

沙门氏菌中 *dnd* 基因簇的缺失与异源表达

徐铁刚 姚 芬 周秀芬 由德林* 邓子新*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

摘 要: 沙门氏菌 *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 是一株从鸡场分离到的菌株, 其DNA骨架上的磷硫酰化导致了在高压脉冲电泳过程中DNA降解(DNA degradation, Dnd表型)。本研究采用 *SacB* 所介导的负筛选系统, 在该菌株中成功缺失了 *dnd* 基因簇, 构建了突变株XTG103, 该突变株不再具有Dnd表型。通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导启动子 P_{lacZ} 的转录可以调控DNA磷硫酰化修饰的 *dnd* 基因簇的异源表达。

关键词: 沙门氏菌, DNA 磷硫酰化, DNA 降解, 基因缺失

Deletion of *dnd* Gene Cluster in *Salmonella enterica* and Heterogenous Expression

XU Tie-Gang YAO Fen ZHOU Xiu-Fen YOU De-Lin* DENG Zi-Xin*

(School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: *Salmonella enterica* serovar Cerro 87, which was isolated from a commercial egg-producing farm, has a phosphorothioated DNA backbone resulting DNA degradation(Dnd) during the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) process. In this research, a gene deletion mutant XTG103 was engineered with the entire *dnd* gene cluster knocked out by double crossover using vector pKOV-kan, and lost Dnd phenotype correspondingly. We regulated the DNA phosphorothioation by heterogenous expression of *dnd* gene cluster with an isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducible promoter P_{lacZ} .

Keywords: *Salmonella*, DNA Phosphorothioation, DNA degradation, Gene deletion

DNA磷硫酰化修饰的研究始于上世纪八十年代初, 在革兰氏阳性细菌变铅青链霉菌的总DNA长时间电泳时DNA发生降解。研究发现, 这种降解现象并不是由于DNA在提取过程中遭到物理损伤, 或污染了具有核酸切割活性的抗生素, 或遭到某些内切核酸酶的切割作用所造成, 而是因为异常修饰的DNA在电泳过程中发生的降解^[1,2]。我们通常使用的DNA电泳缓冲液是由Tris、EDTA和乙酸配制而成,

电泳过程中在阳极积累的Tris过酸衍生物与这种特殊的DNA产生了一种化学切割反应, 从而导致了DNA的降解。Tris过酸衍生物的切割活性可以被还原剂硫脲有效的抑制, 因此用HEPES或者MOPS缓冲液代替Tris缓冲液或者在Tris缓冲液中加入一定量的硫脲可以避免电泳过程中的DNA降解现象^[3,4]。进一步研究发现, 这种修饰是一种位点特异性的复制后修饰^[5-7]。在变铅青链霉菌中找到了控制

这种修饰的 8.3 kb *dnd* 基因簇, 通过同位素喂养发现了 DNA 里面含有硫修饰, 这种硫修饰 DNA 广泛存在于许多微生物中^[8,9]。

沙门氏菌, 属于肠杆菌科, 革兰氏阴性, 广泛存在于各种动物及其环境之中, 是导致人畜共患疾病的病原菌, 经常在欧美、日本及我国发生。沙门氏菌属的分类主要以抗原结构为依据, 经鉴定已发现 2000 多个血清型。在不同国家和地区的十几个血清型的一百多个菌株里面存在一种高压脉冲电泳 (PFGE) 分型时降解的现象, 在 *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 菌株中发现了类似于变铅青链霉菌的 *dnd* 基因簇, 该基因簇从基因组文库 Fosmid 质粒 6G12 克隆到载体 pBluescript II SK(+)^[10] 后得到质粒 pJTU1238, 该质粒能够在 *E. coli* DH5 α 里面表达并赋予该菌株 Dnd 表型, 最近的研究发现这种修饰是 DNA 骨架上发生了磷硫酰化^[11,12] (图 1)。

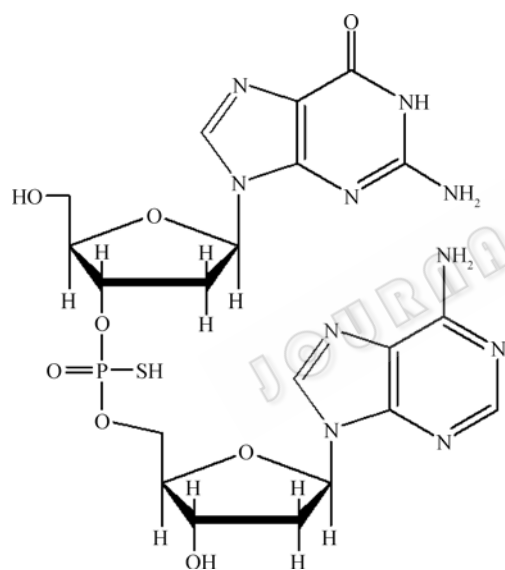


图 1 DNA 磷硫酰化修饰的结构

Fig. 1 The structure of DNA phosphorothioation modification

基因中断 (Gene disruption) 技术为研究基因的功能提供了有力工具。当把待研究的基因缺失后, 观察菌体在不同条件下表型的变化, 就可以得到关于该基因生物功能的重要信息。一种依赖于 *E. coli* 中的同源重组和源于 *Bacillus amyloliquefaciens* 的转果聚糖蔗糖转移酶基因 (*SacB*) 的负筛选系统可以在细菌人工染色体上成功进行点突变^[13]。质粒 pKOV-kan 含有温度敏感型复制子, 卡那霉素和氯霉素抗性基因作为筛选标记, *SacB* 基因在蔗糖存在

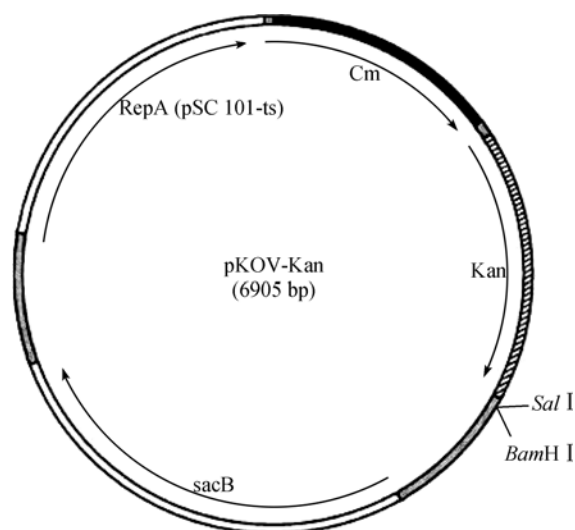


图 2 质粒 pKOV-kan

Fig. 2 The structure of plasmid pKOV-kan

的情况下作为负筛选标记, *BamH* 和 *Sal* 单酶切位点克隆同源重组所需的外源片段 (图 2)。

本研究应用 pKOV-kan 在非工程菌株的沙门氏菌上成功的构建了 *dnd* 基因缺失的突变株 XTG103。在 *E. coli* DH5 α 异源表达时, 通过 IPTG 诱导的 *P_{lac}* 对 Dnd 表型进行一定程度的调控。为进一步研究 DNA 磷硫酰化修饰建立了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 沙门氏菌 *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 由日本 Tottori 大学 Toshiyuki Murase 教授惠赠, 质粒 pKOV-kan 由英国 Birmingham 大学 Maria D. Lalioti 教授惠赠。大肠杆菌 DH5 α ^[14] 和质粒 pUC18^[15] 由本实验室保存。

1.1.2 培养基与试剂: LA (胰蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0, 1.5% 的琼脂粉) 用于细菌的平板培养。SOB (胰化蛋白胨 20 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 0.5 g, 10 mL 250 mmol/L KCl, pH 7.0 该溶液在使用前, 加入 5 mL 灭菌的 2 mol/L MgCl₂) 用于培养细菌感受态细胞。SOC (SOB 培养基含有 20 mmol/L 葡萄糖) 用于质粒电转化。10% 甘油用于制备感受态细胞。KOD 聚合酶, 限制性内切酶和 DNA 连接酶购自 MBI 公司, 寡聚核苷酸引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 质粒测序由 Invitrogen 生物技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Cerro 87)感受态的制备: 在LB平板上划线活化冻存的沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Cerro 87)后,挑取单克隆接种到 5 mL的SOB培养基 37°C培养过夜。过夜培养的种子菌以 1:100 的稀释比率加入到 250 mL新鲜的SOB培养基中继续培养。当菌体浓度达到 OD_{600} 值为 0.4 左右时终止培养并置于冰上预冷 30 min, 然后用Sorvall离心机 4°C以 8000 r/min速度离心 10 min收集菌体。倒掉上清培养基, 菌体沉淀加入 100 mL预冷的 10%甘油用振荡器剧烈振荡充分混匀洗涤后离心 10 min倒掉上清。重复洗涤细胞 3 次后倒掉上清, 用残留的余液悬浮沉淀的菌体得到浓度大约是 $OD_{600}=1.00$ 的感受态细胞, 并以每管 60 μ L分装后于-70°C冻存备用。

1.2.2 双交换的质粒的构建: 重叠延伸PCR (Overlap extension PCR)的方法构建同源交换臂。首先第一轮PCR反应, 使用引入 *Xho* 位点(左交换臂内部有 *Sal* 酶切位点, 引入 *Sal* 的同尾酶 *Xho* 酶切位点)的引物 pLL (5'-GAC CTCTGAG TTGG TTTTCAATA-3', 下划线部分为酶切位点)和 pLR (5'-ATTCGTAAATTGCCATGTAGTTGGCGTTGCTGCG TGGTTA-3')用PCR的方法扩增出 752 bp 的交换臂的左臂, 引物 pRL (5'-TAACCACGCAGCAACGCC AACTACATGGCAATTTACGAAT-3')和引入 *Bam*H 酶切位点的 pRR (5'-AACGGATCCCACTCTGCTT ATC-3', 下划线部分为酶切位点)扩增出 649 bp 的同源交换臂的右臂。引物 pLR 和 pRL 是相同 40 bp DNA区间的正反两条互补链, 因此两个PCR产物含有相同的 40 bp 重叠区间。然后将第 1 次 PCR 的 2

个产物通过胶回收纯化后以适当比例混合做为模板, 进行第 2 轮 PCR 反应, 退火时 2 个片段的 40 bp 重叠区间配对结合, 聚合酶延伸就得到了两个片段互补延伸起来的 1361 bp 的产物, 再使用 pLL 和 pRR 扩增得到了连在一起的同源交换臂。将 PCR 产物用 *Bam*H 和 *Xho* 酶切并纯化后连接到 *Bam*H 和 *Sal* 酶切并纯化的载体 pKOV-kan 上, 得到构建突变株所用的质粒 pJTU3830。

1.2.3 *dnd* 调控表达质粒的构建: 用 *Pvu* II 酶切含有 *dnd* 完整基因的 Fosmid 质粒 6G12 后, 乙醇沉淀纯化回收后再用 *Sca* 酶切, 凝胶回收 5.5 kb 的片段, 连接到 *Sma* 酶切并纯化回收后的 pUC18 上, 得到插入片段方向相反的两个质粒 pJTU2489 和 pJTU2490。

2 结果

2.1 *dnd* 基因簇的缺失

将质粒 pJTU3830 转化沙门氏菌的感受态细胞, 在含有氯霉素或者卡那霉素的抗性 LB 平板上 30°C 培养筛选转化子。含有质粒 pJTU3830 的克隆在 43°C 的氯霉素抗性平板上划线培养筛选发生第 1 次同源重组的克隆, 因游离的质粒不能在 43°C 复制而丢失。在这次同源重组中, 质粒 pJTU3830 被整合到染色体上, 使得同源重组的菌株具有氯霉素或者卡那霉素抗性。左臂和右臂的同源重组分别使用引物 p1 (5'-TTCTGATATGAATAAACCCG-3') 和 p2 (5'-ATATGTCTCGGAAAGAAAGG-3') PCR 扩增出 853 bp 的条带; p3 (5'-AAACCATGCCAACATGCGTC-3') 和 p4 (5'-CCATTATGCGTTATGCGGTA-3') PCR 扩增出 1065 bp 的条带(图 3)。

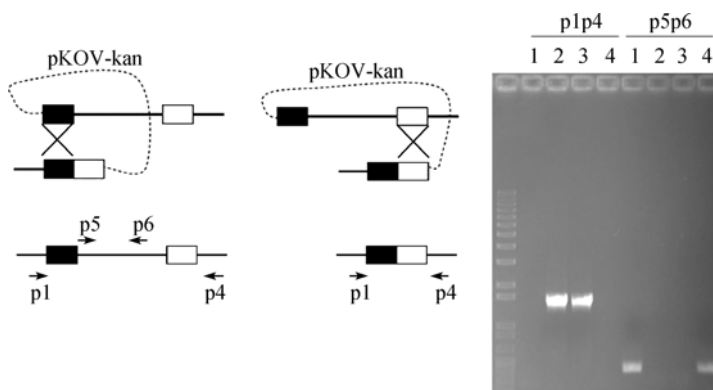


图 3 质粒整合进染色体及 PCR 验证

Fig. 3 The integration of the plasmid into the chromosome and PCR analysis

注: 1 和 3 克隆是在左臂同源重组整合; 2 和 4 克隆是在右臂同源重组整合。

Note: 1 and 3 are recombinations on left arm; 2 and 4 are recombinations on left arm.

选择一个左臂发生同源重组的克隆在非抗性 LB 培养基里 43°C 松弛培养进行第 2 次重组, 第 2 次同源重组后染色体或者恢复成为原始的野生型状态, 或者是我们构建的缺失状态, 重组环出的质粒在 43°C 丢失。由于 *SacB* 基因产物在蔗糖存在的情况下阻止细胞生长的性质, 染色体上含有已整合 pJTU3830 的细菌不能在蔗糖培养基上生长。发生第 2 次重组的重组子中, 有一半恢复为野生型, 有一半重组为交换株。第 2 次重组的筛选条件与文献报道的大肠杆菌的 5% 蔗糖浓度不同, 含 10%~15% 的蔗糖的非抗性 LA 适用于本实验中沙门氏菌株筛选。较低的蔗糖浓度会有许多整合型的假阳性

菌株存在。过高的蔗糖浓度则抑制了正常菌株的生长。通过引物 p1 和 p4 进行 PCR 筛选突变株, 双交换的突变菌株 XTG103 会产生 1560 bp 的条带, 野生型由于引物结合位置距离大于 15 kb, 不会扩增出产物, 同样使用引物 p5(5'-CAGGCAGGTCGCCCTTTCTA-3') 和 p6(5'-CGATGCTGACCGTCGTTGAT-3') PCR 进一步确定突变株, 它们可以在野生型 *dnd* 基因簇上扩增出一条 296 bp 的条带, 在突变株 XTG103 中因为该基因簇的缺失而无法扩增出相应条带(图 4)。

对 XTG103 进行 PFGE 分析发现该突变菌株丧失了 Dnd 表型(图 5)。

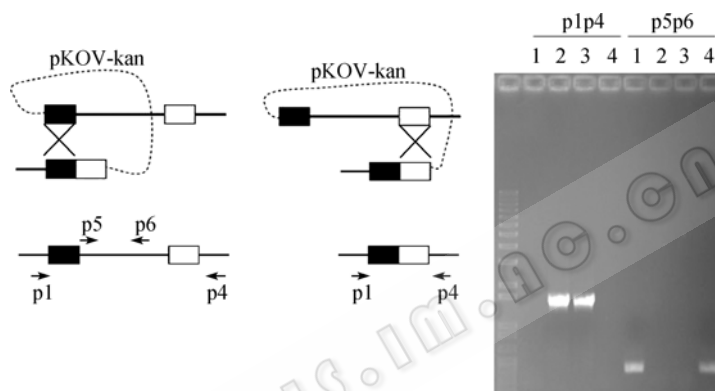


图 4 整合质粒的环出及 PCR 验证

Fig. 4 The resolution of the integrant and PCR analysis

注: 1 和 4 克隆是重组环出得到野生型; 2 和 3 克隆重组环出后得到突变株。

Note: 1 and 4 are original wild type strains; 2 and 3 are mutants.

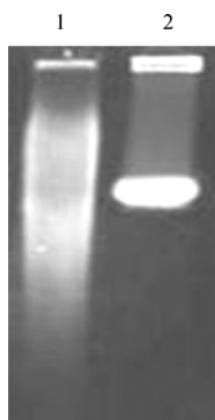


图 5 *dnd* 基因簇缺失突变株 XTG103 的 Dnd 表型

Fig. 5 The Dnd phenotype of mutant XTG103

注: 1: 野生型菌株 *Salmonella enterica* serovar Cerro 87; 2: 突变菌株 XTG103 的总 DNA。

Note: 1: Wild type strain *Salmonella enterica* serovar Cerro 87; 2: Mutant XTG103.

2.2 *dnd* 基因簇的表达调控

dnd 基因簇有自己的启动子 P_{dnd} , 当它被克隆到 pUC18 时, 可以转录表达。pUC18 上面有受 IPTG 诱导的强启动子 P_{lac} , 当我们诱导其进行转录时, 它会转录出大量的 RNA。在 pJTU2489 中 *dnd* 基因簇的插入方向和 *lacZ* 方向相同, 因而会转录出大量的携带 *dnd* 基因的 mRNA, 而在 pJTU2490 中 *dnd* 基因簇的插入方向和 *lacZ* 方向相反, 转录从两个方向开始, 并且会大量转录 *dnd* 基因簇的反义链, *dnd* 基因簇转录受到抑制, 而大量的转录出的反义链也可能和 *dnd* 基因簇的 mRNA 配对形成双链而影响其蛋白翻译。因此在 IPTG 的诱导下可以分别用来加强和抑制 *dnd* 基因的表达(图 6)。

经 PFGE 分析, *dnd* 基因簇的诱导加强表达比诱导抑制表达会使磷硫酰化加强, 进而更多的 DNA 被

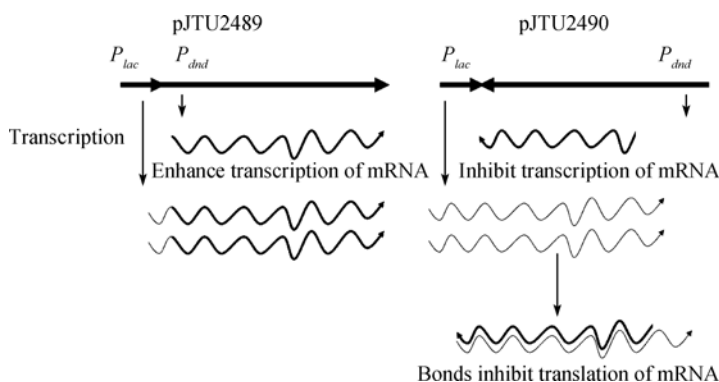
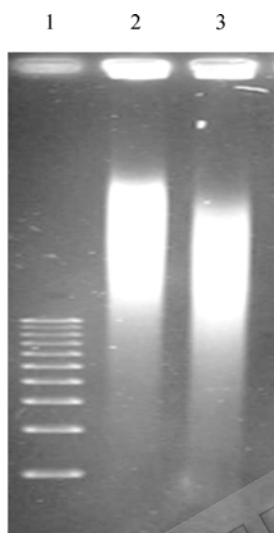
图6 *dnd* 基因簇的表达调控Fig. 6 The regulation of *dnd* gene cluster expression

图7 DNA 磷硫酰化水平的调控

Fig. 7 The regulation of DNA phosphorothioation

注: 1: 标准分子量; 2: *E. coli*(pJTU2489); 3: *E. coli*(pJTU2490).Note: 1: Marker; 2: *E. coli*(pJTU2489); 3: *E. coli*(pJTU2490).

磷硫酰化, 所以电泳时产生更小的降解片段(图7)。

3 讨论

DNA磷硫酰化开辟了一个新的领域^[16], 沙门氏菌中*dnd*基因簇的缺失, 使得我们可以研究这个基因簇的生物学意义。在遗传背景非常清楚的*E. coli* DH5 α 中调控表达该基因簇, 根据它赋予新宿主的功, 同样可以研究这个基因簇的生物学意义。磷硫酰化的DNA可能含有重要的医用价值, 医学上用体外合成的磷硫酰化核酸类物质来抗肿瘤或者抗病毒。来自于生物体内天然的磷硫酰化DNA也有可能应用在不同领域, 从而降低体外化学合成磷硫酰化DNA的成本。

目前, 已经完成了不同血清型的6个沙门氏菌的全基因组测序工作, 并且将完成更多沙门氏菌的全基因组测序。测序结果揭示4000多个开放读框中有许多功能未知的基因。如何确定这些基因的功能将是这一领域的研究者们面临的主要问题。许多临床的沙门氏菌有着各种各样的生物现象也需要我们去研究。基因中断技术使得我们能够清楚的研究这些基因的功能, 但是临床分离到的菌株一般都很难进行遗传操作, 本研究提供了一套临床菌株上进行基因缺失操作的方法。我们也尝试了使用RED系统, 经过PCR扩增出带选择性标记的两个同源臂后来缺失基因簇, 但是没有成功。RED系统必须依赖于非常高效的重组酶活性^[17], 首先, PCR产物转化细菌后, 由于体内外切核酸酶的切割作用, PCR片段两端的同源重组部分易被分解而降低重组活性; 其次, 由于PCR不可能合成大的片段而造成的同源臂很短, 不能有效地发生同源重组; 最后, 两次同源重组必须同时发生, 如果只发生一次, 那么染色体被线性化后无法分裂复制。而*SacB*系统因为是构建在质粒上面, 共价闭合环形的质粒更容易进入细菌体内, 同源交换臂可以做的比较长, 使得同源重组更容易, 我们通过可筛选的先后两次重组事件就缺失掉了*dnd*基因簇。应用同样的原理, *SacB*所介导的重组系统还可以在染色体上构建点突变, 这将有助于我们研究某一个蛋白的活性位点、关键氨基酸残基的作用。在以操纵子形式共同转录的多个基因里面同框缺失上游基因而不影响下游基因的表达。另外还可以把我们感兴趣的基因整合到宿主的染色体上去, 使得它们能够稳定存在并且表达, 不必像游离质粒一样必须用抗生素来维持它的存在, 而且表达量恒定, 不会随着质粒载体的拷贝数发生变化。

参 考 文 献

- [1] Zhou X, Deng Z, Firmin JL, *et al.* Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 4341–4352.
- [2] Evans M, Kaczmarek FS, Stutzman-Engwall K, *et al.* Characterization of a *Streptomyces-lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology*, 1994, **140**(Pt 6): 1367–1371.
- [3] Ray T, Weaden J, Dyson P. Tris-dependent site-specific cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **75**: 247–252.
- [4] Ray T, Mills A, Dyson P. Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, **16**: 888–894.
- [5] Boybek A, Ray TD, Evans MC, *et al.* Novel site-specific DNA modification in *Streptomyces*: analysis of preferred intragenic modification sites present in a 5.7 kb amplified DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 3364–3371.
- [6] Dyson P, Evans M. Novel post-replicative DNA modification in *Streptomyces*: analysis of the preferred modification site of plasmid pIJ101. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 1248–1253.
- [7] Liang J, Wang Z, He X, *et al.* DNA modification by sulfur: analysis of the sequence recognition specificity surrounding the modification sites. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**: 2944–2954.
- [8] Zhou X, He X, Liang J, *et al.* A novel DNA modification by sulphur. *Mol Microbiol*, 2005, **57**: 1428–1438.
- [9] He XY, Ou HY, Yu Q, *et al.* Analysis of a genomic island housing genes for DNA S-modification system in *Streptomyces lividans* 66 and its counterparts in other distantly related bacteria. *Mol Microbiol*, 2007, **65**: 1034–1048.
- [10] Altling-Mees MA, Short. JM. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 9494.
- [11] Wang L, Chen S, Xu T, *et al.* Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**: 709–710.
- [12] Eckstein F. Phosphorothioation of DNA in bacteria. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**: 689–690.
- [13] Lalioti M, Heath J. A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: E14.
- [14] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, **166**: 557–580.
- [15] Yanisch-Perron CJ, Vieira, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, **33**: 103–119.
- [16] 邓子新. DNA 分子上的磷硫酰化——一个新领域的诞生. *中国基础科学*, 2008, **10**(2): 17–19.
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6640–6645.

栏目介绍

生 物 实 验 室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度,深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果,交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室,以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。