

驱除痢疾杆菌侵袭大质粒的新方法

冯尔玲 廖翔 王恒樑 史兆兴 苏国富 黄留玉*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要: 用质粒不相容性原理驱除痢疾杆菌福氏 2a 2457T 和宋内 S7 的侵袭大质粒, 先从福氏 2a 侵袭大质粒分别扩增 *ori* 和 *inc* 基因, 将它们克隆至 pMD18-T 载体, 得重组质粒 pMDori 和 pMDinc, 然后转化 2457T 和 S7, 不管是 pMDori 还是 pMDinc 都能竞争驱除痢疾杆菌福氏 2a 2457T 和宋内 S7 的侵袭大质粒。

关键词: 痢疾杆菌; 侵袭大质粒; 质粒不相容性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0069-05

THE REMOVAL OF LARGE INVASIVE PLASMIDS FROM *SHIGELLA SPECIES*

FENG Er-Ling LIAO Xiang WANG Heng-Liang SHI Zhao-Xing SU Guo-Fu HUANG Liu-Yu

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract: In order to remove invasive plasmids from *Shigella flexneri* 2a 2457T and *Shigella sonnei* S7 based on the principle of plasmid incompatibility. *ori* and *inc* genes were amplified by PCR from *S. flexneri* 2a invasive plasmids, and then they were cloned into plasmid pMD18-T, resulting recombinant plasmids pMDori and pMDinc. After *S. flexneri* 2a 2457T and *S. sonnei* S7 were transformed with pMDori or pMDinc respectively. Invasive plasmids were removed from *S. flexneri* 2a 2457T and *S. sonnei* S7.

Key words: *Shigella species*, Invasive plasmid, Incompatibility

微生物中普遍存在染色体外遗传物质——质粒, 其大小从几个 kb 的小质粒到数百 kb 的大质粒不等, 有的可同时存在几个质粒, 因此用质粒图谱可对微生物进行鉴定。多数质粒携带抗药性基因, 称为抗药性质粒, 使微生物对抗生素等药物具有抗药性, 但有些质粒是不带抗药性基因的 (称为隐蔽质粒)。在病原微生物中, 这类染色体外的遗传物质往往参与致病过程。例如宋内痢疾杆菌的毒力与存在 120Md 的大质粒相关^[1], 它不仅与侵袭力有关, 还编码宋内 I 相 O 抗原, 因此称为宋内 I 相大质粒。侵袭性大肠杆菌的侵袭力与其 140Md 的大质粒相关^[2]; 志贺氏 I 型痢疾杆菌的一个 6Md 的小质粒也参与致病过程^[3]。因此引起很多科学家对这些致病性质粒的关注。由于这些质粒都很大, 很难用常规的遗传工程方法对它们进行研究, 为了研究这些致病性质粒的功能, 最好的方法是将它们驱除, 然后观察它们被驱除后致病菌的表型发生了什么样变化, 就可知道它们在致病过程中的作用。常规的质粒驱除方法有自然丢失、高温驱除^[4]、吡啶橙^[5]、溴化乙啶、和 SDS 处理^[6]。这些方法对驱除小的抗药性质粒是有效的, 而且现在也是常用的^[7], 但很难驱除隐蔽大质粒。我们曾尝试用 SDS 处理驱除福氏 2a 的

* 联系人 Tel: 010-66948835 E-mail: huangly@nic. bmi. ac. cn

收稿日期: 2002-07-09, 修回日期: 2002-08-01

140Md的侵袭大质粒,但没有获得成功。本文利用质粒不相容性原理,从福氏2a的大质粒上扩增了其复制子 *ori* 和 *inc* 基因,将它们克隆至 pMD18-T 载体,再转化至福氏2a和宋内的野生菌株,成功地驱除了痢疾杆菌福氏2a和宋内痢疾杆菌的侵袭大质粒。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5a、痢疾杆菌福氏2a 2457T (*nal*^r) 和宋内痢疾杆菌 S7 (*nal*^r),均为本室保存菌株。培养用培养基 LB,培养温度 37℃,抗生素工作浓度为氨基苄青霉素 100μg/mL 和萘啶酮酸 25μg/mL。pMD18-T 载体 (Ap^r),购自 TaKaRa 公司。

1.2 工具酶及化学试剂

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒,均购自 TaKaRa 公司。扩增福氏2a大质粒复制子的上游 PCR 引物 P1 为 5' G TTC GCG TTC CTC AGT TGT CC 3',下游引物 P2 为 5' GTG GTT ACA TGT GAT ACC GGA GT 3'。扩增复制子内 400bp 左右 *inc* 序列的上游引物 P3 为 5' TGC GAG AGA GAG GGG AGA AC 3',下游引物 P4 为 5' CGC CTT TTC CAT CAG TTT C 3'。PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3 福氏2a大质粒复制子 *ori* 和 *inc* 基因的扩增

ori 和 *inc* 基因的扩增均用全菌 PCR 方法^[9],出发菌株为福氏2a 2457T。反应条件为:94℃预变性 10min,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 2min,经过30个循环后,再于72℃延伸 10min。

1.4 大质粒复制子 *ori* 与 *inc* 基因的克隆

DNA 的酶切、酶切片段的回收、重组、转化、和质粒的抽提,按参考文献 [10] 进行。

1.5 痢疾杆菌大质粒的竞争驱除和鉴定

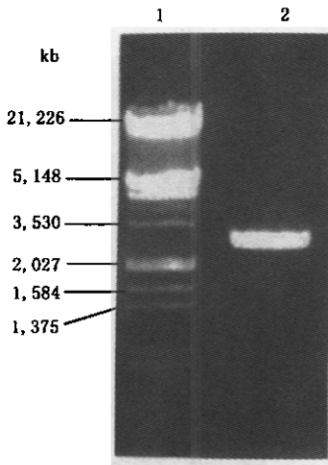
将带有大质粒复制子 *ori* 或复制子中的 *inc* 基因的 T-载体,转化到痢疾杆菌,涂含有 Ap 的 LB 选择平板,挑选抗 Ap 的菌落,再接种含 Ap 的 LB 液体培养基,37℃培养过夜,连续传代 5 次,然后用 PCR 和玻片凝集试验鉴定大质粒是否存在。

2 结果与讨论

2.1 用复制子 (*ori*) 驱除痢疾杆菌侵袭大质粒

2.1.1 大质粒复制子的 PCR 扩增:如果两个质粒不能同时存在于一个菌体内,称这两个质粒是不相容的,后来发现凡质粒的复制子 (*ori*) 相同,它们就不相容。因此我们就可以利用质粒不相容性原理将痢疾杆菌的大质粒驱除。据文献^[8,11]报道,福氏5a、福氏2a和宋内痢疾杆菌大质粒属同一个不相容群,它们的复制子结构相似,复制机理相同。本研究目的是要驱除福氏2a和宋内痢疾杆菌大质粒,以便进一步研究它们在致病中的作用,由于它们的全序列还没有被发表,但福氏5a大质粒的全序列已经发表^[12],因此我们按照福氏5a大质粒复制子两端的序列,设计合成一对引物 P1 和 P2,用全菌 PCR 技术从野生型福氏2a 2457T 扩增了约 2.5kb 左右的复制子 (图1)。

2.1.2 福氏2a侵袭大质粒复制子的克隆:福氏2a大质粒复制子的 PCR 产物 (2.5kb)

图1 *ori* 基因的 PCR 扩增

- 1 λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI,
- 2 *ori* 基因的 PCR 扩增产物

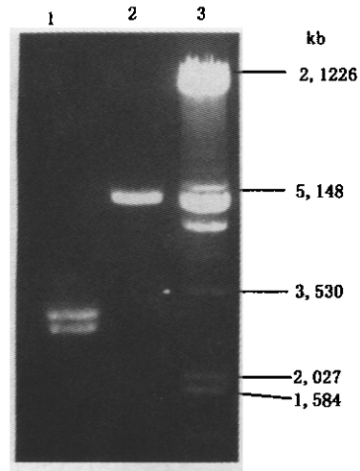


图2 pMDori 重组质粒的酶切鉴定

- 1 pMDori/*Hind*III 和 *Bam*HI, 2 pMDori/*Hind*III,
- 3 λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI

经纯化后,克隆至 T-载体 pMD18-T (2.7kb),转化 *E. coli* DH5a,涂布含 Ap 的 LB 平皿,随机挑取抗 Ap 的菌落,抽提质粒后,进行酶切鉴定(图2),当用 *Hind*III 酶切时,出现一条约 5.2kb 的带,它正好是 T-载体和复制子片段之和(图2第2行),当用 *Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切时,得到 2.5kb 和 2.7kb 两条带,它们正好分别是复制子片段和 T-载体(图2第1行)。表明福氏 2a 侵袭大质粒的复制子已克隆至 pMD18-T,命名为 pMDori。

2.1.3 痢疾杆菌侵袭大质粒的驱除:将带有福氏 2a 大质粒复制子片段的 Ap 抗性 T-载体 pMDori 转化至同一不相容群的福氏 2a 2457T 株及宋内 S7 株,在含 Ap 的 LB 平皿上筛选抗 Ap 的菌落,分别将它们称为 2457T-ori 和 S7-ori,它们应该包含 pMDori。根据质粒不相容性原理,这些抗 Ap 的痢疾杆菌的大质粒应已被竞争驱除。为确保抗 Ap 痢疾杆菌的大质粒充分被竞争驱除,将它们在含 Ap 的 LB 培养液中连续传 5 代,每次 37℃ 振荡培养过夜,然后再涂含 Ap 的 LB 平皿,最后用 PCR 扩增技术,鉴定在含有 Ap 平皿上长出的菌落是否还存在侵袭大质粒。因为侵袭大质粒上都包含与侵袭力相关的 *VirG* 基因,因此用一对 *VirG* 两端的引物对他们进行全菌 PCR,如有大质粒存在,应能扩增出 *VirG* 基因,但我们均未从对 Ap 有抗性的福氏 2a 2457T 株及宋内 S7 中扩增到 *VirG* 基因,对 2457T-ori 的 PCR 结果见图 5 第 3 行,对 S7-ori 的 PCR 结果见图 6 第 3 行,结果表明它们的侵袭大质粒已被竞争驱除。宋内痢疾杆菌的大质粒不仅与侵袭力有关,而且还编码宋内 I 相 O 抗原,但当用抗宋内 I 相 O 抗原的抗血清与 S7-ori 进行玻片凝集试验时,结果均为阴性,进一步表明 AP 抗性的宋内 S7 的 I 相大质粒已被竞争驱除。用 2457T 和对 Ap 有抗性的 2457T 株同时进行双向电泳,发现二者有明显差异(待发表),进一步表明 Ap^r 的 2457T 株中的大质粒也已被驱除。

2.2 用 *inc* 基因驱除痢疾杆菌的侵袭大质粒

2.2.1 *inc* 基因的 PCR 扩增痢疾杆菌中属于同一相容群的大质粒彼此不相容的原理在于它们通过相同的机制控制拷贝数,保证每个菌中只有一种类型的大质粒。这种机制涉及复制子内一段 400bp 左右的 DNA 序列被称为 *inc* 序列,它的反义 RNA 阻断了复制起点的活性^[10],由此推断,这段 DNA 的组成型表达应该能完全抑制大质粒的复制,于

是我们尝试用 *inc* 序列来驱除痢疾杆菌的侵袭大质粒。同样根据已发表的福氏 5a 大质粒的全序列^[11]，在 *inc* 基因两端设计合成一对引物 P3 和 P4，用全菌 PCR 技术从福氏 2a 2457T 扩增了约 400bp 左右的 *inc* 基因 (图 3)。

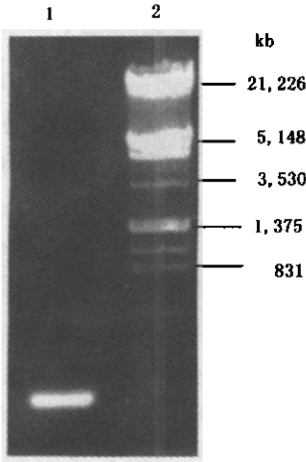


图 3 *inc* 基因的 PCR 扩增
 1 *inc* 基因的 PCR 扩增产物,
 2 λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI

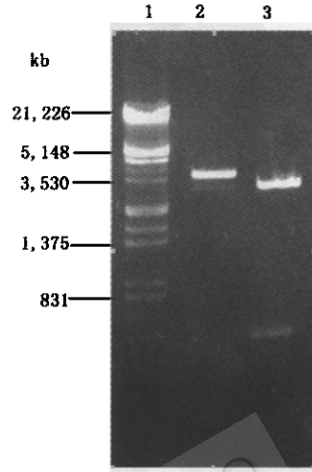


图 4 pMDinc 重组质粒的酶切鉴定
 1 λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI, 2 pMDinc/*Hind*III,
 3 pMDinc/*Hind*III + *Bam*HI

2.2.2 *inc* 基因的克隆: *inc* 基因的 PCR 产物经纯化后，克隆至 *Apr* 的 T-载体 pMD18-T (2.7kb)，转化 *E. coli* DH5a，涂布含 AP 的 LB 平皿，随即挑取抗 Ap 的菌落，抽提质粒后，进行酶切鉴定 (图 4)，当用 *Hid*III 酶切时，出现一条约 3.1kb 的带 (图 4 第 2 行)，它正好是 T-载体 (2.7kb) 和 *inc* (400bp) 片段之和，当用 *Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切时，得到 2.7kb 和 400bp 两个片段 (图 4 第 3 行)。它们正好分别是 T-载体和 *inc* 基因。结果表明 *inc* 基因已被克隆至 T-载体，该重组质粒被称为 pMDinc。

2.2.3 *inc* 基因竞争驱除痢疾杆菌的侵袭大质粒: 将插有 *inc* 基因的 T-载体 (pMDinc)，转化至同一不相容群的福氏 2a 2457T 株及宋内 S7 株，在含 Ap 的 LB 平皿上筛选抗 Ap 的菌落，凡是抗 Ap 的菌株应该都包含一个抗 Ap 的小质粒 pMDinc，由于 *inc* 来自同一个不相容群，根据质粒不相容性原理，这些包含有 pMDinc 的福氏 2a 2457T-*inc* 及宋内 S7-*inc* 内的大质粒应该被竞争驱除。为确保大质粒被驱除，先将福氏 2a 2457T-*inc* 及宋内 S7-*inc* 在含有 Ap 的 LB 培养液中连续传 5 代，每次 37℃ 振荡培养过夜，然后涂含 Ap 的 LB 平皿，最后用 PCR 扩增鉴定。同样用 *VirG* 两侧的引物 P1 和 P2 对 2457T-*inc* 和 S7-*inc* 进行全菌 PCR。结果表明从 2457T-*inc* 中扩增不到 *VirG* 基因 (图 5 第 2 行)，从宋内 S7-*inc* 中也均扩增不到 *VirG* 基因 (图 6 第 2 行)，表明它们的大质粒已被驱除。对 S7-*inc*，用抗宋内 I 相 O 抗原的抗血清与 S7-*inc* 进行玻片凝集试验时，结果均为阴性，进一步表明 Ap 抗性的宋内 S7 的 I 相大质粒已被竞争驱除。对 2457T-*inc* 和 2457T 进行的双向电泳也表明两者有显著差异 (待发表)。以上结果表明用 *inc* 基因也能竞争驱除属于同一不相容群的侵袭大质粒。

质粒的驱除与质粒的诱动一样，对致病菌的毒力质粒的功能研究具同等重要的意义。尽管从 20 世纪 60 年代初，就有人研究从细菌中驱除抗药性质粒，但都是物理性的方法，它们对驱除小质粒有一定的效果，但是它们很难驱除隐蔽的大质粒。本试验尝

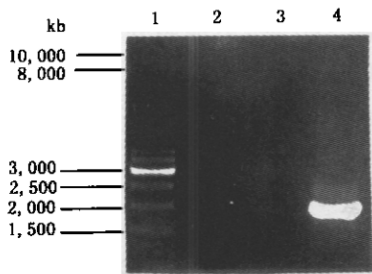


图5 PCR扩增2457T及2457T-inc的VirG

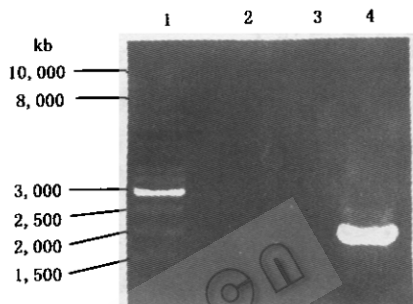


图6 PCR扩增S7及S7-inc的VirG

1 1kb DNA ladder, 2 2457T-inc, 3 2457T-ori, 4 2457T

1 1kb DNA ladder, 2 S7-inc, 3 S7-ori, 4 S7

试了利用质粒不相容性原理来驱除痢疾杆菌的侵袭大质粒，不论是用 *ori* 基因还是 *inc* 基因都获得成功，且效率很高。虽然在驱除大质粒的同时引进了一个抗药性的小质粒，但小质粒的遗传背景清楚，不会影响对大质粒致病性关系的研究，因此该方法对致病性大质粒的功能研究有重要意义。

参考文献

- [1] Sansonetti P J, Kopecko D J, Formal S B. *Infect Immun*, 1981, **34**: 75 ~ 83.
- [2] Sansonetti P J, d'Hautevitte H, Formal S B. *Ann. Microbiol (Paris)*, 1982, **132**: 351 ~ 355.
- [3] Watanabe H, Timmis K N. *Infect Immun*, 1984, **43**: 391 ~ 396.
- [4] Stadler S, Adelberg E A. *J Bacteriol*, 1972, **109**: 447 ~ 449.
- [5] Hirota Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1960, **46**: 57 ~ 64.
- [6] Iuuzuka N, Nakamura S, Inuzuka M, *et al.* *J Bacteriol*, 1969, **101**: 827 ~ 839.
- [7] Mansi E M, Karen J A, Craig A I. *Res. Microbiol*, 2000, **151** (3): 201 ~ 208.
- [8] Rosa M S, Soheyla S, Werner K M. *Infect Immun*, 1988, **56** (4): 836 ~ 842.
- [9] 王恒樑, 冯尔玲, 林云, 等. *微生物学及免疫学进展*, 2000, **28** (1): 15.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Lyndsay R, Michael A, Davis B, *et al.* *J Bacteriol*, 1997, **179** (11): 3670 ~ 3675.
- [12] Venkatesan M M, Goldberg M B, Rose D J, *et al.* *Infect Immun*, 2001, **69** (5): 3271.