

EGFP 荧光标记大肠杆菌的构建

Construction of EGFP Fluorescent-labeled *E. coli* strain

张一帆^{1,2,#}, 徐俊^{1,2,3,#}, 刘玉兰^{1,2,*}

¹ 北京大学人民医院消化内科, 北京; ² 北京大学人民医院免疫介导消化疾病临床研究
中心, 北京; ³ 北京大学人民医院中心实验室, 北京

#共同第一作者

*通讯作者邮箱: liuyulan@pkuph.edu.cn

摘要: 扩增子和宏基因组测序等方法为筛选临床疾病特异的致病菌 (属、株) 提供了便利, 而进一步对已筛选的致病菌进行致病机制的研究也尤其重要。与原位杂交检测致病菌相比, 通过荧光对菌株直接进行标记的方法可更灵敏、快速及精确地对菌株进行示踪, 该方法可应用于相关动物和细胞模型中单菌定植、移位等致病机制研究。本方案将以 *E. coli* MG1655 为例, 介绍如何利用 EGFP 对 *E. coli* 菌株进行标记示踪。

关键词: EGFP, 大肠杆菌, 小鼠, 细菌移位

材料与试剂

1. 超白玻璃盖玻片 (江苏世泰实验器材有限公司, catalog number: 80340)
2. 粘附载玻片 (江苏世泰实验器材有限公司, catalog number: 80312-3161)
3. 50 ml 离心管 (美国康宁 corning 离心管, catalog number:430828)
4. 2.0 ml 的离心管 (美国康宁 corning 离心管, catalog number:430659)
5. *E. coli* MG1655 (中国典型培养物保藏中心)
6. CV129 质粒 (EcoRI/XhoI 酶切) (上海吉凯基因化学技术有限公司)
7. C57BL/6J 小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司)
8. 无菌 (无抗生素) LB 液体培养基 (北京索莱宝科技有限公司, catalog number: T1010)
9. 无菌 (含氨苄青霉素) LB 液体培养基 (自制, T1010 加 5 g 氨苄青霉素粉末)
10. TIANSeq HiFi Taq 酶 (天根生化科技(北京)有限公司, catalog number: NG219)

11. 琼脂糖 （西班牙 Biowest Agarose，北京索莱宝科技有限公司，catalog number: YZQZT）
 12. TAE 电泳缓冲液粉末 （北京索莱宝科技有限公司，catalog number: T1061）
 13. 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 （天根生化科技（北京）有限公司，catalog number: S7920）
 14. 无内毒素质粒中量提取试剂盒 （离心柱型） （天根生化科技（北京）有限公司，catalog number: S8031）
 15. 普通 DNA 产物纯化试剂盒 （离心柱型）（天根生化科技（北京）有限公司，catalog number: M2016M2016）
 16. 去离子水 （18.2 MΩ·cm，由 Milli-Q Gradient System 制取）
 17. OCT 冰冻切片包埋剂 （SAKURA 美国，catalog number: 4583-118ML）
 18. 丙酮 （国药集团化学试剂北京有限公司，catalog number: A10000494）
 19. Triton X-100 （北京索莱宝科技有限公司，catalog number: T8200）
 20. 封闭山羊血清 （北京索莱宝科技有限公司，catalog number: SL038）
 21. 荧光封片剂 (含 DAPI) （北京中杉金桥生物技术有限公司，catalog number: ZLI-9557）
 22. PBS 缓冲液 (pH 7.2-7.4) （北京索莱宝科技有限公司，catalog number: P1020）
 23. LB 营养琼脂琼平板 (含氨苄青霉素) (北京索莱宝科技有限公司，catalog number: L2010)
 24. BamH1 （日本 Takara 公司，catalog number: 1010S）
 25. Xho1 内切酶 （日本 Takara 公司，catalog number: 1094S）
 26. 3M 乙酸钠 (pH5.2) (北京索莱宝科技有限公司，catalog number: A1070-100ml)
 27. SOC 液体培养基 (干粉) (北京索莱宝科技有限公司，catalog number: L1020-1L)
 28. BTX 电极杯 （北京沫之东生物技术有限公司，catalog number: YQ1633119185）
 29. 1.5 ml Eppendorf 管 （美国 Axygen 公司，catalog number: 24918079）
- 仪器设备
1. 电泳仪 （美国 Bio-Rad 公司，美国）
 2. 电转仪 （美国 Bio-Rad 公司，美国）
 3. 恒温培养箱 （美国 Thermo Scientific 公司）

4. 恒温细菌培养箱（日本三洋公司）
5. 台式低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）
6. 超低温冰箱（青岛海尔股份有限公司）
7. 尼康共聚焦显微镜（日本尼康公司，型号 AR1）
8. 冰冻切片机（德国徕卡公司，型号 CM3050s）
9. 凝胶成像仪（上海 Tanon 1600）

实验步骤

一、构建 *E. coli* EGFP-MG1655 荧光标记大肠杆菌^[1]

1. 使用 TIANSeq HiFi Taq 酶扩增目的基因 EGFP 片段（引物序列见表 1）。

表 1. EGFP 基因扩增引物序列

Forward primer (5'-3')	GCGTGGATCCCCAGGAATTCCCA TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Reverse primer (5'-3')	TCACGATGCGGCCGCTCGAGTTA CTTGTACAGCTCGTCCATG

1.1 反应体系：

试剂	体积 (μl)
Taq 酶	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
人基因组 DNA	1
H ₂ O	7

注：人基因组 DNA 来源于人肝癌细胞系 HepG 细胞提取 DNA。

1.2 反应条件：

反应步骤	温度 (°C)	时间
预变性	94	5 分钟
变性	94	30 秒
退火	65	30 秒

延伸	72	1 分钟
充分延伸	72	10 分钟
保存温度	12	

该步骤进行 35 个循环。

1.3 琼脂糖凝胶电泳：180 mA，10 分钟。

1.4 凝胶成像仪显影成像。

1.5 将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下，向胶块中加入等倍体积溶液 PN，漂洗后过吸附柱，切胶纯化回收 EGFP 目的片段。

2. CV129-EGFP 载体的构建

2.1 利用 BamH1 和 Xho1 内切酶酶切 CV129 载体。

酶切体系：

试剂	体积 (μl)
BamH1	1
Xho1	1
Buffer2.1	2
CV129 vector	2 μg
Water	to 20

2.2 37 °C 孵育 5 小时，鉴定成功后凝胶回收（鉴定引物见表 2）。

表 2. 鉴定引物序列

Forward primer (5'-3')	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
Reverse primer (5'-3')	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

2.3 连接：

试剂	体积 (μl)
EGFP 基因组 DNA	300 ng
CV129 载体	1
Ligase buffer	2
T4 ligase	1
Water	10

87 16 °C 孵育过夜。

88 注: *EGFP* 基因组 DNA 使用 *Nanodrop* 测量 DNA 浓度, 根据质量=体积*浓度公式
89 计算。

90 3. *E. coli* MG1655 感受态细胞的制备

91 3.1 将 *E. coli* MG1655 菌液在 37°C 摇床上培养至 OD600=0.6, 随后置于 50 ml
92 预冷的离心管中, 加入 ddH₂O, 4 °C, 2,500 rpm 离心 10 分钟。

93 3.2 弃上清, 离心管中加入少量 ddH₂O, 使沉淀悬浮后, 重悬, 4 °C, 4,000 rpm
94 离心 10 分钟, 重复该步骤一次。

95 3.3 弃上清, 加入少量灭菌预冷的 10% 甘油重悬菌体, 再加满 10% 甘油, 4 °C,
96 4,000 rpm 离心 10 分钟。

97 3.4 弃上清, 每个离心管中加入 5 ml 10% 的甘油, 使沉淀悬浮后获得 *E. coli* M
98 G1655 感受态细胞。

99 4. 将重组质粒 CV129-EGFP 电转至 *E. coli* MG1655 大肠杆菌

100 4.1 将构建的 CV129-EGFP 载体转移至 1.5 ml Eppendorf 管中, 加入下列试剂:

试剂	体积 (μl)
ddH ₂ O	10
3 M NaAC (pH 5.2)	2
无水乙醇	50
T4 ligase	1
Water	10

101 轻轻混匀, 稍微离心并将其置于 -20°C 放置 1 小时以上。

102 4.2 4 °C, 12,000 rpm 离心 30 分钟。

103 4.3 小心移去上清, 避免接触到管底的沉淀物。

104 4.4 加入 500 μl 70% 的乙醇, 轻轻颠倒几次洗涤沉淀。注: 不要离心混匀。

105 4.5 4 °C, 12,000 rpm 离心 30 分钟。

106 4.6 小心移去上清, 将此 Eppendorf 管置空气中直至无乙醇气味。

107 4.7 加入 10 μl ddH₂O 重新溶解沉淀。

108 4.8 从 -80 °C 冰箱中取出感受态细胞, 置于冰上解冻。

4.9 取 1 μ l 纯化后的质粒于 1.5 ml 的离心管中，将其和 0.1 cm 的电极杯一起置于冰上预冷。

4.10 将 100 μ l 解冻的 *E. coli* MG1655 感受态细胞转移至此 1.5 ml 的离心管中，小心混匀，冰上放置 10 分钟。

4.11 打开电转仪，调至 Manual，调节电压为 2.1 KV。

4.12 将此混合物转移至已预冷的电极杯中，轻轻敲击电极杯使混合物均匀进入电极杯的底部。

4.13 将电极杯推入电转化仪，按一下 pulse 键，听到蜂鸣声后，向电击杯中迅速加入 1,000 μ l 的 SOC 液体培养基，重悬细胞后转移到 1.5 ml 的离心管中。

4.14 37 $^{\circ}$ C，220~250 rpm 复苏 1 小时。

4.15 取 20 μ l 转化产物加 160 μ l SOC 液体涂板，放于 37 $^{\circ}$ C 恒温细菌培养箱过夜培养。

5. 挑取单克隆进行 PCR 凝胶电泳检测和鉴定

5.1 反应体系：

试剂	体积 (μ l)
Taq 酶	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
基因组 DNA	1
H ₂ O	7

5.2 反应条件：

反应步骤	温度 ($^{\circ}$ C)	时间
预变性	94	3 分钟
变性	94	30 秒
退火	55	30 秒
延伸	72	30 秒
充分延伸	72	5 分钟
保存温度	12	-

该步骤进行 35 个循环。

5.3 琼脂糖凝胶电泳：180 mA，10 分钟。

5.4 凝胶成像仪显影成像。

二、利用 *E. coli* EGFP-MG1655 在野生型 C57BL/6J 小鼠中示踪细菌^[2]

细菌标记技术是使用标记物标记细菌，以实现目标细菌的识别，从而对其进行定位和示踪。为了探究 *E. coli* EGFP-*E. coli* MG1655 是否在小鼠的肠道黏膜上进行定位，本实验采用肝脏冰冻病理切片观察，对细菌粘附的现象进行检测。为了定位 *E. coli* MG1655，构建了增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein, EGFP）荧光标记和氨苄青霉素抗性的 *E. coli* EGFP-MG1655，并将其应用于动物实验。

1. 将 C57BL/6J 小鼠（饲养于 SPF 环境，北京维通利华实验动物技术有限公司）分别给予正常饲料饮食（Normal diet, ND）喂养至 8 周龄。
2. 将 200 μ l LB 培养基和 200ul 含 1×10^8 cfu *E. coli* EGFP-MG1655 菌液（分别灌胃 C57BL/6J 小鼠，小鼠自由活动 1 小时。
3. 随后牺牲小鼠后，截取小鼠 0.5-1.0 cm 肠道组织，剪取一次性胶头滴管圆形头部 1.5 cm，加入 OCT 化合物，将肠道垂直管底放入，调整肠道组织至平展状态，液氮瞬时冷冻，将肠道包埋在 OCT 化合物中。
4. 于冰冻切片机将 OCT 包埋的组织样本切片，厚度为 7 μ m，将组织标本吸附在粘附载玻片上。
5. 切片置于 -20 °C 预冷丙酮中固定。
6. 将切片用 PBS 清洗 3 分钟，2 次。
7. 将切片用 0.1% Triton 固定破膜 3 分钟，PBS 清洗 3 分钟，2 次。
8. 将切片用 PBS 加 1% 的羊血清封闭 30 分钟。
9. 将切片用 PBS 清洗 3 分钟，2 次。
10. 将切片用 DAPI 染色，0.16 mm~0.19 mm 盖玻片封片。
11. 尼康共聚焦显微镜拍照。

结果与分析

使用 CV129 载体可将 EGFP 荧光标记基因和氨苄青霉素抗性基因导入 *E. coli* MG1655 (图 1A), 琼脂糖电泳示 EGFP 标记的且具有氨苄青霉素抗性的 *E. coli* EGFP-MG1655 构建成功 (图 1B), 含氨苄青霉素的 LB 培养基可见 *E. coli* EGFP-MG1655 细菌菌落生长 (图 1C), 下一步该菌可应用于动物实验。

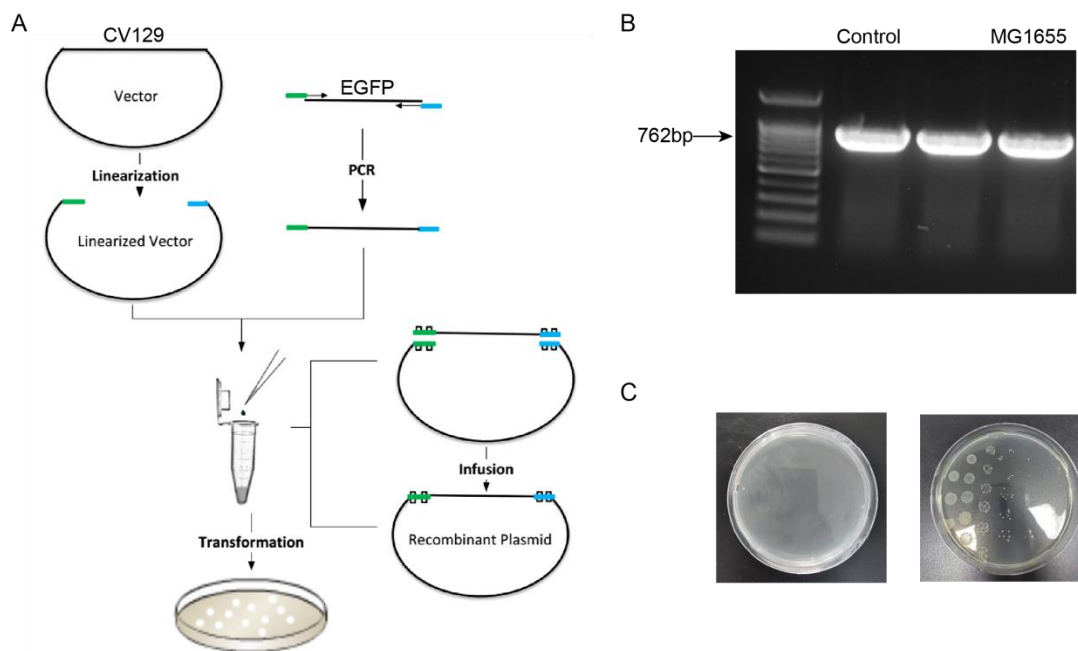


图 1. *E. coli* EGFP-MG1655 荧光标记菌株构建

A. EGFP 重组质粒的构建和转化过程 (上海吉凯基因公司供图); B. *E. coli* EGFP-MG1655 的 PCR 鉴定; C. *E. coli* MG1655 和 *E. coli* EGFP-MG1655 涂板鉴定。

用 *E. coli* EGFP-MG1655 灌胃处理 C57BL/6J 小鼠, 小鼠肠道冰冻病理切片均可见明显的绿色荧光信号, 可对 *E. coli* EGFP-MG1655 在肠道的粘附进行示踪 (图 2)。

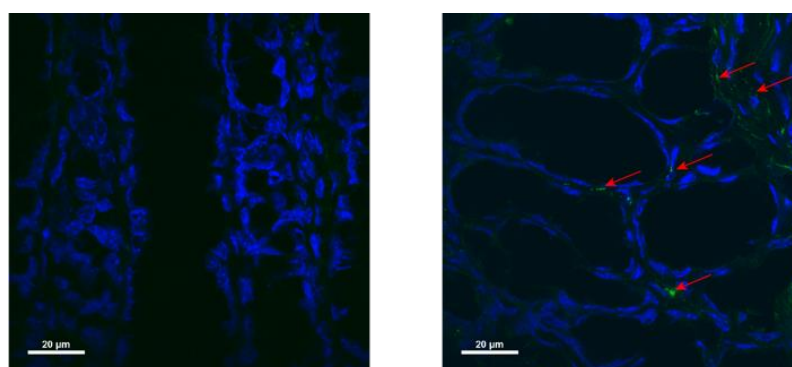


图 2. *E. coli* EGFP-MG1655 可粘附至 C57BL/6J 小鼠肠道

小鼠肠道冰冻切片中 *E. coli* EGFP-MG1655 的检测，可定位于肠道细胞周围（红色箭头，EGFP 绿色荧光信号），白色刻度线表示 20 μ m。

失败经验

1. 在小鼠取材过程中要保证无菌操作，器械要高压灭菌，实验组和对照组要分别准备两套器械，以免产生细菌污染。
2. 小鼠的肠道组织取材后用 PBS 冲洗，以免制备病理切片拍照时产生背景荧光。
3. OCT 固定小鼠组织标本时使用液氮渐冻标本。

致谢

本文实验方案所用仪器由北京大学人民医院消化内科实验室和北京大学医学部药学院国家重点实验室提供。资金来源：国家自然科学基金 (81873549) 和北大医学交叉研究种子基金 (BMU2020MX011)。

实验方案及部分结果摘自张一帆博士毕业论文。

参考文献

1. Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermudez-Humaran, L. G., Smirnova, N., Berge, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., Ouwehand, A., Langella, P., Rautonen, N., Sansonetti, P. J. and Burcelin, R. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* 3(9): 559-572.
2. Sorribas, M., Jakob, M. O., Yilmaz, B., Li, H., Stutz, D., Noser, Y., de Gottardi, A., Moghadamrad, S., Hassan, M., Albillos, A., Frances, R., Juanola, O., Spadoni, I., Rescigno, M. and Wiest, R. (2019). FXR modulates the gut-vascular barrier by regulating the entry sites for bacterial translocation in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 71(6): 1126-1140.