微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Aug. 20, 2021, 48(8): 2632−2642
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.201020

研究报告

基于 pDS132 的基因敲除中创伤弧菌氯霉素的耐药性变化及影响

凤梓涵[1] 王静[2] 金虹[3] 辛文文[1] 康琳[1] 王菁[1] 高姗[1] 李岩伟[1] 袁媛[*1] 王景林[*1]

1 军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所 北京 100071
2 中国农业大学动物医学院 北京 100193
3 中国人民解放军疾病预防控制中心 北京 100071

摘 要：【背景】基于自杀载体的基因敲除在单基因敲除上的应用较为常见，但在多基因敲除过程中细菌耐药性的变化及对后续敲除的影响尚未明确。【目的】探究基于自杀载体 pDS132 的创伤弧菌 *vvhA* 与 *rtxA1* 双基因敲除株构建过程中，创伤弧菌对氯霉素耐药性的变化及对后续基因敲除的影响。【方法】基于自杀载体 pDS132 的同源重组法构建创伤弧菌 YJ016 的单基因敲除株 YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1* 和双基因敲除株 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*，记录单交换筛选时的氯霉素浓度与筛选平板上成功重组的菌株所占比例。琼脂稀释法测定野生型与敲除株的氯霉素最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration，MIC)和抗性突变频率，纸片扩散法测定菌株对其他药物的敏感性，分析其对单交换筛选的影响。【结果】单基因敲除株的氯霉素 MIC 及氯霉素抗性突变频率高于野生型；双基因敲除株的庆大霉素抑菌圈直径小于野生型。单基因敲除时，单交换重组菌株的占比为 100% (20/20)；在 YJ016-*ΔvvhA* 上敲除 *rtxA1* 基因，氯霉素筛选浓度为 2、4 μg/mL 时，单交换重组菌株的占比分别为 40% (8/20)、5% (1/20)；在 YJ016-*ΔrtxA1* 上敲除 *vvhA* 基因，氯霉素筛选浓度为 2、4 μg/mL 时，单交换重组菌株的占比均为 0% (0/20)。【结论】基于自杀载体 pDS132 的基因敲除中创伤弧菌氯霉素的耐药性升高，可能影响后续单交换重组的筛选，该结果为基于自杀载体的同源重组技术应用于多基因敲除提供了参考。

关键词：创伤弧菌，自杀载体，同源重组，基因敲除，耐药性

Changes and effects of chloramphenicol resistance of *Vibrio vulnificus* in gene knockout with pDS132

FENG Zihan[1] WANG Jing[2] JIN Hong[3] XIN Wenwen[1] KANG Lin[1] WANG Jing[1] GAO Shan[1] LI Yanwei[1] YUAN Yuan[*1] WANG Jinglin[*1]

1 Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
2 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China
3 Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] Many domestic studies have reported in detail the application of gene knockout with suicide vectors in single gene knockout. However, the changes in bacterial resistance after gene

***Corresponding authors:** E-mail: YUAN Yuan: miniminiyuan@163.com; WANG Jinglin: wjlwjl0801@sina.com
Received: 23-10-2020; **Accepted:** 23-02-2021; **Published online:** 16-03-2021
*通信作者：E-mail：袁媛：miniminiyuan@163.com；王景林：wjlwjl0801@sina.com
收稿日期：2020-10-23；接受日期：2021-02-23；网络首发日期：2021-03-16

knockout and the impact on subsequent gene knockout remain unclear. **[Objective]** In order to explore the changes in the resistance of *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) to chloramphenicol and its effect on subsequent gene knockout in the process of gene knockout with pDS132, the *vvhA* and *rtxA1* gene knockout strains were constructed. **[Methods]** The single gene knockout strains YJ016-*ΔvvhA*, YJ016-*ΔrtxA1* and double gene knockout strains YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* of *V. vulnificus* YJ016 were constructed by the homologous recombination with suicide vector pDS132. The concentrations of chloramphenicol and the proportions of strains successfully recombined on the screening plate were recorded. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each strain to chloramphenicol and other antibiotics, and the mutation frequency of chloramphenicol resistance were determined and then analyzed. **[Results]** The MIC and the mutation frequency of chloramphenicol of the single gene knockout strains were higher than that of the wild type; the diameter of the gentamicin inhibition zone of the double gene knockout strains was smaller than that of the wild type. When the *rtxA1* gene was knocked out on YJ016-*ΔvvhA* and the chloramphenicol concentration of was 2, 4 μg/mL, the proportions of strains with single-crossover recombination were 40% (8/20) and 5% (1/20), respectively; when the *vvhA* gene was knocked out on YJ016-*ΔrtxA1*, the proportion was 0% (0/20). **[Conclusion]** In the process of gene knockout with the suicide vector pDS132, the resistance of *V. vulnificus* to chloramphenicol increased, which may affect the subsequent screening in single-crossover recombination. The result is helpful for the application of the homologous recombination technique with suicide vector to multiple gene knockout.

Keywords: *Vibrio vulnificus*, suicide vector, homologous recombination, gene knockout, drug resistance

创伤弧菌是一种适度嗜盐的革兰氏阴性弧菌，在海洋环境中较为常见，可以感染鱼类或人类致病[1]。食用未煮熟的带菌海产品可导致食入性感染，患者感染后迅速发生胃肠炎型症状，11.3%−43.0%可发展成脓毒症，此时病死率超过 50%[2]。伤口接触带菌的海水也可致病，常引起坏死性筋膜炎，严重感染的患者常面临截肢风险，大约有 17%的伤口感染患者可迅速发展为感染性休克致死[1]。*vvhA* 基因编码的溶细胞素(*Vibrio vulnificus* Hemolysin，VVH)和 *rtxA* 基因编码的重复序列(Repeats in Toxin，RTX)毒素是创伤弧菌的 2 个重要毒力因子[3]。溶细胞素是创伤弧菌分泌到细胞外的毒素，可依赖于胆固醇在细胞膜上寡聚成孔，对多种细胞产生毒性作用[4]。创伤弧菌的 RTX 毒素 A1 (RtxA1)能破坏肠道上皮细胞和肠道微绒毛结构，引起肠道上皮组织坏死。有研究证实缺少了 VVH 和 RtxA1 这 2 种毒素的创伤弧菌不能引起小鼠食入性感染发病[3]。

创伤弧菌在不同感染途径及感染阶段常涉及多种毒力基因参与致病过程，多基因敲除对探究创伤弧菌的 *vvhA* 和 *rtxA1* 基因在致病过程中的功能至关重要。国内外有多项研究详细报道了基于自杀载体的基因敲除在敲除单个基因上的应用[5-7]，但对多基因敲除的过程及影响其成功率的因素研究较少。本研究成功构建了创伤弧菌 YJ016 的 *rtxA1* 和 *vvhA* 双基因敲除株，在双基因敲除株的单交换重组筛选中，我们发现部分未发生重组的菌株也获得了氯霉素抗性，可在一定浓度的氯霉素筛选平板上生长，甚至可能会导致筛选失败。我们从氯霉素的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration，MIC)和抗性突变频率出发，分析了单交换重组筛选失败的原因，并初步探究了可能影响氯霉素耐药性的因素，以期为基于自杀载体的同源重组技术应用于多基因敲除提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒

创伤弧菌 YJ016 由中国台湾成功大学惠赠，自杀质粒 pDS132、*Escherichia coli* S17-1 λpir 菌株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 分子量标准，生工生物工程(上海)股份有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物(胶)回收试剂盒，QIAGEN 公司；限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Sph* Ⅰ、T4 DNA 连接酶，TaKaRa 公司；氯霉素，Sigma-Aldrich 公司；多粘菌素 B 硫酸盐，TCI 公司；药敏纸片：多粘菌素 B (300 U)、万古霉素(30 μg)、氨苄西林(10 μg)、头孢唑林(30 μg)、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶(19:1，25 μg)、庆大霉素(10 μg)、红霉素(15 μg)、环丙沙星(5 μg)，Oxoid 公司。PCR 仪、凝胶成像仪，Bio-Rad 公司；多功能酶标仪，美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.1.3 引物

采用 Primer Premier 6.0 软件设计基因扩增引物，由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除质粒载体的构建

创伤弧菌 YJ016 经 LB 液体培养基 37 °C、150 r/min 培养过夜，用去离子水将菌液稀释 10 倍。吸取 1 mL 稀释后的菌液室温 5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 180 μL 细胞裂解液重悬菌体，按细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取基因组 DNA。以创伤弧菌 YJ016 的基因组(Assembly ID：GCA_000009745.1) DNA 作为模板进行 PCR 反应，*vvhA* 基因(Gene ID：2621823)引物对为 VVHf1O/VVHr1O 和 VVHf2O/VVHr2O 分别扩增上下游同源臂，纯化后的同源臂片段 1:1 混合。参照刘霞等[5]方法，以混合后的 DNA 片段作为模板，引物对为 VVHr1O/VVHf2O 进行融合 PCR (图 1)。*Sal* Ⅰ和 *Sph* Ⅰ对 pDS132 质粒和融合 PCR 的扩增产物双酶切，将酶切后回收的质粒和片段按适当的

表 1 敲除株的构建及验证引物

Table 1 Primers used in construction and verification of gene knockout strains

基因片段 Gene segment	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5′→3′)	限制性核酸内切酶 Restriction endonucleases	片段大小 Amplicon size (bp)
vvhA-F	VVHf1O	GCGTCGACGCAGCGAAAGTGAGCTTTCACA	*Sal* Ⅰ	561
	VVHr1O	AGCGTTTTGTCAGCGTTTACGGGAAATCACCG CTTGTGTGCAAC	−	
vvhA-R	VVHf2O	GTTGCACACAAGCGGTGATTTCCCGTAAACGC TGACAAAACGCT	−	521
	VVHr2O	CATGCATGCAGTAATTTCTGTGAGAAATGTT	*Sph* Ⅰ	
rtxA1-F	RTXf1O	GCGTCGACTTCCGCCGACGATGGAAACAA	*Sal* Ⅰ	1 083
	RTXr1O	TGTAATGCAGATCGCTGAGTGAGCTAAATGAT TACCGCGCTTG	−	
rtxA1-R	RTXf2O	CAAGCGCGGTAATCATTTAGCTCACTCAGCGA TCTGCATTACA	−	1 018
	RTXr2O	CATGCATGCCCGCAATAGAGGTTCCATCA	*Sph* Ⅰ	
sacB	S-F	GCTTGGCGCAAACGTTGATTGT	−	1 195
	S-R	CCATGATATGCTGCAAATCCCT		
cat	C-F	TTTGCCCATGGTGAAAACGG	−	242
	C-R	TCCATGAGCAAACTGAAACGT		
vvhA	VVH-F	TAGGAACAGCAACAGATGAT	野生型 Wild type	1 914
	VVH-R	ACTTGAGGTTATGGATTGCT	敲除株 Gene knockout strains	963
rtxA1	RTX-F	GCGGTTCGGCATATCTAA	野生型 Wild type	1 715
	RTX-R	ATAACGACACGGCTGTTG	敲除株 Gene knockout strains	939

注：−：不包含设计的酶切位点；双下划线：酶切位点

Note: −: Does not contain designed restriction sites; Double underline: Restriction enzyme cutting sites

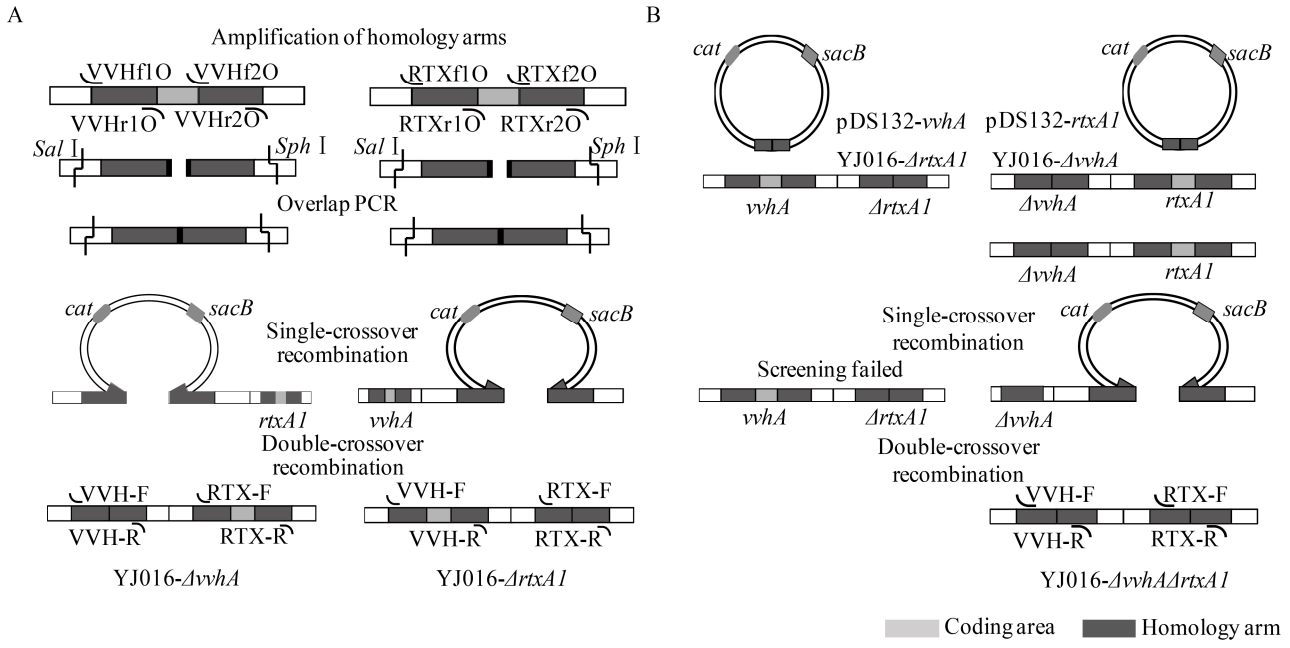

图 1 单基因敲除株(A)与双基因敲除株(B)的构建过程

Figure 1 Construction of single (A) and double (B) gene knockout strains

比例混合，加入 T4 DNA 连接酶连接过夜。将连接产物转化到 *E. coli* S17-1 λpir 感受态细胞中，通过 LB 抗性平板(含 30 μg/mL 氯霉素)筛选获得可能的重组克隆。通过 PCR 和测序分析鉴定出含有 *vvhA* 基因上下游融合同源臂的重组质粒，命名为 pDS132-*vvhA*。*rtxA1* 基因(Gene ID：2621888)敲除质粒的构建方法类似，上下游同源臂扩增引物对分别为 RTXf1O/RTXr1O 与 RTXf2O/RTXr2O；融合 PCR 引物对为 RTXr1O/RTXf2O；鉴定引物对为 RTXf1O/RTXr2O，构建好的质粒命名为 pDS132-*rtxA1*。引物序列见表 1。

1.2.2 单交换重组及鉴定

将含有重组质粒 pDS132-*vvhA* 的 *E. coli* S17-1 λpir 接种在含氯霉素(30 μg/mL)的 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.8−1.0；将 YJ016 接种在含多粘菌素 B (30 μg/mL)的 LBS 液体培养基(2% NaCl)中，37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6−0.8。分别取 1 mL *E. coli* S17-1 λpir 和 1 mL YJ016，LB 洗 3 次后用 50 μL 的无抗 LB 重悬，并 1:1 混匀。用移液枪将混匀的细菌滴于 0.45 μm 滤纸上，于超净台中吹干后贴在 LB 平板上，30 °C 培养过夜进行接合反应。之后用生理盐水洗涤滤膜，洗下的菌悬液涂布在氯霉素和多粘菌素 B 双抗 LB 平板上。多粘菌素 B 浓度为 30 μg/mL，氯霉素设置 2、4、8 μg/mL 这 3 个浓度梯度，37 °C 培养至长出单克隆菌落。随机挑取 20 个单菌落，*sacB-rtxA1* 双重 PCR 鉴定单交换重组的菌株，*sacB* 引物对为 S-F/S-R；*rtxA1* 引物对为 RTX-F/RTX-R。敲除 *rtxA1* 基因的单交换重组操作过程同上，单交换重组菌株通过 *sacB-vvhA* 双重 PCR 鉴定，*sacB* 基因引物对为 S-F/S-R；*vvhA* 引物对为 VVH-F/VVH-R。*vvhA* 和 *rtxA1* 基因的双敲除株构建的单交换重组过程同上。引物序列见表 1。

1.2.3 双交换重组及鉴定

挑取数个转导成功的转化子混合接种于 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6−0.8。将菌液稀释 1 000 倍、100 倍后取 100 μL 涂布于含 10%蔗糖的 LB 平板上，22 °C 培养 2 d 至出现单菌落。挑取单克隆菌落分别涂布于无抗 LB 平板和含有 2 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上，37 °C

培养 24 h。挑选能在无抗 LB 平板上生长但不能在含氯霉素 LB 平板上生长的克隆进行 PCR 和测序鉴定，*vvhA* 和 *rtxA1* 基因敲除株的鉴定和测序引物分别为 VVH-F/VVH-R、RTX-F/RTX-R。引物序列见表 1。

1.2.4 生长曲线测定

分别吸取 0.5 mL 培养过夜的 YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*，加入含 50 mL LB 液体培养基的烧瓶中，混合均匀。而后分别吸取 3.5 mL 左右的混合液，加入 13 个标注有 0、1、2、3…12 h 的试管中，37 °C、150 r/min 培养，到标注时间后取出并吸取 150 μL 用多功能酶标仪测定 OD_{600}，未接种细菌的 LB 液体培养基作为对照，绘制生长曲线。

1.2.5 氯霉素的药敏试验

采用琼脂稀释法按照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI) 2018 标准进行氯霉素的药敏试验[8]。将培养过夜的 YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 菌液以 1%转接至 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6−0.8，稀释 100 倍后，取 100 μL 菌液涂布在氯霉素浓度为 1、2、4、8、16、32 μg/mL 的 LB 平板上，37 °C 培养 16−20 h，以没有细菌生长的最低药物浓度为最低抑菌浓度，实验重复 3 次。

1.2.6 氯霉素突变频率及耐药基因的测定

将培养过夜的 YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 菌液以 1%转接至 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6−0.8，10 倍比稀释 7 个梯度，每个梯度取 100 μL 菌液涂板计数。以菌落数在 30−300 的平板为准，推算出原始菌液中的细菌数目，记为 *N*。同时取 100 μL 原始菌液涂布于氯霉素浓度为 2、4 μg/mL 的 LB 平板上，每个浓度的氯霉素分别涂 3 个平板，37 °C 培养 24 h 后进行菌落计数，计为 *n*。*n*/*N* 记为菌株在氯霉素浓度为 2、4 μg/mL 的 LB 平板上生长的突变频率。PCR 鉴定 YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 及在 4 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的抗性菌株是否含有 *cat* 基因，引物对为 C-F/C-R。

1.2.7 其他抗生素的药敏试验

采用纸片扩散法进行万古霉素、多粘菌素 B、氨苄西林、头孢唑林、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、庆大霉素、红霉素、环丙沙星等 8 种药物的药敏试验。YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 及在 4 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的抗性菌株 37 °C、150 r/min 培养过夜，而后将菌液以 1%转接至 LB 液体培养基中，相同条件培养至 OD_{600} 约 0.6−0.8，稀释 100 倍后取 100 μL 菌液，涂布在 LB 平板上，晾干后贴上药敏纸片，37 °C 培养 16−20 h，记录抑菌圈直径，实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

统计学分析采用 SAS 9.4 软件，单交换重组的菌株占总体比例的比较采用 Fisher 精确概率检验，突变频率、抑菌圈直径的比较采用 *t* 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单基因敲除株的建立

在野生型菌株 YJ016 上敲除 *vvhA* 基因时，在氯霉素浓度为 2 μg/mL 的平板上筛选到了单交换重组的菌株，经 *sacB-rtxA1* 双重 PCR 扩增后得到 1 195 bp 和 1 715 bp 的片段，证明均成功重组(图略)；当氯霉素浓度≥4 μg/mL 时，未发现菌株生长。在野生型菌株 YJ016 上敲除 *rtxA1* 基因时，在氯霉素浓度为 2 μg/mL 和 4 μg/mL 的平板上均筛选到了单交换重组的菌株，经 *sacB-vvhA* 双重 PCR 后得到 1 195 bp 和 1 914 bp 的片段，证明均成功重组；当氯霉素浓度≥8 μg/mL 时，未见菌株生长。双交换重组筛选 *vvhA* 基因敲除株时，12 株菌株中有 3 株成功实现了 *vvhA* 基因的敲除，VVH-F/VVH-R 扩增后呈现 963 bp 的条带，较野生型减少了 951 bp，测序结果表明其与质粒 pDS132-*vvhA* 的同源臂序列一致；RTX-F/RTX-R 扩增后呈现 1 715 bp 的条带与 YJ016

一致，证明敲除成功(图 2)。双交换重组筛选 *rtxA1* 基因敲除株时，20 株菌株中有 11 株成功敲除，RTX-F/RTX-R 扩增后呈现 939 bp 的条带，较野生型减少了 776 bp，经测序表明其与质粒 pDS132-*rtxA1* 的同源臂序列一致；VVH-F/VVH-R 扩增后呈现 1 914 bp 的条带与 YJ016 一致，证明敲除成功(图 2)。

2.2 双基因敲除株的建立

在 YJ016-*ΔrtxA1* 上敲除 *vvhA* 基因时，从氯霉素浓度为 2、4 μg/mL 的 LB 平板上筛选得到的菌株经 *sacB*-*rtxA1* 双重 PCR 鉴定，仅扩增出 939 bp 的敲除后的 *rtxA1* 基因片段，而不含 *sacB* 基因，证实其均未发生重组；氯霉素浓度为 8 μg/mL 未见菌株生长。在 YJ016-*ΔvvhA* 上敲除 *rtxA1* 基因时，从氯霉素浓度为 2 μg/mL 平板上筛选到的 20 株菌株中，经 *sacB*-*vvhA* 双重 PCR 鉴定后，仅 1 株发生重组，其余仅扩增出 963 bp 的敲除后的 *vvhA* 基因片段；而当氯霉素浓度为 4 μg/mL 时，20 株筛选到的菌株中有 8 株成功发生了单交换重组，经 *sacB*-*vvhA* 双重 PCR 鉴定后呈现出 1 195 bp 的 *sacB* 基因与 963 bp 的敲除后的 *vvhA* 基因片段 2 条带(图 3)。氯霉素浓度为 4 μg/mL 时，YJ016-*ΔvvhA* 与 pDS132-*rtxA1* 重组后筛选到的单交换菌株的占比高于 2 μg/mL (8/20 vs. 1/20，P=0.019 7)；高于 YJ016-*ΔrtxA1* 与 pDS132-*vvhA* 重组(8/20 vs. 0/20，P=0.003 3) (表 2)。双交换重组的筛选时，有 8 株成功敲除，经 VVH-F/VVH-R 与 RTX-F/RTX-R 扩增后呈现 963 bp 和 939 bp 的 2 条带，与质粒 pDS132-*vvhA* 和 pDS132-*rtxA1* 一致(图 2)，进一步测序证明双基因敲除株构建成功。

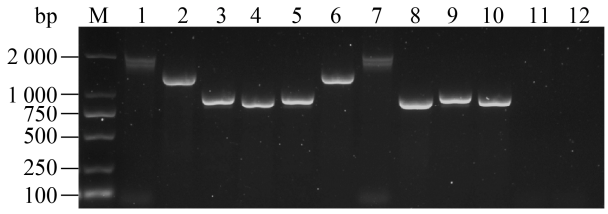

图 2 敲除株的 PCR 鉴定

Figure 2 Identification of gene knockout strains by PCR

注：M：DL2000 DNA Marker；1−2：YJ016 的 *vvhA* 与 *rtxA1* 基因；3−4：质粒 pDS132-*vvhA* 与 pDS132-*rtxA1*；5−6：YJ016-*ΔvvhA* 的 *vvhA* 与 *rtxA1* 基因；7−8：YJ016-*ΔrtxA1* 的 *vvhA* 与 *rtxA1* 基因；9−10：YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 的 *vvhA* 与 *rtxA1* 基因；11−12：阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1−2: *vvhA* and *rtxA1* gene of YJ016; 3−4: pDS132-*vvhA* and pDS132-*rtxA1*; 5−6: *vvhA* and *rtxA1* gene of YJ016-*ΔvvhA*; 7−8: *vvhA* and *rtxA1* gene of YJ016-*ΔrtxA1*; 9−10: *vvhA* and *rtxA1* gene of YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*; 11−12: Negative control

2.3 各菌株的氯霉素药敏试验结果

基因敲除后菌株对氯霉素的耐药基因已消除(图 4)，其生长曲线未见明显差异(图 5)。野生型菌株 YJ016 在氯霉素为 1 μg/mL 的平板上不生长，即 MIC≤1 μg/mL。单基因敲除后的菌株 YJ016-*ΔvvhA* 与 YJ016-*ΔrtxA1*，可在氯霉素为 1 μg/mL 的平板生长，但氯霉素为 2 μg/mL 时不生长，即 1 μg/mL<MIC≤2 μg/mL。双基因敲除后的菌株 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*，

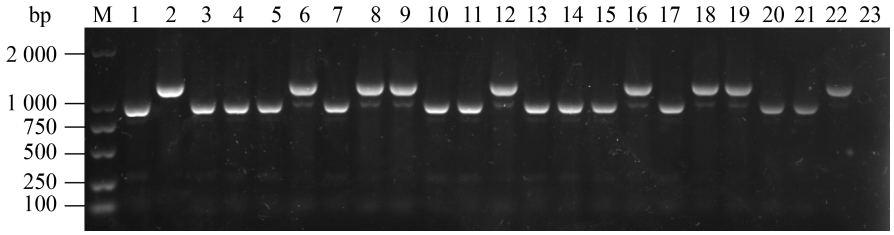

图 3 YJ016-*ΔvvhA* 与 pDS132-*rtxA1* 单交换重组菌株的 *sacB*-*vvhA* 双重 PCR 鉴定

Figure 3 Identification of YJ016-*ΔvvhA* single-crossover recombined with pDS132-*rtxA1* by diplex PCR

注：M：DL2000 DNA Marker；1：YJ016-*ΔvvhA*；2：质粒 pDS132-*rtxA1*；3−22：4 μg/mL 氯霉素的平板上生长菌株，其中 6、8、9、12、16、18、19、22 为成功重组的菌株；23：阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: YJ016-*ΔvvhA*; 2: pDS132-*rtxA1*; 3−22: Strains grown on 4 μg/mL chloramphenicol plates, of which 6, 8, 9, 12, 16, 18, 19, and 22 were successfully recombined with pDS132-*rtxA1*; 23: Negative control

表 2 单交换重组的菌株占总体的比例

Table 2 The proportions of single-crossover recombination strains to the total

氯霉素浓度 Concentration of chloramphenicol (μg/mL)	YJ016-*ΔrtxA1*, pDS132-*vvhA*		YJ016-*ΔvvhA*, pDS132-*rtxA1*	
	sacB$^-$	*sacB*$^+$	*sacB*$^-$	*sacB*$^+$
2	20	0	19	1
4	20	0	12	8
8	–	–	–	–

注：–：此浓度下没有菌株生长

Note: –: No strains grew at this concentration

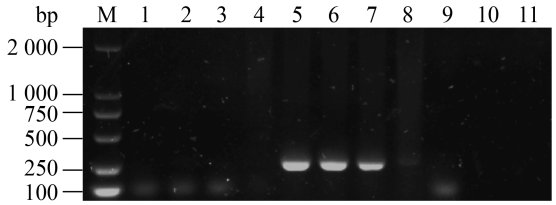

图 4 各菌株 *cat* 基因的 PCR 检测

Figure 4 Detection of *cat* gene by PCR for each strain

注：M：DL2000 DNA Marker；1–4：YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*；5–7：YJ016 与 pDS132-*vvhA*、YJ016 与 pDS132-*rtxA1*、YJ016-*ΔvvhA* 与 pDS132-*rtxA1* 单交换重组的菌株；8–10：YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 在 4 μg/mL 氯霉素的平板上筛选得到的氯霉素抗性突变株；11：阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1–4: YJ016, YJ016-*ΔvvhA*, YJ016-*ΔrtxA1*, YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*; 5–7: Single-crossover recombination strains of YJ016 and pDS132-*vvhA*, YJ016 and pDS132-*rtxA1*, YJ016-*ΔvvhA* and pDS132-*vvhA*; 8–10: YJ016-*ΔvvhA*, YJ016-*ΔrtxA1*, YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* resistant strains grown under 4 μg/mL chloramphenicol; 11: Negative control

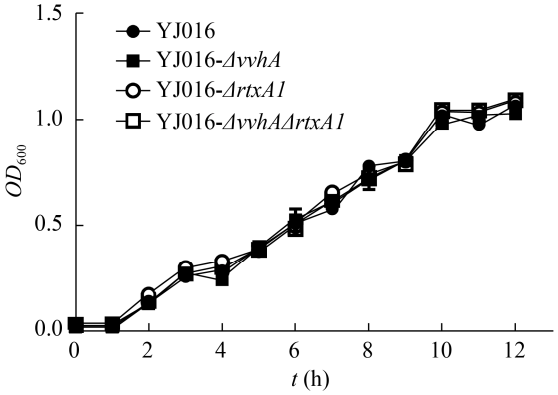

图 5 各菌株的生长曲线

Figure 5 Growth curve of each strain

在接种量为 10^6 CFU 时，部分菌株在氯霉素为 2 μg/mL 的平板上也能生长，但在氯霉素为 4 μg/mL 时不生长，即 2 μg/mL<MIC≤4 μg/mL。

2.4 各菌株的氯霉素抗性突变频率

各菌株在不同浓度氯霉素下的抗性突变频率存在差异(图 6)。YJ016 接种量为 3×10^8 CFU/mL 时，在 2、4 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上均未发现突变株生长，突变频率均小于 3.3×10^{-9} (为方便分析，比较时按 3.3×10^{-9} 算)。YJ016-*ΔvvhA* 接种量为 4.5×10^8 CFU/mL 时，在 2 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的菌落数目为 244、171、204，对应的突变频率为 5.4×10^{-7}、3.8×10^{-7}、4.5×10^{-7}；4 μg/mL 时，菌落数目为 34、28、42，对应的突变频率为 7.6×10^{-8}、6.2×10^{-8}、9.3×10^{-8}。YJ016-*ΔrtxA1* 接种量为 3.5×10^8 CFU 时，在 2 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的菌落数目为 113、142、168，对应的突变频率为 3.2×10^{-7}、4.1×10^{-7}、4.8×10^{-7}；4 μg/mL 时，菌落数目为 11、23、16，对应的突变频率为 3.1×10^{-8}、6.6×10^{-8}、4.6×10^{-8}。YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 接种量为 2.5×10^8 CFU/mL 时，在 2 μg/mL 氯霉素的LB平板上生长的细菌数量过多，无法准确计数，在 4 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的菌落数目为 11、23、16，对应的突变频率为 4.6×10^{-7}、4.1×10^{-7}、

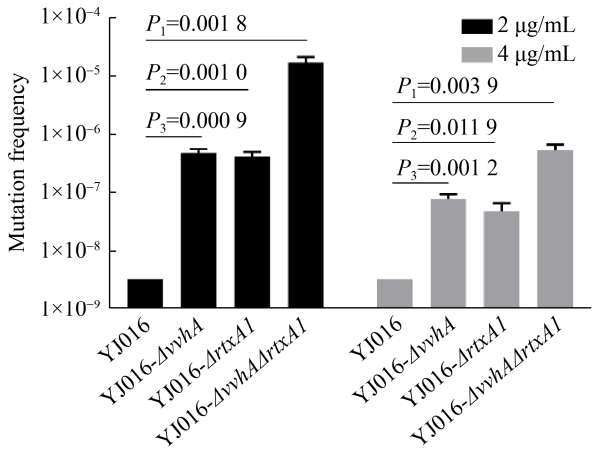

图 6 菌株在不同浓度氯霉素下的突变频率

Figure 6 The mutation frequency of strains under different concentrations of chloramphenicol

6.9×10^{-7}。在测定 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 的 MIC 时，接种量为 10^6 CFU/mL，3 次实验下 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 在 2 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上生长的菌落数目为 13、17、21，对应的突变频率为 1.30×10^{-5}、1.70×10^{-5}、2.10×10^{-5}。敲除株在氯霉素浓度为 2、4 μg/mL 时，发生抗性突变的频率均高于野生型(P_1、P_2、P_3<0.05)。

2.5 不同菌株的其他抗生素药敏试验结果

除氯霉素外，部分菌株对其他抗生素的敏感性也存在差异(图 7)。YJ016、YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 与 YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1*、YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 在 4 μg/mL 氯霉素下筛选得到的突变株，不同抗生素药敏纸片的抑菌圈直径均值分别为：万古霉素：9.2、9.3、9.2、9.3、9.5、9.7、9.2 mm；多粘菌素 B：12.8、12.8、12.2、13.5、13.7、13.3、13.5 mm；氨苄西林：24.3、24.7、24.5、24.7、24.7、24.7、24.2 mm；头孢唑林：19.8、20.5、19.7、19.8、19.7、19.5、19.7 mm；红霉素：25.0、25.5、25.2、24.7、24.6、24.1、24.2 mm；磺胺甲噁唑-甲氧苄啶：28.0、27.8、27.0、27.7、27.8、27.2、27.8 mm；庆大霉素：28.8、27.8、27.8、26.2、24.8、25.5、24.8 mm；环丙沙星：38.7、38.5、38.2、38.2、38.2、37.7、38.5 mm。其中 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 及在 4 μg/mL 氯霉素下筛选得到的氯霉素抗性突变株对庆大霉素的抑菌圈直径(mm)均值小于野生型(28.8 vs 25.1，P<0.000 1；28.8 vs 26.2，P<0.000 1)。

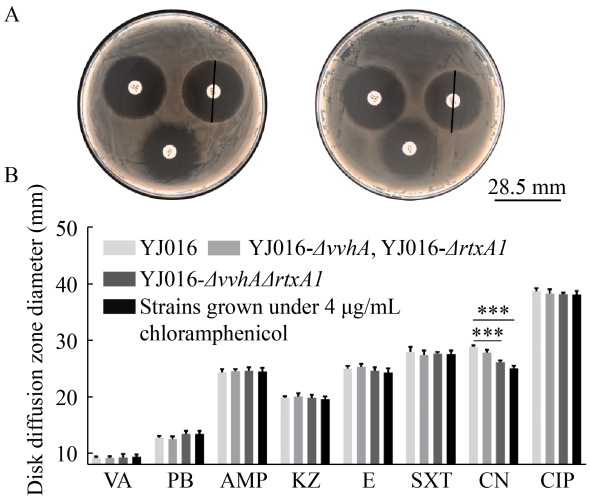

图 7 其他抗生素的药敏试验结果

Figure 7 Results of susceptibility test of other antibiotics

注：A：YJ016 与 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 的庆大霉素、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、红霉素抑菌圈；B：各菌株的 8 种抗生素抑菌圈直径. VA：万古霉素；PB：多粘菌素 B；AMP：氨苄西林；KZ：头孢唑林；E：红霉素；SXT：磺胺甲噁唑-甲氧苄啶；CN：庆大霉素；CIP：环丙沙星；***：P<0.000 1

Note: A: Disk diffusion zone of gentamicin, sulfamethoxazole-trimethoprim, erythromycin of YJ016 and YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1*; B: The disk diffusion zone diameters of eight antibiotics of each strain.VA: Vancomycin; PB: Polymyxin B; AMP: Ampicillin; KZ: Cefazolin; E: Erythromycin; SXT: Sulfamethoxazole-Trimethoprim; CN: Gentamicin; CIP: Ciprofloxacin; ***: P<0.000 1

3 讨论与结论

同源重组技术是无痕敲除的常用技术之一。通过同源重组技术，利用含反向筛选基因 *sacB* 的 pDS132 质粒构建 YJ016 的无痕突变株主要分 2 步[5]。单交换重组，使得质粒整合到宿主基因组中，而后通过质粒赋予的抗性筛选出成功重组的菌株；双交换重组，基于蔗糖平板的选择压力，单交换的菌株发生双交换消除质粒，以在蔗糖平板上生长。pDS132 具有 λpir 位点，在不表达 *pir* 基因的受体菌 YJ016 中无法独立完成复制，只有发生同源重组整合到基因组中与基因组一起进行复制时，才会表达质粒所带基因的抗性。在本研究中，大肠杆菌的质粒 pDS132 含有氯霉素抗性基因 *cat*，可编码氯霉素乙酰转移酶使氯霉素乙酰化失活，从而在氯霉素浓度为 32 μg/mL 的平板上生长；而创伤弧菌 YJ016 的氯霉素 MIC≤1 μg/mL。因此我们选择以 2 倍的 YJ016 氯霉素 MIC 为单交换筛选的起始浓度，设置了 2、4、8 μg/mL 这 3 个梯度。结果显示，不同基因单交换重组后的菌株筛选所需的氯霉素的浓度存在差异，发生 *rtxA1* 基因单交换重组后的菌株可在 4 μg/mL 的氯霉素平板上生长，而 *vvhA* 基因单交换重组后不生长。*vvhA* 基因在细菌密度较高时受群体调控系统影响表达下调，而筛选时的细菌密度较高，我们推测此时质粒上的 *cat* 基因插入 *vvhA* 位点后表达水平可能较低[9]。此外，虽然

单交换重组时的氯霉素浓度高于 2 倍的野生型 MIC，但明显低于大肠杆菌的 MIC，而且未达到临床耐药的判定标准(≥32 μg/mL)[8]，提示我们在设置单交换重组筛选的药物浓度时，要从受体菌株的 MIC 出发，不宜过高。

基于自杀质粒的同源重组用于单基因敲除已有很多文献报道，但单基因敲除与多基因敲除是否存在差异，哪些因素会影响多基因敲除仍不清楚。与单基因敲除不同，在敲除第 2 个基因的单交换重组筛选时，我们发现许多并未成功重组的菌株也能在一定浓度的氯霉素抗性平板上生长。在 YJ016-*ΔrtxA1* 上敲除 *vvhA* 基因时，2、4 μg/mL 氯霉素平板上生长的菌株均未发生单交换重组。在 YJ016-*ΔvvhA* 上敲除 *rtxA1* 基因，氯霉素浓度为 2 μg/mL 时，单交换重组的菌株仅占 5% (1/20)。这些氯霉素抗性菌株不含自杀质粒 pDS132，也未在其他位置整合 *cat* 基因。与单基因敲除不同，多基因敲除时，受体菌在敲除第一个基因的单交换筛选过程中接触过一定浓度的抗生素。有研究表明，细菌在接触抗生素后，可能会发生适应性变异而产生耐药[10]，以革兰氏阴性菌居多[11]。然而筛选单交换重组菌株的过程与筛选适应性耐药突变的菌株有一定的相似性[12]，即细菌均会暴露于一定浓度的抗生素下，而且基因敲除时用到的抗生素浓度比 1/2MIC 逐级诱导时更高。基因敲除的过程中，敲除株自身是否会发生适应性变化，其氯霉素耐药性是否会发生比较持久的改变，使得菌株在单交换筛选时无需整合抗性质粒就能在氯霉素平板上生长。为了验证这一猜想，我们进行了氯霉素的药敏试验，结果显示基因敲除确实影响了创伤弧菌对氯霉素的耐药性，单基因敲除株的氯霉素 MIC 高于野生型，双基因敲除株高于单基因敲除株。但单基因敲除株的 MIC≤2 μg/mL，无法在氯霉素为 2 μg/mL 和 4 μg/mL 时生长，仍无法说明单交换重组时，氯霉素抗性平板上未成功重组的菌株出现的原因。

单交换重组筛选时，YJ016 通过接合转移与单交换重组获得 *cat* 基因而产生氯霉素耐药性，这一过程发生的频率约为 10^{-7}[13]，而 MIC 测定时，接种量仅为 10^6 CFU/mL[8]。如果某一氯霉素浓度下，菌株发生抗性突变的频率与同源重组的频率相当或更高，理论上基因突变的菌株在筛选出的菌株中所占比例会增高，甚至造成单交换重组的筛选失败。为验证这一猜想，我们将细菌的接种量增加到 10^8 CFU/mL，进行了氯霉素抗性突变频率的测定。结果表明，YJ016 发生突变以后在 2、4 μg/mL 氯霉素上生长的频率均小于 3.3×10^{-9}，这可能是单交换重组筛选成功率为 100%的原因。经过一次基因敲除后，单基因敲除株在氯霉素为 2 μg/mL 时的突变频率约 10^{-7}–10^{-6}，明显高于野生型；而 YJ016-*ΔvvhAΔrtxA1* 突变频率进一步升高。*vvhA* 和 *rtxA1* 基因均为创伤弧菌的毒力因子[3]，现有研究未表明其对创伤弧菌的耐药性有影响。本研究中，单基因敲除株 YJ016-*ΔvvhA*、YJ016-*ΔrtxA1* 的氯霉素抗性突变频率并无明显差异；双基因敲除株的氯霉素抗性突变频率高于单基因敲除株，而在基因敲除中，双基因敲除所用质粒等均与单基因敲除相同，唯一的区别是双敲除株在单基因敲除株的基础上多经历了一次单交换筛选(接触氯霉素)。因此，我们推测用自杀质粒 pDS132 敲除 YJ016 的多个基因时，敲除株的氯霉素抗性突变频率的升高可能与在单交换筛选时接触氯霉素有关。若其抗性突变频率接近或超过单交换重组的频率，可能会造成单交换重组的菌株占比降低。此外，敲除株在氯霉素为 4 μg/mL 时的突变频率小于 2 μg/mL，而单交换重组的频率理论上不受氯霉素浓度的影响，这可能是氯霉素浓度为 4 μg/mL 时，YJ016-*ΔvvhA* 与 pDS132-*rtxA1* 单交换筛选中的成功重组的菌株占比高于 2 μg/mL (8/20 vs 1/20，P=0.019 7)的原因。因此，在用同一抗性的质粒敲除多个基因时，在单交换重组菌株可以生长的前提下，选择相对较高的药物浓度进行筛选，或许可以避免实验过程中菌株抗性突变等对单交换筛选的干扰。

虽然氯霉素抗性突变频率上升可能造成未发生单交换重组的菌株在氯霉素抗性平板上生长,但这些菌株氯霉素抗性增强的原因仍不清楚。我们发现相较于野生型,双基因敲除株和氯霉素抗性增强的菌株对庆大霉素的抗性也略有增强,但对万古霉素、多粘菌素 B、氨苄西林、头孢唑林、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、红霉素、环丙沙星等 7 种抗生素的抗性无明显改变。庆大霉素属于氨基糖苷类药物,可不可逆地结合到分离的核糖体 30S 亚基上[14];氯霉素类抗生素可逆地与核糖体 50S 亚基结合,阻断转肽酰酶的作用,二者均可抑制细菌蛋白质合成[15]。红霉素也能抑制蛋白质合成,但其抗性未发生明显变化,提示并非药物结合靶点的突变引起的。高佩增等在环丙沙星诱导宋内志贺菌耐药后,发现氨苄西林、头孢噻肟、庆大霉素、氯霉素、四环素、复方新诺明也产生了耐药,推测诱导后宋内志贺菌外排泵的表达水平升高[16]。创伤弧菌具有耐药结节分化家族(Resistance Nodulation Division,RND)外排泵,其表达水平可影响多种药物的抗性[17]。李健等在 4 种外排泵抑制剂利血平(Reserpine)、羰基氰氯苯腙(Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone,CCCP)、甲基吡咯烷酮(N-Methyl-2-Pyrrolidone,NMP)和苯丙氨酸-精氨酸-β-萘酰胺(Phe-Arg-β-Naphthylamide,PAβN)对 41 株弧菌氯霉素和氟苯尼考 MIC 影响的研究中,发现外排泵抑制剂 CCCP 能够有效抑制弧菌对酰胺醇类药物的外排,从而提高弧菌对酰胺醇类药物的敏感性[18]。但该结论仅针对含有 *floR*、*cmlA* 等编码氯霉素外排泵的耐药基因的菌株,而本研究中筛选得到的氯霉素抗性升高的菌株不含上述耐药基因。PAβN 和 NMP 均属于 RND 外排泵抑制剂,理论上可以结合到外排泵上的相应位点以阻止其他物质与之结合[19],从而抑制外排泵底物发生外排恢复细菌对药物的敏感性,但在创伤弧菌和霍乱弧菌耐药性的研究中,并未发现其可以影响氯霉素的 MIC[18]。此外,关于 RND 外排泵的研究中未发现仅针对氯霉素和庆大霉素的外排泵[20],而且菌株升高后的氯霉素 MIC 也未达到临床耐药的判定标准[8],其药物抗性的改变是否涉及外排泵的变化仍需更深入的研究。

综上,本研究成功构建了创伤弧菌 YJ016 的 *vvhA* 和 *rtxA1* 基因的双敲除株,发现基因敲除后的菌株对氯霉素的 MIC 及氯霉素的耐药突变频率均升高,易造成后续单交换筛选时成功重组菌株的占比降低,甚至筛选失败,适当提高氯霉素的浓度可增加成功重组的菌株所占比例。此外,氯霉素抗性增强的菌株对庆大霉素的抗性也增强,其药物敏感性改变的机制及是否会对菌株毒力、侵袭性等造成影响仍待进一步研究。

REFERENCES

[1] Baker-Austin C, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(2): 423-430

[2] Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(5): 1723-1733

[3] Kim HR, Rho HW, Jeong MH, Park JW, Kim JS, Park BH, Kim UH, Park SD. Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*[J]. Life Sciences, 1993, 53(7): 571-577

[4] Jeong HG, Satchell KJF. Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTX(Vv) and VvhA cytolysins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(3): e1002581

[5] Liu X, Gao H, Yang L, Zhang YQ, Tan YF, Guo ZB, Huang XX, Yang RF, Zhou DS. Establishment of a suicide vector-based gene knockout method in studies of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2011, 19(3): 188-192,276 (in Chinese)
刘霞, 高鹤, 杨琳, 张义全, 谭亚芳, 郭兆彪, 黄新祥, 杨瑞馥, 周冬生. 副溶血性弧菌基因敲除方法的建立及应用[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(3): 188-192,276

[6] Peng L, Pan JY, Luo S, Wu XM. Construction and identification of *Proteus mirabilis* strain with *ppk1* gene deletion[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25(5): 961-964 (in Chinese)
彭亮, 潘嘉韵, 罗苏, 吴晓蔓. 奇异变形菌 *ppk1* 基因缺失株的构建与鉴定[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(5): 961-964

[7] Ji XF, Zhao HL, Zhang Y, Bai XL, Zhang YL, Rong QY, Li BQ. Construction of a novel plasmid vector and its use to

knock out genes in *Helicobacter pylori*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2016, 11(12): 1066-1069,1073 (in Chinese)
季晓飞, 赵慧琳, 张莹, 柏雪莲, 张艳丽, 荣倩玉, 李波清. 基因敲除质粒载体的构建及其在幽门螺杆菌基因敲除中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(12): 1066-1069,1073

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018: 52

[9] Kim MY, Park RY, Choi MH, Sun HY, Shin SH. Swarming differentiation of *Vibrio vulnificus* downregulates the expression of the *vvhBA* hemolysin gene via the *luxS* quorum-sensing system[J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(2): 226-232

[10] Levin BR. Microbiology: noninherited resistance to antibiotics[J]. Science, 2004, 305(5690): 1578-1579

[11] Braoudaki M, Hilton AC. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(1): 73-78

[12] Agafitei O, Kim EJ, Maguire T, Sheridan J. The role of *Escherichia coli* porins OmpC and OmpF in antibiotic cross resistance induced by sub-inhibitory concentrations of kanamycin[J]. Journal of Experiment Microbiology and Immunology, 2010, 14: 34-39

[13] Sia EA, Kuehner DM, Figurski DH. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(5): 1457-1464

[14] Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(22): 6437-6448

[15] Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans[J]. Journal of Environmental Quality, 2016, 45(2): 576-592

[16] Gao PZ, Yao MX. Changes of repressor gene *acrR* and *marR* induced resistant *Sonnei shigella*[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2015, 19(10): 1625-1629 (in Chinese)
高佩增, 姚明晓. 诱导耐药型宋内志贺菌中主动外排阻遏基因 *acrR*、*marR* 的变化[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(10): 1625-1629

[17] Lee S, Yeom JH, Seo S, Lee M, Kim S, Bae J, Lee K, Hwang J. Functional analysis of *Vibrio vulnificus* RND efflux pumps homologous to *Vibrio cholerae* VexAB and VexCD, and to *Escherichia coli* AcrAB[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(4): 256-261

[18] Li J, Zhao S, Wang Y, Ma LC, Liu X, Fang WH. Effects of efflux pump inhibitors on the amphenicols resistance of *Vibrio* strains isolated from marine aquaculture[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(8): 1299-1306 (in Chinese)
李健, 赵姝, 王元, 马立才, 刘旭, 房文红. 外排泵抑制剂对海水养殖源弧菌酰胺醇类药物耐药性的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(8): 1299-1306

[19] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(5): 519-542

[20] Gao HJ, Cheng GY, Wang YL, Ning JN, Chen T, Li J, Hao HH, Yuan ZH. Research progress of the mainly bacterial efflux pumps and related regulator[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2017, 48(11): 2023-2033 (in Chinese)
高海娇, 程古月, 王玉莲, 宁佳囡, 陈婷, 李俊, 郝海红, 袁宗辉. 细菌主要外排泵及其调控蛋白研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(11): 2023-2033