

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.034.html>

◇基础医学研究◇

肠出血性大肠杆菌 O157 : H7 z0986-z1444 双缺失突变株构建

苏莉^{1,2}, 王建新², 陈芳红², 李 颖², 黄 洁², 李 涛², 王 慧²

摘要 目的 采用 Red 重组方法敲除肠出血性大肠杆菌 (EHEC) O157 : H7 z0986 和 z1444 基因, 构建双缺失突变株。方法 首先构建 z0986、z1444 打靶片段; 其次以电击法转化感受态细胞, 之后通过 PCR 鉴定所得菌株; 最终所得阳性单克隆测定生长曲线。结果 z1444 单基因缺失突变株 ($\Delta z1444/933$) 及 z0986-z1444 双基因缺失突变株 ($\Delta z0986/\Delta z1444/933$) 构建成功, 其生长曲线与野生型 EHEC O157 : H7 差异均无统计学意义。结论 z0986 与 z1444 基因缺失对 EHEC 的生长无影响。构建 $\Delta z1444/933$ 及 $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ 为深入研究 z1444 基因的功能及作用机制奠定了基础。

关键词 肠出血性大肠杆菌; Red 重组系统; 三型分泌系统

中图分类号 Q 939.93

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0155-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.001

肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 属于产志贺毒素病原菌, 可造成肠上皮屏障的黏附/消除 (A/E) 损伤, 引起胃肠道疾病和溶血尿毒综合征 (hemolytic uremic syndrome, HUS), 其最常见的血清型为 O157 : H7^[1]。志贺毒素是 EHEC O157 : H7 最主要的致病因子, 但不是唯一的效应分子, 现已鉴定出许多其他参与 A/E 损伤过程的蛋白分子, 既包括肠细胞脱落位点毒力岛 (locus of enterocyte effacement, LEE) 编码的蛋白, 也包括非 LEE 编码的蛋白 Nle^[2-5]。这些效应蛋白主要通过致病菌的三型分泌系统 (T3SS) 进入宿主细胞, 导致被感染细胞骨架重排, 感染部位形成典型的基座样结构, 感染局部微绒毛脱落 (即形成 A/E 损伤)^[6-8]。NleC (z0986 基因编码) 是参与该过程的

效应分子之一, 具有非金属蛋白酶活性, 可特异性切割 NF- κ B 的 p65 亚基, 阻断宿主固有免疫应答信号通路, 帮助 EHEC O157 : H7 逃避免疫监视^[9]。NleP (z1444 基因编码) 的相关研究较少, 有报道^[10]证实该蛋白具有磷酸激酶活性。磷酸化/去磷酸化作用是 NF- κ B 信号通路的重要调节方式, 因此, 关注 NleP 是否属于 T3SS 效应蛋白, 是否参与 NF- κ B 信号途径的调控以及是否与 NleC 存在协同或拮抗效应可能为 EHEC 致病机制的研究提供新思路。该试验采用 Red 重组系统获得了 z1444 单基因缺失突变株及 z1444/z0986 双基因缺失突变株, 为 NleP 蛋白功能及其作用机制研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 pEASY-T1 simple 载体、pKD46 质粒 (含氨苄青霉素抗性基因)、pCP20 质粒 (含卡那霉素抗性基因)、含卡那霉素抗性基因质粒 pUC19-kana (军事医学科学院微生物流行病学研究所保存); EHEC O157 : H7 EDL933 菌株 (本室保存); DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞 (北京 TransGen 生物技术有限公司)。

1.1.2 引物设计 PCR 引物由中美泰和生物技术有限公司合成 (表 1)。

1.1.3 主要试剂 Hind III、Sal I、BamH I、EcoR I、Dpn I 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶 (美国 NEB 公司); 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒 (北京 TransGen 生物技术有限公司)。

1.1.4 主要仪器 2 mm 电转杯、GenePulser X cell 电穿孔仪 (美国 Bio-Rad 公司); PE-2400 PCR 仪 (美国 PE 公司); 恒温振荡摇床 (太仓市实验设备厂); SpectroPlus 全自动酶联免疫检测仪 (美国 MD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 z0986、z1444 打靶片段构建 基因调取及

2016-10-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81401643); 国家重点基础研究计划 (编号: 2015CB554202)

作者单位: ¹ 安徽医科大学, 合肥 230032

² 军事医学科学院微生物流行病学研究所、病原微生物与生物安全国家重点实验室微生物组学与生物信息学研究室, 北京 100071

作者简介: 苏莉, 女, 硕士研究生;

王慧, 女, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: gen0109@vip.sina.com

T-A 克隆:以 EHEC O157 : H7 EDL933 菌株为模板、分别以 z0986U-Hind III /z0986U-Sal I 和 z0986D-BamH I /z0986D-EcoR I 为引物,扩增 z0986 基因上、下游约 500 bp 的同源臂序列,所得片段分别与克隆载体 pEASY-T1 simple 连接,获得 pEASY-T1-z0986-up 质粒和 pEASY-T1-z0986-down 质粒(即 2 种 T-A 克隆质粒)。将这 2 种质粒及 pUC19-kana^r 质粒分别转化 DH5 α 感受态细胞,经克隆后提取 pEASY-T1-z0986-up 质粒、pEASY-T1-z0986-down 质粒和 pUC19-kana^r 质粒。酶切处理及目的片段回收、连接:用 Hind III /Sal I 双酶切 pEASY-T1-z0986-up 质粒、BamH I /EcoR I 双酶切 pEASY-T1-z0986-down 质粒,Sal I /BamH I 双酶切 pUC19-kana^r 质粒。目的片段经凝胶回收后进行体外连接,获得含打靶片段的质粒(pUC19-z0986-up-kana^r-z0986-down)。打靶片段扩增:以上述质粒为模板、z0986U-Hind III /z0986D-EcoR I 为引物扩增打靶片段 z0986-up-kana^r-z0986-down (z0986-ukd)。z1444-up-kana^r-z1444-down (z1444-ukd) 打靶片段构建流程同上。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
z0986U-Hind III	AAGCTTGGTTTGATTTCTTCAGAAAT
z0986U-Sal I	GTCGACGTTTATATCTAATACCCTGC
z0986D-BamH I	GGATCCTTCGTCTTTGCAGTGACATA
z0986D-EcoR I	GAATTCGATAGATTAATAAAAAACAC
z1444U-Hind III	AAGCTTTCACCGCCCTGGTGAGTAA
z1444U-Sal I	GTCGACTCATGAAAAAGCGCGAGGA
z1444D-BamH I	GGATCCCCCTTACCTCCGAGATAGT
z1444D-EcoR I	GAATTCAGAGATCGCGCCTGATTCT
kana-Sal I	GTCGACAGCGATTGTGTAGGCTGGAG
kana-BamH I	GGATCCATGGGAATTAGCCATGGTCCA
exoF (pKD46)	ATGACACCGGACATTATCC
exoR (pKD46)	CAATTCAGCCACTGCCTC

1.2.2 pKD46 质粒转化野生型 EHEC O157 : H7 EDL933 将复苏的 EHEC O157 : H7 EDL933 以 1 : 100 的比例接入 5 ml 新鲜 LB 培养基,37 ℃、200 r/min 条件下培养至 600 nm 处的光密度(optical clinsity ,OD)值即 OD₆₀₀ 值约为 0.5 时取出,冰浴 15 min,4 ℃ 条件下 5 000 r/min 离心 2 min,富集菌体。用预冷的 10% 甘油洗涤菌体 3 次(离心条件均为 4 ℃、5 000 r/min、2 min)。富集所得菌体用 100 μ l 预冷的 10% 甘油重悬,冰浴 15 min,加入 200 ng pKD46 质粒,充分混匀后转入 2 mm 电转杯,进行电转化。之后 30 ℃、200 r/min 复苏培养 1 h,取 100

μ l 菌液均匀涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 固体平板,30 ℃ 培养过夜,次日挑单克隆,做 PCR 鉴定。阳性菌株(pKD46/933)用 50% 甘油保菌(菌液与 50% 甘油体积比为 4 : 1)。

1.2.3 z1444 目的基因敲除 将复苏的 pKD46/933 菌株按 1 : 100 的比例接入 5 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,30 ℃、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.3 时,加入 80 μ l 1 mol/L 阿拉伯糖,30 ℃、200 r/min 诱导表达至 OD₆₀₀ 值约为 0.6 时取出,制备感受态细胞(方法同 1.2.2)。在所得感受态细胞中加入 200 ng z1444-ukd 打靶片段,电击转化,37 ℃、200 r/min 复苏培养 1 h,取 100 μ l 菌液均匀涂布于含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板,37 ℃ 培养过夜,次日挑单克隆,做 PCR 鉴定,阳性菌株(pKD46/z1444-ukd/933)用 50% 甘油保菌。

1.2.4 单基因缺失突变株中卡那霉素抗性基因敲除 将复苏的 pKD46/z1444-ukd/933 菌株按 1 : 100 的比例接入 5 ml 含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基,37 ℃、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.5 时取出,制备感受态细胞(方法同 1.2.2)。所得感受态细胞与 200 ng pCP20 质粒混匀,进行电击转化,之后 30 ℃、200 r/min 复苏培养 1 h,取 100 μ l 菌液涂布于 100 μ g/ml 氨苄青霉素、40 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板,30 ℃ 培养过夜,次日挑单克隆,接种于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素、40 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中,30 ℃ 培养过夜,次日按 1 : 100 接入新鲜无抗性的 LB 培养基,42 ℃、200 r/min 培养 6 h。取 100 μ l 菌液在 LB 平板上划线分离单菌落,37 ℃ 培养约 30 h,挑单克隆,进行 PCR 鉴定,阳性克隆(Δ z1444/933)用 50% 甘油保菌。

1.2.5 pKD46 质粒转化 Δ z1444/933 方法同 1.2.2。

1.2.6 z0986 目的基因敲除 方法同 1.2.3。

1.2.7 双基因缺失突变株中卡那霉素抗性基因敲除 方法同 1.2.4。最终所得阳性克隆(Δ z0986/ Δ z1444/933)用 50% 甘油保菌。

1.2.8 Δ z0986/ Δ z1444/933 生长曲线测定 将复苏的 EHEC O157 : H7 野生株与 Δ z1444/933 单基因缺失突变株及 Δ z0986/ Δ z1444/933 双基因缺失突变株分别按 1 : 100 的比例接种至 10 ml 新鲜的 LB 培养基,37 ℃、200 r/min 培养 600 nm 处的光密度值。每隔 1 h 各取 200 μ l 测定 OD₆₀₀ 值。每株菌做 3 个平行。以时间为横轴、OD₆₀₀ 值为纵轴,将所得数据绘制成生长曲线。

2 结果

2.1 z0986、z1444 打靶片段构建结果 分别以 z0986U-Hind III /z0986D-EcoR I、z1444U-Hind III /z1444D-EcoR I 为引物扩增 z0986 和 z1444 基因的打靶片段,见图 1。

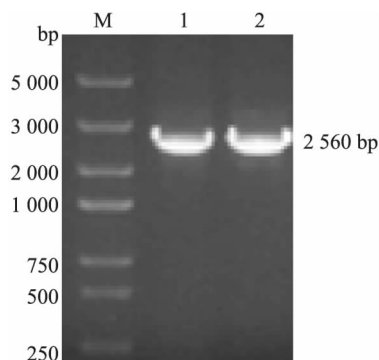


图 1 打靶片段构建

M:BM 5 000 DNA Marker; 1:z0986 基因打靶片段;2:z1444 基因打靶片段

2.2 pKD46 质粒转化 EHEC O157:H7 EDL 933 鉴定结果 pKD46 质粒转化 EHEC 后,挑单克隆,以 pKD46 质粒的 *exo* 基因为模板,设计引物(*exoF/exoR*),并用该引物做 PCR 鉴定所挑选的单克隆,见图 2。

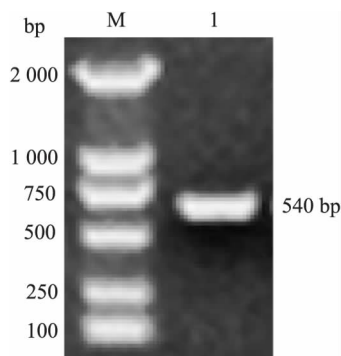


图 2 pKD46 质粒转化 EHEC 鉴定

M:BM 2 000 DNA Marker;1:阳性单克隆

2.3 z1444 单基因敲除 ($\Delta z1444/933$) 鉴定结果

以 z1444U-Hind III /z1444D-EcoR I 为引物,在 PCR 水平鉴定卡那霉素抗性基因敲除结果(图 3);同时,所得菌株分别在含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素和 40 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 平板上划线,进行抗生素敏感检测。PCR 鉴定正确且对这 2 种抗生素均敏感的即为阳性单克隆。 $\Delta z1444/933$ 的成功构建为 z1444 基因的功能研究奠定了基础。

2.4 pKD46 质粒转化 $\Delta z1444/933$ 鉴定结果

pKD46 质粒转化 $\Delta z1444/933$ 后,以 *exoF/exoR* 为引物做 PCR 鉴定挑选的单克隆,见图 4。

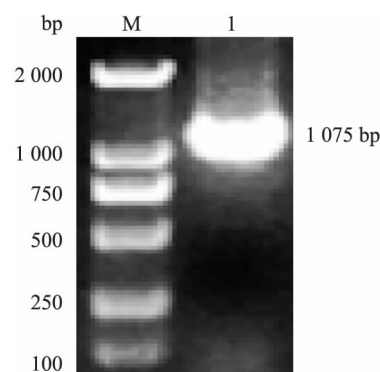


图 3 z1444 单基因敲除鉴定

M:BM 2 000 DNA Marker;1:阳性单克隆

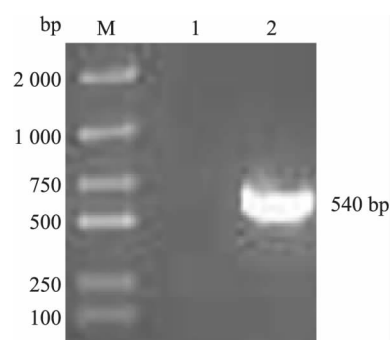


图 4 pKD46 质粒转化 $\Delta z1444/933$ 鉴定

M:BM 2 000 DNA Marker;1:1 号单克隆(假阳性);2:2 号单克隆(阳性)

2.5 z0986-z1444 双基因敲除 ($\Delta z0986/\Delta z1444/933$) 鉴定结果 以 z0986U-Hind III /z0986D-EcoR I 为引物,在 PCR 水平鉴定所选单克隆(图 5),同时,也需进行氨苄青霉素与卡那霉素敏感试验。PCR 鉴定正确且对 2 种抗生素均敏感的单克隆经定点测序显示最终所得突变株比野生株在这 2 个靶位

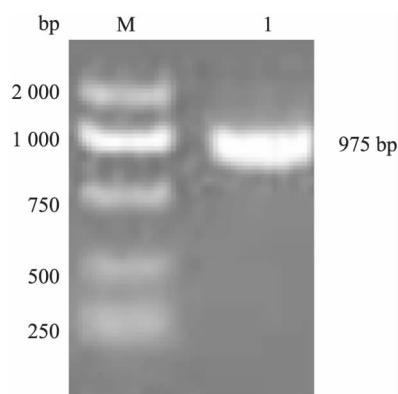


图 5 z0986-z1444 双基因敲除鉴定

M:BM 2 000 DNA Marker;1:阳性单克隆

点均减少了约 500 bp 的序列,表明 z0986-z1444 双基因缺失突变株构建成功。 $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ 的成功构建为 NleP 与 NleC 之间的相互作用研究奠定了基础。

2.6 $\Delta z1444/933$ 与 $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ 生长曲线测定结果 每隔 1 h 分别测定 3 种菌液在 600 nm 处的 OD 值,连续监测 24 h,以时间为横轴、OD 值为纵轴,绘制生长曲线。结果显示 2 种缺失突变株与野生型 EHEC 的生长趋势与生长速度差异无统计学意义,表明 z0986 和 z1444 基因缺失对 EHEC 的生长无影响。见图 6。

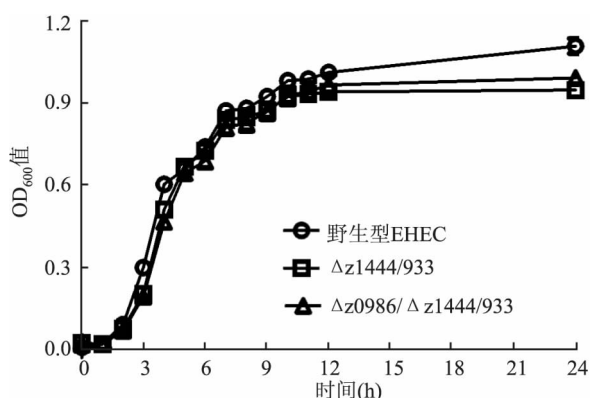


图 6 野生型 EHEC、 $\Delta z1444/933$ 、 $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ 生长曲线

3 讨论

NF- κ B 信号途径是哺乳动物体内的第一炎症通路,主要参与免疫应答、炎症反应、细胞分化相关的基因转录。既然 NF- κ B 途径在多种基因表达过程中发挥关键的调控作用,就不难理解许多病原菌进化出多种调控该信号通路的机制,从多方面、多层次干预该通路的信号转导,进而影响宿主的免疫应答事件,以逃避宿主免疫系统的攻击,利于自身长期存活。例如,目前已显示的 NleC 分子是由 EHEC、肠致病性大肠杆菌、柠檬酸杆菌等可造成 A/E 损伤的肠道病原菌通过 T3SS “转运”至宿主细胞,并直接抑制 NF- κ B 通路中的信号蛋白,从而切断感染信号向下游的传递。此外,非 LEE 毒力岛编码的其他效应分子会干预 NF- κ B 上游或下游的信号途径,从而间接阻断 NF- κ B 通路,如具有糖基转移酶活性的 NleB 通过抑制 GlcNAc 转移酶的活性阻断 NF- κ B 上游的信号通路,NleE 则通过抑制 RPS3 的活性阻断 NF- κ B 下游的信号通路^[7]。

磷酸化/去磷酸化作用是 NF- κ B 信号通路的重要调节方式,据此推测具有磷酸激酶活性的 NleP 可

能作为 T3SS 的效应分子参与 NF- κ B 的调控,因此构建该蛋白的单基因缺失突变株及其与 NleC 的双基因缺失突变株对于研究 z1444 基因的功能及作用机制有重要意义。

基因功能研究往往从两方面展开:其一,将目的基因与合适的载体连接,进行过表达,并观察试验对象的表型变化;其二,使用基因敲除的方法使靶基因沉默,观察表型变化,之后,将靶基因回补至试验对象,再观察相应的表型能否恢复,从而确定基因的功能。Red 重组技术作为常用的细菌基因打靶方法,具有重组率高、靶向性等优点,可在靶基因与外源 DNA 上的重组酶特异识别位点间进行基因的敲除、置换等操作,但步骤繁琐、耗时较长,且容易遗留标记基因,因此,靶基因被敲除之后需通过电转化 pCP20 辅助质粒至宿主,使其在 30 °C 条件下表达重组酶 FLP 并与卡那霉素抗性基因两端的重组酶识别位点 FRT 结合并除去抗性标记基因,但依然会有 FRT 位点残留。此外,为了尽可能减少外源基因对宿主菌的影响,在除去标记基因后,pKD46 与 pCP20 质粒的消除就显得十分重要,而这 2 种温敏型质粒的丢失需高温(约 42 °C)、长时培养(约 48 h)才可能实现,所以,抗生素敏感试验作为筛选最终阳性单克隆的条件是不可或缺的。

参考文献

- [1] Stearns-Kurosawa D J, Oh S Y, Cherla R P, et al. Distinct renal pathology and a chemotactic phenotype after enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga toxins in non-human primate models of hemolytic uremic syndrome[J]. Am J Pathol 2013, 182(4):1227-38.
- [2] Troutwine B R, Ghezzi A, Pietrzykowski A Z, et al. Alcohol resistance in *Drosophila* is modulated by the Toll innate immune pathway[J]. Genes Brain Behav 2016, 15(4):382-94.
- [3] Latz E, Xiao T S, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes[J]. Nat Rev Immunol 2013, 13(6):397-411.
- [4] Turco M M, Sousa M C. The structure and specificity of the type III secretion system effector NleC suggest a DNA mimicry mechanism of substrate recognition[J]. Biochemistry 2014, 53(31):5131-9.
- [5] Giogha C, Lung T W, Mühlen S, et al. Substrate recognition by the zinc metalloprotease effector NleC from enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Cell Microbiol 2015, 17(12):1766-78.
- [6] Fu K, Sun X, Zheng W, et al. Sam68 modulates the promoter specificity of NF- κ B and mediates expression of CD25 in activated T cells[J]. Nat Commun 2013, 4:1909.
- [7] Pearson J S, Hartland E L. The inflammatory response during enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection[J]. Microbiol Spectr 2014, 2(4):EHEC-0012-2013.
- [8] Hodgson A, Wier E M, Fu K, et al. Metalloprotease NleC suppresses host NF- κ B/inflammatory responses by cleaving p65 and

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.035.html>

自噬相关基因在慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型中的表达及意义

骆广跃¹ 张礼刚¹ 张 力^{1,2}, 陈先国^{1,2} 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 检测慢性非细菌性前列腺炎(CNP)大鼠模型中自噬相关基因表达的水平及时序变化,探讨自噬在CNP病程中的可能作用。方法 取3月龄雄性SD大鼠40只,随机分为正常对照组和2、4、6周CNP模型组,每组10只。HE染色观察各组前列腺组织炎性细胞浸润情况,采用Western blot、免疫组化SABC法检测各组前列腺组织中自噬微管相关蛋白1轻链3(LC3)、Beclin-1的表达。结果 HE染色结果提示成功构建大鼠CNP模型,Western blot法、免疫组化法检测显示各实验组LC3、Beclin-1蛋白的表达均高于正常对

照组,并随着时间的推移表达量逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 自噬相关基因可能在CNP的发病过程中发挥重要作用。

关键词 自噬;慢性前列腺炎;Beclin-1;LC3

中图分类号 R 697+33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0159-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.002

2016-11-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81470986);国家临床重点专科建设项目基金(编号:2100299)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

²安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230032

作者简介:骆广跃,男,硕士研究生;

陈先国,男,主治医师,副教授,责任作者,E-mail:cxg7866186@126.com;

梁朝朝,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:Liang-chaozhao@163.com

慢性前列腺炎是泌尿外科常见病和多发病,我国的一项大样本流行病学调查^[1]显示中国男性前列腺炎样症状发生率为8.4%,约占泌尿外科门诊量的25%。慢性前列腺炎主要表现为排尿异常,下腹及会阴部疼痛不适,可导致性功能障碍和男性不育,严重影响患者的身心健康和生活质量。慢性前列腺炎主要分为细菌性和非细菌性,90%为慢性非细菌性前列腺炎(chronic non-bacterial prostatitis, CNP)。由于目前对CNP的发病机制及病理生理改变尚不清楚,因此治疗上主要是对症治疗,导致治疗

interfering with the p65/RPS3 interaction[J]. PLoS Pathog 2015, 11(3):e1004705.

[9] Giogha C, Lung T W, Pearson J S, et al. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens [J]. Cytokine Growth

Factor Rev, 2014, 25(2):235-43.

[10] Pearson J S, Giogha C, Ong S Y, et al. A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection [J]. Nature 2013, 501(7466):247-51.

Construction of z0986-z1444 double deletion mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Su Li^{1,2}, Wang Jianxin², Chen Fanghong², et al

(¹Anhui Medical University Hefei 230032; ²Dept of Microbiological Omics and Bioinformatics, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract Objective To construct the double deletion mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 by knocking out z0986 gene and z1444 gene with Red recombinant system. **Methods** Firstly, the target fragments of z0986 and z1444 were established. Secondly, competent cells were struck by lightning, then the bacteria were identified through PCR. The growth curve of the ultimate positive monoclonal was assayed. **Results** The solo deletion mutant ($\Delta z1444/933$) and the double deletion mutant ($\Delta z0986/\Delta z1444/933$) were successfully constructed and their growth curves had no significant difference compared to the wild type EHEC. **Conclusion** The deletion mutant of z0986 and z1444 has no effect on growth of EHEC. The construction of $\Delta z1444/933$ as well as $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ would be helpful for further study of functions and mechanisms of z1444 gene.

Key words enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Red recombinant system; type III secretion system