

以克隆载体为自杀载体快速构建布鲁氏菌的无痕缺失突变株^{*}

王玉飞^{**} 陈泽良^{**} 赵红庆 苑锡铜 黄留玉^{***}

(中国人民解放军军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

摘要 构建突变株是病原微生物致病机理研究的重要手段。以往研究中布鲁氏菌的无痕缺失突变株都采用传统的自杀载体来构建,效率低下。首先对布鲁氏菌的电击转化条件进行了优化,然后选择含有反向筛选基因 *sacB* 的 pEX18Gm 质粒作为自杀载体,构建了缺失Ⅳ型启动子区的布鲁氏菌无痕缺失突变株。这不仅为构建布鲁氏菌的突变株提供了一个快速有效的技术平台,也为深入研究Ⅳ型分泌系统的功能奠定了基础。

关键词 自杀载体 布鲁氏菌 突变株构建

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0642-04

Construction of *Brucella* Unmarked Deletion Mutant by Using Conventional Cloning Vector as Suicide Plasmid^{*}

WANG Yu-Fei^{**} CHEN Ze-Liang^{**} ZHAO Hong-Qing YUAN Xi-Tong HUANG Liu-Yu^{***}
ZHANG Ling LIU Jing-Mei SONG Hong-Bin

(Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Construction of mutant strain is an essential method in pathogenesis researches. The conventional method for *Brucella* unmarked deletion mutant construction is based on suicide plasmid, but the efficiency is very low. In the present study, we first optimized the electroporation parameters, and then, the cloning plasmid pEX18Gm containing *sacB* was successfully used to construct unmarked deletion mutant of the type IV secretion system. This indicated that by using conventional cloning plasmid as suicide plasmid in *Brucella*, unmarked deletion mutants can be constructed with high efficiency.

Key words Suicide plasmid, *Brucella*, Mutant construction

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人兽共患病,在世界各地广泛流行。致病机理研究一直都是布鲁氏菌研究的重点和热点^[1]。目前,病原菌的致病机理研究主要是通过失活或缺失特定基因,然后分析突变株各种表型的变化,从而解析目标基因的功能。以往的研究常以克隆载体 pUC19 等作为自杀载体来构建其插入失活突变株^[2],而精确的缺失则是采用经典的自杀载体来构建,如 pCVD442 等。但由于这类载体需要在特殊的宿主菌中操作且克隆效率较低,突变株的构建比较困难,已成为后基因组时代功能研究的一个限速步骤^[3,4]。

大多数病原菌携带有与致病性密切相关的质粒。但布鲁氏菌中没有质粒,大多其它来源的质粒也不能在布鲁氏菌中复制^[5]。据此推理很多质粒都可作为自杀载体来构建布鲁氏菌的突变株。为证实这样的推理并提高布鲁氏菌突变株构建的效率,我们选择了易于操作的含反筛基因 *sacB* 的 pEX18Gm 质粒作为自杀载体来构建布鲁氏菌突变株。Ⅳ型分泌系统是一种能分泌细菌毒力因子的多蛋白复合物家族,在布鲁氏菌的基因组中预测到一个,初步的研究结果表明这些基因调控了布鲁氏菌的毒力。为深入研究布鲁氏菌Ⅳ型分泌系统的功能,我们以该系统为目标基因,建立了快速有效

^{*} 国家 973 资助项目,国家自然科学基金资助项目(No.30600024)

^{**} 共同为第 1 作者,其他作者:张伶、刘京梅、宋宏彬

^{***} 通讯作者 Tel: 010-66933356, E-mail: huangly@nic.bmi.ac.cn

收稿日期:2006-10-09,修回日期:2006-12-20

的布鲁氏菌基因无痕缺失突变技术。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒载体

布鲁氏菌 *B. melitensis* 购自中国药品生物制品鉴定所, *E. coli* DH5 α 为本室保存; pUC19 质粒及 pEX18Gm 质粒为本室保存; pBBR1MCS-2 质粒是能够在布氏菌中复制的特殊质粒, 由 Kenneth M Peterson 博士馈赠。

1.2 试剂盒、酶和试剂

PCR 产物回收试剂盒、DNA 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自 Promega 公司, 各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司, *T*₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 IV 型分泌系统缺失引物设计

设计两对引物分别用于扩增 IV 型启动子的上游和下游片段, 并通过融合 PCR 将这两个片段融合在一起, 得到缺失启动子区域 511bp(- 510 ~ + 1) 的缺失突变盒。此外, 设计一对引物 PRO-F 和 PRO-R 用于确定启动子的缺失; 一对引物针对 31kd 蛋白基因, 用于鉴定布鲁氏菌; 一对引物针对 pEX18Gm 质粒上的 *sacB* 基因, 用于确定质粒的消除。设计的引物见表 1。

表 1 本研究所用引物及其序列

引物名	引物序列(5'-3')
IVB-N-F	CTGCG <u>AAGCTT</u> GCAAATTCCTCCGGTTCG
IVB-N-R	GAGGACAAGGAATGGCACCACGACGCAGGACGAAA-GGAC
IVB-C-F	GTCTTTCCTGCTCTGCGTCTGGTGCCATTCCTGTGCTCTC
IVB-C-R	CGACCG <u>GAATTC</u> GAAGCCGCCCGTAAAGTTGC
PRO-F	GAGCGGCTGGAAGTCAAAAC
PRO-R	GACCAACCGCCACCAACGAC
31KD-F	GGCGCAAGTTCAAGCATC
31KD-R	GGTCGGTGTAGAGGTATTCC
<i>sacB</i> -F	TCGCATTATCCGAACCATCC
<i>sacB</i> -R	CACCCAGTCCCAGACGAAGC

1.4 缺失突变盒的构建

用 IVB-N-F 和 IVB-N-R 扩增 IV 启动子的上游序列, 用 IVB-C-F 和 IVB-C-R 扩增下游序列, 回收 PCR 产物, 等量混合, 稀释后作为第二轮 PCR 反应的模板。第二轮扩增的引物为 IVB-N-F 和 IVB-C-R,

扩增产物回收, 得到缺失突变盒 IVB-NC。

1.5 缺失突变载体的构建

缺失突变盒 IVB-NC 用 *Hind*Ⅲ 和 *Eco*RI 进行双酶切后与 pUC19 质粒连接, 得到 pUC19-IVB, 酶切鉴定后送 Invitrogen 公司进行序列测定。测序结果与预期一致, 从 pUC19-IVB 上切下 IVB 片段插入到 pEX18Gm 载体中, 得到 pEX18Gm-IVB。

1.6 布鲁氏菌的电转化

电击用感受态细胞的制备: TSA 平板上新鲜的布鲁氏菌落接种于 5mL TSB 液体培养基中, 37℃ 摇床培养 24h 后转接至 100mL TSB 中, 继续培养 8h 后按 1:20 的比例转接至 600mL TSB 液体中, 37℃ 摇床培养至 *OD*₆₀₀ = 0.20, 冰浴 15min, 4℃ 4000r/min 离心 5min 收集菌体。无菌水洗 2 次后用 15% 的甘油洗 1 次, 按 100 μ L/管分装, - 80℃ 储存备用。

转化条件的优化: 将 100ng 的 pBBR1MCS-2 质粒 DNA 与 30 μ L 感受态细胞充分混匀, 预冷 15min, 然后于不同的电击条件下进行电击, 电击后立即加入 1mL SOC 培养基重悬细菌, 转入 1.5mL 离心管中 37℃ 复苏 24h, 复苏的转化产物系列稀释后涂布含有适当抗生素的 TSB 平板, 37℃ 培养 72h 后计数。根据抗性克隆的数量, 确定最佳的电击转化条件。

1.7 突变体的筛选与鉴定

在最优电转化条件下将 pUC19-IVB 和 pEX18Gm-IVB 质粒转入布鲁氏菌感受态细胞中, 分别涂氨苄青霉素和庆大霉素平板, 37℃ 培养 3d 到 4d, 对长出的抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定。对于 pEX18Gm-IVB 重组子, PCR 鉴定的靶基因包括布鲁氏菌特异的 31kd 蛋白基因、质粒的 *sacB* 基因和突变盒的 IVB 片段, 并用 PRO-F 和 PRO-R 鉴定启动子的缺失情况。4 者均能扩增出预期大小片段即为阳性重组克隆。将重组克隆转接至无抗性的液体培养基中培养 5h 后系列稀释涂布蔗糖平板。随机挑取 16 个蔗糖抗性克隆, 用上述 4 对引物进行鉴定。扩增 *sacB* 基因结果为阴性, 而其余 3 对引物均能扩出预期大小的片段即为我们所需的无痕缺失突变体。

2 结果

2.1 突变盒的构建

IV 型分泌系统是由 12 个基因组成的操纵子, 要

失活整个Ⅳ型分泌系统,只需要缺失Ⅳ型分泌系统的启动子区域及第一个基因的部分编码序列。我们利用融合 PCR 的方法将待缺失区域两侧的序列连接一起,通过两侧序列的同源交换,置换出染色体上的待缺失区域。利用引物 IVB-N-F 和 IVB-N-R,IVB-C-F 和 IVB-C-R,扩增出大小分别为 450bp 和 410bp 的 IVB-N 和 IVB-C 两个片段,电泳结果表明与预期一致。两个片段回收后等量混合作为第二轮的 PCR 模板,用两侧引物 IVB-N-F 和 IVB-C-R 成功扩增出了缺失突变盒 IVB-NC,大小为 860bp(见图 1)。

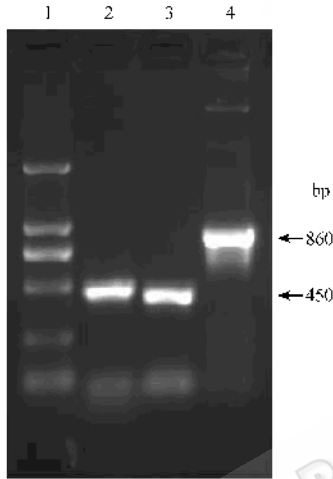


图 1 融合 PCR 合成缺失突变盒

1 DL2000 Marker, 2 IVB-N(450bp), 3 IVB-C(410bp), 4 IVB-NC (860bp)

2.2 缺失突变载体的构建

将缺失突变盒插入到 pUC19 载体,得到 pUC19-IVB,PCR 和酶切鉴定结果正确(结果略)。选取两个质粒进行测序,序列与预期一致(测序结果略)。从 pUC19-IVB 上切下 IVB 片段插入到 pEX18Gm 载体中,得到 pEX18Gm-IVB。PCR 和酶切鉴定结果(图 2)正确。

2.3 布鲁氏菌电转化条件的优化

感受态细菌与 pBBR1MCS-2 质粒混合,于不同电压与电阻下电转。电压为:8kV/cm、10kV/cm、15kV/cm、18kV/cm 和 20kV/cm;电阻为:200Ω、400Ω 和 600Ω。固定其它条件,将电压与电阻条件进行组合,对转化后得到的抗性克隆计数。重复 3 次,取平均值。结果表明 18kV/cm、400Ω 和 20kV/cm、400Ω 这两个条件的转化效率较高(见图 3)。因此,将 18kV/cm、400Ω 的条件确定为后续转化的条件。

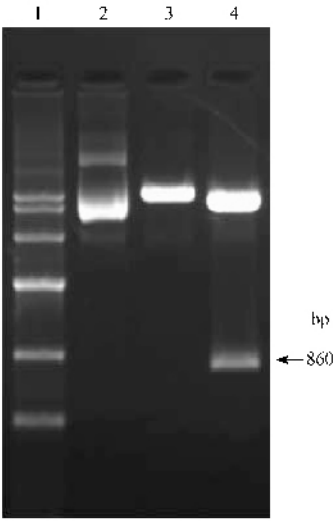


图 2 pEX18Gm-IVB 的酶切鉴定结果

1 Marker IV, 2 pEX18Gm-IVB, 3 pEX18Gm-IVB/*Eco*RI, 4 pEX18Gm-IVB/*Eco*RI + *Hind*III

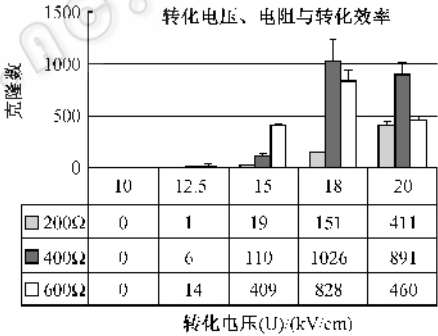


图 3 布鲁氏菌电击转化条件的优化

2.4 Ⅳ型缺失突变株的构建

将 pUC19-IVB 和 pEX18Gm-IVB 质粒转入布鲁氏菌感受态细胞中,鉴定得到的抗性克隆。用 PRO-F 和 PRO-R 进行 PCR 扩增,野生株的扩增产物大小为 806bp,而突变株则为 295bp(图 4),表明启动子区域已成功缺失。通过比较相同转化条件下的重组子数量发现两个突变载体的重组效率基本一致(结果略)。为了进一步构建不带有质粒的无痕缺失突变体,利用 *sacB* 基因的反向筛选功能,将重组克隆转入无抗菌素的培养基中进行培养后涂蔗糖平板,使突变体发生第二次重组以消除质粒。得到的蔗糖抗性克隆进行 PCR 鉴定的结果显示大约 70% 的克隆消除了质粒。质粒 pEX18Gm 消除前后的重组克隆 PCR 鉴定结果见图 4。

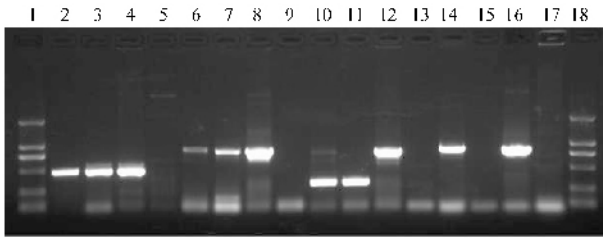


图 4 pEX18Gm 质粒消除前后的鉴定结果

1、18 为 DL2000 2、6、10、14 为 pEX18Gm 质粒消除前的突变株 3、7、11、15 为 pEX18Gm 质粒消除后的突变株 4、8、12、16 为阳性对照(其中 4、12 为野生株 8、16 为 pEX18Gm 质粒) 5、9、13、17 为阴性对照。2~5 扩增 31kd 基因 6~9 扩增 IVB-NC 10~13 扩增 IV 型启动子 PRO 14~17 扩增 *sacB* 基因。

3 讨论

布鲁氏菌的基因功能研究得力于其突变株的构建。由于很多常见载体在布鲁氏菌中不能复制,这些载体均可作为自杀载体来构建布鲁氏菌的突变株,目前多采用克隆载体 pUC19 来构建靶基因的插入失活突变株。对于分析染色体特定区域的功能,特别是分析操纵子中的个别基因的功能时,需要缺失该基因编码框的一部分,不能带有载体序列,即必须构建无痕缺失突变体。以往研究中这类无痕缺失突变体都采用经典的自杀载体来构建,如 pCVD442。这些自杀载体存在一定的不足,如:分子操作需要在特殊的宿主菌中进行、克隆的效率较低,因此,布鲁氏菌无痕缺失突变株的构建往往比较困难。我们在本研究中探讨选用含有反向筛选基因的克隆载体作为自杀载体来构建突变株,以 pEX18Gm 作为自杀载体构建了 IV 型分泌系统的无痕缺失突变株。实验结果表明:利用这类含有反筛基因的克隆载体可以高效构建布鲁氏菌的无痕缺失突变株。

我们首次对布鲁氏菌的电转化条件进行了系统优化。结果表明通过提高电压和延长电击时间可大大提高转化效率。在一定范围内,电压越大转化效率越高,电阻亦然。但只有当两者均合适时才能达到最高的转化效率。因此,布鲁氏菌的高效电

击转化需要合适的电压和电击时间。

sacB 基因作为革兰氏阴性菌中的一个重要反向筛选基因在突变株的构建中应用非常广泛。该基因的编码产物能分解蔗糖,产生有毒物质杀死细菌。因此,含有该基因的细菌不能在蔗糖培养基上生长。我们发现:蔗糖培养基上长出的单克隆有 30% 仍然含有 *sacB* 基因。推测其原因可能是 *sacB* 基因在选择压力下发生了突变,提高蔗糖浓度可减小这种假阳性的几率。

用 pEX18Gm 质粒作为自杀载体构建的布鲁氏菌无痕缺失突变体,其重组效率与 pUC19 基本一致,远高于传统的自杀质粒。因此推测其它携带反筛基因的质粒或者将反筛基因插入的常见克隆载体均可作为布鲁氏菌的高效自杀载体。

在布鲁氏菌的基因组中没有典型的毒力因子,如外毒素、III 型分泌系统等^[6,7],但存在一个 IV 型分泌系统,有研究证实其与布鲁氏菌的胞内生存密切相关。本研究利用 pEX18Gm 质粒作为自杀载体构建了 IV 型分泌系统的突变株,这为深入探讨 IV 型分泌系统的功能,特别是进一步比较突变株与野生株表型上的差异,以及寻找 IV 型分泌系统的效应子蛋白及其在胞内生存复制中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Zvizdic S, Cengic D, Bratic M, et al. Bosn J Basic Med Sci, 2006 6: 15 ~ 18.
- [2] den Hartigh A B, Sun Y H, Sondervan D, et al. Infect Immun, 2004, 72: 5143 ~ 5149.
- [3] Burkhardt S, Jimenez de Bagues M P, Liautard J P, et al. Infect Immun, 2005 73: 6782 ~ 6790.
- [4] Michaux-Charachon S, Jumas-Bilak E, Allardet Servent A, et al. Vet Microbiol 2002 90: 581 ~ 585.
- [5] Paulsen I T, Seshadri R, Nelson K E, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 99: 13148 ~ 13153.
- [6] Roop R M, 2nd, Bellaire B H, Valderas M W, et al. Mol Microbiol, 2004 52: 621 ~ 630.
- [7] Celli J. Res Microbiol 2006 157: 93 ~ 98.