

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00671

尿路致病性大肠杆菌 *iha* 基因敲除及其对细菌生物膜形成的影响

张晓雷,毛立群,葛新*,董小青

武警后勤学院病原生物与免疫学教研室,天津 300162

[摘要] **目的** 构建尿路致病性大肠杆菌(UPEC)W140菌株的黏附素基因 *iha* 缺陷株,分析 *iha* 基因缺失对 UPEC 生物膜形成的影响。**方法** 采用 Red 重组系统的 3 种质粒(pKD46、pKD3、pCP20)敲除 W140 菌株的 *iha* 基因。pKD46 表达 λ 噬菌体的 3 个重组蛋白,转入 W140 菌株使其具有同源重组能力。以 pKD3 携带的两侧带有翻转酶结合位点(FRT)的氯霉素抗性基因替换目的基因 *iha*,再利用表达翻转酶重组酶的质粒 pCP20 将 FRT 之间的氯霉素抗性基因删除,从而获得 *iha* 基因敲除菌株。采用结晶紫染色法比较野生菌株与基因敲除菌株的细菌生物膜形成差异。**结果** PCR 验证和 DNA 测序表明,UPEC W140 菌株染色体上的 *iha* 基因被成功敲除,得到 *iha* 基因缺陷株 UPEC W140Δ*iha*。基因缺陷菌株与野生菌株相比生物膜形成能力降低($P < 0.01$)。**结论** *iha* 基因及其编码产物参与 UPEC 生物膜的形成,通过抑制该基因的表达有望为控制尿路感染提供新的靶点。

[关键词] 大肠杆菌;生物膜;尿路感染;基因敲除

[中图分类号] R 378.21

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)06-0671-05

Knockout of the *iha* gene in uropathogenic *Escherichia coli* and its influence on biofilm formation

ZHANG Xiao-lei, MAO Li-qun, GE Xin*, DONG Xiao-qing

Department of Pathogenic Biology and Immunology, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

[Abstract] **Objective** To construct the adhesin gene *iha* mutant of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strain W140, and analyze the effects of *iha* deletion on UPEC biofilm formation. **Methods** Knockout of the *iha* gene was done with plasmid pKD46, pKD3, and pCP20 of Red recombinant system. pKD46 was transformed into W140 strain to express the three recombination proteins of λ phage. The chloramphenicol resistance gene flanked by flipase recognition target (FRT) of pKD3 was amplified by PCR and transformed into W140 strain to replace the *iha* gene. Finally pCP20 was transformed into W140 strain and expressed flipase recombinase, which deleted the chloramphenicol resistance gene between FRT sites. The differences of biofilm formation ability between the wild strain and the mutant were measured by crystal violet staining. **Results** PCR verification and DNA sequencing indicated that the *iha* gene was successfully knocked out and UPEC W140Δ*iha* was constructed. The biofilm growth level of the mutant was significantly lower than that of wild strain ($P < 0.01$). **Conclusion** The *iha* gene and its encoding product are involved in the process of UPEC biofilm formation. Suppressing *iha* gene may provide a new target for controlling urinary tract infection.

[Key words] *Escherichia coli*; biofilms; urinary tract infection; gene knockout

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 671-675]

尿路感染是常见病,据估计全球每年约有 1.5 亿人患病,尿路致病性大肠杆菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)是其主要致病菌^[1]。尿路感染的发生与细菌形成生物膜密切相关。UPEC 形成生物膜后可黏附于泌尿道上皮细胞表面或导尿管

壁,由于细菌生物膜对抗菌药物和宿主的免疫应答有很强的抵抗力,而且不易清除,往往导致感染迁延不愈。细菌黏附结构在生物膜形成中发挥重要作用。我们在前期研究中利用基因芯片技术对国内临床分离 UPEC 菌株 W140 形成生物膜过程中的差异

[收稿日期] 2012-12-01 **[接受日期]** 2013-03-19

[基金项目] 武警后勤学院科研基金面上项目(WHM201202), Supported by Science Foundation of Logistics College of Chinese People's Armed Police Force (WHM201202).

[作者简介] 张晓雷,硕士生. E-mail: 007_zxl@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 022-60578092, E-mail: bigxer@163.com

表达基因进行了分析,发现一种黏附素基因 *iha* 表达增强,其上调倍数为 7.40,表明该基因与生物膜形成关系密切^[2]。*Iha* 全称为类似 IrgA 黏附素 (IrgA-homologue adhesin) 基因, GenBank 注册号 8215851, ORF 为 2 091 bp, 该基因编码细菌外膜蛋白 Iha, 能够介导 UPEC 黏附人尿路上皮细胞, 属于 UPEC 的一种毒力因子^[3]。本研究采用 Red 重组系统^[4], 对 UPEC W140 株进行 *iha* 基因敲除, 进一步证实该基因与 UPEC 形成生物膜的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒 UPEC W140 株分离自导尿管相关尿路感染患者尿标本, 在我们的前期研究中已证实能够形成明显细菌生物膜^[5]。不能形成生物膜的大肠杆菌 p678-54 为无菌毛株^[6], 由本实验室保存。Red 重组系统包括 3 种质粒, pKD46(氨苄青霉素抗性)携带 λ 噬菌体的 3 个重组蛋白 (Exo、Bet 和 Gam), 使宿主菌具有同源重组能力, 同时携带温度敏感复制子, 高于 37℃ 该质粒会丢失; pKD3 携带氯霉素抗性基因, 两侧带有翻转酶结合位点 (flipase recognition target, FRT); pCP20 (同时具有氨苄青霉素和氯霉素抗性) 表达翻转酶重组酶, 可将 FRT

之间的氯霉素抗性基因删除, 该质粒也具有温度敏感复制子, 在 42℃ 时表达翻转酶重组酶, 同时质粒逐渐消失。以上质粒购自北京金维克生命科学技术中心。

1.2 培养基与试剂 细菌常规培养采用 LB 培养基, 生物膜培养采用 M63 基础培养基, 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购自 TaKaRa 公司; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; PCR 引物合成和 DNA 测序由天津润泰科技发展有限公司完成。

1.3 PCR 引物设计 PR1 和 PR2 是用于同源重组的引物, 5' 端为 50 bp 的 *iha* 基因两侧的同源臂, 3' 端为 20 bp 的用于以 pKD3 质粒为模板扩增氯霉素抗性基因 (包括两侧的 FRT) 的引物, 扩增产物 1 133 bp。P1 和 P2 为基因敲除鉴定引物, 分别位于 *iha* 基因 ORF 的 5' 和 3' 端, 用于氯霉素抗性基因替换目的基因的鉴定 (扩增产物 1 133 bp), 以及最后氯霉素抗性基因消除的鉴定 (扩增产物 215 bp)。P3 和 P4 是 *iha* 基因鉴定引物, 用于检测菌株是否携带该基因, 其扩增产物 1 071 bp, 位于 *iha* 基因序列的中间部分。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Tab1 Sequences of PCR primers

Primer	Purpose	Sequence (5'-3')
PR1	Homologous recombination primers (<i>iha</i> homologous arms underlined)	<u>ATG CGA ATA ACC ACT CTG GCT TCC GTA GTC ATT CCC TGT CTC</u> <u>GGA TTT TCA GCG ATT GTG TAG GCT GGA G</u>
PR2		<u>TCA GAA CTG ATA GTT CAG CGA CAT CCA GTA ATT TCG CTC AGG</u> <u>TAT CAC ATT AAT TAA CGG CTG ACA TGG G</u>
P1	Identification primers for gene knockout	ATG CGA ATA ACC ACT CTG GC
P2		TCA GAA CTG ATA GTT CAG CG
P3	Identification primers for <i>iha</i> gene	TTT CAG CCA GCA GCA TAG
P4		GGA CAA CTC CGT CTT TCA T

1.4 同源重组的一般步骤 首先 PCR 扩增带 FRT 的氯霉素抗性基因 (由质粒 pKD3 提供模板), 将扩增的线性片段转入表达 Red 重组酶的菌株中, 然后选择氯霉素抗性转化子, 最后利用质粒 pCP20 表达的翻转酶重组酶将 FRT 之间的氯霉素抗性基因删除 (图 1)。

1.5 Red 重组系统的诱导 将质粒 pKD46 转化 W140 菌株, 30℃ 培养过夜。次日 1:100 接种至 100 mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养基, 30℃ 培养至光密度 $D_{600} = 0.25$ 。加入 L-阿拉伯糖至浓度为 30

mmol/L 诱导 1 h, 使质粒的 Exo、Bet 和 Gam 蛋白充分表达。将菌液冰浴 10 min, 4℃ 下 $1\ 800 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 把沉淀用预冷 10% 甘油离心洗涤 3 次, 制备电转感受态细胞。

1.6 用氯霉素抗性基因替换 *iha* 基因 以质粒 pKD3 为模板, 用引物 PR1 和 PR2 扩增氯霉素抗性基因 (含两侧 FRT)。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 变性 94℃ 40 s, 退火 56℃ 30 s, 延伸 72℃ 2 min, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后电转入表达重组酶的 W140 菌株感受态细胞,

用氯霉素抗性平板筛选阳性克隆,并在 42℃ 培养传代 3 次,以去除转入的质粒 pKD46。将克隆子分别接种于氯霉素或氨苄青霉素抗性平板,在氯霉素抗性平板中能生长而在氨苄青霉素抗性平板中不能生长,即可证实质粒 pKD46 已丢失。提取阳性克隆基因组 DNA 作为模板,分别用基因敲除鉴定引物 P1、P2 和 *iha* 基因鉴定引物 P3、P4 进行 PCR 验证。

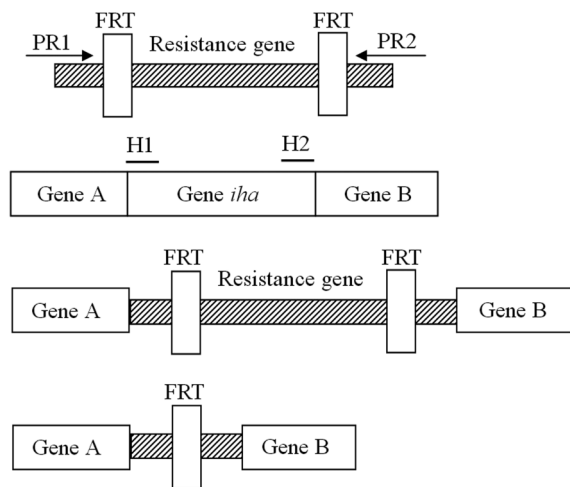


图 1 基因敲除步骤示意图

Fig 1 Schematic diagram of gene disruption strategy

FRT refers to flipase recognition target; PR1 and PR2 are primers for amplification of resistance gene; H1 and H2 refer to the homology extension

1.7 消除氯霉素抗性基因 将质粒 pCP20 转入氯霉素抗性菌株,30℃ 培养 8 h,然后提高到 42℃ 过夜,热诱导翻转酶重组酶表达,同时质粒逐渐丢失。将细菌在无抗生素 LB 培养基上划线培养,选取单菌落接种于氯霉素抗性平板上,未生长的为氯霉素抗性基因已被翻转酶重组酶删除。提取细菌基因组 DNA,用鉴定引物进行 PCR 对氯霉素抗性消失的克隆进行鉴定,并对 PCR 产物测序分析。

1.8 基因敲除菌株生物膜形成能力检测 采用结晶紫染色法^[7]。M63 基础培养基过夜培养野生菌株、基因敲除菌株和生物膜阴性菌株,菌液稀释为 2×10^7 CFU/mL,取 1.25 μ L 菌液加入到 96 孔板中的 125 μ L M63 培养基中,37℃ 静置培养 24 h,按 1:100 取菌液转移至新孔的 125 μ L M63 培养基中,37℃ 静置培养 24 h 或 48 h。每株菌设 4 个复孔。培养完成后,吸去菌液,用生理盐水清洗游离细菌,每孔加入结晶紫染色液 175 μ L,染色 1 min 后吸去染液,用生理盐水冲洗多余染液,室温放置 1 h,待完全干燥后每孔加入二甲基亚砜 200 μ L,使与生物

膜结合的结晶紫完全溶解,用酶标仪检测 D_{550} 值,结果取平均值。以只含培养基不含细菌的孔为空白对照,比较不同菌株的光密度差异。

1.9 统计学处理 数据采用 SPSS 10.0 软件进行 ANOVA 方差分析和 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 同源重组 W140 菌株(氯霉素抗性)的获得 以引物 PR1 和 PR2 扩增质粒 pKD3 上氯霉素抗性基因及两端 FRT,所得 PCR 产物转入已表达重组酶的 W140 菌株中,使带有 *iha* 基因同源臂和 FRT 的氯霉素抗性基因片段与细菌染色体上的 *iha* 发生同源重组,将 *iha* 基因替换下来。用两组鉴定引物分别扩增阳性克隆子的氯霉素抗性基因片段与 *iha* 基因片段,电泳结果见图 2。野生型 W140 菌株可扩增出 2 091 bp 的 *iha* 基因(条带 9),挑选出的 4 个阳性克隆子均能够扩增出 1 133 bp 的氯霉素抗性基因片段(条带 1、3、5、7),而未见 *iha* 基因(条带 2、4、6、8),表明在 W140 菌株染色体上 *iha* 基因已被替换成氯霉素抗性基因。

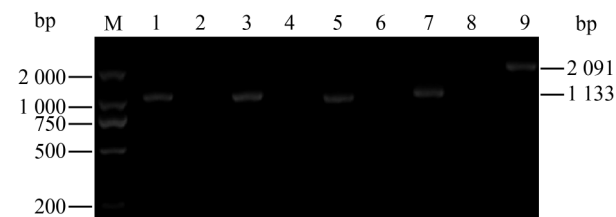


图 2 同源重组菌株 PCR 鉴定

Fig 2 PCR verification of homologous recombination strains M: DNA marker; 1,3,5,7: Chloramphenicol resistance gene in recombinant strains; 2,4,6,8: *iha* gene in recombinant strains; 9: *iha* gene in wild W140

2.2 氯霉素抗性基因的去除 质粒 pCP20 转入重组 W140 菌株,42℃ 热诱导翻转酶重组酶表达,以删除抗生素基因及一侧 FRT,同时质粒逐渐丢失。利用鉴定引物 P1 和 P2 分别对 W140 野生株、W140 氯霉素抗性重组株和 W140 *iha* 基因敲除株的染色体 DNA 进行 PCR 扩增,电泳结果见图 3。野生型 W140 菌株扩增产物为 *iha* 基因 ORF 本身大小 2 091 bp,氯霉素抗性重组株扩增产物为 1 133 bp,*iha* 基因敲除株扩增产物为 215 bp,与预期相符。对 *iha* 基因敲除株扩增产物进行 DNA 测序,表明该菌株染色体上氯霉素抗性基因已被删除,成功敲除目标基因,将该菌株命名为 UPEC W140 Δ *iha*。

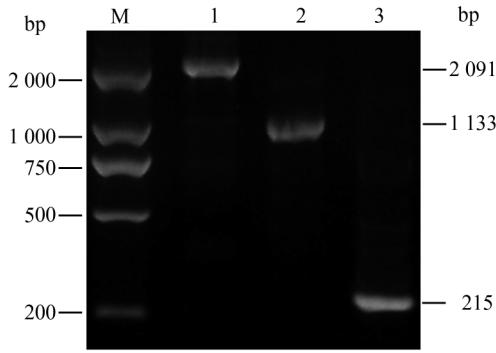


图3 UPEC W140 菌株 *iha* 基因敲除的 PCR 鉴定

Fig 3 PCR verification of *iha* mutant of UPEC W140

M: DNA marker; 1: PCR production of wild W140 strain; 2: PCR production of the recombinant with chloramphenicol resistance; 3: PCR production of UPEC W140Δ*iha*. UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*

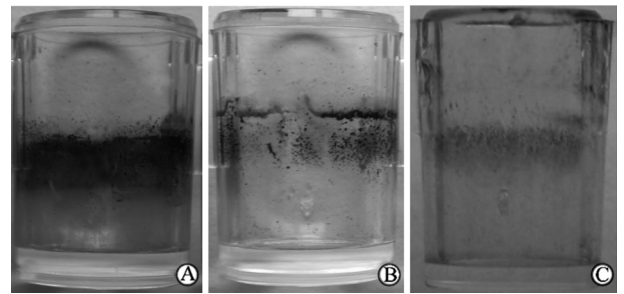


图4 W140 野生株、*iha* 基因敲除株与生物膜阴性株在培养孔中形成的生物膜

Fig 4 Biofilms in culture wells of wild, mutant, and biofilm negative strains

A: Wild W140 strain; B: UPEC W140Δ*iha*; C: *E. coli* p678-54. UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*

2.3 *iha* 基因敲除菌株生物膜形成能力的改变 将野生型 W140 菌株、W140Δ*iha* 和生物膜阴性菌株 p678-54 分别接种于 96 孔板中,使细菌黏附于孔壁形成生物膜。从结晶紫染色的结果看,野生 W140 菌株生物膜覆盖了孔壁自液面下约 1/2 区域,菌膜连接成片,比较致密、均匀(图 4A);*iha* 敲除菌株的生物膜呈斑点状,散在分布,比较稀疏,互不相连(图 4B);p678-54 菌株只是在管壁形成轻微的附着物(图 4C)。24 h 时上述 3 株菌的生物膜染色 D_{550} 检测结果为 1.36 ± 0.05 、 0.30 ± 0.03 、 0.09 ± 0.02 ;48 h 时分别为 1.40 ± 0.03 、 0.34 ± 0.05 、 0.10 ± 0.03 ,组间差异有统计学意义($P < 0.01$),但各株菌 24 h 的生物膜染色 D_{550} 检测结果与 48 h 时比较差异无统计学意义。以上结果表明,*iha* 基因敲除后细菌生物膜形成能力降低,但可能由于其他黏附结构的替代性尚未达到完全不能形成生物膜的程度。同时也说明试验菌株形成的 24 h 生物膜已经成熟,继续培养生物膜的增加并不明显。

3 讨论

Red 重组系统是近年来发展起来的大肠杆菌基因敲除技术,在一系列基因工程菌的基因修饰中发挥了重要作用。该系统主要通过 λ 噬菌体 3 个蛋白 Exo、Bet 和 Gam 发挥作用。Gam 抑制 UPEC 的 RecBCD 核酸外切酶活性,使外源线性 DNA 不至立即被降解;Exo 和 Bet 引导线性片段与同源区发生重组置换,其效率较传统的同源重组方法高几十倍^[4]。

UPEC 表面黏附素在生物膜形成过程中具有重要作用,例如 1 型菌毛被认为在生物膜发生过程中具有起始黏附的作用^[8],F9 菌毛能够介导试验菌株形成致密均一的生物膜^[9],curli 菌毛能够与物体表面直接作用促进细菌形成集束并且形成多层结构^[10]。尽管上述黏附结构在 UPEC 生物膜形成中的作用得到证实,但根据 UPEC 模型菌株 CFT073 的全基因组测序结果,属于伴侣-引导蛋白合成途径(chaperone-usher pathway)的菌毛操纵子就有 10 种,尚未完全被发现^[11]。而且 UPEC 还有多种非菌毛黏附素,这些黏附结构在细菌生物膜形成中的作用值得深入探讨。

本研究的基因 *iha* 编码一种具有黏附作用的细菌外膜蛋白。国外学者 Naves 等^[12]对 15 株形成生物膜的大肠杆菌多种黏附素基因进行分布调查,其结果认为 *iha* 基因与生物膜形成不相关。由于该学者只对 15 株细菌进行统计学分析,我们认为样本数量较少,难以真实反映 *iha* 基因在生物膜形成中的作用,而且 UPEC 菌株的多样性很可能导致国内外菌株差异。本课题组前期进行的基因芯片检测已证实 *iha* 基因在 UPEC 形成生物膜时上调表达^[2],此外我们在国内临床分离 UPEC 中检测到 *iha* 基因携带率为 76%,特别是在生物膜阳性的 UPEC 菌株中的分布率高于生物膜阴性菌株,且差异具有统计学意义(待发表资料),这都表明 *iha* 基因与生物膜形成的相关性。

本研究利用 Red 重组系统对 W140 株进行 *iha* 基因敲除,能够更直接反映该基因在生物膜形成中的作用。从实验结果看,UPEC W140Δ*iha* 确实表

现出生物膜形成能力的降低,说明 *iha* 基因及其编码产物是细菌生物膜形成的主要参与者。当然由于参与生物膜形成的细菌黏附结构不只 Iha 一种,其他黏附素在 Iha 缺失后能发挥一定程度代偿作用,所以 UPEC W140 Δ *iha* 仍然表现出较弱的生物膜形成能力,这也反映出细菌生物膜形成机制的复杂性。尽管如此,在证实 *iha* 基因参与 UPEC 生物膜形成的基础上,通过进一步分析其发挥作用的具体途径和方式,对该基因或其表达产物进行某种形式的干预,有可能对 UPEC 生物膜的发生、发展起到积极地阻断作用,有望为尿路感染的防治增添有益的内容。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model[J]. Microbiology, 2009, 155: 1634-1644.
- [2] 王 辉, 张晓雷, 葛 新, 董小青. 尿路致病性大肠埃希菌生物膜形成过程中差异表达基因筛选与分析[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29: 747-749.
- [3] Tarr P I, Bilge S S, Vary J C Jr, Jelacic S, Habeeb R L, Ward T R, et al. Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure[J]. Infect Immun, 2000, 68: 1400-1407.
- [4] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6640-6645.
- [5] 葛 新, 王 辉, 张晓雷, 董小青. 两种营养条件对尿路致病性大肠埃希菌生物膜形成的影响[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11: 195-198.
- [6] Ge X, Dong J, Chen J Y, Yao P, Gu C, Yang D J. Comparison of infection of different cell lines by uropathogenic *Escherichia coli* [J]. Chinese Sci Bull, 2009, 54: 2662-2668.
- [7] 吴玉秀, 葛 新, 靳 颖, 董小青. 尿路致病性大肠埃希菌生物膜形成与耐药性的关系[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10: 405-408.
- [8] Niba E T, Naka Y, Nagase M, Mori H, Kitakawa M. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli* [J]. DNA Res, 2007, 14: 237-246.
- [9] Ulett G C, Mabbett A N, Fung K C, Webb R I, Schembri M A. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation[J]. Microbiology, 2007, 153: 2321-2331.
- [10] Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi T T, Vidal O, Lejeune P. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid[J]. Environ Microbiol, 2000, 2: 450-464.
- [11] Welch R A, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 17020-17024.
- [12] Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains[J]. Microb Pathog, 2008, 45: 86-91.

[本文编辑] 魏学丽, 尹 茶