

• 论 著 •

大肠埃希菌 *sdiA* 基因缺失株的建立*

伍彬宁,蔡壬辛[#],曾建明,鄂顺梅,李有强,叶大柠,鲁 洋,陈 茶[△]
(广州中医药大学第二临床医学院检验医学部,广东广州 510006)

摘要:目的 为研究 HSL 信号分子对大肠埃希氏菌的影响而建立大肠埃希菌 *sdiA* 基因缺失株。方法 通过 Red 重组系统敲除大肠杆菌 BW25113 和 SM10λpir 的 *sdiA* 基因,PCR 测序鉴定;不同时间点检测 A₆₀₀ 值,绘制细菌生长曲线;荧光定量 PCR 检测 *csgD*、*csgB* 基因水平。结果 PCR 测序结果经 DNAMAN 软件比对分析,与预想结果一致;与野生株相比,*sdiA* 基因突变对细菌生长曲线无明显影响。结论 成功建立 BW25113、SM10λpir 的 *sdiA* 基因缺失株,为后续研究铜绿假单胞菌信号分子 HSL 对大肠埃希菌的影响奠定了基础。

关键词:大肠埃希菌; 基因敲除; Red 重组系统; *sdiA* 基因; HSL 信号分子; 接合反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)17-2466-03

Construction of The *sdiA* Gene Mutant in *Escherichia coli* Strains*

Wu Binning, Cai Renxin[#], Zeng Jianming, E Shunmei, Li Youqiang, Ye Daning, Lu Yang, Chen Cha[△]
(Department of Laboratory Medicine, the Second Clinical Medical College of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: **Objective** To build *sdiA* gene mutants of *Escherichia coli* BW25113 and SM10λpir strains. **Methods** The *sdiA* gene of *Escherichia coli* BW25113 and SM10λpir were knocked out with Red recombination system. The mutants were detected by PCR technique, and the following sequencing results were analyzed through alignment by software DNAMAN. Growth curve of strains were assayed by detecting the A₆₀₀ value at different time point. The *csgD* and *csgB* genes expression levels were detected by fluorescent quantitative PCR in SM10λpir *sdiA* mutant thereafter. **Results** PCR products electrophoresis showed a shorten fragment in mutants comparing to their parental strains BW25113 and SM10λpir, and it was confirmed by DNA sequencing. The growth curves and cells morphology in Gram stain were similar in both mutants and wild-type strains. The expression of *csgD* and *csgB* genes was higher in SM10λpir *sdiA* mutants than those in wild-type strain. **Conclusion** The mutants of *sdiA* deletion of *Escherichia coli* BW25113 and SM10λpir were constructed successfully, and it will be the foundation for further research of the effects of the signal molecular HSL on *Escherichia coli*.

Key words: *Escherichia coli*; gene knockout; Red recombination system; *sdiA* gene; HSL signal molecular; conjugation reaction

铜绿假单胞菌(PA)是临床常见的条件致病菌,近年来,PA 耐药问题日益严重。目前认为基因水平转移是介导细菌耐药的重要途径,其方式有:转化、转导和接合。接合介导的耐药基因水平转移是 PA 多重耐药的重要原因,但 PA 接合的调控机制尚不清楚。有研究证明 Ti 质粒在根癌土壤杆菌结合转移过程中受到一种由细菌释放,称为接合因子的信号分子的调控。接合因子实质上是一种酰基高丝氨酸内酯(HSL)分子,能提高 Ti 质粒转移的频率^[1-2]。目前,有研究证实 PA 等革兰阴性菌广泛存在“群体感应”系统。在“群体感应”系统中,HSL 分子作为自诱导剂来监测群体密度^[3]。当细菌达到一定数量后,HSL 浓度升高到一定阈值,启动一系列基因的表达,调节细菌的群体行为,如:PA 胞外酶的产生、发光菌的生物发光性、Ti 质粒的接合转移、细菌抗生素的合成、毒性因子的表达、生物膜的形成等。课题组前期在国家自然科学基金资助下研究 PA 信号分子 HSL 对大肠埃希菌(*E. coli*)-PA 接合反应的影响,结果发现 HSL 有促进接合反应,并引起接合相关基因

traI、*traG* 和 *trbC* 表达增高的作用。研究发现,转录因子 *sdiA* 是供体菌 *E. coli* 中唯一的 HSL 受体蛋白,为明确 *sdiA* 在接合中的作用,本文通过基因同源重组技术突变供体菌 *E. coli* SM10λpir 的 *sdiA* 基因,为后续研究 HSL 信号分子对 *E. coli*-PA 接合体系的影响打下基础。

1 材料方法

1.1 材料 BW25113 菌株和基因敲除所用质粒^[4]:pKD3、pKD46、pCP20 由 Barry L. Wanner 教授惠赠,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 *sdiA* 基因突变所用引物 D-*sdiA*_F/R 引物序列参考文献[5]进行设计,另外按 NCBI 数据库中 *E. coli* 基因组序列(登录编号:NC_000913.2)设计测序引物 C-*sdiA*_F/R,见表 2。

1.2.2 基因敲除 本试验通过 Red 重组技术敲除 *E. coli* SM10λpir 的 *sdiA* 基因^[4]。以 pKD3 质粒为模板,引物 D-*sdiA*_F/R 扩增重组同源 DNA,纯化后电转化 SM10λpir(pKD46)

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071397、81271909);广东省自然科学基金资助项目(S2013010012970)。 作者简介:伍彬宁,男,硕士研究生在读,主要从事临床微生物学与检验的研究;蔡壬辛,男,检验技师,主要从事临床微生物与检验的研究。 [#] 共同第一作者。
[△] 通讯作者,Email:chencha906@163.com。

感受态,筛选氯霉素抗性克隆,42 ℃培养消除 pKD46 质粒后转化 pCP20 质粒,再次 42 ℃培养消除氯霉素抗性及 pCP20 质粒,获得候选菌株用于后续试验鉴定。

1.2.3 测序鉴定 以引物 *C-sdiA_F/R* 扩增候选菌株,PCR 产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳成像,同时送测序,测序结果用 DNAman 软件比对分析。

1.2.4 荧光定量 PCR(qPCR) 挑取单个 SM10λpir 野生株及 *sdiA* 突变株菌落至 3 mL LB 培养液中,37 ℃、200 r/min 摇菌过夜,按 1∶100 比例稀释到新鲜 LB 培养基中,30 ℃、200 r/min 摇菌 8 h,离心收集菌液提取 RNA 后通过 SYBR Green 染料法定量检测 *csgD* 和 *csgB* 基因表达,*rpoD* 为内参基因,引物序列见表 2。

表 1 试验所用菌株和质粒		
菌株/质粒	相关基因表型特点	来源
菌株		
<i>E. coli</i> BW25113	<i>F</i> ⁻ , <i>DE</i> (<i>araD-araB</i>) 567, <i>lacZ</i> A787 (<i>del</i>) ₊ ; <i>rrnB</i> -3, <i>LAM</i> ⁻ , <i>rph</i> -1, <i>DE</i> (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	赠送
<i>E. coli</i> SM10λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ₊ ; <i>RP4-2-Tc</i> ₊ ; <i>Mu Km λpir</i>	本实验室
质粒		
pKD3	<i>oriR6K</i> , <i>FRT</i> ₊ ; <i>cat</i> ₊ ; <i>FRT template plasmid</i> <i>Cm</i> ^R , <i>Amp</i> ^R	赠送
pKD46	<i>oriR101 repA101ts P-araB-gam-bet-exo</i> <i>Amp</i> ^R	赠送
pCP20	<i>pSC101 replicons Flp</i> (<i>λ Rp</i>) <i>cI857</i> <i>Cm</i> ^R , <i>Amp</i> ^R	赠送

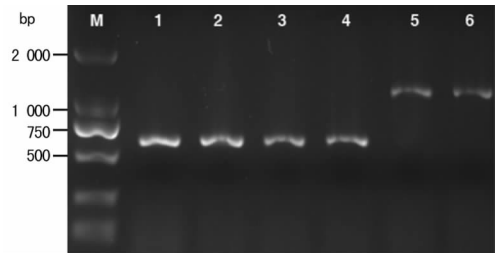
表 2 PCR 引物序列	
引物名称	引物序列(5'→3')
D- <i>sdiA_F</i>	ATG CAG GAT AAG GAT TTT TTC AGC TGG
	CGT CGC ACG ATG TAG GCT GGA GCT GCT TCG
D- <i>sdiA_R</i>	TCA AAT TAA GCC AGT AGC GGC CGC GTA
	ACA GGC AAC CAT GGG AAT TAG CCA TGG TCC
C- <i>sdiA_F</i>	TTT CAA GCC TGA TAA AAC TGC
C- <i>sdiA_R</i>	AGA ATA ATC AAG AAC TGG CAA A
<i>csgD_F</i>	TGC AGC CGC AGC AGG TTA TG
<i>csgD_R</i>	CCC GGT TGC TAC TAC CTT CTT GC
<i>csgB_F</i>	ATT GGC AGG ATA CTT TGA GCA GG
<i>csgB_R</i>	CTT GCA ACC CAT TGA CAA CAC G
<i>rpoD</i> -P1	CGT GGT AAG GAG CAA GGC TAT C
<i>rpoD</i> -P2	TCA CCT GAA TGC CCA TGT CG

1.2.5 生长曲线和细菌染色 从-80 ℃取 *E. coli* SM10λpir *sdiA* 基因突变株与野生株,接种血平板,挑取单克隆至 3 mL LB 液体培养基中 37 ℃、200 r/min 增菌 12 h,取各菌液调 0.5 MCF,再各取 20 μL 至 3 mL LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min,于 0、2、4、6、8、10、12 h 时,在 721 分光光度计测定菌液

A₆₀₀ 值,绘制生长曲线。同时进行常规制片,革兰染色,光学显微镜观察细菌形态并成像。

2 结 果

2.1 *sdiA* 基因敲除的鉴定 因 PCR 鉴定引物在 *sdiA* 基因突变处上下游约 200 bp 处,突变后染色体上残留一个 FRT 序列,所以 PCR 产物应为 622 bp,而野生株则为 1 169 bp。PCR 产物电泳结果与预期一致,见图 1。测序峰形图显示测序质量良好,结果比对正确,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



M:DL2000 DNA maker;1,2:*E. coli* BW25113 *sdiA* 缺失株;3,4:*E. coli* SM10 *sdiA* 缺失株;5:*E. coli* BW25113;6:*E. coli* SM10λpir。

图 1 *sdiA* 基因敲除的 PCR 产物鉴定电泳图

2.2 细菌生长曲线 细菌生长曲线显示,*E. coli* SM10λpir *sdiA* 基因突变株与野生株无明显差异;此外,细菌培养 4 h 和 12 h 时的革兰染色结果显示 SM10λpir *sdiA* 基因突变株与野生株无明显差异,提示 *sdiA* 突变对细菌表型无明显影响。见图 3、4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 qPCR 检测生物膜相关基因的变化^[6] qPCR 检测结果发现 *E. coli* SM10λpir *sdiA* 基因突变株 *csgD* 和 *csgB* 基因表达量明显高于野生株,提示 *csgD* 和 *csgB* 合成受 *sdiA* 蛋白影响,见图 5。

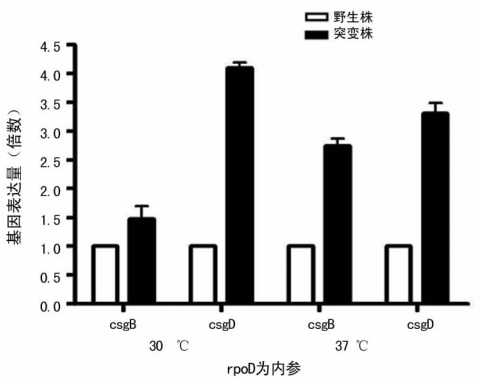


图 5 qPCR 检测 *E. coli* SM10λpir *sdiA* 突变株和野生株 *csgD* 和 *csgB* 基因表达

3 讨 论

本课题组前期试验发现受体菌 PAO1 的 HSL 合成基因缺失将降低 *E. coli*-PA 接合反应频率,因转录因子 *sdiA* 是供体菌 *E. coli* 中唯一的 HSL 受体蛋白,为明确 *sdiA* 在接合中的作用,本研究对供体菌 *E. coli* SM10λpir *sdiA* 基因进行了靶向缺失突变。

Red 同源重组是一种利用同源重组方法改变生物体某一内源基因的遗传学技术。它将靶基因突变位点左右各 35~50 bp DNA 片段连接到耐药基因(本实验为氯霉素 *Cm*^R)两侧,导入细菌后,在 pKD46 质粒携带的 λ 噬菌体 Red 重组酶作用下,

与染色体上靶基因发生同源重组,从而实现在基因水平上对目的基因的敲除、替换和突变等操作^[4]。本研究以 Red 同源重组技术敲除 *sdiA* 基因,证实该技术是一种高效准确的基因突变技术。

首先,本研究通过 PCR 测序检测结果证实 *sdiA* 基因突变成功。其次,在细菌表型方面,*sdiA* 基因高表达能够抑制生物膜成分 curli 形成。因刚果红能结合 curli 和纤维素,是检测 curli 形成的非特异性试验^[6];所以课题组尝试进行刚果红试验验证。然而结果发现 SM10λpir 和 BW25113 *sdiA* 基因突变株的刚果红试验结果与野生株间无明显差别(未在本文结果中描述),不能用于 *sdiA* 突变株表型鉴别。因此,本研究在基因水平上检测了 curli 形成相关基因 *csgD* 和 *csgB* 的表达。结果提示 *csgD*、*csgB* 基因在 SM10λpir *sdiA* 缺失株高表达,与文献报道一致,侧面说明试验菌株建立成功。

文献报道,*E. coli* 细胞分裂需要 ftsQ、ftsA 和 ftsZ 产物的参与,而转录因子 *sdiA* 能识别 ftsQAZ 基因簇启动子^[7],促进基因转录,并导致细菌分裂加速,形态上多为短杆状^[8-9]。本实验通过细菌生长曲线和对延缓期、对数期(4、12 h)的细菌进行革兰染色,发现 37℃下 *sdiA* 基因的缺失对 *E. coli* SM10λpir 菌株的生长曲线和形态无明显影响,与文献报道的在 *sdiA* 基因高表达的条件下,*sdiA* 蛋白促进细菌分裂现象并不矛盾。

综上所述,本文成功建立 *E. coli sdiA* 基因缺失株,为后续研究 PA 信号分子 HSL 对大肠埃希菌的影响奠定了基础。

参考文献

[1] Piper KR, Beck von Bodman S, Farrand SK. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by auto-induction[J]. *Nature*, 1993, 362(6419): 448-450.
[2] Zhang L, Murphy PJ, Kerr A, et al. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones[J]. *Nature*,

1993, 362(6419): 446-448.
[3] Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 685-695.
[4] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(12): 6640-6645.
[5] Zhou X, Meng X, Sun B. An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in *Escherichia coli*[J]. *Cell Res*, 2008, 18(9): 937-948.
[6] Lee J, Maeda T, Hong SH, et al. Reconfiguring the quorum-sensing regulator *sdiA* of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(6): 1703-1716.
[7] García-Lara J, Shang LH, Rothfield LI. An extracellular factor regulates expression of *sdiA*, a transcriptional activator of cell division genes in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(10): 2742-2748.
[8] Wang XD, de Boer PA, Rothfield LI. A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*[J]. *EMBO J*, 1991, 10(11): 3363-3372.
[9] Bendezu FO, de Boer PA. Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in *mre* and *mrd* shape mutants of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(5): 1792-1811.

(收稿日期:2015-04-28)



(上接第 2465 页)

别为 53.06%、51.02%,明显高于其他 2 组,且分别高于 BUN、Scr 指标阳性率,进一步显示 CysC、β2-MG 诊断方案的可行性及可信性。

综上所述,糖尿病肾病早期诊断应用 CysC 的临床诊断效果明显^[12-13],能有效提示患者的病变情况,并提高临床诊断准确率,具有重要的临床价值。

参考文献

[1] 赵建军,朱武.血清胱抑素 C、同型半胱氨酸及尿微量清蛋白/肌酐比值在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(2): 117-120.
[2] 张晓飞.血清 CysC 和 Hs-CRP 在 2 型糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. *中国实用医药*, 2014(15): 64-65.
[3] 林养,陈梅,吴春芳,等.联合检测血清胱抑素 C 和 α-L 岩藻糖苷酶对糖尿病肾病诊断的意义[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(5): 575-576.
[4] 乔立冬.血清胱抑素 C 与肌酐和尿素检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(4): 110-111.
[5] 姚碧婉.多项生化检测指标对糖尿病肾病的早期诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(14): 1873-1874.

[6] 杨英波.检验指标对糖尿病诊治的影响[J]. *中国卫生产业*, 2012, 10(14): 139.
[7] 程苏琴,朱美财.尿微量白蛋白在糖尿病肾损伤早期诊断中的价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(7): 740-741.
[8] 王晓青.胱抑素 C、超敏 C 反应蛋白和尿微量白蛋白在糖尿病早期肾损害监测中的作用[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(11): 1801-1802.
[9] 程莹,李宁娜,刘君静,等.ROC 曲线评价血清胱抑素 C 在糖尿病肾病中的诊断价值[J]. *西南国防医药*, 2014, 24(7): 715-718.
[10] 蔡锦亮,洪桂清,陈静萍. CysC、Hcy、HbA1c、hs-CRP 在糖尿病早期肾损伤中的应用研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(13): 1017-1018.
[11] 陈红涛,伍绍东,刘道利.胱抑素 C 与超敏 C 反应蛋白联合检测 2 型糖尿病早期肾损害的临床价值[J]. *中国实用医药*, 2009, 4(30): 13-14.
[12] 诸波,李维春,戴书连.胱抑素 C 在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. *安徽卫生职业技术学院学报*, 2012, 11(6): 85-86.
[13] 汤建雷,袁莉,刘贤称.胱抑素 C 对 2 型糖尿病肾病的诊断价值[J]. *南通大学学报:医学版*, 2012, 32(4): 272-274.

(收稿日期:2015-04-08)