

采用同源重组技术构建金黄色葡萄球菌 *sae* 基因缺失突变株

唐俊妮¹, 康铭松², 周锐², 史贤明³, 陈焕春²

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 2. 华中农业大学 农业微生物国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 3. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 针对金黄色葡萄球菌 *sae* 基因前后两段序列设计两对引物, PCR 扩增出 *sae* 基因上下游同源臂序列, 克隆到穿梭载体 pBT₂ 中; 两段序列之间用来自质粒 p646 的 Em 抗性基因片段连接, 作为筛选标记, 从而构建同源重组穿梭质粒 pBT₂Δ*sae*; 将 pBT₂Δ*sae* 电转化到金黄色葡萄球菌菌株 RN4220 中, 40℃ 经过七轮培养, 进行抗性培养基筛选和 PCR 验证, 以及 RT-PCR 观察基因表达水平。获得一株金黄色葡萄球菌 *sae* 基因缺失突变株 RNΔ*sae*, 为进一步研究 *sae* 基因的调控机制等提供有用的实验材料。

关键词: 金黄色葡萄球菌; *sae* 基因; 同源重组; 突变株构建

中图分类号: Q 812 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)07-0698-05

Construction of a *Sae*-Deleted Mutant of *Staphylococcus aureus* by Homologous Recombination

TANG Jun-ni¹, KANG Ming-song², ZHOU Rui², SHI Xian-ming³, CHEN Huan-chun²

(1. College of Life Science and technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Division of Animal Infectious Diseases in State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

Abstract: In this study, two pairs of primers were designed according to the upstream and downstream sequence of *sae* gene and used to amplify the homologous arms by PCR. Then the upstream and downstream homologous arms were cloned into the shuttle vector pBT₂ with the Em resistance gene fragment from the plasmid p646 inserted as a selection marker between the two sequences. The plasmid pBT₂Δ*sae* was constructed. The homologous recombination vector was subsequently transformed into *S. aureus* RN4220 by electroporation, *S. aureus* RNΔ*sae* deletion mutant was successfully selected by homologous recombination at 40 °C and confirmed by PCR. Subsequently, the *sae* gene expression level was also valuated by RT-PCR. This study provided the useful tool for further exploring the regulation mechanism of *sae* gene in *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *sae* gene; homologous recombination; mutant construction

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071515); 四川省杰出青年学术技术带头人培育计划项目(2011JQ0043); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(11NZYTH08)

作者简介: 唐俊妮(1971-), 女, 湖北枣阳人, 副研究员, 主要从事食品微生物与食品安全研究。E-mail: junneytang@yahoo.com.cn

金黄色葡萄球菌是一个重要的病原菌,致病机制复杂,引起感染的主要原因是其能够分泌几十种不同的外毒素、酶和细胞表面蛋白,在感染的过程中涉及到这一系列胞外蛋白和细胞壁结合蛋白等毒力因子的协调表达^[1]。这些调控位点的相互作用决定着许多不相邻目标基因的表达,因此,调节基因形成立体调控网络,可同时激活多种毒力基因的表达。金黄色葡萄球菌的毒力就是由多种基因和蛋白质相互反馈形成的立体网络系统共同作用的结果。

sae 基因是金黄色葡萄球菌毒力因子的重要调节子之一。*sae* 基因座是一个双组分调节系统,由两个共转录基因:*saeR*(687 bp)和 *saeS*(1 062 bp)组成,其间被两个核苷酸分开^[2]。双组分信号转导系统 *saeRS* 是金黄色葡萄球菌引起感染所必须的调节元^[3]。*saeRS* 调节涉及到粘附和入侵基因的表达(如编码纤维结合蛋白和纤维蛋白素原结合蛋白)以及-溶血素、-溶血素、-溶血素等相关蛋白的表达^[4,5,6]。*sae* 基因与其它结构基因之间的关系尚有待于进一步研究。因此,本研究利用温敏性穿梭质粒 pBT₂ 构建同源重组质粒 pBT₂Δ*sae*,通过电转化进入金黄色葡萄球菌 RN4220 菌株,利用该质粒对温度敏感的特点,含有重组质粒的金黄色葡萄球菌 RN4220 在 40℃ 多次传代,最终筛选出了一株金黄色葡萄球菌 *sae* 缺失菌株,为进一步研究 *sae* 基因与毒力因子的相互作用和了解 *sae* 基因调节机制的精确知识打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *E. coli* DH5α 由作者所在实验室保存;金黄色葡萄球菌 *S. aureus* RN4220(出发菌株,在含 Em(2.5 μg/mL)和 Cm(10 μg/mL)抗性平板上不生长)由 Dr. Karen Battista 惠赠(International Association for Food Protection, North America);质粒 pBT₂ (Amp^r 和 Cm^r)由 Brückner, R. 惠赠(University of Kaiserslautern);质粒 p646(Emr)由华中农业大学微生物重点实验室赵昌明博士提供。

1.1.2 培养基 LB 液体和固体培养基;BM 液体和固体培养基。

1.1.3 主要试剂 DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒及限制性核酸内切酶 (*Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I)购自大连宝生物(TaKa-Ra)公司,T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司,氨苄青霉素(Amp),氯霉素(Cm),红霉素(Erm)等购自晶美生物公司。

1.1.4 引物 表 1 为作者所在实验室所用引物。

表 1 用于扩增相关基因的引物

Tab. 1 Primer pairs used to amplify related genes

| 引物名称 | 引物序列 (5'-3') | 大小 (bp) |
|--------------------|--|---------|
| <i>sae</i> F1 | 5'-CgT ACg gAA TTC gTA TTA CgT Tgg CAT TTA gC-3' | 1 293 |
| <i>sae</i> F2 | 5'-CgC Tag ggA TCC ACT TTA Tgg gTA TCC TTC TC-3' | |
| <i>sae</i> B1 | 5'-CgT ACg ggA TCC CTC TgT TCT TAC gAC CTC TA -3' | 1 185 |
| <i>sae</i> B2 | 5'-CgC Tag CTg CAg AgT Tgg TgC TgT TgC CTC Tg -3' | |
| <i>saeS</i> -in-01 | 5'-ATC gAA CgC CAC TTg AgC | 235 |
| <i>saeS</i> -in-02 | 5'-CCT AAT CCA gAA CCA CCC | |

1.2 同源重组载体 pBT₂Δ*sae* 的构建

分别用引物 *sae*F1、*sae*F2 及 *sae*B1、*sae*B2 进行 PCR 扩增,获得 *sae* 基因的上下游同源片段,再以 *Eco*RI、*Bam*HI 及 *Bam*HI、*Pst*I 分别双酶切 *sae* 基因上下游片段和 pBT₂ 载体,回收后用 T4 DNA 连接酶进行连接、转化入大肠杆菌 DH5α,用含 Amp^r 的 LB 固体培养基筛选和鉴定。将测序正确的阳性克隆分别命名为:pBT₂-*sae*F 和 pBT₂-*sae*F-*sae*B。进一步用 *Bam*HI 酶切载体 p646,获得红霉素片段(1 500 bp),经过与 pBT₂-*sae*F-*sae*B 连接和转化筛选出阳性克隆,最终的同源重组载体命名为 pBT₂Δ*sae*。

1.3 *S. aureus* RN4220Δ*sae* 的筛选

采用电转化方法将重组穿梭质粒 pBT₂Δ*sae* 导入金黄色葡萄球菌 RN4220 菌株中,通过温度和红霉素抗性压力进行同源重组。具体操作如下:挑取含重组质粒的金黄色葡萄球菌单菌落于 BM(Cm 20 μg/ml)的液体培养基中,37℃ 过夜培养。取 1 mL 菌液接种于新鲜的 100 mL BM(Em 2.5 μg/mL)的液体培养基中,40℃,振荡培养 24 h。共重

复7次,每天按1:100接种于新鲜的100 mL BM (Em 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体培养基中,40 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h (200 r/min)。最后一轮,取1 mL菌液加入100 mL不含抗生素的BM液体培养基中,40 $^{\circ}\text{C}$,摇菌24 h。取该瓶中的100 μL 菌液以10倍梯度稀释,稀释到 10^{-7} 后,取适量的稀释菌液涂布于含Em 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LB平板上,37 $^{\circ}\text{C}$,过夜培养。挑取单菌落分别点到含有Em 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BM平板上和Cm 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BM平板上相应的位置上,过夜培养。其中在Em 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LB平板上生长,而在Cm 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LB平板上不能生长为初步筛选的金黄色葡萄球菌 *sae* 缺失突变株^[7]。最终 *erm* 片段重组于 *S. aureus* RN4220 基因组中替换 *sae* 基因片段,获得 *S. aureus* 的 *sae* 基因缺失菌株,并将阳性菌株命名为 *S. aureus* RN4220 Δ *sae* (简称RN Δ *sae*)。

1.4 PCR 分析

以提取的金黄色葡萄球菌缺失突变株和亲本株的基因组DNA为模板,应用 *sae* 基因内部引物 *sae*-in-01 和 *sae*-in-02 进行PCR扩增。PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测,以DL 2000 DNA Marker为对照,确认反应产物。

1.5 RT-PCR 分析

以提取的金黄色葡萄球菌缺失突变株和对照菌株的RNA(经DNaseI消化)为模板,首先反转录为cDNA,再以cDNA为模板,以引物 *sae*-in-01 和 *sae*-in-02 进行RT-PCR扩增。取10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测,以DL 2000 DNA Marker为对照,确认反应产物。

2 结果与分析

2.1 *sae* 基因上下游同源片段的PCR扩增

根据GenBank金黄色葡萄球菌全基因组序列中 *sae* 上下游序列设计的引物 *sae*F 和 *sae*B,使用Taq酶扩增 *sae* 基因同源臂这两段序列,PCR产物经质量分数1%的琼脂糖凝胶电泳(图1),扩出条带的分子量与预期吻合,分别为1 293 bp(上游:*sae*F)和1 185 bp(下游:*sae*B)。

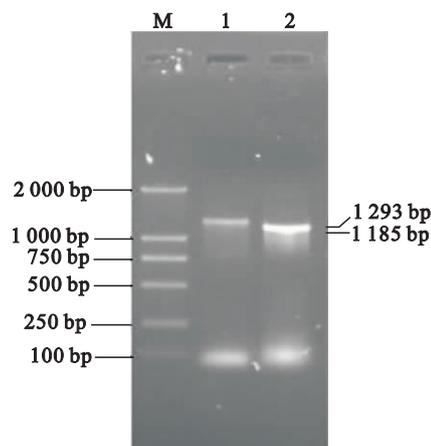
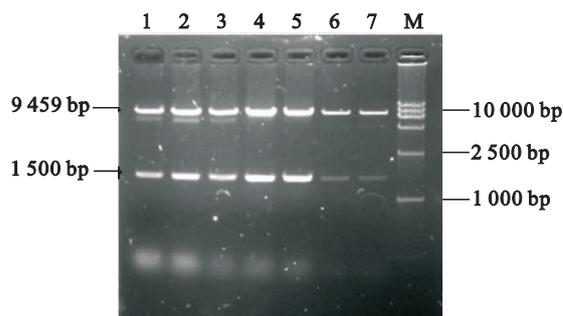


图1 *sae* 基因上下游同源臂的PCR扩增 1:上游片段(*sae*F;1 293 bp);2:下游片段(*sae*B;1 185 bp)M;200 bp DNA ladder

Fig. 1 PCR amplification of the upstream and downstream fragments of *sae* gene 1, upstream fragment (1 293 bp); 2, downstream fragment (1 185 bp); M, 200 bp DNA ladder

2.2 同源重组质粒 pBT2 Δ *sae* 的构建及鉴定结果

将PCR扩增的 *sae*F(上游)克隆入pBT2载体中,经限制性内切酶(BamH I 和EcoR I)后得到1 293 bp的DNA片段和6.97 kb的质粒片段,证明重组质粒为pBT2-*sae*F;将PCR扩增的 *sae*B(下游)克隆入pBT2-*sae*F载体中,经限制性内切酶(BamH I 和Pst)双酶切和BamH I单酶切后,分别得到1 185 bp的DNA片段和8 263 bp的片段(双酶切),单切得到9 448 bp的片段,证明重组质粒pBT2-*sae*F-*sae*B构建正确;将BamH I酶切的红霉素片段插入到pBT2-*sae*F-*sae*B载体中,经BamH I酶切后得到1 500 bp和9 459 bp的片段(图2),证明为阳性克隆,经过以上步骤获得同源重组质粒并命名为pBT2 Δ *sae*。



M: DL15000 Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7-the selected recombinant plasmids-pBT2 Δ *sae* digested by BamH I

图2 重组质粒 pBT2 Δ *sae* 酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pBT2 Δ *sae* by BamH I digestion

2.3 金黄色葡萄球菌 *sae* 缺失突变株的获得

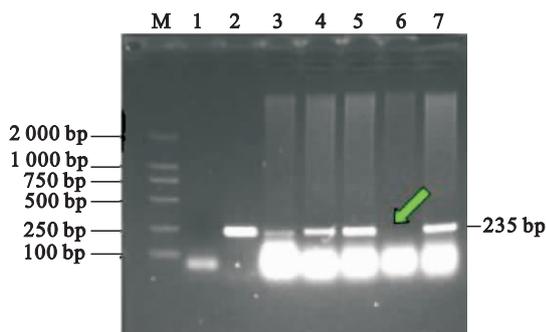
含重组质粒的金黄色葡萄球菌 RN4220 经过 40 °C, 7 次传代, 重组质粒在此过程中逐渐丢失并逐渐实现同源基因的替换。基因替换成功菌株的质粒完全丢失, Em 抗性基因替换 *sae* 基因的全部序列, 因此能在含 Em (2.5 μg/mL) 平板上生长。质粒本身所含的 Cm 抗性基因却因质粒完全丢失而使宿主菌对 Cm 敏感, 在含 Cm (10 μg/mL) 平板上不生长。通过挑选 354 个单菌落, 最后得到了 5 株对 Cm 敏感, 对 Em 具有抗性的菌株 (39、66、91、95 和 116 号)。初步表明这 5 株菌株可能产生双交换。5 株菌在对应的 Cm 平板和 Em 平板上划线, 进一步确认这 5 株菌确实对 Cm 敏感, 而对 Em 具有抗性 (见图 3)。



图 3 重组菌落在 Cm 平板和 Em 平板上划线生长情况
Fig. 3 The selected seven colonies (No. 39, 66, 91, 95 and 116) were Cm-sensitive and Em-resistant

2.4 金黄色葡萄球菌 *sae* 缺失突变株的 PCR 鉴定

挑选在 Em 的平板上生长在 Cm 平板上不生长的 5 株菌落, 接液体 LB 培养基, 提取基因组, 应用 *sae* 基因内部引物 *sae*-in-01 和 *sae*-in-02 扩增基因组上 *sae* 基因, PCR 产物经质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 如图 4, 泳道 6 的第 95 号菌株无 *sae* 扩增片段, 初步证实该菌的 *sae* 基因已缺失, 命名为 RN4220 *sae*。

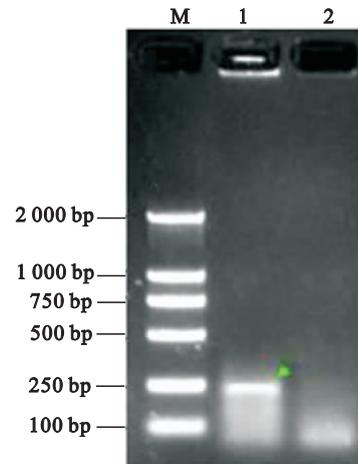


M: DL2000 Marker; 1, 阴性对照; 2, 阳性对照; 3, 39; 4, 66; 5, 91; 6, 95; 7, 116。其中 95 号未扩出 *saeS* 基因

图 4 金黄色葡萄球菌 *sae* 缺失突变株的 PCR 鉴定
Fig. 4 Identification of *S. aureus sae* deletion mutant by PCR

2.5 金黄色葡萄球菌缺失突变株和对照菌株的 *sae* 基因 RT-PCR 分析

以筛选到的 95 号菌和 RN4220 菌株提取的 RNA 为反转录模板, 进行 RT-PCR, 其结果如图 5, 1 号为对照菌株 RN4220 的 RT-PCR 结果, 2 号为筛选到的突变株 (95 号) 的 RT-PCR 结果。2 号未扩增出 *sae* 基因带, 表明 *sae* 基因没有在 95 号菌株中转录表达, 从侧面反映了 *sae* 基因的成功敲出。



M: 相对分子质量标准; 1: 对照菌株; 2: 筛选到的突变株 (95 号)
图 5 突变株和对照菌株的 RT-PCR 结果
Fig. 5 agarose gel electrophoresis showing the amplicons obtained after RT-PCR amplification of the parent strain and the mutant samples following RNA extraction

3 结 语

近几年来, 金黄色葡萄球菌一直是医院感染和食源性疾病的重要病原体之一^[8]。对金黄色葡萄球菌感染进行有效的治疗和控制, 必须明确其毒力因子、致病机理和调节机制。*sae* 基因是金黄色葡萄球菌重要调节系统之一, 对它的研究还处于起步阶段。目前, 人们已经逐渐认识到 *sae* 在金黄色葡萄球菌致病中的重要性, 如 *sae* 是 *hla* (编码 α-毒素) 的转录所必须的^[5,6]; *sae* 对 Eap 和 Emp (金黄色葡萄球菌细胞表面配基, 与吸附和侵入有关) 表达有影响^[9]; 以及 *sae* 与其它基因相互作用共同调节毒力基因的表达等。因此构建金黄色葡萄球菌 *sae* 基因缺失菌株具有必要性和重要性。

为了对金黄色葡萄球菌 *sae* 基因进行敲出, 本研究在构建重组质粒时分别在金黄色葡萄球菌 *sae*

的上下游设计两对引物,扩增与 *sae* 上下游同源臂序列,克隆到载体 pBT₂ 中。两段序列之间用 Em 抗性基因片段连接,作为筛选标记,载体 pBT₂ 自身含有 Amp(*bla*)和 Cm(*cat*)抗性基因,这两个抗性基因在构建重组质粒过程中非常关键,Amp 能在 G⁻ 菌中较好表达,用于在 DH-5 中的克隆筛选;Cm 抗性基因可以用于 G⁺ 菌中筛选,成功建立金黄色葡萄球菌的基因重组构建平台。

作者通过对缺失突变株采用内部引物扩增法进行鉴定,采用 RT-PCR 进行基因表达水平的观

察,初步证明了突变株的构建成功。后续研究还需进一步确认同源重组区引物或外部引物扩增产物的长度变化和测序数据。

金黄色葡萄球菌 *sae* 突变株的成功获得,为进一步研究 *sae* 基因与毒力相关蛋白,*sae* 基因与重要的结构基因表达关系以及 *sae* 基因的调控机制等方面提供良好的实验工具。*sae* 基因和金黄色葡萄球菌致病性之间的关系明确,也对指导金黄色葡萄球菌的感染和药物的合理应用等都有重要的意义。

参考文献(References):

- [1] Arvidson S, Tegmark K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*[J]. **International Journal of Medical Microbiology**, 2001, 291 (2): 159-170.
- [2] Giraud A T, Calzolari A, Cataldi A A, et al. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1999, 177 (1): 15-22.
- [3] Mainiero M, Goerke C, Geiger T, et al. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saeRS*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2010, 192 (3): 613-623.
- [4] Adhikari R P, Novick R P. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus[J]. **Microbiology**, 2008, 154 (Pt 3): 949-959.
- [5] Xiong Y Q, Willard J, Yeaman M R, et al. Regulation of staphylococcus aureus alpha-toxin gene (*hla*) expression by *agr*, *sarA*, and *sae* in vitro and in experimental infective endocarditis[J]. **The Journal of Infectious Diseases**, 2006, 194 (9): 1267-1275.
- [6] Tang J N, Kang M S, Chen H, et al. The influence of *sae* locus knock-out on exoproteins in staphylococcus aureus[J]. **Journal of Food Safety**, 2010 (3), 30: 711-720.
- [7] Brückner R. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1997, 151 (1): 1-8.
- [8] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 杨小鹏食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2011, 30 (1): 84-89.
XU Xiao-ke, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Studies on detection of staphylococcus aureus in foods by mutltiplex PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30 (1): 84-89. (in Chinese)
- [9] HARRAGHY N, KORMANEC J, WOLZ C, et al. *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp[J]. **Microbiology**, 2005, 151 (Pt 6):1789-1800.