

采用 Red 重组系统敲除铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因

余 华,熊浚智,何晓梅,盛哈蕾,蔡文强,谢 玮,张克斌

摘要:目的 敲除铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因,获得无弹性蛋白酶活性的铜绿假单胞菌菌株。方法 采用 PCR 从 pKD46 质粒上扩增 λ 噬菌体的 Red 重组酶基因,并将其克隆到大肠杆菌和铜绿假单胞菌穿梭质粒 pUCP 多克隆位点上,电击转化铜绿假单胞菌 PAO1 感受态细胞,构建 PAO1/pUCP-Red 基因敲除体系。常规基因操作构建两端与弹性蛋白酶基因上、下游同源,中间为庆大霉素抗性基因的线性打靶片段;并将其电击转化 pUCP-Red/PAO1 感受态;采用庆大霉素和羧苄青霉素抗性平板初步筛选阳性重组菌;通过 PCR、RT-PCR 及弹性蛋白酶活性检测方法,鉴定菌株弹性蛋白酶基因的敲除情况。**结果** 本研究通过构建 Red 重组系统,获得了无弹性蛋白酶活性的铜绿假单胞菌菌株。**结论** 本研究成功敲除了铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因,所获无弹性蛋白酶活性的菌株将为系统深入研究弹性蛋白酶在铜绿假单胞菌致病性中的详细作用机理提供材料和基础。

关键词:铜绿假单胞菌;弹性蛋白酶;基因敲除;Red 重组系统

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0129-04

Generation of a *Pseudomonas aeruginosa* elastase gene targeted deletion mutant by Red recombination system

YU Hua, XIONG Jun-zhi, HE Xiao-mei, SHENG Ha-lei, CAI Wen-qiang, XIE Wei, ZHANG Ke-bin

(Medical Experiment and Technology Center, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT: The aim of this study is to obtain the elastase activity negative strain by knocking out the elastase gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Three genes of Red recombination system from λ phage were amplified and cloned into *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vector pUCP, and the pUCP-Red vector was transformed into PAO1 competent cells by electroporation. Then the recombinant DNA fragment which contains gentamycin antibiotic cassette flanked by two 80-bp homology sequences of elastase gene upstream and downstream locuses respectively was obtained by conventional cloning methods. And the fragment was electroporated into PAO1/pUCP-Red competent cells and screened on LB plate containing gentamycin and carbenicillin. The elastase gene knocked-out strain was verified by the methods of PCR, RT-PCR and enzyme activity assays. The elastase activity negative strain was successfully obtained in this study by using the Red recombination system. The elastase gene knocked-out strain obtained in this study provides the basis and materials for systemic study of pathogenicity mechanism of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; elastase; gene knock-out; Red recombination system

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970115)

Corresponding author: Zhang Ke-bin, Email: zhangkebin12@yahoo.com.cn

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa) 又称绿脓杆菌,是临床最常见的条件致病菌,具高度的环境适应力和耐药性。在烧伤、创伤、免疫缺陷、器官移植、肺囊性纤维化及一些医院感染病人中引

起严重感染。Pa 弹性蛋白酶(elastase, LasB)由 *lasB* 基因编码^[1],是其最主要的分泌型蛋白酶及毒力因子,与其致病性密切相关。目前对弹性蛋白酶在该菌侵袭力和致病性中的作用有一些研究^[2],但尚欠系统和深入。如果能获得无弹性蛋白酶活性的 Pa 菌株,将为更全面深入研究弹性蛋白酶在 Pa 中的致病机理,以及细菌与宿主相互关系等方面提供材料和基础。

国家自然科学基金(No. 30970115)资助

通讯作者:张克斌,Email: zhangkebin12@yahoo.com.cn

作者单位:第三军医大学附属新桥医院医学实验技术中心,重庆 400037

近年来发展起来的利用 λ 噬菌体 Red 重组酶的同源重组系统, 具有重组效率高、所需同源序列短、可定点进行基因敲除、敲入、点突变等操作的特点^[3]。目前, Red 重组酶系统已广泛应用于大肠杆菌、痢疾杆菌、沙门氏菌等细菌的基因修饰中^[4-5], 但现有的 Red 重组酶质粒(如 pKD46)所具有的温敏性复制子 oriR101 和 repA 不能在 *Pa* 中进行复制, 从而极大地限制了其在 *Pa* 基因修饰中的运用。然而含有 pRO1610 复制子的 pUCP 系列质粒, 可在 *Pa*、大肠杆菌及多种革兰氏阴性菌中稳定复制^[6]。为此, 本研究通过构建含有 Red 重组酶基因的穿梭质粒 pUCP-Red, 采用双臂同源重组法以获取敲除

lasB 基因的 *Pa* 菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 、*Pa* 野生株 (PAO1) 为本室保存。质粒 pJQ200SK 由第三军医大学微生物教研室李明博士惠赠; pKD46、pMD18T 和 pUCP 载体为本室保存。

1.2 主要试剂和仪器 DNA 限制性核酸内切酶购于 TaKaRa 公司; DNA 连接酶、聚合酶和荧光定量 PCR 酶购于 TOYOBO 核酸公司; 细菌基因组提取、胶回收和质粒提取试剂盒购于天根生物公司; 电转仪购于 Bio-Rad 公司。

1.3 实验所用 PCR 引物

表 1 实验所用 PCR 引物

Tab. 1 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence	Template	Restriction enzyme site
Red gene forward primer (RedFP)	5'-ggccaagcttattatgacaactgacggctac-3'	pKD46	Hind III
Red gene reverse primer (RedRP)	5'-ggcctctagattctctgctctgtttactactggt-3'	pKD46	Xba I
Front arm forward primer (FAFP)	5'-gctagaattccagaaagcgtgcaac-3'	PAO1 genome	EcoR I
Front arm reverse primer (FARP)	5'-tataggatccggcagctaggttgc-3'	PAO1 genome	BamH I
Gentamicin resistance gene forward primer (GMFP)	5'-tataggatccgctgctgcccaaggttgc-3'	pJQ200SK	BamH I
Gentamicin resistance gene reverse primer (GMRP)	5'-tatagtcgaccgatctcgcttgaacga-3'	pJQ200SK	Sal I
Back arm forward primer (BAFP)	5'-tatagtcgacactccaggaaggaatgccg-3'	PAO1 genome	Sal I
Back arm reverse primer (BARP)	5'-atgcaagcttacggccaagcgacata-3'	PAO1 genome	Hind III
Genome identification forward primer (JDFP)	5'-ggatggcattgccttcaac-3'	PAO1 genome	
Genome identification reverse primer (JDRP)	5'-caggctaagaggctcgaac-3'	PAO1 genome	
Transcription forward primer (RTFP)	5'-cgctgccccgaccaacacctaca-3'	<i>lasB</i> gene	
Transcription reverse primer (RTRP)	5'-cgccgctgcgcaagagcatc-3'	<i>lasB</i> gene	

1.4 实验步骤

1.4.1 PAO1/pUCP-Red 基因敲除体系构建

1.4.1.1 pUCP-Red 质粒构建 设计特异性 PCR 引物, 见表 1。从 pKD46 上扩增 Red 重组酶基因(含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因)。通过常规的酶切、连接、转化等基因操作方法构建 DH5 α /pUCP-Red 重组菌。

1.4.1.2 PAO1/pUCP-Red 菌株的构建及筛选 挑取 PAO1 单菌落接种于 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养后, 按 1:100 转接 LB 培养基, 37 °C 220 r/min 快速振荡 3 h (OD₆₀₀ 约为 0.4~0.5)。离心收集菌体沉淀并用 10% 甘油洗涤 4 次, 按每 100 mL 培养所得菌体加入 100 μ L 10% 甘油重悬, 制备电转感受态细胞。取 1 μ g pUCP-Red 质粒电击转化 PAO1 感受态细胞, 电击条件 25 μ F、200 Ω 、2.5 kV。电击后菌液立即转入 LB 培养基中, 180 r/min 振荡 2 h 后, 涂布含有羧苄青霉素 (300 μ g/mL) 的 LB 平板, 37 °C 培养 24 h~48 h 挑取单菌落, 采用 PCR 鉴定质粒是否成功转化(引物见表 1)。

1.4.2 PAO1 *lasB* 基因敲除株的构建

1.4.2.1 线性打靶片段的制备 线性打靶片段的构建参照

文献进行^[7]。打靶片段前臂、后臂 (*lasB* 基因编码区上游或下游) 和庆大霉素抗性基因引物, 见表 1。

1.4.2.2 PAO1/pUCP-Red 电转感受态的制备 PAO1/pUCP-Red 感受态的制备参照上述感受态制备方法和文献^[7]进行。

1.4.2.3 *lasB* 基因敲除株的筛选 从羧苄青霉素 (300 μ g/mL) 和庆大霉素 (200 μ g/mL) 双抗性平板上挑取单菌落经培养后, 提取基因组 DNA, 通过 PCR 鉴定(引物见表 1), 筛选发生正确重组的 *lasB* 基因敲除株。

1.4.3 *lasB* 基因敲除株的鉴定

1.4.3.1 *lasB* 基因转录情况鉴定 常规 LB 培养细菌后, 提取其总 RNA 并反转录为 cDNA, 方法按试剂盒说明书进行。以 cDNA 为模板 PCR 扩增 *lasB* 基因, 检测该基因的 mRNA 转录情况, 引物见表 1。

1.4.3.2 弹性蛋白酶活性测定 通过牛奶平板法, 检测 *lasB* 基因敲除株弹性蛋白酶活性, 方法参照文献进行^[8]。

2 结果

2.1 pUCP-Red 质粒的构建 采用 RedFP 和 Re-

dRP 引物成功扩增了分子量约为 3 400 bp 的 Red 重组酶基因(包括 *exo*、*beta*、*gam3* 个基因)。pUCP-Red 质粒经 PCR 和测序鉴定,所构建的 *red* 基因核酸序列与理论序列完全一致,PCR 结果见图 1。

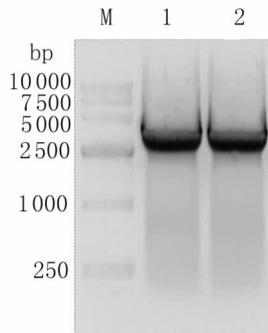


图 1 重组质粒 pUCP-Red 中 *red* 基因的 PCR 鉴定

M:DL15000 Marker;1, 2:*red* 基因 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR analysis of *red* gene cloned into vector pUCP-Red

M: DL15000 Marker; 1, 2: PCR amplification results of *red* gene

2.2 线性打靶片段的制备 以 PAO1 基因组 DNA 为模板,分别扩增出两端与 *lasB* 基因上下游序列同源的 80 bp 前臂和后臂;以 pJQ200SK 质粒为模板,扩增了 835 bp 的庆大霉素抗性基因。通过 FAFP 和 BARP 引物,可扩增全长约为 1 000 bp 的线性打靶片段,如图 2 所示,且经进一步测序鉴定,线性打靶序列与理论序列完全一致。

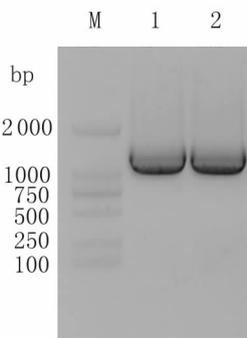


图 2 线性打靶片段的 PCR 鉴定

M:DL15000 Marker;1, 2:线性打靶片段的 PCR 鉴定结果(FAFP 和 BARP 引物鉴定)

Fig. 2 PCR analysis of recombinant DNA fragment used for knocking out the *lasB* gene of PAO1

M: DL15000 Marker; 1, 2: PCR amplification results of recombinant DNA fragment (amplified by FAFP and BARP primers)

2.3 *lasB* 基因敲除株的 PCR 鉴定 若未发生同源重组的菌株,通过敲除基因外侧引物 JDFP 和 JDRP(上下游引物分别位于 *lasB* 基因-431~-413 和+181~+199)可从 PAO1 基因组 DNA 上扩增

出约 2 130 bp 的 *lasB* 基因及基因组序列;而发生正确重组的 *lasB* 基因敲除株则可扩增出约 1 300 bp 的线性打靶片段和部分基因组序列。通过 JDFP 和 JDRP 引物 PCR 鉴定可见,对照组 PAO1、PAO1/pUCP-Red 菌株和发生正确重组的 *lasB* 基因敲除株均扩增出了与理论相符的 DNA 序列长度。此外,通过线性打靶基因的前臂上引和后臂下引扩增出了约 1 000 bp 的打靶基因 DNA 序列,从而从分子水平上证明 *lasB* 基因成功敲除,结果见图 3。

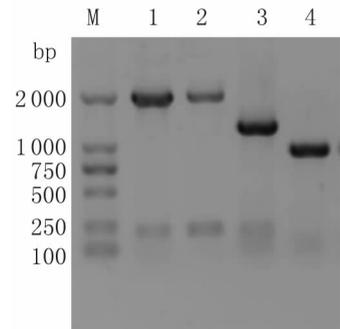


图 3 *lasB* 基因敲除株 PCR 鉴定

M:DL2000 Marker;1: PAO1 野生株(JDFP 和 JDRP 引物鉴定);2 : PAO1/pUCP-Red(JDFP 和 JDRP 引物鉴定);3:*lasB* 基因敲除株(JDFP 和 JDRP 引物鉴定);4:*lasB* 基因敲除株(FAFP 和 BARP 引物鉴定)

Fig. 3 PCR results of PAO1 knocked out of *lasB* gene

M: DL2000 Marker; 1: PAO1 wild type (amplified by JDFP and JDRP primers); 2: PAO1/pUCP-Red (amplified by JDFP and JDRP primers); 3: *lasB* gene knocked-out strain (amplified by JDFP and JDRP primers); 4: *lasB* gene knocked-out strain (amplified by FAFP and BARP primers)

2.4 阳性重组菌弹性蛋白酶基因转录情况 通过 RT-PCR 法鉴定阳性重组菌中弹性蛋白酶转录情况,未发现弹性蛋白酶基因的 mRNA 的转录。结果见图 4。

2.5 *lasB* 基因敲除株的弹性蛋白酶检测 弹性蛋白酶能够降解牛奶平板中的酪蛋白形成透明环,因此,利用牛奶平板可直观的检测菌株弹性蛋白酶的分泌情况。与 PAO1 野生株相比,*lasB* 基因敲除株细菌培养液中未检测到弹性蛋白酶活性,结果见图 5。

3 讨论

Pa 弹性蛋白酶是其最为重要的致病因子之一,它可降解宿主细胞基质分子、各种胶原、肺上皮细胞表面活性蛋白 A 和 D^[9],其降解产物可抑制内源性抗菌物质和其它抗菌肽活性^[10]。这些研究揭示了弹性蛋白酶在 *Pa* 致病性方面的重要性,但其对 *Pa*

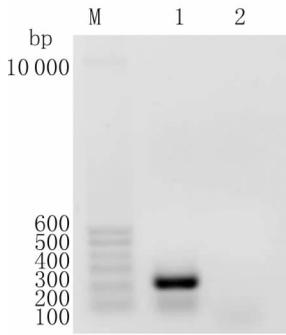


图 4 弹性蛋白酶编码区 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图
M: Markers; 1: PAO1 株弹性蛋白酶编码区 mRNA 的 RT-PCR 产物; 2: *lasB* 基因敲除株弹性蛋白酶编码区 mRNA 的 RT-PCR 产物

Fig. 4 RT-PCR products of elastase mRNA

M: Markers; Line 1: RT-PCR products of elastase mRNA of PAO1; Line 2: RT-PCR products of elastase mRNA of *lasB* gene knocked-out strain

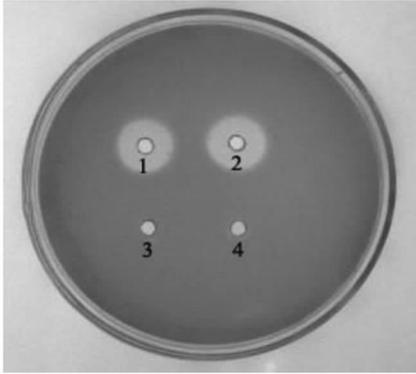


图 5 平板法检测弹性蛋白酶活性检测图
孔 1、2: PAO1 菌液 10^4 /mL \times 50μ L \times 10 hrs; 孔 3、4: 阳性重组菌菌液 10^4 /mL \times 50μ L \times 10 hrs

Fig. 5 Elastase activity measurement by milk plate method

Hole 1 and 2: Bacteria culture of PAO1 (10^4 /mL \times 50μ L \times 10 hrs); Hole 3 and 4: Bacteria culture of *lasB* gene knocked-out strain (10^4 /mL \times 50μ L \times 10 hrs)

自身代谢有何影响? 缺乏弹性蛋白酶的 *Pa* 对宿主整体的致病性有何不同? 目前对这些方面尚缺乏系统深入的研究。因此, 本研究以获得无弹性蛋白酶活性的 *Pa* 菌株, 为进一步研究弹性蛋白酶的致病机理奠定基础。

λ 噬菌体的 Red 重组体系由 *exo*、*beta* 和 *gam* 3 个基因组成, 分别编码 Exo、Beta 和 Gam 三种酶, 其中 Exo 蛋白是一种核酸外切酶, 可结合于双链 DNA 的末端, 从 5' 端向 3' 端降解 DNA, 产生 3' 突出端; Beta 蛋白可结合在单链 DNA 上, 介导互补单链 DNA 退火, 从而有利于线性片段与同源区发生重组置换; Gam 蛋白可与细菌体内 RecBCD 酶结合抑制其核酸外切酶 V 活性, 从而抑制外源 DNA 的降

解^[11-12]。采用 Red 重组系统进行双臂同源重组的基因敲除, 其效率较传统的依赖于细菌体内固有的同源重组机制发生的重组高几十倍^[13]。同时, 在构建好线性打靶片段后, 从转化到筛选获得阳性重组子, 仅需 2 d 时间, 运用该系统进行基因敲除, 具有很高时效性。

文献报道及我们的实验表明, Red 重组系统的重组效率与双臂同源片段的长度有明显相关性, 同源片段越长, 重组效率越高。文献报道所需同源臂长为 50~100 bp 即可满足重组需求, 本研究采用的上、下臂同源片段长度为 80 bp, 获得了较高的重组效率(约 80%), 而采用该系统进行另一 PAO1 基因组 DNA 片段定点插入实验时, 双臂长度选择了 400 bp, 其重组效率可达 100%。

此外, 由于 *Pa* 在液体培养中极易分泌胞外粘性物质(Extracellular polymeric substances, EPS), 影响其感受态的制备及电转化效率。因此在制备感受态时, 为了保证 L-阿拉伯糖能充分诱导 Red 重组酶的表达且保持较低的菌液粘性物质, 在菌液刚出现浑浊(OD_{600} 约为 0.1)时, 即可加入 L-阿拉伯糖进行诱导, 观察菌液及时终止诱导并制备感受态(一般 1~3h)。

本实验通过打靶片段电击转化, 经 1% L-阿拉伯糖诱导表达了 Red 重组酶的 PAO1/pUCP-Red 感受态细胞, 成功筛选到了 PAO1 的 *lasB* 基因敲除株, 表明该 Red 重组体系可有效的运用于 *Pa* 的基因修饰。

同时, 因 pUCP 质粒能在如大肠杆菌等多种革兰氏阴性菌中进行复制, 本研究所构建的 pUCP-Red 质粒还可用于这些菌株的基因敲除、定点突变、基因敲入等多种基因修饰中, 但其效果仍需进一步实验证明。

参考文献:

- [1] Stover C, Pham X, Erwin A, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen [J]. *Nature*, 2000, 406 (6799): 959-964. DOI: 10.1038/35023079
- [2] Leduc D, Beaufort N, De Bentzmann S, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloproteinase regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis [J]. *Infect Immun*, 2007, 75 (8): 3848-3858. DOI: 10.1128/IAI.00015-07
- [3] Isaacs FJ, Carr PA, Wang HH, et al. Precise manipulation of chromosomes *in vivo* enables genome-wide codon replacement [J]. *Science*, 2011, 333 (6040): 348-353. DOI: 10.1126/science.1205822