

• 医药生物技术 •

耻垢分枝杆菌 EF-G 敲低菌株的构建和耐药分析

狄玉昌¹, 白嘉诚¹, 迟明哲¹, 范伟兴², 张雪莲¹

1 复旦大学 生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032

狄玉昌, 白嘉诚, 迟明哲, 范伟兴, 张雪莲. 耻垢分枝杆菌 EF-G 敲低菌株的构建和耐药分析. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1050-1060.

DI YC, BAI JC, CHI MZ, FAN WX, ZHANG XL. Construction of EF-G knockdown strain of *Mycobacterium smegmatis* and drug resistance analysis. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1050-1060.

摘要: GTPase 延伸因子 G (elongation factor G, EF-G) 是蛋白质翻译过程中重要的翻译因子。作为唯一在翻译延伸和核糖体再生 2 个翻译环节发挥重要功能的翻译因子, EF-G 成为潜在的抗菌药物作用靶点。耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, Msm) 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 基因组中均存在 2 个 EF-G 同源编码基因, 分别为 MsmEFG1 (*MSMEG_1400*) 和 MsmEFG2 (*MSMEG_6535*), *fusA1* (*Rv0684*) 和 *fusA2* (*Rv0120c*)。基因突变库和生物信息学推测 MsmEFG1 (*MSMEG_1400*) 和 *fusA1* (*Rv0684*) 是生长必需基因。为探究分枝杆菌中 EF-G 的生物学功能及特点, 利用成簇的规律间隔的短回文重复序列干扰 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference, CRISPRi) 技术构建了耻垢分枝杆菌中 2 个 EF-G 诱导型敲低菌株 (Msm- Δ EFG1(KD) 和 Msm- Δ EFG2(KD)), 研究发现 EF-G2 的敲低对细菌生长无影响, 而 EF-G1 的敲低显著影响分枝杆菌的生长, 成膜能力显著减弱、菌落形态显著变化、菌体长度显著增长, 推测 EF-G 可能与细菌的分裂相关。最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 实验结果表明, 抑制 EF-G1 的表达可增强分枝杆菌对利福平、异烟肼、红霉素、夫西地酸、卷曲霉素等抗菌药物的敏感性, 提示 EF-G1 可能成为未来抗结核药物筛选的潜在靶标, 为探究 EF-G 在分枝杆菌中的生理功能及作为潜在药物靶标提供基础。

关键词: 耻垢分枝杆菌; EF-G; 成簇规律间隔短回文重复序列干扰 (CRISPRi); 最小抑菌浓度; 耐药

Received: March 14, 2021; **Accepted:** April 29, 2021; **Published online:** May 11, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81971898, 81673482); National Key Research and Development Program of China (2016YFA0500601); Key Science and Technology Project of Xinjiang Construction Corps, China (2020AB015)

Corresponding author: ZHANG Xuelian. Tel/Fax: +86-21-31246587; E-mail: xuelianzhang@fudan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (81971898, 81673482); 国家重点研发计划 (2016YFA0500601); 新疆建设兵团重点科技攻关项目 (2020AB015)

Construction of EF-G knockdown strain of *Mycobacterium smegmatis* and drug resistance analysis

DI Yuchang¹, BAI Jiacheng¹, CHI Mingzhe¹, FAN Weixing², ZHANG Xuelian¹

1 State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

2 Laboratory of Zoonosis, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, Shandong, China

Abstract: As the only translational factor that plays a critical role in two translational processes (elongation and ribosome regeneration), GTPase elongation factor G (EF-G) is a potential target for antimicrobial agents. Both *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* have two EF-G homologous coding genes, *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) and *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*), *fusA1* (*Rv0684*) and *fusA2* (*Rv0120c*), respectively. *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) and *fusA1* (*Rv0684*) were identified as essential genes for bacterial growth by gene mutation library and bioinformatic analysis. To investigate the biological function and characteristics of EF-G in mycobacterium, two induced EF-G knockdown strains (*Msm-ΔEFG1*(KD) and *Msm-ΔEFG2*(KD)) from *Mycobacterium smegmatis* were constructed by clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference (CRISPRi) technique. EF-G2 knockdown had no effect on bacterial growth, while EF-G1 knockdown significantly retarded the growth of mycobacterium, weakened the film-forming ability, changed the colony morphology, and increased the length of mycobacterium. It was speculated that EF-G might be involved in the division of bacteria. Minimal inhibitory concentration assay showed that inhibition of EF-G1 expression enhanced the sensitivity of mycobacterium to rifampicin, isoniazid, erythromycin, fucidic acid, capreomycin and other antibacterial agents, suggesting that EF-G1 might be a potential target for screening anti-tuberculosis drugs in the future.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*; EF-G; clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference (CRISPRi); minimal inhibitory concentration (MIC); drug resistance

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引起的传染性疾病。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 2020 结核病报告数据统计显示, 2019 年约有 1 000 万人新发结核病, 140 万人死于结核病, 而耐药结核病 (drug-resistance TB, DR-TB) 的发生是该病难以控制的重要原因之一。2019 年, 约有 50 万人新发利福平耐药结核 (rifampicin-resistant TB, RR-TB), 其中 78% 存在耐多药结核病 (multidrug-resistant

TB, MDR-TB)^[1], 表明当前结核病依然严重威胁全球公共卫生安全。

抗菌药物广泛使用乃至滥用致使耐药病原菌剧增, 急需发现新型抗菌药物。蛋白质翻译是核糖体中发生的高速率和高保真度的复杂过程, 包括起始、延伸、终止和核糖体再循环 4 个阶段。细菌核糖体与真核生物核糖体具有相似的核心区域, 但其总体结构及作用机制差别显著, 因此长期以来作为筛选抗菌药物的直接靶点, 如大环内酯类、四环素类、酚类和氨

基糖苷类, 这些抗生素都是阻碍蛋白质的合成。然而在蛋白质合成中还需要多种翻译因子共同参与以保证核糖体的正常移动及新生肽链的延长, 使其也成为潜在的抗生素靶点, 如延伸因子 Tu (elongation factor Tu, EF-Tu) 和延伸因子 G (elongation factor G, EF-G)^[2]。

EF-G 是蛋白质合成过程中重要的翻译因子, 是一种核糖体依赖的 GTP 酶 (GTPase), 参与翻译延伸和核糖体再生环节^[3-5]。作为唯一参与两个翻译环节的翻译因子, EF-G 的功能和结构研究受到极大关注。EF-G 三维结构包括 6 个结构域 (G、G'、II、III、IV、V), 在翻译延伸过程中, 5 个结构域 (G、G'、II、III、V) 折叠为类似三聚体 (aa-tRNA-EF-Tu-GTP) 的结构, 而 IV 结构域与 tRNA 的反密码子茎环相对应^[6], 与延伸因子 4 (elongation factor 4, EF4) 共同参与 tRNA₂-mRNA 复合物在核糖体上的转位和反转位过程^[6], 保证在肽键形成后催化 tRNA₂-mRNA 复合物以一个密码子长度从核糖体 A/A 和 P/P 位点转到 P/P 和 E/E 位点。在核糖体再生环节, EF-G 与核糖体再循环因子 (ribosome recycling factor, RRF) 协同解离翻译终止复合物 (post termination complex, PoTC), 得到核糖体大小亚基, 同时释放核糖体复合物^[7-9], 得到游离 mRNA 和去氨酰 tRNA, 结束本次肽链合成反应, 当 EF-G 的功能异常时, 则蛋白合成受阻并影响细胞的正常功能, 所以 EF-G 是蛋白合成过程中除核糖体以外的潜在抗生素靶点。临床重要抗菌药物夫西地酸 (fusidic acid, FA) 可通过阻止 EF-G 从核糖体上释放, 使得核糖体滞留于 mRNA 进而阻断细菌的蛋白质合成达到杀菌的目的^[10]。

EF-G 在原核生物中具有高度的序列保守性^[11]。基因组数据表明在快生长的耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, Msm) 和慢生长

的结核分枝杆菌基因组中均存在 EF-G 同源编码基因, 且分别有两个 EF-G 编码基因, *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 和 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*), *fusA1* (*Rv0684*) 和 *fusA2* (*Rv0120c*)。基因突变库和生物信息学推测 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 和 *fusA1* (*Rv0684*) 是细菌生长必需基因^[12], 有实验研究发现, 敲除 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*) 对于耻垢分枝杆菌的生长和生物膜形成没有显著影响^[13], 这表明两个 EF-G 在分枝杆菌中的生物学功能可能存在差异。

鉴于 EF-G 等多种翻译因子在蛋白质合成中的关键作用及其在抗结核分枝杆菌药物筛选中可能成为潜在药物靶点, 本研究对 EF-G 在结核分枝杆菌中的生理功能特点进行探究。由于基因突变库和生物信息学推测 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 是耻垢分枝杆菌的必需基因, 因而本研究采用成簇的规律间隔的短回文重复序列干扰 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference, CRISPRi) 系统^[14]构建了耻垢分枝杆菌的 2 个 EF-G 敲低菌株 (*Msm-ΔEFG1(KD)* 和 *Msm-ΔEFG2(KD)*), 并探究了 *MsmEFG1* 敲低对细菌生长、菌落形态、成膜能力、药物敏感性的影响, 为理解 EF-G 基因功能及作为抗分枝杆菌药物靶标提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

耻垢分枝杆菌 mc²155 菌株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 菌株由本实验室保存。PLJR962 质粒由哈佛大学 Sarah M. Fortune 课题组惠赠。

1.1.2 引物

表 1 中的引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Names	Primer sequences (5'→3')	Use
sg-EFG1-F	GGGATCGATGGTGCACGGTGAA	The forward sgRNA for EFG1 knock down
sg-EFG1-R	AAACTTCACCGTGCACCATCGA	The reverse sgRNA for EFG1 knock down
sg-EFG2-F	GGGAGGAAACCACGGCTGATGATG	The forward sgRNA for EFG2 knock down
sg-EFG2-R	AAACCATCATCAGCCGTGGTTTCC	The reverse sgRNA for EFG2 knock down
q-EFG1-F	GTCGATGACCTTCCCGGATC	The forward primer for EFG1 qPCR
q-EFG1-R	CCTGTGAACCCGCAACTTTG	The reverse primer for EFG1 qPCR
q-EFG2-F	ACCGATCCGCTGGTGTGCG	The forward primer for EFG2 qPCR
q-EFG2-R	TTCGATGCGCAGCGTGGGAT	The reverse primer for EFG2 qPCR
q-sigA-F	CGTCCGGCGACTTCGTGT	The forward primer for sigA qPCR
q-sigA-R	TGGCCAGCTCCACCTCTTCT	The reverse primer for sigA qPCR
PLJR962-F	TTCCTGTGAAGAGCCATTGATAATG	The primer for recombinant PLJR962 plasmid sequence

1.1.3 试剂及培养基

BsmB I、T4 DNA 连接酶购于 NEB 公司；无水四环素 (anhydrotetracycline, ATC) 购于 MCE 公司；细菌总 RNA 抽提试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司；HiScript III All-in-one RT SuperMix、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 购于南京诺唯赞公司；电镜固定液 (2%多聚甲醛, 2.5%戊二醛) 购于 Solarbio 公司；200 目普通碳支持膜、电镜染色液 (5%乙酸双氧铀, 3%柠檬酸铅) 购于中镜科仪公司；Middlebrook 7H9、Middlebrook 7H10 培养基购于美国 BD 公司；葡萄糖、氯化钠以及实验室常用其他试剂购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 耻垢分枝杆菌 EFG 敲低菌株的构建及鉴定

将 sg-EFG1-F 和 sg-EFG1-R 或 sg-EFG2-F 和 sg-EFG2-R 分别以 1:1 摩尔比混合, 98 °C 处理 10 min, 以 5 °C/min 梯度降温至室温形成双链 sg-EFG1 和 sg-EFG2, *BsmB* I 酶 55 °C 处理 PLJR962 载体 3 h, 与双链 sg-EFG1 和 sg-EFG2 分别连接成重组质粒, 将其转入至 DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 挑选单克隆菌落扩大培养

至对数期, 抽取质粒后送测序。将测序验证构建成功的重组质粒电转至耻垢分枝杆菌感受态中, 涂布于含有 30 μ g/mL 卡那霉素的 7H10-OADC (0.05%油酸, 5%牛血清白蛋白, 2%葡萄糖和 5%过氧化氢酶) 平板, 挑选单克隆至含 30 μ g/mL 卡那霉素和 100 ng/mL 无水四环素 (anhydrotetracycline, ATC) 的 7H9-OADC 中培养至对数期, 收集 10 mL 对数期菌体进行总 RNA 抽提和 RT-qPCR 检测。

总 RNA 按照 HiScript III All-in-one RT SuperMix 要求进行反转录, 取 100 ng 反转录产物, 按照 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 的要求配制混合液进行 RT-qPCR, 程序设定为 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 15 s, 共 40 个循环, 72 °C 采集荧光信号。以 *sigA* 为内参, 设置 3 个生物学重复及各 3 个技术重复, 按目标基因相对于内参基因的扩增量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 处理数据, 其中 $-\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_{t,q} - \Delta C_{t,cb})$, $\Delta C_{t,q}$ 为目标基因循环数, $\Delta C_{t,cb}$ 为内参基因循环数。

1.2.2 细菌生长差异的测定

分别将 Msm-WT、Msm- Δ EFG1(KD) 和 Msm- Δ EFG2(KD) 接种于 7H9-OADC (含 30 μ g/mL 卡那霉素) 中, 37 °C 振荡培养至对数期, 调至 $OD_{600}=0.1$, 10 倍梯度稀释至 10^{-5} , 每个梯度取

2.5 μL 点板于含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 7H10-OADC 平板及含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、100 ng/mL 无水四环素的 7H10-OADC 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 3 d。

分别将 Msm-WT 和 Msm- $\Delta\text{EFG1(KD)}$ 接种于 7H9-OADC 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至对数期, 调至 $OD_{600}=0.6$, 按照 1:100 比例分别接种至 50 mL 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 和 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、100 ng/mL 无水四环素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 0、16、18、20、22 h 取样检测 OD_{600} , 每次测定设置 3 个重复。

1.2.3 菌落形态的观察

将 Msm-WT 和 Msm- $\Delta\text{EFG1(KD)}$ 在 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 中培养至对数期, 调至 $OD_{600}=0.2$, 10 倍梯度稀释至 10^{-4} , 取 100 μL 涂布于 7H10-OADC 固体平板 (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、100 ng/mL 无水四环素), 封口膜封口, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 4–8 d, 于宏观变倍体式显微镜下观察并记录菌落形态。

1.2.4 成膜能力的测定

将 Msm-WT 和 Msm- $\Delta\text{EFG1(KD)}$ 在 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 中培养至对数期, 3 750 r/min 离心 10 min 收菌, 用苏通培养基清洗菌体 2 次并重悬菌体, 调至 $OD_{600}=0.1$, 稀释 20 倍, 于 24 孔板中加入菌液 1 mL/孔, 各设置 3 个复孔, 四周加 1 mL 无菌水水封, 封口膜封 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 4–8 d, 于宏观变倍体式显微镜下观察结果。

1.2.5 细菌形态观察

将 Msm-WT 和 Msm- $\Delta\text{EFG1(KD)}$ 在 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 中培养至对数期, 3 750 r/min 离心 10 min 收菌, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 电镜固定液固定 15 min, 无菌水重悬-离心清洗 3 次, 取 2.5 μL 菌液置于 200 目普通碳支持膜上, 取 2.5 μL 电镜染色液进行染色,

55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱进行干燥, 用扫描电子显微镜观察细菌形态并拍照记录^[15]。

1.2.6 MIC 测定

MIC 测定方法采用微孔法^[16]并进行一定改进。总的来说, 将 Msm-WT 和 Msm- $\Delta\text{EFG1(KD)}$ 在 7H9-OADC (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、100 ng/mL 无水四环素) 中培养至对数期, 稀释至 $OD_{600}=0.1$, 然后用 7H9-OADC 稀释 100 倍。取 96 孔圆底微孔板, 四周每孔加入 200 μL 无菌水水封, 在第二列 B2 至 G2 内加入 198 μL 稀释好的菌液, 其余孔内 B3 至 G11 加入 100 μL 菌液, 第二列孔内加 2 μL 相应浓度的抗生素母液, 充分混匀后取 100 μL 加至下一孔, 依次类推, 加至 G10 时取 100 μL 弃掉, G11 不加化合物作为对照, 封口膜密封板四周, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 4–8 d, 观察结果。

1.3 统计学方法

所有实验数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行检验统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 耻垢分枝杆菌 EFG 敲低菌株的构建及鉴定

本实验所使用 CRISPRi 技术是通过无水四环素诱导表达 PLJR962 质粒中的 dCas9 和 sgRNA, 两者形成的 dCas9-sgRNA 复合体可特异性结合 DNA 位点, 阻碍靶基因转录的起始和延伸, 从而达到抑制目的基因转录并降低表达水平的目的^[17-18]。本方法在没有直接破坏分枝杆菌基因组情况下, 通过无水四环素诱导实现靶基因的转录和蛋白水平低表达, 因此是用于分枝杆菌必需基因研究的新型遗传手段。

重组 PLJR962 载体中插入的 sgRNA 序列大小仅有 20 bp, 测序结果表明 sgRNA 序列成功

连接到 PLJR962 质粒中, 并将重组质粒电转至耻垢分枝杆菌感受态中。在含有卡那霉素抗性平板上挑选单克隆菌落至含有不同浓度的无水四环素 (10、30、50、100、150 ng/mL) 的液体培养基中培养至对数期, 抽提细菌的总 RNA, RT-qPCR 分别测定耻垢分枝杆菌野生型和突变体的 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 和 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*) 的转录水平。结果显示, 在 50、100、150 ng/mL 无水四环素条件下, EF-G1 敲低菌株的 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 的转录水平均有不同程度的显著降低, 且当无水四环素浓度为 100 ng/mL 时敲低效果最好 (图 1A), 故后续实验选定无水四环素浓度为 100 ng/mL。结果显示, 与 Msm-WT 相比, 在无水四环素 (100 ng/mL) 存在时, 两种 EF-G 敲低菌株的 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 和 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*) 的转录水平均显著降低, 表明 Msm- Δ EFG1(KD)

和 Msm- Δ EFG2(KD) 诱导型敲低菌株构建成功 (图 1B、1C)。

2.2 敲低菌株 Msm- Δ EFG1(KD) 生长显著减缓

分别将 Msm-WT、Msm- Δ EFG1(KD) 和 Msm- Δ EFG2(KD) 培养至对数期, 调至 $OD_{600}=0.2$, 梯度稀释点板于含或不含 ATC 的 7H10-OADC 固体平板静置培养。结果显示, 不加 ATC 诱导的情况下, Msm-WT、Msm- Δ EFG1(KD) 和 Msm- Δ EFG2(KD) 生长没有差异。在加 ATC 诱导的情况下, 与 Msm-WT 相比, Msm- Δ EFG1(KD) 生长显著受到抑制 (图 2), 而 Msm- Δ EFG2(KD) 的生长依然没有差异。结果说明 EF-G1 的敲低会严重影响分枝杆菌的生长, 从实验角度证实其为细菌的生长必需基因, EF-G2 的敲低不影响分枝杆菌生长, 结果与 Seshadri 等研究结果一致^[13]。

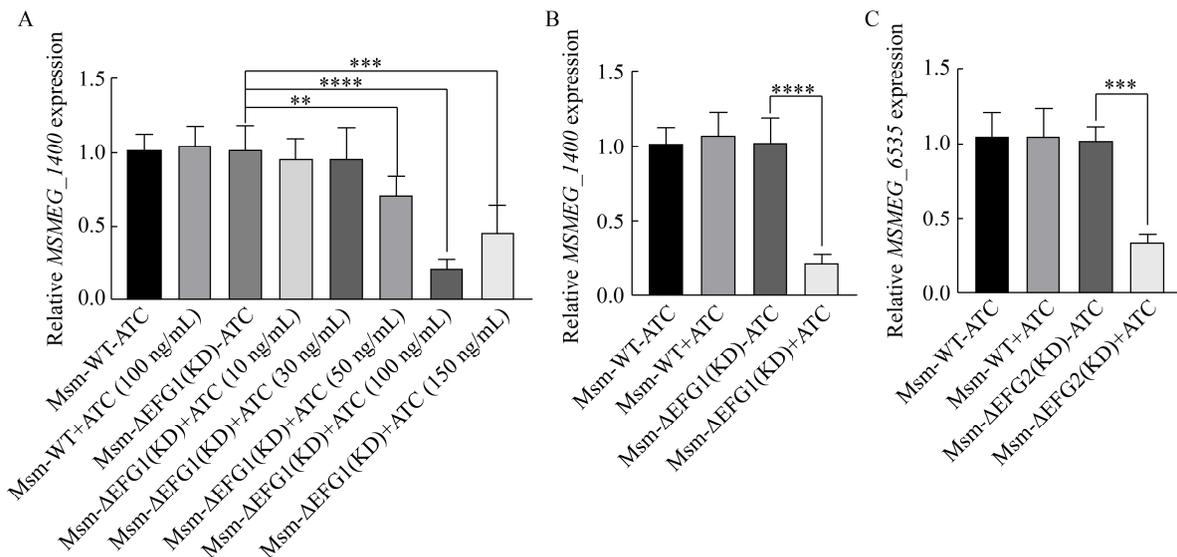


图 1 Msm-WT、Msm- Δ EFG1(KD) 和 Msm- Δ EFG2(KD) 转录水平验证

Figure 1 Verification of Msm-WT, Msm- Δ EFG1(KD) and Msm- Δ EFG2(KD) at the transcription level. (A) Relative *MSMEG_1400* expression of Msm- Δ EFG1(KD) strain at different concentrations of ATC. (B) Relative *MSMEG_1400* expression of Msm- Δ EFG1(KD) strain and (C) relative *MSMEG_6535* expression of Msm- Δ EFG2(KD) was decreased compared with Msm-WT strain respectively. All strains were cultured in 7H9-OADC medium with or without 100 ng/mL ATC.

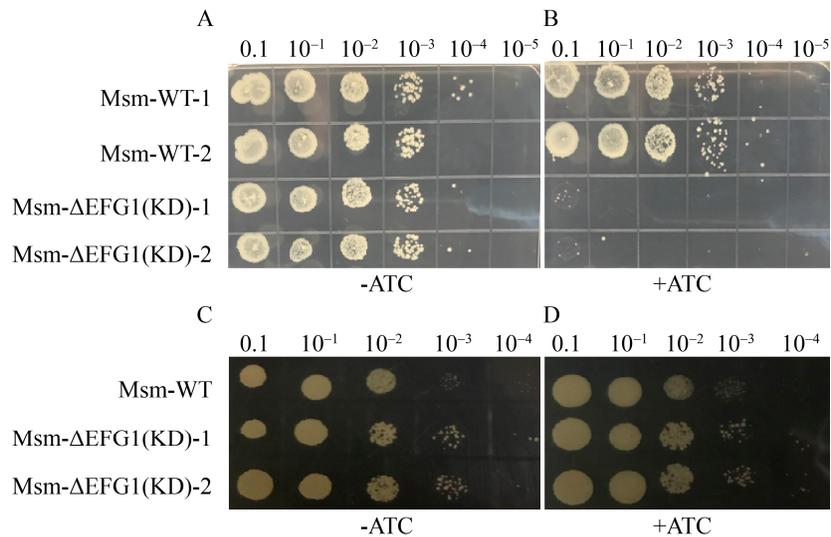


图2 点板实验分析敲低 *MSMEG_1400* 和 *MSMEG_6535* 对菌体生长的影响

Figure 2 Influence of knock down *MSMEG_1400* and *MSMEG_6535* on the growth of *M. smegmatis* by the dot blotting test. Strains Msm-WT and Msm- Δ EFG1(KD) were added into 7H10-OADC plate without (A) and with (B) 100 ng/mL ATC. Strains Msm-WT and Msm- Δ EFG2(KD) were added into 7H10-OADC plate without (C) and with (D) 100 ng/mL ATC. The first line named 0.1 represents the cell density of $OD_{600}=0.1$, approximately 10^7 cells/mL. 2.5 μ L of bacterial at different density were added to each grid.

鉴于 EF-G2 编码基因对分枝杆菌生长没有影响,同时 Seshadri 等^[13]研究发现 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*) 敲除不影响耻垢分枝杆菌的生长和生物膜形成,因此本研究只对 Msm- Δ EFG1(KD) 开展进一步的研究。

将 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 分别在正常培养基中培养至对数期,调至 $OD_{600}=0.6$,1%比例转接至含 ATC 的 7H9-OADC 液体培养基振荡培养。结果显示,与 Msm-WT 相比,在无水四环素存在时, Msm- Δ EFG1(KD) 生长显著受到抑制,进一步说明 EF-G1 为影响分枝杆菌生长的关键蛋白 (图 3)。

2.3 Msm- Δ EFG1(KD) 菌落表面褶皱增加

将 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 分别在不含 ATC 的 7H9-OADC 培养基中培养至对数期,稀释后涂于含 ATC 的 7H10-OADC 培养板上,4 d 后于宏观变倍体式显微镜下观察菌落形态。结果显示,无水四环素存在时,两者菌落

形态差异明显, Msm-WT 褶皱较少,表面光滑,而 Msm- Δ EFG1(KD) 则褶皱变多,表面更加干燥粗糙,中央球状突起明显,且边缘成不规则形状 (图 4)。

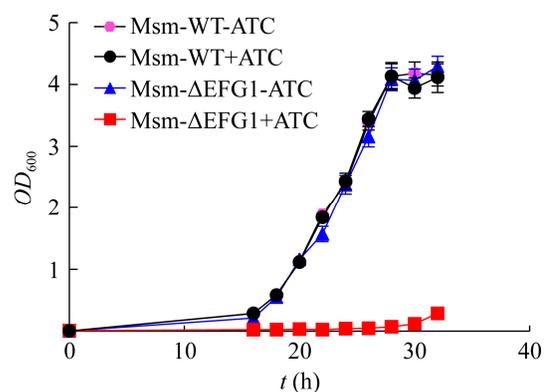


图3 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 的生长曲线
Figure 3 Growth curve of strains Msm-WT and Msm- Δ EFG1(KD) in 7H9-OADC medium with or without 100 ng/mL ATC. Some error bars couldn't be shown because the error bar was shorter than the size of the symbol.

2.4 Msm- Δ EFG1(KD) 的成膜能力减弱

分枝杆菌的菌落形态和成膜能力是其致病能力的重要表型,且分枝杆菌毒力的改变往往伴随着体外生物膜表型的变化^[19]。将 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 培养至对数期,稀释后于苏通培养基中培养,4 d 后于宏观变倍体式显微镜下观察其成膜能力。结果显示,无水四环素存在时,两者的成膜能力差异明显, Msm- Δ EFG1(KD) 成膜时间显著晚于 Msm-WT,且成膜能力减弱,成膜较薄,褶皱显著减少,膜表面的粗糙程度更高(图 5)。

2.5 Msm- Δ EFG1(KD) 形态呈细长丝状

扫描电镜结果显示,无水四环素存在时, MsmEFG1 (*MSMEG_1400*) 敲低会影响菌株形态, Msm-WT 呈短棒状,菌体长度为 3.65 μm ,而 Msm- Δ EFG1(KD) 则相对更为细长丝状化,菌体长度为 12.45 μm ,是 Msm-WT 的 3.41 倍,进一步说明 EF-G1 对细菌生长的重要性,诱导

型敲低后可能影响分枝杆菌的分裂(图 6)。

2.6 Msm- Δ EFG1(KD) 对抗菌药物的 MIC 降低

EF-G 是蛋白质合成过程中重要的翻译因子,夫西地酸是通过阻止 EF-G 从核糖体上释放致使核糖体滞留于 mRNA 来阻断细菌蛋白质合成的药物。为探索 EF-G 在分枝杆菌对药物敏感性方面是否有影响,本研究对 Msm-WT、Msm- Δ EFG1(KD) 进行了部分抗生素的 MIC 测定,其中异烟肼(isoniazid, INH)、利福平(rifampicin, RIF)、链霉素和卷曲霉素为临床常见抗分枝杆菌活性药物^[20],红霉素和夫西地酸(FA)则为常见抑制细菌蛋白合成的抗菌药物^[21]。结果显示,与 Msm-WT 相比,在无水四环素存在时,除链霉素以外, Msm- Δ EFG1(KD) 对所测药物的 MIC 均显著降低,对抗生素药物表现出更高的敏感性(表 2),说明 EF-G1 的抑制可以增强临床药物的抗菌活性。

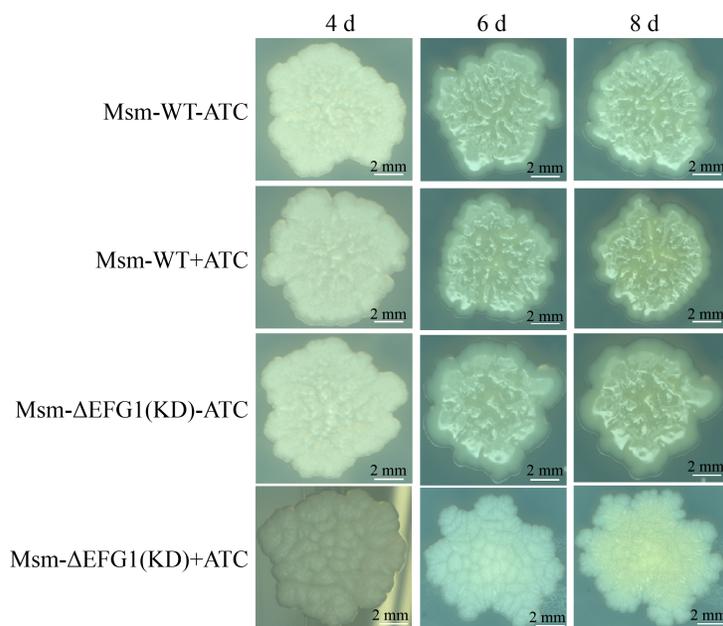


图 4 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 的菌落形态

Figure 4 Colony morphology of Msm-WT and Msm- Δ EFG1(KD). All strains were plated on 7H10-OADC medium with or without 100 ng/mL ATC.

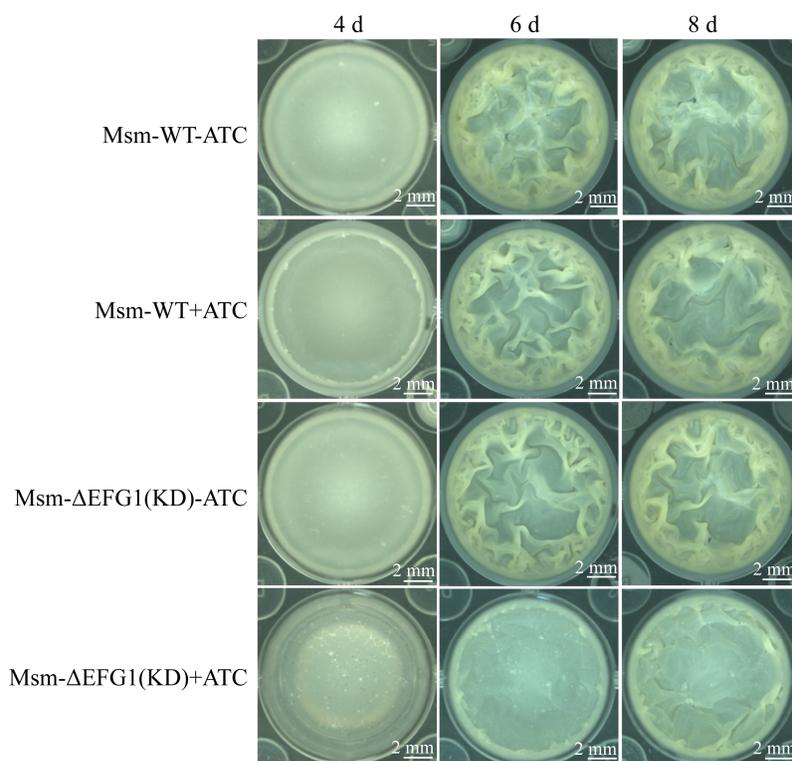


图5 Msm-WT 和 Msm- Δ EFG1(KD) 的生物膜生成

Figure 5 Biofilm formation of strains Msm-WT and Msm- Δ EFG1(KD). All strains were cultured on sauton medium with or without 100 ng/mL ATC.

3 讨论

抗菌药物广泛使用乃至滥用致使耐药病原菌剧增, 急需发现新型抗菌药物。蛋白质合成需要多种翻译因子共同参与, 其中 EF-G 是唯一参与两个翻译环节的翻译因子, 其功能异常时, 蛋白合成受阻, 因此 EF-G 是潜在的新型抗生素靶点。

耻垢分枝杆菌中存在 2 个 EF-G 编码基因, *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 和 *MsmEFG2* (*MSMEG_6535*), 菌体外研究表明, *MsmEFG1* 可以结合鸟嘌呤核苷酸, 具备依赖核糖体的 GTPase 活性, 而 *MsmEFG2* 则没有 GTPase 活性特征^[13], 推测耻垢分枝杆菌中可能是 *MsmEFG1* (*MSMEG_1400*) 发挥翻译因子的功能, 参与翻译延伸和核糖体再生过程。本研究

对构建的耻垢分枝杆菌 *MsmEFG1* 敲低菌株 *Msm- Δ EFG1(KD)* 研究发现, *MsmEFG1* 的敲低严重影响了分枝杆菌生长及分裂, 同时对其菌落形态和成膜能力也产生影响, 从生物学角度证实 EF-G 在分枝杆菌生长中的重要性。

夫西地酸 (FA) 作为直接作用于 EF-G 的抗菌药物, 对革兰阳性菌、许多厌氧菌和几种其他菌的抗菌活性强, 金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、梭状芽孢菌属、棒状杆菌对其非常敏感, 大多数革兰阴性菌对其不敏感, 其他菌如分枝杆菌、嗜肺军团菌、诺卡氏菌对其中度敏感^[22], 其独特的作用机制可以有效避免与其他抗菌药物产生交叉耐药性^[23], 所以可以用来与其他一线抗生素联合用药, 以缓解细菌耐药性带来的治疗困难, 提高治疗效果。尽管当前还没有针对 EF-G 靶点的抗结核分枝杆菌药

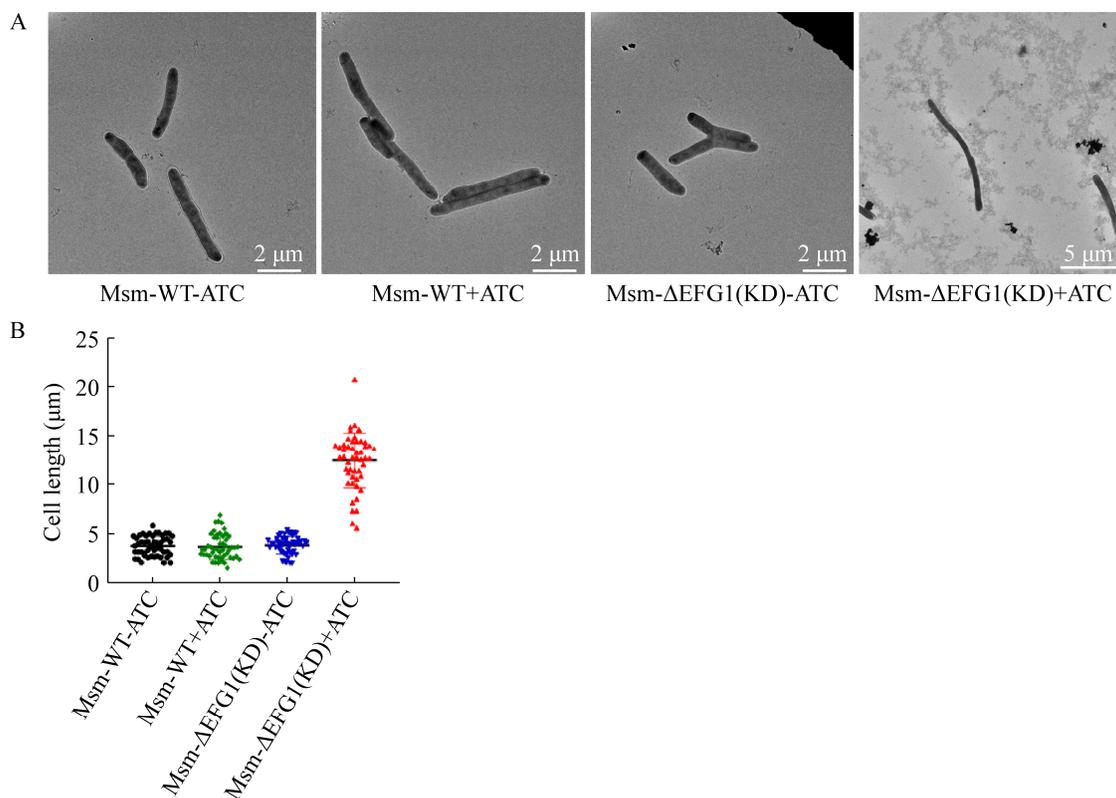


图 6 扫描电子显微镜分析 *MSMEG_1400* 对细菌形态的影响

Figure 6 Analysis of the effect of *MSMEG_1400* on the morphology of *M. smegmatis* by the scanning electron microscopy. (A) Morphology of *M. smegmatis*. (B) Statistics on the length of *M. smegmatis*. The length of *M. smegmatis* was statistically analyzed by GraphPad Prism 8.0 software, and *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

表 2 Msm-WT 和 Msm-ΔEFG1(KD) 菌株 MIC 的测定

Table 2 Determination of the MIC of strains Msm-WT and Msm-ΔEFG1(KD)

<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 strains	MIC (μg/mL)					
	INH	RIF	Erythromycin	FA	Capreomycin	Streptomycin
Msm-WT	25.0	25.00	320	160	1.56	0.312 5
Msm-ΔEFG1(KD)	12.5	6.25	40	80	0.78	0.312 5

物, 但 EF-G 作为翻译延伸和核糖体再生的关键因子, 也提示其可作为抗结核分枝杆菌潜在靶点的可能性。Msm-ΔEFG1(KD) 对常见抗菌药物的敏感性结果显示, EF-G1 的敲低可以增加分枝杆菌对于异烟肼、利福平、红霉素、卷曲霉素和夫西地酸 (FA) 等药物的敏感性, 增强了其他抗菌药物的杀菌活性。链霉素、卷曲霉素和红霉素均为作用于核糖体的药物, 但

EF-G1 的敲低极大增强了分枝杆菌对红霉素的敏感性, 而对链霉素的敏感性不变。链霉素和卷曲霉素均作用于蛋白质的延伸过程, 链霉素作用于 30S 小亚基, 在延伸过程中干扰氨酰-tRNA (aminoacyl-tRNA, aa-tRNA) 进入到 A 位点, 这一过程并不需要 EF-G 的参与, 而是由 EF-Tu 参与催化。卷曲霉素则是抑制随后 EF-G 参与的 mRNA-tRNA 复合物在核糖体上的

转位过程。而红霉素作用于 50S 大亚基, 结合在核糖体出口通道内部进而阻止新生多肽链的延伸^[2], 因此 EF-G 的缺失会进一步增加卷曲霉素和红霉素的抗菌活性。

基于本研究的结论, 后续将以分枝杆菌 EF-G 为靶点筛选新型抗结核药物, 所构建的 EF-G 敲低菌株可进一步用于筛选化合物的活性及耐药性评价, 另外 EF-G 对分枝杆菌毒力和体内耐药性的影响也需通过细胞感染和动物模型进一步探究。

REFERENCES

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2020[EB/OL]. [2020-10-14]. <http://www.who.int>.
- [2] Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(1): 35-48.
- [3] Zengel JM, Lindahl L. Oversynthesis of elongation factors G and Tu in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1982, 149(2): 793-797.
- [4] García-Ortega L, Alvarez-García E, Gavilanes JG, et al. Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G and EF-Tu binding. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(12): 4108-4119.
- [5] Tourigny DS, Fernández IS, Kelley AC, et al. Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science*, 2013, 340(6140): 1235490.
- [6] Yamamoto H, Qin Y, Achenbach J, et al. EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(2): 89-100.
- [7] Connell SR, Takemoto C, Wilson DN, et al. Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Mol Cell*, 2007, 25(5): 751-764.
- [8] Gao YG, Selmer M, Dunham CM, et al. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*, 2009, 326(5953): 694-699.
- [9] Khade PK, Shi X, Joseph S. Steric complementarity in the decoding center is important for tRNA selection by the ribosome. *J Mol Biol*, 2013, 425(20): 3778-3789.
- [10] Tomlinson JH, Kalverda AP, Calabrese AN. Fusidic acid resistance through changes in the dynamics of the drug target. *PNAS*, 2020, 117(41): 25523-25531.
- [11] Caldon CE, Yoong P, March PE. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol Microbiol*, 2001, 41(2): 289-297.
- [12] Zhang YJ, Ioerger TR, Huttenhower C, et al. Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 2012, 8(9): e1002946.
- [13] Seshadri A, Samhita L, Gaur R, et al. Analysis of the fusA2 locus encoding EFG2 in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009, 89(6): 453-464.
- [14] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [15] Ghosh J, Larsson P, Singh B, et al. Sporulation in *Mycobacteria*. *PNAS*, 2009, 106(26): 10781-10786.
- [16] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163-175.
- [17] Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, et al. Programmable transcriptional repression in *Mycobacteria* using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16274.
- [18] 周凤竹, 胡亚文, 葛文雪, 等. 应用 CRISPRi 技术敲低耻垢分枝杆菌异柠檬酸脱氢酶基因. *微生物与感染*, 2018, 13(4): 207-212.
Zhou FZ, Hu YW, Ge WX, et al. Knockdown of isocitrate dehydrogenase gene in *Mycobacterium smegmatis* using CRISPRi. *J Microbes Infect*, 2018, 13(4): 207-212 (in Chinese).
- [19] Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013, 4(1): 3-66.
- [20] Sharma D, Yadav J. An overview of phytotherapeutic approaches for the treatment of tuberculosis. *Mini - Rev Med Chem*, 2016, 17(2): 167-183.
- [21] Shalev M, Baasov T. When proteins start to make sense: fine-tuning aminoglycosides for PTC suppression therapy. *Medchemcomm*, 2014, 5(8): 1092-1105.
- [22] Spelman D. Fusidic acid in skin and soft tissue infections. *Int J Antimicrob Agents*, 1999, 12(Suppl 2): S59-S66.
- [23] Fernandes P. Fusidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(1): a025437.

(本文责编 陈宏宇)