

缺失HPI毒力岛的EAggEC042突变菌株的构建及鉴定

肠集聚性粘附大肠杆菌(enteroaggregative *E. coli*, EAggEC, EAEC)是1987年分离的第五类致泻性大肠杆菌,以其对上皮细胞株HEp-2特有的集聚样粘附方式得名,其具体的致泻机制目前尚不清楚[1]。最初在耶尔森菌中发现的HPI毒力岛(high-pathogenicity island, HPI),也分布在多种肠道杆菌中,如大肠杆菌、枸橼酸杆菌、克雷伯菌和沙门氏菌等[2][3][4][5]。耶尔森菌的HPI有一个约30.5 kb的功能核心区,它携带有与铁载体·耶尔森杆菌素(Yersiniabactin, Ybt)合成、调节和摄取有关的基因簇 $irp1 \sim irp9$ 等基因[6][7][8]。1998年Schubert等[2]在93% EAggEC、27%的侵袭性大肠杆菌(EIEC)、5%的产毒性大肠杆菌(ETEC)和致病性大肠杆菌(EPEC)临床分离株中检出了HPI的 $irp2/fyuA$ 基因簇。在不同类致泻性大肠杆菌中,HPI毒力岛在EAggEC中高频分布的原因,目前也不清楚。我们拟从构建HPI毒力岛全岛缺失株的角度,尽可能破坏HPI毒力岛的完整结构,为进一步研究HPI毒力岛在EAggEC 042菌中所发挥的作用奠定基础。本研究选择了 $irp8$ 和 $irp5$ 基因作为同源重组的靶序列(图1),这两个同源序列之间跨越了HPI毒力岛约24 kb的区域,包含有HPI毒力岛除 $fyuA$ 之外的 $ybtA$ 、 $irp2$ 和 $irp6$ 3个启动区,以及Ybt合成转运和调控的某些必需基因,这个区域的缺失,将导致HPI毒力岛功能的丧失。



图1 EAggEC 042 HPI毒力岛全岛基因缺失突变株缺失区域示意图

Fig.1 Schematic chart of the in-frame full HPI deletion region of EAggEC 042 mutant

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

所用菌株和质粒见表1。

表 1 实验用菌株与质粒

Tab.1 Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Description	Source
Strain		
JM109	recA1supE44endA1hsdR17thi Δ (lac-proAB) F'[traD36proAB+lacIqlacZ Δ M15]	Our lab
SM10 λ pir	thi-1,thr,leu,tonA,lacY, supE,recA::RP4-2-Tc::Mu,Kmr λ pir	Our lab
YenWA(0:8)	Prototype	China CDC
EAggEC O42	Prototype of enteroaggregative <i>E.coli</i> , HPI+	China CDC
EAO85	EAggEC O42 Δ irp8-irp5	This study
Plasmid		
pUC18	Cloning vector, Amp ^r	Our lab
pCVD442	Suicide plasmid, mob RP4 Ori R6K, SacB,Amp ^r	Our lab
pH8	pMD18-T irp8	This study
pH5	pUC18 irp5	This study
pHO85	pUC18 irp5-kan-irp8	This study
pCO85	pCVD442 irp5-kan-irp8	This study

在LB 平板或肉汤中增殖菌株，小肠结肠炎耶尔森菌(Yen)WA 株(0: 8)在28 °C条件下培养，大肠杆菌在37 °C培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素(Amp)为100 μ g/ml、卡那霉素(Km)为25~50 μ g/ml、氯霉素(Cm)15~25 μ g/ml。蔗糖培养基为含1%胰蛋白胍、0.5%酵母提取物、1.5%的琼脂和10%的蔗糖。

1.2 主要试剂

PCR试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及dTTP 为宝生物工程(大连)公司产品，IPTG、X-gal 为PROMEGA 公司产品，蔗糖为上海生工公司产品。引物为上海生工公司合成。

1.3 PCR扩增

根据小肠结肠炎耶尔森菌已知HPI基因序列设计引物，以细菌染色体DNA为模板。所用引物为上海生工公司合成。PCR试剂为华美生物工程公司产品。引物序列见表2。

表 2 本研究工作中所用引物

Tab.2 Primers used in this study

Fragment amplified	Length(bp)	Primers	Reference
<i>irp9</i>	529	Upstream: 5'-gctgtcctgaaatcacgga-3' Downstream: 5'-agtgcgctcgtttatgtt-3'	[8], GenBank No:AJ132668
<i>irp8</i>	1176	Upstream: 5'-tgatcatcagttctcttgcgc-3' Downstream: 5'-ctggatcggcgcctgtctat-3'	[8], GenBank No:AJ132668
<i>irp7</i>	1572	Upstream: 5'-atggtggataaacgggtgagc-3' Downstream: 5'-tatctccagcgcggtggcagtc-3'	[8], GenBank No:AJ132668
<i>ybtA</i>	555	Upstream: 5'-agtgcgctcgtttatgtt-3' Downstream: 5'-gcagcagttctgacgtt-3'	[8], GenBank No:AJ132668
<i>irp3</i>	1139	Upstream: 5'-ggaattcccattggaccggagaacacggtatg-3' Downstream: 5'-gctctagatcacagcgcctccttatcac-3'	[7], GenBank No:Y12527
<i>irp4</i>	827	Upstream: 5'-gctctagaatgtgcacccgctgcgg-3' Downstream: 5'-aacgcagggtaccgtcaccttctgctgaagtgc-3'	[7], GenBank No:Y12527
<i>irp5</i>	1636	Upstream: 5'-cgcggatccggatccaggtgacgcatgaattcttc-3' Downstream: 5'-aactgcagtcacactgttccgggtcgg-3'	[7], GenBank No:Y12527
<i>fyuA</i>	948	Upstream: 5'-gctttatcctctggcctt-3' Downstream: 5'-ggcataacgattaacg-3'	[9], GenBank No:Z35486
<i>kan</i>	998	Upstream: 5'-ggcaccatgg cacgttgtctc-3' Downstream: 5'-ttcccatggtcccgtaagtcag-3'	
EAEC	623	Upstream: 5'-ctggcgaagactgtatcat-3' Downstream: 5'-caatgtatagaatccgctgtt-3'	[1]

1.4 重组自杀质粒pC085的构建

质粒提取，酶切，DNA 片段连接以及转化按常规方法[10]或按产品推荐的条件进行。构建过程见图2。

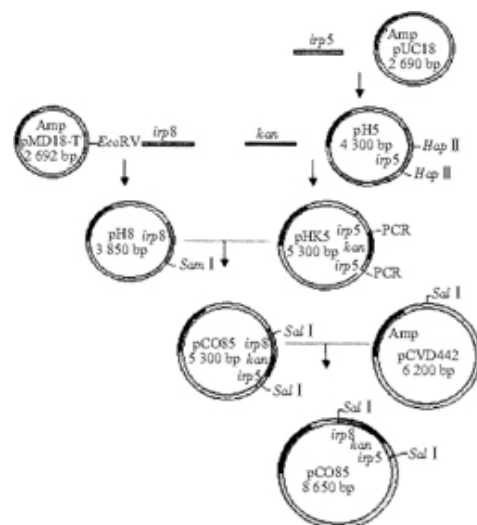


图2 重组自杀质粒pC085的构建示意图

1.5 质粒DNA的接合转移[11]

有无合适的筛选标记是决定能否进行接合转移的重要条件。通过抗生素敏感性实验，发现EAggEC 042(受体菌)对卡那霉素(Km)敏感且具有氯霉素(Cm)抗性，而携带pC085的SM17 λ pir(供体菌)对Cm敏感，因此可将质粒pC085从SM17 λ pir与EAggEC 042进行接合转移。

1.6 EAggEC 042全岛缺失株EA085的一步法筛选

将携带有质粒pC085的SM17- λ pir与EAgg E042进行接合转移，突变株的遗传特性应符合为：Km^r、Cm^r、SacB^r、Amp^s，因此，直接在含有25 μ g/ml卡那霉素、25 μ g/ml氯霉素、20%蔗糖的培养基上筛选三重抗性重组株。将上述平板上长出的菌落平行接种于含有20 μ g/ml氨苄青霉素LBA平板上，挑选Amp^s菌落进行鉴定。

2 结果

2.1 重组自杀质粒pC085的构建及鉴定

将纯化后的irp8、irp5基因的PCR扩增产物分别克隆入pMD18-T、pUC18载体中，经含IPTG/X-gal及氨苄青霉素的LB平板筛选白色菌落，克隆子分别命名为pH8和pH5。

irp5基因内有两个HapII平端限制性内切酶位点(517和922 bp处)，将克隆的irp5基因序列用HapII酶切，缺失两酶切位点的中间片断，琼脂糖凝胶电泳分离最大的DNA酶切片段，纯化，将kan基因的PCR扩增产物与该片断连接，经含氨苄青霉素和卡那霉素双抗性的LB平板筛选重组子，克隆子命名为pHK5。kan基因两侧分别有约500和900 bp左右的irp5基因的部分序列，我们选择irp5约500 bp的一侧序列作为同源序列。PCR扩增判断kan基因在irp5基因中的插入方向，kan基因下游引物与irp5的下游引物组合中扩增有irp5-kan基因片段，产物大小为1 500 bp，与我们所需的DNA片段大小相符。pH8有一个Sma I平端酶切位点，用Sma I消化pH8后，与PCR扩增的irp8-cat基因片段平端连接，用irp8基因的下引物和kan基因的上游引物进行PCR扩增来鉴定插入片段的方向，得顺序排列为irp8-cat-irp5的克隆子pH085。

irp5基因的3'端和irp8基因的5'端各有一个Sal I的酶切位点，用Sal I酶切pH085，回收2.45 kb的irp8-kan-irp5片段，与pCVD442 Sal I酶切产物连接，获得重组自杀质粒pC085，经PCR和酶切反应鉴定与预期大小相一致(图3)，结果证明pC085已克隆有irp5-kan-irp8片段。

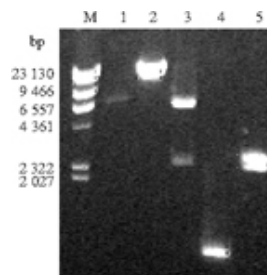


图3 pC085的酶切及PCR结果

Fig.3 Results of digestion with restriction nuclease and PCR of pC085

M: λ -Hind III digest; Lane 1: pCVD442 Sal I; Lane 2: pC085 BamH I; Lane 3: pC085 Sal I; Lane 4: pC085 kan PCR; Lane 5: pH085 Sal I

2.2 EAggEC 042全岛缺失株EA085的一步法筛选和鉴定

将携带有质粒pC085的SM17- λ pir与EAggEC 042进行接合转移，筛选符合缺失株遗传特性Km^rCm^rSacB^rAmp^s的单菌落进行鉴定，同时筛选Km^rCm^r接合子作为对照。以待检菌的粗制水煮DNA为模板，缺失株和接合子的EAggEC特异序列EAEC、kan基因PCR扩增均为阳性，说明它们均为整合有kan基因的EAggEC菌株；但根据研究设计，只有缺失株的irp5-kan片段及kan-irp8片段PCR扩增同时为阳性，而在接合子中只能扩增出其中一个。对缺失株进行PCR扩增鉴定结果为，irp5下游引物kan下游引物组合扩增irp5-kan片段及kan上游引物 irp8下游引物组合扩增kan-irp8片段同时阳性，且大小与预期一致(图4)；几个随机选择的缺失区域的内部基因(irp7、ybtA、irp3、irp4)在缺失株中扩增均为阴性(图

5), 缺失区域的外部基因(irp9、fyuA)扩增均为阳性, 且大小与预期一致(图6), 而接合子这些基因的扩增均为阳性, 说明这个缺失株已按预期缺失了HPI毒力岛, 同时没有影响到外部基因的完整性, 将这个缺失株命名为EA085。EA085的PCR鉴定结果见图4~6。

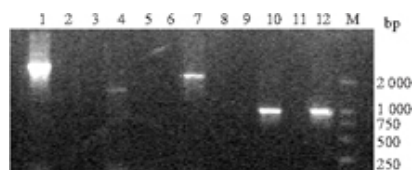


图4 irp5、kan和irp8引物对EA085的PCR鉴定结果

Fig.4 PCR amplification results of EA085 by irp5, kan, and irp8 primers

Lane 1: EA085 irp5-kan-irp8 PCR; Lane 2: EAggEC 042 irp5-kan-irp8; Lane 3: SM17- λ pir(pC085) irp5-kan-irp8 PCR; Lane 4: EA085 irp5-kan PCR; Lane 5: EAggEC 042 irp5-kan PCR; Lane 6: SM17- λ pir(pC085)irp5-kan PCR; Lane 7: EA085 kan-irp8 PCR; Lane 8: EAggEC 042 kan-irp8 PCR; Lane 9: SM17- λ pir(pC085)kan-irp8 PCR; Lane 10: EA085 kan PCR; Lane 11: EAggEC 042 kan PCR; Lane 12: SM17- λ pir(pC085)kan PCR; M: DL2000

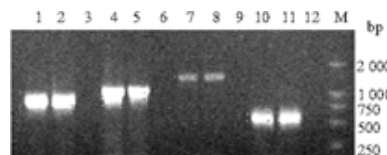


图5 EA085缺失区域内部基因的PCR鉴定结果

Fig.5 PCR amplification results of EA085 by primers for HPI internal regions

Lane 1: EA085 ybtA PCR; Lane 2: EAggEC 042 ybtA PCR; Lane 3: Zygote ybtA PCR; Lane 4: Zygote irp7 PCR; Lane 5: EAggEC 042 irp7 PCR; Lane 6: EA085 irp7 PCR; Lane 7: Zygote irp3 PCR; Lane 8: EAggEC 042 irp3 PCR; Lane 9: EA085 irp3 PCR; Lane 10: Zygote irp4 PCR; Lane 11: EAggEC 042 irp4 PCR; Lane 12: EA085 irp4 PCR; M: DL2000

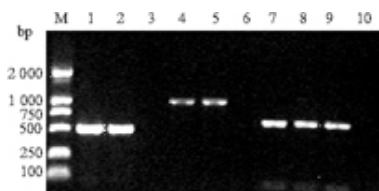


图6 EA085缺失区域外部基因的PCR鉴定结果

Fig.6 PCR amplification results of EA085 by primers for HPI external regions

M: DL2000; Lane 1: EA085 irp9 PCR; Lane 2: EAggEC 042 irp9 PCR; Lane 3: SM17- λ pir(pC085) irp9 PCR; Lane 4: EA085 fyuA PCR; Lane 5: EAggEC 042 fyuA PCR; Lane 6: SM17- λ pir(pC085)fyuA PCR; Lane 7: EA085 EAEC PCR; Lane 8: EAggEC 042 EAEC PCR; Lane 9: Zygote EAEC PCR; Lane 10: SM17- λ pir(pC085)EAEC PCR

3 讨论

耶尔森菌HPI毒力岛的概念是于1996年确立的[6], 在耶尔森菌中, HPI仅存在于鼠疫耶尔森菌、假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌1B型中, 为小鼠毒力表型所必需。近年来的研究还发现, HPI的分布不限于同一属, 也分布在多种肠道杆菌中, 如大肠杆菌、枸橼酸杆菌、克雷伯菌和沙门氏菌等[2][3][4][5], 可能通过基因的水平转移获得。目前, 对肠道杆菌携带的HPI毒力岛的研究, 多为分子流行病学的现况调查报道, 其结构研究刚刚处于起步阶段, 仅对个别HPI阳性菌株的个别基因进行了序列测定, 其具体的功能及其与宿主致病性的关系等方面的研究尚未开展。

构建基因精确定位突变株, 是目前研究基因功能较为有效的方法之一。其构建的原理是, 通过体外突变目的基因, 利用重组自杀质粒与出发菌株体内同源重组的原理, 使在体外被破坏了的的目的基因与染色体上的靶基因发生同源重组, 最终将染色体的靶基因置换下来, 在结构上被破坏了的的目的基因也就失去了原有的功能。在耶尔森菌中, 组成HPI毒力

岛的11个基因功能研究绝大多数都是据此原理通过分别构建目的基因缺失或插入突变株而实现的。在大肠杆菌中,存在着较为丰富的铁摄取系统,如enterobactin系统和aerobactin系统等,单一基因突变所引起的效应可能不足以有明显的表型凸现,而HPI毒力岛30.5 kb的功能核心区,除完成Ybt的合成摄取之外,是否还具有其他的功能?如irp2基因编码的HMWP2除是合成Ybt的必需基因外,还具有促进细菌碱性磷酸酶输出的功能。因此,本研究从破坏HPI毒力岛的完整功能的角度,构建HPI毒力岛全岛缺失株,为进一步研究HPI毒力岛在EAggEC 042菌中所发挥的作用提供物质基础。

本研究在构建缺失株的具体过程中,改良了构建缺失株的方法,大大简化了缺失株的筛选工程。其一,结合突变株的遗传表型,通过一步法直接筛选到突变株。携带pC085质粒的SM17 λ pir与EAggEC 042进行接合转移后,接合转移菌液中无外乎有4种类型的细菌,携带pC085质粒的SM17 λ pir、野生型EAggEC、接合子及突变株,它们有着各自不同的抗性表型,携带pC085的SM17 λ pir遗传表型为Kmr, Cms, SacBr, Ampr;野生型EAggEC为Kms, Cmr, SacBr, Amps;接合子为Kmr, Cmr, SacBs, Ampr;突变株的表型为Kmr, Cmr, SacBr, Amps。可见,KmrCmr SacBr抗性组合为突变株所特有。因此,本实验直接在含有卡那霉素、氯霉素、含蔗糖的培养基上筛选三重抗性重组株,并直接获得了缺失突变株。其二,巧妙利用目的基因的酶切位点,建立了仅通过PCR鉴定缺失株的构建模式。在构建重组自杀质粒pC085时,irp5基因的3'端和irp8基因的5'端各有一个Sal I的酶切位点,将pH085质粒的irp5-kan-irp8片段经Sal I酶切,酶切后irp8和irp5两端的引物序列均已被切掉,因此,在pC085中,但凡涉及到这两个引物的任何组合的扩增都无法扩增出目的片段。缺失株最终PCR扩增结果为irp5下游引物kan下游引物组合及kan上游引物 irp8下游引物组合同时扩增阳性,这个特点有且仅有缺失株具备。

总之,该突变株的建立,将为进一步阐明EAggEC携带的HPI毒力岛功能及为明确HPI在大肠杆菌的铁代谢和致病过程中的作用及EAggEC的致病机理奠定基础。

参考文献:

- [1]Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia Coli[J]. J Clin Microbiol, 1998, 11(1): 142-201.
- [2]Schubert S, Rakin A, Karch H, et al. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans[J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 480-5.
- [3]Gophna U, Oelschaeger TA, Hacker J, et al. Yersinia HPI in septicemic Escherichia coli strains isolates from diverse hosts[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001,196(1): 57-60.
- [4]Koczura R, Kaznowski A. Occurrence of the Yersinia high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae[J]. Microb Pathog, 2003, 35(5): 197-202.
- [5]Oelschlaeger TA, D. Zhang, S. Schubert, et al. The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of Salmonella enterica sub-species I but present in isolates of subspecies III and VI[J]. J Bacteriol, 2003, 185(3): 1107-11.
- [6]Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B Yersinia enterocolitica[J]. J Bacteriol, 1996, 178 (23): 6743-51.
- [7]Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, et al. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of Yersinia: organization and siderophore-dependent regulation [J]. J Bacteriol, 1998, 180(3): 538-46.
- [8]Rakin A, Noelting C, Schubert S, et al. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of Yersinia enterocolitica[J]. Infect Immun, 1999, 67(10): 5265-74.
- [9]Rakin A, Saken E, Harmson D, et al. The pesticin receptor of Yersinia enterocolitica: a novel virulence factor with dual function[J]. Mol Microbiol, 1994, 13(2): 253-63.
- [10]金冬雁, 黎孟枫 (编译). 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [11]于永茂, 刘延清, 祁国明, 等. 霍乱A-B+减毒活疫苗的构建[J]. 中华流行病学杂志(Chin J Epidemiol), 1993, 14(Sup15): 136-41.