

细菌基因突变的策略及应用*

黄 勇

(四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)

摘要:细菌病仍然是目前危害人类和动物的重要疾病。细菌突变技术是重要的细菌学研究技术,包括传统的物理、化学、生物学等方法及现代的基因突变技术。基因突变技术是目前细菌学研究的重点,不同的基因突变技术采用的策略不同。细菌基因突变技术的开发和应用为细菌疫苗研制、细菌基因功能研究和基因治疗提供了新的技术手段。

关键词:细菌,基因突变,策略,应用

中图分类号:Q933, R373, S855 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2007)01-0169-04

The strategy of bacterial genetic mutation and its application*

HUANG Yong

(College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: Bacterial disease is still the important disease hazardous to health of human being and animals. The bacterial mutation technique is an important bacterial research technique, including traditional physical and chemical and biological method, and modern genetic mutation technique. The bacterial genetic mutation technique is one of the research focus in bacteriology nowadays, the mutation strategy varies with different kinds of genetic mutation technique. The development and application of bacterial mutation technique offers new tools for research on new bacterial vaccine, bacterial genetic function and genetic therapy etc.

Key words: Bacteria, Genetic mutation, Strategy, Application

细菌病目前仍然是危害人类和动物的重要疾病,如结核病、鼠疫、大肠杆菌病、沙门氏菌病、巴氏杆菌病、猪传染性胸膜肺炎等^[1]。细菌病的防治主要采用药物和疫苗,但随着细菌耐药性的提高和药物残留对食品安全的影响,开发新型疫苗和药物已经成为当务之急。随着重组DNA技术的发展和运用,细菌基因突变技术取得了很大的进步,为新型细菌疫苗研制、细菌基因功能研究和药物研制等提供了技术支撑。

1 传统的细菌突变技术

细菌的突变其实开展很早,一般采用物理或化学或物理加化学的方法^[2],也有通过不断传代培养或转代培养筛选。物理方法主要采用紫外线、氮氛激光、快中子、 γ 射线、磁场、 N^+ 离子等对菌株进行

处理;化学方法主要采用氯化锂、硫酸二乙酯、亚硝基胍、盐酸胍胺等对菌株进行处理;传代或转代培养主要将细菌在培养基或动物上连续传代或转代,然后通过表型进行突变菌株的筛选。

2 细菌的分子突变技术

随着大量细菌基因组序列和细菌基因功能的阐明,人们陆续采用分子生物学的方法进行细菌的突变。细菌基因突变的策略比较多,不同的突变目的可采用不同的策略。

2.1 质粒载体表达系统 该法通常是将外源抗原基因重组进某细菌的抗性质粒中,然后将抗性质粒转入减毒菌中^[3]。该法操作方便,由于一般质粒拷贝数较高,其携带外源抗原基因的表达式也较高,容易刺激机体产生免疫应答。但细菌的质粒的稳

* 中国博士后科学基金项目(No. 2005037805)

通讯作者 0835-2886117, E-Mail: hyong601@163.com

收稿日期:2006-04-26, 修回日期:2006-06-26

定存在常需抗生素的选择压力,细菌进入体内后在没有抗生素的选择压力会导致质粒丢失,抗原表达量降低,诱导免疫应答能力下降。目前采用这种策略进行细菌突变株构建的策略已经较少。

2.2 转座子突变 (Transposon Mutagenesis) 利用某些转座子对细菌染色体组的插入随机性较高这一特性可构建细菌的突变株文库。其方法一般是将中间插入有抗生素抗性基因的转座子克隆入不能在待突变细菌中复制的质粒中构建出重组质粒,将该重组质粒电转化待突变菌株,转座子随机插入细菌的染色体中,然后通过转座子上的抗生素抗性基因进行突变株的筛选^[4]。由于质粒的电转化效率并不高,利用质粒在待突变株内的条件性复制可提高含转座子质粒的转化效率^[5]。而后有人采用条件复制性的噬菌体为转座子运送载体的策略,噬菌体运送系统的最大优势就是每个细胞都可被携带转座子的噬菌体所感染,从而大大提高DNA的转染效率^[6,7]。信号标签诱变法等 (signature-tagged mutagenesis, STM) 是目前构建基因突变株和在体内高通量筛选病原体毒力基因的新方法,它利用了转座子对细菌基因组的随机插入构建基因突变株库,进而筛选减毒或无毒突变体^[8]。

2.3 应用异常重组 (Illegitimate recombination) 产生突变株 利用来源于待突变菌株的短基因片段转化细菌后与细菌基因组的非定位重组,产生基因的插入、缺失、转位等突变构建突变株文库。研究人员最初采用这个方法的目的是欲达到对基因组的定位同源重组,但是结果却相反。该方法一般是将细菌的某一段基因在质粒载体中进行克隆并在其中间插入抗生素抗性基因,然后切下该片段,将该片段用高效电穿孔技术转化受体菌,产生大量的突变株,在有抗生素抗性固体培养基上生长,挑选单菌落,即为有异常重组的突变株。为确定DNA插入的位置,将染色体DNA用插入片段不具有的酶进行消化,用抗性基因探针筛选阳性片段,连接载体转化大肠杆菌,在抗生素存在的情况下筛选,测序后确定其位置^[9,10]。该方法的原理还不是很清楚,可能的机制之一是短基因片段的某些区域与染色体上的很多位点存在一定的同源性,转化细菌后可在这些位点启动细菌染色体的重组。其实任何定位同源重组均有一定的异常重组背景。该突变方法随机性较高,突变株的遗传背景和生物学特性

还需要通过序列测定和生物学特性观察以鉴定,突变株的鉴定仍然需要抗性标记,因此限制了该法的应用。

2.4 同源重组技术 它通过同源重组的原理通过基因置换将外源抗原基因插入某细菌的染色体中。由于染色体重组后形成的突变是不可逆的,因此外源基因在细菌内高度稳定。该方法是目前采用最多的定点突变技术。该方法要求外源基因的插入位点必须确定。这个方法经历了几个阶段。

一是有抗生素抗性标记的突变株的构建。该法是将抗性基因克隆入待突变菌株的一段染色体片段中,然后电转化含有染色体片段的质粒载体或插有抗性基因的长染色体DNA片段入待突变菌株中,利用染色体片段之间的同源重组产生突变株,然后利用抗性进行突变株的筛选^[11,12]。这个方法构建出的突变株仍然具有抗生素的抗性选择标记。抗生素抗性标记在大多数情况下并不理想,可用的抗生素抗性标记较少,一个菌株一旦有了针对某抗生素的抗性标记,进行下一步的突变则要选择用其它的抗菌素。构建疫苗株是不需要抗生素抗性标记的,因此单纯的抗生素抗性标记在细菌疫苗构建中受到了极大限制。

二是无抗生素抗性标记的突变株的构建。等位基因转移载体构建模式的改变及*SacB*基因的引入^[13],使得无抗性基因突变株和多位点基因突变株变为现实。*SacB*基因来源于枯草芽孢杆菌,编码分泌性的蔗糖-6-果糖基转移酶,该酶催化蔗糖的水解和果聚糖的合成。在革兰氏阴性菌中,在有蔗糖存在的情况下,*SacB*基因的表达对细菌来说是致死性的。革兰氏阳性菌缺乏外膜蛋白,最初认为蔗糖选择不适合革兰氏阳性菌的筛选,但是在棒状杆菌和结核分枝杆菌中,*SacB*同样可以作为其负选择标记,这也许与该类菌特殊的细胞壁有关,该类菌的细胞壁与革兰氏阴性菌极其相似。

该方法首先体外构建含有同源重组区域的转移载体,它属于自杀性质粒,一般含有原核复制子、抗性基因、亲本菌株来源的启动子、*SacB*基因、中间大部分序列缺失的同源重组区域等,原核复制子和抗性基因可用于载体在大肠杆菌中的基因操作和扩增,融合性的启动子-*SacB*区域用于*SacB*基因在亲本菌株中的有效转录,同源重组区域用于载体与亲本菌株的同源重组,*SacB*基因用于无抗性标记重

组菌的筛选。自杀性质粒模式一般为两种,一种为选择标记基因盒(抗性标记-融合性的启动子-*SacB*区域)位于同源重组区域中间的模式,用两步法进行重组,第一步电转化质粒至亲本菌株,质粒上的同源区域与亲本菌株双区域重组后可产生含抗性标记的重组菌,第二步电转化同源重组区域中间无选择标记基因盒的自杀质粒至上一步产生的重组菌株,质粒上的同源区域与重组菌株双区域重组后可去除重组菌的选择标记^[14]。另外一种模式为:选择标记基因盒位于同源重组区域之外的模式,电转化质粒至亲本菌株,质粒上的同源区域与亲本菌株发生单区域重组产生插入了整个载体序列的重组菌,然后将具有抗生素抗性的重组菌株直接在蔗糖平板上进行复制,利用蔗糖的选择性压力和细菌染色体复制过程中发生的自由重组去除载体序列,产生无标记突变株^[15-17]。也有不依赖*SacB*基因而依赖解离酶识别位点去除抗性基因的方法^[18]。

3 细菌基因突变技术的应用

细菌基因突变技术为细菌研究提供了新的工具,在快速构建疫苗株、开展细菌基因功能研究、基因治疗等领域展现出巨大的应用潜力,也取得了突出的成绩。

3.1 构建疫苗株 传统方法构建出的弱毒疫苗株目前仍然占弱毒疫苗的主体,如卡介苗、羊的布氏杆菌五号弱毒疫苗(M5)、猪的布氏杆菌二号苗(S2)、猪丹毒疫苗、猪喘气病弱毒疫苗、猪肺弱毒疫苗等^[19],但传统的突变方法具有偶然性,工作量大,连续传代周期长且具有不确定性。应用分子突变技术有利于快速的疫苗株的产生^[20-24]。对于疫苗株构建的策略,应该依据细菌的分子生物学特性、免疫机理及疫苗的使用目的等因素而设计。策略一是寻找细菌的毒力基因,破坏细菌毒力基因,从而降低其毒力;策略二是将流行菌株的抗原性决定基因替代传统疫苗株的抗原性决定基因,突变出可以用于疫苗生产的毒株。对于抗原性变异比较大的细菌,可以采用这种方法;策略三是以细菌作为表达其它病原的保护性抗原基因的表达载体,构建嵌合疫苗株。一般是将外源基因插入弱毒或无毒的细菌的非必需区。构建嵌合疫苗株时要考虑诸如插入基因在细菌基因组中的稳定性、插入基因后对细菌的复制及产量的影响、外源基因插入的位

置等因素。

3.2 开展细菌基因功能的研究 细菌基因的功能可以借助基因突变技术而阐明。以往把细菌的某一个基因单独克隆出来并在人工表达系统中表达以研究其功能的做法有其不足之处。它没有考虑到细菌基因间的相互作用,不能进行非结构蛋白基因如启动子、终止子的功能的研究,细菌基因在其它的人工表达系统中的功能不能正常的发挥等。现在许多重要的细菌的基因功能的阐明因细菌基因突变技术而得以实现^[25-30]。

3.3 基因治疗 细菌介导的基因治疗技术最近才开始建立,细菌本身对肿瘤就有抑制作用,这可能存在多方面的原因,如细菌所含的脂多糖(LPS)能刺激淋巴细胞增殖和分化及诱发TNF- α 等细胞因子的产生,细菌和肿瘤细胞之间进行营养竞争,细菌分泌蛋白水解酶杀伤肿瘤细胞等。细菌基因治疗一般有两种方法,一是以细菌为基因转移的载体,表达治疗性物质的基因位于细菌的质粒中,细菌进入机体后裂解,质粒进入细胞核,然后应用真核的转录和翻译系统进行治疗性物质的表达;另外一种一种是细菌不仅仅是作为基因转移的载体,而要在靶组织定居,利用自身的转录和翻译系统表达治疗性物质,并可利用低分子物质进行基因表达的调节。细菌的基因治疗已经在沙门氏菌、李斯特菌、志贺氏菌、耶尔森菌以及大肠杆菌等有报道,在传染病免疫、肿瘤的免疫治疗、感染性肠道疾病的免疫调节因子的局部传递中的治疗效果已经显现出来^[31-34]。细菌用于基因治疗的载体要考虑细菌的毒力、组织嗜性、免疫反应、过敏反应、在机体内的遗传稳定性等因素。

虽然细菌基因突变技术取得了一些进展,但是也面临一些问题。传统的突变技术方法简单,但是突变结果具有不可预测性和偶然性,产生突变的分子机理也不清楚,不利于突变菌株的进一步改造和修饰;对分子突变技术而言,转座子突变和同源重组技术应用较多,转座子介导的突变随机性较高,比较适合建立突变株文库,不适合进行定点突变株的构建。同源重组技术可用于定点突变,前景广阔,但是影响因素较多。(1)是基因递送的方法,对于生长快的菌株,电转化率较高,而慢生长的细菌,可采用条件复制性噬菌体转导的方法。(2)是选择标记,抗生素抗性和*SacB*基因表达可做为正和负

选择标记,但是自发的抗生素抗性、高异常重组率和 *SacB* 基因突变可能会导致较高的假阳性,为此可采用营养缺陷性菌株为亲本菌株^[35],此外还应该寻找 *SacB* 基因之外的选择标记,尤其是大部分革兰氏阳性菌目前缺乏去除抗性基因的选择,因此不利于该类菌的无抗性标记菌株的构建。(3)是载体的构建策略,如细菌结构基因和 *SacB* 基因在载体上的方向要一致,*SacB* 基因需要来自亲本菌株的启动子,抗生素抗性基因和 *SacB* 基因的方向应该相对等。(4)是防止 *SacB* 基因的突变和为 *SacB* 基因的表达提供好的环境,如 NaCl 的存在和高于 37℃ 的培养温度会提高自发性的蔗糖抗性^[15]

总之,细菌基因突变技术的开发和应用大大加快了细菌学的研究,为细菌基因功能研究提供新的技术手段,使得大量细菌的一些基因的生物功能得以阐明,也为细菌病的防治提供了新的武器,如细菌新型基因工程疫苗、基因治疗等。目前也任何事物总有两面性,细菌反向遗传技术的开发和应用也使得人类可以依据需要制造新的致病菌等生物武器。因此我国应该加大细菌基因突变技术的开发、应用及技术储备,为细菌病的防治和应付可能的突发事件打下基础。

参考文献

- [1] 陆承平主编. 兽医微生物学(第三版). 北京:中国农业出版社, 2001. 1~4.
- [2] 沈卫荣, 沈 俭, 韩丽萍. 微生物学通报, 2003, 30(4): 60~64.
- [3] 朱红惠, 李艳琴, 邱晓颖, 等. 微生物学通报, 2002, 29(4): 18~22.
- [4] McAdam R A, Weisbrod T R, Martin J, et al. Infect Immun, 1995, 63(3): 1004~1012.
- [5] Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, et al. PNAS, 1997, 94(20): 10955~10960.
- [6] Bardarov S, Kriakov J, Carriere C, et al. PNAS, 1997, 94(20): 10961~10966.
- [7] Rybníček J, Wolke M, Haefl C, et al. J Bacteriol, 2003, 185(5): 1745~1748.
- [8] 郭小奎, 董善庆主编. 细胞微生物学. 上海:第二军医大学出版社, 2004. 32~38.
- [9] Wilson T, Wards B J, White S J, et al. Tuberc Lung Dis, 1997, 78(5~6): 229~235.
- [10] Collins D M, Wilson T, Campbell S, et al. Microbiology, 2002, 148(10): 3019~3027.
- [11] Pelicic V, Reyrat J M, Gicquel B. J Bacteriol, 1996, 178(4): 1197~1199.
- [12] Balasubramanian V, Pavelka M S Jr, Bardarov S S, et al. J Bacteriol, 1996, 178(1): 273~279.
- [13] Dedonder R. Method enzymol, 1966, 8: 500~505.
- [14] Copass M, Grandi G, Rappuoli R. Infect Immun, 1997, 65(5): 1949~1952.
- [15] Wu S S, Kaiser D. J Bacteriol, 1996, 178(19): 5817~5821.
- [16] Pavelka M S J, Jacobs W R Jr. J Bacteriol, 1999, 181(16): 4780~4789.
- [17] Parish T, Stoker N G. Microbiology, 2000, 146(8): 1969~1975.
- [18] Bardarov S, Bardarov J S, Pavelka J M S, et al. Microbiology, 2002, 148(10): 3007~3017.
- [19] 蔡宝祥主编. 家畜传染病学(第四版). 北京:中国农业出版社, 2001. 1~6.
- [20] Prideaux C T, Lenghaus C, Krywul J T, et al. Infection and Immunity, 1999, 67(4): 1962~1966.
- [21] Tonpitak W, Baltes N, Hennig-Pauka I, et al. Infection and Immunity, 2002, 70(12): 7120~7125.
- [22] Sampson S L, Dascher C C, Sambandamurthy V K, et al. Infect Immun, 2004, 72(5): 3031~3037.
- [23] Xu Y W, McDonough S P, Palaniappan R U, et al. Infect Immun, 2005, 73(12): 8194~8203.
- [24] Chen Y, McClane B A, Fisher D J, et al. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 7542~7547.
- [25] Fuller T E, Kennedy M J, Lowery D E. Microb Pathog, 2000, 29: 25~38.
- [26] Harper M, Boyce J D, Wilkie I W. Infect Immun, 2003, 71(9): 5440~5446.
- [27] Harper M, Cox A D, St Michael F. Infect Immun, 2004, 72(6): 3436~3443.
- [28] Okamoto S, Kawabata S, Teras Y. Infect Immun, 2004, 72(10): 6068~6075.
- [29] Chen L, Paulsen D B, Scruggs D W, et al. Microbiology, 2003, 149(8): 2283~2290.
- [30] Varga J, Sturewalt V L, Melville S B, et al. J Bacteriol, 2004, 186(16): 5221~5229.
- [31] Vassaux G, Nitchau J, Jezzard S, et al. Gene Ther, 2006, 13(2): 101~105.
- [32] Theys J, Landuyt A W, Nuyts S. Cancer Detect Prev, 2001, 25(6): 548~557.
- [33] Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, et al. Cancer Gene Ther, 2003, 10(10): 737~744.
- [34] Otero J, Jacobs W R J, Glickman M S. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(9): 5039~5044.