

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.01

大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭载体构建

李 建, 张 磊, 张 媛, 彭国瑞, 王秀丽, 刘 博, 辛凌翔, 罗玉峰, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-01-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0001-05 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 合成胸膜肺炎放线杆菌质粒 pKMA2425 上长度为 126 bp 及 2214 bp 的 2 个 DNA 片段, 克隆到大肠埃希氏菌质粒 pGSI 中, 获得重组质粒 pGSIA。PCR 扩增 pTKRED 上的大观霉素抗性基因及线性化的 pGSIA (126 bp DNA 片段+pGSI+2214 bp DNA 片段), 连接, 电转化胸膜肺炎放线杆菌, 在大观霉素的选择压力下筛选鉴定到连接正确的质粒, 命名为 pGSIAS。pGSIAS 测序结果符合预期。在大观霉素的选择压力下, 含有 pGSIAS 的胸膜肺炎放线杆菌血清 1~10 型菌株均生长良好; 在氨苄青霉素的选择压力下, 含有 pGSIAS 的大肠埃希氏菌生长良好。结果表明本研究构建的大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭载体 pGSIAS 序列正确, 在胸膜肺炎放线杆菌及大肠埃希氏菌中均能复制并表达质粒上的相关基因。

[关键词] 大肠埃希氏菌; 胸膜肺炎放线杆菌; 穿梭载体

Construction of *Escherichia coli*-*Actinobacillus pleuropneumoniae* Shuttle Vector

LI Jian, ZHANG Lei, ZHANG Yuan, PENG Guo-rui, WANG Xiu-li, LIU Bo, XIN Ling-xiang,

LUO Yu-feng, JIANG Yu-wen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: Jiang Yu-wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

Abstract: A 126bp - length DNA fragment and a 2214bp - length DNA fragment from *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmid pKMA2425 were synthesized and then cloned into pGSI. The constructed recombinant plasmid was named pGSIA. Spectinomycin resistance gene amplified by PCR from pTKRED and linear pGSIA (126bp-length DNA fragment+pGSI+2214 bp-length DNA fragment) amplified by PCR from circular pGSIA were ligated together and then transformed into *Actinobacillus pleuropneumoniae* by electroporation. In the selection pressure of spectinomycin, correctly ligated recombinant plasmid was gained by PCR identification and named pGSIAS. Sequencing result of pGSIAS was as expected. In the selection pressure of spectinomycin, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 ~ 10 containing pGSIAS grewed well. In the selection pressure of ampicillin, *Escherichia coli* containing pGSIAS grewed well. The results showed that the sequence of *Escherichia coli*-

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFC1202303)

作者简介: 李 建, 硕士, 从事兽用生物制品研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

Actinobacillus pleuropneumoniae shuttle vector pGSIAS was correct. In addition, pGSIAS could replicate itself and express related genes on the vector in *Actinobacillus pleuropneumoniae* or *Escherichia coli*.

Key words: *Escherichia coli*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; shuttle Vector

猪传染性胸膜肺炎 (porcine contagious pleuropneumonia, PCP), 又称坏死性胸膜肺炎, 是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) [1] 引起的一种猪高度传染性呼吸道疾病。该病于 1957 年由 Pattison 等 [2] 首次报道, 此后逐渐扩散, 目前已遍布世界各地, 在美洲 (美国、加拿大、墨西哥)、欧洲 (瑞士、瑞典、丹麦)、澳大利亚、亚洲 (日本、韩国和中国 [3]) 等地均有流行, 但各地方所流行的血清型不尽相同。1~4 月龄的猪感染时死亡率为 5%~30%, 在新引进猪群中多呈急性爆发, 发病率和死亡率在 20% 以上, 最急性的死亡率可高达 80%~100% [4]。由于各个猪场的免疫情况不同, 死亡率也不尽相同 [5]。1989 年国外报道 APP 导致猪平均日增重下降 33.6%, 饲料报酬下降 25.5% [6]。研究证实, 预防和控制本病最有效的措施仍然是疫苗免疫接种。从临床上观察到, 无论是自然感染还是通过人工方法感染 APP 后存活的猪, 均获得了对所有血清型菌株再次感染的免疫保护力, 暗示若干保护性抗原或免疫复合物可能在交叉保护中起着关键性的作用, 这些成分可能仅在病原感染动物时被诱导产生, 而在动物体外用培养基培养时并不产生。因此, 弱毒活疫苗有可能解决传统灭活疫苗、亚单位疫苗及菌影疫苗等交叉保护力不理想的问题。

利用 DNA 定点同源重组技术可快速对特定 DNA 片段进行缺失、置换或插入, 用以构建减毒株。大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭载体是该平台技术的重要元件, 如携带重组酶表达元件, 则可极大提高同源重组效率; 同时, 也可携带其他基因表达元件或基因沉默元件, 通过基因的过量表达、表达量减少或完全抑制表达来实现对该基因功能的研究。本研究以大肠埃希氏菌质粒 pGSI、胸膜肺炎放线杆菌 pKMA2425 及大观霉素抗性基因为元件, 构建大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pTKRED 购自 NTCC 典型培养物保藏中心。

1.1.2 培养基 普通琼脂、普通肉汤、TSA、TSB 均购自北京中海生物科技有限公司; 氨苄青霉素购自 Amresco 公司; 大观霉素购自上海江莱生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; PCR 产物回收试剂盒购自北京绿源伯德生物科技有限公司; USER-TM 酶购自 NEB 公司; PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 合成 DNA 片段 合成胸膜肺炎放线杆菌质粒 pKMA2425 (Genbank: AJ830714.1) 20~145 bp 片段 (全长 126 bp) 及 962~19 bp (全长 2214 bp), 克隆到大肠埃希氏菌质粒 pGSI 中, 命名为 pGSIAS。

1.2.2 引物设计与合成 利用软件 Oligo6.7.1.0 进行引物的设计, 各 DNA 片段所需引物见表 1。

1.2.3 提取质粒 在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的普通肉汤中培养含 pGSIAS 的大肠埃希氏菌, 提取 pGSIAS, 溶于超纯水。在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大观霉素的普通肉汤中培养含 pTKRED 的大肠埃希氏菌, 提取 pTKRED, 溶于超纯水。

1.2.4 PCR 扩增构建穿梭载体所需元件 以环状 pGSIAS 为模板扩增线性 pGSIAS, 以 pTKRED 为模板扩增大观霉素抗性基因。胶回收, 溶于 TE, 测定 DNA 浓度。

1.2.5 载体连接 线性 pGSIAS 0.01 pmol, 大观霉素抗性基因 0.1 pmol, USER-TM enzyme mix 1 μL , TE 补足 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 用 PCR 产物回收试剂盒回收连接产物。

表 1 引物
Tab 1 Primers

扩增片段 Amplified fragments	引物 Primers	模板 Templates	扩增长度/bp Length of amplified fragments (bp)
线性 pGSIA	ACTGCACAUTC GGGATATTTCT ATGGGGGCUTCTATAATAGGTC	环状 pGSIA	5212
大观霉素抗性基因	AGCCCCAUGCCTCAGCAACTGGTCC ATGTCAGUTATTTGCCGACTACCTTGGT	pTKRED	1026
16SrDNA 片段	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT ^[7]	大肠埃希氏菌或 胸膜肺炎放线杆菌	1505

1.2.6 电转化 用胸膜肺炎放线杆菌血清 4 型菌株制备电转化感受态细胞,将回收的连接产物电转化到感受态细胞中,电转化参数为电压 2.5 kV,电容 25 μ F,脉冲电阻 800 Ω 。非抗性复苏 3 h,涂布含 100 μ g/mL 大观霉素的平板。

1.2.7 载体的测序鉴定 取单菌落培养后提取质粒,送交中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。

1.2.8 穿梭质粒复制表达能力验证 鉴定正确的质粒命名为 pGSIAS(图 1),取 pGSIAS 转化大肠埃希

氏菌 DH5 α 感受态细胞,非抗性复苏 3 h 后,涂布含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的平板。取单菌落培养后,提取质粒,电转化胸膜肺炎放线杆菌血清 1~3 及 5~10 型菌株,非抗性复苏 3 h 后,涂布含 100 μ g/mL 大观霉素的平板。取含 pGSIAS 的大肠埃希氏菌单菌落接种含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的普通肉汤,取含 pGSIAS 的胸膜肺炎放线杆菌接种含 100 μ g/mL 大观霉素、0.001% NAD 及 8% 胎牛血清的 TSB,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 24 h,观察细菌是否生长。

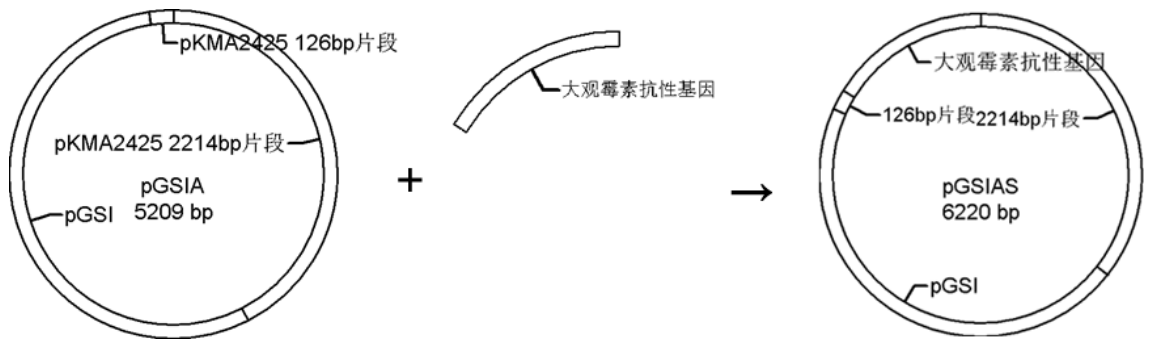


图 1 pGSIAS 构建的技术路线图

Fig 1 Technical route of pGSIAS construction

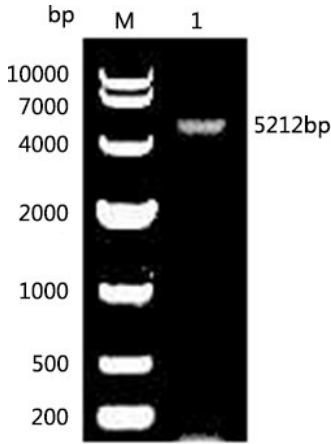
1.2.9 含穿梭质粒菌株的鉴定 PCR 扩增含 pGSIAS 的大肠埃希氏菌及胸膜肺炎放线杆菌血清 1~10 型菌株的 16SrDNA 片段,送交中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。对胸膜肺炎放线杆菌血清 1~10 型菌株进行血清型鉴定。

2 结果与分析

2.1 pGSIA 序列分析 用 DNAMAN7.0.2.176 对

pGSIA 测序结果与预期序列进行比对,结果同源性为 100%,符合预期。

2.2 载体元件 PCR 扩增结果 以环状 pGSIA 为模板扩增出了全长为 5212 bp 的线性 pGSIA(图 2),以 pTKRED 为模板扩增出了全长为 1026 bp 的大观霉素抗性基因(图 3)。上述两个 DNA 片段用于拼接穿梭载体。



M: DL10000 DNA Marker

1: 线性 pGSIA PCR 产物

1: linear pGSIA PCR product

图 2 线性 pGSIA PCR 产物电泳图

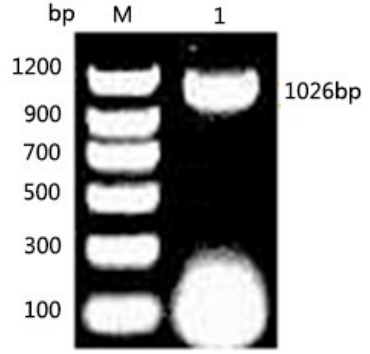
Fig 2 Electrophoresis photo of linear pGSIA PCR product

2.3 pGSIAS 序列分析 用 DNAMAN7.0.2.176 对 pGSIAS 测序结果与预期序列进行比对, 结果同源性为 100%, 符合预期。

2.4 穿梭质粒 pGSIAS 功能验证 含有 pGSIAS 的大肠埃希氏菌 DH5 α 株在 100 μ g/mL 氨苄青霉素的选择压力下生长良好; 含有 pGSIAS 的胸膜肺炎放线杆菌血清 1~10 型菌株在 100 μ g/mL 大观霉素的选择压力下生长良好; 结果表明 pGSIAS 在大肠埃希氏菌及胸膜肺炎放线杆菌中均能正常复制, 在大肠埃希氏菌中可表达氨苄青霉素抗性基因, 在

胸膜肺炎放线杆菌中可表达大观霉素抗性基因, 证明 pGSIAS 是大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭质粒载体。

2.5 含有穿梭质粒 pGSIAS 的菌株的鉴定 大肠埃希氏菌 DH5 α 株及胸膜肺炎放线杆菌血清 1~10 型菌株均扩增出了全长为 1505 bp 的 16SrDNA 片段(图 4), 测序结果与 Genbank 上的序列进行比对, 结果表明上述 11 株菌株均不是杂菌。胸膜肺炎放线杆菌间接血凝试验结果表明 10 株胸膜肺炎放线杆菌的血清型均与对应标识一致。



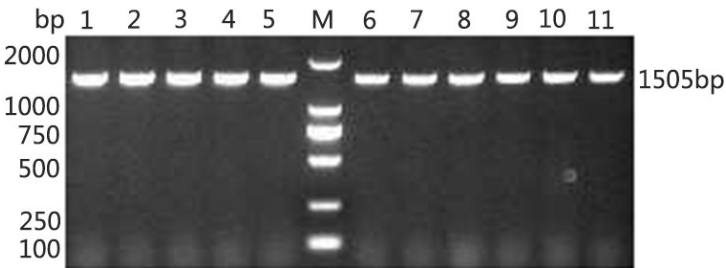
M: DNA Marker II

1: 大观霉素抗性基因 PCR 产物

1: Spectinomycin resistance gene PCR product

图 3 大观霉素抗性基因 PCR 产物电泳图

Fig 3 Electrophoresis photo of spectinomycin resistance gene PCR product



M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 16SrDNA 片段 PCR 产物

1~11: 16SrDNA fragment PCR product

图 4 16SrDNA 片段 PCR 产物电泳图

Fig 4 Electrophoresis photo of 16SrDNA fragment PCR product

3 讨论与小结

穿梭质粒具有两套来源于不同生物的复制子及选择标记元件,可以克服亲缘关系较远的两种生物在遗传上的障碍,实现同一质粒同时在不同生物体内的复制^[8]。由于大肠埃希氏菌操作简便成熟,其质粒拷贝数高,重组质粒易于大量制备,研究者偏爱构建在大肠埃希氏菌中的穿梭载体。

Guy Lalonde 等^[9]构建了第 1 个大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌放线杆菌穿梭载体 pYG53。J. Frey^[10]构建了 7800 bp 的大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌放线杆菌穿梭载体 pJFF224-NX 及 pJFF224-XN。本研究构建的大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌放线杆菌穿梭载体 pGSIAS 全长 6220 bp,容纳外源 DNA 片段的能力比 pJFF224-NX 及 pJFF224-XN 更大。

pGSIAS 在 10 种血清型胸膜肺炎放线杆菌中均能正常复制,稳定遗传,有效表达大观霉素抗性基因,表明该载体具有大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌放线杆菌穿梭质粒载体的相关功能。本试验操作中,在转化步骤可能由质粒溶液带入杂菌,影响实验结果的可靠性,因此,本试验在转化的后续操作中挑取单菌落开展试验,并且对相关菌株进行了定种鉴定,16SrDNA 片段序列比对结果确定了试验过程中未污染杂菌,胸膜肺炎放线杆菌间接血凝定型试验结果确定了未发生血清型间交叉污染。上述结果表明穿梭质粒 pGSIAS 功能验证结果可靠。

本研究构建了大肠埃希氏菌-胸膜肺炎放线杆菌穿梭载体 pGSIAS,并对其穿梭功能进行了验证,可以此为基础,进一步开展疫苗开发及基因功能研究等方面的工作。

参考文献:

[1] Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, *et al.* 猪病学(第 8 版)(赵德明,张中秋,沈建忠,译)[M].北京:中国农业大学出版社,2003:357-959.
Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, *et al.* Diseases of Swine (8th edition) (Translated by Zhao Deming, Zhang Zhongqiu, Shen Jianzhong) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003:357-959.

[2] I.H. Pattison, D.G. Howell, J. Elliot. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions [J]. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 1957, 67:320-330.
[3] 徐金生,黄宝春,肖军,等.进口美国种猪首次检出猪嗜血杆菌胸膜肺炎抗体[J].中国动物检疫,1988,(1):11-13.
Xu Jinsheng, Huang Baochun, Xiao Jun, *et al.* Haemophilus Pleuropneumoniae Antibody was First Detected in Boars Imported from the United States [J]. China Animal Health Inspection, 1988, (1):11-13.
[4] 方琴,朱仕炯.猪传染性胸膜肺炎诊断与治疗[J].畜牧兽医科技信息,2009,(8):66-67.
Fang Qin, Zhu Shijiong. Diagnosis and Treatment of Porcine Contagious Pleuropneumonia [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009, (8):66-67.
[5] Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia [J]. J Am Vet Med Assoc, 1994, 204(9):1334-1340.
[6] 陈小玲,杨旭夫,朱士盛.猪传染性胸膜肺炎的流行现状和防控措施[J].中国兽医杂志,2001,37(7):33-35.
Chen Xiaoling, Yang Xufu, Zhu Shisheng. Epidemic Status and Control Measures of Porcine Contagious Pleuropneumonia [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2001, 37(7):33-35.
[7] 林华,陈世界,杨苗,等.1株猪源绿色气球菌的分离鉴定[J].畜牧与兽医,2015,47(8):113-116.
Lin Hua, Chen Shijie, Yang Miao, *et al.* Isolation and Identification of 1 Strain of Porcine *Aeroecoccus viridans* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 47(8):113-116.
[8] 杨键,游志庆,麦志茂,等.大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体的构建及其在蛋白酶基因表达中的应用[J].生物技术通报,2013,9:146-150.
Yang Jian, You Zhiqing, Mai Zhimao, *et al.* Construction of a Versatile *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* Shuttle Vector and Its Application in Protease Gene Expression [J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 9:146-150.
[9] Guy Lalonde, Peter D. O'Hanley. Development of a shuttle vector and a conjugative transfer system for *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Gene, 1989, 85(1):243-246.
[10] J. Frey. Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other Pasteurellaceae [J]. Research in Microbiology, 1992, 143(3):263-269.