

外源载体高效转化肺炎克雷伯菌的新途径

郑 艳, 刘喜朋, 刘建华*

(上海交通大学生命科学技术学院 生物化学与分子生物实验室 上海 200240)

摘 要: 研究介绍了提高 *Klebsiella pneumoniae* 电转化效率的新途径, 即直接从固体平板上收集 *K. pneumoniae* 菌落制备电转化感受态细胞, 完全不同于传统的试验方法。试验菌株为野生型 *K. pneumoniae* NTUH-K2044 和 *magA*⁻ 突变型菌株。将大小不同的质粒 pIP843T、pIP843TdhaB、pIP843TdhaT 电转化 *K. pneumoniae*, 计算电转化效率。电转化试验结果表明: *K. pneumoniae* NTUH-K2044 固体菌电转化效率高达 $2 \times 10^5 \pm 300$ 转化子/ μg DNA, 而其液体菌电转化效率仅为 150 ± 10 转化子/ μg DNA; 其 *magA*⁻ 突变株固体菌的转化效率最高, 可以达到 $3.4 \times 10^7 \pm 500$ 转化子/ μg DNA, 比液体菌电转化效率提高了 10^4 倍。同时发现质粒大小对电转化效率并没有明显影响。此外, 激光共聚焦显微镜观察发现固体平板和液体培养基中的菌体存在形态学方面差异, 推测固体培养菌电转化效率的显著提高和形态学方面的表现可能具有一定的相关性。

关键词: 电转化; *Klebsiella pneumoniae* 转化效率

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0721-04

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种常见的革兰氏阴性机会致病菌, 是导致医院感染的重要原因之一, 例如: 肺炎、菌血症、尿道炎等。主要发生在老年人、营养不良、慢性酒精中毒、慢性支气管-肺疾病和全身衰竭的患者, 死亡率^[1]。因此, *K. pneumoniae* 受到了研究人员的广泛关注。然而 *K. pneumoniae* 较低的电转化效率在很大程度上限制了其遗传学方面的研究。国外以前的报道中, 一些学者采用在 LB 液体培养基中加入 CaCl_2 ^[2] 或离子螯合剂: 水杨酸钠、乙二醇二(乙醚二胺)四乙酸、乙二胺四乙酸等^[3], 可以一定程度上抑制 *K. pneumoniae* 的荚膜生成, 降低其荚膜生成量, 从而提高质粒转化效率。另外一些学者利用 O 抗原^[4] (脂多糖

的最外层成分) 缺失菌来提高电转化效率。但是, 由于 *K. pneumoniae* 本身特殊的荚膜结构, 使得研究人员操作方面的细微差异会在很大程度上影响电转化的结果。本文在传统方法基础上建立了一种更为有效的 *K. pneumoniae* 电转化方法, 操作简单方便, 结果稳定。希望我们的转化方法可以对从事 *K. pneumoniae* 遗传学研究的科学工作者有所帮助。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验菌株和质粒: 本试验所用菌株和质粒列于表 1。

表 1 试验菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this work

Bacterial strains or plasmids	Genotype or relevant description*	Reference or source
Bacteria		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strains		
NTUH-K2044	Clinical isolates collected from National Taiwan University Hospital (NTUH; serotype K1; amp ^r , tet ^s)	[5]
<i>magA</i> ⁻ mutant	Insertion mutant derivative of NTUH-K2044; non-K1 serotype; amp ^r , tet ^s , kana ^r	[5]
<i>Escherichia coli</i> strains DH5 α	ϕ 80d/lacZ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r. k-. m. k+.), supE44, relA1, deoR, (lacZrA-argF)U169	Gibco-BRL
DY329	W3110 DlacU169 nadA : :Tn10 gal490 λ cI857(Δ cro-bioA)	[6]
Plasmids		
pIP843	Tra Mob ⁺ Ctx ^r amp ^r	[7]
pIP843T	Derivative of pIP843; Tra Mob ⁺ : :tet ^r	This work
pEX18Tc	Cloning vector with a tetracycline resistance gene	This work
pIP843TdhaB	dhaB gene inserted at BamHI site of plasmid pIP843T	This work
pIP843TdhaT	dhaT gene inserted at BamHI site of plasmid pIP843T	This work

* Tra, self-transferable; Mob⁺, mobilizable; Ctx^r, cefotaxime resistance; tet^r, tetracycline resistance; tet^s, tetracycline sensitive.

基金项目: 国家自然科学基金(30571012/C011003)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-34204192 E-mail jianhualidl@sytu.edu.cn

作者简介: 郑 艳(1980-)女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为肺炎克雷伯氏菌分子遗传学。E-mail: fkseven@sytu.edu.cn

收稿日期: 2006-12-21 接受日期: 2007-01-29 修回日期: 2007-03-26

1.1.2 培养基: LB 液体培养基和 LB 固体培养基。根据实验需要添加相应的抗生素。

1.1.3 仪器: 激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 是德国蔡司公司产品, 型号是 ZESS 510 MATE。

1.2 pIP843T 类质粒的构建

1.2.1 pIP843T 质粒的构建: *K. pneumoniae* NTUH-K2044 和 *magA*⁻ 突变株均是氨卞青霉素抗性菌株, 而法国巴斯德研究院 Courvalin 教授提供的 pIP843^[7] 是氨卞青霉素抗性质粒, 不能用 pIP843 转化本研究使用的肺炎克雷伯氏菌。为此, 我们用 *tel*^R 基因替代 *bla*_{CTX-M-17} 基因, 将质粒 pIP843 改造成质粒 pIP843T。首先用寡核苷酸 (5'-ACTGATGTAACACG GATTGACCGTATTGGGAGTTTGAGCCGAGTCAGGCACCGTGTATG-3' 和 5'-TCAACTCAGCAAAGTTCGATTTATTCAACAAAACAGT CAGGTCGAGGTGGCCCGCT-3') 作为引物, 从 pEX18Tc 质粒 PCR 扩增 *tel*^R 基因, 然后将 PCR 扩增获得的 300 ng *tel*^R 基因和 100 ng 质粒 pIP843 共转化 50 μL 大肠杆菌 DY329 感受态细胞悬浮液。

1.2.2 pIP843TdhaB、pIP843TdhaT 质粒的构建: 将质粒 pIP843T 用 *Bam* HI 做单一限制性酶切, 并用 CIP 处理, 试剂盒回收。以抽取的 *K. pneumoniae* 基因组 DNA 为模板, 利用 *dhaB* 基因引物: 5'-CCCGTCGATAGATCTAGTCTGGTTCATT ATCGGCATCTG-3' 和 5'-CCCGCAGC ATAGATCTGAGAAGGTG AACAAATGAAAAGATCAAAAACGAT-3' 和 *dhaT* 基因引物: 5'-CCCGTCGAT ATG AGCTATCGTA TGTTTGATTA-3' 和 5'-CCCGTCGATTTCAGAAATGCCTGGCGGAAAATCGC-3', 通过 PCR 反应分别扩增 *dhaB*、*dhaT* 基因片段。用 *Bgl* II 酶切 PCR 扩增的 *dhaB* 和 *dhaT* 基因片段。用 T4 DNA 连接酶分别将 *dhaB* 基因和 *dhaT* 基因插入 pIP843T 的 *Bam* HI 位点, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

感受态细菌的制备与转化

1.3.1 大肠杆菌感受态细胞制备: 照文献 [6] 介绍的方法制备大肠杆菌感受态细胞。按 1:50 的比例用 LB 液体培养基稀释 32℃ 过夜培养的大肠杆菌菌液, 在 32℃ 继续培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。制备 DY329 感受态细胞, 需要在 42℃ 水浴诱导 15min, 制备 DH5α 感受态细胞, 不需要 42℃ 水浴诱导 15min。然后迅速地将细菌悬浮液置于冰上放置 10min。在 4℃ 以 5500 × g 离心 8min 收集菌体, 并用预冷灭菌双蒸水洗涤 3 次。最后悬浮于适当体积的预冷灭菌双蒸水中, 使菌液浓度达到 50 OD_{600} 左右。

1.3.2 肺炎克雷伯氏菌感受态细胞制备: 从液体培养基培养的肺炎克雷伯氏菌感受态细胞制备方法同大肠杆菌 DH5α。直接从固体培养基培养的肺炎克雷伯氏菌感受态细胞的制备方法如下。直接用牙签从固体培养基表面刮下细菌, 转移到离心管中。用预冷灭菌双蒸水洗涤 3 次。最后悬浮于适当体积的预冷灭菌双蒸水中, 使菌液浓度达到 50 OD_{600} 左右。

1.3.3 细菌电穿孔转化: 50 μL 的感受态细胞悬浮液与适当的外源 DNA 混合于 0.1cm 电转化杯。置 Bio-Rad 电转化仪进行电转化。点转化参数设置为 1.8kV, 2.5F, 200ohms。点转化后, 加入 1mL LB 液体培养基, 于 30℃ 恢复培养 2h。然后将转化菌液涂布于含四环素的 LB 固体培养基上生长。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

各个重组质粒的鉴定均采用 3 种鉴定方案。首先用 PCR 方法初筛, 即从 LB 平板的单一菌落快速抽取少量质粒, 用特异引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳筛选阳性克隆。然后用适当的限制性内切酶分析重组质粒的酶切图谱, 进一步排除假阳性克隆。最后 DNA 测序, 证实本研究所构建的 pIP843T, pIP843TdhaB, pIP843TdhaT 完全正确 (数据没有列出)。

2.2 质粒转化的 *K. pneumoniae* 阳性克隆鉴定

从 LB 固体培养基随机选取一定数量的阳性克隆, 接种到含四环素 LB 液体培养基 37℃ 培养过夜。抽取少量质粒 DNA 进行 PCR 验证。结果表明: *K. pneumoniae* 阳性克隆菌体含有 pIP843T 类质粒。

2.3 质粒电转化 *K. pneumoniae* 的效率

用质粒 pIP843T 电转化 *K. pneumoniae* 5 次, 所获得的转化效率平均值如下。来源于液体培养菌液的肺炎克雷伯氏菌, NTUH-K2044 野生型菌株的转化效率为 150 ± 10 转化子/μg DNA, *magA*⁻ 突变株的转化效率为 $1.3 \times 10^3 \pm 100$ 转化子/μg DNA。来源于固体培养基的肺炎克雷伯氏菌, NTUH-K2044 野生型菌株的转化效率为 $2 \times 10^5 \pm 300$ 转化子/μg DNA, *magA*⁻ 突变株的转化效率为 $3.4 \times 10^7 \pm 500$ 转化子/μg DNA。具有完整荚膜结构的 NTUH-K2044 野生型菌株, 其转化效率比荚膜合成缺陷菌株 *magA*⁻ 低 1~2 个数量级。特别有意思的是, 固体培养基生长的肺炎克雷伯氏菌, 其转化效率比相应的液体培养基培养的细菌高 3~4 个数量级。

进一步用大小不同的质粒, 包括 pIP843T (7.7kb), pIP843TdhaB (13kb) 和 pIP843TdhaT (9kb), 电转化肺炎克雷伯氏菌。转化效率与质粒的大小没有显著差别 (数据没有列出), 表明质粒大小对 *K. pneumoniae* 电转化效率影响不大。

2.4 *K. pneumoniae* 感受态细胞密度对电转化效率的影响

为了确定 *K. pneumoniae* 感受态细胞密度对电转化效率的影响, 用质粒 pIP843T 电转化不同浓度的肺炎克雷伯氏菌 *magA*⁻ (LB 固体培养基培养 16 h) (图 1), 在 20 OD_{600} /mL 至 60 OD_{600} /mL 细胞密度范围内, 细胞浓度的增加能够提高转化效率, 从 2×10^7 转化子/μg DNA 提高到 4×10^7 转化子/μg DNA。但是细胞浓度的进一步增加并不能提高转化效率。

2.5 固体平板培养时间对 *K. pneumoniae* 电转化效率影响

分别在固体培养基培养 *magA*⁻ 突变株 12、16、20、24h, 同时收集相应培养时间的固体平板上的菌体, 制备感受态细胞, 电转化 *magA*⁻ 突变株, 产生的转化子数目没有显著差别。

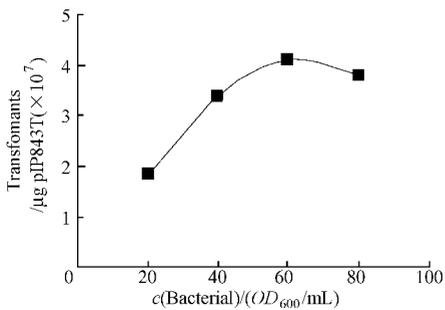


图 1 细胞密度对电转化效率的影响

Fig.1 Effect of cell density on transformation efficiency.

Different amounts of *K. pneumoniae* strain *magA*⁻ grown on LB plates for 16 hours were suspended in sterile double distilled water (ddH₂O) and electro-transformed with pIP843T (100ng plasmids per 50μL bacterial suspension). The transformation was performed in a Bio-Rad Gene Pulser that was set at 1.8kV, 2.5F and 200 ohms. The values shown here are the means from the three independent experiments.

(图 2)。由此看来,在固体 LB 培养基上培养 12~24 小时,对 *K. pneumoniae* 菌株的电转化效率影响不大。

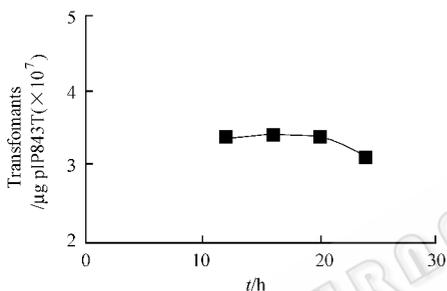


图 2 不同的培养时间对电转化效率的影响

Fig.2 Effect of competent cells of different growth ages on transformation efficiency. Competent cells in different growth stages were harvested from LB plates and prepared for electroporation. The bacterial concentrations were adjusted to 40 OD₆₀₀/mL for each transformation. The values shown here are the means from the three independent experiments.

2.6 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 观察的固体菌和液体菌的形态学差异

固体菌的电转化效率可以达到液体菌的 10³ ~ 10⁴ 倍,并且培养时间和细胞密度对电转化效率影响不显著,推测固体菌和液体菌可能在形态学或生理学方面存在着某种差异。采用激光共聚焦显微镜观察,发现两种培养模式所获得的肺炎克雷伯氏菌体有形态学差异(图 3)。固体培养细菌的细胞融合严重,液体培养细菌的细胞比较分散。这种形态学差异可能与电转化效率存在着一定的相关性。具体机制有待进一步阐明。

3 讨论

肺炎克雷伯菌是常见的医院感染病菌^[8-10],深入研究肺炎克雷伯菌具有十分重要的意义。然而,质粒 DNA 转化肺炎克雷伯菌的效率很低,极大地限制了肺炎克雷伯菌遗传学

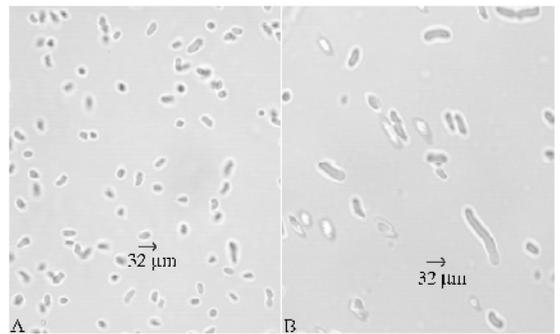


图 3 液体培养 (A) 和固体培养 (B) 的 *magA*⁻ 突变株菌的激光共聚焦显微镜图 (1000 ×)

Fig.3 Photos of *magA*⁻ mutants cultured in LB medium (A) and on LB plates (B).

The bacterial suspension was spread on glass slides and imaged with a CLSM at 1000× magnification. The red arrows in photos represented the scale bars.

研究。亦有研究证实荚膜多糖和脂多糖是外源 DNA 进入 *K. pneumoniae* 的主要阻碍。添加 CaCl₂^[2] 或离子螯合剂如水杨酸钠、乙二醇二(乙醚二胺)四乙酸、乙二胺四乙酸等^[3] 可以提高肺炎克雷伯菌转化效率,其机制是增强细胞膜的通透性或者降低荚膜厚度,提高外源 DNA 进入肺炎克雷伯菌的效率。还有一些研究者^[11] 试图通过破坏 O 抗原合成的方法,减少脂多糖的含量,从而降低外源 DNA 进入细胞的阻力,提高电转化效率。但是在实际的操作过程中,由于 *K. pneumoniae* 本身具有特殊的荚膜结构使试验结果重复性差。我们用文献已经报道的方法很难获得理想的转化效率。基于这些情况,我们认为采用固体培养基培养的细菌制备感受态细胞是转化肺炎克雷伯菌的理想方案。该方法操作简便,转化效率高,重现性好,其推广应用将显著促进肺炎克雷伯菌遗传学和致病机制^[12] 的研究。

致谢 感谢国立台湾大学医学院 Jin-town Wang 教授提供 *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 和 *magA*⁻ 突变株;感谢巴斯德研究院 Courvalin 教授提供质粒 pIP843。

参 考 文 献

- [1] 刘朝晖. 肺炎克雷伯菌肺炎临床研究进展. 岭南急诊医学杂志, 2004 (2): 159-160.
- [2] Merrick MJ, Gibbins JR, Postgate JR. A rapid and efficient method for plasmid transformation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**: 2053-2057.
- [3] Fournet-Fayard S, Joly B, Forestier C. Transformation of wild type *Klebsiella pneumoniae* with plasmid DNA by electroporation. *J Microbiol Methods*, 1995, **24**: 49-54.
- [4] Lerouge I, Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions.

- [5] Chuang YP, Fang CT, Lai SY, *et al.* Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis*, 2006, **193**: 645 – 654.
- [6] Yu D, Ellis HM, Lee EC, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 5978 – 5983.
- [7] Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**: 1212 – 1217.
- [8] Domenico P, Schwartz S, Cunha BA. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun*, 1989, **57**: 3778 – 3782.
- [9] Domenico P, Landolph DR, Cunha BA. Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate. *J Antimicrob Chemother*, 1991, **28**: 801 – 810.
- [10] Domenico P, Hopkins T, Schoch PE, *et al.* Potentiation of aminoglycoside inhibition and reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *J Antimicrob Chemother*, 1990, **25**: 903 – 914.
- [11] Regu M, Enfedaque J, Camprubi S, *et al.* The O-antigen lipopolysaccharide is the major barrier to plasmid DNA uptake by *Klebsiella pneumoniae* during transformation by electroporation and osmotic shock. *J Microbiol Methods*, 1992, **15**: 129 – 134.
- [12] Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, *et al.* Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol*, 2005, **58**: 1054 – 1073.

Highly efficient transformation with plasmid DNA in *Klebsiella pneumoniae*

ZHENG Yan, LIU Xi-peng, LIU Jian-hua

(College of Life Science & Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract : Attempts to transform *Klebsiella pneumoniae* resulted in very low efficiencies because of capsule polysaccharide (CPS). It was reported that some chelating agents could reduce CPS production and improve transformation efficiency. These methods mentioned above could not improve transformation efficiency apparently by incorporating such agents to liquid medium. However, this method introduces a simple way for efficient transformation of *K. pneumoniae*. In this method, *K. pneumoniae* strains NTUH-K2044 and *magA*⁻ mutant are involved as recipients. The plasmids used in this way are composed of pIP843T, pIP843TdhaB, pIP843TdhaT with different sizes. The sole critical step is to harvest bacteria on LB plates to prepare competent cells. 150 ± 10 , $1.3 \times 10^3 \pm 100$, $2 \times 10^5 \pm 300$, and $3.4 \times 10^7 \pm 500$ transformants were obtained per microgram plasmid DNA with NTUH-K2044 liquid cells, *magA*⁻ liquid cells, NTUH-K2044 solid cells, and *magA*⁻ solid cells, respectively. The number of transformants per μg DNA obtained by electroplating solid cells is at least 10^3 fold higher than that of transformants with liquid-cultured bacteria. This method will benefit gene manipulation and genetic study in *K. pneumoniae*.

Keywords : electroporation ; *Klebsiella pneumoniae* ; transformation efficiency