

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.02.02

PEC HPI *irp2* 基因缺失株的构建及蛋白结构功能预测

刘超英, 吴程华, 高洪*, 严玉霖, 富国文, 赵汝

(云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

[收稿日期] 2017-05-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 02-0012-07 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为了探讨致病性大肠杆菌内 HMWP2 蛋白的生物学结构和功能, 采用 Red 同源重组技术, 对致病性 *E.coli* 的 HPI *irp2* 基因进行敲除, 成功构建了致病性 *E.coli irp2* 基因缺失株, 并利用测序结果对 HMWP2 蛋白进行了多重预测分析, 以期对致病性大肠杆菌相关疾病的防治和发生机理研究提供理论基础。

[关键词] 致病性 *E.coli*; *irp2* 基因; HMWP2; Red 同源重组; 基因敲除

Construction of PEC HPI *irp2* Gene Deletion Strains and Structure and Function Prediction of HMWP2

LIU Chao-ying, WU Cheng-hua, GAO Hong*, YAN Yu-lin, FU Guo-wen, ZHAO Ru

(Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Corresponding author: GAO Hong, E-mail: gaohongping@163.com

Abstract: In order to investigate the biological structure and function of HMWP2 protein in PEC, the *irp2* gene was knocked down by Red homologous recombination technique and *irp2* gene deletion strain was successfully constructed, then the structure and function of HMWP2 protein was predicted and analysed by *irp2*'s sequence. This study aims to provide a theoretical basis for prevention and pathogenesis of *E.coli*-related diseases.

Key words: PEC; *irp2* gene; HMWP2; Red homologous recombination; gene knock-out

耶尔森菌强毒力岛 (The Yersinia High-pathogenicity island, HPI) 主要含有与摄铁有关的毒力基因簇^[1-3]。研究表明, 耶尔森杆菌 HPI 不仅可以由 Ybt 的铁载体夺取宿主中的铁元素进而加重机体的感染, 而且可在耶尔森菌和 *E.coli* 之间水平传播, 与致病性 *E.coli* 的毒力进化有着密切的关

系^[4]。*irp2* 基因是 HPI 中主要的功能基因, 在铁缺乏的条件下可表达高分子量蛋白 (High Molecular Weight Protein 2, HMWP2)。高分子量铁调节蛋白参与表达耶尔森杆菌素的阳性表型, 被认为对铁载体耶尔森杆菌素的合成有着非常重要的作用。因此, 致病性 *E.coli* 的 *irp2* 基因缺失株的构建对致病机

基金项目: 国家自然科学基金 (31260594; 31660704); 云南省高校科技创新团队支持计划资助 (云教科[2011]14 号); 云南生猪产业技术体系建设专项经费资助 (云财农[2009]171 号)

作者简介: 刘超英, 博士研究生, 从事特种经济动物健康养殖方面研究。

通讯作者: 高洪。E-mail: gaohongping@163.com

制的研究至关重要。

大肠杆菌基因敲除的传统方法是利用其自身的 RecA 同源重组系统编码的 RecA 和 RecBCD 蛋白介导 DNA 的同源重组。但因该系统存在重组效率低等较多缺点,目前主要采用更为简单迅速的 Red 同源重组系统的方法进行基因敲除^[5-6]。利用该方法构建致病性大肠杆菌 (Pathogenic *E. coli*, PEC) HPI *irp2* 基因缺失株,不仅为 HPI 毒力致病机理研究提供技术基础和理论依据,也为大肠杆菌病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 质粒 pKD46、pKD4、pCP20 购自优宝生物,5 株 *E. coli* (A-E) 分离株由实验室分离鉴定保存。试剂及试剂盒主要包括离心柱型质粒小提试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、2 × power Taq MasterMix、Competent Cell Preparation Kit、Phusion Flash High – Fidelity PCR MasterMix、FastDigest DpnI 限制性内切酶等。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取和 *irp2* 基因的检测 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明提取 CVCC1565、*E. coli* (A-E) 分离株培养液的 DNA,产物保存在

-20 ℃,作为 PCR 模版备用。根据 *irp2* 基因序列 (GenBank 登录号:L18881.1) 的保守区域设计上下游引物,*irp2*-F (5'-3'):TTCCTTCAGCATCGCCTGT-TA,*irp2*-R (5'-3'):CAAGCCCGACATACTCAATCT,由华大基因公司合成。以提取的 DNA 为模版,*irp2*-F/R 为引物,进行 PCR 扩增。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72℃ 再延伸 5 min。扩增结束后,经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测,并在紫外灯下观察结果,拍照。选择 *E. coli* (E) 为试验对象,送硕擎公司进行 *irp2* 基因测序。

1.2.2 Red 同源重组引物的设计 根据 pKD 4 序列 GENE BANK (AY048743.1) 设计引物扩增两侧带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因,在上下游引物 5' 端加入 50 bp 和 45 bp 的 *irp2* 基因的同源重组臂,同源重组引物为 Q1/Q2 (划线部分为同源臂);根据 pKD 46 序列 (GenBank 登录号:AY048746.1) 设计 pKD46 质粒鉴定引物 bet-F/R;根据 pCP 20 序列 (GenBank 登录号:HB393402.1) 设计 pCP 20 质粒鉴定引物 FLP-F/R;敲除鉴定引物为 A1、A2、B1、B2,引物由华大基因合成。引物序列见表 1:

表 1 同源重组所用引物
Tab 1 Primers of homologous recombination

名称 Name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
Q1	ATGATTTCTGGCGCACCATCTCAGGATTCGCTGTTACCGGACAACCGCCA- GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	50
Q2	CTATATCCGCCGCTGACGACGGCGAACAGGGCGAGGTGCTTGTGTATGG- GAATTAGCCATGCTCC	
bet-F	TGCGTTACCGAATGGATGG	56.7
bet-R	TGCTCTGCGGCTTTCTGTIT	
FLP-F	GTGCCTACTAACGCTTTGT	52
FLP-R	GTGCTGCTGAAC TAACCTA	
A1	GATTCGCTGTTACCGGAC	51
A2	TCCTCATCCTGTCTCTTGAT	
B1	CTAAAGGAAGCGGAACACGTA	50
B2	TATATCCGCCGCTGACGA	
A1	GATTCGCTGTTACCGGAC	51
B2	TATATCCGCCGCTGACGA	

1.2.3 *irp2* 缺失株的构建 以质粒 pKD 4 为模板, Q1、Q2 为引物进行 PCR 反应, 制备打靶 DNA 片段。制作 *E.coli*(E) 细胞感受态, 将 pKD 46 质粒转化后用特异性鉴定引物 bet-F/R 鉴定 pKD 46 阳性菌株, 转化成功的菌株命名为 *E.coli*(E)/pKD 46。过夜培养后制备 *E.coli*(E)/pKD 46 电转化感受态细胞并进行电转化, 完成后取 100 μ L 菌液涂布在 LB 固体培养基(卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL)上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 然后使用鉴定引物 A1、A2 和 B1、B2 挑选卡那霉素抗性重组子(图 1)。挑选含有 Kan⁺ 和 Amp⁺ 双抗性的阳性转化株通过 FLP 重组酶删除 FRT 位点之间的抗性序列。用鉴定引物 A1、B2 对卡那霉素消失的克隆进行鉴定。鉴定正确的菌种命名为 *E.coli*(E)/ Δ *irp2*。

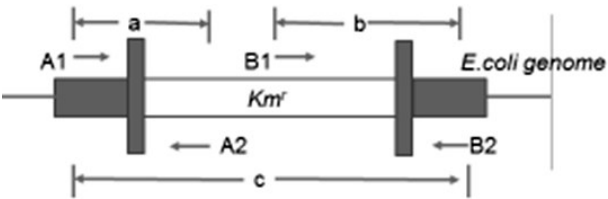


图 1 PCR 鉴定引物所在位置
Fig 1 Scheme of priming sites

1.2.4 HMWP2 蛋白结构及功能预测 利用测序得到的 *irp2* 基因序列, 通过 ExPASy 开发的在线工具 Protparam 分析 HMWP2 的理论分子量和等电点(pI); 登陆 <http://www.predictprotein.org/>, 对 HMWP2 二级结构进行预测; 使用 ExPASy 开发的在线工具 ProtScale 分析 HMWP2 的亲疏水性; 使用 ExPASy 开发的在线工具 TMpred 分析 HMWP2 的可能的跨膜螺旋区, 最优拓扑结构显示有 9 个跨膜螺旋; 使用 ExPASy 开发的在线工具 SWISS-MODEL, 与已知结构的 PDB 数据库中的蛋白质序列进行比对, 预测 HMWP2 的三级结构。

2 结果与分析

2.1 *E.coli irp2* 基因的 PCR 扩增 *E.coli*(A-E) 及阴性对照的 PCR 扩增结果如图 2(M 为 2000 bp 的 DNA Marker; 1 为阴性对照, 无条带; 2-6 为 *E.coli*

(A-E) *irp2* 基因 PCR 扩增条带, 与预期产物大小一致)。

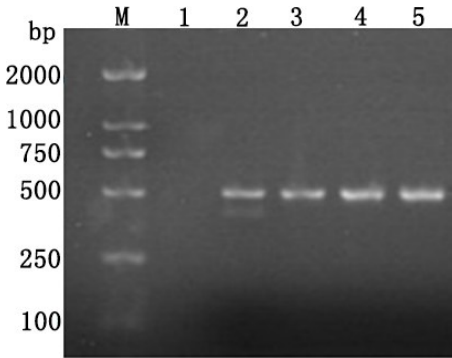


图 2 *E.coli* 中 HPI *irp2* 基因的 PCR 检测

Fig 2 PCR amplification of HPI *irp2* gene of *E.coli*

2.2 打靶 DNA 片段的制备和纯化 用于替换 *irp2* 基因的打靶片段两端的同源序列分别为 45 bp 和 50 bp, 片段中间部分为两侧带有 FRT 位点的卡那霉素(Kan)抗性基因, 有利于重组子的筛选。纯化回收的产物在高保真酶 PCR 扩增后经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 与目的片段的大小一致, 见图 3(M 为 2000 bp 的 DNA Marker, 1-3 为同源重组 DNA 片段)。

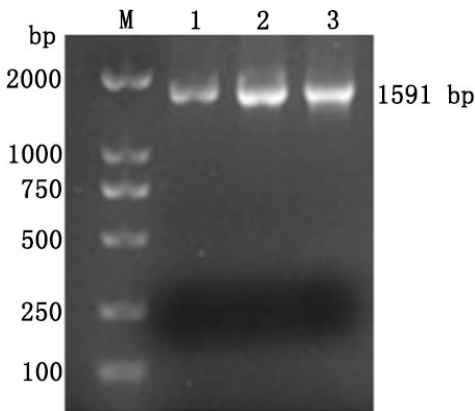


图 3 融合 PCR 构建的同源重组 DNA 片段

Fig 3 DNA homologous recombination
fragment builded by fusiohn PCR

2.3 质粒 pKD 46 转化 *E.coli*(E) 后的提取验证 将 pKD 46 转化导入到 *E.coli*(E) 中, 挑选单个菌落

在 Amp⁺ LB 液体培养基中进行扩大培养,提取质粒后进行电泳验证,转化的鉴定结果见图 4(M 为 2000 bp 的 DNA Marker,1-3 为鉴定结果):

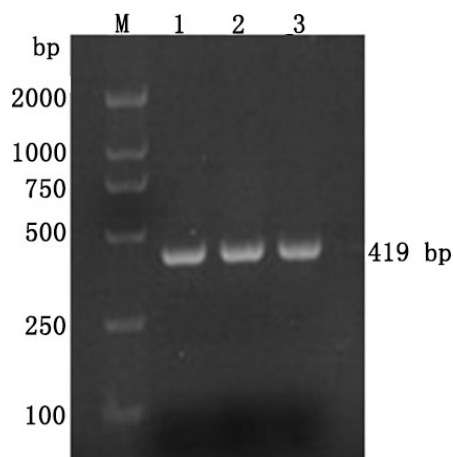


图 4 质粒 pKD 46 转化的提取验证

Fig 4 Extraction and Verification of Plasmid pKD 46

2.4 电转化后同源重组的鉴定 电转化后 *irp2* 基因被 Kan 抗性基因片段替换后,如图 1 所示,引物 A1/A2、B1/B2 和 A1/B2 分别用于扩增片段 a、b、c。结果显示,有 3 个片段的长度和预计的一样(图 5),说明 *Km^r* 基因已经取代 *irp2* 基因,缺陷株 *E. coli* (E)/*Km^r*+/Δ*irp2* 构建成功,正确重组率为 10%。

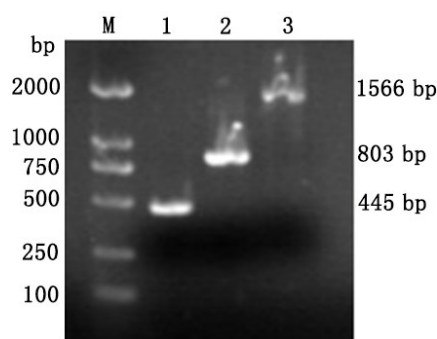


图 5 *irp2* 基因敲除的 PCR 验证

Fig 5 Verification of *irp2* knockout by PCR

2.5 质粒 pCP 20 转化 *E. coli* (E)/*Km^r*+/Δ*irp2* 后的提取验证 将质粒 pCP 20 转化导入缺陷株 *E. coli* (E)/*Km^r*+/Δ*irp2*,涂布于含 Kan⁺和 Amp⁺双抗性

LB 平板上,30℃ 培养筛选阳性转化子,挑选单个菌落在 Amp⁺ Kan⁺ LB 液体培养基中进行扩增,提取质粒后进行电泳验证,转化的鉴定结果见图 6(M 为 2000 bp 的 DNA Marker,1-3 为目的基因)。

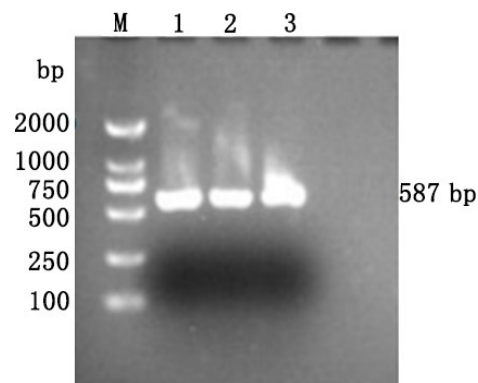


图 6 质粒 pCP 20 转化的提取验证

Fig 6 extraction and verification of plasmid pCP 20

2.6 卡那霉素抗性基因的消除鉴定 将成功转化 pCP 20 的缺陷株 *E. coli* (E)/*Km^r*+/Δ*irp2* 接种于无抗性的 LB 液体培养基中,42℃ 下传 3~5 代,再用卡那霉素抗性进行检测,卡那霉素抗性在能够稳定遗传的菌株中已经消除,命名为 *E. coli* (E)/Δ*irp2*。用鉴定引物 A1、B2 进行验证 PCR 和测序验证,如图 7(M:DNA 分子质量标准;1-3:目的基因)。

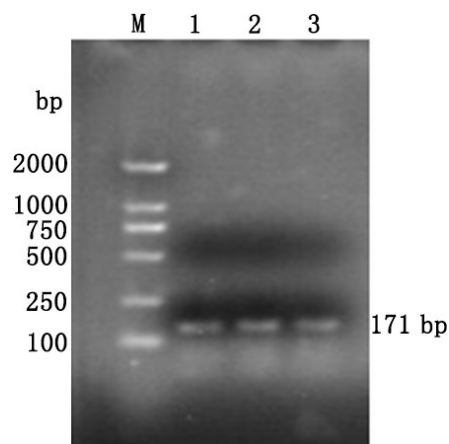


图 7 卡那霉素抗性基因消除后 PCR 鉴定

Fig 7 PCR analysis after kanamycin resistance gene eliminated

2.7 HPI *irp2* 基因表达的蛋白的预测分析

2.7.1 HMWP2 分子量及等电点的预测分析 使用 ExPASy 开发的在线工具 Protparam 分析 HMWP2 的理论分子量和等电点 (pI) 分别为:228826.60 Da, 5.85。

2.7.2 HMWP2 二级结构的预测分析 登陆 <http://www.predictprotein.org/>, 对 HMWP2 二级结构进行预测,二级结构中 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲所占的百分比分别为: 43.5%、10.76%、46.19%,如图 8。



图 8 HMWP2 二级结构预测

Fig 8 Prediction of HMWP2's Secondary Structure

2.7.3 HMWP2 亲疏水性分析 使用 ExPASy 开发的在线工具 ProtScale 分析 HMWP2 的亲疏水性。

结果显示总平均疏水指数为:-0.221,为疏水性蛋白,如图 9。

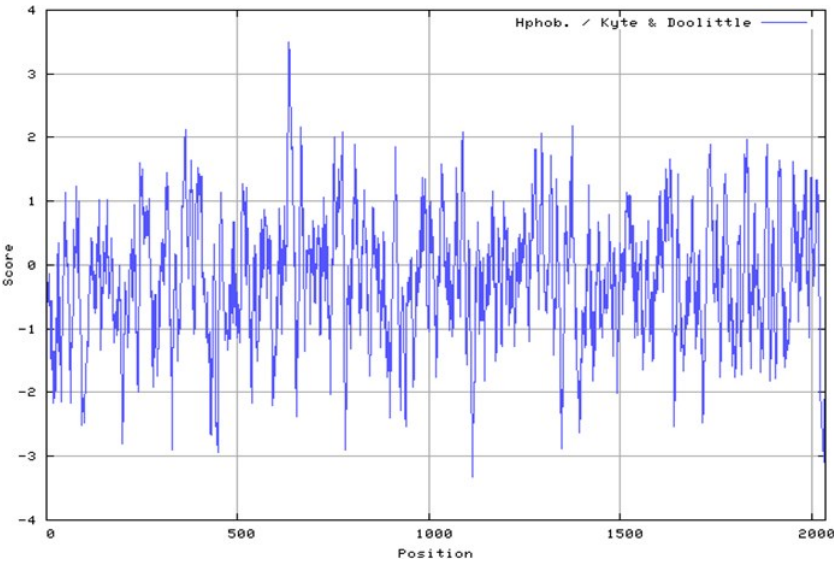


图 9 HMWP2 疏水性预测

Fig 9 Prediction of HMWP2's Hydrophobicity

2.7.4 HMWP2 跨膜区分析 使用 ExPASy 开发的在线工具 TMpred 分析 HMWP2 的可能的跨膜螺旋

区,最优拓扑结构显示有 9 个跨膜螺旋,如图 10。

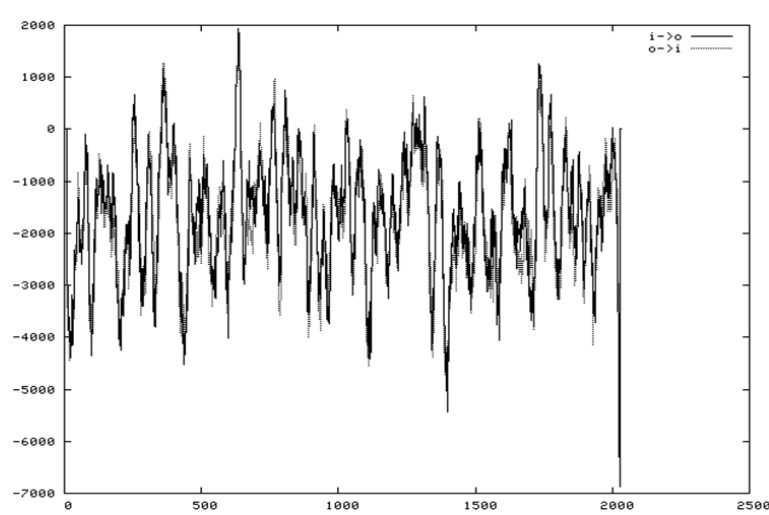


图 10 HMWP2 跨膜螺旋预测
Fig 10 Prediction of HMWP2's Transmembrane Helices

2.7.5 HMWP2 三级结构的预测分析 使用 ExPASy开发的在线工具 SWISS-MODEL,与已知结构的 PDB 数据库中的蛋白质序列进行比对,来预测 HMWP2 的三级结构,结果如图 11。



图 11 HMWP2 三级结构预测
Fig 11 Prediction of HMWP2's Tertiary Structure

3 讨论与小结

1998 年, Murphy^[7] 首次报道了将 λ 噬菌体的 exo、bet、gam 三个重组功能基因在质粒上进行表达,从而利用 λ 噬菌体的 Red 功能在 *E.coli* 染色体上进行基因替换。与 RecA 同源重组体系相比,由于 Red 重组发生在细胞内,*E.coli* 的复制和修复系统保证了克隆的子代分子完全忠实于亲代分子^[8]。

Red 同源重组系统是由 λ 噬菌体的分别编码 Exo、Beta、Gam 三种蛋白质的 exo、bet、gam 三个基因组成的。Exo 蛋白是一种单亚基分子量为 24 kD 的核酸外切酶,它的活性形式是一种环状的三聚物分子,中间有一个一端能容纳双链 DNA(dsDNA),另一端能容纳单链 DNA(ssDNA)的中空通道^[9]。Exo 蛋白可以结合在 dsDNA 的末端,从双链 DNA 从 5' 端向 3' 端降解,从而产生 3' 端突出。Beta 蛋白是一种单亚基分子量为 25.8 kD 的退火蛋白,它可以通过自发地形成环状结构而结合到由 Exo 降解产生的 ssDNA 的 3' 突出端,从而促进 ssDNA 末端与互补链之间的退火,同时 Beta 蛋白还能防止单链核酸酶降解外源线性 DNA^[10]。Gam 蛋白是 Exo 和 Beta 的辅助蛋白,功能是防止外源 DNA 片段被降解掉^[11]。

目前用的最多的 Red 重组质粒是 Datsenko^[12] 构建的具有高效重组能力的的低拷贝质粒 pKD 46。pKD 46 在 30℃ 培养时能够正常地复制,当温度高于 37℃ 时质粒自动丢失,它含有温敏型的复制起点 oriR101 和受 ParaB 启动子调控的 exo、bet、gam 基因^[13],这三个基因携带氨苄青霉素抗性基因作为筛选标记,在 L-阿拉伯糖的诱导下表达。pKD

4 在 Red 同源重组系统中作为抗性标记使用,它含有卡那霉素抗性基因,以及在抗性基因的两侧有 FRT 位点。pCP 20 同时含有氨苄青霉素和氯霉素抗性,且含有温敏型的复制起点。pCP 20 上还有一个能产生与 FRT 位点结合的翻转酶重组酶(Flipase Recombination Enzyme, FLP)的基因,从而使 FRT 位点发生自身同源重组,消除一个 FRT 位点和抗性基因。FLP 重组酶可以在 42 ℃ 时诱导表达,同时质粒逐渐丢失^[12,14]。

HPI 是耶尔森菌的一个基因组,含有 11 个基因的功能核心区,携带的基因与铁载体—耶尔森杆菌素的合成、调节和转运有关。其中, *irp2* 基因为 HPI 的标志基因,与摄铁功能相关,该基因表达的 HMWP2 蛋白对 Ybt 的合成具有重要作用,被认为是 Ybt 阳性表型表达所必需。预测结果表明, HMWP2 蛋白在 pH 为 5.85 时溶解度最小,易于析出。其中 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲所占的百分比分别为 43.5%、10.76% 和 46.19%, HMWP2 蛋白为疏水性跨膜蛋白。这些性质可能与该蛋白的摄铁转运相关。*irp2* 作为铁调节基因,仅在致病性耶尔森菌中表达,编码的分子量为 228 KD 的 HMWP2 蛋白可参与 Ybt 的合成,诱导鼠疫菌素受体和 Ybt 表达,与耶尔森菌的铁摄取能力有关。试验利用 Red 同源重组的方法对 *irp2* 基因进行了敲除,并通过测序,对 *irp2* 基因表达的 HMWP2 蛋白进行了结构及功能预测,不仅为研究 *irp2* 基因在 PEC 致病机制中的作用及 Red 重组系统研究 HPI 的其他基因奠定了基础,也为制备肠道感染病疫苗和粘膜免疫佐剂等提供了更多的理论依据。

参考文献:

- [1] Russell C B, Thaler D S, Dahlquist F W. Chromosomal transformation of *Escherichia coli* recD strains with linearized plasmids [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(5): 2609–2613.
- [2] Hamilton C M, Aldea M, Washburn B K, *et al.* New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(9): 4617–4622.
- [3] Link A J, Phillips D, Church G M. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: Application to open reading frame characterization [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(20): 6228–6237.
- [4] Rakin A, Schubert, Guilvout I, *et al.* Local hopping of IS3 elements into the A+T-rich part of the high-pathogenicity island in *Yersinia enterocolitica* 1B, O:8 [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2000, 182(2): 225–229.
- [5] 吕沈聪, 赵颖颖, 钟卫鸿. RED 同源重组在大肠杆菌基因敲除中的应用 [J]. *化学与生物工程*, 2013, 30(6): 1–6.
Lv S C, Zhao Y Y, Zhong W H. Application of RED homologous recombination in gene knockout of *E. coli* [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2013, 30(6): 1–6.
- [6] 孙旭, 周长林, 方宏清. Red 同源重组在大肠杆菌基因组修饰中的应用 [J]. *生物技术通讯*, 2011, (6): 873–878.
Sun X, Zhou C L, Fang H Q. Application of RED mediated recombination in *E. coli* genome modification [J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, (6): 873–878.
- [7] Murphy K C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(8): 2063–2071.
- [8] Muylers J P, Zhang Y, Stewart A F. Techniques: Recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(5): 325–331.
- [9] Kovall R, Matthews B W. Toroidal structure of lambda-exonuclease [J]. *Science*, 1997, 277 (5333): 1824–1827.
- [10] Smith C E, Bell C E. Domain Structure of the Red β Single-Strand Annealing Protein: the C-terminal Domain is Required for Fine-Tuning DNA-binding Properties, Interaction with the Exonuclease Partner, and Recombination in vivo [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(3): 561–578.
- [11] Yu D, Ellis HM, Lee E, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978.
- [12] 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(12): 6640–6645.
- [13] 张穗生, 郭媛, 韦廷宗, 等. Red 重组系统介导下大肠杆菌改造体系的优化 [J]. *广西科学*, 2010, 17(2): 160–163.
Zhang H S, Guo Y, Wei Y Z, *et al.* Optimizing the conditions for Red-mediated recombinogenic engineering of *E. coli* [J]. *Guangxi Sciences*, 2010, 17(2): 160–163.
- [14] Yuan L Z, Rouviere P E, Larossa R A, *et al.* Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli* [J]. *Metab Eng*, 2006, 8(1): 79–90.