

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.04.003

# 大肠杆菌 O157 : H7 *narX* 与 *narP* 缺失株的构建及其对细胞粘附与 A/E 损伤的观察

徐雪芳, 刘学通, 熊衍文, 徐建国

**摘要:** 目的 大肠杆菌 O157 : H7 是一种重要的可以引起人类严重疾病的肠出血性大肠杆菌(enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC)血清型。为获得 *narX* 与 *narP* 缺失株并观察其对细胞粘附与 A/E( attaching and effacing) 损伤的影响。方法 本研究采用  $\lambda$  Red 重组技术, 利用 PCR 产物, 通过 Bet 和 Exo 蛋白促进同位交换的方法, 构建参与呼吸系统调控的 *narX* 和 *narP* 突变株。**结果** 成功构建了 *narX* 和 *narP* 突变株, 通过细胞粘附实验和免疫荧光染色, 发现两个突变株对 EBL 细胞的粘附力都有明显下降, 而在 A/E 损伤形成能力方面, 只有 *narX* 突变株有明显下降。**结论** *narX* 和 *narP* 均对细胞的粘附有影响, *narX* 对细胞 A/E 损伤有影响。进一步的机制还需深入的实验研究来证明。

**关键词:** 大肠杆菌 O157 : H7; *narX*; *narP*

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)04-0330-05

## Construction of *narX* and *narP* mutants and their effect on adhesion and A/E lesion in *E. coli* O157 : H7

XU Xue-fang, LIU Xue-tong, XIONG Yan-wen, XU Jian-guo

(State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

**ABSTRACT:** *E. coli* O157 : H7 is one of the most important serotypes of EHEC causing diseases in human. To obtain *narX* and *narP* mutants and investigate their effect on adhesion and A/E lesion in *E. coli* O157, *narX* and *narP* mutants were constructed by  $\lambda$ -Red recombineering technology promoted by Bet and Exo proteins using PCR products. By using bacterial infection assays and immunofluorescence microscopy, it was found that the adhesion ability were decreased both in *narX* and *narP* mutant. In addition, the A/E lesion formation was only down-regulated in *narX* mutant. In conclusion, *narX* and *narP* gene might impact the adhesion and *narX* could influence A/E lesion formation.

**KEY WORDS:** *E. coli* O157; *narX*; *narP*

Supported by the State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control Returnees Start-up Funding (No. 2012SKLID401), and the National Major Science and Technology Program for Prevention and Control of AIDS, Viral Hepatitis and other Major Infectious Diseases (No. 2011ZX10004-001)

Corresponding author: Xu Jian-guo, Email: xujianguo@icdc.cn

硝酸盐呼吸是大肠杆菌获取能量的一种重要方式。为了利用其作为电子受体, 需要一系列酶的辅助。由这些酶组成的代谢通路包括甲酸脱氢酶 FDH-N 和硝酸还原酶<sup>[1]</sup>。在通路中, 由 NarX-

NarL 和 NarQ-NarP 两对感受器-调控子组成的调控系统来感受环境中硝酸盐的存在以及负责将信号传递到基因表达水平<sup>[1]</sup>。其中 NarX 和 NarQ 为膜相关性组氨酸激酶, 而 NarL 和 NarP 为转录调控子<sup>[2-9]</sup>。NarX 和 NarQ 蛋白不仅是硝酸盐的感受器, 同时对亚硝酸盐的变化也可作出反应。研究显示, 在对硝酸盐和亚硝酸盐的反应中, NarX 和 NarQ 可以调节 NarL 与 NarP 的 DNA 结合活性<sup>[1]</sup>。Nar 调控系统一共调控 12 组操纵子, 比如

传染病预防控制国家重点实验室留学归国人员启动经费项目(2012SKLID401)和国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(2011ZX10004-001)资助

通讯作者: 徐建国, Email: xujianguo@icdc.cn

作者单位: 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

*narGHJI* 操纵子受 *NarL* 严密调控而对 *NarP* 蛋白没有反应,而受亚硝酸盐诱导的 *fdnGHI* 操纵子除了主要受 *NarL* 的调控外,也受到 *NarP* 的调控。EHEC O157:H7 是全世界范围内重要的致病性大肠杆菌血清型之一。从基因序列比对分析可以看出致病性大肠杆菌都携带大量的毒力岛和前噬菌体成分,而致病性毒力岛(locus of enterocyte effacement, LEE)就是这些基因中的重要成员之一。LEE 所编码的Ⅲ型分泌系统(type III secretion system, T3SS)可引起肠道细胞的 A/E 损伤。本研究旨在构建 *narX* 与 *narP* 缺失株并观察其敲除后对细胞粘附与 A/E 损伤的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 试验用菌株、质粒、引物和培养基 本研究所用的菌株和质粒均列于表 1。细菌培养基为 LB 肉汤或者 Minimal Essential Medium (MEM)。MEM 培养基中葡萄糖的终浓度为 0.2%。所用的抗生素终浓度为:氯霉素(CAM)20 μg/mL, 氨苄青霉素(AMP)100 μg/mL。

**1.2 方法** 采用 λ Red 重组技术,利用扩增与目的基因具有同源性的 PCR 产物,通过 Bet 和 Exo 蛋白促进同位交换的方法,来构建参与呼吸系统调控的 *narX* 和 *narP* 突变株。

**1.2.1 缺失株的构建 携带 pKM201 质粒的感受态菌株制备** 将 pKM201 电转入需要构建缺失的菌株,置于 30 °C LB-AMP 板上孵育过夜。而后挑选单克隆菌落 LB 肉汤 30 °C 过夜培养,第 2 d 1:100 稀释,培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.3 左右,加入终浓度为 4 mmol/L 的 IPTG,继续培养一个小时,42 °C 作用 15 min,立即置冰上 10 min。4 °C 4 000 g 离心后重悬浮于 20% 甘油中,−70 °C 冷冻保存。

**1.2.2 PCR 产物电转入感受态菌株** 表 1 所列的引物 5-KO-*NarX* 和 3-KO-*NarX*,5-KO-*NarP* 和 3-KO-*NarP* 分别用于扩增 *narX* 和 *narP* 基因片段,PCR 模板为 ZAP198 菌株。0.05~1 μg 的 DNA 与 90 μL 的感受态细菌混合,冰浴 10 min。将电极板迅速干燥后,以 2 200 V 0.005 s 的参数电击。加入 SOC 孵育 2 h,而后在不同浓度(10~50 μg/mL)的 CAM 平板上筛选缺失克隆。

**1.2.3 细菌粘附实验和免疫荧光染色** 采用 EBL 细胞系,实验前 1 d 将 5×10<sup>4</sup> 的细胞接种 8 孔玻片培养槽中。接种细菌的前 1 h,用预热的 MEM 培养基洗涤细胞以去除抗生素。每个槽中加入 2×10<sup>6</sup> CFU 的细菌,37 °C 培养 3 h。用 PBS 洗 2 次,而后

用 2.5% PFA PBS 固定 20 min,PBS 洗 3 次,0.1% Triton X-100 作用 5 min,PBS 洗 3 次,加入 1:50 稀释的抗大肠杆菌 O157 抗体(MAST ASSURE)作用 35 min。用 PBS 清洗 3 次,1:1 000 稀释的 Alexa 568 IgG (Molecular Probes) 作用 30 min。PBS 洗 3 次,而后加入 1 μg/mL 的 TRITC-Phalloidin (Sigma) 作用 30 min,PBS 清洗 2 次,固定液固定(Invitrogen),荧光显微镜观察。随机抽取 20 个视野统计细菌和 actin 染色的方法计算细胞粘附率和基底膜形成概率。

**1.2.4 数据分析** 得到的数据先进行 F 检验,如果 F 检验 P 值大于 0.05 则进行双样本等方差假设的 t 检验;若 F 检验 P 值小于 0.05 则进行双样本异方差假设的 t 检验。t 检验的 P 值小于 0.05 则认为差异有显著性。本文结果中提到的 P 值均为 t 检验的结果。

## 2 结 果

**2.1 *narX* 和 *narP* 缺失株的构建** 本研究采用较新的 λ Red 重组技术,在大肠杆菌 O157:H7 ZAP198 菌株中成功构建了 *narX* 和 *narP* 缺失株,通过 PCR 验证 *narX* 和 *narP* 分别已被敲除,而 CAM 片段也位于基因组上的正确位置(图 1D-E)。图 1A 和 1B 分别显示 *narX* 和 *narP* 在基因组上已经缺失,采用的引物分别为 5-NarX 和 3-NarX,5-NarP 和 3-NarP。图 1C 显示的是基因组上存在 CAM 片段,所用的引物分别为 5-KO-NarX 和 3-KO-NarX,5-KO-NarP 和 3-KO-NarP。图 1D 和 1E 显示的是 CAM 片段在基因组上的位置,采用的引物分别是 5-up-NarX 和 3-down-NarX,5-up-NarP 和 3-down-NarP。以上 PCR 结果证明了敲除 *narX* 和 *narP* 基因的同位交换均已完成。

**2.2 ZAP198 和缺失株的细胞粘附研究** 如章节 1.3 中所述,经过固定和抗 O157 抗体染色后,显微镜下观察细胞的粘附数,随机采取 20 个视野,图中结果以每个 EBL 细胞上平均粘附的细菌数表达(图 2)。经过 F 检验和 T 检验分析,结果显示 *narX* 缺失株在每个细胞上的粘附数明显小于野生株( $P < 0.01$ )。而 *narP* 缺失株的粘附数也有明显下降( $P < 0.05$ )。

**2.3 ZAP198 和缺失株的 A/E 损伤研究** 如章节 1.2.3 中所述,经过固定,抗 O157 抗体染色和 Phalloidin 染色后,显微镜下观察细胞的粘附数,随机采取 20 个视野,图中结果以每个 EBL 细胞上平均形

表 1 本研究使用的菌株、质粒和 PCR 引物  
Tab. 1 Strains, plasmids and primers in this study

		Specific description	Source
Strain	ZAP198	<i>E. coli</i> O157 : H7 was negative for Nalidixic acid-resistant and Shiga toxin	[10]
	ZAPnarX <sup>-</sup>	In the strain of ZAP198, <i>narX</i> gene was instead of CAM fragments	This study
	ZAPnarP <sup>-</sup>	In the strain of ZAP198, <i>narP</i> gene was instead of CAM fragments	This study
Plasmids	pKM201	Red-gam expressed temperature-sensitive plasmid	[11]
Primer	5-KO-NarX	cacattcattaagggtattgctattaaaggcctgaaggagggttac GCGGCCGCATGAGACGTTGAT	This study
	3-KO-NarX	tgcgcageatcggtgtatcgtaatcagcaggatagtgcgggttcgt GCGGCCGCTTCAATTCTGC	This study
	5-KO-NarP	caacgtacgtcaaacaataatgatctaataaaaacctcaggagactact GCGGCCGCATGAGACGTTGAT	This study
	3-KO-NarP	gcaggagagataaaaaagaggccgtatgtatgcacatggctattt GCGGCCGCTTCAATTCTGC	This study
	5-NarX	cggtgtctctccgtcacc	This study
	3-NarX	gggtatctccgttgacgtctg	This study
	5-up-NarX	ccgggtatgggtatacttcag	This study
	3-down-NarX	gttcatgcggcatatttag	This study
	5-NarP	cctgaagcaacgcctttcag	This study
	3-NarP	gcgcagtagattgcgaatatg	This study
5-up-NarP	5-up-NarP	gatgc当地aaagcgaacgacaa	This study
	3-down-NarP	ccttgaggcagcagcgattt	This study

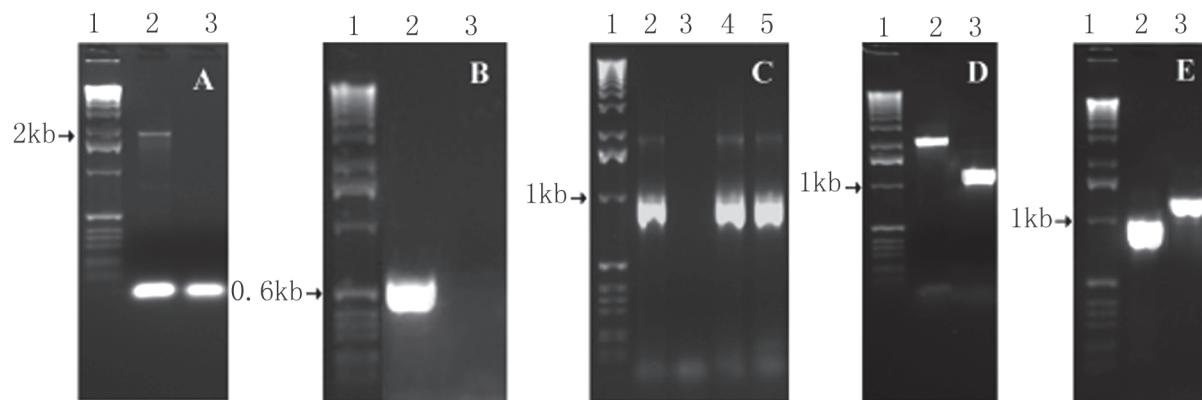


图 1 验证缺失株的电泳图

Fig. 1 PCR screening of colonies for replacement of *narX* with a CAM cassette

- A. Screening for *narX* deletion, sample has no amplified product indicating loss of *narX* (1 797 bp).  
1: marker; 2: ZAP198; 3: *narX* mutant.
- B. Screening for *narP*, sample did not generate a product of the expected size of 648 bp.  
1: marker; 2: ZAP198; 3: *narP* mutant.
- C. Screening for the CAM cassette.  
1: marker; 2: positive control, the expected size is 900 bp; 3: negative control; 4: *narX* mutant; 5: *narP* mutant.
- D. Screening across the *narX* region.  
1: marker; 2: ZAP198; 3: *narX* mutant, the PCR product was 897 bp smaller than ZAP198.
- E. Screening of colonies for outside of *narP*.  
1: marker; 2: ZAP198; 3: *narP* mutant, the PCR product was increased for 252 bp compared with ZAP198.

成的 A/E 损伤数表达(图 3)。经过 F 检验和 T 检验数据分析,结果显示 *narX* 缺失株在每个细胞上

的粘附数明显小于野生株( $P < 0.01$ )。

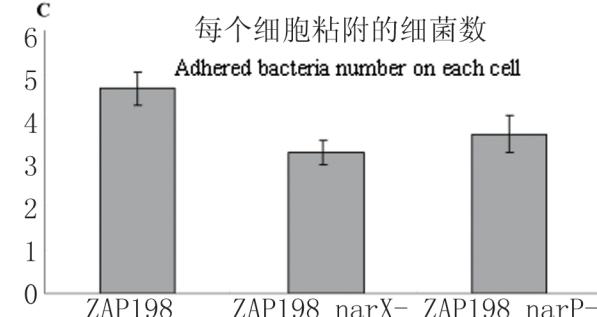
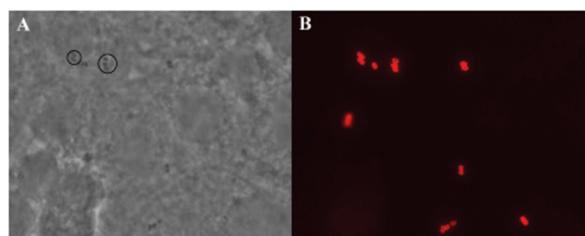


图 2 细胞粘附和抗 O157 抗体染色

Fig. 2 Cell binding assay

Following three hours incubation with EBL cells, bacteria was fixed and examined by microscope. A shows EBL cells with B for anti-O157 staining. Cell biding ability was decreased in both *narX* and *narP* mutant compared with wild type(C).

### 3 讨 论

本研究通过  $\lambda$  Red 重组技术,成功构建了 *narX* 和 *narP* 缺失株。此方法只需通过 PCR 产物和携带促进同位交换的 Red-gam 的质粒即可实现缺失株的构建,其优点是实验过程简易,时间短。但也存在必须导入抗生素片段来筛选缺失株的缺点,不利于缺失株的其他用途。近年来也有利用 PCR 产物<sup>[12]</sup>和  $\lambda$  Red 重组技术来构建缺失株的报道<sup>[13]</sup>,本研究在成功构建了两种缺失株后,对其野生株和缺失株的细胞粘附和 A/E 损伤进行了研究。

经过实验结果发现 *narX* 和 *narP* 缺失后对生长有一定影响,而其细胞粘附力均存在下降的趋势,形成 A/E 损伤的能力在 *narX* 缺失株中也有显著下降。大肠杆菌 EHEC 细胞的粘附和形成与 T3SS, 鞭毛和各种粘附因子密切相关。在细菌进入肠道初期,鞭毛的表达量很高,而当一旦细菌粘附于肠道以后,鞭毛的表达量下降, T3SS 随之开始分泌。而 A/E 的形成则是 T3SS 分泌效应蛋白进入宿主细胞的结果。LEE 所编码的 T3SS 是大肠杆菌的一个分泌和运输系统,在粘附后可以将细菌分泌的效应蛋白输入到宿主细胞内,从而引起肠道细胞

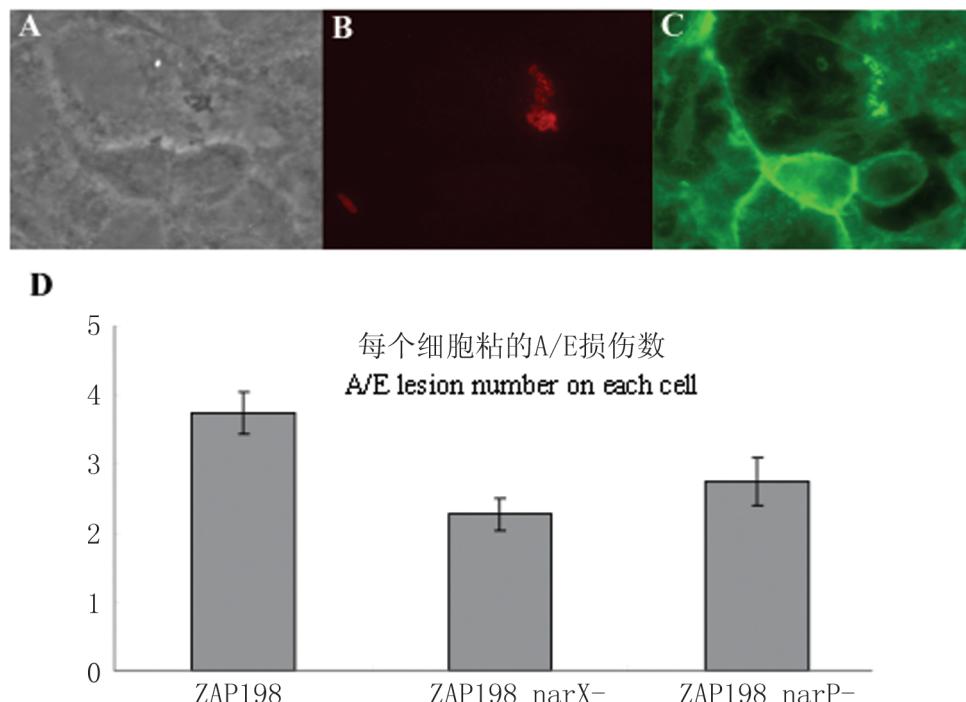


图 3 EBL 细胞中的 A/E 损伤实验

Fig. 3 A/E lesion formation by ZAP198 and defined respiration-associated mutants

After three hours incubation with EBL cells, bacteria was fixed, stained with anti-O157 antibody and TRITC-Phalloidin and examined by microscope. A shows EBL cells with B for anti-O157 staining. C shows TRITC-Phalloidin staining. A/E formation in *narX* mutant was decreased significantly compared with the wild type.

的 A/E 损伤。LEE 调控机制非常复杂,受到诸多调控因子以及环境因子的影响。由 LEE 编码的调控蛋白(Ler)是 LEE 的第一个基因,可以解除 HNS 蛋白的抑制作用,从而调控 T3SS 的表达<sup>[14]</sup>。而 ler 本身的表达又受 *grlA* 的正向调控和 *grlR* 的抑制作用,*GrlA* 和 *GrlR* 均由 LEE 编码<sup>[15]</sup>。另外,T3SS 还受到许多来自非 LEE 区域的染色体上基因的调控。比如 PerC 蛋白家族,*pch* 毗邻基因组区域和 QseA 调控蛋白。本研究中敲除的 *narX* 和 *narP* 基因预测也是通过与 *ler* 直接结合或者间接影响 *ler* 的方式对 T3SS 造成影响,从而导致在细胞中的 A/E 损伤的变化。本研究在成功获得了 *narX* 和 *narP* 缺失株后,对缺失株在细胞中的粘附及其形成 A/E 损伤的能力作了初步研究,以期找到一些其对致病性影响的线索找到一些线索。但更进一步的结论还需通过互补实验进一步证实,深入的作用机制还需要进一步的实验验证。

## 参考文献:

- [1] Stewart V. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1993, 9: 425-434. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01704.x
- [2] Chiang RC, Cavigchioli R, Gunsalus RP. Identification and characterisation of narQ, a second nitrate sensor for nitrate-dependent gene regulation in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1992, 6: 1913-1923. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01364.x
- [3] Gunsalus RP, Kalman LV, Stewart RS. Nucleotide sequence of the *narL* gene that is involved in global regulation of nitrate controlled respiratory genes of *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 1965-1975. DOI: 10.1093/nar/17.5.1965
- [4] Li J, Kustu S, Stewart V. *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fduG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12 [J]. Mol Biol, 1994, 241: 150-165. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1485
- [5] Rabin RS, Stewart V. Either of two functionally redundant sensor proteins, NarX and NarQ, is sufficient for nitrate regulation in *Escherichia coli* K-12 [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 8419-8423. DOI: 10.1073/pnas.89.18.8419
- [6] Rabin RS, Stewart V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12 [J]. Bacteriol, 1993, 175: 3259-3268.
- [7] Schroder I, Wolin CD, Cavigchioli RC, et al. Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli* [J]. Bacteriol, 1994, 176: 4985-4992.
- [8] Stewart V, Parales J, Merkel SM. Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12 [J]. Bacteriol, 1989, 171: 2229-2234.
- [9] Walker MS, DeMoss JA. Role of alternative promoter elements in transcription from the *nar* promoter of *Escherichia coli* [J]. Bacteriol, 1992, 174: 1119-1123.
- [10] Naylor SW, Low JC, Besser TE, et al. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host [J]. Infect Immun, 2003, 71: 1505-1512. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1505-1512.2003
- [11] Murphy KC, Campellone KG. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli* [J]. BMC Mol Biol, 2003, 4: 11. DOI: 10.1186/1471-2199-4-11
- [12] Pan H, Zhu SY, Cheng DR, et al. Knockout of the gene coding for Stx2e of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. J Yangzhou Univ (Agri Life Sci Ed), 2012, 33(1):1-5. (in Chinese)  
潘虹, 朱善元, 成大荣, 等. 产志贺毒素大肠杆菌毒素基因的敲除 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2012, 33(1):1-5.
- [13] Bai GX, Sun ZW, Huang Y, et al. Deletion of clpP in Chromosome of *E. coli* by Red recombination [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2005, 21(1):35-38. (in Chinese)  
白光兴, 孙志伟, 黄莺, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 35-38.
- [14] Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, et al. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression [J]. Mol Microbiol, 2001, 39: 664-678. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x
- [15] Deng W, Puente JL, Gruenheid S, et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 3597-3602. DOI: 10.1073/pnas.0400326101

收稿日期:2012-10-26;修回日期:2013-01-20