

## 基础研究

## 尿路致病性大肠埃希菌外膜蛋白T敲除株的构建及功能评价

赵铁,方幸幸,刘晓露,彭亮,龙敏,张文炳,罗军,曹虹

南方医科大学公共卫生与热带医学学院医学微生物系,广东 广州 510515

**摘要:**目的 探索外膜蛋白T(OmpT)基因在尿路致病性大肠埃希菌(UPEC)CFT073致尿路感染中的作用。方法 利用RED重组技术构建UPEC CFT073 *ompT*基因缺失株(命名为COTD),并建立小鼠急性尿路感染模型,体内外实验比较野生株与敲除株之间在膀胱组织的定植能力。结果 PCR分析及测序鉴定证实*ompT*基因缺失株构建成功;体外实验结果显示野生株粘附率为(8.3±1.9)%,敲除株粘附率为(6.7±2.2)%,敲除株粘附率明显低于野生株( $P<0.05$ )。体内实验膀胱组织内,野生株定植细菌数为(7±2)×10<sup>5</sup> cfu,敲除株定植细菌数为(17±8)×10<sup>4</sup> cfu,*ompT*敲除株定植于膀胱组织的能力明显降低( $P<0.05$ )。结论 证实OmpT作为毒力因子参与细菌定植膀胱组织,在UPEC致尿路感染的过程中发挥重要作用。

**关键词:**尿路致病性大肠埃希菌;外膜蛋白T;尿路感染;定植

中图分类号:Q78 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)07-0956-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.07.011 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120620.1705.034.html>

Construction and functional studies of uropathogenic *E. coli* strains with *ompT* gene knockout

ZHAO Tie, FANG Xingxing, LIU Xiaolu, PENG Liang, LONG Min, ZHANG Wenbing, LUO Jun, CAO Hong

Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To explore the role of *ompT* gene in uropathogenic *E. coli* (UPEC) CFT073 strain in urinary tract infection (UTI). **Methods** An *ompT* deletion mutant (COTD) was generated by  $\lambda$  Red recombineering in the UPEC CFT073 strain, which was characterized by PCR and sequencing. C57B/L6 mouse models of acute UTI with the mutant and wild-type strains were established to compare the colonization abilities of the two strains in the bladder. The adhesion of CFT073 mutant to human unthelial 5637 cells was also investigated *in vitro*. **Results** PCR and DNA sequencing confirmed the loss of *ompT* gene in the mutant COTD. The *in vitro* adhesion rate of the mutant strain COTD to 5637 cells was (6.7±2.2)%, significantly lower than that of (8.3±1.9)% of the wild-type strain ( $P<0.05$ ). In the murine models of acute UTI, the mutant strain showed a mean colonization number of about (17±8)×10<sup>4</sup> cfu, which was significantly lower than that of (7±2)×10<sup>5</sup> cfu of the wide-type CFT073 strain ( $P<0.05$ ). **Conclusion** *OmpT* gene can be involved in the colonization of UPEC in the bladder tissue and plays an important role in the pathogenesis of UPEC-induced UTI.

**Key words:** uropathogenic *E. coli*; outer-membrane protease T; urinary tract infection; colonization

尿路感染是临床中最普遍的细菌感染之一,每年导致约6~7百万人就医。由于性别之间解剖学上的差异,多发于女性,60%的女性一生中至少有一次尿路感染<sup>[1]</sup>。其中尿路致病性大肠杆菌(UPEC)引起的尿路感染约占90%<sup>[2]</sup>,约95%的尿路感染的起始感染部位是膀胱<sup>[3]</sup>。UPEC临床分离株具有高度的遗传学异质性,表现出不同的定植及持续感染膀胱等靶器官的能力。绝大多数UPEC都携带外膜蛋白T(*OmpT*)基因<sup>[4]</sup>,其编码的(OmpT)是一种弱活性的纤溶蛋白酶原激活剂<sup>[5]</sup>,但是其在大肠杆菌致尿路感染中的作用机制并不清楚。本研究利用RED同源重组系统构建尿路致病性大肠杆菌

CFT073的*ompT*基因敲除株,并建立C57/BL6小鼠(易被UPEC感染)<sup>[5]</sup>尿路感染动物模型,通过体内外实验考察*ompT*基因的缺失对致病株定植能力的影响,从而初步探索OmpT参与致病的机制,为最终明确OmpT在大肠埃希菌致尿路感染中的作用打下基础。

## 1 材料和方法

## 1.1 菌株与质粒

尿路致病性大肠埃希菌CFT073由美国南加州大学洛杉矶儿童医院黄胜和教授惠赠;质粒pET-28a为本室保存,*ompT*基因缺失株COTD(含有Kan抗性)由本实验室构建。

## 1.2 实验动物

SPF级C57B/L6小鼠(对尿路感染敏感)<sup>[6]</sup>购自南方医科大学实验动物中心。

## 1.3 试剂

DNA marker购自TaKaRa公司,卡那霉素、戊巴比

收稿日期:2012-04-25

基金项目:国家自然科学基金(30972637);南方医科大学公共卫生学院院长基金(GW201101)

作者简介:赵铁,在读硕士研究生,E-mail: 443801982@163.com;方幸幸,在读本科生,E-mail: 1214476193@qq.com。赵铁、方幸幸共同为第一作者

通讯作者:曹虹,博士,教授,博士生导师,E-mail: gzhcao@fimmu.com

妥钠粉剂购自Sigma公司。酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂均购自北京盈信公司。

#### 1.4 方法

1.4.1 *ompT* 基因敲除株的构建 根据 pET-28a 载体的 3400~4901 bp 位置的卡那霉素抗性基因以及 GenBank 公布的 CFT073 *ompT* 及其上下游序列 (Gene ID: 004431)<sup>[7]</sup>, 设计合成一对引物: OmpT\_Kan\_F2 和 OmpT\_Kan\_R2, 见表 1; 以 pET-28a 为模板, 条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环, 最后延伸 7 min 扩增。胶回收敲除子。将 pKD46 质粒 (~50 ng) 电转化入 CFT073 感受态细胞, (电击参数: 电压=2.5 kV, 电容=25 μF, 电阻=200 Ω); AMP 抗性筛选、挑取单克隆, 即为 *E. coli* CFT073/pKD46。CFT073/pKD4 以 1:100 比例加入 LB 培养基 (不含抗生素), 同时加入 100 μl 1 mol/L L-阿拉伯糖 (终浓度达到 2 mmol/L), 30 °C、220 r/min 培养至

$D_{600}$  达到 0.5 (2~3 h), 诱导 RED 同源重组系统启动, 取 400 ng 纯化的敲除子片段加入 CFT073/pKD46 感受态细胞进行电转化<sup>[8]</sup>。转化细胞涂板 (含 50 μg/ml 卡那霉素), 置 37 °C 培养箱培养至单克隆形成。

正向筛选: 在 5' 和 3' 同源重组臂的外侧设计引物: OmpT-2F、OmpT-2R (表 1)。比较从卡那霉素抗性和 *E. coli* CFT073 菌株扩增出的 PCR 片段的大小。从 *E. coli* CFT073 菌株和未发生正确重组的细菌上, 这对引物扩增产物的长度为 1781 bp; 而从发生正确敲除的细菌 (敲除株) 上, 这对引物扩增产物的长度为 2066 bp。

反向筛选: 在 *ompT* 基因开放阅读框序列内部设计引物 OmpT\_F1、OmpT\_R1 (表 1)。从 *E. coli* CFT073 菌株和未发生正确重组的细菌上, 这对引物可扩增出预期长度 567 bp 的 PCR 片段; 而从已正确敲除 *ompT* 基因的敲除株上, 这对引物不能扩增出相应的产物。

#### 1.4.2 细菌生长曲线测定及菌落形成能力的比较 从平

表 1 构建敲除株所用引物

Tab.1 Primers used for *OmpT* gene knockout in this study

引物	链方向	序列
OmpT_Kan_F2	+	5'-AGGTAAATGCTTACAATATTAGGGGATATTGTTTGTCTTTTACCGGTAACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATG-3'
OmpT_Kan_R2	-	5'-CCTCATGCTATTATCGCTAATAATGATCTAAAGGCATGGCACTTGAATAGGTGCGCTCTCCTGTTCGAC-3'
OmpT-2F	+	5'-CGTTCAGGCTAGCTTCGTTTC-3'
OmpT-2R	-	5'-ATTGCGAGGCCTTATGTGTC-3'
OmpT_F1	+	5'-ATACCTGCTCCATTTTGTCTGT-3'
OmpT_R1	-	5'-AACCTGGACGGATGAAAGTAGA-3'

板上分别挑取 *E. coli* CFT073 和 COTD 单菌落静置培养过夜, 1:100 分别接种到 LB 液体培养基, 160 r/min, 37 °C 培养, 间隔时间取样测  $D_{600}$ , 适应期每 2 h 测定 1 次, 指数生长期 30 min 测定 1 次, 平台期 1 h 测定 1 次, 绘制生长曲线。另取 10 μl *E. coli* CFT073 和 COTD 培养菌按 1:10<sup>6</sup>、1:10<sup>7</sup> 梯度稀释, 均匀涂板, 8 h 后计菌落数。

1.4.3 体外粘附实验 *E. coli* CFT073 及 COTD 37 °C 反复培养。利用  $D_{600}$  估算细菌浓度, 将各细菌浓度调到基本一致。并将要加到细胞的细菌作倍比稀释涂平板计数作为加入细菌总数。人膀胱癌上皮细胞株 5637 传代 2 次, 接种到 24 孔板, 至细胞单层 (1×10<sup>5</sup> /孔)。用 RMPI 1640 培养基清洗 3 次, 再加入完全培养基备用。

将细菌按照 100:1 的比例加到每孔细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h, 去掉培养基, 1×PBS 清洗 5 遍, 加入 150 μl 0.5% Triton-X100 37 °C 孵育 15 min, 然后加入 350 μl 去离子水 37 °C 孵育 10 min, 轻柔吹打混匀, 取 100 μl 样品倍比稀释涂 LB 平板计算菌落数, 作为粘附到细胞的细菌数。粘附率=粘附到细胞的细菌数/加入细菌总数×100%。

1.4.4 动物模型的建立及体内定植能力检测 将 *E. coli* CFT073 和 COTD 分别接种到 LB 培养基, 37 °C 静置培养

过夜。实验前利用  $D_{600}$  估算细菌浓度, 将各细菌浓度调到约 1×10<sup>8</sup> CFU。选取 SPF 级 (7 周龄) C57B/L6 小鼠, 随机分成两组, 每组 7 只; 一组接种野生株 *E. coli* CFT073, 简称野生组; 一组接种敲除株 COTD, 简称敲除组。

0.6% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 每只用量约为 0.25 ml。观察小鼠, 当棉花刺激小鼠眼结膜无反射时; 至小鼠于泡沫塑料固定器, 仰卧<sup>[9]</sup>; 下腹部轻轻地按压, 排除剩余尿液, 擦拭尿道口多余液体, 消毒尿道外口; 将静脉留置针 (BD 公司) 浸石蜡油后在强光观察下缓缓插入尿道外口, 以一定角度至耻骨联合下; 稍有阻力感, 大约 3~4 mm 处。降低留置针朝向, 直到接近小鼠平面时继续进针; 至有落空感后, 逐渐放平针尾使针头上翘, 无阻力地经尿道置入膀胱内<sup>[10]</sup>。当进入达 1~2 cm 时拔出留置针铁针心, 套入 50 ml 微量注射器, 吸取膀胱剩余尿液; 取另一只 50 ml 微量注射器接种细菌, 接种量为 50 ml; 再一只 50 μl 微量注射器接种 PBS 溶液, 接种量为 50 ml。注意接种细菌的时候要缓慢, 避免压力太大造成膀胱输尿管反流, 膀胱上皮细胞的脱落或菌液的溢出。将受感染的小鼠仰卧放回笼中, 防止菌液溢出, 继续饲养; 密切观察小鼠生存状况。组内相同处理。

细菌接种完毕12 h后处死小鼠,腹部消毒,取出膀胱;用PBS清洗5~10次;加入10 ml PBS后匀浆,匀浆液作1:10、1:100、1:1000梯度稀释。取出10 μl 稀释液均匀涂布于LB平板,12 h后计数菌落数。定植率 = 定植到细胞的细菌数/加入细菌总数×100%<sup>[11]</sup>。

1.5 统计学处理

数据利用SPSS 13.0统计软件包进行处理。采用两组间独立样本t检验,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *ompT*基因的敲除鉴定

敲除子的PCR扩增和纯化中,得到大小为1602 bp的片段,见图1的泳道1,与预测的大小一致。经测序证明敲除子构建成功。

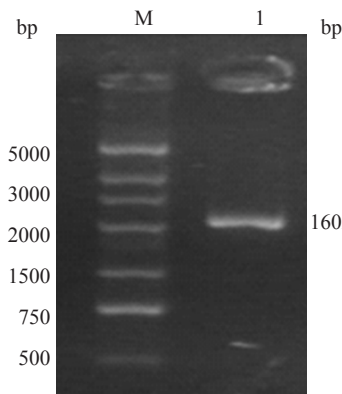


图1 *ompT*敲除子线性打靶片段的扩增

M: DNA Maker DL5000; 1: 以pET28a为模板OmpT\_Kan\_F2和OmpT\_Kan\_R2为引物的扩增产物

Fig.1 Amplification of *ompT* gene knockout targeting sub-linear fragments.

2.1.1 正向筛选 直接做菌落PCR反应,获得约2066 bp的片段,见图2。其余克隆扩增出约为1781 bp大小片段。判断第1、2、3、4、12、14号克隆为*ompT*基因缺失的敲除体。

2.1.2 反向筛选 进行菌落PCR反应。如图3所示,第1、2、3、4、12、14号克隆无567 bp长度的PCR片段扩增,与预期一致。其余克隆扩增出大约567 bp大小的片段。进一步判断第1、2、3、4、12、14号克隆为*ompT*基因缺失的敲除体。

2.1.3 测序验证 选取第2、3号克隆的正向筛选PCR产物,用两侧扩增引物进行测序。然后用BLAST进行比对。测序及比对结果显示:第2、3号克隆基因组上*ompT*基因ORF区域按设计完全敲除。*E.coli* CFT073本身的基因组序列在测序范围内未发生任何突变;敲除株构建成功。

2.2 CFT073与COTD生长曲线及菌落形成能力比较

由图4可以看出,CFT073与COTD的生长曲线基本一致,表明*ompT*基因敲除对细菌生长无影响,敲除株可以用于后续实验。

菌落形成能力的比较可以看出,稀释10<sup>6</sup>倍后,CFT073菌落形成单位为120.40±5.64,COTD菌落形成单位为123.80±3.52,无统计学意义,t值为-1.617,P>

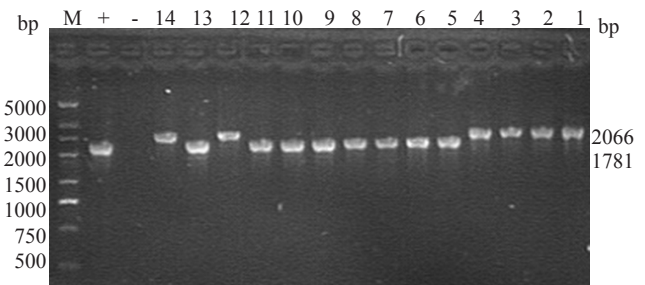


图2 *ompT*基因敲除株的正向筛选

M: DNA MakerDL5000; +: 加入*E.coli* CFT073菌液的阳性对照; -: 不加菌液模板的阴性对照; 1-14: 以OmpT-2F和OmpT-2R为引物,各单克隆为模板的PCR产物

Fig.2 Forward screening of *ompT* mutant.

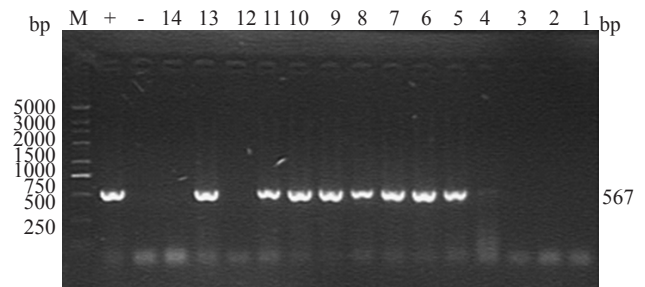


图3 *ompT*基因敲除株的反向筛选

M: DNA Maker DL5000; +: 加入*E.coli* CFT073菌液的阳性对照; -: 不加菌液模板的阴性对照; 1-14: 以OmpT-F1和OmpT-F2为引物,各单克隆为模板的PCR产物

Fig.3 Reverse screening of *ompT* mutant.

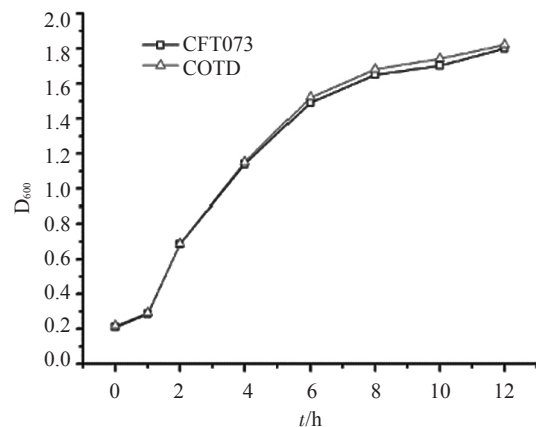


图4 CFT073与COTD生长曲线的比较

Fig.4 Growth curves of CFT073 and COTD.

0.05; 稀释10<sup>7</sup>倍后,CFT073菌落形成单位为12.00±1.63,COTD菌落形成单位为12.10±1.76,无统计学意义,t值为0.000,P>0.05;两组间菌落形成能力无差异,表明*ompT*基因敲除对细菌生长无影响。

2.3 粘附实验结果

计算不同菌株对细胞5637的粘附率,分析结果显示,CFT073粘附率为(8.3±1.9)%,COTD粘附率为(6.7±2.2)%,两种菌株的粘附率差异有统计学意义,t值为2.143,P<0.05,可认为突变株对细胞5637的粘附率低于野生株对细胞5637的粘附率。

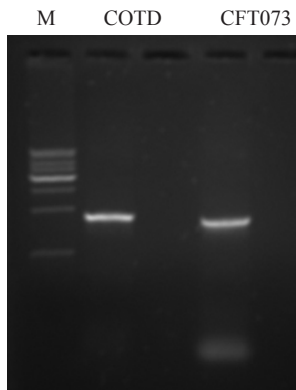


图5 动物膀胱组织的PCR检测  
M: DNA Marker DL5000; CFT073:  
以 $ompT$ 基因设计引物扩增; COTD:  
以 $Kan$ 基因设计引物扩增  
Fig.5 PCR analysis of mouse  
bladder tissue.

## 2.4 动物模型

膀胱体外组织PCR扩增如图5显示,野生组扩增出 $ompT$ 基因,敲除组扩增出 $Kan$ 基因。扩增片段大小与预期相符,表明细菌有定植到膀胱组织,动物模型构建成功。

## 2.5 膀胱组织细菌定植水平的比较

向小鼠膀胱分别接种野生株和敲除株,12 h后取膀胱组织研磨涂板,培养后菌落计数,分析、比较二组间菌落数的差异。野生株为 $(7\pm 2)\times 10^5$ ,敲除株为 $(17\pm 8)\times 10^4$ , $t$ 值为2.312, $P<0.05$ ,有统计学意义。造模12 h后,膀胱组织中野生株细菌定植的细菌数明显高于敲除株( $P<0.05$ ),可以认为OmpT与细菌定殖有关。

## 3 讨论

OmpT是一种在变性溶液中具有很强活性的蛋白水解酶,可引起外源表达蛋白的显著降解<sup>[12]</sup>。但关于OmpT尿路致病机制中的功能一直未得到实验证实,推测应该是一种混合机制<sup>[13]</sup>。

以RED重组系统为基础的基因敲除是近年发展较快的技术,可用于微生物基因的功能研究。与传统的基因敲除方法相比,重组效率明显提高。RED重组不但可达到较高的成功率,而且此方法利用线性打靶DNA,不需构建打靶质粒,因此实验周期大大缩短<sup>[14]</sup>。

在进行体内实验过程中,我们参照Hung等<sup>[10]</sup>的方法并加以改进,构建动物模型的方法简单、成功率高、易于操作,便于大量进行接种感染的研究。另外本法插管注菌增置了留置针,避免反复插管,减少操作因素对实验动物的影响。本模型的建立对于研究尿路感染具有一定的参考价值。

体外实验显示,将基因敲除株与其野生株分别进行粘附实验后,发现与野生株CFT073相比,敲除株粘附活菌数明显减少,粘附率明显降低。 $ompT$ 基因敲除可显著降低致病菌对膀胱组织的粘附能力。推测 $ompT$ 基因可调控菌毛蛋白的表达,在尿路致病性大肠埃希菌的致病过程中具有重要作用,其机制还需进一步证实。

将 $ompT$ 基因敲除株COTD与其野生株CFT073分

别接种C57B/L6小鼠后,对比二者定殖膀胱组织的能力。结果表明造模12 h后,COTD及其野生株CFT073相比,COTD在膀胱定植的细菌量明显减少。

综上所述,本研究利用RED同源重组技术成功构建了尿路致病性大肠埃希菌CFT073的 $ompT$ 基因缺失株,并建立了C57B/L6小鼠的急性尿路感染模型。通过动物模型实验发现,缺失 $ompT$ 基因后,大肠埃希菌CFT073对小鼠膀胱组织的定植能力下降。但OmpT在大肠埃希菌致尿路感染中的作用机制有待于进一步证实。

## 参考文献:

- [1] Nosseir SB, Lind LR, Winkler HA. Recurrent uncomplicated urinary tract infections in women: a review[J]. J Womens Health (Larchmt), 2012, 21(3): 347-54.
- [2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 528-30.
- [3] Chenoweth CE, Saint S. Urinary tract infections[J]. Infect Dis Clin North Am, 2011, 25(1): 103-15.
- [4] Ono B, Kimiduka H, Kubota M, et al. Role of the  $ompT$  mutation in stimulated decrease in colony-forming ability due to intracellular protein aggregate formation in Escherichia coli strain BL21 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(2): 504-12.
- [5] Tagai C, Morita S, Shiraishi T, et al. Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions[J]. Peptides, 2011, 32(10): 2003-9.
- [6] Oottamasathien S, Jia W, Mccoard L, et al. A murine model of inflammatory bladder disease: cathelicidin peptide induced bladder inflammation and treatment with sulfated polysaccharides [J]. J Urol, 2011, 186(4 Suppl): 1684-92.
- [7] Nakata N, Tobe T, Fukuda I, et al. The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of Shigella: the relationship between the  $ompT$  and  $kcpA$  loci[J]. Mol Microbiol, 1993, 9(3): 459-68.
- [8] Muyrers JP, Zhang Y, Testa G, et al. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1555-7.
- [9] 侯芳玉, 高庆英, 郭超. 大鼠急性逆行性肾盂肾炎模型的制作[J]. 中国实验动物学杂志, 1998(1): 34-7.
- [10] Hung CS, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection[J]. Nat Protoc, 2009, 4(8): 1230-43.
- [11] Condron C, Casey RG, Kehoe S, et al. Taurine modulates neutrophil function but potentiates uropathogenic *E. coli* infection in the murine bladder[J]. Urol Res, 2010, 38(4): 215-22.
- [12] Hui CY, Guo Y, He QS, et al. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides [J]. Microbiol Immunol, 2010, 54(8): 452-9.
- [13] Wang MC, Tseng CC, Wu AB, et al. Different roles of host and bacterial factors in Escherichia coli extra-intestinal infections [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(4): 372-9.
- [14] 胡堃, 史兆兴, 赛道建, 等. Red重组系统及在微生物基因敲除中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(5): 628-32.

(编辑:吴锦雅)