论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1350-04

金黄色葡萄球菌N315 T7噬菌体cDNA展示文库的构建

于俊媛[1*]，周莹冰[2*]，张雯庆[1]，祁　琳[1]，李　萌[1]，姜　北[1]，张骁鹏[1]，汪正清[1]，饶贤才[1]，黎　庶[1]，胡晓梅[1]
（400038 重庆，第三军医大学基础医学部微生物学教研室[1]；400010 重庆，重庆市渝中区疾病预防控制中心[2]）

［摘要］ **目的** 构建MRSA N315菌株的T7噬菌体cDNA展示文库，以筛选和鉴定影响N315 ccr基因表达的调节因子。**方法** 采用Tripure试剂提取N315总RNA，逆转录合成双链cDNA，经末端修平、接头连接、酶切后柱洗脱等处理后，连接T7Select 10-3载体，体外包装扩增获得N315 T7噬菌体cDNA展示文库；通过双层平板实验鉴定所建原始文库及扩增文库的库容；PCR鉴定文库插入片段质量。**结果** 原始文库重组克隆数为1.335×10^6 pfu，扩增文库的噬菌体滴度为3.26×10^{10}pfu/mL。随机PCR扩增显示文库阳性重组率为100%，插入片段在300～1 500 bp之间。**结论** MRSA N315的T7噬菌体cDNA展示文库构建成功。

［关键词］ 噬菌体展示；cDNA文库；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；N315
［中图法分类号］ Q785；Q939.48；R378.11　　［文献标志码］ A

Construction of T7 phage display cDNA library from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315

Yu Junyuan[1], Zhou Yingbing[2], Zhang Wenqing[1], Qi Lin[1], Li Meng[1], Jiang Bei[1], Zhang Xiaopeng[1], Wang Zhengqing[1], Rao Xiancai[1], Li Shu[1], Hu Xiaomei[1]*([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Yuzhong District Center for Disease Control and Prevention, Chongqing, 400010, China)

［**Abstract**］ **Objective** To construct T7 phage display cDNA library from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) N315 in order to found a basis for screening and identification of regulatory factor of N315 staphylococcal cassette chromosome gene (scc). **Methods** Total RNA was extracted from MRSA N315 by Tripure reagents and digested with DNase Ⅰ to get rid of the contamination of genomic DNA. Then, the total RNA was reverse-transcribed into double-stranded cDNA with random hexamer primers, and subsequently treated with end modification, adaptors ligation, and *Eco*RⅠ/*Hin*dⅢ digestion. After eliminated excess adaptors and small fragments (less than 300 bp), the cDNA fragment was ligated into T7Select 10-3 vector. The MRSA N315 phage display cDNA library was constructed by package reaction *in vitro* and plate proliferation. Plaque assay and PCR amplification were used to evaluate the library. **Results** The total number of primary recombinants was about 1.335×10^6 pfu, and the phage titer of the amplified library was 3.26×10^{10} pfu/mL. Insert ratio of 24 random plaques was proved to be 100% by PCR amplification, and the length of insert DNA ranged from 300 bp to 1 500 bp. **Conclusion** A T7 phage display cDNA library from MRSA N315 is successfully constructed.

［**Key words**］ phage display; cDNA library; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; N315

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10050, CSTC2011BB5026). Yu Junyuan and Zhou Yingbing are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Hu Xiaomei, Tel: 86-23-68775224, E-mail: hxmay2008@163.com; Li Shu, Tel: 86-23-68771937, E-mail: lishu72@aliyun.com

［基金项目］ 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10050，CSTC2011BB5026)
* 同等贡献者
［通信作者］ 胡晓梅，电话：(023)68775224，E-mail：hxmay2008@163.com
黎　庶，电话：(023)68771937，E-mail：lishu72@aliyun.com
［优先出版］ http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1114.018.html(2013-12-20)

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌；*Staphylococcus aureus*)是医院内感染和社区获得性感染的重要病原菌之一，既可引起皮肤、黏膜等处的轻型化脓性感染，也可导致菌血症、毒性休克综合征等危及患者生命的严重疾病。而耐药性的产生与广泛传播严重干扰着金

葡萄的临床防治,使得近年来金葡菌感染逐步呈现发病率高、耐药性强、治疗困难、病死率高的态势。据美国疾病控制中心报道:仅美国每年就有近10万例金葡菌感染的住院患者,仅次于大肠埃希菌,位居第二[1];因耐药性金葡菌感染导致的患者病死率甚至超过了乙型肝炎患者及艾滋病患者的总和,成为严重的全球性社会卫生问题[2]。在中国,耐药性金葡菌的感染率和致死率也一直居高不下[3-4]。因此,能否有效的控制耐药性产生与传播成为影响金葡菌感染防治工作的关键。以往研究显示:金葡菌,尤其是耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)多重耐药性的获得与其染色体上携带的葡萄球菌盒式染色体元件(staphylococcal cassette chromosome, SCC)密切相关[5]。SCC元件自基因组上解离、转移与重组直接导致了MRSA耐药性的扩散,而MRSA的盒式染色体重组酶(cassette chromosome recombinase, Ccr)则在此解离、重组过程中发挥着主导作用[6]。但Ccr蛋白的表达调控机制至今仍不清楚。本实验采用噬菌体展示技术构建MRSA(N315菌株)的cDNA文库,用以筛选能与*ccr*基因启动子序列结合的蛋白质,旨在为进一步研究影响Ccr重组酶表达的转录调控因素奠定前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

金葡菌N315标准株由第四军医大学唐都医院连建奇教授惠赠,本室长期保存。Tripure试剂购自Roche公司;T7Select Orient Express Random Primer cDNA Cloning System购自Novagen公司;MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit购自Ambion公司;DNase Ⅰ、*Taq* DNA聚合酶购自Promega公司;其他试剂购自大连TaKaRa、上海生工等公司。

1.2 方法

1.2.1 金葡菌总RNA提取 将过夜培养的N315菌液按1∶100比例新鲜培养至光密度$D(600)$值为0.6~1.0。取1 mL菌液离心集菌,重悬于100 μL TE缓冲液(含3 mg/mL溶菌酶和10 μL 1 mg/mL溶葡萄球菌素),37 ℃作用1 h后加入1 mL Tripure试剂进行总RNA抽提(参照试剂说明书进行),采用甲醛变性琼脂糖电泳鉴定总RNA质量。获得的N315总RNA用DNase Ⅰ消化去除基因组DNA污染(参照试剂说明书进行),并以消化处理前后的总RNA为模板,PCR扩增金葡菌看家基因(*mecA*)以评价总RNA中基因组DNA污染情况。最后,采用MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit(AM1905)分离纯化N315 mRNA(参照说明书进行)。

1.2.2 cDNA文库的构建

1.2.2.1 cDNA的合成 采用OrientExpress Random Primer cDNA Synthesis Kits(Novagen,69992-3)进行cDNA的反转录制备。以4 μg mRNA为模板,使用*Hind* Ⅲ Random Primer以MMLV逆转录酶反转录合成cDNA第1链。为兼顾大片段cDNA的合成,我们同时采用0.1 μg和1 μg两种浓度的引物进行反转录,并在RNaseH和DNA聚合酶Ⅰ作用下合成cDNA第2链。而后,将两个反应得到的cDNA混合,等体积苯酚/氯仿/异戊醇抽提后,乙醇沉淀。

1.2.2.2 cDNA末端处理 采用*Eco*RⅠ/*Hind*Ⅲ End Modification Kit(Novagen,69994-3)和DNA Ligation Kit(69838-3)进行cDNA末端的处理:先用T4 DNA聚合酶补平cDNA末端;接着,在T4多核苷酸激酶和T4 DNA连接酶作用下于cDNA末端定向添加*Eco*RⅠ/*Hind* Ⅲ接头;而后采用*Eco*RⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切处理获得粘端cDNA片段。最后,采用Mini Column Fractionation试剂盒(Novagen,69995-3)去除冗余接头及长度在300 bp以下的小片段cDNA。

1.2.2.3 文库构建 采用T7Select10-3 Cloning Kit(Novagen,70550-3)进行N315 cDNA噬菌体展示文库的构建。按1∶2(载体∶插入片段)的摩尔比加入处理好的cDNA片段(0.04 pmol)及T7Select vector arms(0.02 pmol),T4连接酶16 ℃连接过夜。取5 μL连接产物加入25 μL T7噬菌体包装物中,22 ℃温育2 h进行体外包装,所得包装产物即为原始文库。双层琼脂平板试验铺板检测文库滴度。

将所有原始重组克隆铺板并用噬菌体洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,100 mmol/L NaCl,6 mmol/L $MgSO_4$)洗脱噬菌体,3 000 r/min离心5 min回收上清,即获得噬菌体扩增文库。扩增文库经双层平板试验检测滴度后加入10%灭菌甘油,-70 ℃保存。

1.2.3 双层平板试验测定文库库容 采用M9TB培养基37 ℃振荡培养宿主菌BLT5403至$D(600)\approx1.0$;用灭菌LB培养基稀释噬菌体文库(10^{-6}~10^{-3}倍)。取100 μL文库稀释液加入250 μL BLT5403培养物中,轻摇混匀后室温吸附5 min,而后加入3 mL预热至50 ℃左右的0.5%半固体LB琼脂培养基,混匀后均匀铺于含100 μg/mL羧苄青霉素的LB琼脂平板上,37 ℃孵箱培养3~4 h,通过噬斑计数计算文库库容。

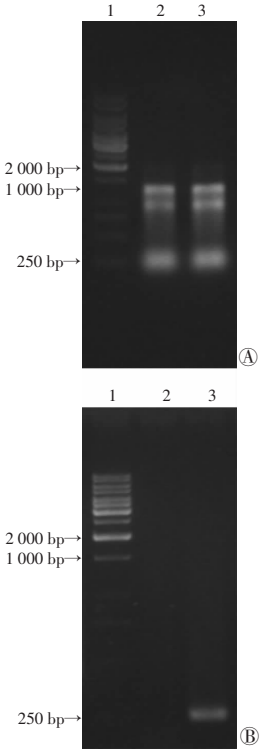
1.2.4 PCR扩增及测序鉴定文库质量 从平板上随机挑选24个分离良好的单个噬菌斑,用灭菌尖头蘸取少量噬菌体分别加入100 μL新鲜配制的10 mmol/L EDTA(pH 8.0)中,涡旋震荡混匀,65 ℃作用10 min,14 000 r/min离心3 min去除不溶物,取2 μL作为模板,采用T7 Select引物进行PCR扩增(上游引物:5′-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3′,下游引物:5′-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3′;PCR循环参数:94 ℃ 50 s,50 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35个循环后72 ℃延伸10 min)。PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析文库构建质量。

2 结果

2.1 总RNA提取

采用Tripure试剂分离总RNA,紫外分光光度计检测显示总RNA $D(260)/D(280)$比值约2.05;甲醛变性凝胶电泳显示总RNA 23S、16S及5S条带明亮清晰、边缘锐利,无明显降解,23S条带亮度为16S亮度的1~2倍(图1A),提示RNA质量良好。用DNase Ⅰ消化处理前后的总RNA为模板,PCR扩增金葡菌看家基因(*mecA*)评估基因组DNA污染去除情况,电泳结果显示未用DNase Ⅰ处理者mecA PCR扩增呈阳性(图1B泳道3),提示初提的总RNA中有一定程度基因组污染。这是由于细菌基因组无成型的细胞核包裹,以原始拟核状态存在于细

菌细胞质内,故在分离细菌 RNA 时难免出现基因组 DNA 污染。但以 DNase I 消化后,mecA 基因转为阴性(图 1B 泳道 2),表明总 RNA 中基因组 DNA 的污染已被去除。采用 MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit 分离纯化 mRNA 片段,用于 cDNA 的制备及文库的构建。



A: N315 总 RNA 电泳 1:DNA 标准;2、3:均为抽提的细菌总 RNA 样本; B: N315 总 RNA mecA 基因 PCR 扩增 1:DNA 标准;2:总 RNA DNase Ⅰ消化后;3:总 RNA DNase Ⅰ消化前

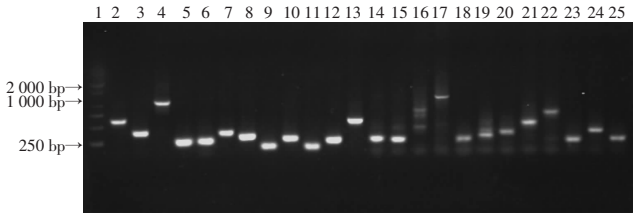
图 1 N315 总 RNA 质量鉴定

2.2 cDNA 合成

由于细菌 mRNA 不带 poly A 尾,故本实验中采用 *Hind*Ⅲ Random Primer 进行 cDNA 第 1 链的反转录合成。根据试剂盒说明书介绍,在 cDNA 逆转录合成时,随机引物的用量可影响合成 cDNA 分子的长度:较高的引物浓度可增加 cDNA 产量,但合成的 cDNA 平均长度较短;相反,降低引物浓度有利于长片段 cDNA 的合成,但 cDNA 产量会降低。因此,我们以 4 μg mRNA 为模板,采用 1 μg 及 0.1 μg 两种浓度的随机引物分别进行 cDNA 逆转录,使获得的 cDNA 片段分布更为均衡和完整;将两组 DNA 合并后用于 cDNA 文库的构建,既能确保文库拥有足够的库容,又能保证其良好的覆盖面和质量。

2.3 文库构建和鉴定

添加了 *Eco*RⅠ/*Hind*Ⅲ接头的 cDNA 产物经双酶切后连接 T7 噬菌体载体 T7Select10-3,连接产物加入 T7 噬菌体体外包装试剂中室温下进行噬菌体体外包装,构建 N315 的 T7Select 噬菌体 cDNA 展示文库,并用双层琼脂平板实验检测文库库容。结果显示原始文库的重组克隆数为 1.335×10^6 pfu,扩增文库的噬菌体滴度为 3.26×10^{10} pfu/mL。从双层琼脂平板上随机抽取 24 个噬斑,采用 T7Select 引物进行 PCR 扩增,评估所建文库的阳性插入率及文库质量。3 次独立实验结果均显示所有克隆中都有片段插入,提示文库阳性插入率为 100%;插入片段大小分布在 300 ~ 1 500 bp 之间(图 2),符合实验设计与要求,可用于后续的筛选实验。



1: DNA 标准;2 ~ 25: 24 个随机噬斑的 PCR 扩增鉴定

图 2 N315 T7 噬菌体 cDNA 展示文库质量鉴定

3 讨论

耐药性的不断增加与广泛传播一直是困扰金葡菌临床防治工作的一大难题。随着耐青霉素金葡菌、MRSA、耐万古霉素金葡菌等耐药菌甚至是多重耐药性金葡菌的出现,临床上耐药性金葡菌的防治工作面临前所未有的困境。

细菌耐药性的获得大致可分为基因突变及耐药基因水平转移两种机制[5]。就 MRSA 而言,其耐药性主要源于染色体上携带的 SCC 元件。SCC 元件广泛存在于 MRSA 等耐药金葡菌染色体复制起始区附近的固定位置,除携带与甲氧西林耐受相关的 *mecA* 基因(也称为 SCC*mec* 元件)外,还带有针对四环素类、氨基糖甙类、β-内酰胺类、大环内酯类等抗菌药物的耐受基因,因而也被称作金葡菌的耐药岛,是 MRSA 等耐药菌具有多重耐药性的重要原因[5,7]。SCC*mec* 耐药岛由三部分组成:*mec* 复合物区域、*ccr* 复合物区域以及功能未知的非 *mec* 非 *ccr* 区域[5,7-8]。依据 *mec* 复合物组成及 *ccr* 复合物类型的不同,目前已鉴定出 11 种不同的 SCC*mec* 类型(SCC*mec* Ⅰ-Ⅺ)[8],其中,Ⅰ型、Ⅳ型、Ⅴ型、Ⅵ型、Ⅶ型、Ⅸ型及Ⅹ型 SCC*mec* 元件的存在仅导致金葡菌对 β-内酰胺类抗生素耐受(由 *mecA* 基因编码);而Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅷ型及Ⅺ型 SCC*mec* 序列中还整合有额外的质粒耐药基因(pUB110、pI258 和 pT181)和转座子耐药基因(Tn554 及 ψTn554)等,使得相应 MRSA 菌株表现出多重耐药性[5]。

SCC*mec* 元件在金葡菌染色体中并不是稳定存在的。即便是正常状态下,SCC*mec* 元件也可自发从 MRSA 基因组中脱落[9],头尾相连形成闭合环状结构游离于菌细胞内[10],并能在不同种属葡萄球菌之间转移,是一种可移动遗传元件,扮演着金葡菌耐药性传递者的角色。而 Ccr 复合物与 SCC*mec* 元件的解离、脱落以及重新整合密切相关:*ccr* 基因编码位点及方向特异性重组酶,参与 SCC*mec* 元件从 MRSA 供体菌基因组上精确切离过程并介导游离 SCC*mec* 元件以正确的方向精确整合入受体菌基因组的 SCC*mec* 附着位点[6,11]。研究显示 Ccr 重组酶的过表达能显著提高 SCC*mec* 元件

的解离率[12-13]；临床上某些常用抗生素（如青霉素、氨苄青霉素、新青霉素Ⅱ、头孢西丁、万古霉素等）的高浓度使用也可导致 *ccr* 基因表达明显上调[14]，提示 Ccr 重组酶表达的高低受着调控因素的影响，若能采取措施降低 MRSA 等耐药金葡菌 *ccr* 基因的表达，则可能抑制其 SCC*mec* 耐药元件的解离与传播，从而控制 MRSA 耐药性的扩散。然而，*ccr* 基因表达的调控机制至今仍不清楚，本实验通过构建 MRSA 的 T7Select 噬菌体 cDNA 展示文库，希望能借之筛选到能与 *ccr* 基因启动子区域结合并对其表达起调控作用的调节子，以促进人们对 SCC*mec* 元件 Ccr 重组酶表达调控机制及 MRSA 多重耐药性播散的深入认识，对今后制定有效措施从源头上抑制金葡菌耐药性的扩散也有着十分重要的意义。

噬菌体展示技术通过将外源基因插入噬菌体展示载体，使其与编码噬菌体外壳蛋白的基因相连接；随着子代噬菌体的重新组装，与噬菌体外壳蛋白融合表达的外源基因编码蛋白即被展示于噬菌体的表面。当以一组随机多肽编码序列或基因群插入噬菌体展示载体，即可构建噬菌体展示文库。结合亲和筛选技术，将靶蛋白或 DNA 片段固定于固相支持物上，通过亲和富集及多次反复淘洗可从噬菌体展示文库中筛选出能与靶蛋白或 DNA 分子特异性结合的噬菌体，进而分析出相应的外源基因序列，是研究蛋白质与蛋白质间、蛋白质与 DNA 分子间相互作用的重要工具。到目前为止，人们已开发出了单链丝状噬菌体展示系统（如 M13 噬菌体），λ 噬菌体展示系统、T4 噬菌体展示系统及 T7 噬菌体展示系统等数种噬菌体展示系统[15]。目前市售的噬菌体展示试剂盒主要为 M13 单链丝状噬菌体展示系统和 T7 噬菌体展示系统。相比而言，T7 噬菌体展示系统具有噬菌体生长迅速，筛选周期短（仅 3 h 形成噬斑），稳定性好，操作和储存方便，包装效率高，文库代表性好等优点，是构建 cDNA 展示文库的理想工具。并且，T7 噬菌体在细胞质中完成组装后直接从细胞裂解释放，克服了丝状噬菌体只能通过穿膜展示分泌蛋白的局限性，对于具有抑制分泌过程作用的蛋白和多肽也能很好的展示和表达，因此，相对丝状噬菌体展示系统而言，利用 T7 噬菌体展示系统构建的 cDNA 文库表达的蛋白或多肽种类更多，文库的信息量更大更完整。在本实验中，我们将 MRSA N315 菌株的 cDNA 片段克隆入 T7Select10-3 载体构建 N315 T7 噬菌体展示文库。经鉴定，原始文库库容约为 1.335×10^6 pfu，扩增文库滴度为 3.26×10^{10} pfu/mL；随机噬斑 PCR 鉴定显示文库插入率为 100%，插入片段大小在 300～1 500 bp 之间，表明构建的文库具有良好的库容和质量，可用于后续 MRSA N315 Ccr 重组酶转录调节子的筛选。目前，我们正以 *ccr* 基因启动子 DNA 片段为诱饵对构建的文库进行生物淘洗筛选，希望能找到影响 MRSA Ccr 重组酶表达的调控因子，为进一步探讨 MRSA SCC*mec* 元件的水平转移机制及金葡菌耐药性播散的原理奠定前期实验基础。

参考文献：

[1] Taubes G. The bacteria fight back[J]. Science, 2008, 321(5887): 356－361.

[2] DeLeo F R, Chambers H F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2464－2474.

[3] 李勇湧, 黄文祥. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的感染现状与治疗进展[J]. 国外医药：抗生素分册, 2010, 31(1): 19－23, 41.

[4] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 325－334.

[5] Ito T, Okuma K, Ma X X, *et al*. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC[J]. Drug Resist Updat, 2003, 6(1): 41－52.

[6] Wang L, Archer G L. Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome *mec*, a *Staphylococcus aureus* genomic island[J]. J Bacteriol, 2010, 192(12): 3204－3212.

[7] Hanssen A M, Ericson-Sollid J U. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(1): 8－20.

[8] Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview[J]. Pol J Microbiol, 2011, 60(2): 95－103.

[9] Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(6): 1449－1458.

[10] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1549－1555.

[11] Jansen W T, Beitsma M M, Koeman C J, *et al*. Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(6): 2072－2078.

[12] 马笑雪, 黄惠颖, 孙丹丹, 等. *ccr* 重组酶基因介导 SCC*mec* 基因岛的剪切功能研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(3): 161－164.

[13] Noto M J, Archer G L. A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type Ⅳ is deficient in CcrAB-mediated SCC*mec* excision[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8): 2782－2788.

[14] Higgins P G, Rosato A E, Seifert H, *et al*. Differential expression of ccrA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying staphylococcal cassette chromosome mec type Ⅱ and Ⅳa elements[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10): 4556－4558.

[15] 祝仁发, 黄莉清, 何后军, 等. 噬菌体展示系统及筛选技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(增): 23－26.

（**收稿**：2013-11-08；**修回**：2013-11-18）

（编辑　邓强庭）