

耐药淋球菌相关核苷酸序列的克隆与初步分析*

季明春 钱莉 陈红菊

(扬州大学医学院 微生物学及免疫学教研室 扬州 225001)

摘要: 为克隆淋球菌染色体耐药相关核苷酸序列, 我们利用抑制性消减杂交技术构建耐药性淋球菌与标准参考菌株差异 DNA 消减文库, 从中筛选淋球菌耐药相关核苷酸序列。通过初步筛选, 对克隆得到的 DNA 片段进行测序, 经 GenBank 和淋球菌基因组序列库检索分析, 发现 5 个未知新核苷酸序列。这些核苷酸序列可能与淋球菌染色体耐药性相关, 将为研究淋球菌耐药性提供新的实验对象。

关键词: 淋球菌, 染色体, 耐药, 核苷酸序列

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0075-04

CLONING AND IDENTIFYING ANTIBIOTIC RESISTANCE RELATIONAL GENES OF *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Ji Ming-Chun QIAN Li CHEN Hong-Ju

(Department of Microbiology and Immunology, Yangzhou University, Yangzhou 225001)

Abstract: To clone the differential genes in antibiotic resistance *Neisseria gonorrhoeae*, the library that contains the fragments of differential genes between antibiotic resistance strain and standard reference strain of *Neisseria gonorrhoeae* was constructed which used suppression subtractive hybridization technique. Then the antibiotic resistance relational genes fragments were cloned and analyzed. Antibiotic resistance *Neisseria gonorrhoeae* subtractive library that has high subtractive efficiency was set up successfully. The amplified library contained 2500 positive clones. Sequence analysis was performed to find the fragments of antibiotic resistance relational genes. Five sequences were unknown previously. The fragments of antibiotic resistance genes may provide an important clue for studying the mechanism of occurrence and development of antibiotic resistance *Neisseria gonorrhoeae*.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, Antibiotic, Resistance, Genes

淋球菌曾经对抗生素十分敏感, 随着抗生素的广泛使用, 以及淋球菌的变异和适应性增强, 淋球菌对抗生素产生了耐药性。耐药的基因机制迄今远未探明, 为全面了解淋球菌对抗生素耐药的分子机制, 我们采用抑制性消减杂交技术建立了淋球菌差异 DNA 消减文库^[1], 在此基础上我们进一步克隆和筛选淋球菌耐药相关核苷酸序列。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株

淋球菌 WHO 标准参考菌株 A (WHO-A) 和多重耐药淋球菌菌株 RSM292C4 由 Pillay D 教授惠赠。

*江苏省应用基础研究资助项目 (No. BJ95122)

收稿日期: 2003-03-07, 修回日期: 2003-08-15

1.2 主要生化试剂

PCR-Select Bacterial Genome Subtraction 试剂盒为 Clontech 公司产品, *Rsa* I 等限制性内切酶为 Roche 公司产品, pGEM-T easy 线性化质粒载体为 Promega 公司产品, Megaprimer DNA labelling systems 和 dCTP-³²P 为 Amersham 公司产品。测序采用 Pharmacia Biotech 公司的 ALFTM DNA Sequencer 系统。实验中所用接头 (adaptor) 有 Adaptor 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT3', 5'-ACCTGCCCGG3';) 和 Adaptor 2 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCCTGGTCGCGGCCGACCT3', 5'-ACCTCGGCCG3'); 引物有 PCR Primer 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC3'), Nested Primer 1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT3') 和 Nested Primer 2 (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3')。

1.3 抑制性消减杂交

参照文献[2]进行。

1.4 DNA 消减文库的构建

参照文献[1]进行。

1.5 DNA 消减文库的初步筛选、克隆鉴定

记数培养板中直径大于 1mm 的白色及蓝色菌落数, 随机挑取白色菌落, 纯化质粒, 以 nested primer 1 和 nested primer 2 为引物进行 PCR 扩增, 分析插入片段。取上述 PCR 产物各 2 μ L, 用 dCTP-³²P 分别标记以 *Rsa*I 酶切 tester 和 driver DNA 为探针, 进行 dot blot 分析。

1.6 序列测定及 BLAST 分析

提取含有特异性插入片段的质粒, 采用 Pharmacia Biotech 公司的 ALFTM DNA Sequencer 系统, 以 PGEM-F 和 PGEM-R 为引物进行双向测序。测序结果送 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 和淋球菌基因组序列库 (<http://www.genome.ou.edu/gono.html>) 检索分析。

2 结果

2.1 DNA 消减文库扩增及克隆的初步鉴定

将消减杂交后的第 2 次抑制性 PCR 产物连接载体质粒和转化细菌, 结果扩增后 DNA 消减文库包含约 2,500 个白色克隆, 白色克隆占 82%, 从中随机挑取 96 个白色克隆, 抽提纯化质粒, 以 nested 引物进行 PCR 扩增分析, 克隆中插入有 100 ~ 600bp 大小的片段, 与理论设计大小相符。

2.2 Dot blot 杂交差异分析

第 2 次抑制性 PCR 产物与质粒连接、克隆、蓝白斑挑选和 PCR 扩增鉴定后, 分别以 *Rsa*I 酶切 tester 和 driver DNA 为探针, dCTP-³²P 标记后, 与随机挑取的 96 个白色菌落质粒作点杂交, 结果见图 1, 43 个克隆和 driver DNA 探针的杂交信号明显强于和 tester DNA 探针杂交的信号, 而有 1 个克隆相反, 和 tester DNA 探针的杂交信号明显增强, 另有 47 个克隆仅能与 tester DNA 探针杂交, 而不能与 driver DNA 探针杂交, 表明这些克隆中载有 RSM292C4 耐药淋球菌菌株的特异基因片段, 它们为 RSM292C4 基因组 DNA 所特有, 可能代表某些淋球菌新基因。

2.3 序列分析及初步结果

在对上述 47 个阳性克隆进行序列测定的基础上, 将测序结果输入 GenBank, 利用

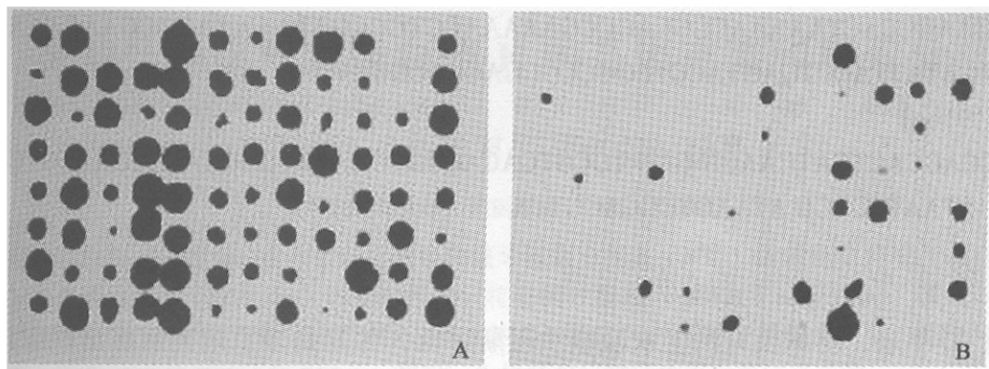


图 1 淋球菌耐药菌株 DNA 消减文库的筛选
A Tester DNA 探针, B Driver DNA 探针

BLAST 程序查找美国国家生物技术信息中心的基因库 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 和淋球菌基因组序列库 (<http://www.genome.ou.edu/gono.html>), 有 5 个淋球菌核苷酸序列未发现与其同源或相匹配的基因, 说明我们发现了 5 个新的淋球菌 DNA 片段。新发现的 DNA 片段序列如下:

No.1 (376bp)

TTCGAGCGGCCGCCGGCAGGTGATGTCTGGGCTGTTGGGAAAGGCAGACAGCGGTGTGCAC
TTTATCGTCAACGACCTGCCGTTGCCGCGTGCGCTGCTGGCGCTGCTGGTGGGCGGCCGCTG
GCAATATCCGGTTTGATTCTGCAAAGCATTGTCCGTAATCCGCTGGCTTCGCCGGATATTCTG
GGGATTACCAGCGGCCCATCGCCAGCGGCAGTGTTCCTTCTCTCGTTTCTGGCGACGGCGATA
AGCCAGCGCTGGCTCCCTGTAGCCGCGATGGGTGGGGCGTGATCACAGCCGTCGCCATTTA
TCTGCTGGCCTGGAACAAGGCGCATCGCCGCTGCGGCTAGTACCTCGGCCGCGACCACGCT
A

No.2 (84bp)

CGAATTGGGCCAGAGACGTTCGCATGCATCACACAGGCCACGCCACATGGCAGGCTCGCCGG
GATAATTCGAGATATTCAACATA

No. 3 (393bp)

TAGCGTGGTCCGCGCCGAGGTAATAATGACCCGAGAGGCTTAACCTTACAACACCGAAGGTG
TTTTGTGAGTGAATCATAGGGACGTGTTTTGATAGTTAGCTTGTTTGAAGATTGGTTCTGATG
GTTGTGCGAGAGCGAGGGCGAAGCATGACGGTTGGAATGAAACAGAATTTGCCTGGCGGCCG
ATAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAAGTGAACGCGGTAGCGCCGAT
GGTAGTGTGGGGCTTCCCATGTGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGTAAG
CCGGAGCAATCTGGTGGTTGTAGAGAAATTCCGGTGGAGCGGTAGTTCAGTTGGTTAGAATAC
CTGCCCCGGCGGCCGCTCGAA

No. 4 (413bp)

TCCGAGCGGCCGCCGGCAGGTACTTGCGTGACTATTTTCGCGAACGCGTGATGTTTTATCGC
CAGCGTTCACTGCAGTTCTCTCGGTTTACCCTACGAACCTAAGTCTAAGTAGGCTTATCCCTT
CATTATTCCAACCTACGACGACCTTGCCGTGGAAAACATCCCCTTCCACGGGTACATTCTTA
CACAGCAAAAACGATTTTCTGCTTGCATATCGGCCCCGACAAAGAGGTTAATGGAGTAGCAAC
CTACCCCTTTATCACACGAGGCAAGATATGAGTAAAGGTTTTGGATAGCAAAAAGAACAGTA

AGAAGAAGCCACTAAAAACGGCAGCCGAAAAACGTGCCGATAAAAAGGCCGAAGAAACCAAG
AGGCTGATATTACCTGAGTACCTCGGCCGCGACACGCTA

No. 5 (91bp)

CCCCCAGCACTGATCAAGN GCN TCGGTCACACTGTGAATCTGCCGATGTGACTGTGACTG
CTGGGATAATTCAGC ATAAGTCGCACGTTA

3 讨论

近 20 年来,淋球菌对抗生素敏感性逐渐降低,尤其是多重耐药菌株出现后,这些菌株有选择性优势,在性活跃的人群中迅速传播,导致临床上淋病治疗失败的情况日益严重。随着遗传学和分子生物学发展,人们对淋球菌耐药机制认识越来越清楚。淋球菌抗生素耐药性机制包括由质粒介导的耐药和染色体介导的耐药。目前对染色体介导耐药性的研究主要集中在 *penA*、*mtr*、*penB*、*gyrA* 和 *parC* 等多个位点的突变上,这些基因的突变使淋球菌对抗生素的最小抑制浓度增加^[3]。但是,除上述基因突变所致染色体介导耐药外,是否还存在其他基因组差异介导的耐药机制,由于实验方法的限制,一直未见相关报道。

抑制性消减杂交技术 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 是 Diatchenko 等在 1996 年发展起来的一项新的基因克隆技术^[2],是以抑制 PCR 为基础的消减杂交方法,它具有敏感性高、特异性强、背景低、重复性好等优点。1998 年 Akopyants 等改进 SSH 方法^[4],通过两次杂交及两次 PCR 消除待比较菌的同源片段,同时使特异差异片段达到有效富集,然后克隆从 PCR 获得的消减 DNA 片段建立消减文库,再进一步分析其序列及功能^[5],为病原体中未知基因筛选和微生物基因组差异、分子进化的研究提供了重要的技术手段^[6]。

本研究在成功构建特异性淋球菌耐药菌株 DNA 消减文库的基础上^[1],对消减文库进行初步筛选,克隆出 47 个耐药淋球菌差异 DNA 片段,其中有 5 个核苷酸序列在 GenBank 和淋球菌基因组序列库 (<http://www.genome.ou.edu/gono.html>) 中检索不到与其同源性的基因序列,表明它们为淋球菌耐药菌株 RSM292C4 基因组的特有核苷酸序列。这些耐药淋球菌特有核苷酸序列的克隆为研究淋球菌耐药性的发生、发展机理提供了新的线索,同时说明淋球菌多重耐药性可能涉及细菌染色体的多个基因,值得进行深入研究。

参考文献

- [1] 季明春,陈红菊,严华,等.扬州大学学报(农业与生命科学版),2002,23(4):8~11.
- [2] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Proc Natl Acad USA, 1996, 93(12): 6025~6030.
- [3] Moodley P, Pillay C, Goga R, et al. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(4): 853~859.
- [4] Akopyants N S, Diatchenko L, Lukyanow S, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(22): 13108~13113.
- [5] Winstanley C. J Med Microbiol, 2002, 51(6): 459~467.
- [6] Tinsley C R, Nassif X. Proc Natl Acad USA, 1996, 93(20): 11109~11114.