

1 株假单胞菌 *oprD* 基因缺失和回补载体的构建

朱艳容^{1,2}, 刘志新¹, 杨靖¹, 韩韵², 陈果², 徐祥^{1,2*}

(1. 湖北医药学院基础医学院, 湖北十堰 442000; 2. 长江水利委员会水文局汉江水文水资源勘测局, 湖北襄阳 441000)

摘要 [目的] 构建假单胞菌毒性基因(*oprD*)缺失突变株, 为进一步探讨其编码的毒力因子功能奠定基础。[方法] 利用 pEX18Gm 质粒作为基因敲除的载体, 构建假单胞菌 *oprD* 基因重组自杀质粒, 通过同源重组并激活自杀基因方式, 筛选到目的基因缺失的突变株, 再利用 pBBR1MCS-2 质粒作为目的基因回补的载体, 构建回补载体。[结果] 同源重组后, 经过庆大霉素和氯霉素双抗平板、蔗糖平板筛选和 PCR 鉴定, 成功获得了 *oprD* 基因缺失突变株, 类似操作获得了回补菌株。[结论] 基因缺失突变株的成功构建可为下一步的毒性机理研究奠定基础。

关键词 假单胞菌; 毒力因子; 基因敲除; 基因回补

中图分类号 S 188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)02-0109-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.02.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Construction of *oprD* Gene Deletion and Complement Vector of *Pseudomonas* sp.

ZHU Yan-rong^{1,2}, LIU Zhi-xin¹, YANG Jing¹ et al (1. Basic Medical College, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000; 2. Hanjiang River Bureau of Hydrology and Water Resources Survey, Xiangyang, Hubei 441000)

Abstract [Objective] To construct *Pseudomonas* virulence gene (*oprD*) deletion mutant, and lay the foundation of function for the virulence factor encoded. [Method] We constructed *Pseudomonas oprD* using pEX18GM plasmid as the vector of gene knockout. The mutant strain with target gene deletion was screened by homologous recombination and activation of suicide gene. The plasmid pBBR1MCS-2 was used as the vector of target gene complement, and the complement vector was constructed. [Result] The results showed that the mutant strain was subjected to gentamicin and chloramphenicol double resistance plate. Through sucrose plate screening and PCR identification, the *oprD* gene deletion mutant strain was successfully obtained. Similar operation obtained the complement strain gene deletion mutant strain. [Conclusion] The successful construction laid a foundation for further study of toxicity mechanism.

Key words *Pseudomonas*; Virulence factor; Knockout; Complement

假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌是杆状或稍弯的革兰染色阴性杆菌, 菌体大小约为(0.5~1.0) μm × (1.5~4.0) μm, 不形成芽胞, 有荚膜; 某些假单胞菌株能产生荧光色素, 如红、蓝、黄等水溶性色素, 有些则具有较强的分解有机物的能力^[1-3]。假单胞菌是广泛存在的环境微生物, 在土壤、空气、水、动植物体内均有分布, 该属中有许多致病菌, 能引发动植物疾病^[4-7]; 另外, 假单胞菌属细菌在生物技术应用领域也有着巨大的潜力^[8-10]。

该试验所用细菌是从东湖水域中筛选获得高产铁载体假单胞菌, 其产铁载体的机制与其他假单胞菌不同, 前期研究表明, 其发挥毒性作用而导致线虫死亡。由于其产铁载体的机制与其他已知的假单胞菌不同, 故其可能有特殊的毒性机制^[11-13]。利用转座子插入突变株的构建和毒性相关基因的多次筛选, 得到一些与细菌毒性相关的基因, 以其中 1 个 *oprD* 为研究对象, 扩增目的基因上下游片段, 再利用同源重组交换方法, 构建 *oprD* 基因缺失载体, 同时构建回补菌株, 从分子生物学方向揭示 HYS 菌株的毒性作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒。 高产铁载体假单胞菌、大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞、克隆载体 pEX18Gm、回补载体 pBBR2 由武汉大学谢志雄教授惠赠。

基金项目 湖北省教育厅指导性项目(B2016113)。

作者简介 朱艳容(1985—), 女, 湖北咸宁人, 高级工程师, 硕士, 从事水环境监测研究。* 通信作者, 讲师, 硕士, 从事病原微生物研究。

收稿日期 2021-05-12; **修回日期** 2021-06-15

1.1.2 主要试剂。 甘油(BIOSHARP)、氯霉素、庆大霉素、卡那霉素(普博欣); 基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒(天根生物); 内切酶、T4 DNA 连接酶、2×PCR *Taq* Mix (Takara 公司); Gold View(赛百盛生物); 三氯甲烷、异丙醇、乙醇、蔗糖、氯化钠(国药集团); 蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉(美国 BD 公司)。

1.1.3 引物及测序。 引物根据 NCBI 序列设计(表 1), 由生物工程合成。该试验所有相关 DNA 测序工作均由华大基因完成。

1.1.4 主要仪器。 PCR 仪(Veriti, Applied Biosystem 公司); 全自动凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司); 水平电泳仪(Bio-Rad 公司); 移液器、离心机(Eppendorf 公司); 恒温摇床、恒温培养箱(上海世平实验设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 假单胞菌基因组提取。 将活化后的 HYS 菌液按 1% 转接到新的 LB 中培养 6 h 离心去上清; 用天根生物试剂公司的基因组试剂盒抽提假单胞菌基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.2.2 基因敲除菌株的构建。

1.2.2.1 待敲除基因上下游片段的扩增与回收。 根据已知的 HYS 基因序列, 定位 *oprD* 基因上下游长度约 350 bp 大小的序列通过软件 Primer Premier 5.0 设计引物扩增。反应体系 50 μL; 去离子水 20 μL; 2×*Taq* mix 25 μL; Primer 1 2 μL; Primer 2 2 μL; HYS DNA 1 μL。反应程序 105 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应后, 用天根生物试剂公司的胶回收试剂盒对目的条带回收。

表 1 试验所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in the experiment

引物 Primer	序列(5'—3') Sequence(5'—3')	描述 Description
oprD-up- <i>Eco</i> RI	GGAATTCTCGACCCGGTGCTGCTG	<i>oprD</i> 基因上游同源臂扩增
oprD-up- <i>Sac</i> I	AGGAGCTCATGCGCGTAGCCGTGCTC	<i>oprD</i> 基因上游同源臂扩增
oprD-down- <i>Sac</i> I	GAGAGCTCTACCCCATCAGGGCCAT	<i>oprD</i> 基因下游同源臂扩增
oprD-down- <i>Xba</i> I	CTCTAGACGGAAATAGGCCAGGTGCGAC	<i>oprD</i> 基因下游同源臂扩增
oprD-M13F	CGCCAGGGTTTCCACGTACAGAC	敲除载体通用引物
oprD-M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	敲除载体通用引物
oprD-M-1	CGCAGCTGTTTCGCGAAGGT	<i>OprD</i> 菌株检测
oprD-M-2	GACGATCTGGCTGTAGTGC	<i>OprD</i> 菌株检测
oprD- <i>Eco</i> RI	GGAATTCATGGGCAACAACCCACAC	目的基因上游
oprD- <i>Xho</i> I	CCTCGAGCGCAACCTGGAGGTG	目的基因下游

1.2.2.2 基因上下游片段与敲除载体的连接。胶回收的上游基因片段用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,下游片段用 *Sac* I 和 *Eco* RI 双酶切,酶切体系 20 μ L,其中去离子水 6 μ L,10 \times FastDigest Buffer,2 μ L,PCR purified (0.2 μ g) 10 μ L,FastDigest enzyme 1 1 μ L,FastDigest enzyme 2 1 μ L。质粒 pEX18Gm 用 *Xba* I 和 *Eco* RI 双酶切(图 1)。酶切体系 20 μ L,其中,去离子水 13 μ L,10 \times FastDigest Buffer 2 μ L,plasmid DNA (1 μ g) 3 μ L,FastDigest enzyme *Xba* I 1 μ L,FastDigest enzyme *Eco* RI 1 μ L。然后加 T4 连接酶放入 16 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 3 h。

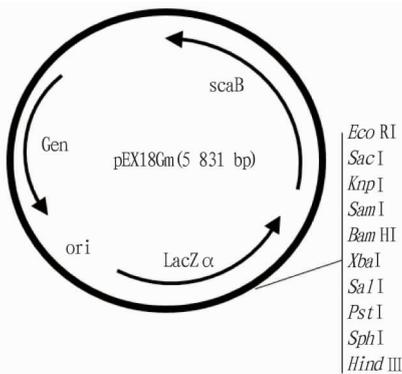


图 1 pEX18Gm 质粒图谱

Fig.1 pEX18Gm plasmid map

1.2.2.3 转化过程及转化子鉴定。将孵育好的 20 μ L 连接体系加入 100 μ L 感受态细胞混匀,冰浴 30 min 后 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,立即置于冰上,2 min 后补加 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 水浴。离心去上清后用 LB 悬浮细胞并涂布抗性平板。37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。选取平板上的转化子进行 PCR 鉴定,反应体系 10 μ L,其中,去离子水 4.0 μ L,2 \times Taq max 5.0 μ L,M13F 0.5 μ L,M13R 0.5 μ L,菌落(转化子)1 个。反应程序:105 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;55 $^{\circ}$ C 退火 90 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应后,凝胶电泳并观测所得条带是否正确。正确条带的菌株送公司测序。

1.2.2.4 假单胞菌与转化子的同源交换。取过夜培养的 HYS 菌液和鉴定正确的转化子菌液分别稀释后等体积混合均匀,滴入 LB 后放入 30 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 36~48 h,用 20% 甘油将 LB 平板上的菌苔洗脱下来记为 100,然后进行梯度稀释至

10 $^{-6}$ 。取后 3 个稀释度的菌液涂布庆大霉素和氯霉素双抗平板,对照做同样处理培养 24 h,从平板上挑单个菌落接种到同样双抗的 LB 液体培养基中,振荡培养 12 h,然后转接到没有抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h,梯度稀释菌液至 10 $^{-6}$,并取最后 3 个稀释度下的菌液涂布 5% 蔗糖平板,12 h 后 PCR 鉴定单菌落是否为敲除株。

1.2.3 基因的回补菌株及其过表达菌株的构建。

1.2.3.1 回补基因表达质粒的构建。以 HYS 为模板,设计引物将目的基因扩增后用 *Eco* RI 和 *Xho* I 双酶切并回收,再与用相同内切酶处理的质粒载体 pBBR1MCS-2 进行连接,并通过转化进入大肠杆菌中,鉴定正确后得到带有重组表达质粒的菌株。具体操作参照敲除质粒的构建(图 2)。

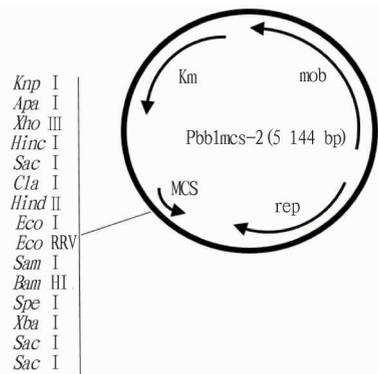


图 2 pBBR1MCS-2 质粒图谱

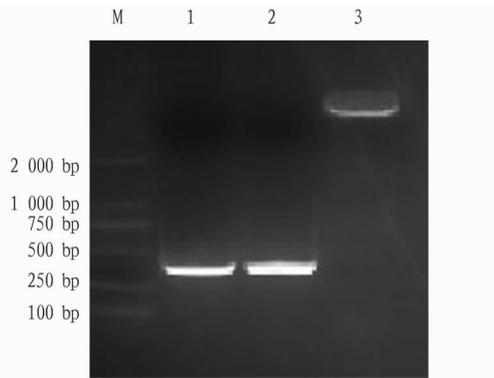
Fig.2 pBBR1MCS-2 plasmid map

1.2.3.2 假单胞菌的基因回补。通过接合使重组表达质粒进入已构建好的基因敲除菌株和野生型 HYS 菌株中,接合时间为 12 h,洗脱后,将菌液稀释至 10 $^{-4}$ ~10 $^{-6}$ 涂布到有双抗性(卡那霉素和氯霉素)的筛选平板。同时设置对照组构建带有质粒载体 pBBR1MCS-2 的基因敲除菌株和 HYS 菌株。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段克隆 根据 HYS 基因组上 *oprD* 基因上下游序列设计引物,得到与预期大小一致的条带,上下游均约为 350 bp。双酶切上下游片段和 pEX18Gm(5831 bp)载体,琼脂糖凝胶结果见图 3。

2.2 基因缺失载体的构建 将双酶切回收后的片段与载体



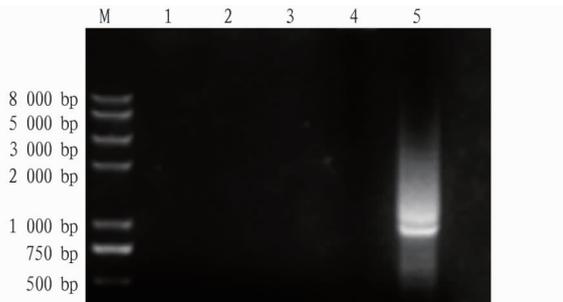
注: M.DL2000; 1.双酶切同源臂上游基因; 2.双酶切同源臂下游基因; 3.双酶切 pEX18Gm

Note: M.DL2000; 1.Double enzyme digestion of homologous arm upstream gene; 2. Double enzyme digestion of homologous arm downstream gene; 3.Double enzyme digestion pEX18Gm

图 3 酶切回收:PCR 产物和载体 (pEX18Gm) 的鉴定

Fig.3 Enzyme digestion recovery: identification of PCR product and vector (pEX18Gm)

进行三段酶连, 所得产物转大肠杆菌感受态, 涂布于抗性平板。所得转化子 5 个, 以通用引物进行 PCR 鉴定, 所得结果见图 4。只有一个转化子在 800 bp 处有条带与预期相符。测序结果显示, 序列同源性 99% 以上为阳性克隆。



注: M.Trans 2K Plus II; 1~5.转化子

Note: M.Trans 2K Plus II; 1~5.Transformants

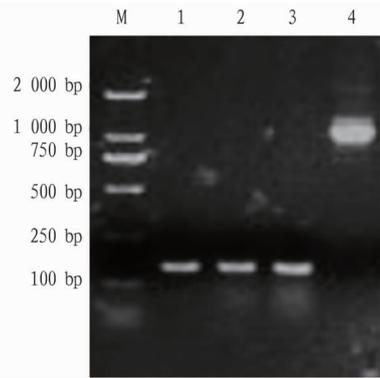
图 4 转化子鉴定的结果

Fig.4 Results of transformant identification

2.3 HYS 同源交换 将 HYS 菌株与转化子混合均匀, 孵育后洗脱, 梯度稀释后选择合适的稀释梯度涂布庆大霉素和氯霉素双抗平板。将所选择菌落接种于同样双抗的 LB 液体培养基中 12 h, 转接到没有抗性的 LB 液体培养基 12 h, 梯度稀释后选择合适稀释度涂布 5% 蔗糖平板, 以 HYS 基因组为模板, 设计引物对长出的 4 个菌落 PCR 进行鉴定, 结果表明有一个条带相符, 公司测序结果符合为同源交换阳性株 (图 5)。

因质粒 pEX18Gm 不能在假单胞菌中独立复制, 只能通过整合后复制。故通过庆大霉素和氯霉素双抗选择和无抗选择, 可以得到敲除株与野生株, 利用 5% 蔗糖平板筛选出敲除株。

2.4 目的基因回补菌株的构建 以 HYS 为模板, 设计引物将目的基因扩增 (750 bp) 后双酶切, 用相同内切酶处理的质粒载体 pBBR1MCS-2 (5 144 bp) 胶回收 (图 6), 酶连并转化, 鉴定正确后得到带有重组表达质粒的菌株。测序结果正确,



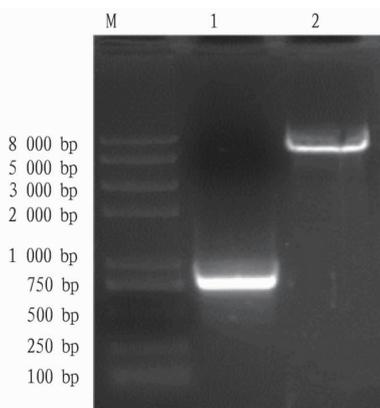
注: M.DL2000; 1~4.同源交换菌落

Note: M.DL2000; 1~4.Homologous exchange colony

图 5 同源交换后鉴定结果

Fig.5 Identification results after homology exchange

回补载体构建完成。



注: M.Trans 2K Plus II; 1.双酶切目的基因; 2.双酶切 pBBR1MCS-2

Note: M.Trans 2K Plus II; 1.Double enzyme digestion of target gene; 2. Double enzyme digestion pBBR1MCS-2

图 6 回补目的基因和载体 (pBBR1MCS-2) 的鉴定

Fig.6 Identification of complementary target gene and vector (pBBR1MCS-2)

3 讨论

该研究所用的假单胞菌, 因产铁载体与其他假单胞菌不同^[11,13], 以该细菌喂食线虫, 有明显的线虫致死效应。利用转座子插入突变的方式, 多次筛选得到多个毒性相关基因。但目前对这些基因的毒性作用机理却知之甚少。在对病原微生物毒性基因的研究过程中^[14-15], 目的基因的缺失是确定其功能、阐明毒性机理的重要方法。利用同源重组交换的方式敲除待研究基因是研究其功能的重要手段^[16-20]。

利用分子生物学的手段, 以同源重组为基础构建了假单胞菌潜在毒性基因 *oprD* 的缺失载体和回补载体。利用氨基苄抗性筛选缺失基因转化子。在同源交换过程中, 通过庆大霉素和氯霉素双抗筛选双交换敲除株和野生株, 最终通过激活蔗糖致死性基因排除野生株, 得到敲除株, 并以测序的方式验证其正确性。另外, 用类似的方法对目的基因进行回补, 为下一步研究 *oprD* 基因的毒性功能以及为其他潜在的毒性基因功能研究奠定基础。

(下转第 117 页)

都是社会大众所关注的热点问题之一。垂直绿化凭借着其独特的造景能力和丰富的价值功能,成为建设园林式校园的重要途径。面对全球日益严重的环境问题,校园建设应当走可持续发展道路,建设环境友好型和资源节约型校园,促进人与自然的和谐发展。

校园的环境景观是一所学校给人的第一印象,在运用垂直绿化进行校园景观建设的过程中,始终遵循“以生为本、环境育人”的建设理念,充分利用垂直绿化的观赏价值、生态效益和育人价值,根据不同植物的观赏类型、形态特征和生长习性进行科学合理搭配设计,精心施工和养护,给师生创造出优美的学习环境和浓厚的文化氛围,不断提高师生的幸福感、荣誉感以及学校的社会认可度。

参考文献

- [1] 河海大学后勤管理处.美化校园 环境育人:河海大学立体绿化纪实[J].国土绿化,2012(11):38-39.
- [2] 赖柳萍.南方大学校园垂直绿化浅析:以华侨大学厦门校区为例[J].福建建筑,2014(3):116-118.
- [3] 王丹莹,李煜.攀援植物在校园垂直绿化中的应用:以西南林业大学为例[J].农业与技术,2015,35(22):154,157.
- [4] 凌青根,单家林.海南大学校园垂直绿化植物的调查[J].安徽农业科学,2009,37(36):8270-8273.
- [5] 陈明,戴菲,殷利华.基于内容分析法的中国垂直绿化研究进展[J].风景园林,2018,25(5):104-109.
- [6] 陈雪.深圳市办公建筑立体绿化设计研究[D].成都:西南交通大学,2019.

(上接第 111 页)

参考文献

- [1] 高芸.生防芽孢杆菌及假单胞菌拮抗植物微生物病害研究进展[J].北方园艺,2021(2):131-136.
- [2] GAO J W, XIE G F, PENG F, et al. *Pseudomonas donghuensis* sp. nov, exhibiting high-yields of siderophore[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107(1):83-94.
- [3] 蒋海霞,周莲,何亚文.铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J].微生物学通报,2015,42(7):1338-1349.
- [4] PARKINS M D, SOMAYAJI R, WATERS V J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4):1-38.
- [5] KESWANI C, SINGH H B, GARCÍA-ESTRADA C, et al. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(3):1013-1034.
- [6] 陈磊.假单胞菌在烟草病虫害防治中的应用[J].安徽农业科学,2021,49(2):5-7.
- [7] 徐志伟,魏云林,季秀玲.假单胞菌噬菌体基因组学研究进展[J].遗传,2020,42(8):752-759.
- [8] 崔莹,宋凯,何亚文.假单胞菌代谢产物藤黄绿菌素化学结构、生物合成途径、调控机制及应用研究进展[J].中国生物防治学报,2021,37(1):52-59.
- [9] FERNÁNDEZ M, PORCEL M, DE LA TORRE J, et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains[J]. Front microbiol, 2015, 6:1-11.
- [10] AL-WRAFY F, BRZOZOWSKA E, GÓRSKA S, et al. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017, 71:78-

- [7] 李向茂.上海市工程建设规范 DG/TJ 08-75-2014《立体绿化技术规范》解读[J].上海建设科技,2015(2):63-65.
- [8] 陈恒彬,张凤金,阮志平,等.观赏藤本植物[M].武汉:华中科技大学出版社,2013:10.
- [9] 胡亮.东亚温带藤本植物多样性及其格局[J].生物多样性,2011,19(5):567-573.
- [10] 辛建攀,田如男.江苏野生藤本植物多样性初探[J].广西植物,2017,37(3):356-364,334.
- [11] 郭学民,徐兴友,孟宪东,等.河北野生藤本植物区系分析[J].河北林果研究,2005,20(2):107-110.
- [12] 刘济祥,吕小林,李红怀.江西赣南藤本植物资源多样性调查研究[J].中国林副特产,2011(5):105-108.
- [13] 王发国,陈红锋,刘东明,等.广东省野生藤本植物资源及其在园林绿化中的应用[J].中南林业科技大学学报,2009,29(3):157-161.
- [14] 杜丽敏,杨胜莲,陈显臻,等.基于 AHP 的 15 种藤本植物观赏价值的综合评价[J].热带林业,2019,47(4):10-13.
- [15] 付艳茹,张婷,莫健彬,等.基于层次分析法的野生藤本垂直应用筛选研究[J].中国野生植物资源,2021,40(1):29-35.
- [16] 徐冬云,周媛,姚中华,等.武汉地区攀援植物引种及评价筛选[J].安徽农业科学,2020,48(8):143-146,152.
- [17] 陈宇,宋双双,侯雅楠.南京市夏季垂直绿化对人体舒适度的影响探究[J].中国园林,2020,36(9):64-69.
- [18] 邢庆伟.夏热冬冷地区垂直绿化建筑的节能性实验研究[D].湘潭:湖南科技大学,2019.
- [19] 秦吉中,童开林.6种藤本植物的生态效应比较[J].西北林学院学报,2013,28(5):63-65.
- [20] 陈骅.几种绿墙植物声学特性测试及降噪效果研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [21] 王薇,程欲玥.垂直绿墙对建筑环境的影响研究综述[J].安徽建筑大学学报,2020,28(5):76-83.

91.

- [11] SHI H M, HUANG X Q, WANG Z, et al. Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(8):3465-3476.
- [12] SULOCHANA M B, JAYACHANDRA S Y, KUMAR S K A, et al. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25[J]. J Basic Microbiol, 2014, 54(5):418-424.
- [13] BANO N, MUSARRAT J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent[J]. Curr Microbiol, 2003, 46(5):324-328.
- [14] SAWADA H, FUJIKAWA T, NISHIWAKI Y, et al. *Pseudomonas kitaguniensis* sp. nov, a pathogen causing bacterial rot of Welsh onion in Japan[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2020, 70(5):3018-3026.
- [15] XIE G F, ZENG M, YOU J, et al. *Pseudomonas donghuensis* HYS virulence towards *Caenorhabditis elegans* is regulated by the Cbr/Crc system[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):1-12.
- [16] 蒋成辉,曾巧英,王萌,等. CRISPR/Cas9 构建 *srtA* 基因敲除的金黄色葡萄球菌[J].生物技术通报,2020,36(9):253-265.
- [17] YU X Y, CHEN M, JIANG Z, et al. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS[J]. J Bacteriol, 2014, 196(18):3259-3270.
- [18] 石雨鹭,郑瑞,靳亚军,等.水稻 *OsDTH13* 基因编辑突变体的创制与分析[J].天津师范大学学报(自然科学版),2020,40(3):22-27.
- [19] 徐涵,潘超,黄竟,等.铜绿假单胞菌 *waaL* 突变体构建及糖基化系统的建立[J].生物技术通讯,2020,31(6):634-640.
- [20] 李明奇,王小凤,郭嘉,等.布鲁菌 *DK63_426* 基因缺失株的构建及生物学特性研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2020,38(1):31-36.