阪崎肠杆菌随机突变体库的构建

董晓晖[1,2,3]，吴清平[2]，莫树平[2]，杨小鹃[2]
（1.中国科学院南海海洋研究所，广东广州 510301）（2.广东省微生物应用新技术公共实验室，广东省菌种保藏与应用重点实验室，广东省微生物研究所，广东广州 510070）（3.中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：阪崎肠杆菌（*Cronobacter*（*Enterobacter sakazakii*））是一种以婴幼儿奶粉为主要致病源的食源性致病菌。至今人们对其功能基因所知不多，毒力因子和致病机制研究都未能找到突破口。本研究利用质粒pTnMod-okm和pBSL180构建阪崎肠杆菌随机突变体库，最终以工程菌 *Escherichia coli* WM3064 及其所含质粒pBSL180成功构建了阪崎肠杆菌随机突变体库，并通过阪崎肠杆菌显色培养技术和抗生素抗性标记（卡那霉素 50 μg/mL）对重组子进行筛选，建立了该菌功能基因组研究平台。在后继研究中不但可以实现对单个基因进行定位及功能研究还可找到有相似功能的一类基因，为抗性机制和致病机理研究奠定基础。

关键词：阪崎肠杆菌；转座子；突变体库

文章篇号：1673-9078(2012)11-1454-1458

Generation of a *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) Mutant Library

DONG Xiao-hui [1,2,3], WU Qing-ping [2], MO Shu-ping[2], YANG Xiao-juan[2]
(1.South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China)
(2.Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology and Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)
(3.Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*, a pathogen commonly found in powdered infant formula (PIF), is an important food-borne pathogen. At present, very limited information is available regarding the function of genes, virulence factors and the pathogenesis of *Cronobacter*. In this study, plasmid pTnMod-okm and pBSL180 were used to build *Cronobacter* random mutant library. Finally, the mutant library of *Cronobacter* was built based on transposon that contained in pBSL180 plasmid of *Escherichia coli* WM3064 through Chromogenic technology and antibiotic resistance labeling (kanamycin 50 μg/mL). In subsequence research, gene assignment and finding the similar function gene can be achieve, which layed the foundation for further studying the resistance mechanism and the pathogenesis of *Cronobacter*.

Key words: *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*); transposon; mutant library

阪崎肠杆菌[*Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*)]是隶属于肠杆菌科的有周生鞭毛，能运动，兼性厌氧的革兰阴性无芽孢杆菌[1]。作为一种重要的条件性致病菌，阪崎肠杆菌感染的大多数病例都是婴儿，特别是早产儿、出生体重偏低等身体状况较差的新生儿。主要引起脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎，致死率高达40%~80%，除了感染新生儿外，该菌偶尔还可引起成人局部感染、菌血症以及骨髓炎等[2,3]。阪崎肠杆菌在很多食品中被检测到，这些食品包括：奶酪、腌肉、水、蔬菜、大米、面包、茶叶、草药、调味料及豆腐等[4~6]，但在一些新生儿阪崎肠杆菌感染事件的调查中发现婴幼儿奶粉是主要感染渠道[7]。虽然阪崎肠杆菌的全基因组测序在2007年就已完成，但至今人们对其功能基因所知不多，毒力因子和致病机制研究都未能找到突破口。迄今为止该菌基因功能研究多集中于序列比对后进行基因敲除验证其功能，对于探索控制某类功能的多个基因和阪崎肠杆菌特有的基因有很大局限性，而诱变和转座子标签法可以打破现有局限。转座子是DNA插入因子的一种，又称跳跃因子，即能在基因组间或组内跳跃的DNA片段，其实质是基因组中不必借助于同源序列就可移动的核酸序列。自1951年美国Barbara Mclintock在玉米中首先发现了DNA转

收稿日期：2012-06-11
基金项目：广东省科技计划项目（2008A030203012）；广东省中国科学院全面战略合作专项（2010B090301037）

作者简介：董晓晖（1980-），女，博士研究生，主要从事食品微生物安全研究
通讯作者：吴清平（1962-），男，研究员，主要从事食品安全研究

座子以来，许多转座子在各种原核与真核生物中陆续被发现[8]。

传统诱变方法是通过化学或物理作用破坏了细菌的DNA，而转座子标签法是直接将一段已知DNA序列插入到细菌的基因组中，二者本质是一样的，但转座子的方法更直接，获得突变体后可以利用基因工程技术进行功能基因组学的研究。作为研究基因功能的转座子具有以下优点：(1)转座子载体均为自杀性质粒，必须在特定的宿主中才能复制；(2)转座区域带有抗性基因，便于突变体的筛选；(3)可抑制自身的转座，保证在突变菌株上的单拷贝插入并在插入位点稳定存在，使突变性状稳定，是针对单个基因分析的必要条件；(4)转座子在插入位点有一段已知DNA序列，比传统的诱变方法更易定位[9]。

近年来，转座子突变技术成为微生物分子遗传研究的一种有力工具。用此方法研究基因的好处在于不需要鉴定待测基因的产物，只要转座因子插入可引起表型变化的基因均可用此法分离鉴定，这对于那些已知表型而未知其基因调控机制的微生物遗传学研究尤为有利。因此利用转座子构建随机突变体库并从与致病性相关的角度揭示一些重要基因的功能，不失为阪崎肠杆菌致病机制研究的突破点。本研究将转座突变技术应用于阪崎肠杆菌，通过阪崎肠杆菌显色培养技术和质粒中带有的抗生素抗性标记，建立了该菌的功能基因组研究平台，以期为后继的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件

本研究中所用菌株和质粒见表1。大肠杆菌和阪崎肠杆菌采用LB培养基，37 ℃培养。

表1 供试菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids tested in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Reference or source
Escherichia coli S17-1	*Tpr Smr recA thi pro hsdR*	Reference [10,11]
Escherichia coli WM3064	*pir*$^{+}$ *DAP*$^{-}$	Reference [12,13]
Cronobacter sakazakii ATCC 29544	α-transglucosidase^{+}	This laboratory
Plasmid pTnMod-okm	pMB1 oriR RP4oriT Tn5 Km^{r}	Reference [10,11]
Plasmid pBSL180	LacIQ Ptac R6Kori Tn10 Amp^{r} Km^{r}	Reference [12,13]

1.1.2 所用试剂和培养基

二氨基庚二酸（DAP）50 μg/mL；卡那霉素（Km）50 μg/mL；氨苄青霉素（Amp）50 μg/mL；LB肉汤；LB琼脂和阪崎肠杆菌显色培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司，UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。PCR扩增试剂盒TaqMix购自广州东盛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工程菌株和试验菌株的确证

大肠杆菌 *Escherichia coli* S17-1 (pTnMod-okm)接种于加有卡那霉素的 LB 肉汤（Km）中，37 ℃摇床培养进行复壮，将过夜培养菌液划线至加有卡那霉素的阪崎肠杆菌显色培养基（Km）平板上，评价该工程菌是否会显色。大肠杆菌 *E.coli* WM3064 (pBSL180)和试验菌株 *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 分别接种于 LB 肉汤（DAP+Km+Amp）和 LB 肉汤中，37 ℃摇床培养。将过夜培养菌液分别划线阪崎肠杆菌显色培养基（DAP+Km+Amp）、阪崎肠杆菌显色培养基（Km）、阪崎肠杆菌显色培养基（Amp）和单纯的阪崎肠杆菌显色培养基平板上，评价工程菌是否是二氨基庚二酸缺陷型菌株、其所含构建突变体的质粒是否丢失，工程菌在阪崎肠杆菌显色培养基上是否会显色、抗生素和阪崎肠杆菌显色培养基是否有效。

1.2.2 接合试验

按照供体菌和受体菌以体积 1:1 的比例混合菌液加入到 5 mL 无菌试管中 37 ℃静置培养。将无菌滤膜置于 LB 琼脂培养基上，吸取 100 μL 混合菌液于滤膜中央，37 ℃的恒温培养箱中培养 20 h。

1.2.3 初筛试验

接合试验后用灭菌棉签蘸取LB培养基将滤膜上结合的菌体刮至装有1.2 mL LB肉汤（Km）的离心管中，然后用棉签蘸取离心管中的菌液涂布于阪崎肠杆菌显色培养基（Km）平板上置37 ℃培养24 h。

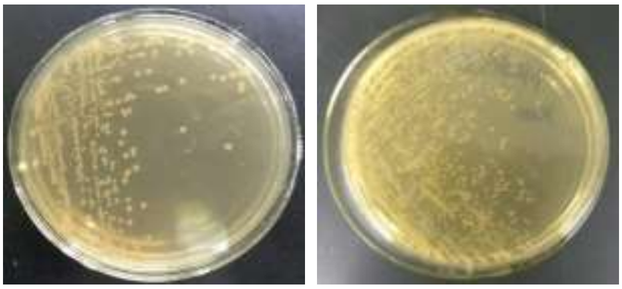
1.2.4 阪崎肠杆菌的随机突变体库确证试验

挑取*E. coli* S17-1 (pTnMod-okm)和*C. sakazakii* ATCC 29544接合后初筛试验中长在阪崎肠杆菌显色培养基（Km）平板上的5株蓝色重组子接种至LB肉汤（Km）中，37 ℃摇床培养16~18 h，编号为t1~t5。每株重组子各取1.2 mL菌液提取质粒，以*E. coli* S17-1 (pTnMod-okm)和菌株*C. sakazakii* ATCC 29544分别作为阳性和阴性对照进行质粒提取和扩增验证。扩增验证的引物为:S17F：

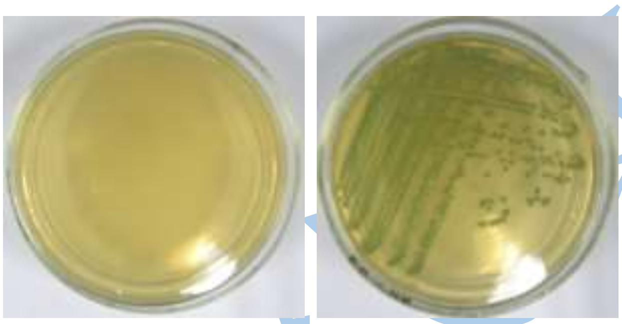
5′-GCAGGGCTTCCCAACCTTCCCAGAG-3；S17R：5′-GAGGCCACCACATTCCG CCACCGTAG-3′，上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。25 μL PCR体系中含250 μmol/L 上游（S17F）/下游引物（S17R）、2×PCR TaqMix及50 ng~100 ng模板DNA。PCR反应条件：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35个循环; 72 ℃ 10 min。挑取*E. coli* WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544接合后初筛试验中长于阪崎肠杆菌显色培养基（Km）平板上的蓝色重组子分别划线于阪崎肠杆菌显色培养基（Km）和阪崎肠杆菌显色培养基（Amp）放于37 ℃培养24 h进行确证实验。

2　结果与讨论

2.1　工程菌株和试验菌株的确证



A　　B



C　　D

图1　工程菌株和实验菌株的确证结果

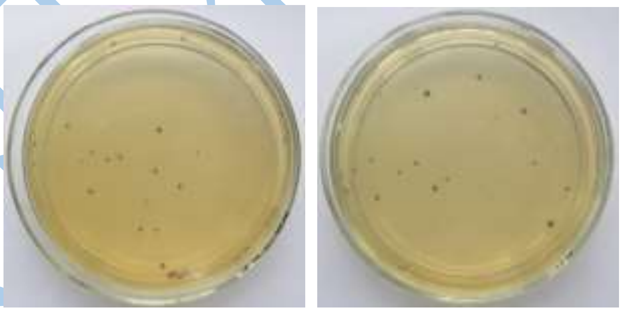
Fig.1 The results of confirmative tests

注：A-工程菌株*Escherichia coli* S17-1（pTnMod-okm）在加有卡那霉素的阪崎肠杆菌显色培养基上的生长情况；B-工程菌*E. coli*WM3064 (pBSL180)在加有卡那霉素、氨苄青霉素和二氨基庚二酸的阪崎肠杆菌显色培养基上的生长情况；C-工程菌*E. coli* WM3064 (pBSL180)在加有卡那霉素的阪崎肠杆菌显色培养基上的生长情况；D-*Cronobacter sakazakii* ATCC 29544在阪崎肠杆菌显色培养基上的生长情况。

工程菌株和实验菌株的确证结果符合实验要求，结果如图1所示。工程菌株*E. coli* S17-1(pTnMod-okm)在加有卡那霉素的阪崎肠杆菌显色培养基上生长但不显色（图1A）；工程菌*E. coli* WM3064 (pBSL180)在阪崎肠杆菌显色培养基（DAP+Km+Amp）上生长但不显色（图1B），同时在阪崎肠杆菌显色培养基（Km）上不生长（图1C）；说明此工程菌质粒未丢失，可以用阪崎肠杆菌显色培养基来筛选重组子，保证在后继的平板初筛试验中不会有假阳性。*C. sakazakii* ATCC 29544在含任何一种抗生素的培养基上都不生长；在阪崎肠杆菌显色培养基上显色（图1D），表明抗生素有效，这些条件满足了利用阪崎肠杆菌显色培养基（Km）作为表型判断从而构建阪崎肠杆菌的随机突变体库的要求。

2.2　接合试验和初筛试验

两株工程菌和供试菌株都能结合并且产生重组子，见图2。*E. coli* S17-1（pTnMod-okm）和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子（图2A）与*E. coli* WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子（图2B）在阪崎肠杆菌显色培养基（Km）上生长并显色，说明两株工程菌与目标菌*C. sakazakii* ATCC 29544都有接合作用，能够产生重组子，可以进行后继确证实验。



A　　B

图2　结合实验结果

Fig.2 The results of conjugation tests

注：A-*Escherichia coli* S17-1（pTnMod-okm）和*Cronobacter sakazakii* ATCC 29544的重组子；B-*E. coli* WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子。

2.3　阪崎肠杆菌的随机突变体库确证试验

阪崎肠杆菌随机突变体的确证试验结果如图3所示。*E. coli* S17-1（pTnMod-okm）和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子t1~t5抽提质粒后用S17F/S17R引物扩增后电泳（图3A），显示所有的重组子和*E. coli* S17-1（pTnMod-okm）都有扩增条带，证明此质粒不能在菌株*C. sakazakii* ATCC 29544中自杀。不能应用pTnMod-okm质粒构建阪崎肠杆菌*C. sakazakii* ATCC 29544的随机突变体库。

E. coli WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子在阪崎肠杆菌显色培养基（Km）上生长（图3B）但是在LB琼脂平板（Amp）上不生长（图3C），这表明质粒pBSL180的启动子不能被阪崎肠杆菌

识别，可以在阪崎肠杆菌内“自杀”，不能自我复制和转座。利用工程菌*E. coli* WM3064 (pBSL180)成功构建了阪崎肠杆菌随机突变体库，至今已经分离保存了4000多株突变体，为进一步的表型筛选做准备。

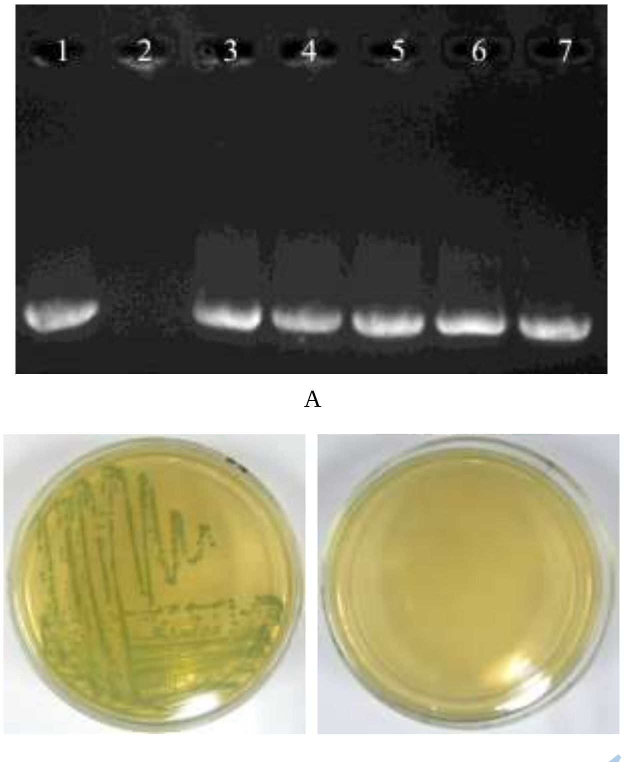


图3 阪崎肠杆菌随机突变体的确证试验结果

Fig.3 The confirmative test result of recombinant

注：A-*Escherichia coli* S17-1（pTnMod-okm）和*Cronobacter sakazakii* ATCC 29544及其重组子用S17F/ S17R引物扩增的确证结果；1：*E. coli* S17-1（pTnMod-okm）的扩增结果；2： *C. sakazakii* ATCC 29544的扩增结果，3-7：*E. coli* S17-1（pTnMod-okm）和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子扩增结果；B-*E. coli* WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子在加有卡那霉素的阪崎肠杆菌显色培养基上生长；C-*E. coli* WM3064 (pBSL180)和*C. sakazakii* ATCC 29544的重组子在加有氨苄青霉素的阪崎肠杆菌显色培养基上的生长情况。

3 结论

3.1 pTnMod-okm（图4）是由Tn5转座子元件、来自RP4的结合转移诱动基因序列、窄宿主复制位点pMB1以及卡那霉素抗性基因组成的质粒[14]。可移动自杀质粒pBSL180（图5）携带卡那霉素抗性基因修饰的Tn10转座子，具有氨苄青霉素(Amp)和卡那霉素(Km)抗性。他们的宿主菌*E. coli* S17-1和*E. coli* WM3064均可与阪崎肠杆菌发生接合作用，产生重组子。但*C. sakazakii* ATCC 29544可以识别质粒pTnMod-okm的复制起点，从而使这个转座子能够在*C. sakazakii* ATCC 29544中复制，并在基因间跳跃，即转座子pTnMod-okm在*C. sakazakii* ATCC 29544中不“自杀”，不能抑制自身的转座，这样的重组子不稳定，无法对其插入的基因进行准确定位。而质粒pBSL180的复制起始点不能被*C. sakazakii* ATCC 29544识别，因此该转座子插入目标菌基因组后不能自我复制，能够在抗性标记的选择压力下稳定存在于其最初插入位点，可通过转座子序列对其插入失活的基因进行准确定位。并且质粒pBSL180与阪崎肠杆菌产生的重组子鉴定方法简便，只要在加有卡那霉素的培养基上生长而在含氨苄青霉素的培养基上不生长就表明此重组子稳定，能够构建突变体库，可以用于基因功能研究。

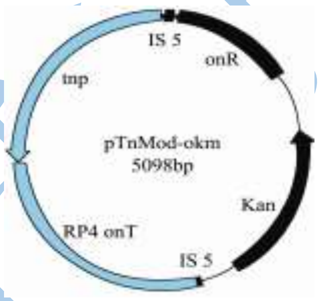


图4 pTnMod-okm质粒示意图

Fig.4 The sketch map of pTnMod-okm plasmid

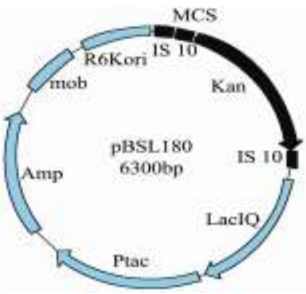


图5 pBSL180质粒示意图

Fig.5 The sketch map of pBSL180 plasmid

3.2 质粒pBSL180的宿主细胞*E. coli* WM3064是二氨基庚二酸（DAP）营养缺陷型，这是筛选重组子避免假阳性的又一保障。阪崎肠杆菌具有α-葡萄糖苷酶（α-transglucosidase）活性，在显色培养基中加有5-溴-4-氯-3-吲哚α-D葡萄糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucopyranoside)，这种底物在葡萄糖苷酶的作用下使菌落呈蓝绿色，而工程菌*E. coli* WM3064不能在这样的显色培养基上显色，这种表型筛选重组子简单易行，并且避免了试验过程中出现其他菌污染后筛选目标菌重组子时的假阳性问题。

3.3 随着一系列与该菌相关的重大感染事件的爆发，阪崎肠杆菌受到全世界普遍关注。迄今对阪崎肠杆菌的致病机制尚无定论，建立阪崎肠杆菌随机突变体库并从与致病机制相关角度来筛选重组子可为当前阪崎

肠杆菌研究带来新思路。利用转座子标签法构建突变体库，快速、稳定、突变位置清楚,便于后续操作、抗药性标记易于选择，为研究阪崎肠杆菌的各项功能提供了良好的素材和捷径，可节约时间、财力和人力并加快研究进程。

参考文献

[1] Farmer JJIII, Asbury MA, Hickman FW, et al. The *Enterobacteriaceae* Study Group. *Enterobacter sakazaki*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980, 30: 569-584

[2] Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii* : a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34(2): 103-113

[3] Corti G, Panunzi I, Losco M, et al. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man [J]. Journal of Chemotherapy, 2007, 19(1): 94-96

[4] Leclercq A, Wanegue C, Baylac P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1631-1638

[5] No HK, Park NY, Lee SH, et al. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(4): 1511-1514

[6] Soriano JM, Rico H, Molto JC, et al. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants [J]. Food Microbiology, 2001, 18(2): 159-163

[7] Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products [J]. Food Microbiology, 2004, 21(6): 771-777

[8] Alfons G, Heinz S. Plant transposable elements and gene tagging [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19: 39-49

[9] 年洪娟,陈丽梅,李昆志.Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J].中国生物工程杂志，2009, 29(12):114-118

[10] 李光飞,邓代永,许枚英,等.利用转座质粒 plasposon 构建荧光标记的脱色希瓦氏菌 S12[J].微生物学通报,2007,34(6): 1174-1178

[11] Jonathan J Dennis, Gerben J Zylstra. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes [J]. Applied and environmental microbiology, 1998, 64(12): 2710-2715

[12] Chen X, Sun G, Xu M. Role of iron in azoreduction by resting cells of *Shewanella decolorationis* S12 [J]. Journal of applied microbiology, 2011, 110(2): 580-586

[13] Chen X, Xu M, Wei J, et al. Two different electron transfer pathways may involve in azoreduction in *Shewanella decolorationis* S12 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 86(2): 743-751

[14] M Pistorio, L J. Balague, A Lagares. et al. Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP - P64L/S65T [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214(2): 165-170