

## • 基础实验研究论著 •

## 福氏 2a 志贺菌 C0719 RNA 基因突变体的构建

李娜<sup>1,2</sup>, 王恒樑<sup>2</sup>, 朱力<sup>2</sup>

(1. 海军总医院检验科, 北京 400037; 2. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要:**目的 构建福氏 2a 志贺菌 301 株已验证的但是功能未知的 C0719 基因突变体, 以进行 C0719 RNA 功能研究。方法 根据福氏 2a 志贺菌 301 株基因组全序列, 采用  $\lambda$ -Red 重组系统对 C0719 RNA 基因进行缺失, 并经 PCR 验证; 对野生株和 C0719 缺失突变株 37 °C 时的生长曲线及生化反应进行比较研究; 对野生株和 5 个 sRNAs 缺失突变株进行蛋白质组的比较研究; 同时利用毒力侵袭模型来评价突变株毒力。结果 构建了 C0719 缺失突变株; 突变株初始生长均较慢, 但最终和野生株状态一致; 对构建成功的 C0719 缺失突变体进行生化特性分析, 结果表明和野生株相比, 301 $\Delta$ C0719 株利用棉子糖的能力比野生株强一些; 对 C0719 缺失突变体进行了比较蛋白质组分析。结论 获得了福氏 2a 志贺菌 301 株 C0719 基因突变体, 为深入研究 sRNA 基因的功能奠定了基础。

**关键词:** 志贺菌, 弗氏; 基因; 突变; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2221-03

Construction of C0719 RNA gene mutants of *Shigella flexneri* 2aLi Na<sup>1,2</sup>, Wang Hengliang<sup>2</sup>, Zhu Li<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 400037, China;

2. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

**Abstract:** **Objective** To construct C0719 deletion mutants of *Shigella flexneri* 2a strain 301 for exploring the function of sRNAs in *S. flexneri* 2a strain 301. **Methods** According to the complete genome sequence of *S. flexneri* 2a strain 301, the sRNA gene was deleted by using  $\lambda$ -Red recombination system, and confirmed by PCR. Growth of the mutant and wild strain at 37 °C were measured respectively, and some biochemical events of them were comparatively investigated. **Results** The sRNA deletion mutant of *S. flexneri* 2a strain 301 were constructed. The mutant grew slower than wild strain at the initial period, and ultimately they showed the consistent growth state. We analysed the biochemistry characteristics of five deletion mutants. The capability to utilizing raffinose of C0719 deletion mutant was more than wild strain. We also analysed the comparative proteomics of the C0719 deletion mutant. **Conclusion** The C0719 deletion mutant of *S. flexneri* 2a strain 301 are obtained. This research will be helpful to study the functions of sRNA gene.

**Key words:** shigella flexneri; genes; mutation; polymerase chain reaction

志贺菌属细菌通称痢疾杆菌, 是一类具有高度传染性的革兰氏阴性肠道致病菌。流行病学调查发现, 在发展中国家, 福氏志贺菌(*S. flexneri*)感染尤为严重。据世界卫生组织公告报道, 全球每年菌痢患者达 1.647 亿, 有 1.632 亿分布于发展中国家, 在我国, 菌痢发病率也很高, 其严重危害了我国人们的健康<sup>[1]</sup>。因此对痢疾杆菌进行研究具有重要的意义。我国科学家于 2000 年率先完成了第一株福氏志贺菌(*S. flexneri* 2a 301 株)的全基因组序列分析<sup>[2]</sup>。2003 年, 美国威斯康星大学完成了另一株福氏志贺菌 2a 2457T 的全基因组测序分析<sup>[3]</sup>, 在此基础上, 研究者于 2003 年率先完成了痢疾杆菌的蛋白质组全谱研究, 并陆续开展了痢疾杆菌的功能蛋白质组学研究<sup>[4]</sup>。但是这些研究主要集中对痢疾杆菌开放阅读框(mRNA)的研究, 而对于基因组中非编码的小 RNA 的研究却很少。在细菌基因组中鉴定到许多长度为 50~400nt 并且不翻译成蛋白质的非编码小 RNAs, 简称小 RNA(sRNAs)或非编码 RNAs(ncRNAs)。小 RNAs 作为一类新发现的基因表达调控子已经引起了高度的重视。Griffin 等<sup>[5]</sup>在 1971 年首先在大肠杆菌中发现 sRNAs 分子, 但是这些 RNA 分子的编码基因以及它们的功能都不清楚。2003 年, Hershberg 等<sup>[6]</sup>用在大肠杆菌基因组中鉴定的 55 个 sRNAs 基因与福氏 2a 志贺菌基因

组进行同源比对, 其中的 52 个都能在大肠杆菌基因组中找到同源序列; 2007 年, Urban 等<sup>[7]</sup>通过构建 sRNAs 表达载体研究大肠杆菌 sRNAs 的表达和调控, 为进一步研究其他种属的 sRNAs 的功能提供了很好的方法。研究者将上述预测的大肠杆菌基因组上的 sRNAs 与 sanger 中心网站 (<http://www.sanger.ac.uk>) 列出的在痢疾杆菌中鉴定到的 sRNAs 进行比较, 发现 sanger 中心所列的 11 个功能未知 sRNAs 都在预测的染色体编码 sRNAs 之中。因此, 研究者首先选取上述 11 个染色体编码 sRNAs 中的 C0719 RNA 利用  $\lambda$ -Red 重组系统<sup>[9]</sup>进行缺失突变体的构建并进行 sRNA 功能研究。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 福氏 2a 志贺菌野生株 301 为本实验室保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司。质粒 Pmd18-T 购自 TaKaRa 公司; pET-22b 购自 Novagen 公司; pKD46(温度敏感型, 含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*, *bet*, *gam* 基因和氨苄青霉素抗性基因)、pKD4(含有两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因)。pAK 为本研究室自行构建的低拷贝质粒, 含卡那霉素抗性基因)。豚鼠和 B/C 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。IPG 干胶条、蛋白纯化试剂盒(Plus One 2- D Clean-Up Kit)、蛋白定量试剂盒(2- D Quant Kit) 购自 Amersham-

Pharmacia 公司;蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitor cocktail-ablet) 购自 Roche 公司。

**1.2 sRNAs 缺失突变体的构建** 综合痢疾杆菌基因组上的 sRNAs 与 sanger 中心网站 (<http://www.sanger.ac.uk>) 列出

的在痢疾杆菌中鉴定到的 sRNAs 进行比较,选取 C0719 RNA 进行缺失突变体的构建。根据 NCBI 上福氏 2a 志贺菌 301 株全基因组序列 (NC\_004337) 中的 C0719 基因及上、下游同源臂序列,采用 Primer 5.0 分析软件设计引物见表 1。

表 1 引物列表

引物	序列	酶切位点
C07195p1	5'- CGG GAT CCC ACC AAA GGA GAA ACC AAT C - 3'	BamH I
C07195p2	5'- GCG TCG ACC AGT TCA GTC CTC TTT TGC - 3'	Sal I
C07193p1	5'- CCA AGC TTC TAC CGC AGT TAC TAT CAT AGC - 3'	HindIII
C07193p2	5'- CCC TCG AGA GAC CGA GTT CAG TGC TG - 3'	Xho I

以 pKD4 为模板,用引物 K1、K2 扩增质粒上两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因。PCR 产物经 Sal I 和 Hind III 双酶切后,与经同样双酶切的 pET- 22b 载体连接,验证正确后命名为 pETkan。在 C0719 基因的上游(N 端)和下游(C 端)各设计一对引物,即 C07195P1 / C07195P2 和 C07193P1 / C07193P2,分别从该基因的上游和下游扩增长约 600 bp 的基因片段作为线性打靶 DNA 片段(长同源臂突变盒)的同源臂 H1 和 H2。为方便后续的长同源臂突变盒构建,在上游同源臂 H1 的引物末端分别加上限制性酶切位点 BamH I 和 Sal I,在下游同源臂 H2 的引物末端分别加上限制性酶切位点 HindIII 和 Xho I。将含有 pKD46 质粒的 301 株于 30 °C 培养至 D600 nm 值为 0.5~0.6,制备电转化感受态,并在 D600 nm 值达到 0.5~0.6 前 1 h 加入终浓度为 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖,诱导 Red 基因重组系统的表达。通过 PCR 扩增上述构建的长同源臂打靶 DNA 片段,电击转化至含有 pKD46 的 301 株感受态细胞中(电击参数:电阻 200 欧姆,电容 25 微法,电压 2.5 千伏)。复苏 1~2 h,然后涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板,并于 30 °C 培养约 24 h,长出的阳性克隆即为带有卡那霉素抗性的缺失突变株。将筛选到的阳性克隆转入液体 LB 培养基中,42 °C 培养 12 h 左右去除 pKD46 质粒,即可获得含卡那霉素抗性的 301ΔC0719::kan 突变体。

**1.3 突变株与野生株生长状态的测定** 从 LB 平板上挑取 301ΔC0719::kan 缺失株与 301 野生株单菌落,分别接种于 5 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中过夜培养,以 1 : 100 转接于 100 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中,于 37 °C 同步培养,每隔 1 h 取样测定 D600 nm 值,测定其生长状态。

**1.4 突变株与野生株部分生化特性比较** 用接种针从新鲜培养平板上挑取单菌落至 5 mL 含 0.85% NaCl 的培养基中,配制成均一的菌悬液,然后用吸管将细菌悬液加到生物梅里埃公司的 API 20E 生化鉴定试剂条上,盖上盖子,于 37 °C 孵育 24 h。参照说明书判读结果,试剂呈黄色为阳性反应,蓝色或蓝绿色为阴性反应。从新鲜的培养平板上挑取几个一致菌落,转接至含有 10 mL API 50CB/E 的培养基中,仔细混匀制成浊度相当于 2Mc Farland 的均一细菌悬液,然后用吸管将此细菌悬液滴入生物梅里埃公司的 API 50CH 生化鉴定试剂条中,用灭菌的石蜡油封好,盖上盖子,37 °C 孵育 24 h 后观察,参照说明判读结果。

**1.5 突变株与野生株毒力比较** 分别用相同量的 301 野生株和 301ΔC0719::kan 菌体均匀涂在豚鼠的角膜上,24 h 后观察角膜病变情况。

**1.6 突变株与野生株蛋白表达差异的比较** 全菌蛋白样品的

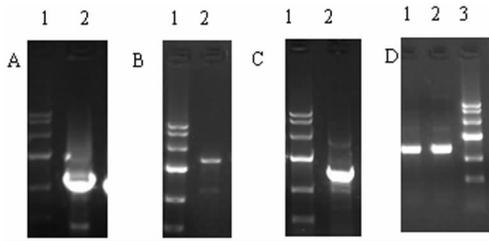
制备:挑取福氏 2a 志贺菌 301 野生株和 301ΔC0719::kan 突变株的单菌落至 5 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、225 r / min 振荡培养 12 h,再按照 1 : 100 的比例接种于无抗性的新鲜 LB 培养基中,37 °C 振荡培养 12 h;4 °C、8 000 r / min (SIGMA 3K12, Nr. 12150) 离心 10 min 收集菌体,用预冷的低盐清洗缓冲液 (3 mmol / L KCl, 1.5 mmol / L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68 mmol / L NaCl, 9 mmol / L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 洗菌体 4 次;将细胞沉淀重悬于 5 mL 裂解液中 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 40 g/L CHAPS, 10 g/L DTT),加入半片蛋白酶抑制剂,冰浴超声 4 min (脉冲 2 s, 停 2 s, 最大功率的 25%);超声后加入 1.25 mg RNaseA、50 U RQ1 DNase 和 50 μL IPG 缓冲液 (pH 4~7);于室温放置 1 h, 26 000 r / min (SIGMA 3K30, Nr. 12154) 离心 30 min 去除不溶性沉淀;取上清液用蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度使用蛋白纯化试剂盒纯化全菌蛋白样品进行双向电泳实验。等电聚焦使用预制的 18 cm IPG 胶条,使用胶面向上放置的电泳槽进行等电聚焦,并在两极加放厚滤纸片。等电聚焦结束后在含 10 g/L DTT 的平衡缓冲液中平衡 15 min,在含 25 g/L 碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15 min。采用垂直板电泳槽行 SDS-PAGE (12.5% 丙烯酰胺);用胶体考马斯亮蓝染色方法染色过夜,以 1% 乙酸溶液脱色至背景干净后扫描胶图。

**1.7 蛋白质鉴定** 本研究主要采用本地化的 Mascot 程序,使用格式化的福氏 2a 志贺菌 301 株数据库进行肽质量指纹图谱检索;并辅以 Matrix Science 网站 (<http://www.matrix-science.com>) 提供的 NCBI nr 数据库进行检索。检索时,可接受的肽段相对分子质量误差为 0.2。氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl (C) 修饰,可能的修饰方式选 Oxidation (M) 修饰。本地运行的 Mascot 数据库查询结果的有效值为 49 分以上;Matrix Science NCBI nr 数据库查询结果的有效值为 79 分以上。

**2 结 果**

**2.1 301ΔC0719::kan 缺失突变体的构建与验证** 将获得的基因缺失突变株于 37 °C 培养过夜,以 C07195P1 与 C07193P2 为外部鉴定引物,进行 PCR 验证;设计 kan 基因内部分别与基因组上 C0719 基因上下游同源臂以外的一段基因配对引物,进行 PCR 验证并测序检测,结果见图 1。如突变体构建成功,当用外部引物进行检测时,野生株的扩增产物大小应为 1 100 bp 左右图 1-A;当卡那霉素抗性基因替换掉目的基因后,突变株的扩增产物大小应为 2 500 bp 左右图 1-B;当使用卡那霉素抗性基因的引物进行检测时,应当只有抗性基因替换目的基因后获得的突变株能够得到 1 512 bp 的扩增产物图 1-C;从图中可以看出,电泳结果与预期完全一致,说明 C0719 基因缺失突

变株构建成功。



A:野生株 C0719 外部引物扩增; B:突变株 C0719 外部引物扩增; C:突变株卡那霉素抗性基因引物扩增; D:基因组与 kan 配对引物扩增。

图 1 301ΔC0719 缺失突变株的 PCR 验证

**2.2 突变株与野生株生长状态的测定** 使用 LB 液体培养基,将野生株 301、突变株在 37 °C 下同步培养,每隔 1 h 测定一次 D600 nm 值,绘制生长曲线见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。可见 C0719 缺失株它们的生长曲线与野生株 301 相比 C0719 的缺失并没有对菌株的生长造成明显的改变。

**2.3 突变株与野生株的生化特性比较** 对构建成功的 C0719s RNA 缺失突变体进行生化特性分析,结果表明和野生株相比,C0719 的缺失只是在利用棉子糖的能力相对于野生株稍强一些,因此可以认为 C0719 的缺失并没有对菌株的生化代谢造成明显影响。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)

**2.4 突变株与野生株毒力的比较** 挑取 301ΔC0719::kan 野生株与 C0719 突变株单菌落至 5 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、225 r/min 振荡培养 12 h,测定 D600 nm 值,分别离心收集相同活菌数涂豚鼠角膜。分别观察 6、8、24、48 h 豚鼠角膜变化。结果表明个突变株和野生株的表现一致,24 h 引起角膜炎症反应,48 h 都造成了角膜脱落。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)

**2.5 全菌蛋白样品的双向电泳图谱** 使用 pH 4~7 和 pH 6~11 的胶条对全菌蛋白样品进行分离,在电泳图中可以分辨出 12 个以上的蛋白点。见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)

**2.6 质谱鉴定结果** 使用 MALDI-TOF MS 共鉴定到 12 个蛋白点对应于 12 种蛋白质。这些蛋白的质谱鉴定结果见表 2。

表 2 标注差异蛋白点的质谱鉴定结果

蛋白点	分值(分)	GI 编号	基因	同义名	序列覆盖率(%)	匹配肽段数
N001	171	gi 24112004	gltA	SF0577	74	34
N002	95	gi 223035	—	—	70	17
N003	110	gi 2257579	—	—	91	27
N004	96	gi 110804972	—	—	70	32
N005	74	gi 16128695	—	—	50	27
N006	193	gi 24113001	fumA	SF1635	44	16
N007	136	gi 24113001	fumA	SF1635	49	19
N008	236	gi 24113001	fumA	SF1635	44	19
N009	113	gi 24112004	gltA	SF0577	46	23
N010	42	gi 24115621	slt	SF4424	18	10
N011	67	gi 24113119	—	SF1765	59	10
N012	45	gi 24113917	srmB	SF2638	24	9

—:无数据。

### 3 讨论

小 RNAs 作为一类新发现的基因表达调控子已经引起了高度的重视。随着近几年研究的不断深入,已经在大肠杆菌中发现了近 80 种 sRNAs,并且逐步揭示了 sRNAs 的功能<sup>[8]</sup>。本研究中通过 λ-Red 重组系统进行了福氏 2a 志贺菌 301 株已验证的但是功能未知的 sRNAs 基因缺失突变体的构建。通过将目的基因缺失,然后分析突变株与野生株之间的表型差异,结合相应的功能基因组学方法,研究该基因与其他基因间相互关系的改变,获得与该基因功能相关的一些信息,以达到阐明该基因功能的目的<sup>[9-10]</sup>。研究者通过对突变体和野生株进行蛋白质组的比较研究,同时利用构建毒力侵袭模型来评价突变株毒力,寻找到有重要调控功能的 sRNAs,并明确部分 sRNAs 与痢疾杆菌致病性之间的关系。研究表明 C0719 这个 sRNA 基因的缺失突变并未引起福氏 2a 志贺菌毒力的变化,同时也没有对福氏 2a 志贺菌的生长及生化特性造成很大的影响。研究构建成功的这个 C0719 sRNA 基因的缺失突变株可以用于进一步的基因功能的研究。

### 参考文献

- [1] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies [J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(8): 651-666.
- [2] Jin Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157 [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(20): 4432-4441.
- [3] Wei J, Goldberg MB, Burland V, et al. Complete genome sequence and comparative genomics of Shigella flexneri serotype 2a strain 2457T [J]. Infect Immun, 2003, 71(5): 2775-2786.
- [4] Liao X, Ying T, Wang H, et al. A two-dimensional proteome map of Shigella flexneri [J]. Electrophoresis, 2003, 24(16): 2864-2882.
- [5] Griffin BE. Separation of 32P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of '4.5 S' and 5 S from E. coli [J]. FEBS Lett, 1971, 15(3): 165-168.
- [6] Hershberg R, Altuvia S, Margalit H. A survey of small RNA-encoding genes in Escherichia coli [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(7): 1813-1820.
- [7] Urban JH, Vogel J. Translational control and target recognition by Escherichia coli small RNAs in vivo [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(3): 1018-1037.
- [8] Livny J, Brencic A, Lory S, et al. Identification of 17 Pseudomonas aeruginosa sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2 [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(12): 3484-3493.
- [9] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [10] Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, et al. Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis [J]. Science, 1999, 285(5429): 901-906.

(收稿日期: 2013-04-13)