

论著

插入失活法构建 2 型猪链球菌突变株

路玲玲^{1,2} 李 蓉¹ 李文君² 袁 媛² 郑玉玲² 王恒樑² 姜永强²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;

2. 军事医学科学院病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071)

摘要:目的 构建 2 型猪链球菌突变株 05ZY 0913,05ZY 0936。方法 以 05ZY 为模版,分别扩增 0913、0936 基因内部 504 bp,549 bp 片段为同源臂,与 pSET4S 质粒进行连接,将连接产物转入 DH5 感受态细胞中,构建载体 0913-pSET4S,0936-pSET4S。然后利用插入失活法,将构建的 0913-pSET4S、0936-pSET4S 载体通过电转化导入 2 型猪链球菌的感受态细胞中,利用壮观霉素抗性筛选得到阳性转化子,并用 PCR 进行鉴定。结果 筛选到的菌株均能抵抗 100 μg/ml 壮观霉素,经 PCR 鉴定,为失活了目的片段(0913 和 0936 片段)的 2 型猪链球菌突变株。结论 本研究成功构建了 2 个突变株,为进一步研究目的片段的基因功能奠定了基础。

关键词:链球菌;猪;基因沉默;诱变;插入

Construction *Streptococcus Suis* Type 2 Mutant Strains by Insertional Inactivation

LU Ling-ling, LI Rong, LI Wen-jun, YUAN Yuan, ZHENG Yu-ling, WANG Heng-liang, JIANG Yong-qiang
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To construct the mutant strains of *Streptococcus suis* type 2—05ZY 0913, 05ZY 0936. **Method** Using the genomic DNA of 05ZY as the template, 504 bp, 549 bp fragments in the 0913, 0936 were amplified respectively as homologous arms, and linked with pSET4S, and then the linked products were transferred into DH5 competent cells to build the vectors 0913-pSET4S, 0936-pSET4S. Then using the method of insertional inactivation, the vectors of 0913-pSET4S and 0936-pSET4S were introduced into competent cells of *Streptococcus suis* type 2 by electrotransformation. And the transformants were screened on the plates containing spectinomycin and detected by PCR. **Results** The selected strains could resist spectinomycin whose concentration was 100 μg/ml. Through PCR verification, the selected strains were the mutants of *Streptococcus suis* type 2 whose purposed fragments were inactivated. **Conclusion** Two mutant strains were successfully constructed, which laid the foundation of studying function of the purposed fragments.

Key word: *Streptococcus suis*; Gene Silencing; Mutagenesis, Insertional

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是革兰阳性兼性厌氧球菌,是导致猪和其它家畜感染的主要病原菌之一,同时也可导致人的感染^[1]。1968年,丹麦首次报道猪链球菌引起的人体严重感染^[2]。1998年该病曾在江苏省部分地区暴发流行,造成猪大量死亡,并有人感染致死的情况发生。2005年6月猪链球菌病又在四川资阳等地区流行,截至2005年8月3日12时,报告人感染猪链球菌病例204例,死亡38例^[3]。迄今为止,已有中国、美国、加拿大等许多国家报道了此类病例。猪链球菌病对人体健康的危害及造成的经济损失引起了社会的广泛关注。其中,

根据猪链球菌荚膜多糖抗原差异所分的35种血清型中,2型猪链球菌被认为是致病性最强的、流行最广的荚膜类型^[4]。

猪链球菌 05ZY 的基因组中,0913 是一种 ATP 酶的编码基因,0936 是一种 GIP 酶的编码基因。Anita Verma 等研究显示,博德特菌百日咳病毒中,ATP 酶的缺失导致负责毒素分泌的 Pt1H 定位发生了变化^[5];Jayesh 等研究显示,在沙门菌中,GIP 酶受到刺激时,触发肌动蛋白细胞骨架重排,使毒力因子通过吞饮作用和细胞内摄作用进入宿主细胞^[6]。而在猪链球菌基因组中,这两个基因是否也影响其毒力需要进一步的研究。本研究以这两个基因为基础,构建载体 0913 - pSET4S,0936 - pSET4S,然后通过同源重组技术,将构建的载体分别插入到猪链球菌的 0913 和 0936 基因中,获得失活了 0913 和 0936 片段的插入失活突变株 05ZY 0913,05ZY 0936。

基金项目:国家自然科学基金科学基金项目(30600023);

863 基金(2006AA02Z404);

十一五国家科技支撑计划(2006BAD06A02)。

作者简介:路玲玲 女 博士生

通讯作者:姜永强 男 研究员

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种、质粒、培养条件 猪链球菌 05ZY 由军事医学科学院杨瑞馥实验室惠赠,培养于 THB (Todd-Hewitt Broth) 培养基。质粒 pSET4S^[7] 由日本 Daisuke Takamatsu 惠赠,为壮观霉素 (*Spectinomycin*, *Spc*) 抗性质粒,温度敏感。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 感受态为本实验室保存,培养于 LB (Luria-Bertani) 培养基中。需要时,将壮观霉素加入固体或液体培养基中,浓度均为 100 μg/ml^[7]。

1.1.2 试剂 内切酶 EcoR、BamH、Sal、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 分子标记(分子量分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp) 购于宝生物工程(大连)有限公司;THB 培养基购于 Bacto 公司;1,4-哌嗪二乙磺酸二钾盐(PIPES)、dl-苏氨酸购于美国 Sigma 公司;溴化乙啶(EB)购于美国 AMRESCO 公司(0492-1G);氯化锰、氯化钙、氯化钾、蔗糖、磷酸氢二钾购于北京化工厂;质粒提取试剂盒购于美国 Promega 公司。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成,引物测序工作由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。化学转化缓冲液(chemical transformation buffer, CTB):55 mmol/L 氯化锰、15 mmol/L 氯化钙、250 mmol/L 氯化钾、10 mmol/L PIPES,调 pH 值到 6.7;电转缓冲液(electroporation

buffer, EB):0.3 mol/L 蔗糖、2 mmol/L 磷酸氢二钾,调 pH 值到 8.4。

1.1.3 主要仪器 生物安全柜(NU-440-400E,美国 NUAIR 公司)、恒温培养箱(MCO-17A1,三洋公司)、凝胶成像系统(VersaDoc Model 4000, Bio-Rad 公司)、恒温水浴摇床(HZS-H,哈东联公司)、PCR 仪(Tpersonal,德国 Biometra)、离心机(himae CF16RX,日本日立公司)、电转仪(Gene Pluser Xcell, Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 以 05ZY 基因组为模版,设计引物 0913A1、0913A2、0936A1、0936A2,分别扩增 0913、0936 基因内部的 504 bp、549 bp 长度的片段为同源臂,即 0913 片段 A 和 0936 片段 A,用于插入失活载体的构建。根据质粒 pSET4S 设计引物 P1、P2、P3、P4;根据猪链球菌基因组中的保守序列 MRP 片段设计引物 MRP1、MRP2;根据突变体 05ZY 0913、05ZY 0936 的基因组设计引物 0913B1、0913C1、0936B1 和 0936C1,这 4 个引物仍位于猪链球菌 05ZY 的 0913、0936 基因上,并且处于所扩增的同源臂 0913 片段 A 和 0936 片段 A 的外侧,上述引物组合所扩增的片段分别为突变体上的 pSET4S 片段、MRP 片段、0913 片段 B、C 和 0936 片段 B、C,6 者均用于突变体的鉴定(见图 1)。所设计的引物见表 1。

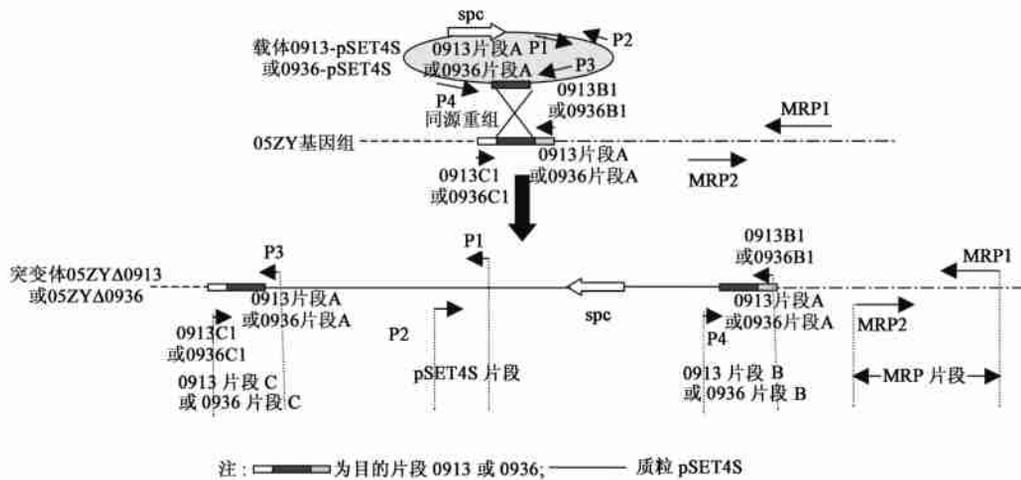


图 1 05ZY 0913、05ZY 0936 插入失活突变体的构建及鉴定示意图

所有片段的 PCR 反应条件均为 94 预变性 7 min;94 变性 1 min,60 退火 1 min,72 延伸 1 min,反应 29 个循环后 72 延伸 7 min,4 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙啶(EB)染色后在凝胶成像系统中成像。

1.2.2 酶切、连接、转化及鉴定 37、4 h 双酶切 0913 片段 A、0936 片段 A 与质粒 pSET4S。其中,使用限制性内切酶 EcoR 和 BamH 分别对 0913 片段 A、质粒 pSET4S 进行双酶切,然后,用 T4 连接酶

将酶切的这两个片段进行连接;使用限制性内切酶 EcoR 和 Sal 分别对 0936 片段 A、质粒 pSET4S 进行双酶切,然后,也用 T4 连接酶将酶切的这两个片段进行连接。随后,将 0913-pSET4S、0936-pSET4S 连接产物分别转入 DH5 感受态细胞,涂布接种于含 Spc (100 μg/ml) 的 LB 平板,37 培养 24 h。挑选转化后长出的 0913-pSET4S-DH5、0936-pSET4S-DH5 菌落进行 PCR 鉴定,同时接种于含 Spc (100 μg/ml) 的 LB 液体培养基。提取 PCR 呈阳性菌

表 1 猪链球菌 05ZY 片段扩增及突变体鉴定所用引物

扩增片段	引物	序列(5' - 3')	酶切位点	扩增片段长度(bp)
0913 片段 A	0913A1	GCGAATTCAGATCAAGGTCAAACCCATTC	EcoR	504
	0913A2	GCGGATCCATGCCACCCCTCAACTTCTTT	BamH	
0913 片段 B	0913B1	CGCTATTCACATCAACAGTA		1057
	P4	CTGTGGATAACCGIATTA		
0913 片段 C	0913C1	GTTCITATCCGAACCTTCCT		1097
	P3	TTTTTATTTTGGITTTGATGTT		
0936 片段 A	0936A1	GCGAATTCCTATCTTACTTGGAGGACAA	EcoR	549
	0936A2	GCGTCGACCATCAATTTCAGAATCATAG	Sal	
0936 片段 B	0936B1	AGCGAACCATTCGGCCTTTA		962
	P4	CTGTGGATAACCGIATTA		
0936 片段 C	0936C1	TTCCTGICCGGCCTCAACA		1068
	P3	TTTTTATTTTGGITTTGATGTT		
pSET4S 片段	P1	ACTAGTATCGGCATAATCG		1000
	P2	TCTATTGTACAGGATTTCG		
MRP 片段	MRP1	ACTAAAGCCGTTCAGGGTCC		1450
	MRP2	TTGGGTCAAATGGGTAAGGT		

落的质粒,进行酶切鉴定、测序正确后用于电转化试验。

1.2.3 05ZY 感受态的制备和电转^[1] 接种适量新鲜培养 8 h 的猪链球菌 05ZY 于含有 40 mmol/L *dl*-苏氨酸的 20 ml THB 液体中,37 培养至 $A_{600} = 0.3 \sim 0.5$ 。离心,用 5 ml CTB 将菌体重悬浮;离心,再将菌体用 5 ml CTB 重悬浮,冰浴 30 min;离心,用 5 ml 电转缓冲液将菌体重悬浮;将上一步重复 3 次。离心,用含 15% 甘油的电转缓冲液 500 μ l 将菌体重悬浮,-80 储存。所有离心条件均为 4、18 000 $\times g$ 离心 10 min。

将 2 μ l 质粒 0913 - pSET4S 和 0936 - pSET4S 分别加入 50 μ l 05ZY 感受态中,在 1.8 kV、200、25 μ F 的条件下电转,电转完成后于 30、120 r/min 振荡培养 3 h,离心后涂布于含 Spc (100 μ g/ml) 的 THB 平板,于 30、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。

1.2.4 突变体的筛选和鉴定 挑取单个菌落划线接种于含 Spc (100 μ g/ml) 的 THB 平板上,先后在 30 和 37 的温度下筛选,挑选生长状态稳定的菌落进行 PCR 验证。

2 结果与讨论

2.1 0913 片段 A、0936 片段 A 的扩增

DNA 间发生同源重组的频率是很低的,因此如何提高同源重组发生频率是实验成功与否的关键因素。应用同源基因 DNA 片段构建载体,可提高同源重组频率;同源臂长度在 0.35 kb 到 2.5 kb 之间时,随着 DNA 同源片段长度的增加,同源重组频率呈指数增加^[8]。本研究以 05ZY 基因组为模版,PCR 扩增得到同源臂 0913 片段 A 和 0936 片段 A,分别在 504bp、549bp 处有一条特异性 PCR 扩增条带(见图 2)。

2.2 转化子的鉴定

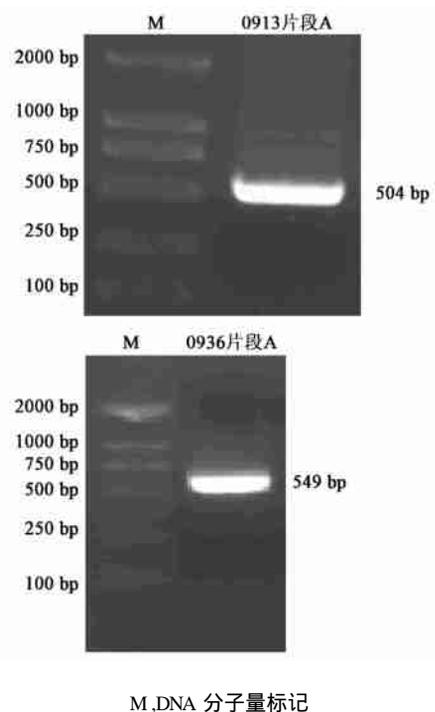
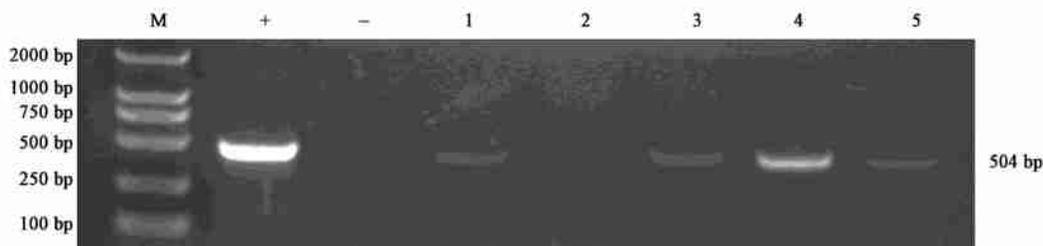


图 2 05ZY 基因组中 0913 片段 A 和 0936 片段 A 的扩增

2.2.1 0913 - pSET4S - DH5 和 0936 - pSET4S - DH5 的鉴定 质粒 pSET4S 是带有壮观霉素抗性的温度敏感型自杀质粒,它的 *LacZ* 基因上有 11 个酶切位点,在温度高于 35 时不能进行复制。由于质粒 pSET4S 含有 ColE1 复制原点,在大肠杆菌中,37 条件下仍有活性,有助于连接有同源臂的载体的构建。而在猪链球菌中,质粒 pSET4S 在 28 条件下损失较慢,37 条件下损失较为严重^[7]。将载体通过电转化导入猪链球菌感受态细胞后,未整合到猪链球菌基因组上的载体将在温度筛选过程中丢失,而能在 37、含有壮观霉素的抗性平板上生长的,即为失活了目的片段的猪链球菌突变株。本研究针对两个不同的片段选取不同的酶切位点构建连接有同源臂的载体。在大肠杆菌和猪链球菌中,利用 pSET4S 上所带的壮观霉素抗性进行筛选。

随机挑选的5个0913 - pSET4S - DH5 菌落的PCR结果见图3,其中,1、3、4、5号菌落的PCR结果

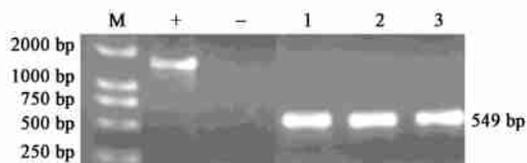
均为阳性。将4号菌提质粒,酶切鉴定和测序结果证明同源臂0913片段A已定点插入pSET4S中。



M,DNA 分子量标记;“+”:阳性对照;“-”:阴性对照;1~5:随机挑选的5个转化子

图3 菌落0913 - pSET4S - DH5 的PCR鉴定结果

随机挑选的3个0936 - pSET4S - DH5 菌落的PCR结果均为阳性(图4)。将1号菌提质粒,酶切鉴定和测序结果证明同源臂0936片段A已定点插入pSET4S中。



M,DNA 分子量标记;“+”:阳性对照;

“-”:阴性对照;1~3:随机挑选的3个转化子

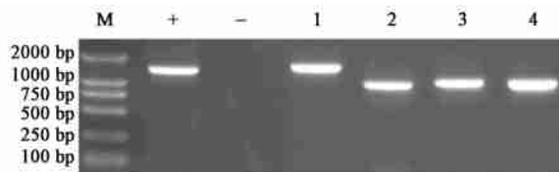
图4 菌落0936 - pSET4S - DH5 的PCR鉴定结果

2.2.2 05ZY 0913 和 05ZY 0936 的鉴定 插入失活法是利用同源重组技术,将外源基因(或DNA片段)插入到某一基因内的位点后,使这个基因丧失了原有功能的方法,是目前对基因功能研究的首选方法。本研究利用该法构建2型猪链球菌突变株,将连接有同源臂的载体通过电转入到猪链球菌基因组中,构建缺失了目的片段功能的突变株。

为鉴定突变体,本研究选取了突变体上的4个片段进行PCR鉴定,其中包括:MRP片段,为猪链球菌基因组上的保守基因,证明该突变体为猪链球菌;pSET4S片段,证明通过电转化,连有同源臂的载体中pSET4S部分已位于突变体的基因组上;0913片段B或0936片段B、0913片段C或0936片段C分别从插入位点的两侧证实同源臂的存在。若所扩增的片段均为阳性,则可以证明缺失0913和0936基因功能的插入失活突变株05ZY 0913,05ZY 0936已构建成功。

分别挑选一个05ZY 0913和05ZY 0936转化子提取基因组,PCR结果见图5和图6。

MRP片段扩增出1000~2000bp之间的条带,与预期结果1450bp基本相符;pSET4S片段扩增出1000bp左右的条带,与预期结果1000bp基本相符;0913片段C扩增出1000bp左右的条带,与预期结果

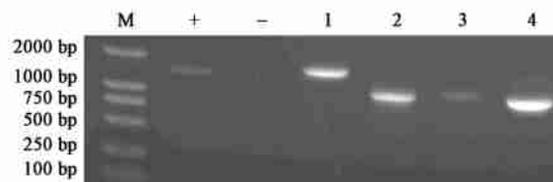


M,DNA 分子量标记;“+”:阳性对照;“-”:阴性对照;

1:MRP片段;2:pSET4S片段;3:0913片段C;4:0913片段B

图5 05ZY 0913 突变体的鉴定结果

1097bp基本相符;0913片段B扩增出1000bp左右的条带,与预期结果1057bp基本相符。说明插入失活突变株05ZY 0913构建成功。



M,DNA 分子量标记;“+”:阳性对照;“-”:阴性对照;

1:MRP片段;2:pSET4S片段;3:0936片段C;4:0936片段B

图6 05ZY 0936 突变体的鉴定结果

MRP片段扩增出1000~2000bp之间的条带,与预期结果1450bp基本相符;pSET4S片段扩增出1000bp左右的条带,与预期结果1000bp基本相符;0936片段C扩增出1000bp左右的条带,与预期结果1068bp基本相符;0936片段B扩增出1000bp左右的条带,与预期结果962bp基本相符。说明插入失活突变株05ZY 0936构建成功。

综上所述,本研究应用插入失活法成功构建了猪链球菌突变株05ZY 0913和05ZY 0936,为进一步研究0913和0936基因的功能奠定了基础,也为研究猪链球菌基因组中其它可能的毒力基因提供了一个有效的插入失活平台。

参考文献

[1] DAISUKE TAKAMATSU, MAKOTO OSAKI, TSUTOMU SEKIZAKI. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors[J]. Plasmid, 2001, (45):101-113.

论著

淀粉样肽 31 - 35 介导的神经细胞线粒体损伤及机制研究

李 丽 张 杰 余焕玲 向 丽 封锦芳 苑林宏 肖 荣

(首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069)

摘要:目的 研究 A 31 - 35 介导的神经细胞线粒体毒性作用,并探讨其可能的作用机制。方法 24 h龄 Wistar 大鼠大脑皮质神经细胞原代培养,培养 48 h后在培养基中分别加入 A 31 - 35 和 A 25 - 35 建立大脑神经细胞线粒体损伤模型。24 h后,流式细胞术检测神经细胞线粒体通透性转变孔道(PTP)开放;酶法检测神经细胞线粒体氧化还原平衡体系 GSH/GSSG 比率的变化;激光共聚焦显微术检测神经细胞活性氧(ROS)水平。结果 与对照组相比, A 31 - 35 和 A 25 - 35 处理组神经细胞线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$),反映线粒体颗粒大小的前向光散射(FSC)和反映线粒体颗粒性状的侧向光散射(SSC)分布峰由低道数向高道数移动,表明线粒体肿胀、颗粒性状发生改变;A 31 - 35 和 A 25 - 35 处理组神经细胞线粒体 GSH/GSSG 比率显著降低,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$);A 31 - 35 和 A 25 - 35 处理可以使神经细胞 ROS 水平显著增高,且与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 A 31 - 35 同 A 25 - 35 一样可引起神经细胞线粒体毒性作用,其作用机制与 A 介导的神经细胞线粒体氧化损伤有关。

关键词:淀粉样 蛋白;神经元;线粒体;毒性试验

Study on Damage and Mechanism of Mitochondria of Neurons Induced by A 31 - 35

LILi, ZHANGJie, YU Huan-ling, XIANGLi, FENGJin-fang, YUAN Lin-hong, XIAO Rong

(School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To study the damage of mitochondria of neurons induced by A 31-35 and explore its possible mechanism. **Method** Cerebral cortexes of newborn 24 h Wistar rats were dissected to get neurons for primary culture. The neurons were planted into 2 ml culture plate at a density of 2×10^5 cells/ml to grow for 48 h. Then, A 31-35 and A 25-35 were respectively added into the medium to establish mitochondria damaged model of neurons. After treating neurons with A 31-35 or A 25-35 for 24 h, the mitochondrial permeability transition pore (PTP) of neurons was investigated by flow cytometry. The relative value of GSH/GSSG in mitochondria of neurons was measured by assay kit; Confocal microscopy was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS). Each experiment was repeated 3 times. **Results** Comparing with control group, A 31-35 and A 25-35 treatment group caused significant decrease of the mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$) and the relative

- [2] PERCH B, KRISTJANSEN P, SKADHAUGE K. Group streptococci pathogenic for man[J]. Acta pathol Microbiol Scand, 1968, 74: 69-76.
- [3] 万遂如. 我国猪链球菌 II 型流行情况与人们健康[J]. 动物科学与动物医学, 2005, 22 (4): 38-39.
- [4] 曹三杰,段丽丽,肖驰,等. 猪 2 型链球菌毒力因子研究进展[J]. 中国人畜共患病学报, 2007, 23(1): 89-91.
- [5] ANITA VERMA, DRUSILLA L BURNS. Requirements for assembly of PtiH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis* [J]. American Society for Microbiology, 2007, 75(5): 2297-2306.
- [6] PATEL J C, GALAN J E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions[J]. The journal of cell biology, 2006, 175(3): 453-463.
- [7] DAISUKE TAKAMATSU, MAKOTO OSAKI, TSUTOMU SEKIZAKI. Thermosensitive suicide vector for gene replacement in *Streptococcus suis* [J]. Plasmid, 2001, (46): 140-148.
- [8] INDRANIL BISWAS, ALEXANDRA GRUSS, DUSKO EHRlich, et al. High efficiency gene inactivation and replacement system for gram positive bacteria[J]. Journal of bacteriology, 1993, 175(11): 3628-3635.

[收稿日期:2007 - 10 - 08]

中图分类号:R15;S855.11 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2008)02 - 0103 - 05

基金项目:国家自然科学基金(30571560);北京市教育委员会科技发展计划资助项目(KM200610025010);

北京市教育委员会科技发展计划重点资助项目(KZ200710025011)。

作者简介:李丽 女 硕士

通讯作者:肖荣 女 教授