

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.018

铜绿假单胞菌 PA0745 基因突变株的构建及鉴定

卢培林, 刘 利, 熊 霞[△]

(西南医科大学附属医院皮肤科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 构建铜绿假单胞菌 PA14 细胞株的 PA0745 基因突变株, 并验证其致病性。**方法** 采用同源重组原理构建铜绿假单胞菌 PA0745 基因缺失株和点突变株。利用质粒抗性和营养缺陷进行筛选, 获得铜绿假单胞菌突变株 E126A、E146A 和 Δ PA0745。分析突变 PA0745 基因后, PA14 细胞株生长特性及致病性变化。**结果** 成功构建 PA14 细胞株的 PA0745 基因突变株 E126A、E146A 和 Δ PA0745。生长曲线测定结果表明, PA0745 基因突变后, 不影响 PA14 细胞株正常生长。细胞感染实验结果显示, 相较于 PA14 细胞株, E126A、E146A 和 Δ PA0745 对 RAW264.7 感染能力分别下降了 29.51%、60.66% 和 79.34%。**结论** 本研究成功构建了 PA14 细胞株的 PA0745 基因突变株, 并初步验证了 PA0745 基因的功能, 这对开发抗菌药物有指导意义。

[关键词] 假单胞菌, 铜绿; 毒力; PA0745 基因; 同源重组

[中图分类号] R378.99+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1763-04

Construction and identification of pseudomonas aeruginosa PA0745 gene mutant strains

LU Peilin, LIU Li, XIONG Xia[△]

(Department of Dermatology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** Constructed Pseudomonas aeruginosa PA14 PA0745 mutant and verified its pathogenicity. **Methods** Constructed Pseudomonas aeruginosa PA0745 gene deletion and point mutant by homologous recombination. Pseudomonas aeruginosa mutant strains E126A, E146A and Δ PA0745 were screened by plasmid resistance and auxotrophy. Analysed mutant PA0745, PA14 growth characteristics and pathogenic changes. **Results** PA14 PA0745 mutant strains E126A, E146A and Δ PA0745 were successfully constructed. The results of growth curve showed that PA14 PA0745 mutation did not affect PA14 normal growth. The results of cell infection showed that the infection ability of E126A, E146A and Δ PA0745 decreased by 29.51%, 60.66% and 79.34% respectively compared with PA14. **Conclusion** PA14 PA0745 mutant was successfully constructed in this study, and the function of PA0745 was confirmed, which had some guiding significance for the development of antibacterial drugs.

[Key words] pseudomonas aeruginosa; virulence; PA0745 gene; homologous recombination

铜绿假单胞菌是一种革兰阴性需氧菌, 普遍存在于土壤、水、空气和多种动物体内, 具有较强的环境适应性和耐药性, 可引起泌尿系统、呼吸系统和消化系统感染等, 是慢性皮肤溃疡创面感染最常见的细菌。尤其在合并有基础疾病或免疫力低下时, 如患有艾滋病、糖尿病和癌症等, 病死率将大大增加。此外, 由于铜绿假单胞菌耐药性强、耐药谱广, 对多种抗菌药物表现出天然或获得性耐药, 可供选择的有效抗菌药物很少。因此, 从根本上寻找新的抗铜绿假单胞菌感染途径具有重大意义^[1-2]。

研究显示, 铜绿假单胞菌耐药性的产生与生物膜的形成息息相关。其中, 临床分离的铜绿假单胞菌 PA14 细胞株可产生一种扩散信号分子 (diffusible

signal factor, DSF) 类的小分子化合物顺式-2-癸烯酸 (cis-2-decenoic acid, CDA), CDA 可有效扩散 PA14 细胞株形成的生物膜, 增强铜绿假单胞菌的致病性和耐药性。相关研究表明, 烯酰辅酶 A 水合酶/异构酶是 CDA 合成过程的关键酶^[3-6]。当 PA0745 基因功能受到抑制时, CDA 合成受阻, 铜绿假单胞菌菌膜扩散能力减弱, 致病性下降。当外源性加入 CDA 时, 菌膜运动能和细菌感染力又得以恢复。另有研究表明, PA0745 基因结构中有两个保守的谷氨酸残基对行使其催化功能具有重要意义, 他们分别是 α 3 上的 Glu126 和 α 4 上的 Glu146^[7-9]。本研究利用同源重组的原理构建 PA0745 基因点突变株 E126A、E146A 和基因缺失株 Δ PA0745, 通过生长曲线测定和细胞感染

表 1 铜绿假单胞菌 PA14 突变株构建所用引物表

点突变	核苷酸序列(5'-3')
PEX18Gm	PEX18Gm-up: ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCC PEX18Gm-down: CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTAAAC
PEX0745	PEX0745-up: AACGACGCCAGTGCCAAGCTTGCGACGAATACGTGCTGGACGG PEX0745-down: AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCGAGCAGTGCGTCCAGGCGCG
E126A	E126A-up: ACGCCATGGGCGGCGGCCTGGCCTGCGCCCTCGCCTGC E126A-down: AGCCGTTGATCGCCGCGATCGACACCCCGGAAATCGC
E146A	E146A-up: ATGGCCCTGCCGGCCCGCGGTGGGCCTGCTGCCCTG E146A-down: CTGCGCCTGGCGCTCGGCGATGCGGATGTCGAGGCGAGG
ΔPA0745	ΔPA0745-up: GCCTTCCATCGAACCCGGCGGGTGCGCC ΔPA0745-down: GAAGTCCCTACTGGATCATGGGCCGGGGCGT

up: 上游; down: 下游

实验初步验证了 PA0745 基因对铜绿假单胞菌致病性的影响。铜绿假单胞菌突变株的构建有助于开展铜绿假单胞菌功能组学研究和抗菌药物的开发。

1 材料与方 法

1.1 材料 大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司, S17-1 由四川大学包锐研究员惠赠, 铜绿假单胞菌 PA14 细胞株和穿梭质粒 PEX18Gm 均由四川大学王震玲教授惠赠。其中, PEX18Gm 质粒含有负选择性标记基因 SacB, 含有庆大霉素(Gentamicin, Gm)抗性基因。

1.2 主要试剂及引物 DNA 聚合酶(Q5TM Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase)购自北京 NEB 公司, 同源重组酶(ClonExpressTM II One Step Cloning Kit)购自南京 Vazyme 公司, 磷酸化酶(Blunting Kination Ligation Kit)购自日本 TaKaRa 公司, 限制性内切酶(Dpn I)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 质粒提取试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 抗生素购自北京天根生化科技有限公司, 蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司。引物合成和 DNA 测序由擎科生物科技有限公司完成, 引物序列见表 1。用 Primer Premier5.0 软件, 根据铜绿假单胞菌 PA14 株染色体上 PA0745 基因上下游序列, 设计包含其上下游同源臂序列(800 bp)的引物、点突变引物和 PA0745 基因敲除引物。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒 PEX0745 (PEX18 + PA0745-up + PA0745 + PA0745-down) 的构建^[10]

1.3.1.1 制备线性化载体 PEX18Gm 以 PEX18Gm 质粒为模板, 以 PEX18Gm-up 和 PEX18Gm-down 为引物, 用 DNA 聚合酶扩增质粒 PEX18Gm, PCR 反应条件如下: 98 °C 30 s, 98 °C 10 s, 62 °C 25 s, 72 °C 5 min, 30 个循环, 72 °C 5 min。反应体系为 25 μ L, 取 5 μ L PCR 产物进行 PCR 鉴定。为了提高后期重组效率, 需用限制性内切酶 Dpn I 去

除未线性化的环状质粒, 条件如下: 37 °C 2 h, 80 °C 20 min。

1.3.1.2 制备含目的基因上下游片段的 PA0745-up + PA0745 + PA0745-down 以 PA14 细胞株的 DNA 为模板, 使用引物 PEX0745-up 和 PEX0745-down 扩增含上下游片段的 PA0745-up + PA0745 + PA0745-down, PCR 反应条件如下: 98 °C 30 s, 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 32 个循环; 72 °C 5 min。反应体系为 25 μ L, 取 5 μ L 进行 PCR 鉴定之后, 再进行测序验证。

1.3.1.3 利用重组酶连接目的片段和载体得重组质粒 PEX0745 将克隆载体 PEX18Gm 和插入片段 PA0745-up + PA0745 + PA0745-down 以摩尔比为 1 : 2 的比例混合, 利用重组酶进行重组反应得重组质粒 PEX0745。反应条件如下: 37 °C 30 min, 4 °C 5 min。取 5 μ L 进行 PCR 鉴定后, 再进行测序验证。

1.3.2 PA0745 基因突变质粒 E126A、E146A 和 ΔPA0745 的构建 以重组质粒 PEX0745 为模板, 分别使用对应引物扩增出发生 126 位点突变、146 位点突变和 PA0745 基因缺失的重组质粒 E126A、E146A 和 ΔPA0745。PCR 反应条件如下: 98 °C 30 s, 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 72 °C 5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。取 5 μ L PCR 产物进行 PCR 鉴定之后, 进行测序验证。为了去除 PCR 产物中的质粒模板, 需要对其进行 Dpn I 酶切, 条件如下: 37 °C 2 h, 80 °C 20 min。对酶切产物进行磷酸化及连接, 反应条件如下: 25 °C 5 min, 16 °C 1 h。

1.3.3 采用等位基因替换原理构建铜绿假单胞菌 PA0745 基因突变株 PEX18Gm 为穿梭质粒, 它可以通过结合转移的方法从大肠杆菌 S17-1 转移至铜绿假单胞菌, 然后整合到其基因组中。PEX18Gm 携带可以在大肠杆菌中用于质粒复制的复制子、Gm 抗性基因和带有具有负选择性标记的基因 SacB。基于铜绿假单胞菌可以利用柠檬酸作为碳源, 而大肠杆菌

不可以这一特点,利用仅含柠檬酸作为碳源的培养基 VBMM 作为第 1 次同源重组的筛选。另外,SacB 基因的表达产物是果聚糖蔗糖酶,30 °C 条件下能催化蔗糖水解生成对大肠杆菌有致死作用的果聚糖。因此,SacB 基因的表达会杀死生长在含有蔗糖培养基上的大肠杆菌,可以用做第 2 次同源重组的筛选。

分别将成功制备的重组质粒 E126A、E146A 和 ΔPA0745 转化到大肠杆菌 S17-1 感受态细胞中,后涂布于含有 30 μg/mL Gm 的 LB 琼脂板上,37 °C 培养过夜。

用 LB 培养基 1 : 1 稀过夜培养的铜绿假单胞菌 PA14 细胞株,于 42 °C 环境热阻断 3~6 h,以体积比为 1 : 6 的比例与对数期供体菌 S7-1 混合,用滤器过滤使细菌置于滤膜上,再把滤膜贴于 LB 琼脂板上,30 °C 孵箱孵育过夜。

1.3.4 铜绿假单胞菌 PA14 突变株筛选鉴定 首先,利用含 50 μg/mL Gm 的 VBMM 琼脂糖平板进行第 1 次同源重组筛选;其次,利用含 10% 蔗糖的 NSLB 琼脂糖平板进行第 2 次同源重组筛选;最后,利用 PIA 琼脂糖平板分离铜绿假单胞菌,进行测序验证,得到铜绿假单胞菌 PA14 突变株 E126A、E146A 和 ΔPA0745。

1.3.5 铜绿假单胞菌 PA0745 基因突变株的生物学特性

1.3.5.1 生长曲线测定 将铜绿假单胞菌 PA14 细胞株及其突变株 E126A、E146A 和 ΔPA0745 的过夜菌,分别按照 1 : 100 的比例加入到 3 mL 新鲜的 LB 培养基和 20% LB 培养基中,37 °C 振荡培养 2 h 和 3 h 后,测 OD₆₀₀ 值,以后每 0.5 h 取样,测 OD₆₀₀ 值,绘制细菌体外生长曲线。

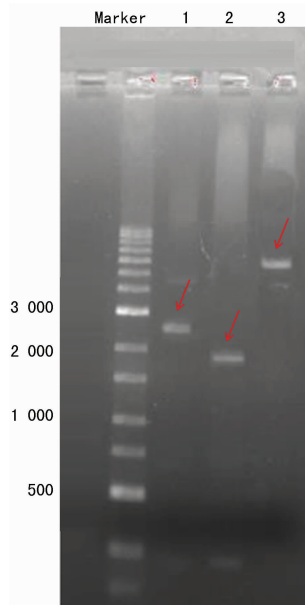
1.3.5.2 细胞侵染实验 用含 10% 胎牛血清(FBS)无抗生素的 DMEM 培养基调整对数期的铜绿假单胞菌 PA14 细胞株及其突变株 E126A、E146A 和 ΔPA0745 OD₆₀₀ 为 0.1,首先,细菌与巨噬细胞 RAW264.7 按照 10 : 1 的感染复数(MOI)混合,37 °C 共孵育 1 h。其次,培养基替换成含 10% FBS 和 150 ng/mL Gm 的 DMEM 培养基,37 °C 孵育 1 h,用以除去细胞外铜绿假单胞菌。最后,磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗后,0.5% Triton X-100 裂解细胞,梯度稀释后,涂布于 LB 琼脂糖平板上,次日对进入细胞内的细菌进行计数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组载体的鉴定 以重组质粒 PEX0745 为模板,扩增出 PA0745 基因点突变株的质粒 E126A、

E146A 和基因缺失株 APA0745,并测序,测序结果与预期结果一致,见图 1。



1:PA0745 基因和其上下游 800 bp 片段;2:PA0745 基因的上下游 800 bp 片段;3:pEX18Gm 质粒线性化

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 PA14 细胞株的 PA0745 基因突变株的特性 分别测试了 PA14 细胞株的 PA0745 基因突变株 E126A、E146A 和 ΔPA0745 在营养充足(LB)和营养缺陷(20% LB)的环境下的生长曲线。细菌在 20% LB 的生长条件下,8 h 后细菌达到生长平台期,OD₆₀₀ 为 1.5 左右,而在营养充足的 LB 生长条件下,8.5 h 后细菌达到生长平台期,OD₆₀₀ 为 2.0 左右。但不论细菌是在 LB 培养基中还是 20% LB 培养基中培养,PA14 野生型菌株与突变株生长并没有差异,说明 PA0745 基因突变后不影响 PA14 细胞株的生长,见图 2。

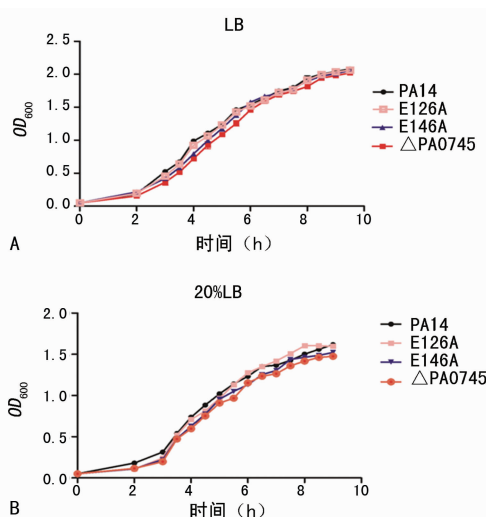


图 2 铜绿假单胞菌 PA14 细胞株及突变株在 LB(A)和 20% LB(B)中生长曲线

2.3 突变 PA0745 基因抑制铜绿假单胞菌细胞侵染

能力比较 PA0745 基因敲除后,铜绿假单胞菌侵入细胞的能力相较于野生型 PA14 细胞株下降了 79.34%,具有催化活性的 126、146 位谷氨酸分别突变成丙氨酸后,相较于野生型 PA14 细胞株,细菌侵染能力也分别下降了 29.51%及 60.66%,见图 3。

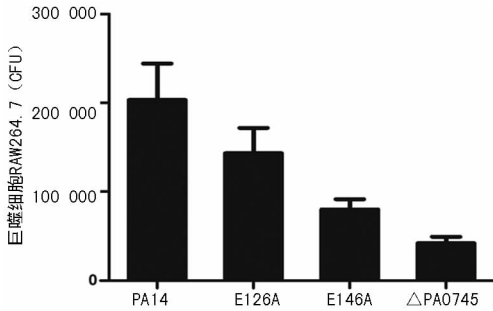


图 3 铜绿假单胞菌 PA14 细胞株及其突变株侵染巨噬细胞 RAW264.7 能力比较

3 讨 论

慢性皮肤溃疡创面为铜绿假单胞菌的存活提供良好的“培养基”,使创面迁延不愈。而在近年相关研究中发现巨噬细胞在创面愈合过程中起总指挥的作用,当细菌大量繁殖扩增,使局部炎症反应及细胞因子的生物学效应减弱,影响巨噬细胞对抗炎和促进修复的调控。这为临床医生对慢性皮肤溃疡细菌感染的抗菌治疗提供理论依据^[11]。

本研究通过同源重组的原理成功构建了铜绿假单胞菌 PA0745 基因突变株:E126A、E146A 和 ΔPA0745,通过生长曲线测定,各突变株与野生型 PA14 菌株之间并无明显差异,说明 PA0745 基因的功能缺失并不影响 PA14 细胞株的生长。通过巨噬细胞侵染实验考察 PA0745 基因对铜绿假单胞菌致病性的影响,发现相较于野生株 PA14,PA0745 基因各突变株的细胞侵染能力均出现了不同程度的下降。上述实验结果表明,以生物膜扩散信号分子形成过程中的关键酶为靶点,设计抗菌药物的可行性,由于它仅抑制细菌的致病性而不直接杀死细菌,这种抗菌药物将大大降低耐药菌株的产生。同时本实验从细菌侵染宿主方面证明了 PA0745 基因作为抗菌药物靶点的潜力,为开发针对 PA0745 基因靶点的新型抗菌药物提供理论基础^[12]。

本研究针对铜绿假单胞菌生物膜扩散信号分子 CDA 生物合成的关键酶 PA0745 基因的功能展开了研究,在后续工作中,本课题组将通过对比分析铜绿假单胞菌野生型 PA14 和 PA0745 基因敲除株基因表达谱,深入研究 CDA 在铜绿假单胞菌内参与调控的下游信号通路,以期为以 PA0745 基因为靶点的小分子抑制剂的筛选提供理论基础和可行性分析。

参考文献

- [1] 徐凤琴,黄松音,莫红平,等. sRNA phrs 调控铜绿假单胞菌生物膜形成的功能研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017,27(10):2169-2172.
- [2] 刘华之,侯良. 皮肤创伤后铜绿假单胞菌生物膜感染的治疗效果研究[J]. 当代医学,2016,22(16):7-8.
- [3] AMARI D T, MARQUES C N, DAVIES D G. The putative enoyl-coenzyme a hydratase dspl is required for production of the pseudomonas aeruginosa biofilm dispersion autoinducer cis-2-decenoic acid[J]. J Bacteriol, 2013, 195(20):4600-4610.
- [4] SEPEHR S, RAHMANIBADI A, BABAIENAIJEJ H, et al. Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e101677.
- [5] JENNINGS J A, COURTNEY H S, HAGGARD W O. Cis-2-decenoic acid inhibits S. aureus growth and biofilm in vitro: a pilot study[J]. Clin Orthop Relat Res, 2012, 470(10):2663-2670.
- [6] RAHMANI B A, SEPEHR S, FALLAHI H, et al. Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in Pseudomonas aeruginosa using microarray technique[J]. Front Microbiol, 2015, 6:383.
- [7] TAN D, CRABB W M, WHITMAN W B, et al. Crystal structure of DmdD, a crotonase superfamily enzyme that catalyzes the hydration and hydrolysis of methylthioacryloyl-CoA[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63870.
- [8] SPADARO F, SCOFFONE V C, CHIARELLI L R, et al. The crystal structure of burkholderia cenocepacia DfsA provides insights into substrate recognition and quorum sensing fatty acid biosynthesis[J]. Biochemistry, 2016, 55(23):3241-3250.
- [9] SRIVASTAVA S, CHAUDHARY S, THUKRAL L, et al. Unsaturated lipid assimilation by mycobacteria requires auxiliary cis-trans enoyl CoA isomerase[J]. Chem Biol, 2015, 22(12):1577-1587.
- [10] HMELO L R, BORLEE B R, ALMBLAD H, et al. Precision-engineering the Pseudomonas aeruginosa genome with two-step allelic exchange[J]. Nat Protoc, 2015, 10(11):1820-1841.
- [11] 陈宏. 巨噬细胞 PPAR γ 对皮肤伤口愈合的作用研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [12] FONG J, YUAN M, JAKOBSEN T H, et al. Disulfide bond-containing ajoene analogues as novel quorum sensing inhibitors of pseudomonas aeruginosa. [J]. J Med Chem, 2017, 60(1):215-227.