文章编号:1000-5404(2009)10-0875-04

论著

肠出血性大肠埃希菌O157:H7 *tccP* 基因敲除菌株的构建

肖大平[1],郭 鹰[1],张卫军[1],顾 江[1],王海光[1],朱凤才[2],毛旭虎[1] ([1]第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038;[2]江苏省疾病预防控制中心急传科,南京 210009)

摘 要:目的 构建肠出血性大肠埃希菌O157:H7介导和宿主细胞的粘附与擦拭(A/E)损伤相关基因 *tccP* 敲除菌株。**方法** 根据GenBank公布的肠出血性大肠埃希菌O157:H7基因序列,设计PCR引物,分别扩增克隆 *tccP* 基因两端外侧的DNA片段,并与氯霉素耐药基因 *Cam* 连接后亚克隆于pBluescriptSKⅡ质粒,通过同源重组替换野生型 *tccP* 基因,采用PCR、RT-PCR以及Western blot分别从DNA、RNA及蛋白质水平鉴定 *tccP* 基因是否被敲出。**结果** 在DNA、RNA及蛋白质3个水平均证实 *Cam* 片段已成功替换 *tccP* 基因而整合进入O157:H7基因组中。**结论** 成功构建肠出血性大肠埃希菌O157:H7 *tccP* 基因敲除菌株。

关键词: 肠出血性大肠埃希菌O157:H7;*tccP*;同源重组;基因敲除
中图法分类号: Q78;Q933;Q939.121 **文献标识码:** A

Mutant construction of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with *tccP* gene knockout

XIAO Da-ping[1], GUO Ying[1], ZHANG Wei-jun[1], GU Jiang[1], WANG Hai-guang[1], ZHU Feng-cai[2], MAO Xu-hu[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Center for Disease Prevention and Control of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To construct an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strain with *tccP* gene knockout based on O157:H7 strain, which gene mediates attaching and effacing (A/E) lesions. Methods According to EHEC O157:H7 gene sequence in the GenBank, PCR primers were designed and then the DNA fragments outside *tccP* were amplified. The PCR products was linked to chloramphenicol-resistant gene *Cam* and then subcloned into plasmid pBluescriptSKⅡ(-). After digested by double enzymes, the homologous recombination DNA fragments was used to replace *tccP* wild-type gene. PCR, RT-PCR, as well as Western blotting were used to identify *tccP* gene knockout from the DNA, RNA and protein levels respectively. Results DNA, RNA and protein levels confirmed that the *Cam* fragment had been successfully replaced *tccP* gene and integrated into the O157:H7 genome. Conclusion EHEC O157:H7 *tccP* knockout strain is successfully constructed, which is helpful in the research on the pathogenic mechanism of the bacteria.

Key words: EHEC; *tccP*; homologous recombination; gene knockout

肠出血性大肠埃希菌(enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)O157:H7为重要的人畜共患传染病原,其感染具有暴发流行、强烈的致病性与致死性和抗生素治疗加剧病情等特点,同时它还可作为细菌武器与生物恐怖战剂的原料,已成为全球性的公共卫生问题[1,2]。但致病机制至今尚未完全清楚。阐明其致病机制对提高由该菌引起的暴发流行、生物恐怖的预防和处理能力,具有重要的理论指导意义[3,4]。病原体和宿主的相互作用是决定感染的关键。EHEC O157:H7通过Ⅲ型分泌系统将其Tir等效应毒力分子转运至宿主

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2007AA02Z409);国家自然科学基金(30670107);重庆市自然科学基金(2006BB5115)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z409), the National Natural Science Foundation of China (30670107) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5115)

作者简介: 肖大平,男,湖南省常德市人,硕士研究生,主管技师,主要从事病原微生物方面的研究。电话:(023)68752315,E-mail:xiaodaping@gmail.com
通信作者: 毛旭虎,电话:(023)68752315,E-mail:mxh95xy@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-12-13;**修回日期:** 2009-01-06

细胞,经一系列的信号转导过程介导和宿主细胞的黏附与擦拭(A/E)损伤[5]。Tir-细胞骨架偶联蛋白(Tir-cytoskeleton coupling protein,*tccP*)为 EHEC O157:H7 黏附宿主细胞、肌动蛋白踏板形成所必需,在 EHEC O157:H7 造成 A/E 损伤过程中起到关键作用[6-8]。本研究中我们采用同源重组方法,成功构建肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 *tccP* 基因敲除菌株,旨在为研究 *tccP* 在肠出血性大肠埃希菌 O157:H7致病机制中的作用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要菌种和试剂

EHEC O157:H7(Sakai 株)(江苏省 CDC 惠赠),质粒 pBulescript SK(-)(本校微生物教研室惠赠),*E. coli* DH5α(本实验室保存),细菌基因组 DNA 的提取试剂盒(北京天根),凝胶回收试剂盒(上海生工),Primer star® *Taq* 酶、r*Taq* 酶、pMD18-T Vector、限制性内切酶(大连宝生物),T_4 连接酶(Promega),质粒提取试剂盒(Omiga)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 查询基因组数据库中 EHEC O157:H7(Sakai 株)*tccP* 基因组数据,依据 *tccP* 基因两端各 1 292 bp 和 1 038 bp 大小的核酸片段序列设计 2 对引物,LA1:5′-CGGATCCACTTCGCATCCTAT-3′,LA2:5′-CGGAAGCTTGCAGATTACCTTATAAGT-3′,RA1:5′-GCGCCTCGAGTTATAATATAATTACCTAT-3′,RA2:5′-GGTACCCAGTCAGCGGAACAAAGC-3′,下划线部分分别引入*Bam*HⅠ、*Hind* Ⅲ、*Xho*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ,引物由上海生工合成。

1.2.2 PCR 扩增目的片段 以 EHEC O157:H7(Sakai 株)基因组为模板,用 LA1+LA2/RA1+RA2 引物分别进行 PCR 扩增。使用 Primer star® *Taq* 酶进行 PCR,总反应体积为 50 μl,反应条件为:94 ℃预变性 4 min 后进入 PCR 循环,94 ℃ 1 min→55 ℃ 1 min→72 ℃ 1.5 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 反应完后,加入 r*Taq* 酶(加 A 尾):72 ℃反应 10 min。取延伸后的产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒分别回收目的 DNA 片段。

1.2.3 目的片段分别亚克隆入 pMD18-T Vector 转化 *E. coli* DH5α,通过蓝白斑实验筛选,*Bam*HⅠ+*Hind* Ⅲ/*Xho*Ⅰ+*Kpn*Ⅰ分别进行酶切鉴定。

1.2.4 基因重组用同源臂及抗性基因连接入 pBluescript SK(-)质粒 T-LA、T-RA 分别用 *Bam*HⅠ+*Hind* Ⅲ/*Xho*Ⅰ+*Kpn*Ⅰ进行酶切后回收目的 DNA 片段,氯霉素抗性基因(*Cam*)来自 pHel2 质粒。上述各酶切片段与 *Bam*HⅠ+*Kpn*Ⅰ切后的 pBluescript SK(-)质粒使用 T_4 DNA 连接酶 22 ℃连接 12 h,生成重组质粒 pBSKΔ*tccP*::*Cam*。连接产物转化入 *E. coli* DH 5α,涂 25 μg/L 的氯霉素抗性 LB 平板,随机从平板上挑取 5 个克隆,使用 25 μg/L 的氯霉素抗性 LB 液体 10 ml 增菌,质粒提取后分别使用 LA1+LA2/*Cam*1+*Cam*2/RA1+RA2 引物 PCR 鉴定。经上述鉴定正确的质粒使用 *Bam*HⅠ+*Kpn*Ⅰ酶切下并回收 LA-*Cam*-RA DNA 片段。

1.2.5 重组 DNA 片段转化入野生型 EHEC O157:H7(Sakai 株) 取增菌过夜的 EHEC O157:H7(Sakai 株)菌液 50 μl,加入到 10 ml LB 液体内,37 ℃培养 6 h 后收菌,使用 10 ml 冰冷的 10% 甘油洗涤 2 次后使用 2 ml 10% 甘油悬浮制备成电转化感受态菌。取 100 μl 感受态菌,加入到直径 2 mm 电转杯后混入 10 μl 10 μg/ml 的 LA-*Cam*-RA DNA 片段,冰浴 10 min;使用 Bio-Rad 电转化系统,2 100 V/200 Ω 电击转化,涂氯霉素抗性 LB 平板 37 ℃培养过夜。挑取阳性克隆,进行 PCR 扩增反应鉴定 EHEC O157:H7(Sakai 株)*tccP* 基因敲除突变株(Δ*tccP*)。

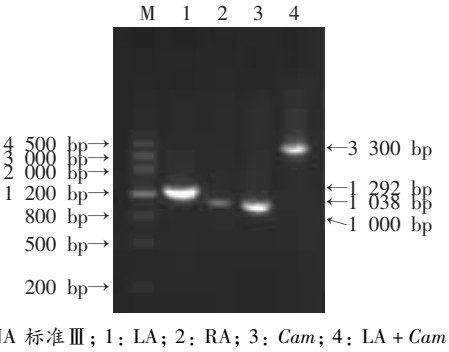
1.2.6 RT-PCR 鉴定分析 使用 Trizol Reagent (Gibco/BRL)提取细菌的 RNA,逆转录后 PCR 鉴定,使用 gyrB 作为内参基因。*tccP* 的 RT-PCR 引物为 T1:5′-TCGGCATCATTTCATC-3′;T2:5′-CAGGCAGAGGTCTTGATTGT-3′,扩增产物大小为 199 bp。gyrB 的 RT-PCR 引物为 G1:5′-CGGAATGTTGTTGGTAAAGC-3′;G2:5′-CGTGACGGCAAAGAAGAC-3′,扩增产物大小为 198 bp。

1.2.7 Western blot 分析 以本室制备的兔抗 *tccP* 蛋白的多抗血清为一抗(稀释倍数为 1∶5 000),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗(稀释倍数为 1∶5 000,武汉博士德),对野生型和突变型 EHEC O157:H7全菌蛋白进行 Western blot 分析,具体操作方法参考文献[9]。

2 结果

2.1 携带同源重组 DNA 片段的 pBSKΔ*tccP*::*Cam* 质粒的构建

LA 和 RA 片段亚克隆入 pMD18-T Vetor,分别获得 T-LA 和 T-RA,经相应的酶双切鉴定,可分别切出约 1 292 bp 和1 038 bp 片段。pBSKΔ*tccP*::*Cam* 质粒经相应的引物 PCR 扩增出相应的1 292 bp 的 LA、1 038 bp 的 RA、1 000 bp 的 *Cam* DNA 片段,说明 pBSKΔ*tccP*::*Cam* 载体构建成功(图 1)。

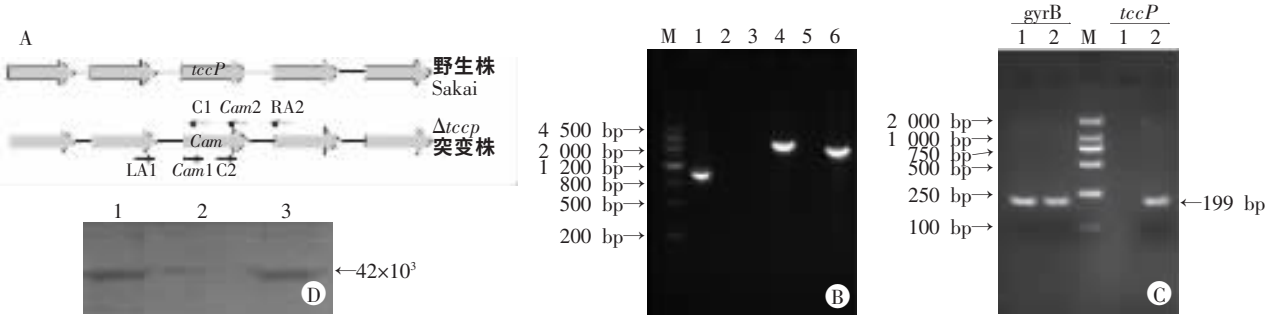


M:DNA 标准Ⅲ;1:LA;2:RA;3:*Cam*;4:LA+*Cam*+RA

图 1 PCR 鉴定携带同源重组 DNA 片段的 pBSKΔ*tccP*::*Cam* 质粒

2.2 *tccP* 基因敲除株的鉴定

对于氯霉素抗性 LB 平板筛选出的携带 *Cam* 基因的菌株(EHEC O157:H7 *tccP*::*Cam*),在 LB 液体培养基中 37 ℃培养过夜后,分别对 *tccP* 基因进行了 DNA 水平(图 2A、2B)、RNA 水平(图 2C)以及蛋白质水平(图 2D)鉴定。结果显示,敲除株中无法扩增出 *tccP* 基因,却能成功扩增出 *Cam* 基因;提取的敲除株总 RNA 经逆转录后 PCR 鉴定也没有检测出 *tccP*;细菌全菌 Western blot 分析进一步证实了 *tccP* 基因敲除后缺乏 *tccP* 蛋白。



A:PCR 鉴定野生株与敲除株基因组示意图;B:PCR 鉴定敲除株基因组　M:DNA 标准Ⅲ;1: *tccP*(WT); 2: *tccP*(Δ*tccP*); 3: LA + *Cam*(WT); 4: LA + *Cam*(Δ*tccP*);5: *Cam* + RA(WT); 6: *Cam* + RA(Δ*tccP*); C: RT-PCR 鉴定 *tccP* 敲除株 RNA　1: Δ*tccP*; 2: WT; M: DNA 标准(DL 2000); D:Western blot 鉴定敲除株　1:*tccP* 蛋白;2:*tccP* 蛋白(Δ*tccP*);3:*tccP* 蛋白(WT)

图 2　*tccP* 基因敲除突变株的鉴定　(Δ*tccP*:*tccP* 基因敲除株;WT:野生株)

3　讨论

tccp 是 EHEC O157:H7转移至宿主细胞的效应分子中与宿主细胞分子相互作用的终端效应分子,含有多个富含脯氨酸的重复片段。新近实验和文献表明 EHEC O157:H7菌株之间 *tccP* 的重复片段存在差异,这种差别可能影响其与 N-Wiskott aldrich 综合征蛋白(N-WASP)的结合,并直接影响 A/E 损伤的形成[10, 11]。

基因敲除是通过一定途径使机体特定基因失活或缺失的一种分子生物学技术。从分子水平上看,是将一个结构已知而其功能未知的基因去除,或者用其他序列相近的基因取而代之的人工突变技术,然后从整体观察实验生物,推测相应基因的功能。目前,绝大多数的基因敲除策略都是基于同源重组的机制[12]。因此,同源重组的筛选和检测也就成为了基因敲除技术的关键环节。同源重组要求 2 个 DNA 分子序列同源,同源区越长越有利于重组;同源区太短,则难于发生重组;但太长又不利于克隆操作。为了获得较高的重组效率,一般将同源序列设置在 500 ~1 000 bp。在本研究中,我们分别选择了 *tccP* 编码基因上下游约 1 000 bp 的两侧序列作为同源臂,以保证较高的重组效率以便利于后续的突变筛选。pBluescript SK(-)是以大肠杆菌为宿主的克隆质粒,在 EHEC O157:H7中也能复制,所以,我们采用酶切的办法将携带氯霉素耐药基因的同源重组 DNA 片段从载体上切下回收后直接用于基因敲除。LA-*Cam*-RA DNA 片段是不能够在 EHEC O157:H7中自主复制扩增的,但可以通过 *tccP* 两侧同源臂 LA 和 RA 与野生株相应的同源区域发生重组,从而融合在细菌染色体一起复制。同源重组后的结果是,一方面将 LA-*Cam*-RA DNA 片段上的氯霉素抗性基因引入野生株细菌内,使得重组菌获得氯霉素抗性;另一方面,*Cam* 的插入替换了原野生菌株 *tccP* 基因,从而实现了对 *tccP* 的敲除灭活。当同源重组 DNA 片段电转入 EHEC O157:H7时,要么不能复制而被消除,要么插入到细菌的染色体上,和染色体一起复制。同源臂重组到细菌染色体上到有 2 种可能:一是单臂交换重组;二是双臂交换同源重组。当发生单臂交换重组时,虽然抗性筛选基因被整合到细菌的染色体上,而靶标基因依然存在;双臂交换同源重组发生概率很小,发生时靶标基因将被抗性基因完全取代掉。本实验平板上长出的多个具有氯霉素抗性的细菌克隆当中,有 1 个经基因组 DNA 水平分析证实为双臂交换同源重组突变株,其余全部为单臂交换重组事件,表明通过同源重组 DNA 片段成功获得了介导 EHEC O157:H7与宿主细胞的黏附与擦拭(A/E)损伤的 *tccP* 基因敲除突变株。进一步的 RNA 和蛋白水平分析发现,*tccP* 基因的敲除导致该基因不能在细菌中正常转录、表达,说明 *tccP* 基因敲除是成功有效的。该基因敲除菌株的成功构建为进一步研究 *tccP* 在 EHEC O157:H7致病性中的作用提供了有力保障。

参考文献:

[1] 罗　萍, 陈洪章, 曾　明, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7志贺毒素Ⅱ A1 亚单位单克隆抗体的制备和生物学特性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 698 - 701.

[2] 余　抒, 顾　江, 曾　浩, 等. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7黏附 HeLa 细胞模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1933 - 1935.

[3] 罗　萍, 曾　浩, 易　勇, 等. EHEC O157:H7志贺毒素Ⅱ A1 亚单位蛋白的构建表达与免疫原性鉴定[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(3): 287 - 290.

[4] 王　燕, 谢贵林, 杜　琳. 大肠杆菌 O157:H7感染流行概况[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(1): 51 - 58.

[5] Yip C K, Kimbrough T G, Felise H B, *et al*. Structural characterization of the molecular platform for type Ⅲ secretion system assembly [J]. Nature, 2005, 435(7042): 702 - 707.

[6] Welch M D, Mullins R D. Cellular control of actin nucleation[J]. An-

nu Rev Cell Dev Biol, 2002, 18: 247 - 288.
[7] Goosney D L, DeVinney R, Finlay B B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli pedestals*[J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 3315 - 3322.
[8] Deng W, Li Y, Hardwidge P R, *et al*. Regulation of type Ⅲ secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens[J]. Infect Immun, 2005, 73(4): 2135 - 2146.
[9] 杨 琴, 顾 江, 毛旭虎, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 *tccP* 基因克隆、表达及其抗原性鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(4): 319 - 322.
[10] Garmendia J, Frankel G, Crepin V F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation[J]. Infect Immun, 2005, 73(5): 2573 - 2585.
[11] Garmendia J, Ren Z, Tennant S, *et al*. Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5715 - 5720.
[12] 金 涛, 吴补领, 苏凌云, 等. 远缘链球菌 ftsK 基因敲除菌株的构建[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2005, 15 (5): 251 - 254.

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)10-0878-01

女性 Kallmann 综合征 1 例

谭明红,魏 平 (第三军医大学西南医院内分泌科,重庆 400038)

Kallmann 综合征又称促性腺激素分泌不足的性腺功能减退伴嗅球丧失症,是一种先天性的遗传病[1]。最早由 Kallmann 于 1944 年报道,男女均可发病,男性发病率约为 1/10 000,女性发病率约为 1/50 000。本科于 2008 年 8 月诊治 1 例 Kallmann 综合征患者,现报告如下。

1 临床资料

患者,女性,15 岁,因第二性征未发育而就诊。无月经来潮。查体:五官外行正常,女性表征,无阴毛、腋毛生长,双乳未发育,为 B0 期。外生殖器为幼稚型,嗅觉障碍,酒精与醋辨别差。追问病史家族中无类似疾病患者。辅助检查:染色体:46XX,正常女性染色体核型;妇科超声:子宫测值小(上下径 23 mm,前后径 12 mm,横径 24 mm),考虑为幼稚子宫;双侧肾上腺超声:未见明显异常;蝶鞍 MRI:鞍区 MRI 平扫未见明确异常信号改变。性激素:孕酮(P)0.38 ng/ml,卵泡刺激素(FSH)0.31 mIU/ml,黄体生成素(LH) 0.15 mIU/ml,催乳素(PRL)4.33 ng/ml,睾酮(T)0.25 ng/ml,雌二醇(E_2) 7 pg/ml。生长激素、甲状腺激素水平正常。人绒毛膜促性腺激素(HCG)兴奋试验:注射前 15 min E_2 7 pg/ml,注射时 E_2 11 pg/ml,肌肉注射 HCG 2 000 U 后 24 h E_2 11 pg/ml,48 h E_2 10 pg/ml。GnRH 兴奋试验:注射前 FSH 0.275 mIU/ml,LH 0.511 mIU/ml,静推曲普瑞林 100 μg 后 30 min FSH 0.825 mIU/ml,LH 1.27 mIU/ml,60 min FSH 1.00 mIU/ml, LH 1.38 mIU/ml, 90 min FSH 1.16 mIU/ml,LH 1.43 mIU/ml,120 min FSH 1.29 mIU/ml,LH 1.47 mIU/ml。诊断为 Kallmann 综合征,给予行人工周期治疗,在服药过程中月经按期来潮,量一般。因患者目前年龄较小,未给予排卵治疗,嘱患者有生育要求时来医院就诊。

作者简介:谭明红,女,重庆市人,医师,主要从事代谢内分泌方面的研究。E-mail:tmh@cq139.com

收稿日期:2009-02-25;修回日期:2009-03-24

2 讨论

Kallmann 综合征主要表现为低促性腺激素、低性腺激素且伴有嗅觉功能障碍或丧失。Kallmann 综合征属于一种遗传性疾病,主要见于男性患者,女性发病率低,国内近 10 年共报道 78 例,其中女性 3 例。由于 KAL 基因突变,导致下丘脑分泌 GnRH 不足,同时导致邻近的嗅觉中枢病变,因此该综合征同时存在性腺发育不良及嗅觉障碍。其诊断主要靠基因检测,但目前大多数医院无法开展。临床上主要靠性激素水平(低 FSH、LH、T 或 E_2)检测及 HCG、GnRH 兴奋试验,同时行嗅球 MRI 明确诊断。本例患者表现为青春期后无月经来潮,乳房和内外生殖器发育不良合并嗅觉障碍,内分泌检测提示 FSH、LH、E_2 低,HCG 兴奋试验及 GnRH 兴奋试验提示病变在下丘脑。该病的治疗主要采取激素替代治疗,应用 GnRH 脉冲可诱导女性排卵或促进男性生精,但由于 GnRH 价格昂贵且生育期相对较短,因此临床上较少应用。有生育要求的也可同时使用 HCG 和绝经期促性腺激素(HMG)促进女性排卵或男性精子生成;一般无生育要求者男性可采用睾酮类制剂(如十一酸睾丸酮等)促进睾丸发育,维持第二性征。女性可行人工月经周期替代治疗,维持正常女性第二性征。

关键词: Kallmann 综合征;女性;人工周期疗法
中图法分类号: R588 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 刘新民. 实用内分泌学[M]. 北京:人民军医出版社,1997: 563.
[2] 郝丽君, 崔英霞. Kallmann 综合征的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(7): 647 - 649.
[3] 任建枝, 李 萍, 韩冬梅, 等. Kallmann 综合征 1 例报道[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(21): 3359.

(编辑 王 红)