

一种简单高效的结合转移克隆方法*

史兆兴 王恒樑 胡 莖 冯尔玲 姚 潇

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要: 为了建立一种将整合在染色体上的重组自杀质粒重新环化成环质粒的技术方法, 以体内表达技术筛选到的痢疾杆菌融合菌株为出发点, 借助辅助质粒 pMT999 或 pRK2013 进行了结合转移实验, 成功地建立了一种结合转移克隆方法, 并且具有较高的克隆效率。

关键词: 结合转移, 克隆, 反向诱动

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0095-05

A SIMPLE METHOD OF TRANSCONJUGATIVE CLONING WITH HIGH EFFICIENCY

SHI Zhao-Xing WANG Heng-Liang HU Kun FENG Er-Ling YAO Xiao
SU Guo-Fu HUANG Liu-Yu

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract: In order to establish a method by which the recombinant suicide plasmids integrated on the chromosome could

* 国家重大基础研究规划资助项目 (973) (No. G1999054103)

首都二四八重大创新工程资助项目 (No. H010210360119)

** 联系人 Tel: 86-10-66948805, E-mail: huangly@nic.bmi.ac.cn

作者还有: 苏国富, 黄留玉**

收稿日期: 2003-04-17, 修回日期: 2003-06-25

be recircled, A simple method of transconjugative cloning was established with the helper plasmids pMT999 or pRK2013 and fusion strains of *Shigella flexneri* which were obtained by screening with in vivo expression technology. And the cloning efficiency with this method is very high.

Key words: Transconjugation, Cloning, Retromobilization

最近发展起来一种用于研究病原菌与宿主相互作用的新技术——体内表达技术 (in vivo expression technology)。此技术可以分离到病原菌在与宿主相互作用过程中被诱导表达的基因,一般认为这些基因在病原菌致病过程中起到重要作用^[1]。因此,这一技术也广泛用于致病微生物的致病机理研究。在应用这一技术过程中,必须将可诱动的重组自杀质粒整合到病原菌的基因组上,才可用于筛选。但是,筛选到的融合菌株无法分析其基因信息,需要将整合到病原菌基因组上的重组自杀质粒重新诱动环化成环状质粒才可进行下一步分析。目前用于诱动融合质粒重新环化的技术方法主要有:酶切连接法^[2, 3]、噬菌体转导法^[4]、质粒剪切系统^[5]和结合转移法^[6]。噬菌体转导法和质粒剪切系统操作相对比较复杂,我们对酶切连接法和结合转移法进行了试验。结果用酶切连接法试验了多次,都没有获得成功。在试验结合转移方法时,建立了一种简单高效的从细菌基因组上重新克隆质粒的方法。本文以痢疾杆菌融合菌株为例,对此方法进行较为详尽的介绍。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。

表 1 本实验所用的菌株和质粒

菌株和质粒	相关特征	来源
菌株		
大肠杆菌		
S ₁₇ -λ pir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , Sm ^r , λpir	文献 [7]
MC1061	pMT999 质粒的宿主菌, Sm ^r	本实验室
MT1694	F ^Δ (<i>gpt-proA</i>) 62 <i>Leu B6 sup E44 ara-14 galK2 lac Y1Δ (mcrC-mrr) rpsL20 (str^r) Xyl-5 mut-1 recA13</i> , Sm ^r	文献 [6]
福氏 2a 痢疾杆菌		
STD	2457T 的 <i>asd</i> 缺失突变体, Nal ^r	本实验室
Sfx	融合了 pXLsdx 的 STD 衍生株, Nal ^r , Cm ^r	本实验室
SF2401	融合了 pXLsd2401 的 STD 衍生株, Nal ^r , Cm ^r	本实验室
质粒		
pRK2013	RP4 类辅助质粒, Km ^r	P. B. Rainey
pXLsd	插入了 <i>asd</i> 的 pXL275, Cm ^r	本实验室
pMT999	温度敏感的 RP4 类质粒, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Hg ^r	本实验室
pXLsdx	在 <i>asd</i> 基因前插入了 T32 基因组 DNA 部分酶切片段的 pXLsd, Cm ^r	本实验室

1.2 引物

P1: CTGCAAGCGGATTAAGTTGG;

P2: AGAACGGAGCCGACCATACC;

引物合成及测序服务均由上海博亚生物技术有限公司提供。

1.3 试剂和抗生素

DNA 限制性内切酶和 DNA Marker 购自 Takara 公司。二氨基庚二酸 (DAP) 购自 Sigma 公司。抗生素工作浓度: 萘啶酮酸 (Nal) 40μg/μL, 氨苄青霉素 (Ap) 100μg/μL, 链

霉素 (Sm) 100 μ g/ μ L, 氯霉素 (Cm) 30 μ g/ μ L, 卡那霉素 (Km) 50 μ g/ μ L。

1.4 细菌的培养

对于大肠杆菌 *S*₁₇₋₁ λ pir、MT1694 和痢疾融合杆菌 Sfx (融合了 pXLasdx 的 STD 衍生株), 挑取单菌落, 接种于 5mL 液体 LB 培养基 (含相应抗生素) 中, 37 $^{\circ}$ C 振摇 (200r/min) 培养过夜。对于 MC1061 和以 pMT999 为辅助质粒进行的结合转移实验中得到的克隆菌株在 30 $^{\circ}$ C 培养。

1.5 以 pRK2013 为辅助质粒的结合转移克隆

将供体菌 Sfx、受体菌 *S*₁₇₋₁ λ pir 和辅助菌 MT1694 (pRK2013) 在 37 $^{\circ}$ C 振摇培养至指数生长期 (约 10⁹ CFU/mL), 按供体菌: 辅助菌: 受体菌 = 5: 4: 1 (v/v/v) 混合均匀, 涂含 DAP 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 6~8 h。用 5mL LB 培养液洗下混合菌, 稀释 10 倍和 100 倍后, 分别涂布在 Cm^r + Sm^r 的平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 筛选结合转移子, 菌落计数。

1.6 以 pMT999 为辅助质粒的结合转移克隆

在用 pMT999 作辅助质粒时, 试验了两种方案。第一种方案是进行两次结合转移实验, 供体菌 Sfx (NaI^r、Cm^r 和加 DAP) 和辅助菌 MC1061 (Sm^r) /pMT999 (Ap^r、Hg^r、Tc^r 和 Km^r) 按 5: 1 (v/v) 混合, 涂 DAP 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 6~8 h。用 5mL LB 培养液洗下混合菌, 稀释 10 倍和 100 倍后, 在 NaI^r + Cm^r + Km^r + DAP 的平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 筛选结合转移子。挑取第一次结合转移的单菌落, 振摇过夜作为供体菌与受体菌 *S*₁₇₋₁ λ pir (Sm^r) 进行第二次结合转移, 最后在 Cm^r + Sm^r 的平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 筛选二次结合转移子。第二种方案是将供体菌、辅助菌和受体菌按 2: 2: 1 (v/v/v) 同时进行结合转移, 30 $^{\circ}$ C 培养筛选 Cm^r + Sm^r 的结合转移子, 菌落计数。

1.7 生物信息学分析

BLAST 分析: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

2 结果

2.1 结合转移诱动过程

当供体菌 Sfx 和受体菌 *S*₁₇₋₁ λ pir 进行结合转移的时候, 在辅助质粒 pRK2013 或 pMT999 的帮助下发生了 DNA 的转移 (图 1)。供体菌 Sfx 染色体上整合有重组自杀质粒 pXLasdx (mob⁺ Tra^r), 此整合的质粒可以通过同源重组剪切下来, 在辅助质粒表达 Tra 的情况下, 重组质粒由供体菌转移进入了受体菌, 受体菌本身可以表达自杀质粒复制所需的 π 蛋白, 从而使重组自杀质粒在受体菌中以环形质粒的形式不断复制。

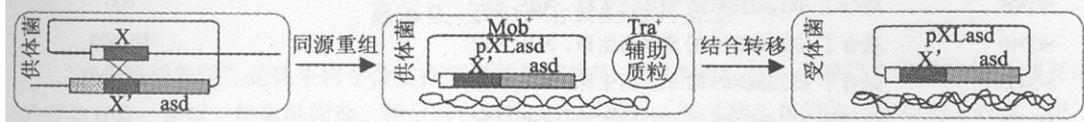


图 1 结合转移诱动过程

X' 重组质粒上克隆到的痢疾杆菌基因片段, X 痢疾杆菌基因组上与 X' 对应的基因片段

2.2 结合转移克隆片段的鉴定

为了证实用结合转移克隆方法得到的重组自杀质粒中是否含有痢疾杆菌的基因组片段, 我们对得到的重组质粒进行了限制性酶切分析 (图 2)。由酶切图可见, 在随机挑取的 7 个重组子中 6 个含有 DNA 片段的插入。

在证实了重组自杀质粒中插入了 DNA 片段后, 我们又对部分插入片段进行了序列分析, 得到了插入片段的全长序列, 并对序列进行了 BLAST 分析, 进一步证实这些片段为痢疾杆菌基因组 DNA (表 2)。

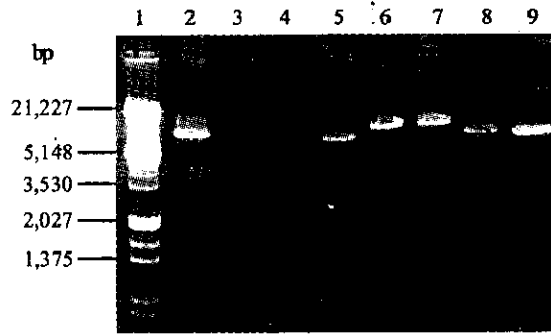


图 2 重组质粒的酶切鉴定

1 λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I, 2~8 pXLasdx/*Xba* I, 9 pXLasd/*Xba* I

表 2 用 BLAST 分析插入片段与痢疾杆菌基因组的关系

供体菌	插入片段的大小 (kb)	插入 DNA 的基因组定位
Sf2204	2.6	痢疾杆菌染色体和毒力质粒
Sf2211	3.2	痢疾杆菌染色体
Sf3107	0.9	痢疾杆菌染色体
Sf3111	1.5	痢疾杆菌染色体
Sf3302	0.8	痢疾杆菌染色体
Sf3305	0.9	痢疾杆菌染色体

2.3 结合转移克隆方法的效率

为了将整合于痢疾杆菌染色体上的重组自杀质粒重新诱动环化, 我们分别用 pRK2013 和 pMT999 两个辅助质粒进行结合转移克隆方法的可行性以及克隆效率的探索。在以 pRK2013 作辅助质粒、以 Sf2401 作供体菌、S₁₇₋₁ λ pir 为受体菌进行的实验中, 共筛选到 3 个转移克隆子。经提取质粒、酶切鉴定表明它们为 pXLasdx 系列的重组自杀

表 3 从不同 Sfx 菌株回收到的结合转移克隆数

供体菌	相关特征	结合转移克隆数 ^a
Sf2201	融合了 pXLasd2201 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	7,050
Sf2202	融合了 pXLasd2202 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	150
Sf2204	融合了 pXLasd2204 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	2,550
Sf2205	融合了 pXLasd2205 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	1,950
Sf2211	融合了 pXLasd2211 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	7,950
Sf3105	融合了 pXLasd3105 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	17,700
Sf3107	融合了 pXLasd3107 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	300
Sf3111	融合了 pXLasd3111 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	5,550
Sf3302	融合了 pXLasd3302 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	101,000
Sf3305	融合了 pXLasd3305 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	600
Sf3310	融合了 pXLasd3310 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	96,500
Sf3403	融合了 pXLasd3403 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	12,300
Sf3408	融合了 pXLasd3408 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	2,400
Sf3409	融合了 pXLasd3409 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	8,400
Sf3410	融合了 pXLasd3410 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	3,000
Sf3501	融合了 pXLasd3501 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	1,950
Sf3503	融合了 pXLasd3503 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	1,500
Sf3505	融合了 pXLasd3505 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	225,600
Sf3601	融合了 pXLasd3601 的 STD 衍生株, NaI ^r , Cm ^r	13,050

a 结合转移克隆数是指约 10¹⁰ CFU 受体细菌中用抗生素筛选到的转移克隆子的数目

质粒,证明此结合转移克隆方法可成功地用于整合于染色体上的重组自杀质粒的重新克隆,但克隆效率较低。随后我们以 pMT999 为辅助质粒,分别用两种方案进行结合转移克隆实验,都获得了成功。第一种方案周期较长,因此我们选用第二种方案。对多个 Sfx 菌株克隆其重组自杀质粒,发现其克隆效率存在差异,在 150~225,600 不等(表 3),但其效率大大优于用 pRK2013 作为辅助质粒。

3 讨论

用结合转移克隆整合于细菌基因组上重组质粒的方法已有报道,Rainey^[6]等人以 pRK2013 为辅助质粒对荧光假单胞菌和鼠伤寒沙门氏菌进行了研究,并成功地获得了整合于染色体的环形重组质粒,同时也发现,不同菌种、不同菌株之间的克隆效率是不同的。我们用 pRK2013 和 pMT999 两种辅助质粒进行了结合转移克隆法的试验,都取得了成功,发现不同辅助质粒、不同融合菌株之间的克隆效率存在很大差异。对于 pRK2013 和 pMT999 两种辅助质粒造成的克隆效率差异,目前还没有更多的信息进行解释。对于不同菌种和同一菌种不同菌株之间克隆效率不同,推测有以下几个方面的原因:(1)整合位点 DNA 序列的不同(包括一级结构和高级结构)影响到同源重组发生的效率,从而影响到克隆效率的高低;(2)不同菌种之间存在不同的重组酶系统,各种重组酶系统的效率高低影响到了克隆效率的高低;(3)整合于染色体上的重组质粒对不同菌种重组酶系统的影响是不同的。简单高效的结合转移克隆方法为体内表达技术成功应用于致病微生物的功能基因组研究提供了前提条件,而且可以推广应用于任何整合于染色体的自杀质粒的研究。

参考文献

- [1] Su L C, John J M, David W H. *Annu Rev Microbiol*, 1999, **53**: 129~154.
- [2] Young G M Miller V L. *Mol Microbiol*, 1997, **25** (2): 319~328.
- [3] Wang J, Mushegian A, Lory S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 10434~10439.
- [4] Michael J M, James M S, John J M. *Science*, 1993, **259**: 686~688.
- [5] Law J, Buist G, Haandrikman A, *et al.* *J Bacteriol*, 1995, **177**: 7011~7018.
- [6] Rainey P B, Heithoff D M, Mahan M J. *Mol Gen Genet*, 1997, **256**: 84~87.
- [7] Penfold R J, Pemberton J M. *Gene*, 1992, **118** (1): 145~146.

· 写作要点 ·

高等院校教学论文的撰写要点

“高等院校教学”是微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学栏目,是专门为高等院校教师开辟的教学交流、切磋、提高的园地,栏目特色特别突出。因此,要求作者撰写的内容必须有新意,绝不是泛泛地谈体会和叙述教学安排与过程。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,及时将国内外新的科技成果贯穿到教学始终,只有这样才能真正起到教与学的互动,提高高科技人才培养的水平。同时,稿件的录用率也能得到提高。