

· 论 著 ·

## 化脓性链球菌高毒力株特异基因文库的构建和分析\*

吴剑锋, 夏永祥<sup>△</sup>

(南京医科大学附属南京第一医院医学检验科 210006)

**摘要:**目的 构建化脓性链球菌毒力基因文库, 克隆和筛选化脓性链球菌高毒力株特异表达基因。方法 采用抑制消减杂交方法, 以从患者体内分离的链球菌作为毒力菌株, 分离毒力基因, 将其与 PMD18-T 载体进行 T/A 连接构建文库, 将连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10 进行文库扩增后, 将转化菌液涂布于 LB 固体平板, 构建化脓性链球菌毒力株特异基因消减文库, 用斑点杂交初步筛选后, 将获得的阳性克隆进行测序和同源性分析。结果 酶切产物为 100~2 000 bp, 连接效率大于 50%, 成功构建了化脓性链球菌毒力基因消减文库, 所得阳性克隆经斑点杂交筛选后测序, 与 Genebank 数据库进行同源性比对, 5 个未知序列可能为新基因, 7 个与已知基因有高度的同源性。结论 用抑制消减杂交技术及 T/A 克隆技术成功构建了化脓性链球菌毒力基因文库; 5 个未知的新序列可能与化脓性链球菌的高毒力有关。

**关键词:**链球菌科; 抑制消减杂交; 毒力基因; 基因消减文库

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1701-03

Construction and analysis of virulence genes subtracted library of *Streptococcus pyogenes*\*Wu Jianfeng, Xia Yongxiang<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Nanjing, Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

**Abstract:** Objective To construct virulence genes subtracted library of *Streptococcus pyogenes* and lay foundations for screening the virulent genes. Methods Suppression subtractive hybridization was performed to isolate the fragments of virulence genes in *Streptococcus pyogenes*. Then these fragments were directly inserted into T/A cloning vector to set up subtractive library. Amplification of the library was carried out with transformation of *E. coli* TOP10. Dot blot was used to screen the subtracted library. The differentially expressed cDNA fragments was sequenced and analyzed in Genebank with Blast search. Results A smear ranged from 100—2 000 bp was observed. The ligation efficiency of tester DNA with adaptor was at least higher than 50%. The difference between subtractive group and unsubtractive group was apparently significant. Partial positive clones in the library were randomly selected and successfully sequenced. 5 sequences showed no homology and presumably represent unknown genes, 7 sequences had a high similarity to the known genes. Conclusion Virulence genes subtracted library of *Streptococcus pyogenes* was constructed successfully with SSH and T/A cloning techniques. The library could be efficient and lays solid foundation for screening and cloning new and specific virulence genes of *Streptococcus pyogenes*.

**Key words:** Streptococcaceve; suppression subtractive hybridization; virulencegenes; subtracted library

A 群链球菌又称化脓性链球菌<sup>[1]</sup>, 主要引起化脓性炎症反应, 其引起的主要疾病有扁桃体炎、咽炎、蜂窝组织炎、亚急性细菌性心内膜炎及产褥感染等。因链球菌的 M 蛋白与心肌、肾小球基底膜有共同的抗原, 可引起风湿热和急性肾小球肾炎等超敏反应性疾病; 还可引起猩红热、毒性休克综合征等中毒性疾病, 严重威胁人类健康<sup>[2]</sup>。一些菌株的毒性强于其他菌株, 研究认为可能与菌株的毒力变异有关<sup>[3]</sup>。比较毒力株和标准菌株的基因组 DNA, 鉴别毒力差异基因, 有助于对感染性疾病的分子发病机制进一步深入了解。本研究采用抑制消减杂交技术(SSH)构建化脓性链球菌毒力基因文库, 筛选毒力相关基因, 探讨基因表达差异与化脓性链球菌高毒力之间的关系。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 化脓性链球菌取自本院化脓性链球菌感染患者(征得患者同意), 标准菌株购于中国工业微生物菌种保藏管理中心, 菌种编号为 10373; SSH 试剂盒购自 CLOTH 公司; 细菌基因组提取试剂盒购自海门市碧云天公司; 异丙基-β-D-硫代

吡喃半乳糖苷(IPTG)/X-gal, 购于 Sigma 公司, 氨苄西林(AMP)购自 Promega 公司; 感受态大肠杆菌 TOP10 购自 TAKARA 公司; PMD18-T 载体购自 TAKARA 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司; Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养** 在血琼脂固体培养基上接种化脓性链球菌, 在培养箱中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜。

**1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取** 根据细菌基因组提取试剂盒操作手册, 分别对毒力菌株和标准菌株提取 DNA, 并用紫外分光光度计对所提取的 DNA 进行浓度、纯度测定。

**1.2.3 基因组 DNA 酶切** Rsa I 1.5 μL(10 U/μL), 10× Rsa I 缓冲液 5 μL, 基因组 DNA 2 μg, 灭菌水加至 50 μL, 37 °C 酶切 16 h, 然后加入 2.5 μL 0.2 mol/L EDTA 终止反应。将酶切产物 5 μL 用于琼脂糖凝胶电泳分析, 其余用 95% 乙醇及 4 mol/L NH<sub>4</sub>OAc 进行沉淀, 将沉淀物溶于 5.5 μL 灭菌水中, 使终浓度达到 300 ng/μL。毒力菌株酶切产物命名为

Tester, 标准菌株酶切产物命名为 Driver。

**1.2.4 接头连接及其效率分析** 将 Tester 1  $\mu\text{L}$  用 7.5  $\mu\text{L}$  灭菌水稀释。分为 2 份,一份加入接头 1 2  $\mu\text{L}$  连接,另一份加入接头 2R 2  $\mu\text{L}$ ,16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接,分别加入 1  $\mu\text{L}$  EDTA 终止反应,68  $^{\circ}\text{C}$  5 min 灭活连接酶,产物分别为 Tester1、Tester2。按照 SSH 使用手册中的检测方法检测连接效率,在新的离心管中,混合 2  $\mu\text{L}$  Tester1 和 Tester2,作为非消减对照组。接头 1 与接头 2R 序列分别为:5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT-3'、3'-GGC CCG TCC A-5';5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT-3'、3'-GCC GGC TCC A-5'。

**1.2.5 两轮 SSH** 用 Driver 2  $\mu\text{L}$  分别与 1  $\mu\text{L}$  Tester1、1  $\mu\text{L}$  Tester2 杂交,在 PCR 仪中,98  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min,然后 68  $^{\circ}\text{C}$  杂交 10 h,完成第 1 次杂交。立刻进行第 2 次杂交,将新鲜变性的 Driver 1  $\mu\text{L}$  同以上完成杂交的 2 种产物杂交,63  $^{\circ}\text{C}$  过夜,两轮杂交完成。

**1.2.6 两轮选择性 PCR 扩增** 将杂交产物溶于 200  $\mu\text{L}$  稀释缓冲液中,取 1  $\mu\text{L}$  作为模板,PCR 引物 1 作为引物进行第 1 轮 PCR,扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,66  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min,25 个循环。将第 1 次 PCR 产物稀释 40 倍作为第 2 次 PCR 的模板,以巢式引物 1 和巢式引物 2R 为引物进行第 2 轮扩增,扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,68  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min,15 个循环。取 8  $\mu\text{L}$  产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。非消减对照组按相同条件扩增两轮。PCR 引物 1 序列:5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'。巢式引物 1 和巢式引物 2R 序列分别为:5'-TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3',5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'。

**1.2.7 消减效率的分析** 将消减和非消减的第 2 次 PCR 产物稀释 10 倍作为模板,以 23S rRNA 正向引物和 23S rRNA 反向引物为引物,PCR 扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,68  $^{\circ}\text{C}$  2 min,18 个循环。完成后取 5  $\mu\text{L}$ ,其余再扩增 5 个循环,重复 3 次,最后将消减和非消减的扩增 18、23、28、33 个循环的产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。23S rRNA 正向引物和 23S rRNA 反向引物序列分别为 5'-CTA CCT TAG GAC CGT TAT AGT TAC-3'、5'-GAA GGA ACT AGG CAA AAT GGT GCC-3'。

**1.2.8 PCR 产物的 T/A 克隆** 取 2  $\mu\text{L}$  第 2 轮 PCR 产物与 2  $\mu\text{L}$  线性化的 PMD18-T 载体混合,在 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA 连接酶作用下,14  $^{\circ}\text{C}$  连接 16 h,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 10  $\mu\text{L}$  连接反应产物与 100  $\mu\text{L}$  感受态大肠杆菌 TOP10 于离心管中混匀,用热激法将连接产物导入感受态大肠杆菌 TOP10,向离心管中加入 890  $\mu\text{L}$  LB 培养基,混匀后置于摇床,37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 45 min,涂布 200  $\mu\text{L}$  菌液在含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 的 IPTG/X-gal 琼脂平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h,随机挑选直径大于 1 mm 的白色克隆菌落,点种于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 的 LB 培养基的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,加 15% 甘油,-70  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.9 菌液斑点杂交筛选** 取 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存菌株,点种于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 的 LB 培养基的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。取 1  $\mu\text{L}$  菌液接种于尼龙膜 (Roche 公司),在含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 的琼脂平板上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h,尼龙膜上的菌斑,经变性、中和、80  $^{\circ}\text{C}$  固定 2 h 后备用。取纯化的正向和反向 SSH 第 2 轮 PCR 产物各 80 ng(3  $\mu\text{L}$ ),用 5  $\mu\text{L}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] d-ATP 随机引物法标记纯化后备用。42  $^{\circ}\text{C}$  预杂交 1 h,杂交 18 h 后洗膜,

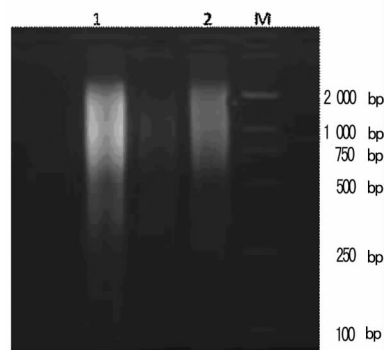
-70  $^{\circ}\text{C}$  放射自显影 12 h。

**1.3 阳性克隆的测序与同源性分析** 取斑点杂交初步筛选的阳性克隆,用巢式引物 1 和巢式引物 2R 为引物,进行 PCR 扩增,2% 琼脂糖凝胶电泳分析确认有插入片断后,以 M13 为正向引物,PE ABI PRISM 3700 测序仪 (美国 ABI 公司) 测序。测序结果用 Primer5.0 分析后,在 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 中进行序列同源性检索分析。

**2 结 果**

**2.1 细菌基因组的提取** 经过紫外分光光度计测定,毒力菌株和标准菌株所提取的 DNA 浓度分别为 120、160  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 分别为 1.73、1.81。

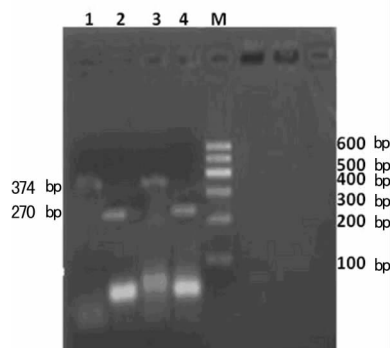
**2.2 基因组 DNA 酶切** 酶切后为小于 2 000 bp 的片段,酶切效果较好,见图 1。



1: Tester; 2: Driver; M: DL2000 DNA 标记。

图 1 细菌基因组 DNA 酶切

**2.3 接头连接效率分析** 结果显示 PCR 引物 1 与 23S rRNA 引物扩增所得条带亮度较 23S rRNA 正、反向引物扩增所得条带亮度相差小于 2 倍,表明连接效率大于 50%,连接效率较高,见图 2。



1: 以 Tester1 为模板,23S RNA 正向引物和 PCR 引物 1 为引物的 PCR 产物;2: 以 Tester1 为模板,23S RNA 正、反向引物为引物的 PCR 产物;3: 以 Tester2 为模板,23S RNA 正向引物和 PCR 引物 1 为引物的 PCR 产物;4: 以 Tester2 为模板,23S RNA 正、反向引物为引物的 PCR 产物;M: MD101 DNA 标记。

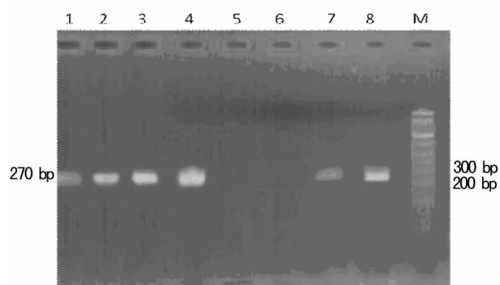
图 2 连接效率检测结果

**2.4 消减效率的分析** 将消减和非消减的扩增 18、23、28、33 个循环的产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,未消减过的产物在 18 个循环时就已出现清晰条带,消减过的产物在 28 个循环时才出现条带,表明消减效果理想,见图 3。

**2.5 SSH 文库的构建筛选结果** 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 的 IPTG/X-gal 琼脂平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h 后,平板可见 254 个白色及蓝色菌落生长,以白色菌落为主 (约占 80%),菌落饱满清晰,

直径 1 mm 左右。随机挑选 175 个白色菌落,保存。斑点杂交信号对比,获得 A1、A2、A6、B5、C5、C7、D3、E4、E8、F5、G5、H2 共 12 个差异基因片段,且这 12 个基因片段均表现为毒力株 DNA 片段标记的探针信号增强。

**2.6 DNA 测序与同源性分析结果** 对 12 个含有差异基因片段的阳性克隆进行 M13 双向引物测序,与 Genebank 数据库初步比对,结果显示 12 个差异片段中有 5 个未检索到同源序列,可能代表了化脓性链球菌的新的毒力基因,其余 7 个序列均与已知基因有高度的同源性,见表 1。



1~4:非消减第 2 次 PCR 产物 23S rRNA 基因扩增 18、23、28、33 个循环的产物;5~8:消减第 2 次 PCR 产物 23S rRNA 基因扩增 18、23、28、33 个循环的产物;M:1kb plus DNA 标记。

图 3 消减效率分析

表 1 差异基因片段的生物学信息检索结果

差异片段序号	序列长度 (bp)	序列检索结果	杂交信号强度
A1	518	预测的 reP 蛋白质[解螺旋酶]	增强
A2	238	tnpA(SEcp1-like transposase)转座酶基因	增强
A6	481	未知序列	增强
B5	573	未知序列	增强
C5	1 740	预测的膜融合蛋白流出泵	增强
C7	298	未知序列	增强
D3	584	部分的 DNA 解旋酶 b 亚单位	增强
E4	443	23S rRNA 核糖体核糖核酸	增强
E8	317	未知序列	增强
F5	400	前 62 及后 41 个为 16S RNA 核糖体基因	增强
G5	916	位点特异性 I 型脱氧核糖核酸酶	增强
H2	206	未知序列	增强

### 3 讨论

近几年,随着 PCR 技术的不断发展,涌现了许多基于 PCR 的分离差别表达基因的新方法。1992 年 Liang 和 Pardee<sup>[4]</sup> 提出 mRNA 差异显示技术,1994 年有学者提出代表性差示分析技术及 SSH,有力地推动了基因克隆工作的深入和发展<sup>[5]</sup>。在抑制性 PCR 基础上建立起来的 DNA 消减杂交方法,克服了差异显示技术假阳性较高和代表性差示分析技术消减杂交轮次较多的缺点,十分适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能。

化脓性链球菌是一类在世界范围内广泛分布的革兰阳性菌,是许多疾病的重要病原之一,与其他病原微生物一样,化脓性链球菌的致病性与其产生的许多毒力因子息息相关,毒力基因是产生各种毒力因子的物质基础,因此发现毒力基因是很有必要的。SSH 已经被应用于许多致病菌毒力基因的发现<sup>[5-7]</sup>,都得到了理想的效果。SSH 目前还应用于鉴定细菌<sup>[8]</sup>、鉴定毒力岛<sup>[9]</sup>、发现插入序列<sup>[10]</sup>及构建检测探针<sup>[11]</sup>等多方面,表明该技术是一个简单、有效的鉴定细菌间遗传差异的方法。

本研究首次将 SSH 技术应用于化脓性链球菌毒力基因的研究,以标准菌株作为对比材料,严格检测基因组 DNA 提取质量,又经基因组 DNA 酶切、接头连接、两轮消减杂交及两次抑制 PCR 等反应步骤,使 Tester 与 Driver 中共有的基因片段得到消减,存在于 Tester 中的毒力基因得到特异性扩增。通过 T/A 克隆技术,将两轮扩增 PCR 产物纯化后直接与 PMD18-T 载体连接,成功构建化脓性链球菌毒力基因文库。用斑点杂交初步筛选消减文库后,将获得的阳性克隆进行测序,测序结果与 Genebank 数据库进行同源性比对,发现其中 7 个序列与已知基因有高度的同源性,5 个未知序列可能为新的毒力基因。化脓性链球菌毒力基因文库的建立避免了筛选、鉴定特有基因的盲目性,有利于克隆出低丰度的稀有基因,为进一步研究化脓性链球菌致病的分子机制及临床治疗方法奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci[J]. J Exp Med, 1933, 57(4): 571-595.
- [2] Holm SE. Invasive group A streptococcal infections[J]. N Engl J Med, 1996, 335(8): 590-591.
- [3] Zhang YL, Ong CT, Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish[J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt 4): 999-1009.
- [4] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [5] 田云, Aarestrup FM, 陆承平. 猪链球菌 2 型的可能毒力基因的发现[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 613-616.
- [6] Janke B, Dobrindt U, Hacker J, et al. A subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199(1): 61-66.
- [7] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [8] Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, et al. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3759-3762.
- [9] Walker JC, Verma NK. Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridization of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 213(2): 257-264.
- [10] Sawada K, Kokeguchi S, Hongyo H, et al. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Prophyomonas gingivalis* [J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5621-5625.
- [11] Parsons YN, Panagea S, Smart CH, et al. Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4607-4611.