity*, 2011,79(3):1329-1337.
- [49] Pierard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia Coli* Isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998,36(11):3317-3322.
- [50] Perrat A, Branchu P, Decors A, Turci S, Bayon-Auboyer M, Petit G, Grosbois V, Brugère H, Auvray F, Oswald E. Wild Boars as Reservoir of Highly Virulent Clone of Hybrid Shiga Toxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Responsible for Edema Disease, France[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2022,28(2):382-393.
- [51] Hale T L, Formal S B. Cytotoxicity of *Shigella Dysenteriae* 1 for Cultured Mammalian Cells[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1980,33(11 Suppl):2485-2490.
- [52] Riley L W, Remis R S, Helgerson S D, McGee H B, Wells J G, Davis B R, Hebert R J, Olcott E S, Johnson L M, Hargrett N T, Blake P A, Cohen M L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia Coli* Serotype[J]. *The New England journal of medicine*, 1983,308(12):681-685.
- [53] C Koch S H R L. Isolation of a Lysogenic Bacteriophage Carrying the Stx(1(Ox3)) Gene, Which is Closely Associated with Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains From Sheep and Humans[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001,11(39):3992-3998.
- [54] Christine Bürk R D G A. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia Coli* Ont:H19 of Bovine Origin[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,5(41):2106-2112.
- [55] Polymerase Chain Reaction Amplification, Cloning and Sequencing of Variant *Escherichia Coli* Shiga-Like Toxin Type Ii Operons[J].
- [56] Persson S, Olsen K E P, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping Method for *Escherichia Coli* Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007,45(6):2020-2024.
- [57] Weinstein D L, Jackson M P, Samuel J E, Holmes R K, O'Brien A D. Cloning and Sequencing of a Shiga-Like Toxin Type Ii Variant From *Escherichia Coli* Strain Responsible for Edema Disease of Swine[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988,170(9):4223-4230.

- [58] Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler L H, Karch H. A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2F) From *Escherichia Coli* Isolated From Pigeons[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000,66(3):1205-1208.
- [59] P H M Leung J S M P. A Newly Discovered Verotoxin Variant, Vt2G, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia Coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003,12(69):7549-7553.
- [60] Frankel G, Candy D C, Fabiani E, Adu-Bobie J, Gil S, Novakova M, Phillips A D, Dougan G. Molecular Characterization of a Carboxy-Terminal Eukaryotic-Cell-Binding Domain of Intimin From Enteropathogenic *Escherichia Coli*[J]. *Infection and Immunity*, 1995,63(11):4323-4328.
- [61] Donnenberg M S, Kaper J B, Finlay B B. Interactions Between Enteropathogenic *Escherichia Coli* and Host Epithelial Cells[J]. *Trends in Microbiology*, 1997,5(3):109-114.
- [62] Yu J, Kaper J B. Cloning and Characterization of The *eae* Gene of Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7[J]. *Molecular Microbiology*, 1992,6(3):411-417.
- [63] Barrett T J, Kaper J B, Jerse A E, Wachsmuth I K. Virulence Factors in Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia Coli* Isolated From Humans and Cattle[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1992,165(5):979-980.
- [64] Schwidder M, Heinisch L, Schmidt H. Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Hemolysin[J]. *Toxins*, 2019,11(9):502.
- [65] Hua Y, Zhang J, Jernberg C, Chromek M, Hansson S, Frykman A, Xiong Y, Wan C, Matussek A, Bai X. Molecular Characterization of the Enterohemolysin Gene (*Ehxa*) in Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Isolates[J]. *Toxins*, 2021,13(1):71.
- [66] Ethelberg S, Olsen K E P, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen A M, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark1[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004,10(5):842-847.

第二章 噬菌体的研究进展

噬菌体是一种可以感染细菌的病毒，由Frederick W. Twort和Felix d'Herelle于1915年发现的，是地球上最丰富的物种^[1]。噬菌体组成简单，仅包括遗传物质和蛋白质外壳，基因组比较小，不同种类的噬菌体基因组大小不同，一般在2435bp~540kb之间^[2]。基于噬菌体可以感染细菌的特性，对噬菌体的研究包括但不限于噬菌体基因组、噬菌体疗法、噬菌体衍生酶、检测致病菌、分子生物学实验工具等。

1 噬菌体种类

1.1 按照结构形态分类

现在一般使用透射电镜对噬菌体形态进行观察，分为有尾噬菌体（蝌蚪状）和无尾噬菌体（丝状、微球状等）^[3]。事实上，自然界大多数噬菌体属于有尾噬菌体，在电镜下一般由一个头部、尾部和、或颈部组成，而无尾噬菌体一般仅有“头部”。

1981年和1984年，有尾噬菌体先后被ICTV(the International Committee on Taxonomy of Viruses)分为肌尾噬菌体(Myoviridae)、长尾噬菌体(Siphoviridae)和短尾噬菌体(Podoviridae)(https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases)，现在已经将有尾噬菌体归为Caudovirales目。肌尾噬菌体的特点是尾部可以收缩，长尾、短尾噬菌体尾部不可以收缩^[4]。

无尾噬菌体主要包括丝状噬菌体和微球状噬菌体等，他们的结构没有尾部，仅由头部构成。结合1.3中以遗传物质为依据对噬菌体进行分类。Moïra B. Dion, Frank Oechslin and Sylvain Moineau发表的文献详细地介绍了噬菌体形态、命名和各部分组成等，如图2-1^[2]。

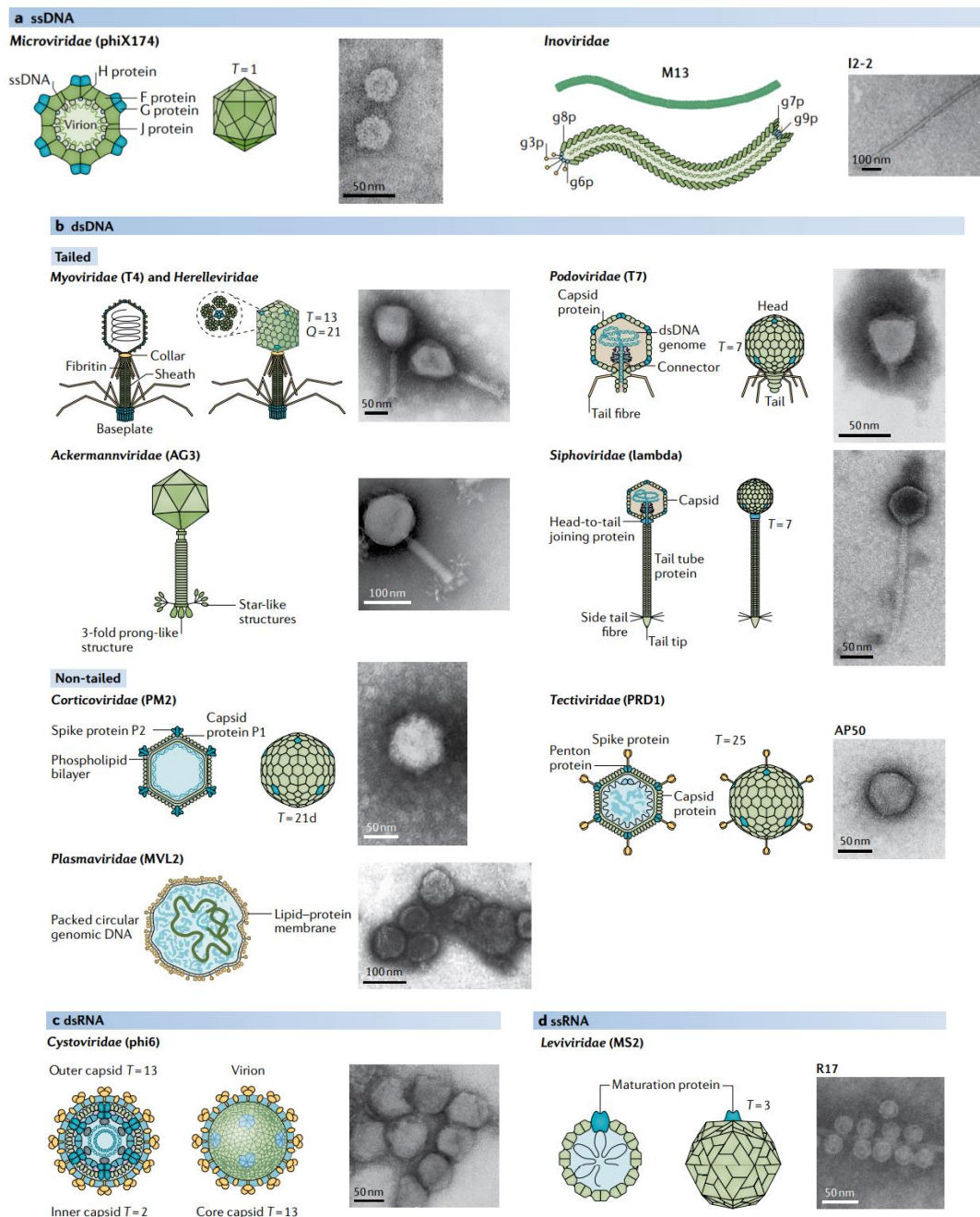


图2-1 各种形态的噬菌体^[2]

Figure 2-1 Phages in various morphology

1.2 按照生命周期分类

噬菌体感染细菌后，衣壳蛋白留在外面，而遗传物质则“注入”到细菌体内，此时，如果某一种噬菌体在裂解细菌同时利用宿主营养复制自己的基因组最后释放出大量新代噬菌体，这种噬菌体就被称为烈性噬菌体，烈性噬菌体一般应用于噬菌

体疗法^[5]；如果噬菌体核酸整合到宿主细菌基因组中，并随着宿主代谢，则称之为溶原噬菌体，溶原噬菌体一般应用于分子实验的研究中，如pUC118噬菌体，作为载体可以克隆外源目的基因^[6]。

溶原噬菌体因此生活特点，所以可以介导基因在不同细菌中传播。原本那些毫无致病性的细菌可以经此获得毒力因子、耐药基因等^[7]。例如白喉棒状杆菌和肉毒梭菌，溶原噬菌体 γ 和C1编码其主要的毒力因子^[8~9]。另一个非常重要的通过水平基因传播获得毒力的细菌就是大肠杆菌O157: H7,其毒力基因来自于stx噬菌体^[10]。

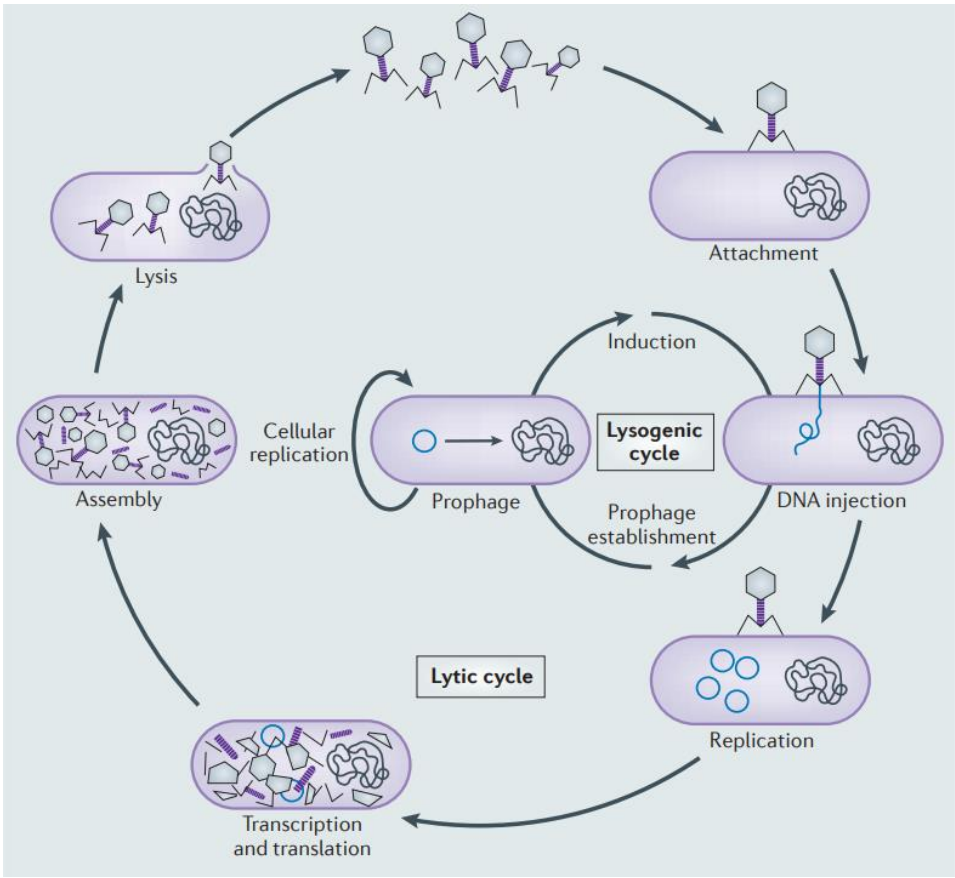


图 2-2 噬菌体的不同生命周期^[11]

Figure 2-2 Phage life cycles

1.3 按遗传物质分类

噬菌体的遗传物质包括DNA和RNA。如上图2-1所示，以遗传物质对噬菌体分类方法已非常成熟。其中，有些噬菌体是以单链DNA或者RNA作为遗传物质，例如ΦX174^[12]、MS2^[13]。有些噬菌体以双链DNA或RNA作为遗传物质，例如T2噬菌体^[14]。

2 噬菌体基因组

噬菌体作为地球上最丰富的物种，其基因组亦非常丰富。有很多可以用于注释噬菌体基因组的网站或者软件，例如NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、RAST(<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)、VFDB(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)等。但是在噬菌体基因组中存在着大量的假定蛋白无法注释，这意味着噬菌体的基因组并未研究透彻^[15]。

噬菌体基因组的特征之一是镶嵌体^[16]。即，噬菌体的基因很多是通过水平基因转移获得的，这一部分基因“镶嵌”在基因组中，例如分枝杆菌Rosebush和Qyrzula，二者之间有相似度高于94%的大小约1.8kbp的片段^[17]；噬菌体P2的尾纤维蛋白具有与噬菌体Mu、P1、lambda、K3和T2的尾纤维蛋白相似的区域^[18]。这也表明，噬菌体和噬菌体之间存在着基因交换，即使是不同科属的噬菌体也可能由共同祖先进化而来。温和噬菌体会将基因整合到细菌基因组中，这就会造成基因在不同物种间传播，例如stx噬菌体将stx带给大肠杆菌或者其他细菌^[17]。

3 噬菌体应用

3.1 作为生物实验工具

1969年的生理学诺贝尔奖颁发给Alfred Hershey ,Martha Chase i andLuria，这三位科学家通过T2噬菌体证明遗传物质是DNA而非蛋白质，这是噬菌体在分子生物领域的第一次登台。后来人们发现了限制性内切酶可以用来切割分子片段^[19]，以及T4噬菌体编码的DNA连接酶可以用来连接分子片段^[20]。这为后续的科研研究奠定了基础，直到现在仍旧在构建载体时发挥作用。

噬菌体亦可以作为载体，例如λ噬菌体、M13噬菌体可以用于插入外源基因，构建基因文库，用于筛选特异性基因^[21]；

3.2 噬菌体疗法

噬菌体在最初发现的时候，就被研究如何应用于细菌感染。1926年，Felix d'Herelle就报道了他用噬菌体成功治疗感染沙门氏菌的鸡的案例^[22]，他还写了关于噬菌体治疗感染的其他报道^[23]。随后，噬菌体治疗掀起一阵热潮。但是很快，人们就遇到了困难。由于当时处于起步阶段，所以面临以下困难：首先，当分离到的噬菌体的宿主谱与实际要治疗的细菌不同时，噬菌体会完全无效。其次，当时的技术无法获得较纯的噬菌体，噬菌体液体中往往残存着细菌。再次，噬菌体会被机体代谢，如何持续发挥治疗作用是个难题。从次，噬菌体很快也会有噬菌体抗性菌株的

产生。最后，体外和体内实验的结果大相径庭。与此同时，1928年青霉素问世^[24]，其他广谱且有效的抗生素陆续亦被发现，噬菌体疗法随之黯淡下来。19世纪40年代抗生素广泛的使用使得许多科学家预言将会产生耐药菌，正如预测的那样，随后出现了抗生素耐药性的临床报告，例如结核病中分离到耐药结核分枝杆菌^[25]。细菌感染治疗何去何从？

1980年，Smith and Huggins的一系列研究改变了之前人们对噬菌体疗法的认识。他们使用了对宿主谱非常了解的噬菌体R来进行试验，不仅证明了噬菌体与八倍浓度的链霉素具有相同治疗作用^[26]；不仅如此，他们还尝试使用两种噬菌体混合来解决噬菌体抗性出现带来的窘境^[27]。这些积极的结果使得科学家们又对噬菌体治疗重新感到希望。

随着后来人们不断的优化，现在已经有许多噬菌体治疗成果的案例，例如成功治疗被粪肠球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌细菌感染的病人^[28]。加州大学圣地亚哥研究团队成功治疗酒精性肝病^[29]，并成立了创新噬菌体应用与治疗中心。目前科学家开发出噬菌体鸡尾酒制剂，例如2013年，获批的针对沙门氏菌的鸡尾酒制剂^[30]；FDA批准的商品化制剂ListShield，针对食品上单核球增多性李斯特菌污染^[31]，诸如此类，数不胜数。

3.3 噬菌体衍生酶制剂

目前对噬菌体衍生酶的研究主要分为两大主流，一种是针对革兰氏阳性菌的裂解酶(Endolysin)^[32]，另一种是针对革兰氏阴性的解聚酶(depolymerase)^[33]。裂解酶主要分布在噬菌体尾突蛋白(Tail Spike Protein,TSP)、尾纤维蛋白(Tail Fiber Protein,TFP)中，例如果胶酸裂解酶^[34]；解聚酶主要分布于TSP、TFP，基板和颈部连接蛋白，例如，唾液酸酶、肽酶等^[35]。下图是由Diana P. Pires等人的综述中归纳的图片，展示有尾噬菌体各种酶可能存在的位点。

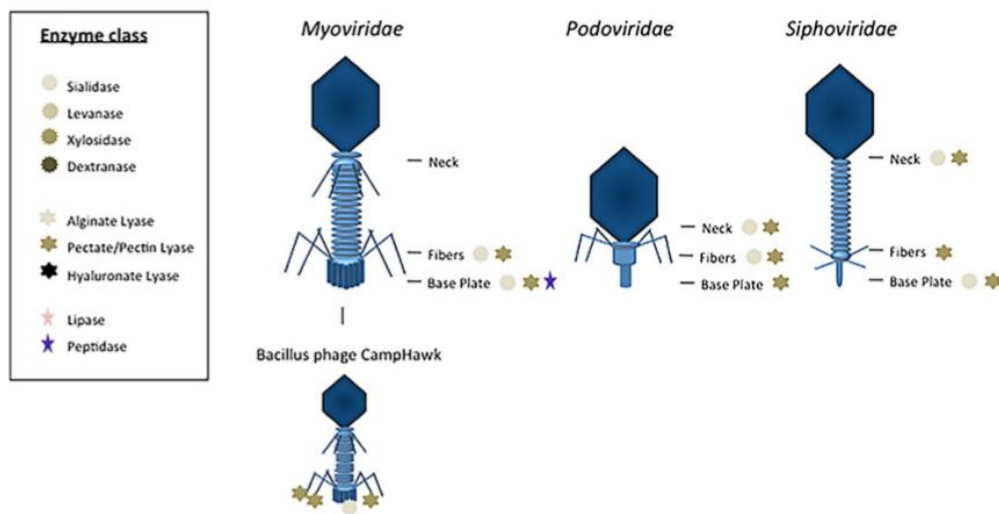


图 2-3 各种噬菌体酶分布位点^[34~35]

Figure 2-3 Distribution sites of various phage enzymes

解聚酶的主要作用靶点是胞外多糖、生物被膜例如荚膜多糖，降解掉胞外多糖后，噬菌体将继续发挥裂解作用。裂解酶的主要作用靶点是细胞壁，由结合结构域与细胞壁多糖特异性结合后，催化结构域发挥切割作用^[36]。

噬菌体衍生酶制剂与噬菌体制剂不同，酶制剂的安全性高于噬菌体制剂，并且具有高效性。目前已经有许多噬菌体衍生酶成功应用于各种场景下的案例。例如，在食品安全和农业方面，有几种解聚酶和裂解酶商品，例如LysZ5，一种可以添加在豆浆中的酶制剂，医疗方面目前研究最透彻的就是针对金黄色葡萄球菌的裂解酶，如Staphfek SA.100，一种可以治疗耐药金黄色葡萄球菌的皮肤涂抹酶制剂。针对肺炎克雷伯杆菌的解聚酶DpoKP360,具有清除体内肺炎克雷伯杆菌的作用^[37]，Mushtaq的研究表明，解聚酶endoE可以减轻动物败血症症状^[38]，而且后续的研究表明，该解聚酶还具有削弱体内炎症因子水平的作用^[39]。解聚酶还应用于清除生物被膜方面，例如，李敏等的研究发现P510dep可以清除血清型为KL64的肺炎克雷伯杆菌的生物被膜^[40]，Lin的研究发现一种特异性降解K1型的肺炎克雷伯杆菌的解聚酶^[41]。

3 产志贺毒素大肠杆菌噬菌体的研究进展

3.1 Stx 噬菌体与 STEC

十九世纪九十年代，几株产志贺毒素大肠杆菌噬菌体933J^[42]、H19B^[43]、H30^[44]相继报道，研究认为这几株噬菌体是引起“shiga-toxin conversion”的原因，最初被发

现的这些STEC噬菌体，被称为stx噬菌体，是一类温和噬菌体，编码stx。不仅如此，stx噬菌体与STEC之间有着千丝万缕的关系。1996日本发生了一场超过5000人感染STEC的公共卫生事件，这株STEC经过测序研究后，科学家们发现其序列中存在许多可转移的片段，且是特异性的通过比对、分析GC含量、前噬菌体（stx噬菌体）整合位点等一系列生物信息学分析，这些发现与K12大肠杆菌的发现一致^[41]。这表明，stx噬菌体的存在丰富了STEC的基因^[45]。

3.2 在食品方面的应用

基于STEC的传播途径，其会造成奶制品、牛羊肉、生菜的污染。不带有毒力因子和耐药基因的STEC噬菌体在防控STEC污染上比抗生素、传统消毒剂更加安全。如，噬菌体DT1和DT6被用于减少牛奶发酵中STEC载量，与对照组相比，应用噬菌体组几乎无STEC生存^[46]。在Wang等的研究中，应用STEC噬菌体AZO145A来应对牛肉上的STEC，发现AZO145A不仅在2个小时之内将STEC载量降低 $4 \times \log^{10}$ ，而且有限的减少了STEC形成的生物被膜^[46]。

参考文献

- [1] Twort F W. On an Invisible Microbe Antagonistic Toward Dysenteric Bacilli: Brief Note by Mr. F. D ' Herelle, Presented by Mr. Roux[J]. J Hyg (Lond), 1936,2(36):204-235.
- [2] Dion M B, Oechslin F, Moineau S. Phage Diversity, Genomics and Phylogeny[J]. Nature reviews. Microbiology, 2020,18(3):125-138.
- [3] Ackermann H W. Frequency of Morphological Phage Descriptions in the Year 2000. Brief Review[J]. Archives of Virology, 2001,146(5):843-857.
- [4] Ackermann H W. Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales[J]. Advances in Virus Research, 1998,51:135.
- [5] Chang R Y K, Wallin M, Lin Y, Leung S S Y, Wang H, Morales S, Chan H. Phage Therapy for Respiratory Infections[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2018,133:76-86.
- [6] Brosius J. Superpolylinkers in Cloning and Expression Vectors[J]. DNA, 1989,8(10):759-777.
- [7] Keen E C. Paradigms of Pathogenesis: Targeting the Mobile Genetic Elements of Disease[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012,2.
- [8] Barksdale L, Arden S B. Persisting Bacteriophage Infections, Lysogeny, and Phage Conversions[J]. Annual Review of Microbiology, 1974,28(1):265-300.
- [9] FREEMAN V J. Studies On the Virulence of Bacteriophage-Infected Strains of Corynebacterium Diphtheriae[J]. Journal of Bacteriology, 1951,6(61):675-688.
- [10] Smith D L, James C E, Sergeant M J, Yaxian Y, Saunders J R, McCarthy A J, Allison H E. Short-Tailed Stx Phages Exploit the Conserved YaeT Protein to Disseminate Shiga Toxin Genes Among Enterobacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2007,189(20):7223-7233.
- [11] Salmond G P, Fineran P C. A Century of the Phage: Past, Present and Future[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015,13(12):777-786.
- [12] S A Langeveld A D V M. Nucleotide Sequence of the Origin of Replication in Bacteriophage ϕ X174 Rf Dna[J]. Nature, 1978,271(5644)(2):417-420.
- [13] Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, Min J W, Molemans F, Raeymaekers A, Van den Berghe A, Volckaert G, Ysebaert M. Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage Ms2 Rna: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene[J]. Nature, 1976,260(5551):500-507.
- [14] Fumiya Hoshiga K Y N T. Modification of T2 Phage Infectivity Toward Escherichia Coli O157 H7 Via Using Crispr-Cas9[J]. Fems Microbiology Letters, 2012,4(336):n41.
- [15] Hatfull G F, Hendrix R W. Bacteriophages and their Genomes[J]. Current Opinion in Virology,

2011,1(4):298-303.

- [16] Hatfull G F. Bacteriophage Genomics[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008,11(5):447-453.
- [17] Hendrix R W, Smith M C, Burns R N, Ford M E, Hatfull G F. Evolutionary Relationships Among Diverse Bacteriophages and Prophages: All the World's a Phage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999,96(5):2192-2197.
- [18] Haggard-Ljungquist E, Halling C, Calendar R. Dna Sequences of the Tail Fiber Genes of Bacteriophage P2: Evidence for Horizontal Transfer of Tail Fiber Genes Among Unrelated Bacteriophages[J]. Journal of Bacteriology, 1992,174(5):1462-1477.
- [19] H O Smith K W W. A Restriction Enzyme From Hemophilus Influenzae[J]. Journal of Molecular Biology, 1970,51 (2) (28):379-391.
- [20] B Weiss C C R. Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid, I. Repair of Single-Strand Breaks in Dna by an Enzyme System From Escherichia Coli Infected with T4 Bacteriophage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967,4(57):1021-1028.
- [21] 张红英, 郭嘉雯, 员月明, 徐志勇, 邓长生, 王琪. 人肺癌细胞a549 λ 噬菌体Cdna文库的构建与鉴定[J]. 西南医科大学学报, 2021,44(04):333-337.
Zhang HY, GUO JW, YUAN YM, XU ZY, DENG CS, WANG Q. Construction and identification of a549 λ phage Cdna library of human lung cancer cells [J]. Journal of South China Medical University. 2021,44(04):333-337.
- [22] D He Relle F A S G. The Bacteriophage and its Behavior[J], 1926.
- [23] D'Herelle F. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections[J]. Bull N Y Acad Med, 1931,5(7):329-348.
- [24] Fleming A. Penicillin ' S Finder Assays its Future. [EB/OL]. <https://www.nytimes.com/1945/06/26/archives/penicillins-finder-assays-its-future-sir-alexander-fleming-says.html>.
- [25] Marshall G B J W, Gaddum J H E A. The Clinicians of the Centres Met Periodically as a Working Subcommittee Under the Chairmanship of[J]. Br Med J, 1948,2 (4582) (30):769-782.
- [26] H. Williams Smith M B H. Successful Treatment of Experimental Eschen'chia Coli Infections in Mice Using Phage: Its General Superiority Over Antibiotics[J]. Journal of General Microbiology, 1982(128):309-317.
- [27] Smith H W, Huggins M B. Effectiveness of Phages in Treating Experimental Escherichia Coli Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs[J]. Journal of general microbiology, 1983,129(8):2659-2675.
- [28] Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, Hites M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, Askilashvili L, Kvachadze L, van Noort V, Wagemans J, Jayankura M, Chanishvili N, de Boer M, Nibbering P,

- Kutateladze M, Lavigne R, Merabishvili M, Pirnay J. Combination of Pre-Adapted Bacteriophage Therapy and Antibiotics for Treatment of Fracture-Related Infection Due to Pandrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*[J]. *Nature Communications*, 2022,13(1).
- [29] Duan Y, Llorente C, Lang S, Brandl K, Chu H, Jiang L, White R C, Clarke T H, Nguyen K, Torralba M, Shao Y, Liu J, Hernandez-Morales A, Lessor L, Rahman I R, Miyamoto Y, Ly M, Gao B, Sun W, Kiesel R, Hutmacher F, Lee S, Ventura-Cots M, Bosques-Padilla F, Verna E C, Abraldes J G, Brown R S, Vargas V, Altamirano J, Caballería J, Shawcross D L, Ho S B, Louvet A, Lucey M R, Mathurin P, Garcia-Tsao G, Bataller R, Tu X M, Eckmann L, van der Donk W A, Young R, Lawley T D, Stärkel P, Pride D, Fouts D E, Schnabl B. Bacteriophage Targeting of Gut Bacterium Attenuates Alcoholic Liver Disease[J]. *Nature*, 2019,575(7783):505-511.
- [30] Sharma M. Lytic Bacteriophages[J]. *Bacteriophage*, 2014,3(2):e25518.
- [31] Bai J, Kim Y, Ryu S, Lee J. Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016,7.
- [32] Xu Y. Phage and Phage Lysins: New Era of Bio - Preservatives and Food Safety Agents[J]. *Journal of Food Science*, 2021,86(8):3349-3373.
- [33] Pires D P, Oliveira H, Melo L D R, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-Encoded Depolymerases: Their Diversity and Biotechnological Applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016,100(5):2141-2151.
- [34] Michaud P, Da C A, Courtois B, Courtois J. Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2003,23(4):233-266.
- [35] Davies G, Henrissat B. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases[Z]. United States: Elsevier Inc, 1995:853-859.
- [36] Gutierrez D, Fernandez L, Rodriguez A, Garcia P. Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon to Kill *Staphylococcus Aureus*?[J]. *Mbio*, 2018,9(1).
- [37] Majkowska-Skrobek G, Łątka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M, Lavigne R, Struve C, Drulis-Kawa Z. Capsule-Targeting Depolymerase, Derived From *Klebsiella* Kp36 Phage, as a Tool for the Development of Anti-Virulent Strategy[J]. *Viruses*, 2016,8(12):324.
- [38] Mushtaq N, Redpath M B, Luzio J P, Taylor P W. Treatment of Experimental *Escherichia Coli* Infection with Recombinant Bacteriophage-Derived Capsule Depolymerase[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005,56(1):160-165.
- [39] Zelmer A, Martin M J, Gundogdu O, Birchenough G, Lever R, Wren B W, Luzio J P, Taylor P W. Administration of Capsule-Selective Endosialidase E Minimizes Upregulation of Organ Gene Expression Induced by Experimental Systemic Infection with *Escherichia Coli* K1[J]. *Microbiology*,

2010,156(7):2205-2215.

- [40] Li M, Li P, Chen L, Guo G, Xiao Y, Chen L, Du H, Zhang W. Identification of a Phage-Derived Depolymerase Specific for Kl64 Capsule of *Klebsiella Pneumoniae* and its Anti-Biofilm Effect[J]. *Virus Genes*, 2021,57(5):434-442.
- [41] Lin T, Hsieh P, Huang Y, Lee W, Tsai Y, Su P, Pan Y, Hsu C, Wu M, Wang J. Isolation of a Bacteriophage and its Depolymerase Specific for K1 Capsule of *Klebsiella Pneumoniae*: Implication in Typing and Treatment[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014,210(11):1734-1744.
- [42] A Huang S D G J. Stx1C is the Most Common Shiga Toxin 1 Subtype Among Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Isolates From Sheep but Not Among Isolates From Cattle[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986,2(166):375-379.
- [43] Huang A, de Grandis S, Friesen J, Karmali M, Petric M, Congi R, Brunton J L. Cloning and Expression of the Genes Specifying Shiga-Like Toxin Production in *Escherichia Coli* H19[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986,166(2):375-379.
- [44] Kozlov Y V, Kabishev A A, Lukyanov E V, Bayev A A. The Primary Structure of the Operons Coding for *Shigella Dysenteriae* Toxin and Temperate Phage H30 Shiga-Like Toxin[J]. *Gene*, 1988,67(2):213-221.
- [45] 夏炉明, 陈琦, 严亚贤. Stx噬菌体基因组结构及基因表达调控[J]. *畜牧与兽医*, 2010,42(10):97-100.
Xia LM, Chen Q, Yan YX. Stx phage genome structure and gene expression regulation[J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010,42(10):97-100.
- [46] Tomat D, Mercanti D, Balagué C, Quiberoni A. Phage Biocontrol of Enteropathogenic and Shiga Toxin - Producing *Escherichia Coli* During Milk Fermentation[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2013,57(1):3-10.

第二篇 研究内容

第三章 羊源产志贺毒素大肠杆菌的毒力因子检测和强弱毒株评估

摘要：产志贺毒素大肠杆菌是一种食源性致病菌，主要的毒力基因包括 *stx*、*eae*、*exhA* 等。不同的 STEC 因毒力因子分布不同以及 *stx* 亚型不同，从而引发不同程度的临床症状。本研究对 16 株羊源分离株所携带的毒力因子、*stx* 进行检测和亚型分型，尝试使用生物信息学方法对 STEC 进行亚型分析，后期使用 vero 细胞对这些菌株的志贺毒素致病性分析。结果发现，这 16 株羊源 STEC 均携带不同数量的毒力因子；*stx* 亚型分型结果显示 *stx1a* 亚型 4 株，*stx1c* 亚型 5 株，*stx2a* 亚型 1 株，*stx2c* 亚型 6 株，1 株未测定出来；vero 细胞毒性实验表明 4 株 STEC 毒力等级为++++，1 株 STEC 毒力等级为+++，4 株 STEC 毒力等级为++，7 株 STEC 毒力等级为+。综合这些分析，初步筛选出后续分离噬菌体所用的菌株。

关键词：产志贺毒素大肠杆菌；毒力因子；Vero 细胞毒性实验；本地版 BLAST

产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)是一种致病性大肠杆菌，因其基因组中携带志贺毒素而得名。STEC 其贮藏在反刍动物肠道内，贮藏宿主同时作为一种传播媒介，引起人类感染。一般通过受污染的牛羊肉、乳制品、即食蔬菜传播，亦可以通过人传人的方式进行传播是该病原体的流行特征^[1]。

志贺毒素 Shiga toxin (Stx)、溶血素 Hemolysin (Hly)、黏附素等均是引起 STEC 感染的毒力基因^[2]。其中，志贺毒素 Stx 作为已知的最强细菌毒素之一，可以分为志贺毒素 1 (*stx1*) 和志贺毒素 2 (*stx2*)^[3]，而后，根据 *stx1* 和 *stx2* 核苷酸序列的不同区域的变异可以将它们进一步主要分成 *stx1a*、*stx1c*~*stx1e*^[4]、*stx2a*~*stx2g* 等 10 种亚型，感染 *stx* 亚型不同的菌株会有不同的临床表现^[3]。目前主要通过普通 PCR 或者 qPCR 的方法对 STEC 菌株中携带的毒力因子进行检测以及 *stx* 亚型分型^[5]。B S Drasar 使用 vero 细胞研究志贺毒素的致病作用，至今仍被沿用^[6]。球果糖基神经酰胺是 *stx* 毒素的受体，Vero 细胞富含这种酰胺的优势使它们成为研究 STEC 感染的最理想的体外模型。

本研究通过 PCR 检测和 Vero 细胞毒性实验对 16 株羊源分离株的 *stx* 等毒力因子进行检测，并对 *stx* 进行亚型分型。使用生物信息学角工具建立了一个 STEC 的 *stx* 亚型基因序列资源库，可以通过使用本地版 BLAST⁺对测序的 STEC 所含有的 *stx* 的

亚型对进行区分，对 STEC 感染的预后和防控提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂

Green Taq MixDNA 聚合酶、DL2000 DNA maker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司、24 孔细胞培养板购自 TaKaRa 公司、蔡司倒置显微镜。培养消化细胞使用的血清和胰酶均来自的是 gibco 公司。引物由 Oligo 6 设计，擎科生物有限公司合成。

1.1.2 菌株和细胞

O157: H7 标准菌株 ATCC 43895，大肠杆菌 MC1061，Vero 细胞。本次实验 16 株细菌由江苏省疾控中心惠赠。所有分离株信息见表 3-1。

表 3-1 17 株 STEC 菌株信息

Table 3-1 Information of 17 STEC strains

菌株	来源	时间	分离地
EC928	羊粪	2019	盐城武烈
EC929	羊粪	2019	盐城武烈
EC930	羊粪	2019	盐城安丰
EC931	羊粪	2019	盐城安丰
EC932	羊粪	2019	盐城安丰
EC933	羊粪	2019	盐城安丰
EC934	羊粪	2019	盐城安丰
EC935	羊粪	2019	盐城安丰
EC936	羊粪	2019	盐城安丰
EC937	羊粪	2019	盐城安丰
EC938	羊粪	2019	盐城安丰
EC939	羊粪	2019	盐城安丰
EC940	羊粪	2019	盐城安丰
EC941	羊粪	2019	盐城安丰
EC942	羊粪	2019	盐城安丰
EC944	生羊肉	1999	丰县

1.1.3 生物信息学分析所用工具和代码

首先，在 NCBI 上搜索现有的完成测序的所有 stx 亚型核酸序列，截止到 2022 年 3 月，本研究共找到共 93 条，保存的文件格式为 FASTA。其次从 NCBI 官网下载本地版 BLAST+ linux 版本，安装后首先使用命令行格式化数据库:makeblastdb -in x.fasta -dbtype nucl -parse_seqids -out,这里 x 代表自己下载的数据，通过此条代码可以建立所需的 BLAST 资源库。再次输入命令行对未知的已测序 STEC 序列进行亚型分型检索: blast -query y.fasta -out y.blast -db x outfmt 6 -evalue 1e-5,这里的 y 代表需要检索的菌株基因序列。最终，从输出的 y.blast 文件信息中读取结果。

1.2 STEC 亚型分型及毒力基因检测

采用 PCR 方法检测 16 株羊源 STEC 菌株的毒力相关基因 stx, iha, efaI, saa, paa, subA, katP, toxB, ehxA, 引物及其反应条件的参考胡夏佩、郑晓凤等人的文献^[7~8]。

1.3 体外模型 vero 细胞评估 Stx 毒性作用

参考已有文献的方法,通过对 Vero 细胞的细胞毒性检测和溶血活性的检测共同评定 STEC 菌株的毒力大小^[7]。

Vero 细胞的细胞毒性实验：将冻存的菌株在 LB 琼脂平板上划线培养，挑取单菌落接种于 1ml LB 培养基中，37℃、180rpm 培养 8 小时，使用不超过 5000rpm 的转速离心 5min 后用 0.22 μm 滤器过滤除菌，得到的细菌滤液。

Vero 细胞培养于含有 10%胎牛血清的细胞营养液 DMEM 中，待细胞长满，将细胞代谢液倒出，用 PBS 洗 3 次，取 500ul 胰酶进行消化。消化后加入 12ml 含有 10%的胎牛血清，混匀后取 500ul 分别铺于 24 孔细胞板中，放置 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养。24 小时后，将细胞代谢液倒出，用 PBS 洗 3 次备用。

用 DMEM 培养液以 1:4 稀释度稀释细菌滤液，加入细胞孔中。本次实验的阳性对照是 O157:H7 标准菌株 ATCC 43895，阴性对照是 MC1061。并于 12、24 小时用倒置显微镜（40×目镜）观察并收集结果，并根据出现细胞病变时间与细胞病变程度与 ATCC43895 作为对照，评出++++（细胞病变程度与 ATCC43895 几乎一致，100%病变）、+++（细胞病变程度稍弱于 ATCC43895，75%病变）、++（细胞病变程度弱于 ATCC43895，50%病变）、+（轻微的细胞病变程度，25%病变）四个毒力等级。每株细菌做 3 次重复实验。

溶血活性实验：使用 4%的绵羊血配置血平板。用无菌接种环接种在血平板上，放置 37℃中，5%CO₂ 的恒温培养箱中培养 12 小时。每株菌做 3 次重复实验。

2 结果

2.1 STEC 分型及毒力基因检测结果

在检测的 16 株羊源 STEC 中，共有 5 株 STEC 具有 ehxA，7 株具有 Paa,通过测定 16 株 STEC 分离株的 stx 亚型，发现有 9 株属于 stx1，其中 stx1a 亚型 4 株，stx1c 亚型 4 株，1 株未测定出来；7 株属于 stx2 基因，stx2c 亚型 6 株，一株未测定出来。

（结果见图 3-1）。根据第一章综述中表格 1 所述，与致病有关的亚型有 stx1a、stx2a、stx2c，因此 EC928、EC929、EC930、EC931、EC933、EC936、EC938、EC939、EC940 更有可能与临床发病有关，而 EC932、EC934、EC935、EC937、EC941、EC942、EC944 则可能无关。

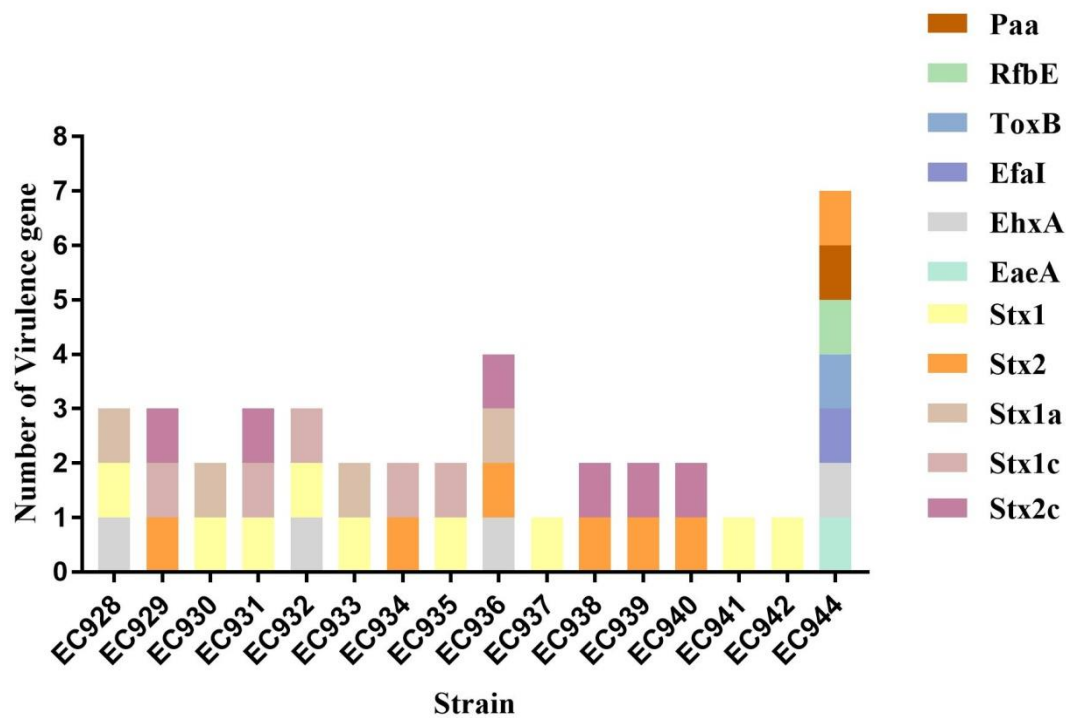


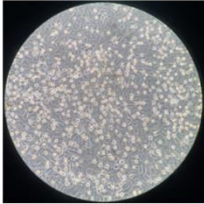
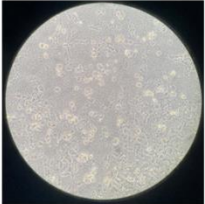
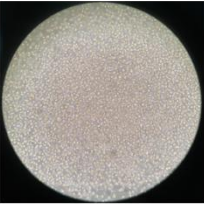
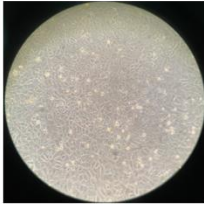
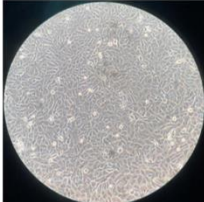
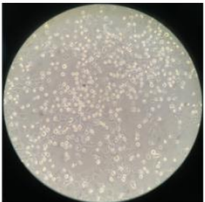
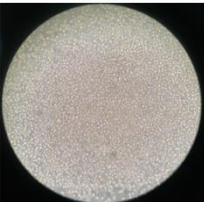
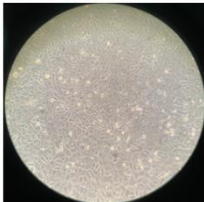
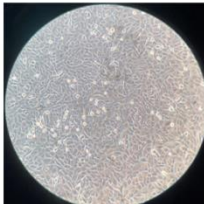
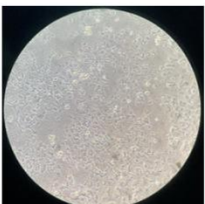
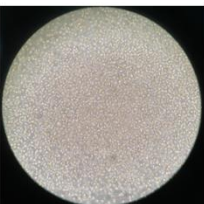
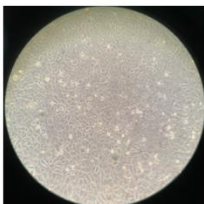
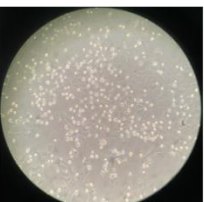
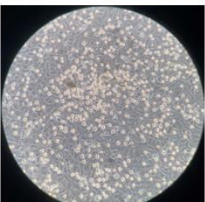
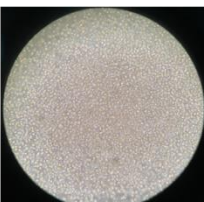
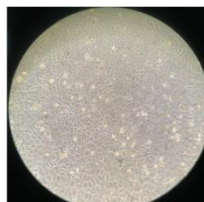
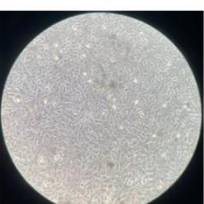
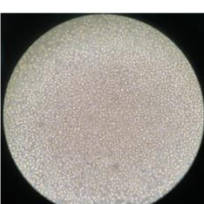
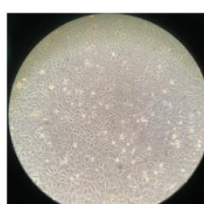
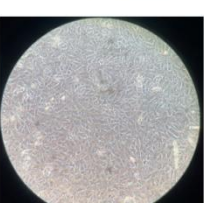
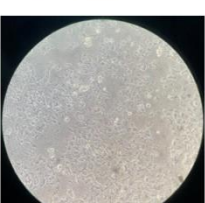
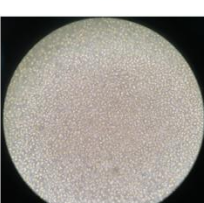
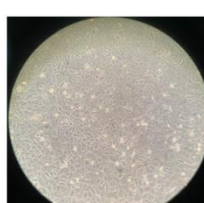
图 3-1 16 株 STEC 毒力基因分布

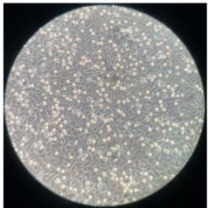
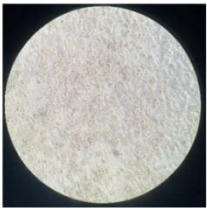
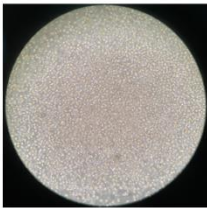
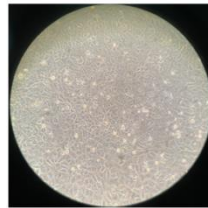
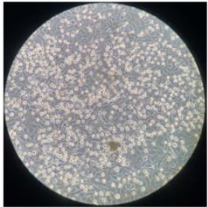
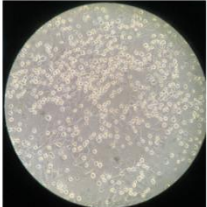
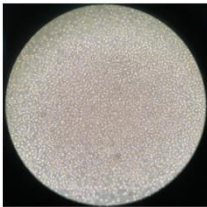
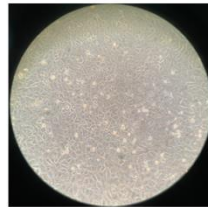
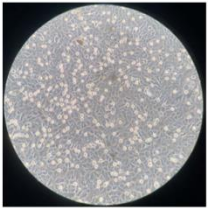
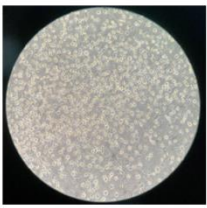
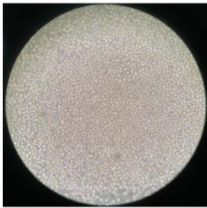
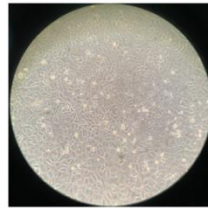
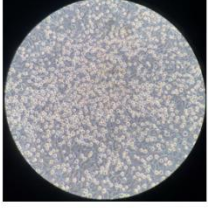
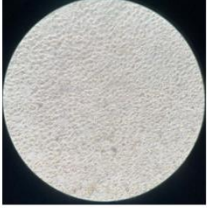
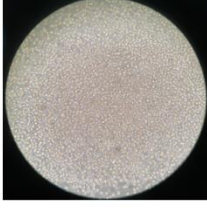
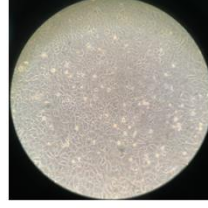
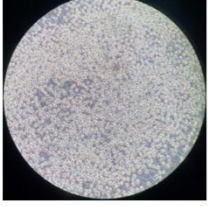
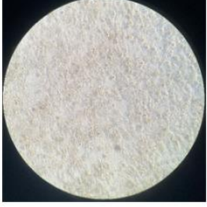
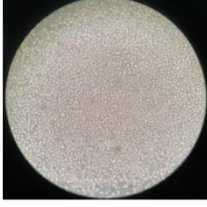
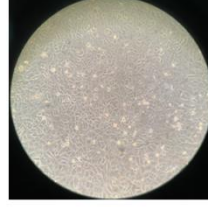
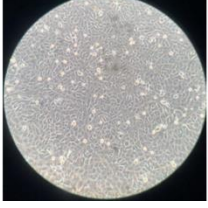
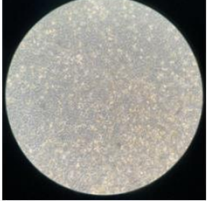
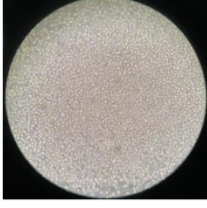
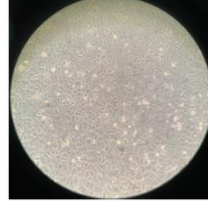
Figure 3-1 Distribution of virulence genes in 16 strains of STEC

2.2 STEC 菌株 Vero 细胞毒性和溶血活性检测结果

STEC 分离菌株的 Vero 细胞毒性检测结果见图 3-3，结果显示：阳性对照 ATCC 43985 滤液处理后的 Vero 细胞形态变圆皱缩，之后死亡，阴性对照 MC1061 滤液处理后的 Vero 细胞形态基本保持正常(图 3-3)。以此作为对照，16 株 STEC 中，有 4 株 STEC 的 vero 细胞毒性等级为++++，细胞病变为 100%，分别是：EC935、EC936、

EC937、EC938； 有 1 株 STEC 等级为+++，细胞病变为 75%是 EC942，这 5 株 STEC 可能会造成比较严重的临床疾病；有 4 株 STEC 的 vero 细胞毒性等级为++，细胞病变为 50%，分别是 EC928、EC929、EC940、EC944 ；有 7 株 STEC 的 vero 细胞毒性等级为+，细胞病变为 25%，分别是 EC930、EC931、EC932、EC933、EC934、EC939、EC941。

菌株 Strain	作用时间 12h	作用时间 24h	阳性对照 ATCC43895 (++++)	阴性对照 MC1061 (-)	病变等级
EC928					++
EC929					++
EC930					+
EC931					+
EC932					+
EC933					+

EC934					+
EC935					++++
EC936					++++
EC937					++++
EC938					++++
EC939					+

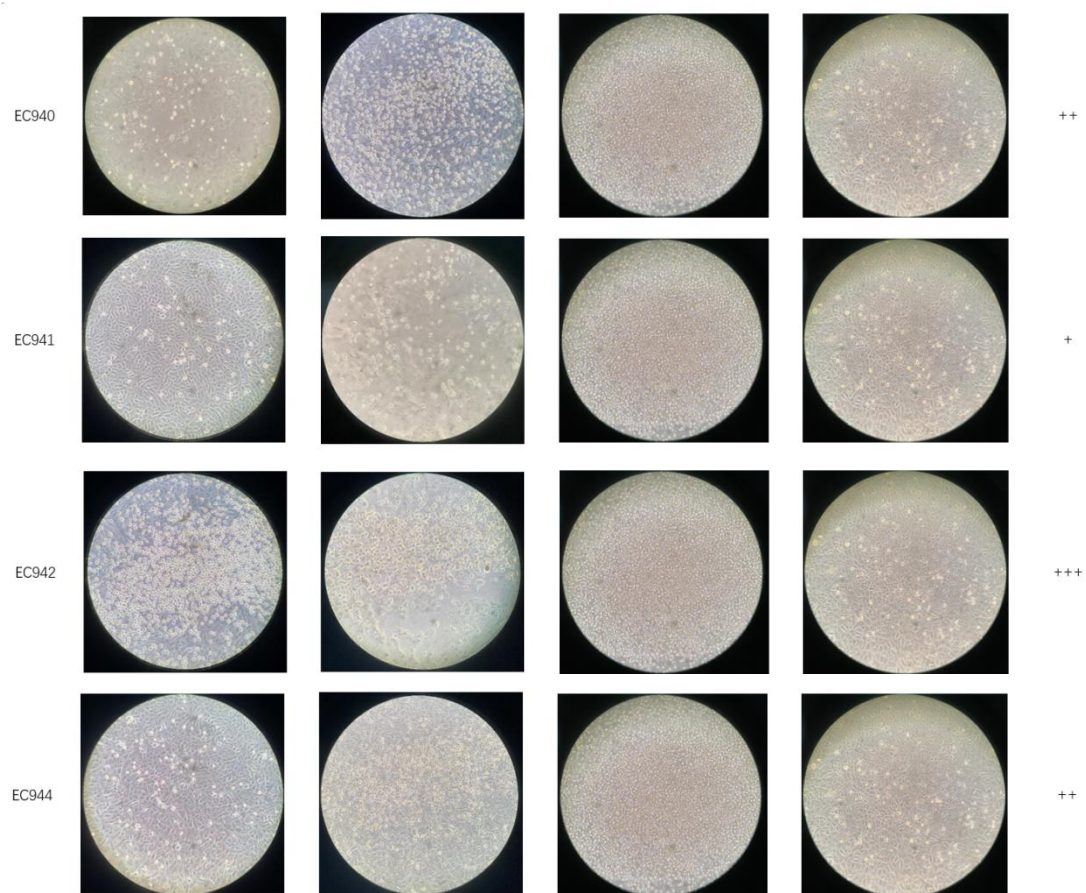


图 3-3 vero 细胞毒性实验显微镜观察结果

Figure3-3 Results of vero cytotoxicity experiment under microscope

溶血活性检测结果见图 3-4。结果可见： 阳性对照 ATCC 43985 形成明显的 β -溶血环，5 株 STEC 菌株有 β -溶血环，且溶血环大小不一，分别为 EC930、EC931、EC938、EC939、EC940，其余 11 株 STEC 细菌没有形成溶血环。

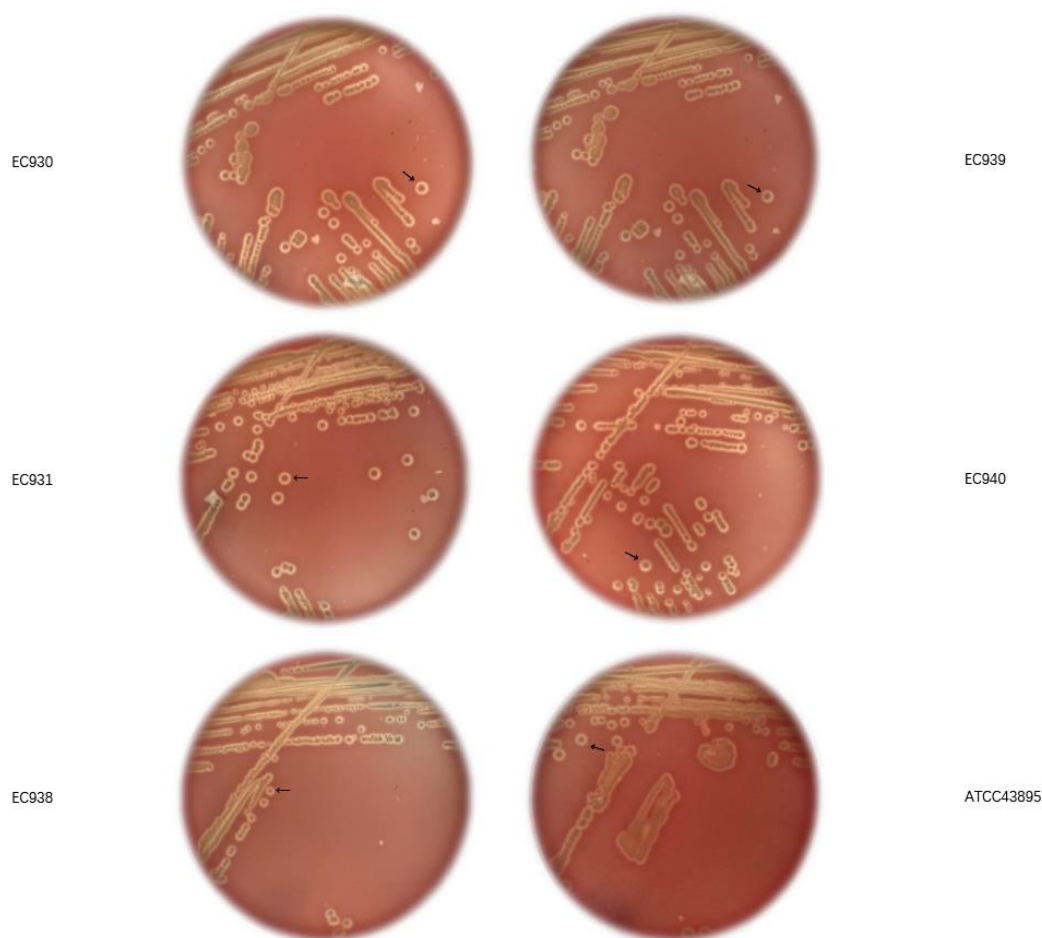


图 3-4 溶血实验结果

Figure 3-3 Results of hemolysis test

3 讨论

本研究，首先通过 PCR 鉴定 STEC 的亚型，其次 PCR 检测其毒力因子的分布，然后通过 Vero 细胞毒性实验和溶血活性测定，评估了其毒力等级。

产志贺毒素的大肠杆菌菌株已被确定为重要的食源性病原体和全球公共卫生威胁；它们大多与出血性结肠炎(HC)和溶血性尿毒综合征(HUS)等两种重要疾病有关^[9]。分析产志贺毒素大肠杆菌分离株的主要毒力特征，为临床筛选噬菌体开发养殖场环境消毒剂、制作 stx 毒素抗体进而对 STEC 感染的治疗和检测都具有重要意义^[10]。

使得产志贺毒素大肠杆菌备受关注源于其中的一种血清型—O157: H7，曾多次引起大范围公共卫生事件爆发，当时该血清型的菌株被认为是最重要的产志贺毒素大肠杆菌菌株^[11]。因此按照重视程度来区分 STEC 后，STEC 菌株被分为 O157:H7 和

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/167036006154010025>