

# 核糖体 *bS22*、*bL37* 基因的敲除增强分枝杆菌对抗生素的敏感性

单婵, 岳倩文, 丁晓明

复旦大学 生命科学学院, 上海 200433

单婵, 岳倩文, 丁晓明. 核糖体 *bS22*、*bL37* 基因的敲除增强分枝杆菌对抗生素的敏感性. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1061-1073.  
SHAN C, YUE QW, DING XM. Knockout of ribosomal genes *bS22* and *bL37* increases the sensitivity of mycobacteria to antibiotics. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1061-1073.

**摘要:** 近年来, 利用冷冻电子显微镜在分枝杆菌 (*mycobacteria*) 的核糖体中新发现了两个蛋白: 位于 30S 亚基解码中心附近的 *bS22* 和位于 50S 亚基肽酰转移酶中心附近的 *bL37*。由于这两个蛋白均邻近抗生素与核糖体结合区, 推测它们可能会影响相关药物与靶点的结合。因此我们利用同源重组的方法, 在野生型耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) mc<sup>2</sup>155 中分别敲除这两个蛋白的编码基因, 并测定菌株的生长曲线和对相关抗生素的敏感性。结果表明, 与野生型相比, 2 株敲除株的生长速率均没有显著变化, 但菌株  $\Delta bS22$  相比于野生型对卷曲霉素、卡那霉素、阿米卡星、链霉素、庆大霉素、巴龙霉素和潮霉素 B 的敏感性增加, 菌株  $\Delta bL37$  相比于野生型对利奈唑胺的敏感性增加, 并且这种敏感性的变化通过基因回补均得到恢复。研究结果暗示了核糖体蛋白 *bS22*、*bL37* 作为药物设计靶点的可能性。

**关键词:** 分枝杆菌; 耻垢分枝杆菌; 核糖体蛋白 *bS22* *bL37*; 抗生素敏感性

## Knockout of ribosomal genes *bS22* and *bL37* increases the sensitivity of mycobacteria to antibiotics

SHAN Chan, YUE Qianwen, DING Xiaoming

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** In recent years, two novel proteins in the ribosomes of *mycobacteria* have been discovered

**Received:** June 25, 2021; **Accepted:** September 1, 2021; **Published online:** February 10, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908300, 2016YFA0500600); National Natural Science Foundation of China (31970049)

**Corresponding author:** DING Xiaoming. Tel: +86-21-31246671; E-mail: xmding74@fudan.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2020YFA0908300, 2016YFA0500600); 国家自然科学基金 (31970049)

by cryo-electron microscopy. The protein bS22 is located near the decoding center of the 30S subunit, and the protein bL37 is located near the peptidyl transferase center of the 50S subunit. Since these two proteins bind to conserved regions of the ribosome targeted by antibiotics, it is speculated that they might affect the binding of related drugs to these targets. Therefore, we knocked out the genes encoding these two proteins in wild-type *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 through homologous recombination, and then determined the growth curves of these mutants and their sensitivity to related antibiotics. The results showed that compared with the wild-type strain, the growth rate of these two mutants did not change significantly. However, mutant  $\Delta$ bS22 showed increased sensitivity to capreomycin, kanamycin, amikacin, streptomycin, gentamicin, paromomycin, and hygromycin B, while mutant  $\Delta$ bL37 showed increased sensitivity to linezolid. These changes in antibiotics sensitivity were restored by gene complementation. This study hints at the possibility of using ribosomal proteins bS22 and bL37 as targets for drug design.

**Keywords:** mycobacteria; *Mycobacterium smegmatis*; ribosomal protein bS22 bL37; antibiotic sensitivity

随着在结核病的临床治疗中对抗生素的广泛使用,耐多药结核病和耐利福平结核病出现并大量传播,严重威胁着公共健康。根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布的 2020 全球结核病报告,2019 年全球共发现和报告了 206 030 例耐多药/耐利福平结核病病例,比 2018 年增加了 10%<sup>[1]</sup>。因此,积极开展结核病病原菌结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 耐药机制的研究,寻找到新的药物靶点,加快抗结核新药的研发是当前结核病防治研究的一个重要方向。

核糖体执行着蛋白质翻译的功能,对菌株的生长至关重要。目前已知相当多作用于核糖体的抗生素,它们大多结合在核糖体保守区域附近,如 50S 大亚基上负责催化肽键形成的肽酰转移酶中心 (peptidyl transferase center, PTC) 以及 30S 小亚基上负责监控 mRNA 的密码子和氨酰-tRNA (aa-tRNA) 的反密码子之间正确对的解码中心 (decoding center, DC)。

近年来,多个实验室利用冷冻电子显微镜,分别将结核分枝杆菌及其研究模式菌——

快生非致病的耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的核糖体结构解析至接近原子的分辨率,揭示了它们核糖体内部的大量细节,并报道了新鉴定出的两种保守的核糖体蛋白:位于 30S 亚基的解码中心附近的 bS22 和位于 50S 亚基的肽酰转移酶中心附近的 bL37<sup>[2-4]</sup>(图 1A)。

根据 Hentschel 等<sup>[2]</sup>描述,bS22 是一个具有 33 个氨基酸残基的多肽,折叠成扭曲的  $\alpha$ -螺旋,呈高度碱性 (pI=12.9),侵入了 16S rRNA 螺旋 (helix) h27、h44 和 h45 之间,位于 mRNA 通道下方 (图 1B)。因此,bS22 被认为能够稳定 h44 结构,以及与 h45 作用影响附近 anti-SD 序列上游出口位点附近 mRNA 通道排列元件的灵活性。此外,bS22 与 23S rRNA 螺旋 H70 建立了额外的亚基间接触,从而潜在地增加了组装的 70S 核糖体的稳定性。

bL37 是一个具有 24 个氨基酸残基的多肽,具有短的  $\alpha$ -螺旋折叠和一个低复杂度的尾部,它与 23S rRNA 的几个部分以及 5S rRNA 的尖端接触,夹在 23S rRNA 结构域 II 的螺旋 H39 和 H40 之间,以及结构域 V 的 H72 和 H89 之间,

该结构域包括普遍保守的肽酰转移酶中心,以及 tRNA 必需的结合位点 (A 和 P) (图 1C)。被 rRNA 包围的 bL37 被认为可能是为了稳定核糖体这一关键部分的重要功能结构进化而来的。

通过 BLAST 比对,发现 bS22 的氨基酸序列在耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 (*MSMEG\_0945*) 中与在结核分枝杆菌 H37Rv (*Rv0500B*) 中完全一致。结核分枝杆菌的 bS22 被列为 TubercuList 中功能未知的蛋白质,并被列为 WHO 热带疾病研究 (tropical disease research, TDR) 数据库 (<https://tdrtargets.org/>) 中的潜在药物靶点 (TDR Targets ID: 981937)。耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的 bL37 (*MSMEG\_1916*) 的氨基酸序列与其他放线菌门 (Actinobacteria) 的菌株相比,仅在序列水平上存在细微的差异,表明 bL37 具有保守功能。

然而,在革兰氏阴性菌以及大多数其他革

兰氏阳性菌的核糖体中均不含有上述这两个蛋白,即它们相应的该区域是空缺的,而在一些放线菌的核糖体中会存在这样的蛋白质。此外,在一些真核生物及其线粒体的核糖体中,存在类似 bS22 的蛋白 (eL41, mL41) 占据了相同的位置,但它们在序列上并不同源,与 rRNA 形成的相互作用也不同。

总之,由于这两个新发现的蛋白质在分枝杆菌中保守但具有一定的独特性,以及它们在核糖体中均处于关键位置,或许能够成为抗结核特异性药物设计的靶点<sup>[5]</sup>。为了探索这种可能性,我们在耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 中利用同源重组的方法分别敲除这两个蛋白的编码基因 *bS22* (*MSMEG\_0945*)、*bL37* (*MSMEG\_1916*),并探究了敲除株的生长速率以及对部分相关抗生素敏感性的变化。

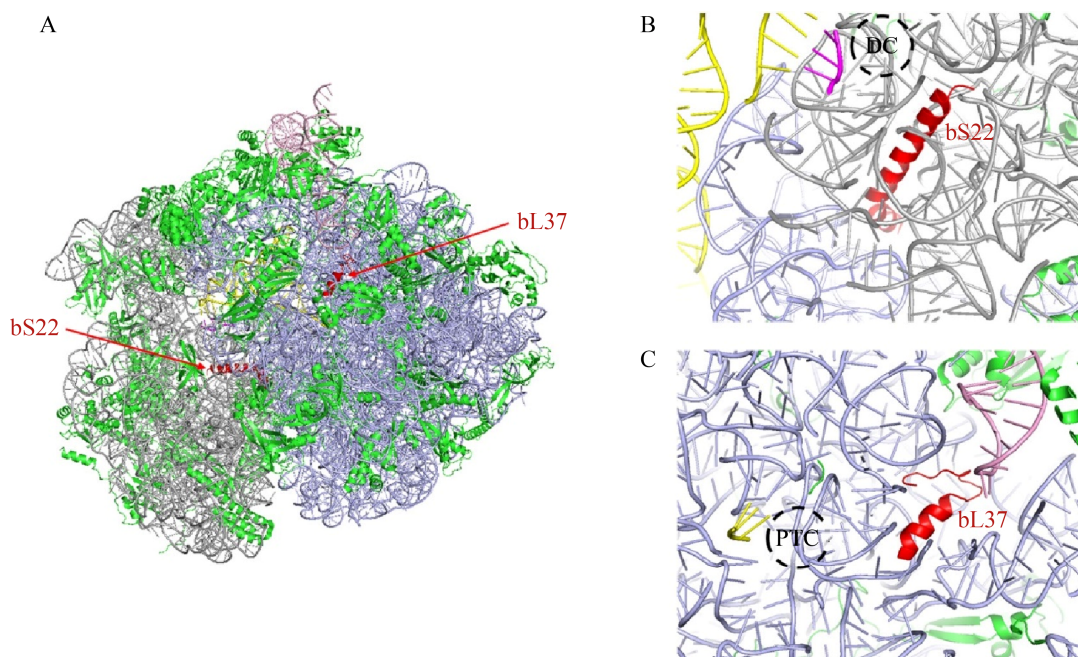


图 1 核糖体蛋白 bS22 和 bL37<sup>[2]</sup>

Figure 1 Ribosomal proteins bS22 and bL37<sup>[2]</sup>. (A) The position of bS22 and bL37 in the ribosome of *M. smegmatis* (PDB: 5O61). (B) The structure and location details of bS22 (PDB: 5O61). (C) The structure and location details of bL37 (PDB: 5O60). (A–C) Protein bS22 and bL37 are highlighted in bright red, 23S rRNA is shown in bluish violet, 16S rRNA is shown in gray, 5S rRNA is shown in pink, mRNA is shown in rose red, tRNA is shown in yellow, and other ribosomal proteins are shown in green.

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 质粒及菌株

实验所用质粒见表 1; 实验所用菌株见表 2。

### 1.1.2 主要试剂

2×YT 培养基: 胰蛋白胨 (16 g/L, 购自 OXOID), 酵母粉 (10 g/L, 购自 OXOID), 氯化钠 (5 g/L, 购自 BBI Life Science), 固体培养基需添加 1.5%的琼脂粉 (购自 BioFroxx), 用于培养大肠杆菌。

7H9 肉汤培养基: Difco™ Middlebrook 7H9 Broth 粉末 (4.7 g/L, 购自 Becton, Dickinson and Company), 5%吐温-80 (10 mL/L, 购自 BBI Life Science), 50%甘油 (4 mL/L, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司), 用于培养耻垢分枝杆菌。

7H10 固体培养基: Difco™ Middlebrook 7H10 Agar 粉末 (19 g/L, 购自 Becton, Dickinson and Company), 50%甘油 (10 mL/L, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司), 用于培养耻垢分枝杆菌。

OADC 营养添加剂: 牛血清白蛋白 (50 g/L, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司), 葡

萄糖 (20 g/L, 购自 Sigma), 氯化钠 (8.5 g/L, 购自 BBI Life Science), 过氧化氢酶 (0.3 g/L, 购自 Solarbio), 油酸 (120 μL/L, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司), 用于添加加入 7H9 肉汤培养基和 7H10 固体培养基。

抗生素: 卡那霉素 (kanamycin, Kan)、链霉素 (streptomycin, Str)、庆大霉素 (gentamicin, Gen) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp)、阿米卡星 (amikacin, Amk)、巴龙霉素 (paromomycin, Par)、潮霉素 B (hygromycin B, HygB) 购自 BBI Life Science; 利奈唑胺 (linezolid, LZD) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 卷曲霉素 (capreomycin, Cpm) 购自湖北威德利化学科技有限公司; 阿泊拉霉素 (apramycin, Apra) 购自 Sigma 公司。

### 1.1.3 主要仪器

SW-CJ-2F 净化操作台 (苏州净化设备有限公司), HZ-9211K 恒温培养摇床 (江苏省华利达试验设备公司), GNP-9080 型隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司), 5415D 台式高速离心机 (Eppendorf), 5804R 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf), 常规 PCR 仪 (Eppendorf),

表 1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Sources
pXL1	<i>ori p15A</i> , $\phi$ BT1 <i>int</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i> , $\phi$ C31_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , <i>SacB</i>	Lab stock
pXL2	<i>ori p15A</i> , $\phi$ C31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , TG1_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , <i>SacB</i>	Lab stock
pXL3	<i>ori p15A</i> , TG1 <i>int</i> , <i>Hyr<sup>R</sup></i> , $\phi$ BT1_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , <i>SacB</i>	Lab stock
pXL12	$\phi$ C31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , <i>ori p15A</i> , <i>oriM<sup>ts</sup></i>	Lab stock
pCQ1	pXL12 <i>derive</i> , TG1 <i>int</i> , <i>Hyr<sup>R</sup></i> , <i>ori p15A</i> , <i>oriM<sup>ts</sup></i>	This work
pCQ9	pXL1 <i>derive</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>SacB</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , $\phi$ C31_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , upstream and downstream homologous fragment of <i>mc<sup>2</sup>155 MSMEG_0945</i> (gene <i>bS22</i> ), used to delete gene <i>bS22</i>	This work
pCQ10	pXL1 <i>derive</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>SacB</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , $\phi$ C31_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , upstream and downstream homologous fragment of <i>mc<sup>2</sup>155 MSMEG_1916</i> (gene <i>bL37</i> ), used to delete gene <i>bL37</i>	This work
pCQ11	pXL2 <i>derive</i> , $\phi$ C31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , TG1_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , <i>SacB</i> , upstream and downstream homologous fragment of <i>mc<sup>2</sup>155 MSMEG_0945</i> (gene <i>bS22</i> ), gene <i>bS22</i> , used to complement gene <i>bS22</i>	This work
pCQ12	pXL2 <i>derive</i> , $\phi$ C31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , TG1_ <i>attB</i> and <i>attP</i> , <i>SacB</i> , upstream and downstream homologous fragment of <i>mc<sup>2</sup>155 MSMEG_1916</i> (gene <i>bL37</i> ), gene <i>bL37</i> , used to complement gene <i>bL37</i>	This work

表 2 本研究所用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK λ<sup>-</sup>rpsL nupG</i>	Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Wild-type	Lab stock
Δ <i>bS22</i> -Kan <sup>R</sup>	mc <sup>2</sup> 155Δ <i>MSMEG_0945</i> , <i>bS22</i> gene was knocked out, Kan <sup>R</sup> , φC31_ <i>attB</i> and <i>attP</i>	This work
Δ <i>bL37</i> -Kan <sup>R</sup>	mc <sup>2</sup> 155Δ <i>MSMEG_1916</i> , <i>bL37</i> gene was knocked out, Kan <sup>R</sup> , φC31_ <i>attB</i> and <i>attP</i>	This work
Δ <i>bS22</i> -Apra <sup>R</sup>	Δ <i>bS22</i> -Kan <sup>R</sup> derivate, harboring pXL12	This work
Δ <i>bL37</i> -Apra <sup>R</sup>	Δ <i>bL37</i> -Kan <sup>R</sup> derivate, harboring pXL12	This work
Δ <i>bS22</i>	Δ <i>bS22</i> -Apra <sup>R</sup> derivate, without pXL12	This work
Δ <i>bL37</i>	Δ <i>bL37</i> -Apra <sup>R</sup> derivate, without pXL12	This work
C-Δ <i>bS22</i> -Apra <sup>R</sup>	Δ <i>bS22</i> -Kan <sup>R</sup> derivate, complement gene <i>bS22</i> ( <i>MSMEG_0945</i> ), φC31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , TG1_ <i>attB</i> and <i>attP</i>	This work
C-Δ <i>bL37</i> -Apra <sup>R</sup>	Δ <i>bL37</i> -Kan <sup>R</sup> derivate, complement gene <i>bL37</i> ( <i>MSMEG_1916</i> ), φC31 <i>int</i> , <i>Apra<sup>R</sup></i> , TG1_ <i>attB</i> and <i>attP</i>	This work
C-Δ <i>bS22</i> -Hyr <sup>R</sup>	C-Δ <i>bS22</i> -Apra <sup>R</sup> derivate, harboring pCQ1	This work
C-Δ <i>bL37</i> -Hyr <sup>R</sup>	C-Δ <i>bL37</i> -Apra <sup>R</sup> derivate, harboring pCQ1	This work
C-Δ <i>bS22</i>	C-Δ <i>bS22</i> -Hyr <sup>R</sup> derivate, without pCQ1	This work
C-Δ <i>bL37</i>	C-Δ <i>bL37</i> -Hyr <sup>R</sup> derivate, without pCQ1	This work

实时荧光定量 PCR 仪 CFX96™ (Bio-Rad), 电穿孔仪 (Bio-Rad), 分光光度计 (Eppendorf), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), Synergy™ 2-多功能酶标仪 (BioTek), Tanon-2500 DNA 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司), Tanon EPS 100 型 DNA 电泳仪 (上海天能科技有限公司), Scientz-48 高通量组织研磨器 (宁波新芝)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒构建

本研究质粒构建过程中各片段通过 PCR 扩增获得, 所设计引物及其序列如表 3 所示。利用 ClonExpress™ II/MultiS One Step Cloning Kit (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 无缝克隆将各片段连接, 按照说明书配制连接反应体系, 之后将连接产物利用 CaCl<sub>2</sub> 法转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中。将转化并活化后的菌液涂布至加有相应抗生素 (其中卡那霉素、阿泊拉霉素终浓度为 50 μg/mL, 氨苄青

霉素终浓度为 100 μg/mL, 潮霉素 B 终浓度为 150 μg/mL) 的 2×YT 固体培养基平板上培养, 挑取平板上阳性克隆菌落扩大培养至对数期并抽取质粒, 后续将抽取的质粒送至北京擎科生物科技有限公司完成测序, 以确保所构建的质粒各片段连接正确且无突变。

### 1.2.2 目的菌株的构建

本研究利用“两步法”同源重组<sup>[6]</sup>, 并参考本课题组前期工作中“循环敲除”的思路<sup>[7]</sup>, 在野生型耻垢分枝杆菌中利用电击转化 (电转化杯规格: Bio-Rad 2 mm, 电转化参数设置: 电压 2.5 kV, 电阻 200 Ω) 转入带有目的基因上、下游各约 2 kb 的同源臂 (upstream, downstream) 的敲除质粒, 待敲除基因被一段两端带有一对 φC31 *att* 位点的卡那霉素抗性标记基因替代 (图 2 步骤①)。为了排除该抗性标记基因在后续实验中的影响, 在所获得的敲除株中转入带有耻垢分枝杆菌温敏型复制子 *oriM<sup>s</sup>* 和 φC31 整合酶基因 (φC31 *int*) 的退出质粒 pXL12, 并于

表3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
bS22-Up-F	<i>ATTAAGCATTGGTAACTCGAGCTGTGTGAGCGGCAACTTCCTGTG</i>	45
bS22-Up-R	AGACTCCGCACTCTCCGCTA	20
bS22-Down-F	<i>CGTACAATTGGATGCGGTTGCTTTCTGCCGCGGCCGCTAG</i>	40
bS22-Down-R	CATCGGATAGATCTCCTCAG	20
bL37-Up-F	<i>ATTAAGCATTGGTAACTCGAGCTGTGCACTTTCACGTCCGGATGG</i>	45
bL37-Up-R	CCTGGTTGTCTTCTAGCCCC	20
bL37-Down-F	<i>CGTACAATTGGATGCGGTTGAATGATCCCTCCAGACGTTT</i>	40
bL37-Down-R	TTCCCGGTGGGAAACAGTGG	20
bS22-KZT-F	<i>TAGCGGAGACTGCGGAGTCTCCTGGTGTCCCTGTTGATAAC</i>	40
bL37-KZT-F	<i>GGGGCTAGAAGACAACCAGGCTGGTGTCCCTGTTGATAAC</i>	40
KZT-R	CAACCGCATCCAATTGTACG	20
bS22-SA-F	<i>CGGCTCTGAGGAGATCTATCCGATGGCTGGAGTACGACCCATCAC</i>	45
bL37-SA-F	<i>CCGGCCCACTGTTTCCACCGGGAAGCTGGAGTACGACCCATCAC</i>	45
SA-R	ACAGCTCGAGTTACCAATGC	20
bS22C-Up-R	CGGCAGAAAGTTACTTACCG	20
bS22C-Down-F	<i>CTTACCCAGTTGGGCGGGATCTTTCTGCCGCGGCCGCTAG</i>	40
bL37C-Down-F	<i>CTTACCCAGTTGGGCGGGATGAAGACAACCAGGTCAGGCG</i>	40
bS22C-AZT-F	<i>CGGTAAGTAACTTTCTGCCGACGCAACCGAACTCATATGG</i>	40
bL37C-AZT-F	<i>GGGGCTAGAAGACAACCAGGACGCAACCGAACTCATATGG</i>	40
AZT-R	ATCCCGCCAACTGGGTAAG	20
OriM-F	<i>CAAAGGAATAGGGTGCTGGGAAACAAACCACCGCTGGTAG</i>	40
OriM-R	TCGGAATCGCAGACCGATAC	20
Hyr-TG1-F	<i>GTATCGGTCTGCGATTCCGACTAGCTTGCAGTGGGCTTAC</i>	40
Hyr-TG1-R	CCCAGCACCTATTCTTTG	20
22-U-F	CCGGTGACGGGATCTATGAC	20
22-D-R	AGCGTGTGCTGGATGGTCTC	20
37-U-F	GCTCGTGCGGAAAGCTCATC	20
37-D-R	CGGCCAGGTAGTGACATTG	20
U1-R	CCAGTTACCTCGTTCAAAG	20
D1-F	GCTTGCCGAATATCATGGTG	20
U2-R	CGTACGTGTCCATGCGAAAC	20
D2-F	GAGGCGGGATGCGAAGAATG	20
22-G-F	TGCTGGAGACCTCGTACTTC	20
22-G-R	GCTTGCGATGCTTCTTCTTC	20
37-G-F	CACTGCGGATGACCCGTAAC	20
37-G-R	TGACCGCAAGCACTCGAAGG	20
22-X-F	GGGTTGCGATGACGTCTATG	20
22-X-R	CCAGAACGTCCATCAGAATC	20
37-X-F	AAGCAGCACCTCGAAGAATG	20
37-X-R	TGATCGCCCTCATGAACCAC	20
qPCR-sigA-F	CCACCGGGAATTCGTAAGAC	20
qPCR-sigA-R	CTTACCGGCTCTTCGGTTG	20
qPCR-22-F	TCATCAAGAAGCGGCGTAAG	20
qPCR-22-R	GAGTTCGCCGAAGCAGCTTG	20
qPCR-37-F	TCAGGCGTTGGGTCGCTTGC	20
qPCR-37-R	CCAAGCGTGGCCGCAAGAAG	20

The homology arms of the plasmid construction primers are indicated in italics.

30 °C 培养。 $\phi$ C31 整合酶能够识别抗性标记基因两端的  $\phi$ C31 *att* 位点, 将其从基因组上消除 (图 2 步骤②), 之后提高培养温度至 42 °C, 该退出质粒能够自行从菌株中丢失, 最终获得的敲除株不带任何抗生素抗性基因。

本研究后续分别在两株敲除株中所敲除基因进行回补, 所用方法和原理与敲除株构建时相同, 分别在两敲除株中电转带有目的基因上、下游各约 2 kb 的同源臂的回补质粒。卡那霉素抗性基因片段被待回补基因和一段两端带有一对 TG1 *att* 位点的阿泊拉霉素抗性基因替代 (图 2 步骤③)。之后在回补株中转入带有耻垢分枝杆菌温敏型复制子 *oriM<sup>s</sup>* 和 TG1 整合酶基因 (TG1 *int*) 的退出质粒 pCQ1, 并于 30 °C 培养。TG1 整合酶能够识别抗性标记基因两端

的 TG1 *att* 位点, 将其从基因组上消除 (图 2 步骤④), 之后提高培养温度至 42 °C 使该退出质粒自行从菌株中丢失, 最终获得的回补株也不带任何抗生素抗性基因。

### 1.2.3 总 RNA 提取

耻垢分枝杆菌在 37 °C 摇床中培养至  $OD_{600}$  约 0.8, 取 20 mL 菌液, 4 000 r/min 室温离心 5 min 收集菌体, 用 1 mL 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 (购自北京天根生化科技有限公司) 中的裂解液 RL (已加入 10  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇), 重悬菌体, 并将重悬液转移至装有 0.5 mL 玻璃砂的 2 mL 冻存管 (无菌) 中。将冻存管置于 -80 °C 冰箱冷却 60 s, 随后取出置于高通量组织研磨器中, 以 50 Hz 工作条件处理 60 s 后再置于 -80 °C 冷却 60 s, 如此重复 6-7 次以彻底研磨菌

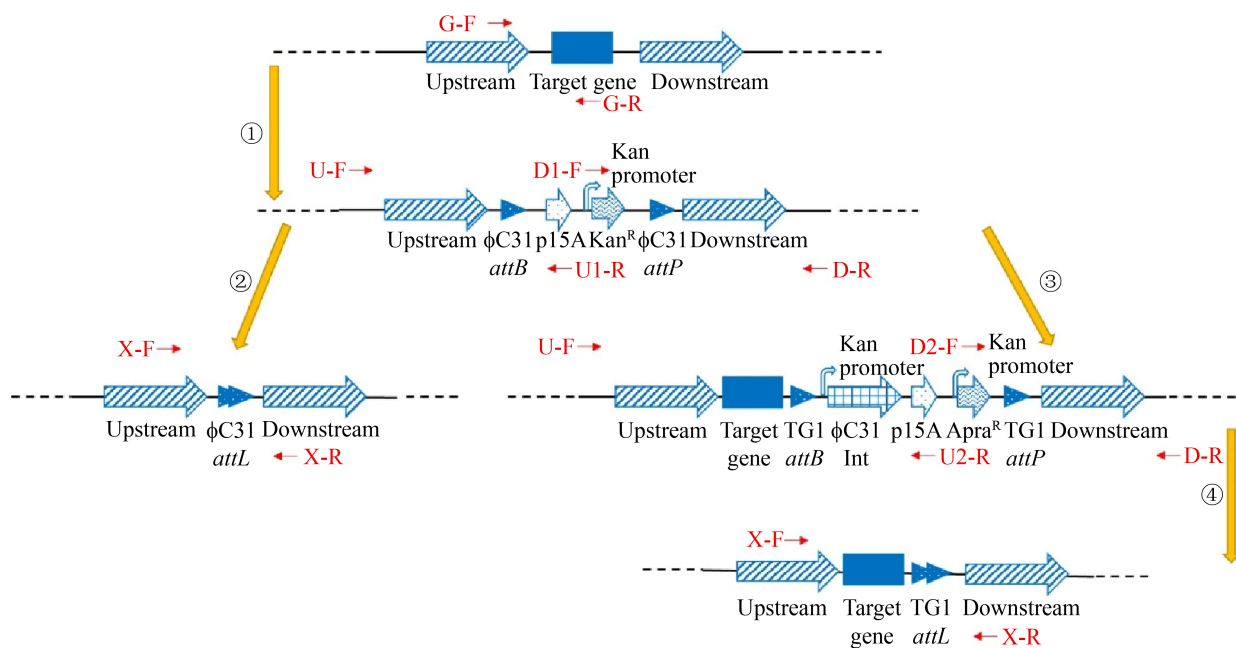


图 2 目的菌株构建流程

Figure 2 Strain construction flow chart. Step ①: using homologous recombination, the target genes on the genome of wild-type *M. smegmatis* were knocked out respectively to obtain the knockout mutants with the kanamycin resistance gene. Step ②: the exit plasmid pXL12 was transferred into the knockout mutants to eliminate the resistance gene. Step ③: using homologous recombination, the knocked-out genes were complemented in the two knockout mutants respectively to obtain the complemented strains with the apramycin resistance gene. Step ④: the exit plasmid pCQ1 was transferred into the complemented strains to eliminate the resistance gene. The red arrows in the figure indicate the validation primers designed in this study.

体。后续的 RNA 提取步骤按照试剂盒说明书中操作执行,并用 DNA 酶完全去除基因组 DNA,同时在实验过程中注意防止 RNA 酶污染。

#### 1.2.4 RNA 反转录与 qPCR

反转录步骤按照试剂盒 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书进行操作,所提取的 RNA 使用 NanoDrop 2000 测定浓度,并计算控制反转录时每管总的 RNA 量约 400 ng。随后参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书配制反应体系(每组 3 个平行),并以 ddH<sub>2</sub>O 为模版作为阴性对照。设置 qPCR 反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,循环反应 40 次。本研究以 *sigA* 基因 (*MSMEG\_2758*) 作为内参基因,相对定量方法为  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ [8]。

#### 1.2.5 生长曲线

在 7H10+OADC 固体培养基上挑取耻垢分枝杆菌单克隆接入加有 3 mL 7H9+OADC 液体培养基的试管中,37 °C、110 r/min 培养 1–2 d,作为种子液。随后,用新鲜的 7H9+OADC 液体培养基将各组种子液稀释到  $OD_{600}$  为 1,将稀释后的种子液以 1%接种至 100 mL 7H9+OADC 液体培养基的锥形瓶中,每组设置 3 个生物学重复,置于 37 °C、110 r/min 摇床中培养。待接种 12 h 后,取样测每瓶  $OD_{600}$  值,随后每 3 h 测一次  $OD_{600}$ ,待达到对数生长期后期时,每间隔 6 h 测一次,达到稳定期后,每 12 h 测一次。使用软件 GraphPad Prism 8.0.2 中的 logistic growth 模型对数据进行拟合,以生长时间为横坐标,每组  $OD_{600}$  的平均值为纵坐标,绘制生长曲线。

#### 1.2.6 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定

在 7H10+OADC 固体培养基上挑取耻垢分

枝杆菌单克隆并接入 7H9+OADC 液体培养基试管活化,测菌液  $OD_{600}$  并用新鲜 7H9+OADC 培养基调整至  $OD_{600}$  为 1 左右,并进一步将其稀释 100 倍。取无菌的 96 孔微滴度板,在其板盖上标注抗生素名称和浓度。在第 1 列加入 100  $\mu$ L 的新鲜无抗生素 7H9+OADC 培养基,作为无菌对照孔。第 2 列加入 50  $\mu$ L 的新鲜无抗生素培养基作为生长对照孔,后续每一列依次加入 50  $\mu$ L 抗生素浓度梯度为 128.00–0.25  $\mu$ g/mL 的培养基。在生长对照孔和加有各梯度浓度抗生素培养基的孔中加入 50  $\mu$ L 上述稀释后的菌悬液,小心混匀,最终各抗生素的终浓度为 64.000–0.125  $\mu$ g/mL。将 96 孔板置于 37 °C 培养箱中孵育 2 d。后续移去板盖,用酶标仪测定  $OD_{600}$ ,MIC 即为与无菌对照孔  $OD_{600}$  相近的最低抗生素浓度。

#### 1.2.7 稀释点板

在 7H10+OADC 固体培养基上挑取耻垢分枝杆菌单克隆并接入试管 7H9+OADC 液体培养基活化,测菌液  $OD_{600}$  并用无菌 PBS 将菌液稀释至  $OD_{600}$  为 0.1,并在此基础上进一步将其梯度稀释至  $10^{-1}$ – $10^{-4}$ 。取  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  稀释菌液各 5  $\mu$ L,分别在无抗生素和添加不同抗生素种类及浓度的平板上依次点板,待滴加的菌液在超净台中自然吹干之后,移至 37 °C 培养箱中倒置培养至有可见形态。后续移去板盖,将培养皿倒置于凝胶成像仪中拍照记录生长形态。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的菌株构建验证结果

在野生型耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 中分别转入 *bS22*、*bL37* 基因敲除质粒 pCQ9、pCQ10,在添加 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和 10%蔗糖的平板上筛选双交换重组菌。在敲除株  $\Delta bS22$ -Kan<sup>R</sup>、 $\Delta bL37$ -Kan<sup>R</sup> 中分别转入 *bS22*、*bL37* 基因回补质粒 pCQ11、pCQ12,在添加 50  $\mu$ g/mL 阿泊拉



霉素和 10%蔗糖的平板上筛选双交换重组菌。挑取平板上的阳性克隆进行 PCR 验证,验证引物设计示意图 2,引物序列见表 3。分别跨待验证敲除株的同源臂上下游设计引物 U-F/U1-R, D1-F/D-R 验证同源臂的交换,引物 G-F/G-R 验证基因是否敲除;分别跨待验证回补株的同源臂上下游设计引物 U-F/U2-R, D2-F/D-R 验证同源臂的交换。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 3A-D 所示。图 3A 中,对比野生型菌株,1、4 号菌株的基因 *bS22* 成功敲除;图 3B 中,对比野生型菌株,1-3 号菌株的基因 *bL37* 成功敲除。图 3C 中,对比菌株  $\Delta bS22$ -Kan<sup>R</sup>, 1-6 号菌株的基因 *bS22* 成功回补。图 3D 中,对比菌株  $\Delta bL37$ -Kan<sup>R</sup>, 2-4 号菌株的基因 *bL37* 成功回补。

将退出质粒 pXL12 分别转入敲除株  $\Delta bS22$ -Kan<sup>R</sup>、 $\Delta bL37$ -Kan<sup>R</sup>, 在添加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿泊拉霉素的平板上筛选阳性克隆  $\Delta bS22$ -Apra<sup>R</sup>、 $\Delta bL37$ -Apra<sup>R</sup>, 将退出质粒 pCQ1 分别转入回补株 C- $\Delta bS22$ -Apra<sup>R</sup>、C- $\Delta bL37$ -Apra<sup>R</sup>, 在添加 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的平板上筛选阳性克隆 C- $\Delta bS22$ -Hyr<sup>R</sup>、C- $\Delta bL37$ -Hyr<sup>R</sup>。对平板上的阳性克隆进行 PCR 验证,引物 X-F/X-R 用于验证抗性标记基因的消除,引物设计示意图 2,引物序列见表 3。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 3 E-H 左侧胶图,抗性基因消除后 PCR 扩增的片段小于抗性基因消除前扩增的片段。

选取经 PCR 验证抗性基因消除成功的克隆,转接试管并升高培养温度促使质粒在菌株中自行丢失。然后将菌液在平板划线,并挑取单克隆分别接试管液体培养后,同时在添加相应抗生素平板和无抗生素平板上点板,菌株在两种平板上的生长情况如图 3 E-H 右侧所示,在无抗生素平板上能够生长且在抗生素平板上无法生长的克隆证明成功将退出质粒丢失。最终分别获得不带任何抗性基因的敲除株

$\Delta bS22$ 、 $\Delta bL37$  和回补株 C- $\Delta bS22$ 、C- $\Delta bL37$ 。

## 2.2 转录水平验证菌株基因的敲除或回补

分别提取野生型耻垢分枝杆菌 WT, 敲除株  $\Delta bS22$ 、 $\Delta bL37$ , 回补株 C- $\Delta bS22$ 、C- $\Delta bL37$  的 RNA, 反转录并进行实时荧光定量 PCR, 结果如图 4 所示。

分别以野生型耻垢分枝杆菌中 *bS22*、*bL37* 基因的表达量为对照, 从转录水平验证菌株  $\Delta bS22$ 、 $\Delta bL37$  中分别对这两个基因成功实现敲除, 以及菌株 C- $\Delta bS22$ 、C- $\Delta bL37$  中分别对这两个基因成功实现回补。

## 2.3 敲除株的生长速度与野生型一致

选取所构建的敲除株  $\Delta bS22$ 、 $\Delta bL37$ , 以野生型耻垢分枝杆菌 WT 为对照, 测量菌株在不同时间点的  $OD_{600}$ , 并绘制生长曲线 (图 5)。

通过观察生长曲线, 发现这两个核糖体蛋白基因的敲除对于菌株的生长速度均没有明显影响。

## 2.4 敲除株对抗生素的敏感性增加

为了探究敲除这两个核糖体蛋白基因是否分别会影响菌株对作用靶点在其附近的抗生素的敏感性, 本研究以野生型耻垢分枝杆菌为对照, 选择了几种相关的抗生素探究。为了选取合适浓度的抗生素进行点板实验, 首先检测了这些抗生素对野生型耻垢分枝杆菌的最低抑菌浓度 MIC, 结果如表 4 所示。

参考 MIC 结果, 在 7H10+OADC 固体培养基平板上分别添加不同种类合适浓度的抗生素, 将  $OD_{600}$  控制在相同浓度的各组菌液进行梯度稀释点板, 并以无抗生素添加的固体平板作为对照, 结果如图 6 所示。

观察实验结果可知, 当未添加抗生素时, 野生型菌株、敲除株和回补株在平板上的生长没有明显差异。在添加利奈唑胺的平板上, 与野生型菌株 WT 相比, 菌株  $\Delta bL37$  的生长受到

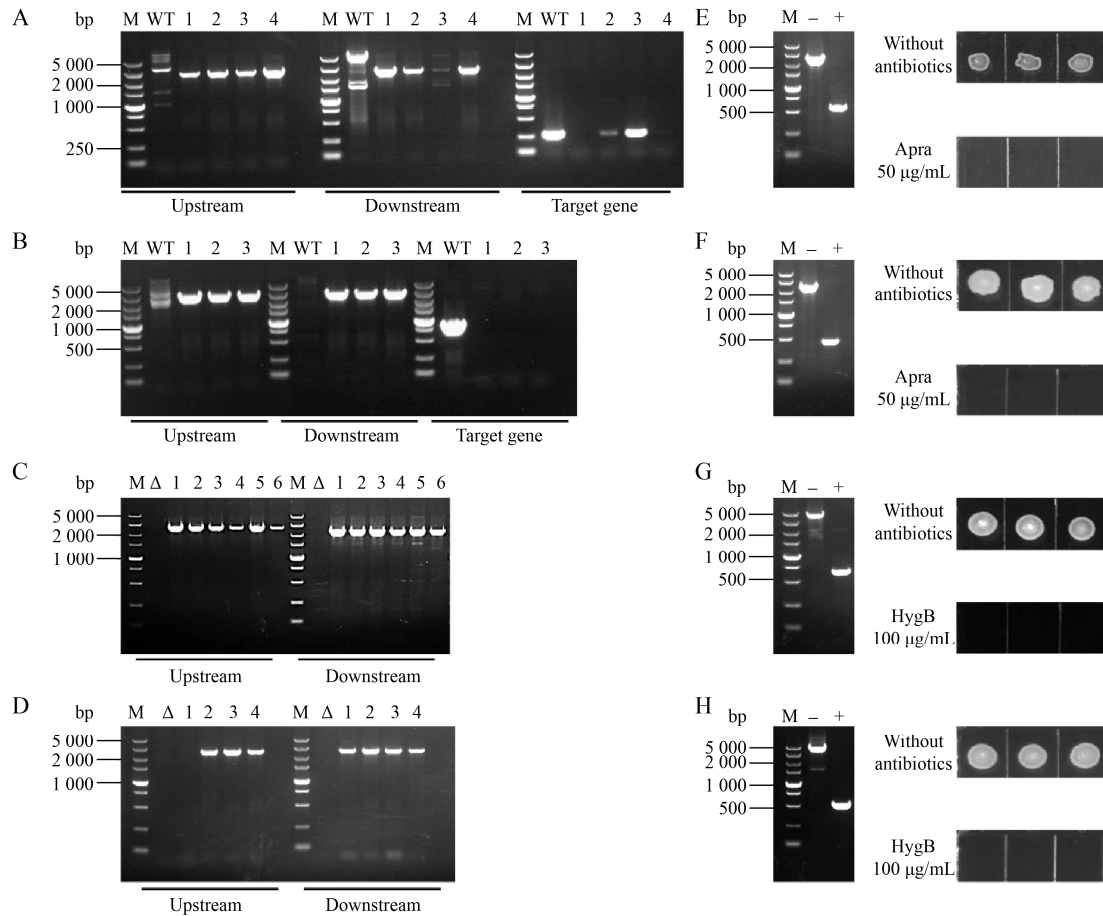


图3 目的菌株构建的验证

Figure 3 Validation of the targeted strain construction. (A–D) PCR validation of gene knockout or complement strains. Lane M: DL 5 000 DNA ladder; lane WT: PCR product of wild-type strain. (A) Gene *bS22* knockout verification. Lane 1–4: PCR product of strains to be verified. The PCR fragment sizes of the upstream homologous arm, downstream homologous arm and target gene are 2 675 bp, 2 525 bp and 274 bp, respectively. (B) Gene *bL37* knockout verification. Lane 1–3: PCR product of strains to be verified. The fragment sizes of the upstream homologous arm, downstream homologous arm and target gene are 2 741 bp, 2 811 bp and 890 bp, respectively. (C) Gene *bS22* complement verification. Lane  $\Delta$ : PCR product of strain  $\Delta bS22$ -Kan<sup>R</sup>; lane 1–6: PCR product of strains to be verified. The fragment sizes of the upstream homologous arm and downstream homologous arm are 2 596 bp and 2 319 bp, respectively. (D) Gene *bL37* complement verification. Lane  $\Delta$ : PCR product of strain  $\Delta bL37$ -Kan<sup>R</sup>; lane 1–4: PCR product of strains to be verified. The fragment sizes of the upstream homologous arm and downstream homologous arm are 2 550 bp and 2 693 bp, respectively. (E–H) Left chart shows the validation of the resistance gene elimination from the genome, lane M: DL 5 000 DNA ladder; lane -: PCR product of strains that have not eliminated the resistance gene; lane +: PCR product of strains that have eliminated the resistance gene. Right chart shows the verification of the exit plasmid elimination, the strains were cultured on solid medium with or without antibiotics at the same time. (E) Verification of the elimination of *bS22* knockout resistance gene. The PCR fragment sizes before and after resistance gene elimination are 2 511 bp and 567 bp. (F) Resistant gene elimination verification of *bL37* knockout. The PCR fragment sizes before and after resistance gene elimination are 2 404 bp and 460 bp. (G) Resistant gene elimination verification of *bS22* complement. The PCR fragment sizes before and after resistance gene elimination are 4 510 bp and 650 bp. (H) Resistant gene elimination verification of *bL37* complement. The PCR fragment sizes before and after resistance gene elimination are 4 379 bp and 519 bp.

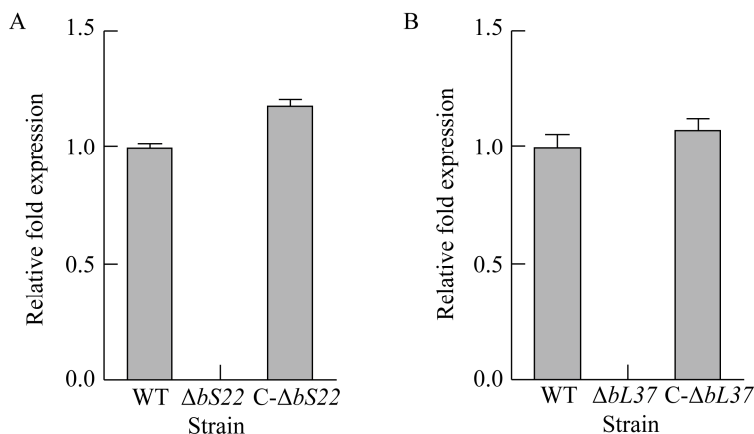


图 4 转录水平验证菌株基因的敲除或回补

Figure 4 Verification of gene knockout or complementation at the transcriptional level. WT: wild-type strain. (A)  $\Delta bS22$ : gene *bS22* knockout strain; C- $\Delta bS22$ : gene *bS22* complement strain. (B)  $\Delta bL37$ : gene *bL37* knockout strain; C- $\Delta bL37$ : gene *bL37* complement strain.

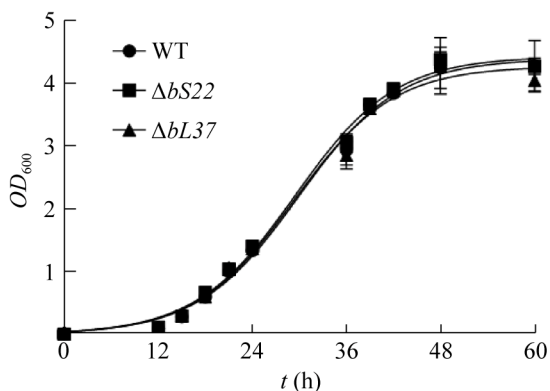


图 5 野生型与敲除株的生长曲线

Figure 5 Growth curves of wild-type and knockout strains. WT: wild-type strain.  $\Delta bS22$ : gene *bS22* knockout strain;  $\Delta bL37$ : gene *bL37* knockout strain.

表 4 耻垢分枝杆菌 MIC 的测定

Table 4 Determination of MIC of *Mycobacterium smegmatis*

Antibiotic names	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
Linezolid	1–2
Capreomycin	4–8
Streptomycin	0.5–1.0
Kanamycin	0.5–1.0
Amikacin	0.5–1.0
Hygromycin B	16–32
Paromomycin	1–2
Gentamicin	1–2

更明显的抑制，回补之后的菌株 C- $\Delta bL37$  恢复野生型的状态 (图 6A)。相比于野生型菌株 WT，菌株  $\Delta bS22$  在添加卷曲霉素、卡那霉素、阿米卡星、巴龙霉素、潮霉素 B、庆大霉素和链霉素的平板上的生长受到更明显的抑制，回补之后的菌株 C- $\Delta bS22$  恢复野生型的状态 (图 6B)。抗生素耐药实验结果表明，敲除株对于作用靶点在所缺失核糖体蛋白附近的抗生素的敏感性增加。

### 3 讨论

核糖体蛋白对于核糖体的组装、构象的稳定以及翻译功能的行使都起着至关重要的作用。本研究在野生型耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 中分别敲除了在分枝杆菌核糖体上新鉴定出的两个蛋白 *bS22*、*bL37* 的基因，证明这两个蛋白对于菌株的生存来说都是非必需的。此外，通过测定生长曲线，发现这两个基因的敲除对于菌株的生长速率没有明显影响。

通过抗生素耐药实验，发现菌株  $\Delta bS22$  对卷曲霉素、卡那霉素、阿米卡星、巴龙霉素、潮霉素 B、庆大霉素和链霉素的敏感性增加。菌株  $\Delta bL37$  对利奈唑胺的敏感性增加。

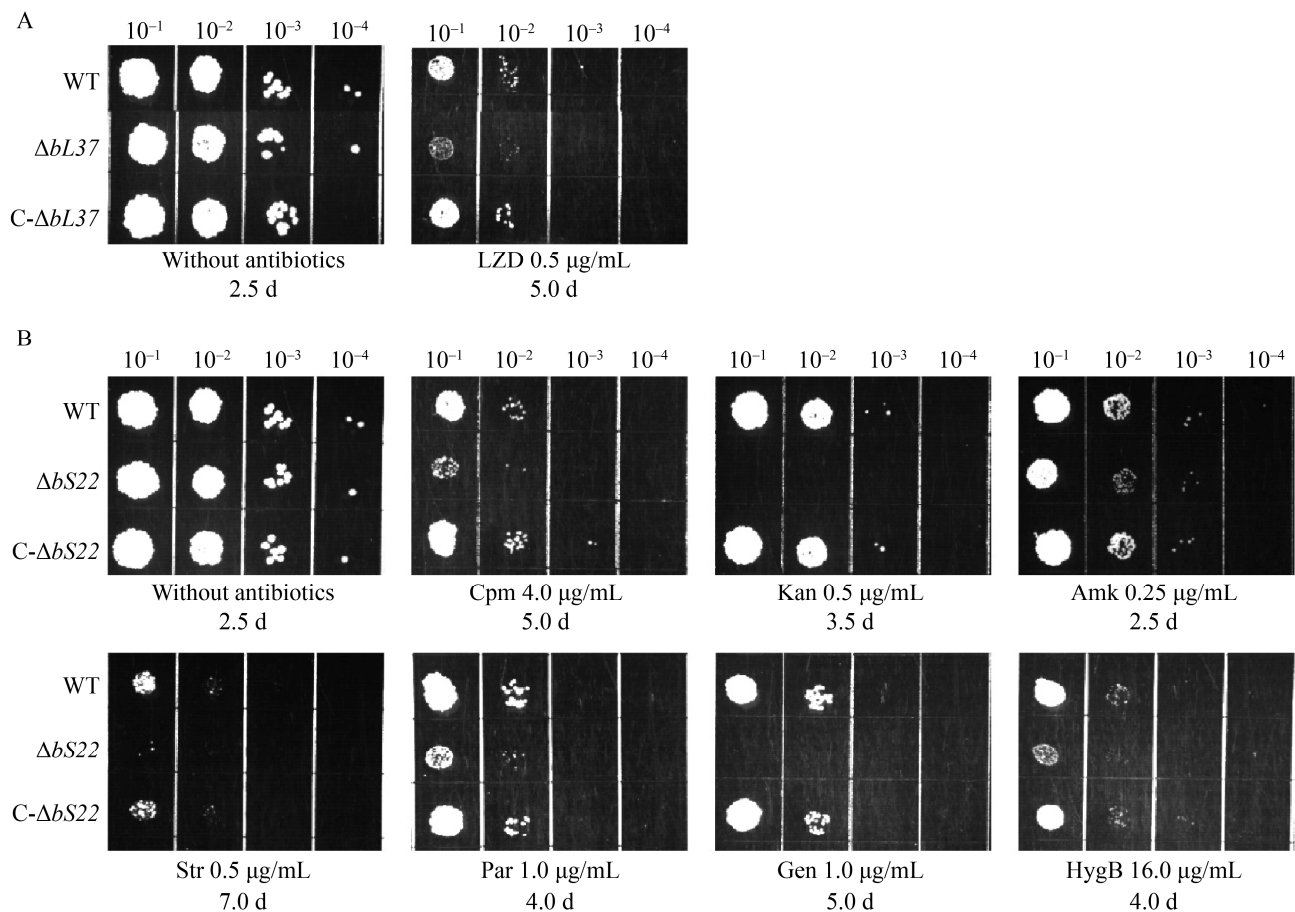


图 6 敲除株对部分抗生素敏感性增加

Figure 6 The knockout strains showed increased sensitivity to some antibiotics. The dilution factor of the bacterial solution is marked on the top of the pictures, the names of the strains are marked on the left of the pictures. The names and the concentration of the antibiotics, and culture time are marked on the bottom of the pictures. (A) Results of  $\Delta bL37$  antibiotic resistance test. (B) Results of  $\Delta bS22$  antibiotic resistance test.

核糖体解码中心由 30S 亚基头部与肩部区域以及 16S rRNA 螺旋 h44 的顶部组成, 其保守核苷酸 A1492 (h44)、A1493 (h44) 和 G530 (h18) 以及核糖体蛋白 S12 (Pro45) 在解码过程中起关键作用, 由 h44 组成的 30S 亚基区域及其邻近区域是多种抗生素的靶点<sup>[9]</sup>。

氨基糖苷类抗生素链霉素目前属于二线抗结核药物, 它靶向 16S rRNA 的螺旋 h44、h27、h18 以及核糖体蛋白 S12, 诱导核苷酸 A1492 和 A1493 构象的变化, 干扰核糖体解码中心密码子和反密码子之间碱基的正确配对, 进而

干扰核糖体的翻译过程<sup>[10-11]</sup>。类似于链霉素, 巴龙霉素和庆大霉素也结合在 h44 的顶部, 并诱导 A1492 和 A1493 的构象重排, 从而刺激 A 位点上非同源 tRNA 的结合来增加错误编码<sup>[11]</sup>。潮霉素 B 具有独特的螺旋缩醛结构, 结合 16S rRNA 的 h44, 它不会刺激错误编码, 反而增加 tRNA 和 A 位点的亲和力, 抑制 tRNA 易位<sup>[12]</sup>。二线抗结核药物卷曲霉素是结核放线菌素类的环肽药物, 其结合主要依赖于 16S rRNA h44 和 23S rRNA H69 中碱基的甲基化, 甲基转移酶 TlyA 的失活能够使菌株产生卷曲霉素耐

药<sup>[13]</sup>。氨基糖苷类抗生素卡那霉素也能够结合 16S rRNA 的 h44, 降低 mRNA 翻译的保真度, 其环 3-氨基葡萄糖在核糖体上的结合位点与潮霉素 B 重合<sup>[14]</sup>, 阿米卡星是卡那霉素的衍生物, 目前它们也都属于二线抗结核药物。

核糖体肽酰转移酶中心的 A 位裂缝是由 23S rRNA 核苷酸 U2504、A2451 和 C2452 碱基形成的楔形缺口, 大多数结合 50S 亚基的抗生素能够通过进入的 aa-tRNA 的氨基酸侧链竞争结合核糖体的 A 位裂缝而抑制蛋白质合成<sup>[9]</sup>。

利奈唑胺是恶唑烷酮家族的成员, 对所有主要的致病性革兰氏阳性细菌具有活性, 它与 23S rRNA 结构域 V 的肽基转移酶环形成的 rRNA 口袋结合, 并阻止肽基的转移<sup>[2]</sup>。利奈唑胺的氟苯基部分堆叠在碱基 C2452 上, 其恶唑烷酮环与碱基 U2504 相互作用, 完美地契合肽酰转移酶中心的 A 位裂缝。此外, 利奈唑胺的其余部分与 aa-tRNA 的 CCA 末端碰撞, 并可能干扰其调节<sup>[9]</sup>。

本研究所敲除的这两个核糖体蛋白的分子量都很小, 即使对它们进行敲除, 核糖体也能够维持正常装配和行使翻译功能, 不会影响菌株的生长速度。即便如此, 它们带有较强的电荷, 或许能够对其附近空间结构的稳定性产生影响, 导致缺失之后, 造成菌株对于一系列作用靶点在其附近的抗生素的敏感性发生了变化。

本研究通过实验暗示了核糖体蛋白 bS22、bL37 可能作为药物设计的潜在靶点, 如它们的抑制剂或许能够与抗生素联用以提高抗生素的杀菌作用, 但具体的影响机制还有待进一步探究。

## REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.  
[2] Hentschel J, Burnside C, Mignot I, et al. The complete

structure of the *Mycobacterium smegmatis* 70S ribosome. Cell Rep, 2017, 20(1): 149-160.

- [3] Li Z, Ge X, Zhang Y, et al. Cryo-EM structure of *Mycobacterium smegmatis* ribosome reveals two unidentified ribosomal proteins close to the functional centers. Protein Cell, 2018, 9(4): 384-388.  
[4] Yang K, Chang JY, Cui Z, et al. Structural insights into species-specific features of the ribosome from the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. Nucleic Acids Res, 2017, 45(18): 10884-10894.  
[5] Kushwaha AK, Bhushan S. Unique structural features of the *Mycobacterium* ribosome. Prog Biophys Mol Biol, 2020, 152: 15-24.  
[6] Hmelo LR, Borlee BR, Almlblad H, et al. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. Nat Protoc, 2015, 10(11): 1820-1841.  
[7] Lei X, Fan Q, Huang T, et al. Efficient circular gene knockout system for *Burkholderiales* strain DSM 7029 and *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(7): 697-706.  
[8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods, 2001, 25(4): 402-408.  
[9] Lin J, Zhou D, Steitz TA, et al. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. Annu Rev Biochem, 2018, 87: 451-478.  
[10] Demirci H, Murphy F, Murphy E, et al. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. Nat Commun, 2013, 4: 1355.  
[11] Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. Nature, 2000, 407(6802): 340-348.  
[12] Borovinskaya MA, Shoji S, Fredrick K, et al. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. RNA, 2008, 14(8): 1590-1599.  
[13] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(2): 571-577.  
[14] Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, et al. A mutation in the 16S rRNA decoding region attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2016, 84(8): 2264-2273.

(本文责编 郝丽芳)