

空肠弯曲菌 *cheA* 基因插入突变及其对小鼠空肠定植能力的影响

谢礼丽, 张颂, 姚薇

常熟第一人民医院检验科, 常熟 215500

摘要:【目的】构建空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) *cheA* 基因插入突变株, 了解 CheA 与空肠弯曲菌小鼠体内定植的相关性。【方法】运用同源重组的原理构建空肠弯曲菌 *cheA* 基因突变株, 采用 PCR 技术检测 *cheA* 突变株的构建情况。通过基因回补试验构建 *cheA* 基因回补株。空肠弯曲菌感染小鼠, 运用小鼠空肠内容物涂板计数的方法检测 *cheA* 突变株、*cheA* 基因回补株和野生株定植小鼠能力的差异。【结果】PCR 检测显示成功构建 *cheA* 基因突变株。空肠弯曲菌 *cheA* 基因突变株定植小鼠空肠的数量明显减少 ($P < 0.05$); *cheA* 基因回补株定植小鼠空肠的数量跟野生株相比无明显差异 ($P > 0.05$)。【结论】本研究成功构建 *cheA* 基因突变株及其回补株。*cheA* 基因可能参与空肠弯曲菌在小鼠体内定植的过程。

关键词: 空肠弯曲菌, 同源重组, 趋化

中图分类号: S85 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0208-06

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) 经肠道感染, 引起以腹泻为主的急性肠炎, 也可导致反应性关节炎、Reiter's 和 Guillain-Barre 综合征等并发症, 故该菌是重要的食源性病原菌^[1-4]。空肠弯曲菌依赖鞭毛的定向趋化运动, 穿越粘膜表面粘液层到达空肠及回肠黏膜细胞表面定植, 然后大量繁殖引起疾病^[5-6]。近年文献报道, 不少细菌定植趋化运动受趋化 (chemotaxis, che) 相关二元信号系统 (two-component systems, TCS) 调控, 通常呈 MCPs → Ches → Flis/Mots 三级调控模式^[7-10]。Che 家族蛋白具有放大或抑制细菌趋化信号的作用。CheA 为 Ches 家族重要的一员, 具有组氨酸激酶活性, 是细菌趋化相关二元信号系统重要组成部分。有研究报道幽门螺杆菌 *cheA* 基因突变株失去定植小鼠的能力^[11]。已知空肠弯曲菌 NCTC11168 株基因组中含编码 CheA 基因^[12], 但至今尚无 CheA 与空肠弯曲菌定植小鼠空肠的相关性的研究报道。

本研究中, 我们根据同源重组的原理构建了空肠弯曲菌 NCTC11168 株 *cheA* 基因突变株, 用大肠杆菌-空肠弯曲菌穿梭质粒 pMEK80 为载体构建 *cheA* 基因突变后的回补株。运用小鼠空肠定植试验观察空肠弯曲菌 *cheA* 基因突变株及其回补株定植能力的变化, 以期初步了解 *cheA* 基因的功能, 为进一步阐明空肠弯曲菌 che 相关 TCS 信号传导系统在空肠弯曲菌感染小鼠过程中的作用打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及实验动物: 空肠弯曲菌空肠亚种 NCTC11168 株购自美国菌株保藏中心 (ACCT)。6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c-ByJ 小鼠购自北京实验动物研究中心。

1.1.2 质粒及主要试剂: 质粒 pBlueskript-II-SK 和 pET42a 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌-空肠弯曲菌穿

梭质粒 pMEK80 由华盛顿州立大学 Micheal E. Konkel 惠赠。PCR 试剂盒、限制性内切酶购自 TOYOBO、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。PCR 产物纯化试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒和 1 kb DNA maker 购自 BioColor 公司。MH 和 LB 培养基购自 Oxoid 公司。

1.2 目的 DNA 片段的扩增和测序

1.2.1 引物: 采用苯酚-氯仿法提取空肠弯曲菌 NCTC11168 株基因组 DNA, 分光光度法测定其浓度。参考 GenBank 中 *cheA* 基因序列 (Accession No.: NC_002163) 及其限制性内切酶图谱、pBlueskriit-II-SK 质粒多克隆位点中限制性内切酶位点设计引物, 引物由上海 Introvigen 公司合成。用于扩增 *cheA* 基因全长的引物为: (sense) 5'-GGCCTCGAG (*Xho* I) TTATCCTAGTTTCAA-3', (antisense) 5'-GGCTCTAG A (*Xba* I) ATGGAAGATTGCAAG-3'。

1.2.2 PCR 试剂盒扩增全长目的基因片段: 采用 100 μ L 反应体系, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 15 min。用溴乙锭预染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。*cheA* 基因扩增片段大小为 2310 bp。

1.2.3 克隆: 采用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的扩增片段后, 将 *cheA* 基因全长片段和质粒 pBlueskriit-II-SK 分别用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 琼脂糖电泳分离后用 DNA 片段切胶回收试剂盒回收。在 T4 DNA 连接酶的作用下将 *cheA* 基因片段与线性化的 pBlueskriit-II-SK 连接形成重组质粒 pBlueskriit-II-SK-*CheA*, 然后将其转化到 *E. coli* DH5 α 中并扩增, 碱变性法提取质粒, 双酶切初步鉴定后委托上海 Novagen 公司测序。

1.3 *CheA* 基因突变株的构建

1.3.1 自杀质粒的构建: 以质粒 pET42a 为模板, 用 PCR 方法扩增卡那霉素抗性基因盒 (*Kan*^r) 片段 (1062 bp), 引物序列: (sense) 5'-GGCTGATCA (*Bcl* I) ATCGGCTCCGTCGATACTATG-3', (antisense) 5'-GGCTGATCA (*Bcl* I) CATCAGAGTATGGACAGTTGC-3'。采用 PCR 产物纯化试剂盒及 T-A 克隆试剂盒将 *Kan*^r 片段回收并克隆入 pMD18-T 载体中, 形成重组质粒 pMD18-T-*kan* 并由上海 Novagen 公司测序。将 pBlueskriit-II-SK-*cheA* 和 pMD18-T-*kan* 分别用限制性内切酶 *Bcl* I 酶切, 用 DNA 片段切胶回收试剂盒回收目的片段。在 T4 DNA 连接酶的作用下

将 *Kan*^r 片段与线性化的 pBlueskriit-II-SK-*cheA* 连接形成自杀质粒 pBlueskriit-II-SK-*cheA-kan*, 再次测序。

1.3.2 突变株的筛选: 根据测序结果, 将正确的自杀质粒转化到 *E. coli* DH5 α 中, 在含有 100 μ g/mL 氨苄西林和 50 μ g/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中扩增, 采用碱变性法提取重组质粒。参照 Wassenaar 介绍的方法, 将空肠弯曲菌 NCTC11168 株与 2 μ g 自杀质粒混合, 冰浴 10 分钟后电转化 (18000 V, 200 Ω , 25 μ F)。电转产物接种无抗生素的 MH 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 然后转于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 MH 血平板继续培养, 筛选出卡那霉素抗性的 *cheA* 基因突变株菌落^[13]。按上述方法提取空肠弯曲菌 *cheA* 基因突变株基 DNA, 用 PCR 进行鉴定, 所用引物序列为: (sense) 5'-GGCTCTCCAACACTACAAAGCCA-3', (antisense) 5'-GGCGAGAAAGGTGTTCAAGAA-3'。自杀质粒及 *CheA* 基因突变株的构建策略见图 1。

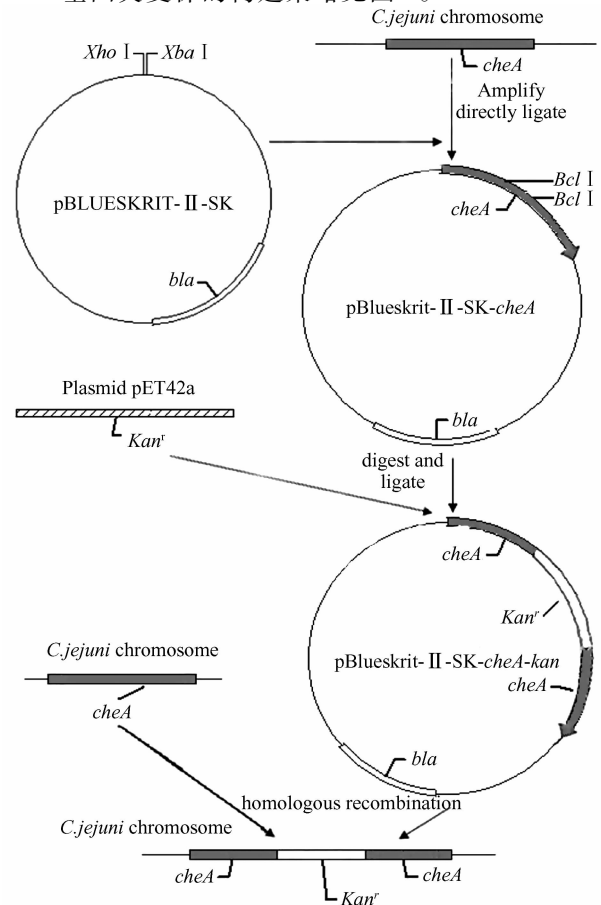


图1 空肠弯曲菌 NCTC11168 株 *cheA* 基因突变株的构建策略
Fig. 1 Strategy for generation of *cheA* mutant based on homologous recombination.

1.4 *cheA* 基因回补实验

1.4.1 *cheA* 基因回补穿梭质粒的构建:以空肠弯曲菌野生株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增一段 2671bp 的片段,此片段包含完整 *cheA* 基因及其启动子,所用引物为:(sense) 5'-GGCCTCGAG (*Xho* I) TCTTTGATCGACATCAGGACC-3', (antisense) 5'-GGC CTCGAG (*Xho* I) ATTTATGGTGAAAGTTTAAA C-3'。将此片段克隆入 pMD18-T 载体中后送上海 Novagen 公司测序。将测序正确的片段从克隆载体上酶切下来连入大肠杆菌-空肠弯曲菌穿梭质粒 pMEK80,形成 *cheA* 基因回补穿梭质粒 pMEK90,再次送上海 Novagen 公司测序。

1.4.2 *cheA* 基因回补株的筛选:大肠杆菌-空肠弯曲菌穿梭质粒 pMEK80 含有四环素抗性基因。根据测序结果,将正确的重组质粒 pMEK90 转化到 *E. coli* DH5 α 中,在含有 50 μ g/mL 四环素的液体 LB 培养基中扩增,采用碱变性法提取重组质粒。按照上述方法将重组质粒 pMEK90 通过电转化导入 *cheA* 基因插入突变株。然后在含有四环素抗性基因的 MH 血平板上筛选出 *cheA* 基因回补株。

1.5 小鼠空肠定植实验 BALB/c-ByJ 小鼠

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c-ByJ 小鼠常用于空肠弯曲菌小鼠空肠定植实验^[14-15]。实验小鼠分成两组,每组 4 只。每只小鼠灌喂 500 μ L NaHCO₃ 以中和胃酸,然后分别灌喂 1 mL 1×10^7 CFU 空肠弯曲菌 NCTC11168 野生株、*cheA* 突变株及其回补株。常规饲养 5 天,第 6 天处死小鼠,收集小鼠空肠组织

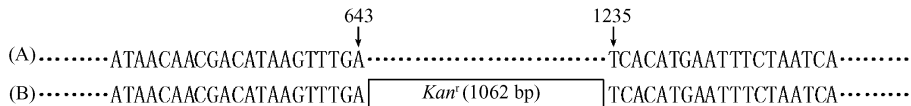


图 2 *Kan^r* 片段插入后 *cheA* 基因序列变化

Fig. 2 The changes of sequence when *Kan^r* was inserted into *cheA* gene. A: Sequence of *cheA* gene in wild-type strain; B: Sequence of *cheA* gene in *cheA* mutant.

2.3 空肠弯曲菌 *cheA* 突变株及回补株定植小鼠空肠能力的变化

空肠弯曲菌 *cheA* 突变株定植小鼠空肠能力降低,小鼠空肠内容物中空肠弯曲菌 *cheA* 突变株的数量较野生株明显减少 ($P < 0.01$);当 *cheA* 突变株 *cheA* 基因回补以后又恢复了和野生株一样的定植小鼠空肠的能力,*cheA* 回补株在小鼠空肠内容物中的数量较野生株无明显差异 ($P > 0.5$) (图 4)。

和内容物。空肠内容物经灭菌 PBS 稀释,选择 3 个连续的适宜稀释度各取 0.1 mL 涂到含筛选抗生素的 MH 血平板上,培养 72 h 后选择菌落数在 15 - 150 之间的平板计数^[14-15]。

1.6 统计学分析

各实验至少重复 3 次,小鼠空肠内容物空肠弯曲菌数量用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件中的 *t* 检验进行分析和比较, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 *cheA* 插入突变的构建

cheA 基因中插入 *Kan^r* 片段后序列发生变化,*cheA* 基因 643 bp 到 1235 bp 之间的序列被 *Kan^r* 片段替换(图 2)。

2.2 *cheA* 插入突变的证实

以质粒 pET42a、空肠弯曲菌 NCTC11168 株及 *cheA* 突变株 DNA 为模板分别扩增出预期大小的 *Kan^r*、*cheA* 和 5'*side-cheA/Kan^r-3'side* 片段(图 3-A)。与已报道的 *cheA* 基因序列(GenBank Accession No.: NC_002163)比较,所克隆的 *cheA* 基因序列的相似性为 100%,*Kan^r* 和 5'*side-cheA/Kan^r-3'side* 片段与模板序列也完全相同。为了确认 *cheA* 基因被敲除 PCR 验证时在 *cheA* 基因两侧各增加 120 bp 扩增片段。测序结果证实,*cheA* 突变株染色体 DNA 中 *cheA* 基因被插入灭活(图 3-B)。

3 讨论

不少病原菌具有特定的寄生部位,如霍乱弧菌寄生于人类小肠、幽门螺杆菌寄生于胃和十二指肠、空肠弯曲菌寄生于空肠。究其原因,是这些细菌在与宿主长期相互作用过程中逐步产生适合特定部位寄生的特征。以往认为黏附是病原菌致病的第一步,然而至少对上述肠道致病菌而言,趋化,即达到

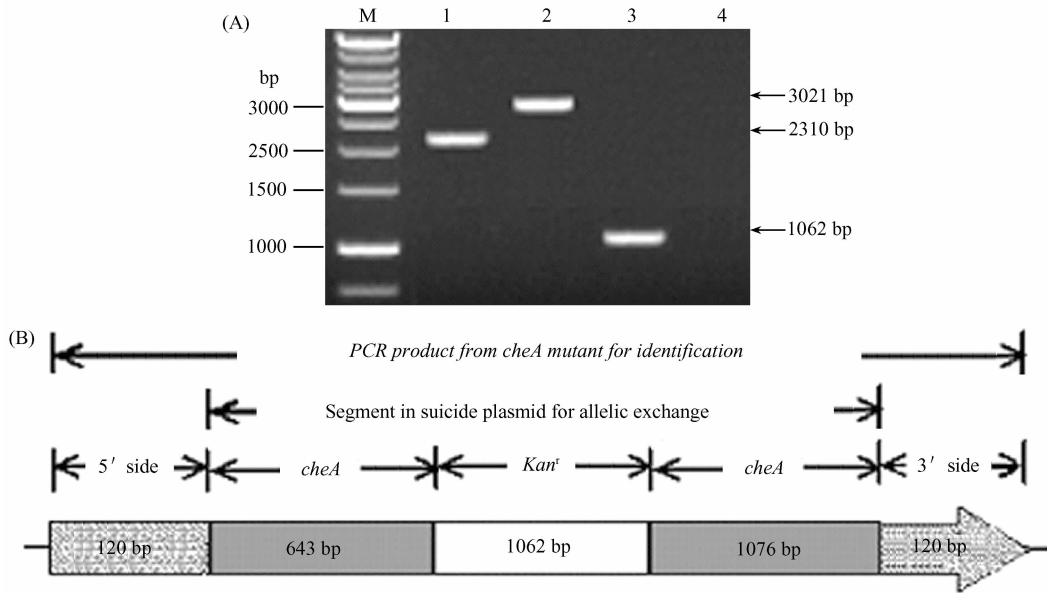


图3 PCR 扩增条带及空肠弯曲菌 *cheA* 突变株 PCR 验证策略

Fig. 3 DNA segments amplified by PCR and strategy of identification of *cheA* mutant. M: DNA maker; 1, 2 and 3: amplified DNA segments of *cheA* gene (2 310 bp), 5' side-*cheA*/*Kan^r*-3' side (3 021 bp) and *Kan^r* (1 062 bp); 4: blank control.

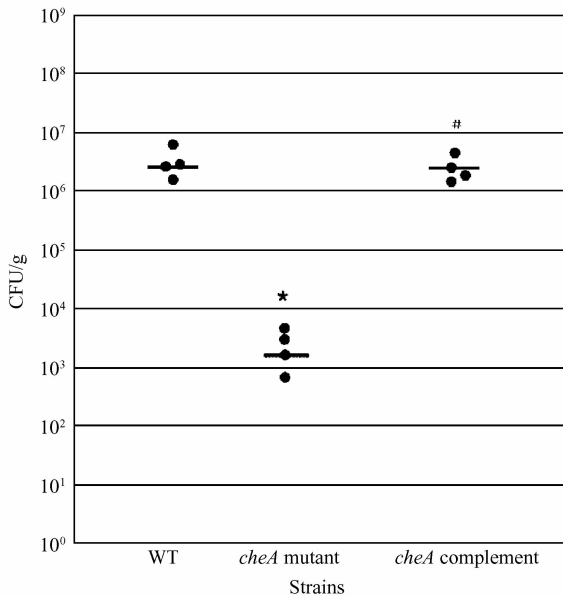


图4 小鼠空肠内容物中空肠弯曲菌计数结果

Fig. 4 Quantification of colony numbers in the jejunal contents infected with the mutants and wild-type strain. *: $P < 0.01$ vs the wild-type strain; #: $P > 0.05$ vs the wild-type strain.

特定部位的定向运动,才是其致病的第一步,继而繁殖或侵入宿主,导致疾病的发生。

细菌定向趋化运动是受外环境信息调节的反应性行为,由 *che* 相关 TCS 调控^[9-10]。目前发现的细

菌 TCS 大多由两类蛋白组成:有接受外界信号和组氨酸激酶 (histidine kinase) 活性的传感器蛋白 (sensor protein)、调控特定基因表达水平的应答调节蛋白 (response regulator protein)^[8-10]。目前认为,每种细菌均有十数个或数十个不同的 TCSs,从而使细菌能对多种不同性质和类型的外界信号作出反应^[7-10]。*che* 相关 TCS 由 MCP、Che、调控鞭毛运动三类蛋白组成。*che* 相关 TCS 基因的突变或缺失,可导致细菌趋化和定植能力减弱甚至消失^[17-19]。空肠弯曲菌有特定的寄居部位,故进入消化道后必须依赖 *che* 相关 TCS 传递信号,调控细菌鞭毛定向运动,从而到达空肠和回肠黏膜细胞表面定植。在 *che* 相关 TCS 中, *Che* 家族蛋白具有放大或抑制细菌趋化信号的作用。*CheA* 为 *Ches* 家族重要的一员,具有组氨酸激酶活性,是细菌趋化相关二元信号系统重要组成部分。有研究报道幽门螺杆菌 *cheA* 基因突变株失去定植小鼠的能力。已知空肠弯曲菌 NCTC11168 株基因组中含编码 *CheA* 基因^[12],但至今尚无 *CheA* 与空肠弯曲菌定植小鼠空肠的相关性的研究报道。

基因插入灭活是目前了解基因功能较为直接和可靠的方法。pBlueskriit-II-SK 质粒曾被成功地用于构建灭活空肠弯曲菌靶基因的自杀质粒^[20-21],因

而,在本实验中我们也采用该质粒构建灭活 *cheA* 基因的自杀质粒。在空肠弯曲菌 NCTC11168 株 *cheA* 基因中 5'端第 641 ~ 646 位、1232 ~ 1237 位有限制性内切酶 *Bcl* I 位点 TGATCA,若利用这两个位点,在其中插入 *Kan^r* 片段,其 5'端余 643 bp,3'端余 1076 bp,二者可跟空肠弯曲菌 NCTC11168 野生株 *cheA* 基因同源序列发生同源交换,导致 *cheA* 基因被灭活。为了证实被灭活的 *cheA* 基因确实位于空肠弯曲菌基因组 DNA 中而非细菌内残存的自杀质粒 pBlueskriit-II-SK-CheA-kan 中,我们在 *cheA* 基因的两端 120 bp 处设计 PCR 引物。实验结果证明,我们用此种方法成功灭活了空肠弯曲菌 NCTC11168 株 *cheA* 基因(图 2)。

BALB/c-ByJ 小鼠常用于空肠弯曲菌小鼠空肠定植实验^[14-15],为了了解空肠弯曲菌 NCTC11168 株 *cheA* 突变株致病能力的变化,我们用 *cheA* 突变株感染 BALB/c-ByJ 小鼠,发现 *cheA* 突变株定植小鼠空肠的能力明显下降,表现为小鼠空肠黏膜表面空肠弯曲菌 *cheA* 突变株明显减少,小鼠空肠内容物中 *cheA* 突变株 CFU 值有显著差异 ($P < 0.05$) (图 4)。为了进一步证实 *cheA* 在空肠弯曲菌定植小鼠空肠过程中起重要作用,我们设计了 *cheA* 突变株的 *cheA* 基因回补实验,发现 *cheA* 回补株定植小鼠空肠的能力恢复到野生株水平。

综上所述,我们证实 *cheA* 基因在空肠弯曲菌定植小鼠空肠过程中起到重要作用。

参考文献

- [1] Black RE, Levine MM, Clements ML. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 1988, 157(3): 472-479.
- [2] Robinson DA. Infective dose of *campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 1981, 282(6276): 1584.
- [3] Allos BM. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(2): 125-128.
- [4] Leung FY, Littlejohn GO, Bombardier C. Reiter's syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *Arthritis Rheumatism*, 1980, 23(8): 948-950.
- [5] Young KT, Davis LM, DiRita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(9): 665-679.
- [6] Konkel ME, Kim BJ, Amill VR. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(4): 691-701.
- [7] Tran VK, Orope R, Kenney LJ. A single amino acid substitution in the C terminus of OmpR alters DNA recognition and phosphorylation. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299(5): 1257-1270.
- [8] Koretke KK, Lupas AN, Arkin A. Evolution of two-component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(12): 1956-1970.
- [9] Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203(2001): 11-21.
- [10] Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 2002, 3(10): 3013-3026.
- [11] Terry K, Williams SM, Connolly L. Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infection and Immunity*, 2005, 73(2): 803-811.
- [12] Parkhill J, Wren BW, Mungall K. The genome sequence of food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequence. *Nature*, 2000, 403(6770): 665-668.
- [13] Wassenaar TM, Fry BN, van der Zeijst BA. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene*, 1993, 13(2): 131-135.
- [14] Pei Z, Burucoa C, Grignon B. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infection and Immunity*, 1998, 66(21): 938-943.
- [15] Baqar S, Applebee LA, Bourgeois AL. Immunogenicity and protective efficacy of a prototype *Campylobacter* killed whole-cell vaccine in mice. *Infection and Immunity*, 1995, 23(63): 3731-3735.
- [16] Meyer A, Stallmach T, Goldenberger D. Lethal maternal sepsis caused by *Campylobacter jejuni*: pathogen preserved in placenta and identified by molecular methods. *Modern Pathology*, 1997, 10(34): 1253-1256.
- [17] Smith JG, Latiolais JA, Guanga GP. Investigation of the role of electrostatic charge in activation of the *Escherichia coli* response regulator CheY. *The Journal of Bacteriology*, 2003, 185(21): 6385-6391.
- [18] Di Paola V, Marijuan PC, Beltra RL. Learning and evolution in bacterial taxis: an operational amplifier circuit modeling the computational dynamics of the

prokaryotic two component system protein network. *Biosystems*, 2004, 74(1-3): 29-49.

- [19] Terry K, Williams SM, Connolly L. Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infection and Immunity*, 2005, 73(2): 803-811.
- [20] Raczko AM, Bujnicki JM, Pawtowski M. Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the

DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology*, 2005, 151(36): 219-231.

- [21] Bachtiar BM, Coloe PJ, Fry BN. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007, 49(124): 149-154.

Construction of *cheA* insertion mutant of *Campylobacter jejuni* and the effect of its adhesion on mice jejunum

Lili Xie^{*}, Song Zhang, Wei Yao

Clinical Laboratory, First People Hospital of Chang Shu, Changshu 215500, China

Abstract: [**Objective**] To construct *cheA* (chemotaxis, che) insertion mutant of *Campylobacter jejuni* and to observe the role of *cheA* gene in adhesion of *Campylobacter jejuni* on mice jejunum. [**Methods**] We generated *cheA* gene insertion mutant of *C. jejuni* NCTC11168 based on homologous recombination. The *cheA* mutant was checked by PCR and sequencing. We detected the difference in mice jejunal adhesion between *cheA* mutant and wild-type of *C. jejuni* NCTC11168 by CFU (Colony-Forming Units) counting of *C. jejuni* in jejunal content. We confirmed the role of *cheA* gene plays in mice jejunal adhesion of *Campylobacter jejuni* by complementation analysis. [**Results**] PCR results reveal that we have successfully constructed *cheA* insertion mutant of *C. jejuni* NCTC11168. The *cheA* mutant displayed significantly attenuated colonization on jejunal mucosa of mice compared to wild-type strain ($P < 0.05$). Complementation analysis shows that the complementation of *cheA* mutant regained its ability in colonization on jejunal mucosa of mice. [**Conclusion**] The *cheA* mutant and its complementation were successfully constructed. The *cheA* gene may play an important role in colonization of *C. jejuni* on jejunal mucosa of mice.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, homologous recombination

(本文责编:王晋芳)

^{*} Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-83759506; E-mail: 275342137@qq.com

Received: 26 July 2010/ Revised: 29 November 2010