

· 论 著 ·

## 化脓性链球菌高毒力株特异基因文库的构建和分析\*

田福亮<sup>1</sup>, 吴剑锋<sup>2</sup>, 夏永祥<sup>2△</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院 210046; 2. 南京医科大学附属南京第一医院 210006)

**摘要:**目的 构建化脓性链球菌高毒力株特异基因文库, 克隆和筛选化脓性链球菌高毒力株特异表达基因。方法 采用抑制消减杂交技术(SSH), 以从患者体内所分离链球菌为毒力菌株, 分离特异表达基因, 将其与 T 载体进行 T/A 连接构建文库, 将连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10 进行文库扩增后, 转化菌液涂布于 LB 固体平板, 构建化脓性链球菌毒力株特异基因消减文库, 用斑点杂交初步筛选消减文库后, 将获得的阳性克隆进行测序和同源性分析。结果 酶切产物为 100~2 000 bp, 连接效率大于 50%, 消减组与非消减组差异明显, 成功构建了化脓性链球菌毒力株特异基因消减文库, 所得阳性克隆经斑点杂交筛选后测序, 与 Genbank 数据库进行同源性比对, 5 个未知序列可能为新基因, 7 个与已知基因有高度的同源性。结论 用 SSH 及 T/A 克隆技术成功构建了人源化脓性链球菌高毒力株基因文库, 5 个未知的新序列有待于进一步的研究。

**关键词:**链球菌, 化脓; 抑制消减杂交; 毒力基因; 基因消减文库

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0529-03

**Construction and analysis of virulence genes subtracted library of streptococcus pyogenes by suppression subtractive hybridization\***Tian Fuliang<sup>1</sup>, Wu Jianfeng<sup>2</sup>, Xiang Yongxiang<sup>2△</sup>

(1. Department of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China;

2. Affiliated Nanjing Frist Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

**Abstract:** Objective To construct the virulence genes subtracted library of streptococcus pyogenes and to lay the foundations for screening the virulent genes. **Methods** Suppression subtractive hybridization was adopted to isolate the fragments of virulence genes in streptococcus pyogenes. Then these fragments were directly inserted into T/A cloning vector to set up subtractive library and amplification of the library was carried out with transformation of E. coil TOP10. Dot blot was used to screen the subtracted library, the differentially expressed cDNA fragments were sequenced and analyzed in Genbank with Blast search. **Results** A smear ranged from 100~2 000 bp was observed. The ligation efficiency of tester DNA with adaptor was at least higher than 50 percent. The difference between subtractive group and unsubtractive group was apparently significant. Partial positive clones in the library were randomly selected and successfully sequenced. 5/12 sequence showed no homology and presumably represent unknown genes, 7/12 had a high similarity to the known genes. **Conclusion** The virulence genes subtracted library of streptococcus pyogenes is constructed successfully with SSH and T/A cloning techniques. The library is efficient and lays solid foundation for screening and cloning new and specific virulence genes of streptococcus pyogenes.

**Key words:** streptococcus pyogenes; suppression subtractive hybridization; virulence genes; subtracted library

A 群链球菌又称化脓性链球菌<sup>[1]</sup>, 主要引起化脓性炎症, 以上呼吸道感染为主。引起的主要疾病有扁桃体炎、咽炎、蜂窝组织炎、亚急性细菌性心内膜炎及产褥感染等。因链球菌的 M 蛋白与心肌、肾小球基底膜有共同的抗原, 可引起风湿热和急性肾小球肾炎等超敏反应性疾病; 同时, 可引起猩红热、毒性休克综合征等中毒性疾病, 严重威胁人类的健康<sup>[2]</sup>。Zhang 等<sup>[3]</sup>研究认为一些菌株的毒性强于其他菌株可能与菌株的毒力变异有关。比较毒力株和标准菌株的基因组 DNA, 鉴别差异基因, 有助于对感染性疾病分子发病机制进一步深入了解, 并为临床诊断和治疗提供理论依据。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 化脓性链球菌取自南京市第一医院化脓性链球菌感染患者(征得患者同意); 标准菌株采购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC), 菌种编号为 10373; 抑制消减杂交试剂盒购自 Cloth 公司; 细菌基因组提取试剂盒购自海门市碧云天公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖(X-GAL)购于 Sigma 公司; 氨苄青霉素(AMP)购

自 Promega 公司; 感受态大肠杆菌 TOP10 购自 Takara 公司; PMD18T 载体购自 Takara 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 细菌培养** 在血琼脂固体培养基上接种化脓性链球菌, 放置于温度培养箱里 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜。

**1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取** 根据细菌基因组提取试剂盒操作手册, 分别对毒力菌株和标准菌株提取基因组 DNA, 并用紫外分光光度计对所提取的基因组 DNA 进行浓度、纯度测定。

**1.2.3 抑制消减杂交技术(SSH) 应用** PCR-Select 基因组消减试剂盒, 并按其说明书进行。对毒力菌株和标准菌株进行基因组消减杂交, 包括两个菌株的基因组 DNA 酶切, 接头连接及其效率分析, 两轮消减杂交, 两轮选择性 PCR 扩增, 并且对比消减组和非消减组, 以对消减效率进行检测。

**1.2.4 PCR 产物的 T-A 克隆** 应用 Advantage PCR cloning 试剂盒, 并按其说明书进行。取 2 μL 第 2 轮 PCR 产物与 2

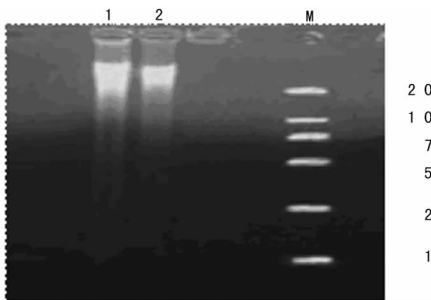
$\mu\text{L}$  线性化的 PMD18-T 载体混合, 在  $1 \mu\text{L}$  T4 DNA 连接酶的作用下,  $14^\circ\text{C}$  连接 16 h,  $-20^\circ\text{C}$  保存。取  $10 \mu\text{L}$  连接反应产物与  $100 \mu\text{L}$  感受态细菌 TOP10 混匀于离心管中, 用热激法将连接产物导入感受态大肠杆菌 TOP10, 向离心管中加入  $890 \mu\text{L}$  LB 培养基, 混匀后置于摇床,  $37^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ r/min}$  培养 45 min, 涂布  $200 \mu\text{L}$  菌液在含有  $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素 X-gal/IPTG 琼脂平板上,  $37^\circ\text{C}$  培养 18 h。随机挑选直径大于  $1 \text{ mm}$  的白色克隆, 点种于含  $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 培养基的 96 孔板中,  $37^\circ\text{C}$  培养过夜, 加 15% 甘油,  $-70^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.5 菌液斑点杂交筛选** 取  $-70^\circ\text{C}$  保存菌株, 点种于含  $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素 LB 培养基的 96 孔板中,  $37^\circ\text{C}$  培养过夜。取  $1 \mu\text{L}$  菌液接种于尼龙膜 (Roche), 在含  $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素琼脂平板上  $37^\circ\text{C}$  培养 18 h, 尼龙膜上的菌斑经变性、中和、 $80^\circ\text{C}$  固定 2 h 后备用。取纯化的正向和反向消减杂交第 2 轮 PCR 产物各  $80 \text{ ng}$  ( $3 \mu\text{L}$ ), 用  $5 \mu\text{L}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{p}$ ]d-ATP 随机引物法标记纯化后备用。 $42^\circ\text{C}$  预杂交 1 h、杂交 18 h 后, 洗膜 ( $58^\circ\text{C}$ ,  $2 \times$  柠檬酸钠缓冲液 (SSC),  $0.5\%$  十二烷基磺酸钠 (SDS),  $20 \text{ min}$  2 次,  $58^\circ\text{C}$ ,  $0.2 \times$  SSC,  $0.5\%$  SDS,  $20 \text{ min}$  2 次),  $-70^\circ\text{C}$  放射自显影 12 h。

**1.2.6 阳性克隆的测序与同源性分析** 取斑点杂交初步筛选的阳性克隆, 用 nested primer1 和 nested primer 2R 为引物, 进行 PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析确认有插入片段后, 以 M13 为正向引物, PE ABI PRISM 3700 测序仪测序 (上海英俊生物技术有限公司代理)。测序结果用 Primer5.0 分析后, 在 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 中进行序列同源性检索分析。

## 2 结果

**2.1 细菌基因组 DNA 的提取** 经过紫外分光光度计测定, 浓度分别为  $120$ 、 $160 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 光密度值 (OD) $260/280$  分别为  $1.73$ 、 $1.81$ , 取  $5 \mu\text{L}$  基因组 DNA 2% 琼脂糖凝胶电泳。



1: Tester 基因组 DNA; 2: Driver 基因组 DNA; M: Marker DL2000。

图 1 细菌基因组 DNA 的提取

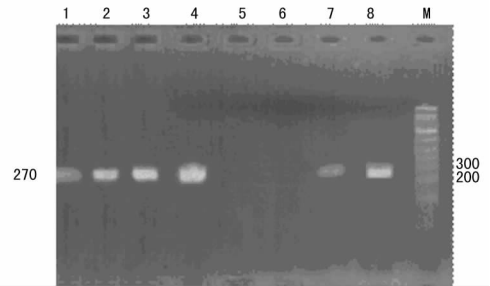
**2.2 消减效率的分析** 将消减和非消减的 18、23、28、33 个循环产物 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 2, 未消减过的产物在 18 cycles 时就已出现清晰条带, 消减过的在 28 个循环时才出现条带, 表明消减效果理想。

**2.3 消减杂交文库**  $200 \mu\text{L}$  转化菌液涂布的平板上约有 300 多个白色菌落生长, 菌落清晰饱满, 白色菌落占总菌落的 60% 以上, 说明消减文库构建成功, 随机挑取 100 个白色菌落建成化脓性链球菌毒力株基因消减文库。

**2.4 消减杂交文库的构建筛选结果**  $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素/X-gal/IPTG 琼脂平板上,  $37^\circ\text{C}$  培养 18 h 后, 平板可见 254 个白色及蓝色菌落生长, 以白色菌落为主 (约占 80%), 菌落饱满清晰, 直径  $1 \text{ mm}$  左右。随机挑选 175 个白色菌落, 保存。斑点杂交信号对比, 获得 A1、A2、A6、B5、C5、C7、D3、E4、E8、

F5、G5、H2 共 12 个差异基因片段, 且这 12 个基因片段均表现为毒力株 DNA 片段标记的探针信号增强, 结果如图 3。

**2.5 DNA 测序与同源性分析结果** 对 12 个含有差异基因片段的阳性克隆进行 M13 双向引物测序, 与 Genebank 数据库初步比对, 结果显示 12 个差异片段中有 5 个未检索到同源序列, 其余 7 个序列均与已知基因有高度的同源性, 结果如表 1。



1~4: 非消减第 2 次 PCR 产物 23S rRNA 基因 18、23、28、33 个循环产物; 5~8: 消减第 2 次 PCR 产物 23S rRNA 基因 18、23、28、33 个循环产物; M: 1 kb plus DNA ladder

图 2 消减效率分析

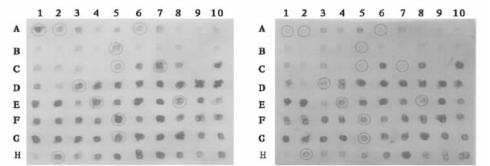


图 3 斑点杂交筛选结果

表 1 差异基因片段的生物学信息检索结果

序号	序列长度(bp)	序列检索结果	杂交信号强度
A1	518	DNA 促旋酶亚单位 A (gyrA)	增强
A2	238	链激酶 (streptokinase gene)	增强
A6	481	未知序列	增强
B5	573	未知序列	增强
C5	1 740	大环内酯流出基因 (mefE)	增强
C7	298	未知序列	增强
D3	584	致热外毒素 C (speC)	增强
E4	443	补体抑制剂 (SIC 基因)	增强
E8	317	未知序列	增强
F5	400	胶原样表面蛋白 1 (SCL1)	增强
G5	916	C5a 肽酶 (scpA)	增强
H2	206	未知序列	增强

## 3 讨论

研究微生物致病机制的首要前提是识别和分离其毒力基因<sup>[4]</sup>。Diatehenko 等<sup>[5]</sup>于 1996 年提出 SSH, 该技术最初用于肿瘤细胞与正常细胞基因组或 cDNA 差异的研究, 后来被推广到微生物领域。SSH 已经应用于许多致病菌毒力基因的发现, SSH 被用于嗜水气单胞菌<sup>[3]</sup>、尿毒性大肠杆菌菌株 536<sup>[6]</sup>、猪链球菌 2 型强毒株<sup>[7]</sup>、副猪嗜血杆菌<sup>[8]</sup>、海德堡沙门菌<sup>[9]</sup>、肺炎链球菌<sup>[10]</sup>、鸡瘟沙门菌<sup>[11]</sup>毒力基因的发现, 都得到了理想的效果。SSH 目前还被应用于鉴定细菌<sup>[12]</sup>、鉴定毒力岛<sup>[13]</sup>、发现插入序列及构建检测探针<sup>[14]</sup>等多方面, 表明该技

术是一个简单且有效的鉴定细菌间遗传差异的方法。

本研究首次将 SSH 技术应用于化脓性链球菌毒力株特异基因的研究,以标准菌株作为对比材料,严格检测基因组 DNA 提取质量,基因组 DNA 酶切,接头连接,两轮消减杂交及两次抑制 PCR 等反应步骤,使 Tester 与 Driver 中共有的基因片段得到消减,存在于 Tester 中的特异基因得到特异性扩增。通过 T/A 克隆技术,将两轮扩增 PCR 产物纯化后直接与 T 载体连接,成功构建化脓性链球菌毒力株特异基因文库,并且通过 M13 双向引物测序,与 Genbank 数据库 BLAST 比对得到了 12 个差异基因片段,7 个序列均与已知基因有高度的同源性,包括了链球菌激酶、链球菌补体抑制剂、C5a 肽酶、致热外毒素 C、DNA 促螺旋酶等,有 5 个未检索到同源序列,这些未知的序列有待于进一步的研究,期望对治疗化脓性链球菌感染有所帮助。

#### 参考文献:

- [1] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci[J]. J Exp Med, 1933,57(4):571-595.
- [2] Holm SE. Invasive group A streptococcal infections[J]. N Engl J Med,1996,335(8):590-591.
- [3] Zhang YL,Ong CT,Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish[J]. Microbiology,2000,146(Pt 4):999-1009.
- [4] Strauss EJ,Falkow S. Microbial pathogenesis: genomic and beyond[J]. Science,1997,276(5313):707-712.
- [5] Diatchenko L,Lau YF,Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(12):6025-6030.
- [6] Janke B,Dobrindt U,Hacker J, et al. A suppressive subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli*

k-12 strain MG1655[J]. FEMS Microbial Letters,2001,199(1):61-66

- [7] 田云, Frank M Aarestrup, 陆承平. 猪链球菌 2 型的可能毒力基因的发现[J]. 微生物学报,2004,44(5):613-616.
- [8] Zhou H, Yang B, Xu F, et al. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization[J]. Vet Microbiol, 2010,144(3/4):377-383.
- [9] Bronowski C, Winstanley C. Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella Heidelberg*[J]. FEMS Microbiol Lett,2009,298(1):29-36.
- [10] Suzuki N, Seki M, Nakano Y, et al. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridians group Streptococci by genomic subtractive hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(9):4528-4234.
- [11] Qiuchun L, Xu Y, Jiao X. Identification of *Salmonella pullorum* genomic sequences using suppression subtractive hybridization[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(9): 898-903.
- [12] Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, et al. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001,67(8):3759-3762.
- [13] Walker JC, Verma NK. Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridization of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes [J]. FEMS Microbiol Lett,2002,213(2):257-264.
- [14] Parsons YN, Panagea S, Smart CH, et al. Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol,2002,40(12):4607-4611.

(收稿日期:2011-06-11 修回日期:2011-11-07)

(上接第 528 页)

- Cardiovasc Res,2007,74:767-770.
- [3] D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, et al. B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003(284):H1592-1600.
- [4] Hobbs A, Foster P, Prescott C, et al. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide[J]. Circulation,2004,110:1231-1235.
- [5] 莫显刚, 罗兴林. 大电导钙激活钾通道与动脉粥样硬化[J]. 基础医学与临床,2008,28:1216-1218.
- [6] Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, et al. Functional con-

tribution of voltage dependent and  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  (BKCa) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides [J]. J Smooth Muscle Res,2002,38:117-129.

- [7] Williams WR. Relative similarity within purine nucleotide and ligand structures operating on nitric oxide synthetase, guanylyl cyclase and potassium (KATP, BKCa) channels [J]. J Pharm Pharmacol,2011,63:95-105.
- [8] Hund TJ, Mohler PJ. Differential roles for SUR subunits in KATP channel membrane targeting and regulation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2011,300:H33-35.

(收稿日期:2011-06-21 修回日期:2011-11-01)