

利用 Red 重组系统敲除 APEC 毒力岛 *irp2* 基因

李叶芳, 涂 健, 邵 颖, 刘红梅, 祁克宗*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: 应用质粒 pKD46 介导的 Red 同源重组系统, 以质粒 pKD3 为模板, 设计 *irp2* 基因序列敲除引物, 引物 5'端有 51 bp 的拟敲除基因的同源臂, 3'端为扩增引物, 扩增两侧含 FRT 位点的氯霉素抗性基因, 通过第 1 次同源重组将拟敲除的 *irp2* 基因替换为氯霉素抗性基因, 再通过重组酶质粒 pCP20 在 FRT 位点发生第 2 次同源重组, 消除抗性基因。结果表明, 利用该重组系统成功敲除了禽致病性大肠杆菌 HPI 毒力岛 *irp2* 基因。为深入研究 *irp2* 基因在禽致病性大肠杆菌致病过程中所发挥的作用打下基础。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; HPI 毒力岛; Red 同源重组酶; *irp2*; 缺失

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)06-0854-05

Deletion of *irp2* gene of avian pathogenic *E.coli* strain with HPI by red recombination

LI Ye-fang, TU Jian, SHAO Ying, LIU Hong-mei, QI Ke-zong

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The aim of this research was to construct *irp2* gene deletion mutant of avian pathogenic *E.coli* (APEC) which harbored the HPI by using Red recombination system. PCR products were obtained by using primers with 51 bp extension homologous to *irp2* using template plasmid pKD3 which carrying chloramphenicol resistance gene flanked by FRT sites. With the plasmid pKD46 mediated Red recombinant system, the PCR products were transformed into APEC (CE02) by electroporation to recombine *irp2* gene, and the recombinant was selected on chloramphenicol agar plate. Then the plasmid pCP20 which encoded the Flp recombinase was introduced into the recombinant to eliminate chloramphenicol resistance gene. The results showed that gene of *irp2* deletion mutant of APEC was successfully constructed. The recombinant strains would be the foundation for the further research on the role of *irp2* gene in pathogenic mechanism of APEC.

Key words: avian pathogenic *E.coli*; high pathogenicity island; Red recombinase; *irp2*; deletion

毒力岛^[1-2]最早由 Hacker 等人提出, 是编码细菌毒力基因簇的一个相对分子量较大的、不稳定的外源 DNA 片段, 分子量、密码使用、G+C 百分比等特点与宿主染色体均有明显差异, 提示毒力岛可能通过基因水平转移获得, 在细菌进化过程中扮演重要角色。强致病性毒力岛^[3] (high pathogenicity island, HPI)首先在耶尔森菌中发现, 主要含有编码参与合成及摄取铁载体-耶尔森菌素(Yersiniabactin, Ybt)的铁抑制蛋白基因及其调控基因, 是赋予耶尔森菌毒力和致病性的重要因素。HPI 的突出特性就是通过 Ybt 的铁载体夺取宿主中的铁元素, 增强细

菌在宿主体内存活的机率, 进而加重机体的感染。根据保守程度和 G+C 含量的不同, 将 HPI 分为功能核心区(约 30.5 kb)和可变区两部分, 其中功能核心区包括 *irp2-fyuA* 基因簇共 12 个基因, 在不同种耶尔森菌中高度保守, *irp2* 作为铁调节基因, 仅存在于强致病株中^[4], 与毒力密切相关, 成为用来判断和检测其它病原菌是否存在 HPI 的标志基因^[5]。

研究表明, HPI 广泛存在于多种肠道杆菌中^[6-8], 禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *E.coli*, APEC)临床分离株中也存在 *irp2-fyuA* 基因簇^[9]。目前 *irp2* 在耶尔森菌 HPI 内的功能研究相对清楚, 缺铁条件

收稿日期: 2012-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(30871851)资助。

作者简介: 李叶芳, 女, 硕士研究生。E-mail: 550803294@163.com

* 通讯作者: 祁克宗, 男, 博士, 教授。E-mail: qkz@ahau.edu.cn

下 *irp2* 和 *irp1* 共同表达 2 种高分子量蛋白 HMWP2 (228 ku) 和 HMWP1 (380 ku), HMWPs 被认为对铁载体耶尔森杆菌素合成有重要作用, 是耶尔森杆菌素阳性表型所必需^[10]。HMWP2 可能参与铁载体的合成, 从而诱导耶尔森菌素受体和铁载体表达^[11], 但并不是所有的 *irp2*⁺ 都能表达 HMWP2^[4,10]。而 *irp2* 在 APEC 中是否也具有与耶尔森菌相同的铁摄取功能, 是否加强了 APEC 其他毒力因子的作用尚未明确。

Red 重组技术是利用 λ 噬菌体 Red 系统介导实现带有同源重组序列的外源线性 DNA 片断与染色体靶基因进行同源重组的方法^[12], 是研究基因功能和构建新菌株的有力工具。目前, Red 同源重组系统在普通大肠杆菌中进行基因敲除和整合已经相当成熟, 在沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、痢疾杆菌等细菌中也成功实现了目的基因的敲除与置换^[13-16], 但在 APEC 中应用报道较少。鉴此, 本研究拟从 *irp2* 基因入手, 利用 Red 同源重组方法敲除禽源 HPI⁺ 大肠杆菌 *irp2* 基因, 为进一步研究 *irp2* 在 HPI 的毒力贡献以及 APEC 中的致病功能打下基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

APEC 分离株 CE02 是用于进行同源重组的菌株, 由本实验室保存。pKD46(oriR101 repA101ts ParaB-gam-bet-exo Amp)同源重组的协助质粒, 温度敏感复制子, 阿拉伯糖诱导后表达 Gam、Bet 和 Exo 3 个噬菌体重组酶。pKD3(oriRycat bla)为 PCR 扩增提供氯霉素抗性基因的模板, 氯霉素抗性基因两侧 FRT 位点(FLP 重组酶识别位点), 为重组转化体提供筛选标志。pCP20 是含氨苄和氯霉素抗性基因的温度敏感型复制子, 42℃诱导 FLP 重组酶的表达, 质粒也逐渐丢失, 该质粒用于消除 FRT 位点间的氯霉素抗性基因。以上质粒均购自美国耶鲁大学菌种保藏中心。

1.2 试剂

L-阿拉伯糖, 氨苄青霉素、氯霉素、质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司, DL 2000 DNA Marker、PCRMIX、高保真 PCRMIX、DNA 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自大连宝生物工程技术有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 PCR 扩增及鉴定引物的设计

用于同源重组引物设计的原则是 5'端为 51 bp 的 *irp2* 基因两侧的同源臂, 3'端为 20 bp 的用于扩

增氯霉素抗性基因(两侧有 FRT 位点)的引物, 以 pKD3 为模板, PCR 方法扩增氯霉素抗性基因, 以替换 *irp2* 基因。鉴定引物分别从目的基因的上下游设计。同源重组引物 A1(划线部分为同源臂, 是从起始密码子开始的 51 bp 的序列):

5'-ATGATTTCTGGCGCACCATCTAAGGATT
CGCTGTTACCGGACAACCGCCACGTGTAGGCT
GGAGCTGCTTCG-3'; 同源重组引物 A2 (划线部分为同源臂, 是从终止子向左 45 bp 的序列):

5'-CTATATCCGCCGCTGACGACGGCGAACA
G GGCGAGGACGTTTTGTGCATATGAATATCCTC
CTTAG-3'; 鉴定引物:

A3: 5'-GTCGCGCCCCCTAAATTCC-3';

A4: 5'-TGCGTTCGCGATGGCGTTCC-3'。

1.4 融合 PCR 产物的制备和纯化

以质粒 pKD3 为模版, A1、A2 为引物, 按长引物条件进行 PCR 扩增。经鉴定的 PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化, 再将该初始纯化产物用限制性内切酶 *Dpn* I 酶切消化 4 h, 最终用胶回收方法得到最终纯化产物, 并测定 DNA 浓度。

1.5 感受态的制备与电击转化

将过夜培养 12 h 的 APEC(CE02)/pKD46 按 100:1 的量接种, 振荡培养至 OD_{600} 值约为 0.2, 加入终浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿拉伯糖继续培养至 OD_{600} 为 0.5~0.6, 使 pKD46 上的 Exo、Bet 和 Gam 3 个蛋白充分表达。冰上预冷 10 min, $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4℃离心 10 min, 弃培养基, 用预冷的双蒸水洗涤 2 次, 再用预冷 10%甘油离心洗涤 3 次, 浓缩 100 倍成 1 mL 的感受态细胞, 每管 100 μL , 存放于 -70℃冰箱待用。

取 200 ng 同源臂引物扩增的外源打靶氯霉素抗性基因片段与 100 μL 感受态细胞混匀, 转入已经预冷 10 min 的 0.2 cm BioRad 电击杯中, 轻轻敲击电击杯, 然后进行电击, 电击条件为电阻 200 Ω , 频率 25 μF , 电压 1.8 kV, 电击时间为 4~5 ms, 电击完成后迅速加入 1 mL 冰冷的 LB 培养基, 37℃水浴培养 1 h, 取 100 μL 涂于氯霉素平板(氯霉素浓度为 $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)上。37℃, 过夜培养, 次日挑选氯霉素抗性重组子。

1.6 FLP 位点专一性重组

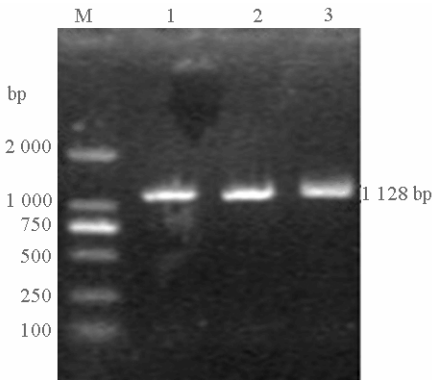
将质粒 pCP20 电转化导入氯霉素抗性重组子, 涂布于含氨苄和氯霉素双抗性 LB 平板上 30℃培养筛选阳性转化子, 挑选阳性转化子接种于无抗性的 LB 中, 42℃培养过夜, 热诱导 FLP 重组酶表达,

通过重组删除 FRT 位点间的序列,只保留一个 FRT 位点。用接种环蘸菌液在无抗生素培养基上划线,挑长出的单克隆点到氯霉素抗性平板上,未生长的为氯霉素抗性基因已被 FLP 重组酶删除。用鉴定引物作 PCR 对氯霉素抗性消失的克隆进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 融合 PCR 产物的制备与纯化

质粒 pKD3 为模版, A1、A2 为引物,高保真酶扩增,95℃预变性 45 s,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,74℃延伸 1 min 20 s 为条件,扩增的融合重组片段的大小与预期一致,DNA 片段纯化后电泳如图 1。

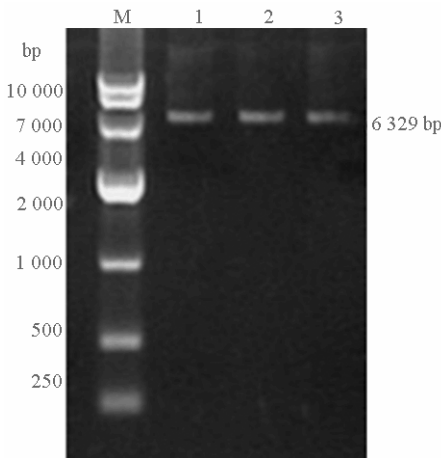


M: DNA Marker; 1、2、3: PCR 的重复

M: DNA Marker; 1,2 and 3: Products of fusion PCR fragment

图 1 融合 PCR 构建的同源重组片段

Figure 1 DNA homologous recombination fragment built by fusion PCR



M: DNA Marker; 1: pKD46; 2、3: pKD46 阳性转化子质粒提取

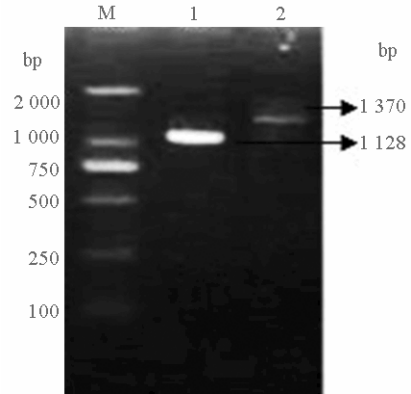
M: DNA Marker; 1: pKD46; 2,3: pKD46 positive transformants plasmid extraction

图 2 质粒 pKD46 转化提取验证

Figure 2 The extraction test of plasmid pKD46 transformants

2.2 质粒 pKD46 转化 APEC(CE02)后提取验证

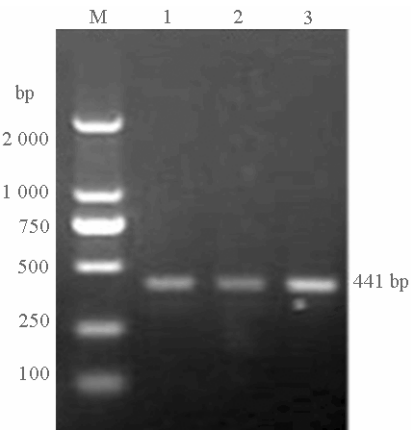
将 pKD46 按照化学方法转化到 APEC(CE02),挑选阳性重组菌在 LB 液体培养基中进行扩大培养,用质粒提取试剂盒提质粒后电泳验证,表明质粒 pKD46 转化成功,结果如图 2 所示。



M: DNA Marker; 1: 融合 PCR 片段大小; 2: 电转化后重组菌 PCR 鉴定片段大小

M: DNA Marker; 1: Products of fusion PCR fragment; 2: Products of recombinant strain PCR fragment after electrotransformation

图 3 电转化后重组菌 PCR 片段与融合 PCR 片段的对比
Figure 3 Comparison of the recombinant strain PCR fragment after electrotransformation and fusion PCR fragment



M: DNA Marker; 1、2、3: PCR 的重复

M: DNA Marker; 1,2 and 3: Products of chloramphenicol resistance gene eliminated

图 4 氯霉素抗性基因消除后 PCR 鉴定

Figure 4 PCR analysis after chloramphenicol resistance gene eliminated

2.3 电转化后重组菌 PCR 验证

鉴定引物 A3、A4 在同源臂的外侧,同源重组的氯霉素打靶片段大小为 1128 bp,电转化后 *irp2* 被氯霉素抗性基因替换后鉴定引物之间的序列为 1370 bp,通过扩增产物的大小判断引物间序列的变化。共鉴定了 20 个氯霉素抗性克隆,扩增产物在

1.0%琼脂糖凝胶上电泳,结果显示有3个为正确的重组转化体,正确重组率为15%(见图3)。

2.4 氯霉素抗性基因的消除

将质粒 pCP20 导入上述重组菌中,经二次重组后获得氨苄和氯霉素均敏感的二次重组菌,将其接种于无抗性的 LB 培养基中传 3~5 代,再用氯霉素抗性进行检测,能够稳定遗传的菌株证明氯霉素抗性已消除,用鉴定引物 A3、A4 进行 PCR 扩增,电泳显示在 441 bp 处出现清晰条带,如图 4。

2.5 测序结果

将 2.4 中 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳回收,用鉴定引物 A3、A4 进行测序。其中下划线部分为同源臂,黑体部分为 FRT 位点。结果如下:

```
GTCGCGCCCCCTAAATTCCTCCCTGACAGAG
GCCCCGATACCCCATCCGGGCCTCTGTATTTC
CGCCTGTTACCAACCCGAAACGGGCATAAATA
AACCCGTTTCGGGTAGCATATAATTGTTAATAAT
TATTATTCTCAAATTATTATTCTCATATGAGAAAT
GCTTTTCGGTAAGACGTGCCATCAGGAGGAAA
AATGATTTCTGCGCACCATCTAAGGATTCGCT
GTTACCGGACAACCGCCACgtgtaggctggagctgcttcg
aagtctctactttctagagaataggaacttcggaataggaactaagga
ggatattcatatggaccatggctaattcccatACAAAACGTCCTC
GCCCTGTTTCGCGTCGTCAGCGGCGGATATAG
CGCGAAGCAAACACTGATTTTCCCCGGAACGCCA
TCGCGAACGCA
```

3 讨论

利用 Red 重组系统,我们成功敲除了 APEC 中 HPI 毒力岛 *irp2* 基因,构建了 *irp2* 缺失菌,而且在操作位点没有留下选择标志,这为进一步研究 *irp2* 的缺失效应提供了简单的遗传环境。本研究初步摸索了 Red 重组系统的实验条件,总结如下:(1)采用高保真酶制备同源重组片段,打靶之前用 *Dpn* I 酶消化 4 h,因为 PCR 得到的线性 DNA 没有甲基化,*Dpn* I 识别序列只作用甲基化的底物,可以消除模板质粒电转化后假阳性的影响。(2)阿拉伯糖最佳诱导浓度为 10 mmol·L⁻¹,诱导条件为 30℃水浴培养 1~1.5 h,使 *OD*₆₀₀ 不超过 0.6,保证重组蛋白 Exo、Gam 和 Bet 充分表达,提高重组效率。(3)试验采用的 PCR 同源臂序列 51 bp、45 bp 较短,成功敲除了 *irp2* 基因,但与其他文献报道相比,重组效率不高,分析可能与 PCR 同源臂的长度有关,Murphy 等^[17]在 2003 年研究中也报道了长的 PCR 同源臂更有利于目的基因的敲除。此外也可能与所敲除的目的基因大小有极大相关性,*irp2* 在 HPI 内全长 6 468

bp,本试验针对 *irp2*(219~6 282 bp)基因进行敲除,相比已报道的多数所敲除基因的序列都长^[14-16,18],结合 Red 同源重组的作用机理,推测拟敲除的靶基因与 PCR 同源重组片段在序列长度上相差越大,重组效率也就越小,符合试验得出的结论。

当前研究致病菌的毒力基因最好方法就是构建基因缺失或突变株,使其失去正常基因的原有功能从而研究该基因在染色体基因组中的具体作用,而基于 λ 噬菌体 Red 重组酶作用同源重组技术因其同源臂短、重组效率高、试验周期短、操纵方便以及能在任何位置进行点突变、缺失、插入和克隆等优点逐渐成为研究基因功能的有效手段之一^[19-20]。传统的大肠杆菌内源性 RecA 同源重组体系,不仅需要较长的靶基因同源序列,还需构建具有靶位点的质粒,重组效率低,费时费力,使用起来有一定的局限^[21];而利用自杀性载体系统来敲除目的基因的方法,需要构建长同源重组序列的载体,需要多次进行酶切、连接,操作繁琐^[18],因而 Red 重组系统已成为目前分子生物学和分子遗传学研究的热点,在高等生物基因组研究领域产生深刻的影响,具有重要的理论意义和实践价值。

irp2 基因突变株的成功构建,为进一步深入研究 *irp2* 在 APEC 致病机制中的作用以及今后利用 Red 重组系统研究 HPI 的其他基因奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution[J]. Mol Microbiol, 1997, 23(6): 1089-1097.
- [2] 徐建国. 毒力岛和细菌毒力的进化[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(2): 169-174.
- [3] 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): 6743-6751.
- [4] de Almeida A M, Guiyoule A, Guilvout I, et al. Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence[J]. Microbial Pathogenesis, 1993, 14(1): 9-21.
- [5] Carniel E, Guiyoule A, Mercereau-Puijalon O, et al. Chromosomal marker for the 'high pathogenicity' phenotype in *Yersinia*[J]. Contributions to Microbiology and Immunology, 1991, 12: 192-197.
- [6] Bach S, de Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(2): 289-294.
- [7] 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]. Infection and Immunity, 1998, 66(2): 480-485.
- [8] Karch H, Schubert S, Zhang D, et al. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(11): 5994-6001.
- [9] 金文杰, 郑志明, 秦爱建, 等. 禽致病性大肠杆菌中耶尔森菌强毒力岛的分子流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(10): 787-790.
- [10] Carniel E, Mazigh D, Mollaret H H. Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence[J]. Infect Immun, 1987, 55(1): 277-280.
- [11] Fetherston J D, Bearden S W, Perry R D. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin /yersiniabactin receptor[J]. Mol Microbiol, 1996, 22(2): 315-325.
- [12] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [13] Muyrers J P, Zhang Y, Testa G, et al. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET- recombination[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1555-1557.
- [14] 汪莉, 王玉民. 用 Red 重组系统快速敲除大肠杆菌 *aroL* 和 *aroK* 基因[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(4): 308-311.
- [15] 姜娜, 王芑, 王艳春, 等. 利用 Red 重组系统敲除伤寒沙门氏菌 *rfaH* 基因[J]. 生物技术通报, 2009, 20(2): 173-176.
- [16] 王恒梁, 冯尔玲, 史兆兴, 等. Red重组系统在痢疾杆菌基因敲除中的应用研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 740-746.
- [17] Murphy K, Campellone K. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*[J]. BMC Mol Biol, 2003, 4(1): 11.
- [18] 朱春红, 孙晓庆, 何素芬, 等. 基于 Red 同源重组和高效自杀性载体系统构建肠炎沙门氏菌突变株方法的比较[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(2): 81-84.
- [19] Muyrers J P, Zhang Y, Stewart A F. Techniques: Recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(5): 325-331.
- [20] Poteete A R. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 201(1): 9-14.
- [21] 韩聪, 张惟材, 游松. Red 同源重组技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 17-21.