文章编号:1000-5404(2010)08-0749-05

论著

# 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 相互作用蛋白的筛选

原薇薇,杨 杰,王冬梅,胡 珍,朱军民,陈志瑾,张俊磊,王嘉丽,刘 佳,饶贤才 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室)

**[摘要]** **目的** 通过建立细菌双杂交技术,筛选 MRSA 中与 PBP2a 相互作用的蛋白。**方法** 利用 PCR 扩增,获得 PBP2a 蛋白转肽酶活性区(TPase)的编码基因,插入 pRBR 构建成诱饵质粒 pBR-PBP2a。提取 MRSA N315 株基因组 DNA,经 *Sau*3AⅠ部分酶切后连接到 pRAC 质粒的 *Bam*HⅠ位点,获得基因组 DNA 表达文库;将文库质粒转化入含诱饵质粒 pBR-PBP2a 的报告菌株 KS1,利用细菌双杂交技术进行筛选,获得与诱饵质粒编码的融合蛋白相互作用的猎物,对猎物中编码序列进行 DNA 测序和生物信息学分析,确定与 PBP2a 发生相互作用的蛋白质或多肽。**结果** 成功构建了 pBR-PBP2a 诱饵质粒,可表达 PBP2a TPase 与大肠埃希菌 RNA 聚合酶 α 亚单位 N 端序列的融合蛋白。所构建的 MRSA N315 株基因组文库覆盖率达 9 倍,满足文库筛选的需要。将文库转化含诱饵质粒和报告基因的 KS1 宿主菌,利用细菌双杂交技术经 3 次筛选,共获得 9 个猎物克隆,其报告基因的活性均升高 2 倍以上,对 9 个猎物质粒进行了测序,信息学分析表明它们均来自于 MRSA N315 株基因组,插入片段最长者 648 bp,最短者 334 bp, 9 个插入片段中含 14 个编码基因,其中 10 个功能未知,1 个编码二氢吡啶二羧酸合酶、1 个编码二氢吡啶二羧酸还原酶,2 个编码染色体解离稳定(SMC)蛋白。9 个克隆中介导与 PBP2a 相互作用的多肽由 14 ~ 46 个氨基酸组成。**结论** 利用细菌双杂交技术从 MRSA 基因组文库中成功筛选到与 PBP2a 相互作用的多肽。

**[关键词]** 基因组 DNA 文库;PBP2a 蛋白;细菌双杂交系统;蛋白质间相互作用
**[中图法分类号]** R378.11;R394-33;R394.3 **[文献标志码]** A

# Screening of proteins interacting with PBP2a in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Yuan Weiwei, Yang Jie, Wang Dongmei, Hu Zhen, Zhu Junming, Chen Zhijin, Zhang Junlei, Wang Jiali, Liu Jia, Rao Xiancai (Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To further understand the mechanism of PBP2a mediated the drug-resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with a bacterial two hybrid system. **Methods** The fragment encoded PBP2a TPase domain of MRSA strain N315 was amplified by PCR and then cloned into pRBR vector to construct the bait plasmid pBR-PBP2a. The genomic DNA of MRSA strain N315 was partially digested with *Sau*3AⅠ and the fragments between 500 to 1 500 bp were recovered, then ligated to pRAC vector prior cut with *Bam*HⅠ to get a genomic DNA library. The bacterial two hybrid system was constructed by transforming the plasmids of the DNA library into KS1 host cells (harboring a LacZ reporter gene) prior transformed with the bait plasmid pBR-PBP2a and the prey plasmids were screened out by LacZ test. After isolation and DNA sequencing of the prey plasmids, the inserts were characterized by bioinformatic analysis and the peptide that interacts with PBP2a were obtained. **Results** The genomic DNA library of MRSA strain N315 and the bait plasmid pBR-PBP2a were successfully constructed. Nine clones were obtained with more than 2 times raised for LacZ activity in the bacterial two hybrid assay and their insert sequences were qualified by DNA sequencing. The longest insert was 648 bp and the shortest one was 334 bp. There were 14 genes related with the 9 inserts and 10 of them encoded proteins with unknown functions. Among the 4 familiar genes, one encoded dihydrodipicolinate synthase, one encoded dihydrodipicolinate reductase and the others encoded chromosome segregation SMC proteins. The peptides that may interact with PBP2a in the 9 prey plasmids composed of 14 to 46 amino acids.

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30571666,30772061)
**[通信作者]** 饶贤才,电话:(023)68752834,E-mail: xcrao@yahoo.com

**Conclusion** The proteins interact with PBP2a are successfully screened by the bacterial two-hybrid system assay, which facilitates further understanding the mechanism of PBP2a mediated the drug-resistance in MRSA.

**[Key words]** genomic DNA library; PBP2a protein; bacterial two-hybrid system; protein-protein interaction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571666, 30772061). Corresponding author: Rao Xiancai, Tel: 86-23-68752834, E-mail: xcrao@yahoo.com

金黄色葡萄球菌是一种重要的条件致病菌,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)已成为全球院内感染的首要病原菌[1-3],其多重耐药菌株不断涌现,使得治疗变得更加困难。研究表明,MRSA 耐药机制包括靶位改变、钝化酶产生、主动外排等。其中,抗生素作用靶位的改变是最主要的耐药机制[2-4]。通常,金葡菌细胞壁的肽聚糖合成是由一组称为青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs)的蛋白酶系完成的,PBPs 有转糖基酶(glycosyltransferase, TGase)和转肽酶(transpeptidase, TPase) 2 种酶学活性,β-内酰胺类抗生素能与 PBPs 的转肽酶功能域(TPase domain)选择性结合,使其乙酰化而灭活 TPase 活性,阻断细菌肽聚糖合成,进而杀灭敏感菌。耐药 MRSA 菌则从一种未知宿主中获得一 mecA 基因,编码产生一种新的 PBPs,称为 PBP2a,其 TPase domain 与 β-内酰胺类抗生素的亲和力极低,当正常 PBPs 被 β-内酰胺类药物结合而失去活性时,PBP2a 能代替其功能,继续肽聚糖合成,维持金葡菌的生长和成活。

研究表明,在 MRSA 中,PBP2a 是其高水平 β-内酰胺类抗生素耐药性所必需的[1]。然而,PBP2a 如何参与 MRSA 的耐药性表达? 有否相应的共激活或抑制分子等调节因子存在? 目前都不清楚。我们将 MRSA 菌 PBP2a TPase 基因克隆到 pRBR 载体上,构建成诱饵质粒,利用细菌双杂交系统(bacterial two-hybrid system, B2H), 从 MRSA 基因组文库中筛选与 PBP2a 有相互作用的分子,为深入研究 PBP2a 在 MRSA 高耐药性表达中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

MRSA 标准株 N315 由第四军医大学唐都医院连建奇教授惠赠,大肠埃希菌 DH5α、pMD-PBP2a 质粒为本室保存,细菌双杂交系统(含 pAC-λCI 和 pBR-α 质粒、KS1 菌株)由美国哈佛大学 Ann Hochschild 教授惠赠, 本实验使用的 pRAC、pRBR 质粒分别为对 pAC-λCI 质粒和 pBR-α 质粒的多克隆位点进行改造后而成,见文献[5]。pACλCI-βflap 和 pBRL28 质粒(克隆了沙眼衣原体 CT663 基因)由美国路易斯安娜州立大学沈犁教授惠赠,其构建见文献[5]。

### 1.2 工具酶和试剂

$T_4$ DNA 连接酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、限制性内切酶 *Sau*3AⅠ、*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ(TaKaRa 公司),小量质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒以及 PCR 试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),IPTG 购自北京索宝来科技有限公司,卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素均购自北京鼎国生物工程公司,培养细菌用的酵母提取物、蛋白胨为 Oxoid 公司产品,其余生化试剂均为分析纯。

### 1.3 诱饵质粒 pBR-PBP2a 的构建

根据 MRSA PBP2a 蛋白的编码基因 mecA 的序列(登录号:NC_002745)设计 1 对 PCR 引物,上游引物 P1:5′-AATAGGATCCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTA-3′;下游引物 P2:5′-GGCCCTCGAGTTATTCATCTATATCGTATTTTTT-3′。其中 P1 含有 *Bam*HⅠ酶切位点,P2 含有 *Xho*Ⅰ酶切位点。以质粒 pMD-PBP2a 为模板进行 PCR 扩增, 回收扩增产物,经 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ双酶切后插入到 pRBR 的 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ位点,构建 pBR-PBP2a 重组质粒,用酶切和核苷酸测序进行验证。

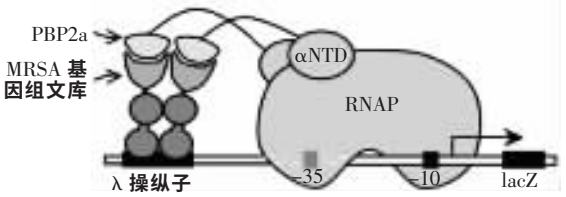
### 1.4 基因组文库的构建与鉴定

因 *Sau*3AⅠ与 *Bam*HⅠ为同尾酶,而 *Sau*3AⅠ识别 4 个碱基对(GATC),具有高频切割的特点,用其切割的 DNA 片段能与 *Bam*HⅠ(识别序列为 GGATCC)切割后产生的粘端直接相连,故本实验采用 *Sau*3AⅠ构建 MRSA N315 株基因组文库。培养 MRSA,收集菌体,提取其基因组 DNA,具体提取方法见文献[6]。对基因组 DNA 进行不完全酶切条件摸索,以主要降解片段集中在 500 ~ 1 500 bp 的酶浓度为最佳酶切浓度。按最佳酶切条件,酶切提取的基因组,回收 500 ~ 1 500 bp 目的片段;将 pRAC 质粒用 *Bam*HⅠ进行完全酶切线性化,并经牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化处理;再将回收的基因组片段与 pRAC 线性质粒连接,转化 DH5α 感受态细胞,经氯霉素抗性筛选得到重组克隆,构建成基因组文库[7]。挑取 50 个重组菌落,用位于 pRAC 多克隆位点两侧的测序引物 P3:5′-TCCGTTGTGGGGAAAGTTATC-3′和 P4: 5′-GGGTAGCCAGCAGCATCC-3′进行 PCR 扩增鉴定,检测克隆中插入片段的大小及分布情况。用液体 LB 培养基将全部重组菌落洗下,37 ℃振荡培养 3 h,用小量质粒提取试剂盒提取文库质粒, -20 ℃保存备用。

### 1.5 细菌双杂交筛选文库

本研究采用的是基于转录激活的 B2H[8],将 PBP2a TPase 的编码基因克隆到该系统的 pRBR 质粒(AMP 抗性),使其与载体携带的大肠埃希菌 RNA 聚合酶 α 亚单位 N 端(可识别 RNA 聚合酶的其他亚单位并与之形成全酶)融合,构建成诱饵质粒;将文库或者猎物基因克隆至 pRAC 质粒(氯霉素抗性),若有适宜的片段与 pRAC 质粒上的 λ 噬菌体转录激活因子 λCI 蛋白的 DNA 结合结构域融合,该片段编码的多肽如果能与诱饵蛋白相互作用,则可激活已整合在工程菌 KS1(卡那霉素抗性)染色体上的由 λ 操纵子控制的报告基因 lacZ,见图 1 所示,

通过检测β-半乳糖苷酶活性,根据其活性的改变判断蛋白相互作用,筛选出可疑的猎物分子。




RNAP:RNA 聚合酶;αNTD:RNA 聚合酶 α 亚单位 N 端

**图1 基于转录激活的细菌双杂交系统示意图**

具体步骤按参考文献[9]进行。首先制备 KS1 感受态,将构建正确的诱饵质粒 pBR-PBP2a 转化入 KS1,挑取 AMP 抗性重组菌制备感受态,再将猎物文库转化入已含诱饵质粒的 KS1 感受态中,转化产物涂布于含 50 mg/ml X-gal、100 μmol/L IPTG、100 μg/ml AMP、50 μg/ml 卡那霉素(Kan)和 34 μg/ml 氯霉素(Cl)的琼脂平板上,37 ℃培养过夜,4 ℃放置 1~2 d,挑取深蓝色菌落进行 LacZ 活性测定。同时以空质粒 pRAC 为阴性对照,以文献[5]报道的 pACλCI-βflap 转化含 pBRL28 的 KS1 菌为阳性对照。

### 1.6 LacZ 活性测定

挑取平板上的深蓝色菌落,分别用 1 ml 含 AMP、Kan、Cl 的三抗 LB 培养基 37 ℃振荡培养过夜,次日按 1∶100 比例接种于 4 ml 三抗 LB 中,37 ℃培养至 $D(600)$ 约为 0.3,将培养液分成 4 管(1 ml/管),其中 3 管分别加入 IPTG,终浓度分别为 5、20、50 μmol/L,37 ℃诱导培养 1 h,各管取 0.4 ml 离心,沉淀中加入 0.4 ml PBS 缓冲液重悬,各取 0.1 ml 悬液加入 96 孔板的相应孔内。同时各取 0.1 ml 于 1.5 ml EP 管中,加入 0.4 ml 每 100 毫升含 0.27 ml β-巯基乙醇的 Z-Buffer(0.06 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L $MgSO_4$, pH 7.0),然后,分别加入 50 μl 氯仿、25 μl 0.1% 的 SDS,剧烈振荡,裂解细菌。加入 100 μl 4 mg/ml 的邻硝基苯-β-D-半乳吡喃糖苷(ONPG),28 ℃反应10 min,加入 0.5 ml 1 mol/L 的 $NaCO_3$ 溶液终止反应,14 000 r/min 离心 15 min,分别取 0.1 ml 上清加入 96 孔板相应孔内。酶标仪测定 $D(600)$、$D(550)$ 与 $D(420)$ 值,利用 Miller Units 公式计算 β-半乳糖苷酶(LacZ)活性值。以未加 IPTG 诱导孔为对照,根据 LacZ 活性升高程度,筛选猎物克隆。

### 1.7 猎物质粒的分离与测序

将筛选到的 β-半乳糖苷酶活性明显升高的克隆分别接种于含氯霉素和卡那霉素的 LB 中培养(以淘汰 AMP 抗性的诱饵质粒),提取质粒,转化 DH5α 感受态,涂布只含氯霉素的 LB 平板,挑取抗性菌落培养,再提取质粒,即为筛选到的候选猎物质粒。将该质粒再转化含诱饵质粒的 KS1 宿主菌,用 B2H 进行第 2 次双杂交验证,LacZ 确实为明显升高者即为猎物质粒,将质粒测序,获得猎物的编码序列。

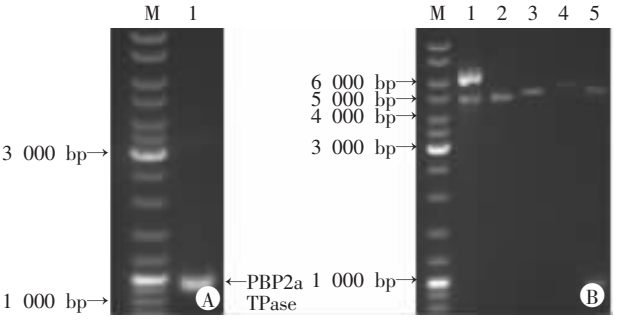
### 1.8 插入序列的分析

将测序获得的序列与 MRSA N315 基因组 DNA 进行序列比对,分析克隆中插入片段在基因组中的位置。进一步根据阅读框,分析插入片段中编码与诱饵蛋白相互作用的多肽。

## 2 结果

### 2.1 诱饵质粒 pBR-PBP2a 的构建与鉴定

利用设计的 PCR 引物 P1、P2,以质粒 pMD-PBP2a 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,大小约为 950 bp(图 2A);回收扩增产物,经 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切后插入 pRBR 质粒的 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ位点,转化 DH5α,挑取 AMP 抗性质粒进行酶切鉴定,如图 2B 所示,重组质粒能被 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ双酶切出约 950 bp 的目的片段。进一步对重组质粒进行测序,结果显示,插入的 PBP2a TPase 基因碱基序列完全正确,且与 pRBR 质粒上的大肠埃希菌 RNA 聚合酶 α 亚单位的 N 端序列正确融合,将此重组质粒命名为 pBR-PBP2a。




A:目的基因的 PCR 扩增产物电泳结果 M:DNA 标准;1:PCR 扩增产物;B:pBR-PBP2a 的酶切鉴定电泳结果 M:DNA 标准;1:pRBR 空质粒;2:pRBR + *Bam*HⅠ;3:重组质粒 pBR-PBP2a;4:pBR-PBP2a + *Bam*HⅠ;5:pBR-PBP2a + *Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ

**图2 重组诱饵质粒 pBR-PBP2a 的酶切鉴定**

### 2.2 MRSA N315 株基因组 DNA 提取及最佳酶切条件摸索

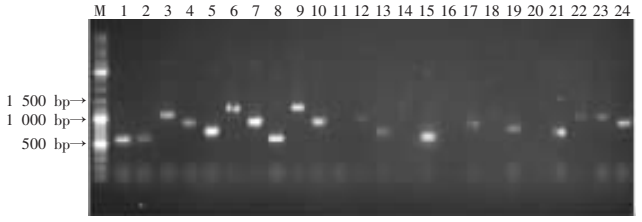
培养 MRSA N315,按分子克隆中的方法[6]提取基因组 DNA。分别取 1 μg 基因组 DNA,用不同稀释度的 *Sau*3AⅠ进行部分酶切 30 min,结果表明,*Sau*3AⅠ作 1∶16 稀释时,MRSA 基因组 DNA 部分酶切产生 500~1 500 bp 的片段最多,故选用 1∶16 稀释的 *Sau*3AⅠ酶切 MRSA 基因组进行建库。

### 2.3 MRSA N315 株基因组文库的构建与初步鉴定

取 MRSA N315 株基因组 DNA 10 μg,用 1∶16 稀释的 *Sau*3AⅠ进行不完全酶切,回收 500~1 500 bp 酶切片段,与用 *Bam*HⅠ酶切并去磷酸化的 pRAC 质粒连接,转化 DH5α 大肠埃希菌,涂布氯霉素抗性平板。37 ℃培养后统计菌落数,共获得约 $6.1 \times 10^4$ 个阳性克隆。选取 50 个克隆,用位于 pRAC 质粒多克隆位点两侧的测序引物进行菌落 PCR 扩增,扩增产物用 1% 琼脂糖电泳,从图 3 可以看出,所分析的 50 个克隆中 90% 以上都含有插入片段,片段大小随机性良好,主要集中在 0.5~1.5 kb,少数扩增条带较弱,可能与所选菌落较小、直接裂解不彻底、基因组未完全释放有关,但总体来看,该文库的构建符合预期结果。

从理论上讲,文库构建时获得的克隆数越多,代表性越好,但过多又会增加后续筛选的工作量。利用文献[8]报道的克隆数计算公式 $N = \ln(1-P)/\ln(1-f)$(其中 N 为所需重组克隆数,P 为任何一段 DNA 序列出现的概率,f 为插入片段的平均

长度与基因组总长度之比),以 MRSA N315 基因组进行计算:MRSA N315 基因组(NC_002745)全长约为 28 kb,f 为 $3.55 \times 10^{-4}$,如果以 99% 的概率(P)筛选到基因组任意一段 DNA 序列,所需要的重组克隆数(N)为 6 479。本研究所构建文库的克隆数为 $6.1 \times 10^4$ 个,覆盖倍数约为 9 倍,达到了基因组文库的构建要求,可以用于后续的筛选工作。




M: DNA 标准;1~24:菌落 PCR 鉴定

**图 3 基因组文库中插入片段的菌落 PCR 扩增电泳结果**

### 2.4 细菌双杂交筛选结果

将文库质粒转化含诱饵质粒 pBR-PBP2a 的 KS1 宿主菌,按 B2H 方法进行筛选。共筛选了 3 次(约 200 个克隆),结果获得 9 个可疑克隆,它们在 IPTG 诱导后,报告基因表达的 β-半乳糖苷酶活性明显升高(图 4),其中 2、9 号克隆 LacZ 升高达 3.65 倍和 3.17 倍(50 μmol/L IPTG 诱导后),与阳性对照 pACλCI-βflap/pBRL28/KS1 的 3.25 倍相仿,阴性对照 pRAC/pBR-PBP2a/KS1 的 LacZ 活性基本不升高。

### 2.5 插入序列的信息学分析

将 3 次细菌双杂交中 β-半乳糖苷酶活性均明显升高的 9 个克隆分别培养,制备猎物质粒进行测序,测序结果通过 NCBI 网站及 DNAstar 软件进行分析。同源检索表明,9 个猎物质粒中的插入基因片段均来自于 MRSA N315 基因组,最长(2 号)648 bp,最短(7 号)334 bp,能连续编码长短不一的氨基酸短链与 pRAC 质粒上的 λCI 蛋白融合,介导与诱饵蛋白 α-PBP2a 的相互作用。9 个插入片段中含编码基因 14 个,10 基因编码蛋白的功能未知,4 个已知的编码基因分别是 2 号片段编码的二氢吡啶二羧酸合酶和还原酶,6 号和 8 号片段编码的染色体解离稳定(SMC)蛋白。结果见表 1。

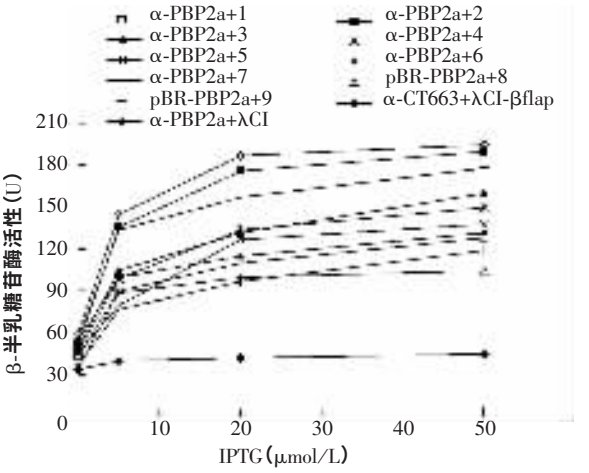



**图 4 筛选到的 9 个猎物质粒克隆的 B2H 结果(LacZ 活性)**

## 3 讨论

随着抗菌药物在临床的广泛应用,耐药性 MRSA 感染在全球范围内迅速增加[10]。MRSA 具有多重耐药性,给临床治疗造成了极大困难。目前,MRSA 对万古霉素也开始出现耐药的趋势[11]。通过对 MRSA 耐药机制的研究发现,其 mecA 基因、fem/aux 基因[12]、代谢调控蛋白 A(CcpA)编码基因[13]等都与 MRSA 高度耐药有关。其中,mecA 基因编码产生 PBP2a,是 MRSA 靶位改变耐药机制中的 1 个典型例子,也是近年来研究的热点。然而,PBP2a 在 MRSA 中的表达模式,以及其发挥功能时的相关辅助因子都不清楚。因此,在 MRSA 中寻找到 PBP2a 的相互作用分子,对深入探索 PBP2a 参与 MRSA 耐药形成机制有重要意义。

目前,随着科学技术的进步和发展,研究蛋白质相互作用的方法日益增多,如已有 B2H、酵母双杂交技术(Y2H)、Co-IP、pull-down、蛋白质芯片、亲和层析[14]

**表 1 猎物质粒中插入片段的生物信息学分析**

| 序号 | 插入片段(bp) | 插入片段在 MRSA N315 染色体上的位置 | 插入片段中的编码基因 | 基因编码的蛋白质 | 与 λCI 形成融合蛋白的肽链长度 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 476 | 2 034 120~2 034 596 | Gene1 ID:1124674<br>Gene2 ID:1124675<br>Gene3 ID:1124676 | 1:hypothetical protein<br>2:hypothetical protein<br>3:hypothetical protein | 18 肽 |
| 2 | 648 | 1 403 348~1 402 700 | Gene1 ID:1124066<br>Gene2 ID:1124067 | 1:dihydrodipicolinate synthase<br>2:dihydrodipicolinate reductase | 40 肽 |
| 3 | 607 | 2 013 946~2 014 553 | Gene ID:1124653 | hypothetical protein | 37 肽 |
| 4 | 535 | 459 197~458 662 | Gene1 ID:1123181<br>Gene2 ID:1123182 | 1:hypothetical protein<br>2:hypothetical protein | 14 肽 |
| 5 | 529 | 301 648~301 119 | Gene ID:1123026 | hypothetical protein | 11 肽 |
| 6 | 389 | 1 217 496~1 217 885 | Gene ID:1123908 | chromosome segregation SMC protein | 20 肽 |
| 7 | 334 | 709 677~709 343 | Gene ID:1123422 | hypothetical protein | 35 肽 |
| 8 | 606 | 1 218 490~1 217 884 | Gene ID:1123908 | chromosome segregation SMC protein | 20 肽 |
| 9 | 602 | 1 996 553~1 995 951 | Gene1 ID:1124628<br>Gene2 ID:1124629 | 1:hypothetical protein<br>2:hypothetical protein | 46 肽 |

等一系列体内、体外检测方法。在众多的方法中,B2H由于细菌的生长速度快、转化效率高、筛选库容量大等优点而倍受关注,已被广泛应用于生物学的各个领域[15-19]。我们采用基于报告基因转录激活的细菌双杂交系统对PBP2a的相互作用蛋白进行了筛选研究,在成功构建诱饵质粒pBR-PBP2a和MRSA基因组表达文库的基础上,将文库质粒转化入含诱饵质粒的KS1报告宿主菌,当融合表达的诱饵蛋白与猎物有相互作用时,可激活报告基因lacZ的转录和表达,再通过检测β-半乳糖苷酶活性,判断蛋白相互作用的强弱。据文献[9]报道,在IPTG诱导后,LacZ活性升高2倍以上者可确认为可疑克隆,再进行下一步的分析和验证。本实验通过对200多个克隆的反复筛选,发现了9个可疑猎物。对9个猎物质粒测序分析发现,其插入基因片段均来自于MRSA N315基因组,最长648 bp,最短334 bp,能连续编码长短不一的氨基酸短链与pRAC质粒上的λCI蛋白融合,介导与诱饵蛋白α-PBP2a的相互作用。9个插入片段中含14个编码基因,其中10个功能未知,1个编码二氢吡啶二羧酸合酶、1个编码二氢吡啶二羧酸还原酶,2个编码染色体解离稳定蛋白。其中二氢吡啶二羧酸合酶为赖氨酸生物合成的关键酶,与氨基酸的转运代谢以及细胞壁与细胞膜的合成有关;二氢吡啶二羧酸还原酶能催化赖氨酸中的2,3-二氢吡啶二羧酸还原成2,3,4,5-四氢吡啶二羧酸以及催化二氨基庚二酸的合成;染色体解离稳定蛋白具有DNA拓扑异构酶的活性,与DNA的合成与构象有关。当然,这9个克隆编码的多肽能否与PBP2a相互作用,进而影响PBP2a介导MRSA的耐药性尚需在获得每个目标肽段后,通过生化以及生物学功能验证后才能揭晓[20,21]。

综上所述,本研究成功构建了MRSA N315株基因组文库以及融合表达PBP2a TPase的诱饵质粒,建立了细菌双杂交筛选方法,对PBP2a相互作用蛋白进行了筛选,获得9个可疑的猎物克隆,为下一步研究这些克隆编码多肽对PBP2a活性的影响,深入认识PBP2a介导MRSA耐药性发生的机制奠定了坚实的基础。

## 参考文献:

[1] Pantosti A, Venditti M. What is MRSA? [J]. Eur Respir J, 2009, 34(5): 1190-1196.

[2] Nakou A, Woodhead M, Torres A. MRSA as a cause of community-acquired pneumonia[J]. Eur Respir, 2009, 34(5): 1013-1014.

[3] Frazee B W, Lynn J, Charlebois E D, *et al*. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections [J]. Ann Emerg Med, 2005, 45(3): 311-320.

[4] Willey B, Mazzulli T, McGeer A, *et al*. Evaluation of screening media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from surveillance swabs [J]. Am J Infect Control, 2005, 33 (5): e181.

[5] Rao X, Deighan P, Hua Z, *et al*. A regulator from Chlamydia trachomatis modulates the activity of RNA polymerase through direct interaction with the beta subunit and the primary sigma subunit[J]. Genes Dev, 2009, 23(15): 1818-1829.

[6] 马学军, 舒跃龙. 精编分子生物学实验指南[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 2006: 44-92.

[7] Seed B, Parker R C, Davidson N. Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion[J]. Gene, 1982, 19(2): 201-209.

[8] Dove S L, Joung J K, Hochschild A. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts[J]. Nature, 1997, 386 (6625): 627-630.

[9] Lahiri S, Pulakat L, Gavini N. Functional NifD-K fusion protein in Azotobacter vinelandii is a homodimeric complex equivalent to the native heterotetrameric MoFe protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(2): 677-684.

[10] Cosgrove S E, Sakoulas G, Perencevich E N, *et al*. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus bacteremia*: a meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2003, 36(1): 53-59.

[11] Appelbaum P C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(Suppl 1): 16-23.

[12] Rohrer S, Berger-Bachi B. FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 837-846.

[13] Seidl K, Stucki M, Ruegg M, *et al*. Staphylococcus aureus CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4): 1183-1194.

[14] Figeys D. Novel approaches to map protein interactions[J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14(1): 119-125.

[15] Lim D, Strynadka N C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(11): 870-876.

[16] Dove S L, Hochschild A. A bacterial two-hybrid system based on transcription activation[J]. Methods Mol Biol, 2004, 261: 231-246.

[17] Joung J K, Ramm E I, Pabo C O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(13): 7382-7387.

[18] Hu J C, Komacker M G, Hochschild A. *Escherichia coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions[J]. Methods, 2000, 20(1): 80-94.

[19] Ichikawa E, Platts-Mills T A E, Woodfolk J A, *et al*. Screening of a genomic DNA library and recombinant expression: a new approach to the question of allergic responses to bacterial proteins[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2001, 124(1/3): 97-99.

[20] 符庆瑛, 高钰琪, 刘昕. 大肠杆菌双杂交系统筛选与AMPKα2相互作用的蛋白质[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 820-823.

[21] Hua Z, Rao X, Feng X, *et al*. Mutagenesis of region 4 of sigma 28 from Chlamydia trachomatis defines determinants for protein-protein and protein-DNA interactions[J]. J Bacteriol, 2009, 191(2): 651-660.

(**收稿**:2009-11-16;**修回**:2009-12-14)

(编辑 王 红)