

大肠杆菌 *qseC* 基因敲除及其缺陷株运动能力研究

蒙俊¹⁾, 杨堃²⁾, 黄洁²⁾, 叶联华³⁾, 陈华梅²⁾, 汪珺²⁾, 方育²⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院心血管外科; 2) 麻醉科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学第三附属医院胸心外科, 云南昆明 650118)

[摘要] 目的 通过 Red 同源重组法构建 *qseC* 基因缺失的大肠杆菌突变株, 探讨 *qseC* 基因对大肠杆菌运动能力的影响. 方法 PCR 扩增两翼与目的基因上下游同源、含有氯霉素抗性基因片段, 电击转入大肠杆菌 MC1000, 在 Red 同源重组酶作用下, 用含同源臂的氯霉素抗性片段置换目的基因 *qseC*, 并利用 FLP 位点专一性重组将氯霉素抗性基因删除. 测定 *qseC* 基因缺失株运动能力的变化. 结果 *qseC* 基因已被成功敲除. 在 LB 培养基中, *qseC* 基因缺陷株的生长状况与亲株无明显差异. MC1000 与 MC1000*qseC* 基因缺失株运动圆环的直径分别为 (6.10 ± 0.36) mm 和 (3.20 ± 0.53) mm ($P < 0.01$). 结论 成功构建大肠杆菌 *qseC* 基因缺失突变株, 且 *qseC* 基因对细菌运动能力具有重要调控作用.

[关键词] 大肠杆菌; *qseC* 基因; Red 同源重组; 运动能力

[中图分类号] Q784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0006-05

Construction of *qseC*-Deleted Mutant of *Escherichia coli* and Evaluation of Its Motility

MENG Jun¹⁾, YANG Kun²⁾, HUANG Jie²⁾, YE Lian-hua³⁾, CHEN Hua-mei²⁾, WANG Jun²⁾, FANG Yu²⁾

(1) Dept. of Cardiovascular Surgery; 2) Dept. of Anaesthesiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Cardiac and Thoracic Surgery, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To construct a *qseC*-deleted mutant strain of *E. coli* by using Red recombination and to study the motility of *qseC* gene in the mutants. **Methods** The chloramphenicol-resistant gene flanked by homologues of target genes was amplified by PCR and electro-transformed into *E. coli* MC1000. When induced by L-arabinose, the plasmid pKD46 could express three recombinant proteins of λ -prophage, which led to the replacement of target gene (*qseC*) with chloramphenicol-resistant gene. Then the chloramphenicol-resistant gene was eliminated by FLP-promoted recombination events. The motility of wild-type and mutant strain was detected. **Results** The *qseC*-deleted mutant of *E. coli* was confirmed by various PCR. Gene *qseC* was completely deleted. There was no significant difference in growth ability between the *qseC* mutant strain and the wild-type strain MC1000. The sizes of motility halos was (6.10 ± 0.36) mm and (3.20 ± 0.53) mm, respectively. **Conclusion** The *qseC*-deleted mutant of *E. coli* was constructed successfully, and the *qseC* gene plays an important role in regulation of motility in *Escherichia coli*.

[Key words] *Escherichia coli*; *QseC* gene; Red recombination; Motility

大肠杆菌是生活在人和动物肠道中的条件致病菌, 由于肠道是体内最大的“储菌库”, 肠道屏障一旦损伤, 即可发生细菌移位^[1]. 从肠道移位的

细菌中, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 占半数以上^[2,3].

研究发现大肠杆菌密度感应调节子 C (Quorum

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81460278); 云南省应用基础研究计划项目 (2014FB024)

[作者简介] 蒙俊 (1975~), 男, 云南文山州人, 医学博士, 讲师, 主要从事心外科临床工作.

[通讯作者] 黄洁. E-mail: ydyhj@163.com

sensing *E. coli* regulator C, *QseC*) 可以识别人体肾上腺素 (EPI) 及去甲肾上腺素 (NE) 等信号分子^[4-8], 提示大肠杆菌在细菌移位过程中还可能受到宿主的调控. 而大肠杆菌密度感应调节子 C (*QseC*) 作为密度感应系统中的信号受体蛋白, 在宿主对细菌的调控中占重要地位^[9,10]. 本研究借助 Red 重组系统敲除大肠杆菌 MC1000 染色体上的 *qseC* 基因, 构建 *qseC* 缺陷型重组菌株 MC1000 Δ *qseC*, 并分析其运动能力的变化.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 K-12 MC1000 [araD139 Δ (araABC-leu) 7679] 菌株, 阿拉伯糖代谢缺陷, 有利于使用阿拉伯糖诱导表达 Red 重组系统. 质粒 pKD46 (oriR101 repA101ts ParaB-gam-bet-exo bla) 为同源重组的协助质粒, 是温度敏感复制子, 高于 37°C 该质粒会丢失, 阿拉伯糖诱导后表达 Gam、Bet 和 Exo 3 个 λ 噬菌体重组酶. pKD3 (oriR γ cat bla) 为 PCR 扩增提供氯霉素抗性基因的模板, 其两侧带有 FRT (FLP 重组酶识别位点) 的氯霉素抗性基因, 可为重组子提供筛选标志. pCP20 是 FLP 重组酶的表达质粒, 复制子为温度敏感型, 42°C 诱导 FLP 重组酶表达, 质粒也逐渐

丢失, 该质粒用于消除 FRT 间的氯霉素抗性基因. 以上菌株和质粒均由美国耶鲁大学 CGSC 惠赠.

1.2 试剂

Pfu DNA 聚合酶、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化有限公司; Dpn I 消化酶、DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; LB 培养基、氨苄青霉素钠、氯霉素等试剂均购自上海生工生物技术公司 (氨苄青霉素、氯霉素在培养基中的工作浓度分别为 100 μ g/mL、25 μ g/mL).

1.3 引物

扩增氯霉素抗性基因 *cat* 的引物 H1-P1、H2-P2 分别由两部分组成, 靠近 5' 端加下划线的序列与 *qseC* 基因两翼序列同源, 靠近 3' 端未加下划线的序列与质粒 pKD3 上 *cat* 基因两侧序列同源. 在大肠杆菌染色体上 *qseC* 基因同源重组区域外侧以及在氯霉素抗性基因片段内部, 分别设计引物 P3、P4, 用于鉴定重组菌株 (表 1). 引物由 Invitrogen 公司合成.

PCR 扩增氯霉素抗性基因片段: 以质粒 pKD3 为模板, H1-P1、H2-P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 30 个循环. 加入 Dpn I 酶降解残存的模板质粒, PCR 产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳并行

表 1 实验所用引物及其序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物	引物序列 (5'→3')
H1-P1	GATTTTATTCGTACCGTGCATGGTATTGGTTACACATTAGGTGAGAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
H2-P2	CGTTTTAACGGCTCTCATAGACAGAGAAGTTACCAGCTTACCTTCGCCTCCATATGAATATCCTCCTTA
P3	CGACGCAAACCTCGGTACTGA
P4	TTGGGGACGGTTTATATTTT

胶回收.

Red 重组系统的诱导及电击感受态细胞的制备: 取 30°C 过夜培养的 MC1000/pKD46 菌液 1:100 接种于 LB 培养基中, 30°C 振荡培养至 A600 值为 0.3 时, 加入 L-阿拉伯糖至终浓度为 30 mmol/L, 诱导 90 min, 使 pKD46 上的 Gam、Bet 和 Exo 3 个蛋白充分表达. 冰上预冷 15 min, 4°C 下离心 15 min (4 000 r/min), 弃培养基, 用冰冷灭菌去离子水洗涤菌体, 重复 3 次后, 浓缩 100 倍成感受态细胞.

1.4 电转化

移取 5 μ L PCR 扩增的氯霉素抗性基因片段

(约 300 ng) 和 50 μ L 感受态细胞到冷的电击杯 (0.2 cm) 内, 用 Bio-Rad 电击仪行电转化. 电击条件: 200 Ω , 25 μ F, 电压为 2.5 kV, 电击时间为 4.6 ms. 电击后迅速加入 1 mL LB 培养基, 37°C、180 r/min 振荡培养 2 h 后, 涂于含氯霉素的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养. 筛选阳性重组子 (MC1000 Δ *qseC*:Cm), 并行 PCR 鉴定.

1.5 氯霉素抗性基因的去除

质粒 pCP20 携带氨苄青霉素抗性基因的质粒, 将 pCP20 转化入大肠杆菌 MC1 000 Δ *qseC*:Cm 感受态细胞中, 42°C 振荡培养 5 h, 热诱导 FLP 重组酶表达, 质粒也逐渐丢失. 37°C 平板划线培养, 对所

得单菌落进行氨苄青霉素和氯霉素敏感检测,最后对氨苄青霉素和氯霉素均敏感的菌株就是去掉氯霉素抗性基因的重组子 ($MC1000\Delta qseC$)。用鉴定引物 P3、P4 对其行 PCR 鉴定。

1.6 重组菌株生长曲线的测定

取过夜培养的大肠杆菌 MC1000 和 MC 1000 $\Delta qseC$ 菌液转接至 LB 培养基中, 37°C、250 r/min 继续培养, 每 2 h 测定细菌密度 (A600 值)。

1.7 运动能力的检测

分别用灭菌牙签挑取对照菌株、重组菌株的单菌落点种于 LB 半固体培养基 (蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂粉 4 g/L) 上, 正置于 37°C 恒温培养箱中, 12 h 后观察并测量圆环直径 (细菌会依赖鞭毛运动在培养基表面以接种点为圆心向周围泳动生长, 形成大小不一的圆环)。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件包, 两样本均数比较采用 t 检验, 结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增氯霉素抗性基因片段

以质粒 pKD3 为模板, H1-P1、H2-P2 为引物, 扩增出两端与 $qseC$ 基因上下游同源, 中间为氯霉素抗性基因的 DNA 片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定为 1 113 bp, 与理论值一致 (图 1)。

2.2 氯霉素抗性基因替代 $qseC$ 基因

鉴定引物 P3、P4 在同源臂的外侧, 它们之间的序列在野生菌中是 1 488 bp, $qseC$ 基因被氯霉素抗性基因替代后的序列为 1 176 bp, 通过此引物可初步鉴定菌株的基因型 (图 2)。

2.3 氯霉素抗性基因的消除

质粒 pCP20 可通过重组删除 FRT 间的序列。用 FLP 重组酶消除了氯霉素抗性基因后, 在同源区内只残留 34 bp 的 FRT 位点, 从而使后续的研究结果更为可靠。用鉴定引物 P3、P4 进行 PCR 扩增, 对氯霉素抗性消除的克隆进行验证, $qseC$ 基因被氯霉素抗性基因置换后扩增出 1 176 bp 的片段 (图 2), 而去除抗性基因后的突变体 ($MC 1000 \Delta qseC$) 则扩增出 237 bp 的片段, 这与预期结果一致 (图 3)。

2.4 重组菌株生长曲线的测定

以 LB 培养基中各时刻所测定的细菌密度作图, 从图 4 可以看出, MC 1000 和 $MC1000\Delta qseC$

的生长曲线几乎完全重合。说明在 LB 培养基中, 对照菌株和重组菌株的生长并无明显差异。

2.5 运动能力的检测结果

运动力检测结果如图 5, 从图可以知道, 相对于对照菌株, $qseC$ 基因缺失菌株的泳动能力有明显下降。MC1000 和 $MC1000\Delta qseC$ 在半固体培养基中形成的运动圆环的直径分别为 (6.10 ± 0.36) mm 和 (3.20 ± 0.53) mm, $P < 0.01$ 。

3 讨论

肠道细菌移位受密度感应系统的调控。细菌密度感应系统是通过监测其群体的细菌密度来调节特定基因的表达。单个细菌释放自诱导物 (autoinducer, AI) 到周围环境中, AI 是细菌间进行交流的信号分子。随着局部细菌密度增加, 细菌周围环境中 AI 浓度升高到一定阈值, 就会被位

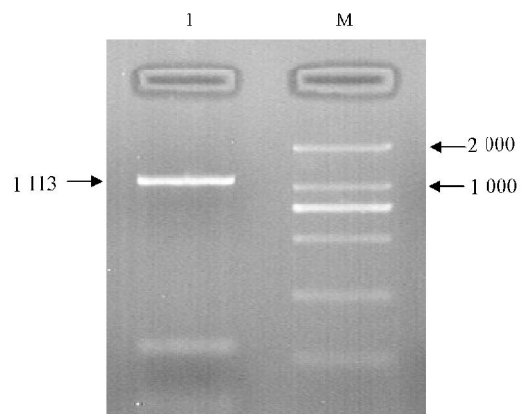


图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of chloramphenicol resistance gene in plasmid pKD3

M:DL2000 DNA Marker; 1:PCR 扩增产物

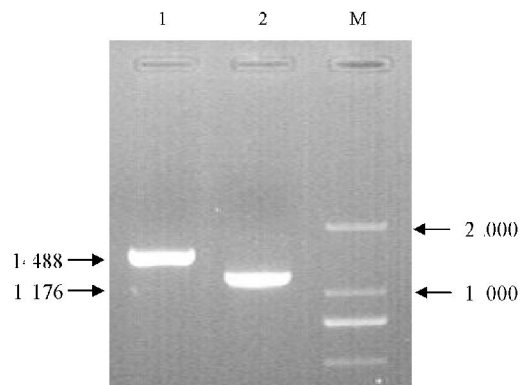


图 2 MC1000 和 $MC1000\Delta qseC::Cm$ 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of $MC1000\Delta qseC::Cm$

M:DL2000 DNA Marker; 1:MC1000;

2:为 $MC1000\Delta qseC::Cm$.

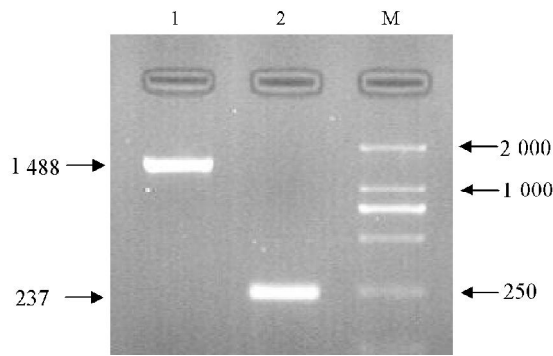


图3 MC1000和MC1000Δ*qseC*的PCR鉴定
Fig. 3 PCR identification of MC1000Δ*qseC*
 M:DL2000 DNA Marker; 1:MC1000; 2:MC1000Δ*qseC*.

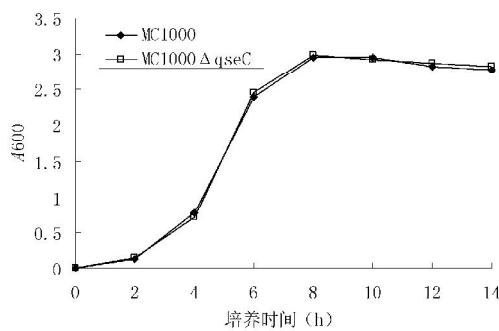


图4 大肠杆菌 MC1000Δ*qseC*在LB培养基中的生长
Fig. 4 Comparison of growth curves of parent and Δ*qseC* strains in LB medium

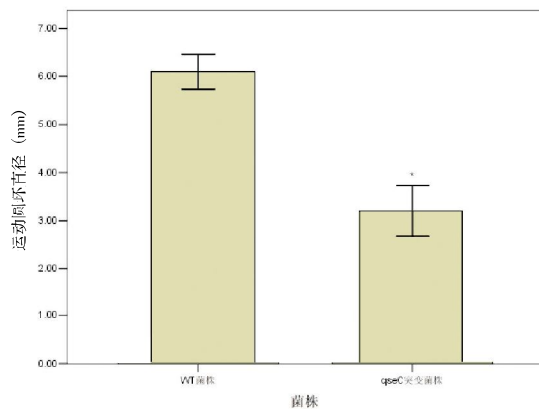


图5 12 h后MC1000及其突变株在半固体培养基中的运动圆环直径

Fig. 5 Sizes of motility halos after 12 h
 与MC1000野生菌株相比, **P* < 0.01.

于细菌表面的信号受体蛋白识别并与之结合, 最终诱导细菌特定基因表达, 使细菌产生适应性的生理变化^[1]. QseC是密度感应系统中信号分子的受体蛋白, 它可以识别信号分子AI-3, 在细菌密度感应系统中起重要调节作用^[9,10]. 本研究选择

*qseC*作为靶基因, 构建大肠杆菌*qseC*基因缺陷株, 有助于深入了解大肠杆菌*qseC*在肠道细菌移位中所起的作用.

Red同源重组技术是一种新型基因打靶技术^[12,13], 它的原理是将一段携带与靶基因两翼各有40~60 bp同源序列的PCR片段导入宿主菌细胞, 利用λ噬菌体Red重组酶(Gam、Bet、Exo 3种蛋白)的作用, 使线性DNA片段与染色体的特定靶序列进行同源重组, 靶基因被标记基因置换下来. 本研究采用Red同源重组技术, 直接利用中间为氯霉素抗性基因两端为同源序列的线性DNA片段, 借助Red重组酶的作用, 同源序列与靶序列发生重组, 从而用氯霉素抗性基因置换*qseC*基因.

重组菌株的筛选和鉴定尤为重要, 除了利用打靶片段上的氯霉素抗性筛选标记外, 还需要通过菌落PCR进行鉴定. 本研究所用的鉴定引物在同源臂的外侧, 重组菌未能扩增出*qseC*基因片段(1488 bp), 但可扩增出氯霉素抗性基因片段(1176 bp), 提示*qseC*基因已被置换.

所得到的重组菌株在*qseC*基因位点上留下了氯霉素抗性基因, 通过位点专一性重组酶的作用将其删除. 去除氯霉素抗性基因后的重组菌株经PCR鉴定, 结果正确. 所构建的MC1000Δ*qseC*菌株与MC1000菌株之间具有除*qseC*基因以外相同的遗传背景, 可对大肠杆菌*qseC*基因功能做出真实的判断.

早期研究发现大肠杆菌*qseC*可调节毒素因子表达和细菌运动力^[5], 而在肠源性脓毒症中肠道细菌移位起重要作用. 本研究观察到*qseC*基因敲除并不影响大肠杆菌MC1000的生长, 同时发现*qseC*缺失的大肠杆菌运动能力减弱, 提示*qseC*基因对大肠杆菌的运动力具有重要调控作用, 使其可能成为肠道细菌移位治疗的新靶点, 为后续研究大肠杆菌*qseC*在肠源性脓毒症中所起的作用奠定了基础.

[参考文献]

[1] BALZAN S, QUADROS C A, CLEVA R, et al. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(4): 464-471.
 [2] MACFIE J, O'BOYLE C, MITCHELL C J, et al. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity [J]. Gut, 1999, 45(2): 223-228.
 [3] TAKESUE Y, KAKEHASHI M, OHGE H, et al. Bacterial (下转第18页)

PKD 途径影响 PD-L1 表达.

[参考文献]

- [1] HERNANDEZ B Y, GREEN M D, CASSEL K D, et al. Preview of hawaii cancer facts and figures 2010 [J]. Hawaii Medical Journal, 2010, 69(9): 223 - 224.
- [2] 丁爱萍, 张淑兰. 调节性T细胞在妇科肿瘤发生发展中的作用及其研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(9): 718 - 720.
- [3] FLIES D B, SANDLER B J, SZNOL M, et al. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy [J]. The Yale journal of biology and medicine, 2011, 84(4): 409 - 421.
- [4] CHEN J, FENG Y, LU L, et al. Interferon-gamma-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway [J]. Immunobiology, 2012, 217(4): 385 - 393.
- [5] ZHANG P, SU D M, LIANG M, et al. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis [J]. Molecular Immunology, 2008, 45(5): 1 470 - 1 476.
- [6] QIN X, LIU C, ZHOU Y, et al. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk /MAPK signaling pathway [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2010, 56(11): 1 366 - 1 372.
- [7] HASPOT F, FEHR T, GIBBONS C, et al. Peripheral deletion of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway [J]. Blood, 2008, 112(5): 2 149 - 2 155.
- [8] LIANG M, FU J. Triptolide inhibits interferon gamma induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast cancer cells [J]. Cancer Letters, 2008, 270(2): 337 - 341.
- [9] PRESTLE J, PFIZENMAIER K, BRENNER J, et al. Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment [J]. The Journal of cell biology, 1996, 134(6): 1 401 - 1 410.

(2015-02-16 收稿)

(上接第9页)

- translocation: not a clinically relevant phenomenon in colorectal cancer [J]. World J Surg, 2005, 29(2): 198 - 202.
- [4] PACHECO A R, SPERANDIO V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host [J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(2): 192 - 198.
- [5] CLARKE M B, HUGHES D J, ZHU C, et al. The qse C sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10 420 - 10 425.
- [6] CURTIS M M, SPERANDIO V. A complex relationship: The interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host [J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(2): 133 - 138.
- [7] RASKO D A, MOREIRA C G, LI DE R, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development [J]. Science, 2008, 321(5 892): 1 078 - 1 080.
- [8] DOUGAN G. Does the Trojan horse have an Achilles' heel [J]. N Engl J Med, 2009, 360(1): 83 - 84.
- [9] WALTERS M, SIRICILI M P, SPERANDIO V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 2006, 188(16): 5 668 - 5 681.
- [10] SPERANDIO V, TORRES A G, KAPER J B. Quorum sensing Escherichia coli regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in E. coli [J]. Mol Microbiol, 2002, 43(3): 809 - 821.
- [11] LI J, ATTILA C, WANG L, et al. Quorum sensing in Escherichia coli is signaled by AI-2/LsrR: Effects on small RNA and biofilm architecture [J]. J Bacteriol, 2007, 189(16): 6 011 - 6 020.
- [12] DATSENKO K A, WANNER B L. 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): 6 640 - 6 645.
- [13] SERRA-MORENO R, ACOSTA S, HERNALSTEENS J P, et al. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes [J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 31 - 42.

(2015-02-03 收稿)