

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.31.004

大肠埃希菌 JM109 表面抗原 Ag43 基因敲除与鉴定*

黄用豪,赵焕阁,周松森,林映莹,谭光宏,黄凤迎[△]
(海南医学院海南省热带病重点实验室,海口 571199)

[摘要] 目的 敲除大肠埃希菌 JM109 表面抗原 43(Ag43)基因并对其进行鉴定。方法 采用 Sigma 公司的 TargeTron 基因敲除系统和 Ag43 基因特异设计的 PCR 引物扩增获得突变 II 组内含子 RNA 蛋白复合体(RNP)基因序列,然后将这段基因序列插入表达 RNP 的质粒 pACD4K-C 中,获得 Ag43 特异的重组 RNP 质粒 pACD4K-Ag43。最后将 pACD4K-Ag43 转化 JM109,经过 IPTG 诱导表达将 II 组内含子插入 Ag43 特异的部位。结果 通过软件分析发现插入 II 组内含子的最佳位点位于碱基 1 812 和 1 913 之间,琼脂糖凝胶电泳发现 PCR 扩增的突变 II 组内含子 RNP 基因序列分子量大小和预期值(350 bp)相一致,用 Nhe I 和 Hind III 二种酶切分析重组质粒 pACD4K-Ag43 结果和预期值相符,PCR 扩增相应产物和基因测序显示 II 组内含子特异地插入 Ag43 基因碱基序列的 1 812/1 913 位点。结论 成功地将大肠埃希菌 JM109 中的基因敲除,为更进一步深入研究 Ag43 基因的功能和将其作为制备重组 Ag43 嵌合蛋白的宿主菌奠定了基础。

[关键词] 抗原 Ag43;基因敲除;细菌表面表达;II 组内含子;表达系统

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)31-4330-03

Knockout and identification of the surface antigen 43 gene in escherichia coli JM109*

Huang Yonghao, Zhao Huange, Zhou Songlin, Lin Yingying, Tan Guanghong, Huang Fengying[△]
(Key Laboratory of Tropical Medicine, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 571199, China)

[Abstract] **Objective** To knockout and identify the Antigen 43 (Ag43) in the Escherichia coli JM109. **Methods** Mutation group II introns RNA protein complexes (RNP) gene sequence was obtained by Sigma Company's TargeTron Gene Knockout System and Ag43 gene specific designed PCR primers amplification, then, to acquired Ag43 specific recombinant RNP plasmid pACD4K-Ag4, this gene sequence was inserted into the plasmid pACD4K-C of RNA's expression. Finally, pEGFP-Ag43 was transformed into JM109 and inserted the group II intron into the Ag43's locus by IPTG inducing expression. **Results** The best insertion locus was between 1 812 and 1 913. Through the agarose electrophoresis gel, the RNP gene sequence was consistent with the expected value (350 bp). The pEGFP-Ag43 vector was correctly constructed which was proofed by endonuclease Nhe I and Hind III digestion as predicted products (3 646 and 4 029 bp; 7 000 and 550 bp, respectively). The PCR and gene sequence results indicated that the group II intron was inserted into the locus between 1 812 and 1 913 in the Ag43 gene. **Conclusion** Successful knockout of the Ag43 in Escherichia coli JM109 found basis to further study the Ag43's function and regard the coli as host bacteria of Ag43 chimeric protein recombinant.

[Key words] antigen 43; gene knockout; antigens, surface; inteins; group II; gene expression

表面抗原 43 (antigen 43, Ag43) 是大肠埃希菌表达于细胞表面的重要抗原分子,该分子可以促使大肠埃希菌在特殊条件下形成生物膜,使细菌可以在极端的条件下生长并获得对多种抗生素的耐药性^[1-3],是大肠埃希菌一个重要的功能分子。和细菌的菌毛和鞭毛不同,Ag43 不需任何辅助分子,转运至细胞外膜的所有部件全部存在于该分子的组成结构中。Ag43 分子由信号肽、 α 和 β 结构域 3 个功能部位组成^[4-6],其中信号肽的结构能保证 α 和 β 结构域通过细胞的内膜, β 结构域则在细胞外膜上折叠成为一个桶状通道, α 结构域穿过这一桶状通道后表达于细菌表面。Ag43 的 α 与 β 结构域之间通过非共价键结合,加热到一定程度后 α 结构域就离开 β 结构域并溶解于水溶液中^[7]。此外,由于 α 结构域含有大量的 T 和 B 淋巴细胞的抗原表位,因此 Ag43 还有可能是制备自身抗原分子疫苗,成为打破自身抗原分子免疫耐受的一个重要的抗原分子。

目前基因敲除是了解基因功能的重要手段,大肠埃希菌 Ag43 基因敲除后不但可以更进一步了解 Ag43 的功能,也有可能利用这一基因敲除菌作为一个 Ag43 嵌合蛋白的表达宿主细菌。因此,本研究利用基因工程技术将 Ag43 基因敲除并

利用 PCR 和基因测序技术对其进行鉴定。

1 材料与方

1.1 材料 含有 Ag43 基因的大肠埃希菌 JM109、细菌基因敲除试剂盒(TargeTron 基因敲除系统,内含有 pACD4K-C 质粒、连接酶、EBS 通用引物等)购自 Sigma 公司。DNA Marker、PCR 试剂盒、凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒,内切酶 Nhe I 和 Hind III、电泳琼脂糖、异丙基硫代-B-D-半乳糖苷(IPTG)均购自大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 选择 Ag43 基因敲除位点和突变 RNA-蛋白复合体(RNP)的 PCR 引物 从 PubMed 的基因库中查找到 Ag43 基因(CP000948.1)序列。登录 Sigma 公司提供的分析软件网站地址(www.sigma-aldrich.com/targetronaccess),将 Ag43 基因序列的信息输入软件并按照提示进行操作,软件自动报告基因敲除(插入一个 Group II intron)的最佳位置,并同时提供相应的 3 个 PCR 引物(IBS、EBS1d、EBS2)的碱基序列信息。这 3 个 PCR 引物决定了所敲除基因位点的特异性,由大连宝生物公司合成。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272477);海南省自然科学基金资助项目(812198)。 作者简介:黄用豪(1980-),助理研究员,硕士,主要从事免疫学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: fyhuang16@126.com。

1.2.2 PCR 扩增突变 II 组内含子 RNP 基因序列 将以上合成的 3 个 PCR 引物和试剂盒提供的 EBS 通用引物混合成 Four-primer mix, 然后按照说明将试剂盒提供的 Water、Intron PCR Template、Jump Start REDTaq Ready mix 和 Four-primer mix 混合成 50 μ L 的 PCR 反应体积。按 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 进行 30 个循环反应, 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。此后将 PCR 产物在 1% 琼脂糖上进行电泳分析, 凝胶回收纯化试剂盒回收相应的 PCR 产物。

1.2.3 II 组内含子 RNP 表达质粒 pACD4K-C 的构建和鉴定 将以上回收的 PCR 产物连同试剂盒提供的线性 pACD4K-C 质粒按 T4 连接酶要求的反应条件进行连接反应, 获得本研究敲除 Ag43 基因的 II 组内含子表达质粒 pACD4K-Ag43。此后用上述同样的酶切方法对获得的重组质粒 pACD4K-Ag43 进行鉴定。

1.2.4 pACD4K-Ag43 转化 JM109 菌株并诱导 II 组内含子插入 Ag43 基因 按照 TargeTron 基因敲除系统试剂盒说明书进行操作, 将以上获得的 pACD4K-Ag43 重组质粒转化改造宿主细菌 JM109, 经冰浴和热休克后加入 SOC 培养基于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1 h, 接着取 100 μ L 的转化培养物加入到 3 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。第 3 天取 40 μ L 的过夜培养物加入到 2 mL 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD600 值为 0.2 后, 加入 IPTG(100 mmol/L) 诱导质粒表达, 最后吸取 100 μ L 培养物至含有卡那霉素(25 μ g/mL) 的 LB 培养基平板上 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 培养获得的菌株就可能是 Ag43 基因敲除的菌株。

1.2.5 Ag43 基因敲除菌株基因测序鉴定 为了证明以上培养阳性菌株是否 Ag43 基因敲除菌, 随机挑选以上培养卡那霉素阳性细菌并用大肠埃希菌基因组提取试剂盒提取相应的细菌基因组后, 采用 PCR 方法扩增相应区段基因序列进行琼脂糖凝胶电泳和基因测序鉴定。具体的 PCR 扩增策略见图 1 所示。图示中 For 引物序列为: 5'-CCA AAG CTT AAC GGT GA T ACC GG-3', Rev 引物序列为: 5'-CCA CTC GAG TCA GAA GGT CAC AT-3'。A 方法采用 For 和 Rev 引物, PCR 产物约为 4 500 bp; B 方法用 For 和 EBS 通用引物, PCR 产物为 1 300~1 400 bp; C 方法用 EBS2 和 Rev 引物, PCR 产物约为 3 500 bp。最后将相应的 PCR 产物交由大连宝生物工程有限公司进行测序。

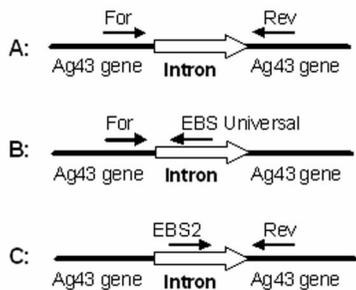


图 1 PCR 方法鉴定 Ag43 基因敲除细菌的引物位置及相应的产物

2 结 果

2.1 最佳 II 组内含子插入位点及相应的 RNP 突变体 PCR 引物 Sigma 公司提供的分析软件分析结果发现, 在 Ag43 基因上有多个位点适合插入 II 组内含子, 本研究选择 E 值最高的 1 812/1 913 位点作为本研究的 II 组内含子插入位点, 同时选择这个位点的 IBS、EBS1d 和 EBS2 3 条特异引物供 PCR 扩增特异 RNP 突变体, 见图 2。

2.2 多重 PCR 扩增获得突变体 RNP 的 PCR 产物 按照 Sigma 公司的 TargeTron 基因敲除系统说明书要求, 将以上 3

条 PCR 引物连同试剂盒提供的 EBS 通用引物一起混成引物复合体, 然后按照试剂盒推荐的 PCR 反应条件进行多重 PCR 扩增, 将扩增产物进行电泳分析。结果发现, PCR 扩增到的产物位于 200~400 bp 之间, 和预期 350 bp 的相对分子质量大小相符, 说明获得了 Ag43 特异 RNP 突变体的 PCR 产物(图 3, 泳道 1)。

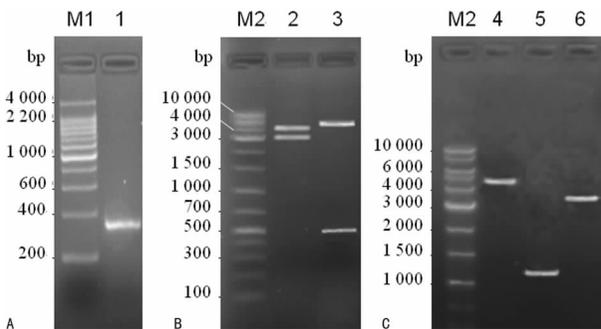
Insertion Location	Gene 5' exon	Gene 3' -exon	Score	E-value
1812 1813a	ACGCAGGCTGATGGTGCCTACTGTCCGTT	-intron - CAGGTTTTTCACTTT	10.85	0.009

Primers for retargeting the L1LtrB intron	
1812 1813a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTCTTAATTCCTCCGTTGTGCGCCAGATAGGGGTG
1812 1813a-EBS1d	CAGATGTGACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTCCGTTTCATAACTTACCTTTCTTTGT
1812 1813a-EBS2	TGAACCGCAAGTTTCTTAATTCGGTTAGATCCGATAGAGGAAAGTGCT

图 2 Ag43 基因敲除位点和 RNP 突变体 PCR 引物

2.3 表达 RNP 的重组质粒 pACD4K-Ag43 的构建和鉴定 利用 T4 DNA 连接酶将 RNP 突变体的 PCR 产物插入 RNP 表达质粒 pACD4K-C 中, 然后用酶切方法进行鉴定。经分析, Nhe I 在 RNP 重组质粒上有两个酶切位点, 酶切产物分别为 3 646 和 4 029 bp。Hind III 两个位点酶切产物为 7 125 和 550 bp。图 3 第 2 泳道为 Nhe I 酶切结果, 两个片段大小和预测的 3 646 和 4 029 bp 相一致; 图 3 泳道 3 为 Hind III 酶切结果, 切出约 7 000 和 550 bp 两个片段。说明正确构建了含 Ag43 基因特异重组质粒, 将这一重组质粒命名为 pACD4K-Ag43。

2.4 Ag43 基因敲除阳性菌株 JM109(Δ Ag43) 的鉴定 将重组质粒 pACD4K-Ag43 转化含有 Ag43 基因的大肠埃希菌 JM109 菌株, 按照 TargeTron 基因敲除系统试剂盒所提供诱导和筛选方法, 将 II 组内含子基因序列插入 Ag43 基因碱基 1 812/1 813 之间, 造成 Ag43 基因功能丧失(基因敲除)。按照图 1 显示的 A、B、C 3 种鉴定方法对转化诱导细菌进行鉴定。3 种 PCR 扩增产物分别约为 4 500、1 400 和 3 500 bp, 大小和预期相符(图 3, 泳道 4~6)。另外, 将这 3 种 PCR 产物的 DNA 进行基因测序, 测序结果和基因库中的 Ag43 基因进行比对分析, 发现 Ag43 基因的 1 812/1 813 位置插入了一段 II 组内含子的 DNA 序列。说明 JM109 菌株中的 Ag43 基因被有效敲除, 将这一株细菌命名为 JM109(Δ Ag43)。



A: 突变 RNP 的 PCR 产物(泳道 1); B: 质粒 pACD4K-Ag43 酶切鉴定(泳道 2、3); C: Ag43 基因敲除菌的 PCR 鉴定(泳道 4~6)。

图 3 重组质粒构建及鉴定

3 讨 论

本研究利用美国 Sigma 公司的专利细菌基因敲除试剂盒并按照试剂盒所提供的说明书的方法和步骤将一个带有卡那霉素耐药基因的 II 组内含子插入大肠埃希菌 JM109 Ag43 基因碱基 1 812/1 913 之间, 造成 Ag43 基因功能失活, 从而达到 Ag43 基因功能敲除的目的。它是通过一个具有程序化限制性内切酶活性的 RNP 将重组质粒 pACD4K-C 表达的 II 组内含子插入到 Ag43 基因中。由于本研究选用了 1 812/1 913 位点特异的 3 条 PCR 引物(IBS、EBS1d 和 EBS2)和试剂盒 EBS 通用引物进行多重 PCR 反应构建的 pACD4K-Ag43 重组质粒的特

异性,使 RNP 能够定点将 II 组内含子插入相应特异的 Ag43 基因碱基 1 812/1 913 之间。图 3 结果表明,用 Nhe I 和 Hind III 二种酶切方法均将重组质粒 pACD4K-Ag43 切出预想的片段,同时按照图 1 的 PCR 扩增策略能够从诱导 Ag4 基因敲除菌中扩增到相应的 PCR 反应产物,这 3 种 PCR 产物的 DNA 序列经基因测序分析也发现 Ag43 基因的 1 812/1 813 位点间确实插入了一段 II 组内含子的 DNA 序列,说明本研究获得了 Ag43 基因正确敲除的新的菌株 JM109(Δ Ag43)。

Ag43 是大肠埃希菌表面表达的一个独特分子,该分子 α 结构域受热至一定温度后就能从 β 结构域分离,溶于加热的水溶液中,离心将菌沉淀后液体上清中就含有单一的 α 结构域分子。细菌鞭毛和菌毛是典型的细菌表面抗原分子,有人已经设想利用细菌鞭毛或菌毛作为细菌表面表达嵌合抗原分子的载体^[8]。但是,利用细菌鞭毛或菌毛表达嵌合抗原分子存在较明显的缺点,主要表现为表达的分子受到表达分子大小的制约,插入外源分子也会影响载体蛋白的结构和功能,同时还降低载体的拷贝数^[8]。另外,大多数细胞表面表达的抗原分子还受限于宿主细菌的背景,将这类细胞表面表达分子作为外源抗原分子的展示分子不具有普适性。显然,作为外源抗原分子的展示载体的细菌表面抗原分子必须能够适应较大的外源插入分子,同时还应具有较高的拷贝数及常见表达宿主的普适性。研究结果表明,一个大肠埃希菌细胞表面就有多达 50 000 个 Ag43 抗原分子,利用基因工程将 Ag43 构建成一个重组原核表达载体后,发现这一重组原核表达载体也能够肺炎克雷伯杆菌和绿脓杆菌中大量表达,表达外还能够改变宿主细菌的形态结构^[7]。此外,将 Ag43 作为外原抗原分子的表达载体比菌毛载体具有更好的表达能力,菌毛载体只能表达 20~30 个氨基酸的外源抗原分子,但 Ag43 载体表达的外源抗原分子则可高达 500 个氨基酸^[7]。研究结果还表明,Ag43 的免疫原性很强,同时还具有很多的 T 和 B 淋巴细胞抗原表位,可以促使免疫系统产生高强度的免疫应答^[9]。本研究获得的 Ag43 基因敲除菌 JM109(Δ Ag43)来自常用基因程表达宿主菌 JM109,如果同时和一个可以表达 Ag43 嵌合分子的表达载体结合,二者就可以构成一个制备外源抗原分子的嵌合蛋白疫苗的表达式系统,在制备疫苗和研究 Ag43 基因功能等方面都具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Sherlock O, Dobrindt U, Jensen JB, et al. Glycosylation of

the self-recognizing Escherichia coli Ag43 autotransporter protein[J]. J Bacteriol, 2006, 188(5): 1798-1807.

- [2] Wallecha A, Correnti J, Munster V, et al. Phase variation of Ag43 is independent of the oxidation state of OxyR [J]. J Bacteriol, 2003, 185(7): 2203-2209.
- [3] Ulett GC, Webb RI, Schembri MA. Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in Escherichia coli [J]. Microbiology, 2006, 152(Pt 7): 2101-2110.
- [4] Kjaergaard K, Schembri MA, Hasman H, et al. Antigen 43 from Escherichia coli induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of Pseudomonas fluorescens [J]. J Bacteriol, 2000, 182(17): 4789-4796.
- [5] Gabig M, Herman-Antosiewicz A, Kwiatkowska M, et al. The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of Escherichia coli in the presence of bile salts and carbohydrates [J]. Microbiology, 2002, 148(Pt 5): 1533-1542.
- [6] Roche A, McFadden J, Owen P. Antigen 43, the major phase-variable protein of the Escherichia coli outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles [J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 1): 161-169.
- [7] Kjaergaard K, Hasman H, Schembri MA, et al. Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system [J]. J Bacteriol, 2002, 184(15): 4197-4204.
- [8] Rani DB, Bayer ME, Schifferli DM. Polymeric display of immunogenic epitopes from herpes simplex virus and transmissible gastroenteritis virus surface proteins on an enteroadherent fimbria [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(1): 30-40.
- [9] Henderson IR, Owen P. The major phase-variable outer membrane protein of Escherichia coli structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR [J]. J Bacteriol, 1999, 181(7): 2132-2141.

(收稿日期:2015-07-11 修回日期:2015-07-21)

(上接第 4329 页)

- [21] Zhang Y, Lv SJ, Yan H, et al. Effects of glycine supplementation on myocardial damage and cardiac function after severe burn [J]. Burns, 2013, 39(4): 729-735.
- [22] 周军利, 黄跃生, 党永明. 甘氨酸对缺血缺氧心肌细胞能量代谢的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(6): 1093-1095.
- [23] 张水军, 史冀华, 唐哲. 甘氨酸对脑死亡大鼠供肝损伤的防护作用 [J]. 中华器官移植杂志, 2004, 25(5): 264-266.
- [24] 秦杰, 谢立平. 氨基酸在肾功能保护中的作用研究进展 [J]. 国外医学泌尿系统分册, 2003, 23(4): 374-377.
- [25] 秦霞, 曹剑秋, 柏惠, 等. 甘氨酸对 ATP 耗竭诱生性细胞自噬的作用及其机制 [J]. 南京医科大学学报, 2009, 29(12): 1633-1637.
- [26] Pan C, Bai X, Fan L, et al. Cytoprotection by glycine against ATP-depletion-induced injury is mediated by glycine receptor in renal cells [J]. Biochem J, 2005, 390(Pt

2): 447-453.

- [27] Perez-Torres I, Ibarra B, Soria-Castro E, et al. Effect of glycine on the cyclooxygenase pathway of the kidney arachidonic acid metabolism in a rat model of metabolic syndrome [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(12): 899-910.
- [28] 周庆功, 刘伟. 力竭运动小鼠体内部分元素水平的变化 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(12): 997-998.
- [29] 赵敬国, 王福文. 力竭性运动对心脏影响的研究 [J]. 山东体育科技, 2000, 22(2): 42-46.
- [30] 郝选明, 万文君, 黄海, 等. 补体系统对有氧运动的免疫应答与适应特征 [J]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(3): 242-244.
- [31] 张玮, 洪熊. 有氧运动对补体的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(30): 6047-6049.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-07-16)