

利用 Red 重组系统敲除鼠伤寒沙门氏菌 VI 型分泌系统相关基因

王萍 董俊芳 邹清华*

(北京大学医学部基础医学院病原生物学系 北京 100191)

摘要:【背景】沙门氏菌是一种重要的人畜共患病原菌，可引起广泛的胃肠炎以及伤寒、副伤寒，其致病机制一直未被阐明。基因敲除技术在研究沙门氏菌致病性方面发挥了重要作用，然而目前的敲除技术仍存在费时、成功率低的问题。研究发现鼠伤寒沙门氏菌含有 VI 型分泌系统，其组成成分之一溶血素共调节蛋白(Hemolysin-coregulated protein, Hcp)可能在其致病过程中发挥了重要作用。【目的】拟通过对 3 个编码 Hcp 蛋白的基因进行敲除，在鼠伤寒沙门氏菌中建立一套方便快捷的重组系统，从而用于沙门氏菌致病性的研究。【方法】以 pKD4 为模板，扩增两端带有目的基因同源序列的卡那霉素抗性基因片段，将片段导入含重组酶系统的目的菌，重组后再导入质粒 pCP20 消除抗性基因片段，达到无痕敲除的效果。【结果】对 3 个单独的 *hcp* 基因及其组合进行了敲除，得到了所需的基因缺失株，并总结出了一些实验过程中可能遇到的问题的解决方案。【结论】Red 重组系统可用于鼠伤寒沙门氏菌的基因敲除，通过优化同源片段的长度、PCR 模板浓度、L-阿拉伯糖加入时间、实验过程中的温度等实验条件，提高 Red 重组系统在沙门氏菌中的重组效率。此方法简单、快速，重组效率高，值得推广。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌，VI 型分泌系统，溶血素共调节蛋白，Red 重组系统

Knockout of *hcp* genes in *Salmonella typhimurium* by Red recombination system

WANG Ping DONG Jun-Fang ZOU Qing-Hua*

(Department of Microbiology & Infectious Disease Center, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract: [Background] *Salmonella* is an important food-borne pathogen causing disease such as gastroenteritis, typhoid fever and paratyphoid fever in humans and animals worldwide. The pathogenic mechanism is still unclear. Gene knockout plays an important role in studying the pathogenicity of *Salmonella*, however, currently it is time consuming and the success rate is very low. *S. typhimurium* has a Type VI secretion system (T6SS). The component Hemolysin-coregulated

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81572041)

*Corresponding author: Tel: 86-10-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

Received: December 14, 2017; Accepted: April 16, 2018; Published online (www.cnki.net): May 28, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(81572041)

*通信作者: Tel: 86-10-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2017-12-14; 接受日期: 2018-04-16; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-28

protein (Hcp) may play an important role in its pathogenicity. **[Objective]** To establish a quick and effective gene knock out system by knocking out the three Hcp encoding genes in *S. typhimurium*, thus to study the pathogenicity of *Salmonella*. **[Methods]** Kanamycin resistance gene fragments with homologous upstream and downstream sequences of *hcp* genes were amplified with pKD4 as template, and then were introduced into *S. typhimurium* which has Red recombination system enzyme. Then pCP20 were electroporated into the cells to delete the integrated kanamycin resistant gene from the recombinant bacteria. **[Results]** Both individual *hcp* genes and their recombinations were successfully knocked out from the genome of *S. typhimurium*. We also summarized some solutions to the problems we may encounter. **[Conclusion]** Red recombination system is a good method to knock out genes in *S. typhimurium*. We can improve the efficiency by optimizing the experimental conditions such as the length of the homologous fragment, the concentration of the PCR templates, the time point for L-arabinose addition and the culture temperature. It is a simple and efficient method and deserves to be popularized.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Type VI secretion system (T6SS), Hemolysin-coregulated protein (Hcp), Red recombination system

沙门氏菌是一种重要的食源性病原菌^[1], 可导致腹泻、伤寒和副伤寒。大多数人通常持续 4–7 d 后无需治疗即可自愈^[2], 而急性沙门氏菌感染会致命, 在美国每年约 400 人因急性沙门氏菌感染而死亡。鼠伤寒沙门氏菌是近几年报道频率较高的血清型^[3]之一, 可引起人类腹泻以及小鼠的系统性疾病, 常被用作研究伤寒症的疾病模型^[4]。

VI 型分泌系统(The type VI secretion system, T6SS)是一种在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中首次被鉴定出来的细菌分泌系统^[5], 广泛存在于革兰氏阴性菌中^[6]。T6SS 一般包括 13 个基因序列较为保守的核心基因编码的核心组分, 此外也包含一些非核心基因编码的组分和游离在 T6SS 外的孤岛(Orphan)基因编码的组分。研究发现 T6SS 在细菌间的竞争^[7]、细菌对真核细胞(阿米巴原虫^[8]、巨噬细胞^[3]、酵母菌^[9]等)的抗吞噬作用以及细菌对动植物宿主的致病性^[5,10]等方面均发挥了重要作用。T6SS 尾复合体内管部分的溶血素共调节蛋白(Hemolysin-coregulated protein, Hcp)既可以作为构成内管的结构蛋白, 负责效应蛋白的传递, 同时 Hcp 蛋白本身又可以作为一种效应蛋白, 在靶细胞的定殖方面起重要的作用。鼠伤寒沙门氏菌拥有 3 种 Hcp 蛋白, 分别由位于毒力岛 6 (*Salmonella pathogenicity island*, SPI6)上的 STM14_0324 和 STM14_0327 以

及位于毒力岛之外的孤岛上的 STM14_3785 编码。目前对这 3 种 Hcp 蛋白的功能尚无较清楚的阐述。

基因敲除技术在研究沙门氏菌致病机制方面具有重要的作用。目前最常用的研究方法是自杀质粒介导的同源重组^[11]。自杀质粒主要采用温度敏感型质粒 pHSG415^[11], 它在较高温度条件下不复制, 而在 28 °C 会进行滚环复制从而使基因重组, 但重组后的基因有可能被敲除, 也有可能回复为野生型的状态。因此使用这种同源重组方式重组效率不高, 耗时也较长。Red 重组系统是近些年发展起来的一种敲除系统, Datsenko 等^[12]首次将 Red 重组系统用于大肠杆菌的基因敲除, 该系统需要 pKD46、pKD4 和 pCP20 三种质粒。pKD46 包含 3 个关键基因, 它们的编码产物有利于线性 DNA 插入基因组, 防止线性 DNA 降解, pKD4 包含抗性基因并且两侧含有 FRT 位点; 而 pCP20 携带基因的编码产物可特异性识别 FRT 位点, 导致抗性基因片段环化, 最终将抗性基因消除。Red 同源重组技术具有所需同源序列短、无需构建重组质粒的特点^[13], 目前已较为广泛地应用于易于制作感受态的细菌如大肠杆菌的基因敲除。在沙门氏菌中此方法尚未完全建立。本研究拟通过优化 Red 重组系统的条件, 对鼠伤寒沙门氏菌的 *hcp* 基因进行敲除, 从而建立一套方便可行的方法用于沙门氏菌的基因敲除。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

野生型菌株 14028S, 基因缺失菌株 14028S $\Delta hcp1$ 、14028S $\Delta hcp2$, 实验所需质粒 pKD46、pKD4 和 pCP20, 均为实验室保存。本研究所构建菌株为 14028S $\Delta hcp3$ 、 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ 、 $\Delta hcp1\Delta hcp3$ 、 $\Delta hcp2\Delta hcp3$ 以及 $\Delta hcp1\Delta hcp2\Delta hcp3$, 如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司; SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式胶回收试剂盒、氨苄西林 (Ampicillin, Amp)、氯霉素 (Chloramphenicol, Cam) 和卡那霉素 (Kanamycin, Kana), 生工生物工程(上海)股份有限公司; AxyPrep DNA Plasmid Miniprep Kit 250-prep, Axygen 生物公司; 限制性内切酶, 大连宝生物有限责任公司; LB 肉汤 (LB broth) 和 LB 琼脂 (LB agar) 培养基, 北京陆桥技术有限责任公司。

台式高速离心机, 贺利氏控股集团; PCR 热循环仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像仪、电热恒温水浴槽, 北京市医疗设备总厂; DYY-5 型稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; THZ-C 恒温振荡器, 江苏培英仪器设备公司; MicroPulser 电击仪及电击杯, Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 公布的鼠伤寒沙门氏菌 14028S 的全基因组序列 (GenBank 序列号为 CP001363.1), 分别查找所需敲除靶基因的位置, 由于本实验室已拥有 $\Delta hcp1$ 与 $\Delta hcp2$ 菌株, 因此查找了 $hcp1$ 基因 (STM14_0324) 与 $hcp3$ 基因 (STM14_3785) 所在位置, 选取了其前后各 56 bp 作为引物的同源片段, 并分别在引物 3' 端加上了扩增质粒 pKD4 卡那霉素抗性基因的上、下游引物序列。鉴定引物选取目的基因前后序列中 G+C% 含量适宜的 20 bp 碱基序列, 最终引物序列如表 2 所示。

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Bacteria strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Bacteria strains and plasmids	描述及特征 Characteristics	来源 References
Strains		
<i>S. typhimurium</i> 14028S	<i>S. typhimurium</i> 14028S wild type	Preserved by our lab
14028S $\Delta hcp1$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_0324 (Hcp 1) gene knock-out mutant	Preserved by our lab
14028S $\Delta hcp2$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_0327 (Hcp 2) gene knock-out mutant	Preserved by our lab
14028S $\Delta hcp3$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_3785 (Hcp 3) gene knock-out mutant	Constructed by this study
14028S $\Delta hcp1\Delta hcp2$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_0324 and STM14_0327 gene knock-out mutant	Constructed by this study
14028S $\Delta hcp1\Delta hcp3$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_0324 and STM14_3785 gene knock-out mutant	Constructed by this study
14028S $\Delta hcp2\Delta hcp3$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_3785 and STM14_0327 gene knock-out mutant	Constructed by this study
14028S $\Delta hcp1\Delta hcp2\Delta hcp3$	<i>S. typhimurium</i> 14028S STM14_0324, STM14_0327 and STM14_3785 gene knock-out mutant	Constructed by this study
Plasmids		
pKD46	Amp ^R	Preserved by our lab
pKD4	Kan ^R , Amp ^R	Preserved by our lab
pCP20	Amp ^R	Preserved by our lab

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')
Hcp1-F	<u>AAAAGATATAGATAAAAATCAGGTTTATTTTAAGTAAAACCTTAATAAGGATATAAAA</u> GTGTAGGCTGGAGC TGCTTC
Hcp1-R	TAAAATCAAAACAATAAAACCAGCCAGACATAACATCTGGCCGAAAAACAGCCGCATATGAATATCCT CCTTAG
Hcp3-F	<u>GCCGCCGGTATTCGTCTGGCTGCTGAACTGCCACCTGATCAACAAGGAGATAAAATCGTGTAGGCTGGAGC</u> TGCTTC
Hcp3-R	<u>TATCCCCTCAACCAAGAGCCTGTCTGAATAGCGCGACCGGAATGGTTGGTGTGCATCACATATGAATATCCT</u> CCTTAG
Hcp1-jdF	TGACGCAACCAATACCTGCT
Hcp1-jdR	CAGCCAGACATAACATCTGGC
Hcp2-jdF	GCATACGTTCTCTTGCTCTG
Hcp2-jdR	TACGCCATTCATTCATGTA
Hcp3-jdF	TTGCGTCGTACCAATTCATG
Hcp3-jdR	ATAAGAGTCACAAGCGCTGG

注：划线片段为同源序列。

Note: The underlined sequences are homologous sequences.

1.2.2 同源片段的扩增与回收

以质粒 pKD4 或其稀释产物为模板,利用 Hcp1 或 Hcp3 的引物对,用高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:模板 1 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μL , $2\times Pfu$ buffer mix 50 μL ,去离子水 41 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。利用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。

1.2.3 感受态的制备以及质粒 pKD46 的电转化

需要敲除基因的靶细菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,次日取 60 μL 于 3 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 培养 3 h,立刻置冰水浴中 30 min,随后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用预冷的去离子水洗涤 2 次,再用 10%的预冷甘油洗涤 1 次,加 300 μL 甘油重悬细胞并分装。将 1–2 μL pKD46 质粒加入需要转化的感受态细菌悬液内,混匀置于冷的电击杯内,选择 EC1 模式,电击后加入 800 μL LB 培养液。将细菌于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下培养 1 h,在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素抗性的平板上均匀涂板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后对长出

的菌落提取质粒进行鉴定。

1.2.4 Red 重组酶的诱导表达以及同源片段的电转化

将鉴定正确的含 pKD46 的菌培养过夜,取 60 μL 于 3 mL 液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 培养 1.5 h 后加入 L-阿拉伯糖(使其终浓度为 100 mmol/L),继续培养 1.5 h 诱导 Red 重组酶表达。将培养物置于冰水中预冷 30 min,再按照 1.2.3 中的方法制备感受态。取 5 μL 含有目的片段前后各 56 bp 同源片段的中间为卡那霉素抗性基因的 PCR 扩增产物与感受态细胞混匀,进行电转化,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 1 h,将培养物涂布于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 琼脂平皿上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。选取长出的单菌落提取 DNA 后用鉴定引物进行 PCR 扩增鉴定。

1.2.5 质粒 pKD46 的消除

将鉴定正确的菌在 42 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 15 h,梯度稀释后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜获得单菌落。将单菌落分别用含卡那霉素或氨苄青霉素的平板上培养,选取在卡那霉素平板上生长,在氨苄青霉素平板上

不生长的菌落, 进行下一步实验。

1.2.6 卡那霉素抗性基因的消除

按照 1.2.3 中的方法将消除掉 pKD46 的菌株制成感受态, 电转化转入 5 mL 的 pCP20, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上 30 °C 培养 24 h。对长出的菌落提取质粒确定 pCP20 转入情况。将转入 pCP20 的菌转接到无抗生素的 LB 液体培养基中, 42 °C 培养 12 h, 梯度稀释后培养获得单菌落, 挑取单菌落分别涂到含卡那霉素的平板及不含抗生素的平板上, 选取卡那霉素敏感的菌落进行下一步实验。

1.2.7 质粒 pCP20 的消除

将消除掉卡那霉素抗性的菌株于 42 °C、180 r/min 培养 15 h, 梯度稀释, 选取稀释 10^6 和 10^8 的菌液涂平板, 37 °C 培养过夜后分别将单菌落在无抗生素以及含卡那霉素的 LB 平板和含氨苄青霉素的 LB 平板上划线, 37 °C 培养过夜, 挑取在无抗生素平板上生长, 在含卡那霉素和氨苄青霉素的 LB 平板上均不生长的菌落, 即为目的基因敲除成功的菌, 进行测序鉴定。

2 结果与分析

2.1 Hcp1 与 Hcp3 同源片段扩增结果

PCR 扩增出来的片段应为两端各有 56 bp 与 *hcp1* 及 *hcp3* 基因同源, 中间为质粒 pKD4 上 2 个 FRT 位点前后 20 bp 之间的包括卡那霉素抗性基因的序列, 最终应扩增出 1 589 bp 片段, 琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物大小正确。

2.2 质粒 pKD46 的转化

将 pKD46 电转化导入目的细菌后提取的质粒进行酶切鉴定, pKD46 长度为 6 329 bp, 单酶切后电泳结果显示出现预期长度条带。

2.3 同源片段转化与重组

将同源片段电转化到含有 pKD46 的目的菌后, 挑取卡那霉素平板上长出的单菌落, 用位于目的基因两侧的鉴定引物进行 PCR 鉴定。如果重组成功, *hcp1* 被卡那霉素基因替代后用鉴定引物扩增的片

段长度应为 1 860 bp, 未被卡那霉素基因替代的 *hcp1* 应为 869 bp。结果发现, 直接以 pKD4 为模板扩增出来的同源片段电转化时假阳性结果较为显著(图 1A)。挑取的 20 个菌落仅有 1 个菌落同源片段重组成功, 其他 19 个菌落的目的基因并未被卡那霉素基因所代替, 其卡那霉素抗性应该是 PCR 时作为模板的 pKD4 转入所导致。于是将 pKD4 稀释 10 倍后作为模板进行 PCR 扩增, 用得到的同源片段进行电转化, 结果发现能显著降低假阳性率(图 1B)。挑取的 9 个菌落均重组成功。利用稀释后的质粒作为模板的同源重组方法, 以 14028S WT、14028S Δ *hcp1* 以及 14028S Δ *hcp2* 为亲本, 敲除 *hcp3*; 以 14028S Δ *hcp2* 为亲本, 敲除 *hcp1*; Δ *hcp1* Δ *hcp2* 及 Δ *hcp2* Δ *hcp3* 为亲本, 分别敲除 *hcp3* 及 *hcp1*, 均得到预期结果。将 PCR 产物进行测序后结果显示目的基因敲除成功, 卡那霉素抗性基因成功插入。

2.4 质粒 pKD46 的消除

pKD46 是一种温度敏感型质粒, 在 30 °C 时能正常复制, 而在 42 °C 时丢失, 丢失质粒的菌在含有氨苄青霉素的环境中无法增殖。将细菌在 42 °C 培养 15 h 后对菌液梯度稀释涂板, 过夜培养后挑取单菌落, 分别在含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基内继续培养, 筛选到了在含有氨苄青霉素的培养基内无法生长, 而在含卡那霉素的培养基内能明显生长的菌落, 表明此菌落中的质粒被消除, 保存菌株并进行后续实验。

2.5 卡那霉素抗性基因的消除及质粒 pCP20 的消除

将消除 pKD46 的菌株电转化导入质粒 pCP20, 在含有氨苄青霉素的培养基中培养, 提取质粒后在 10 000 bp 左右有条带出现, 质粒长度为 9 332 bp, 因此认为质粒转化成功。

质粒 pCP20 是一个温度敏感型质粒, 因此转化入 pCP20 的菌株按消除 pKD46 的方法操作, 最终分别无抗生素平板、含氨苄青霉素的平板以及含卡那霉素的平板上进行鉴定, 仅在不含抗生

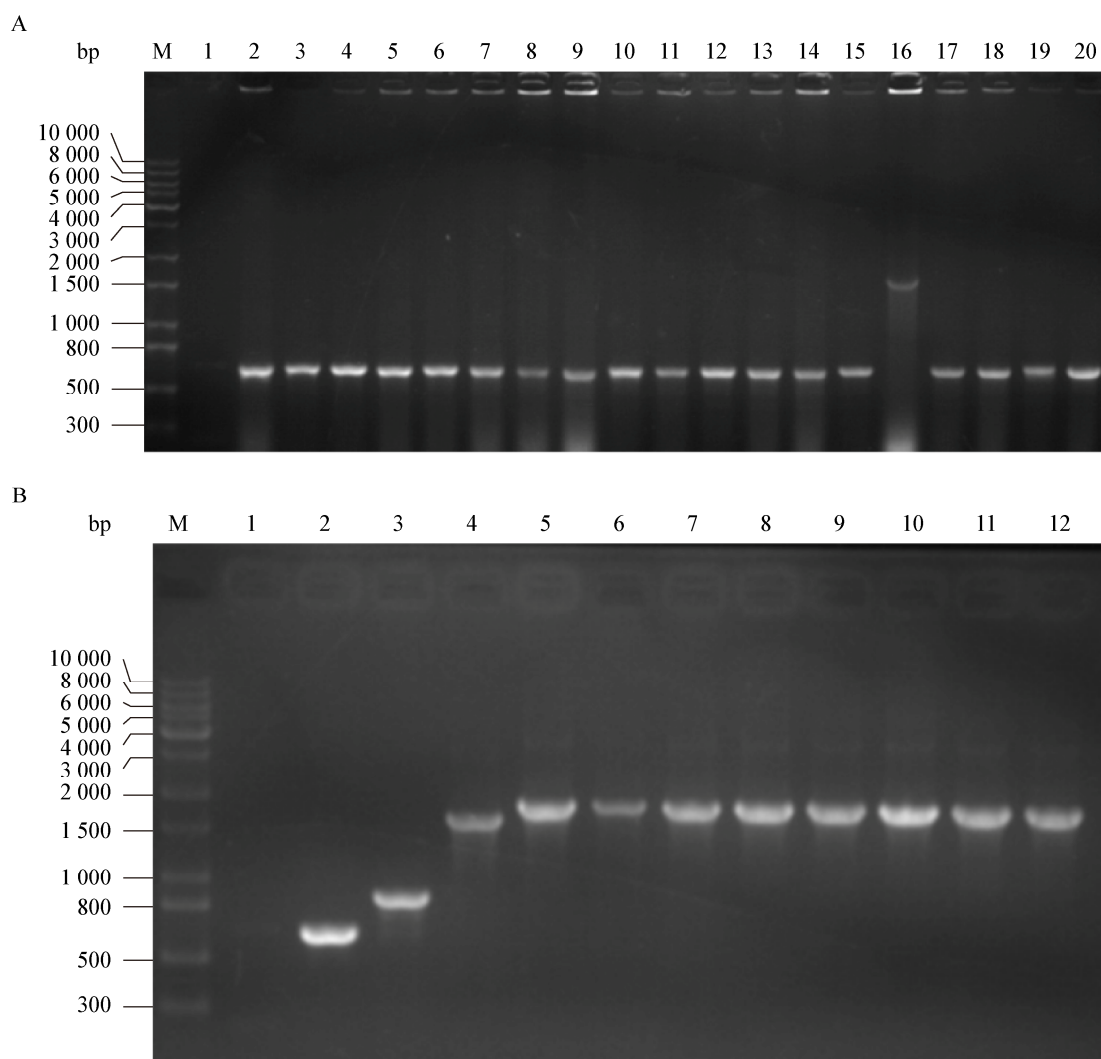


图1 单菌落 PCR 鉴定结果

Figure 1 PCR results of individual colonies

注：M：Marker；1：阴性对照。A：直接以 pKD4 为模板的扩增产物电转化后单菌落 PCR 鉴定结果，2-20：挑取单菌落进行 PCR 后琼脂糖凝胶电泳结果，其中仅 16 号为同源重组成功的菌，其他均为 pKD4 转入导致的假阳性。B：以稀释 10 倍的 pKD4 为模板的扩增产物电转化后单菌落鉴定结果，2：*hcp3* 未敲除株对照；3：*hcp1* 未敲除株对照；4-12：挑取单菌落进行 PCR 后琼脂糖凝胶电泳结果，显示均重组成功。

Note: M: Marker; 1: Negative control. A: PCR results of the colonies using pKD4 as template, 2-20: PCR results of the colonies, number 16 is the only colony with *hcp1* knocked out successfully. B: PCR results of the colonies using 10-fold diluted pKD4 as template, 2: *hcp3* positive control; 3: *hcp1* positive control; 4-12: PCR results of the colonies.

素平板上生长，在含氨基青霉素的平板以及含卡那霉素的平板上均不能生长的菌落为 pCP20 消除成功的菌落。

2.6 缺失菌株的 PCR 鉴定

将鉴定正确的菌用鉴定引物进行 PCR 扩增，琼

脂糖凝胶电泳确认。基因敲除成功且抗性基因也消除后， $\Delta hcp1$ 扩增结果应为 427 bp， $\Delta hcp3$ 扩增结果应为 191 bp，图 2 显示了部分基因缺失菌株的 PCR 鉴定结果，结果显示均鉴定正确。对 PCR 产物进行测序确认，结果显示目的基因敲除成功。

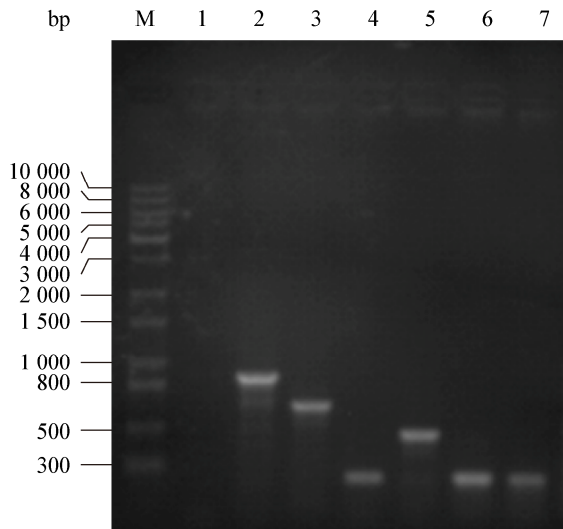


图2 基因敲除后 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR results of gene knock-out strains

注: M: Marker; 1: 阴性对照; 2: *hcp1* 未敲除株对照; 3: *hcp3* 未敲除株对照; 4、5、6、7: 分别为 $\Delta hcp3$ 、 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ 、 $\Delta hcp1\Delta hcp3$ 、 $\Delta hcp2\Delta hcp3$ PCR 扩增结果。

Note: M: Marker; 1: Negative control; 2: *hcp1* positive control; 3: *hcp3* positive control; 4, 5, 6, 7: PCR results of gene knock-out strains $\Delta hcp3$, $\Delta hcp1\Delta hcp2$, $\Delta hcp1\Delta hcp3$, $\Delta hcp2\Delta hcp3$.

3 讨论与结论

目前,虽然 Red 重组系统已经广泛应用于多种细菌如大肠杆菌的基因敲除中,但因为沙门氏菌生理特征与大肠杆菌差异较大,应用范围不如大肠杆菌。本实验通过优化 Red 重组系统的条件成功构建了沙门氏菌的缺失株。在实验过程中,我们认为有以下注意事项以及改进措施可用作沙门氏菌基因敲除的参考。

3.1 同源片段的长度选择及假阳性的降低

目前通过 Red 重组系统进行基因敲除时设计的同源片段通常在 40–60 bp 左右,张雪等在对大肠杆菌进行基因修饰时发现,若是将同源重组片段设计为 56 bp 则可以显著降低假阳性^[14],另外有研究发现在大肠杆菌中提高同源片段长度(每侧 280 bp)也能显著降低假阳性^[15]。本实验室曾经使用 40 bp 的同源重组片段进行基因敲除,但成功率极低。考虑到 280 bp 片段较长,虽然可能增加成

功率,但同时也会提高实验的复杂程度。本实验将同源片段设置为 56 bp,发现转化后可获得上百个单克隆,重组效率比较理想,因此推荐使用 56 bp 作为沙门氏菌基因敲除的同源片段碱基数。

在用质粒 pKD4 作为模板进行 PCR 扩增后发现 pKD4 极易造成干扰,假阳性较为显著。由于提取的质粒一般都会有甲基化修饰,而扩增的线性化片段则没有,因此有文献建议通过 *Dpn* I 酶对最终 PCR 产物进行酶切以去除模板质粒^[16],避免太多假阳性结果。本实验通过将模板质粒稀释 10 倍后进行 PCR 扩增,之后对扩增的产物切胶回收再进行电击转化,发现假阳性明显降低。

3.2 含 pKD46 菌株感受态的制备及保存

转化目的片段前需要用 L-阿拉伯糖诱导质粒 pKD46 的重组酶, Serra-Moreno 等^[15]发现在制作含 pKD46 细菌的感受态前 1.5 h 用 100 mmol/L 的 L-阿拉伯糖处理,线性片段转化的成功率更高。李伟星等^[17]在对大肠杆菌转化 pKD46 时发现,制作感受态后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存对后续电转化并无影响,与本研究观察到的现象一致。但在用 L-阿拉伯糖诱导 pKD46 产生重组酶后制作的感受态需要立即电转化,存入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 一段时间后电转化成功率明显下降。

3.3 质粒转化后培养温度的选择

本研究在转化 pKD46 与 pCP20 后,将细菌均放置在质粒复制最适温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养,但文献^[15]分别进行 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养后发现,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下细菌的生长速度更快。为了严格控制实验条件,本研究选择了 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3.4 温度敏感型质粒的消除

消除 Red 重组系统中的温度敏感型质粒一般都是在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或是 $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h,但文献^[18]培养时间为 15 h,本研究分别对培养 6 h 和 15 h 的菌进行了鉴定,发现培养 15 h 后质粒消除的概率明显升高。此外,培养菌时加抗生素与不加抗生素效果也存在差异:转入目的片段后菌具有卡那霉素抗性,为了使菌株保持其抗性,在消除质粒 pKD46 时,

本研究用含卡那霉素与不含卡那霉素的培养基分别将菌培养相同的时间, 鉴定后发现含卡那霉素培养基培养出来的细菌中质粒 pKD46 的消除率较低, 可能是细菌在有抗生素的环境下产生了某种保护机制, 使 pKD46 较难消除。

本实验成功构建了鼠伤寒沙门氏菌 14028S 菌株 Hcp 蛋白相关基因的缺失株, 这些菌株的获得为进一步研究 3 种 Hcp 蛋白的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Scallan E, Mahon BE. Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) in 2012: a foundation for food safety in the United States[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54 (S5): S381-S384
- [2] Besser JM. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change[J]. *Food Microbiology*, 2018, 71: 55-59
- [3] Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, et al. Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya[J]. *BMC Microbiology*, 2006, 6: 101
- [4] Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages[J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 145-156
- [5] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1526-1533
- [6] Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, et al. Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 12): 3678-3688
- [7] Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, et al. *Salmonella typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(34): E5044-E5051
- [8] Riquelme S, Varas M, Valenzuela C, et al. Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella typhimurium* to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1305
- [9] Haapalainen M, Mosorin H, Dorati F, et al. Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 4810-4822
- [10] Peng Y, Wang XR, Shou J, et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26816
- [11] White AP, Collinson SK, Burian J, et al. High efficiency gene replacement in *Salmonella enteritidis*: chimeric fimbriins containing a T-cell epitope from *Leishmania major*[J]. *Vaccine*, 1999, 17(17): 2150-2161
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [13] Hu K, Shi ZX, Sai DJ, et al. The red recombination system and its application to gene knock-out in microorganism[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(5): 628-632 (in Chinese)
胡堃, 史兆兴, 赛道建, 等. Red 重组系统及在微生物基因敲除中的应用[J]. *遗传*, 2003, 25(5): 628-632
- [14] Zhang X, Wen TY. Advances of red recombination system in *Escherichia coli* gene modification[J]. *China Biotechnology*, 2008, 28(12): 89-93 (in Chinese)
张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 89-93
- [15] Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, et al. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes[J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7: 31
- [16] Li Y, Zhang XX, Guo MZ, et al. Deletion of sopB gene of *Salmonella typhimurium* LT2 by λ Red recombination system[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(9): 171-177 (in Chinese)
李晔, 张西轩, 郭梦征, 等. 利用 λ Red 重组系统敲除鼠伤寒沙门氏菌 sopB 基因[J]. *生物技术通报*, 2014(9): 171-177
- [17] Li WX, Zhang L, Wang Y, et al. Study on the efficiency of transforming pKD46 into competent cells from *Escherichia coli* K12[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(8): 1803-1806 (in Chinese)
李伟星, 张力, 王扬, 等. 不同条件对大肠杆菌 K12 转化质粒 pKD46 效率研究[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(8): 1803-1806
- [18] Lü XL. Construction of three major pathogenicity islands deleted-mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and evaluation of their immune efficacy in chickens[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2015 (in Chinese)
吕雪莲. 肠炎沙门氏菌三种主要毒力岛基因缺失株的构建及其免疫效力研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2015