

irradiation of *Taenia solium* metacestodes [J]. *Parasitol Res*, 2003, 90(3): 203-208.

[5] 陈治水, 贾丹兵, 聂志伟, 等. 灭囊灵对体外猪囊尾蚴的抑制作用和毒理学研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005, 8(5): 40-43.

[6] 郝艳红, 李庆章, 刘永洁, 等. 药物对猪囊尾蚴体外作用的比较研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2000, 16(2): 19.

[7] SOTELO J, ROSAS N. Freezing of infested pork muscle kills cysticerci [J]. *American Medicine Association*, 1986, 256(7): 893-894.

[8] 邓明, 哈益明, 严奉伟, 等. 冷却肉低剂量辐照后的理化和感官特性变化 [J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 121-126.

[9] 王培仁, 王中州, 张丁, 等. γ 射线对沙门氏菌属的辐照效应及保藏冻猪肉研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(5): 103-104.

[10] 马丽珍, 南庆贤, 戴瑞彤. 真空包装冷却猪肉低剂量辐照后的理化和感官特性变化 [J]. *农业工程学报*, 2003, 19(4): 184-187.

[11] 侯铮迟, 孙大宽, 秦宗英, 等. 高剂量辐照猪肉的挥发物、脂氧化和感官特征分析 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2005, 23(1): 35-39.

[12] 侯铮迟, 孙大宽, 秦宗英, 等. 猪肉高剂量辐照工艺及其营养变化 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2004, 22(6): 325-328.

[13] 徐艺青, 黄漫青, 董鸿雁, 等. 天然保鲜剂结合辐照保藏鲜猪肉的研究 [J]. *粮油加工*, 2003, 31(10): 82-83.

[14] 哈益明, 王锋, 李淑荣, 等. 辐照处理对冷却肉脂肪氧化影响的研究 [J]. *食品科学*, 2004, 25(11): 303-306.

论著

2005—2007 年我国食品中大肠埃希菌 O157 分离株 *tccP1* 基因的分布研究

白莉¹, 廖兴广², 张秀丽², 申志新³, 张淑红³, 郭云昌¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450016; 3. 河北省疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050021)

摘要:目的 了解我国 2005—2007 年食源性疾病监测网分离的大肠埃希菌 O157 分离株中 *tccP1* 基因的分布情况及特点。方法 对 89 株食源性大肠埃希菌 O157 分离株运用 PCR 方法进行检测。结果 *tccP1* 基因的阳性率为 55.1%。结论 *tccP1* 基因广泛存在于 O157: H7 大肠埃希菌中, 在 O157: 非 H7 中检出率很低。其分布与 *eaeA* 基因的携带情况具有一定的相关性, 与志贺毒素基因携带没有相关性。

关键词: 大肠埃希菌 O157; *tccP1*; 粘附抹平效应

中图分类号: R378. 21 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)03-0214-04

Distribution of *tccP1* gene in *Escherichia coli* O157 isolated from foods in 2005—2007

Bai Li, Liao Xingguang, Zhang Xiuli, Shen Zhixin, Zhang Shuhong, Guo Yunchang (National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To determine the distribution of *tccP1* gene in *Escherichia coli* O157 isolates collected by the National Foodborne Disease Surveillance System from 2005 to 2007. **Methods** PCR was applied to detect the genes of 89 isolates of *E. coli* O157. **Results** The isolates carrying *tccP1* accounted for 55.1%. **Conclusion** The *tccP1* gene was widely present in O157: H7 strains but scarcely present in O157: non-H7 strains. There were some associations of the distribution of *tccP1* gene with *eaeA* gene but no association with shiga toxin gene carried by *Escherichia coli* O157.

Key words: *Escherichia coli* O157; *tccP1*; attaching and effacing lesions

收稿日期: 2010-11-23

作者简介: 白莉 女 博士生 助理研究员 研究方向为食品微生物学

通信作者: 郭云昌 男 副研究员 E-mail: yunchangguo@yahoo.com.cn

肠致病性大肠埃希菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) 和肠出血性大肠埃希菌 (enterhemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC), 在细菌粘附细胞周围形成肌动蛋白聚集的杯垫样结构来粘附并定植在肠道粘膜上, 完成侵入宿主细胞的第

一步。同时,被感染的肠道粘膜上皮细胞刷状缘脱落并失去微绒毛,这种特殊的病理损伤过程,称为粘附抹平效应(attaching and effacing lesions, A/E 效应),该效应由 LEE 毒力岛(locus of enterocyte effacement pathogenicity island)编码的Ⅲ型分泌系统的效应蛋白完成^[1-2]。内毒素受体偶联细胞骨架蛋白 1(Tir couple cytoskeleton protein 1, TccP1)是近年研究新发现的肠出血性大肠埃希菌 EHEC O157:H7 致病分子,是由 LEE 毒力岛外的前噬菌体 CP-933U 编码的,它经 LEE 毒力岛编码的Ⅲ型分泌系统转入宿主细胞内,结合并活化宿主蛋白神经威奥综合症蛋白(neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein, N-WASP),引起肌动蛋白的聚集,最终诱导特征病理改变 A/E 损伤的形成^[3]。*espJ* (*E. coli*-secreted protein J)基因位于前噬菌体 CP-933U 的 5'端,与 *tccP1* 基因在同一个操纵子上^[4]。在体内试验中,该基因编码的蛋白影响了肠道上皮细胞清除致病菌的动力,有助于致病菌在宿主体内的存活和传播。但是 *EspJ* 蛋白对于 *TccP1* 蛋白的作用还不是很清楚。国内外已有关于临床分离的大肠埃希菌 O157 菌株 *tccP1*、*espJ* 基因研究的相关报道^[4]。且在部分非 O157 肠出血性大肠埃希菌和肠致病性大肠埃希菌中也发现该基因。本研究对国家食源性致病菌监测网分离的 89 株大肠埃希菌 O157 中 *tccP1*、*espJ* 基因进行检测,为了解其分布情况、特点以及其在致病中发挥的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

2005—2007 年国家食源性致病菌监测网 22 个省、自治区和直辖市分离的 89 株大肠埃希菌 O157 由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所食源性疾病监控室鉴定保存^[5]。其中 42 株是 O157:H7, 6 株是携带 *flic_{H7}* 基因、无动力的 O157:NM, 19 株是不携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 和 22 株 O157:hund^[5]。

1.2 试剂和仪器

DNA 提取试剂盒(天根 tgDP304-02), 2xTaq PCR MaterMix(天根 KT201-02), PCR 仪(美国 Bio-Rad Peltier Thermal cycler Tetrad® 2), 电泳仪(美国 Bio-Rad), 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad GEL Doc 2000)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备 DNA 模板

按照天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取实验菌株 DNA 模板,置于

-20℃ 保存。

1.3.2 PCR 方法

tccP1^[4]、*espJ*^[4]、*tir_{EPEC}*^[6] 和 *tir_{EHEC}*^[6] 引物序列见表 1,由上海生物工程公司合成。PCR 循环参数为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,退火温度见表 1,30 s,72℃ 1 min/kbp,共 30 个循环;延伸 72℃ 10 min。阳性对照为大肠埃希菌 O157:H7 EDL933、大肠埃希菌 O127:H6 E2348/69,阴性对照为大肠埃希菌 DH5a (K-12)。

表 1 检测基因引物序列及产物长度
Table 1 Oligonucleotides sequence and length of primers for detected genes

引物名	序列	长度 (bp)	退火温度(℃)
<i>tccP1</i> ^[4]	5- ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT -3	1150	58
	5- TCACGAGCGCTTAGATGATTAATG -3		
<i>espJ</i> ^[4]	5- ATGTCAATTATAAAAACTGCTTATC -3	650	60
	5- TTTTGTGAGAGGATATATGTCAAC-3		
<i>tir_{EHEC}</i> ^[6]	5- TCTGTTTCTGAGATATGGGAATA -3	400	56
	5- TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT -3		
<i>tir_{EPEC}</i> ^[6]	5- CATATTTATGATGAGGTCGCTG -3	400	46
	5- TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT -3		

1.3.3 产物检测

取 5 μl 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色后凝胶成像系统记录并保存结果。

2 结果

2.1 *tccP1* 基因在大肠埃希菌 O157 的分布

在检测的 89 株大肠埃希菌 O157 中,共有 49 株菌检测到 *tccP1*、*espJ* 基因,阳性率均为 55.1%。在 42 株 O157:H7 和 6 株携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 均检测到 *tccP1*、*espJ* 基因,阳性率为 100%;在 19 株不携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 中,仅检测到 1 株携带 *tccP1*、*espJ* 基因,阳性率为 5.3%;在 22 株 O157:hund 中,没有检测到该基因。见表 2。*rfb_{O157}*、*flic_{H7}*、*hlyA*、*eaeA*、*stx* 基因的检测结果见文献[5]。

2.2 *tccP1* 基因在携带志贺毒素基因菌株的分布

在 29 株携带志贺毒素基因的菌株里,其中 28 株 O157:H7 菌株和 1 株携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 菌株均检测到 *tccP1*、*espJ* 基因。见表 2。

2.3 *tccP1* 基因与 LEE 毒力岛分布的关系

菌株携带 *eaeA* 基因间接反映携带 LEE 毒力岛。在检测的 89 株菌株中,共有 52 株菌检测到 *eaeA* 基因,其中在 42 株 O157:H7 和 6 株携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 均携带了 *tccP1* 基因,一致性较高。但是在另外 4 株携带 *eaeA* 基因的 O157:非 H7 菌株中,仅有 1 株不携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 携带有 *tccP1* 基因。见表 2。

表 2 *tccP1* 基因在 89 株食品来源的 O157 大肠埃希菌分布情况
Table 2 Distribution of *tccP1* gene in 89 isolates of *E. coli* O157 from foods

O157大 肠埃希菌	年份	省份	来源	<i>tccp1</i>	<i>espJ</i>	<i>tir_{EHEC}</i>	<i>tir_{EPEC}</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx</i>	O157大 肠埃希菌	年份	省份	来源	<i>tccp1</i>	<i>espJ</i>	<i>tir_{EHEC}</i>	<i>tir_{EPEC}</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx</i>	
O157: H7	2005	河北	生羊肉	1	1	1	0	1	1	O157: NM (<i>flic_{H7}</i> 基因检测为 阴性没有动 力)	2006	河南	生牛肉	1	1	1	0	1	0	
	2005	河北	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2007	河北	生牛肉	1	1	1	0	1	0	
	2005	河北	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2005	内蒙	生猪肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河北	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河北	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生牛肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生猪肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	0		2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0	
	2005	四川	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2006	河北	生羊肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	四川	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2006	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	四川	生猪肉	1	1	1	0	1	0		2006	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	四川	生猪肉	1	1	1	0	1	0		2007	安徽	其他	0	0	0	0	0	0	0
	2005	四川	生鸡肉	1	1	1	0	1	0		2007	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	内蒙	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2007	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	内蒙	生牛肉	1	1	1	0	1	1		2007	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2005	广西	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	0
	2006	河北	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	湖北	生鸡肉	1	1	0	1	1	1	0
	2006	河北	生猪肉	1	1	1	0	1	1		2007	重庆	生鸡肉	0	0	0	0	0	0	0
	2006	福建	生羊肉	1	1	1	0	1	1		O157: hund	2005	陕西	生猪肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	广西	生鸡肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	陕西	生鸡肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	内蒙	生羊肉	0	0	0	1	1	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	内蒙	生猪肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	四川	生鸡肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	四川	生牛肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	陕西	生猪肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	陕西	其他	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2005	吉林	生牛肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2006	内蒙	生羊肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2006	河南	生羊肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2006	河南	生猪肉	0	0	0	0	0	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2006	河南	生羊肉	0	0	0	1	1	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1			2006	河南	生牛肉	0	0	0	1	1	0
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2006	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	广东	生猪肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	福建	生牛肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	内蒙	生猪肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	湖北	生猪肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	河南	生羊肉	1	1	1	0	1	1		2007	重庆	生牛肉	0	0	0	0	0	0	
	2006	陕西	生羊肉	1	1	1	0	1	0		合计				49	49	48	4	52	29
	2006	广西	其他	1	1	1	0	1	1											
2006	内蒙	生羊肉	1	1	1	0	1	1												
2007	吉林	生猪肉	1	1	1	0	1	1												
2007	河北	生羊肉	1	1	1	0	1	1												
2007	陕西	生羊肉	1	1	1	0	1	0												
2007	宁夏	凉拌菜	1	1	1	0	1	1												
2007	宁夏	生羊肉	1	1	1	0	1	1												
2007	河南	其他	1	1	1	0	1	0												
2007	江苏	凉拌菜	1	1	1	0	1	0												
2007	江苏	凉拌菜	1	1	1	0	1	1												
2007	福建	生羊肉	1	1	1	0	1	0												

2.4 *tccP1* 基因与 *tir_{EPEC}* 和 *tir_{EHEC}* 基因分布的关系

在 49 株 *tccP1* 基因阳性菌株中,其中 48 株菌携带 *tir_{EHEC}* 基因,仅有 1 株菌携带 *tir_{EPEC}* 基因,该菌为 O157: NM。见表 2。

2.5 *tccP1* 基因在不同来源的食品中的分布

在不同的食品种类中分离的 49 株 O157 大肠埃希菌均检测到了 *tccP1* 基因。分别分离于 25 份

生羊肉,10 份生牛肉,5 份生猪肉,4 份生鸡肉,3 份凉拌菜及 2 份其他食品中。见表 2。

2.6 *tccP1* 基因在不同地区和时间分离菌株中的分布

在 2005 年,共在 5 个省的 22 株菌中检出 *tccP1* 基因;在 2006 年,共在 6 个省的 16 株菌中检出 *tccP1* 基因;在 2007 年,共在 8 个省的 11 株菌中检

出 *tccP1* 基因。见表 2。

3 讨论

tccP1 基因位于前噬菌体 CP-933U 上,该基因编码的 TccP1 蛋白是肠出血性大肠埃希菌 EHEC O157:H7 引起肌动蛋白聚集细菌自身的效应蛋白。在非 O157 肠出血性大肠埃希菌和肠致病性大肠埃希菌中,也发现 *tccP1* 基因^[7]。我们的研究发现 *tccP1*、*espJ* 基因部分分布于食品来源的大肠埃希菌 O157 中。其中,所有的 O157:H7 菌株和携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 中都检测到了 *tccP1*、*espJ* 基因,与先前国际报道的结果一致^[4]。在我国,*tccP1* 基因在食品中检出数的顺序依次是生羊肉、生牛肉、生猪肉、生鸡肉。与先前发表的文章中 O157:H7 检出率顺序是一致的^[5]。国外研究发现,牛是 O157:H7 菌株最主要的宿主动物。在我国青岛市零售市场研究也发现牛肉是最主要的检出食品^[8],河南省在家禽家畜的研究结果显示羊是 O157 大肠埃希菌的最主要的来源^[9]。这可能与我们的菌株来源于全国不同地区有关,但主要来自于生畜肉。所以,*tccP1* 基因的检出与不同来源、不同地区、不同年代分离的菌株并没有直接的关系,关键是看是否是 O157:H7 菌株或携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM 菌株。且我们的研究发现,在 O157:H7 菌株中,*tccP1* 基因与是否携带了志贺毒素基因没有关系,与 *eaeA* 基因却有很高的相关性。在 O157:非 H7 菌株中,*tccP1* 基因的检出率很低。典型的肠出血性大肠埃希菌 EHEC O157:H7 菌株和典型的肠致病性大肠埃希菌 EPEC O127:H7 菌株分别运用 Tir_{EHEC}-TccP1 途径和 Tir_{EPEC}-Nck 途径来激活 N-WASP 蛋白,引起肌动蛋白的聚集,完成侵入宿主细胞的第一步^[7]。国外学者通过分析大量临床和环境中的菌株发现,某些菌株既具有 EPEC 样的 Tir,也具有 TccP1 蛋白,此类菌株能够同时使用 Tir-Nck 和 Tir-TccP1 两种途径引起肌动蛋白的聚集^[10]。有趣的是,在我们的检测中也发现了 1 株这样的菌株,该菌株为不携带 *flic_{H7}* 基因、无动力 O157:NM,与一般大肠埃希菌 O157 不同的是,该菌株携带 *tir_{EPEC}* 基因,且同时检测到 *tccP1* 基因,说明该菌株可能同时使用 Tir_{EHEC}-TccP1 和 Tir_{EPEC}-Nck 两种途径引起肌动蛋白的聚集。此菌株是否具有较其他菌株更强的致病

性,还需进一步研究。

综上所述,我国食品来源的大肠埃希菌 O157 分离株中,携带了不同的毒力基因。应进一步加强食品中大肠埃希菌 O157 的监测,为制定有效的防治措施提供更多科学依据。

致谢:感谢北京、上海、重庆、吉林、内蒙古、山东、河南、陕西、湖北、江苏、浙江、福建、广东、广西、河北、四川、安徽、宁夏、甘肃、湖南、辽宁、江西等 22 个省、自治区和直辖市参与全国食源性疾病监测的全体同志。

参考文献

- [1] NATARO J P, KAPER J B. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11:142-201.
- [2] FRANKEL G, PHILLIPS A D, ROSENSHINE I, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* more subversive elements [J]. Mol Microbiol, 1998, 30 (5): 911-921.
- [3] GARMENDIA J, PHILLIPS A D, CARLIER M F, et al. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin cytoskeleton [J]. Cell Microbiol, 2004, 6 (12): 1167-1183.
- [4] GARMENDIA J, REN Z, TENNANT S, et al. Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (11): 5715-5720.
- [5] 白莉,刘秀梅,付萍,等. 2005—2007 年我国食品中疑似 O157 大肠埃希菌的鉴定及毒素基因的检测[J]. 卫生研究, 2010, 39 (3): 335-338.
- [6] OOKA T, VIEIRA M A, OGURA Y, et al. Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271 (1):126-135.
- [7] FRANKEL G, PHILLIPS A D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal [J]. Cell Microbiol, 2007, 10 (3):549-556.
- [8] PATON A W, PATON J C. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx₁*, *stx₂*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb_{O157}*, and *rfb_{O111}* [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:598-602.
- [9] 夏胜利,沈刚健,靳会娟,等. 河南省新发传染病 EHEC O157:H7 监测研究 [J]. 现代预防医学, 2008, 35 (23): 4691-4694.
- [10] WHALE A D, GARMENDIA J, FRANKEL G, et al. A novel category of enteropathogenic *Escherichia coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodeling [J]. Cell Microbiol, 2006, 8 (6):999-1008.