

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):459-464; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

结核分枝杆菌 H37 有毒株与无毒株的代谢相关基因 *pabB* 和 *lpdA* 启动子活性分析

孙青^{1,3}, 吕亮东², 姚玉峰^{3*}, 赵英伟^{1*}

(¹ 苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

(² 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

(³ 上海交通大学医学院病原生物学教研室, 上海 200025)

摘要:【目的】通过分析结核分枝杆菌无毒株 H37Ra 的全基因组序列, 并与 H37Rv 基因组序列比较, 发现 *pabB* 和 *lpdA* 预测的启动子区发生了突变。我们利用报告基因, 确认启动子突变与其基因转录水平的关系, 探索结核分枝杆菌 H37Ra 毒力丧失的内在原因。【方法】利用生物信息学方法预测这两对基因的启动子区, 采用 PCR 技术克隆这两对基因的启动子, 与分枝杆菌启动子探针载体 pMC210 相连, DNA 测序证实连接片段正确后, 用电穿孔法将重组质粒转化至耻垢分枝杆菌 mc²155。利用 Quantitative Real-Time RT-PCR 检测报告基因 *lacZ* 转录水平的差异, 进一步验证这两对基因启动子的突变对相应基因转录水平的影响。【结果】Quantitative Real Time PCR 检测结果显示 H37Ra *pabB* 启动子活性是 H37Rv *pabB* 启动子活性的 6 倍 ($p < 0.05$), 而 H37Rv *lpdA* 启动子的活性是 H37Ra *lpdA* 启动子的 2 倍 ($p < 0.05$)。【结论】*pabB*, *lpdA* 的启动子在 H37Ra 中的突变对其启动子的活性产生了影响, 其中 *lpdA* 启动子的突变可能与结核分枝杆菌 H37Ra 的毒力丧失有关。

关键词: 结核分枝杆菌; H37Rv; H37Ra; pMC210; *pabB*; *lpdA*

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0459-06

结核病是目前单一致病菌中致死率最高的传染病之一。据世界卫生组织统计, 全世界现有结核病人 2000 万, 每年新发病例约 800 万例, 每年死亡 200 万人, 约 1/3 人口有潜伏性结核分枝杆菌感染^[1-2]。我国是全球结核病高负担国家之一, 结核病人数量位居世界第二, 仅次于印度。我国大约有活动性结核病人 600 万, 每年有 25 万人死于结核病^[3]。由于人口剧增、移民增加、旅游业发展、耐药性的产生、人类免疫缺陷病毒感染流行、吸毒、酗酒与贫困等原因, 结核病的发病率呈不断升高趋势。因此, 对结核病的致病菌——结核分枝杆菌的致病机制及免疫机制的深入研究显得极为重要和迫切, 但至今人们对其

致病的分子机理仍然知之甚少。随着分子生物学的发展, 结核分枝杆菌 H37Rv 和其同源无毒株 H37Ra 的全基因组序列的测定均已完成, 这为对结核分枝杆菌基因的功能及其致病机理的深入研究提供了广阔的前景^[4-5]。

H37Ra 无毒株由 H37 有毒株在体外传代过程中突变而来^[6], H37Ra 无毒株与 H37Rv 有毒株相比发生了很大的变化: 菌落形态隆起, 分枝杆菌的索状结构丢失^[7], 不能被中性红染色^[8], 在厌氧条件下或在巨噬细胞内的生存能力降低^[9], 在豚鼠体内的毒力丧失^[10]。通过与 H37Rv 全基因组 (NC_000962) 序列比较发现^[5]: H37Ra 有 53 个插入突

* 通信作者。赵英伟, Tel: +86-512-65880132, Fax: +86-512-65880103, E-mail: zhaoyingwei1993@sina.com; 姚玉峰, Tel: +86-21-63846590-776590, Fax: +86-21-64671226, E-mail: yfyao@sjtu.edu.cn

作者简介: 孙青 (1984-), 女, 硕士研究生, 山东人, 研究方向为分子微生物学。E-mail: sunqing6696432@163.com

收稿日期: 2009-12-15; 修回日期: 2010-01-20

变, 21 个缺失突变, 198 个单碱基突变 (SNVs)。这些突变中少数是发生在已知功能的基因上, 如 *phoP* (Rv0757/MRA_0767); 但多数是发生在未知功能的基因上。启动子存在突变的有 21 个基因, 根据其功能可分为: 膜蛋白基因, PPE 家族蛋白基因, 代谢调节相关的基因等。本文对 *pabB* (Rv1005c/MRA_1014) 和 *lpdA* (Rv3303c/MRA_3344) 这两个具有启动子突变且与结核分枝杆菌代谢密切相关的基因进行了初步研究。

目前研究表明 *pabB* 编码对氨基苯甲酸盐合成酶的组分 I, 参与 *P*-氨基苯甲酯 (pABA) 的生物合成, pABA 是叶酸盐生物合成的前体, 对细菌在宿主细胞内的生存具有重要意义^[11]。*lpdA* 具有编码转氢酶和醌还原酶的活性, 具有从吡啶核苷酸库转移能量至电子传递链的能力, 对在无氧条件下能量的产生非常重要^[12]。*LpdA* 可将宿主细胞释放的活性氧离子转移, 增强结核分枝杆菌在宿主细胞内的生长和定植, 从而增强结核分枝杆菌的致病性^[13]。在对结核分枝杆菌无毒株 H37Ra 全基因组 (NC_009525) 序列分析时, 发现这两个基因在预测的启动子区存在突变。其中 *pabB* 的翻译起始密码上游 66 bp 处有一 T-A 颠换, *lpdA* 启动子的突变在于 *lpdA* 和 Rv3304 (MRA_3345) 基因间区的 58 bp 串联重复序列的拷贝数不同, H37Rv 菌株有 2 个拷贝, 而 H37Ra 菌株有 3 个^[5]。鉴于这两个基因的重要功能, H37Ra 这两个基因启动子的突变可能会对这两个基因本身及其上下游基因的表达产生影响, 我们希望通过研究 *pabB* 和 *lpdA* 启动子突变对其基因表达影响的研究, 加深对结核分枝杆菌 *pabB* 和 *lpdA* 这两个重要基因分子水平的认识, 为解释 H37Ra 菌株毒力丧失提供进一步探索的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株: 分枝杆菌启动子探针载体 pMC210 由上海公共卫生中心范小勇博士惠赠。耻垢分枝杆菌 mc²155 国际标准株来自 Johns Hopkins 大学医学院结核病研究中心的 Petros Karakousis 博士。结核分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra 国际标准株 DNA 由复旦大学生命科学学院提供。克隆用大肠杆菌菌株 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 生化试剂与培养基: *Pfu* DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 *Bam*HI、*Kpn* I、*Xba* I、DNA 分子量标准均购自 MBI 公司。PCR 产

物纯化试剂盒, 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司。质粒提取试剂盒为上海博彩生物公司产品。酵母提取物、胰蛋白胨购自 OXOID 公司。完全 Middlebrook 7H9 培养基购自 BD 公司。RNA 提取纯化和逆转录试剂盒均购自 Ambion 公司。Real time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 生物有限公司。

1.2 分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra *pabB*, *lpdA* 启动子片段的克隆

利用生物信息学软件“Neural Network Promoter Prediction” (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测这两对基因的启动子区, 设计引物: *PabB*, 上游: 5'-TTCCGGTACCGGAAACAGCGGTTCCATGA-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Kpn* I 识别位点), 下游: 5'-TTCCGATCCCGTGCTAAGCTCCCACGCTA-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Bam*H I 识别位点)。*lpdA*, 上游: 5'-TTCCTCTAGA CACCGGTCAAGGTTCTCTC-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Xba* I 识别位点), 下游: 5'-TTCCGGATCCACCGAGGATCACGATGCGGGT-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Bam*H I 识别位点)。分别以 H37Rv 和 H37Ra 的全基因组 DNA 为模板扩增这两对基因预测的启动子。PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 25 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 重组质粒的构建

*Bam*H I/*Kpn* I 分别双酶切 H37Rv 和 H37Ra 的 *pabB* 启动子和载体 pMC210, *Bam*H I/*Xba* I 分别双酶切 H37Rv 和 H37Ra 的 *lpdA* 启动子和载体 pMC210, 电泳回收目的片段和载体, 用 T4 DNA 连接酶连接, 然后转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板, 筛选阳性克隆。重组质粒分别命名为: pMC210-Rv-*pabB*, pMC210-Ra-*pabB*, pMC210-Rv-*lpdA*, pMC210-Ra-*lpdA*。经 PCR 和双酶切鉴定正确后, 送上海英俊生物公司进行进一步测序验证。

1.4 耻垢分枝杆菌的电转化

取培养至对数生长期 (OD_{600} 约 0.5) 的耻垢分枝杆菌 mc²155, 以预冷的 10% 甘油洗涤 3 次, 制备耻垢分枝杆菌感受态细胞。取 100 μ L 感受态细胞加入 0.5 μ g 重组质粒, 以空白质粒 pMC210 作为对照。冰浴 30 min, 转入预冷的 2 mm 电穿孔杯中, 在 2.5 kV、25 μ F、1000 Ω 条件下电穿孔。放电完毕后立即加入 900 μ L 完全 Middlebrook 7H9 培养基, 将穿孔后的菌涂布于含 20 μ g/mL 卡那霉素的 7H11

平板, 37℃ 静置培养 3-4 d, 筛选阳性克隆。

1.5 RNA 提取、纯化、逆转录及验证

H37Rv 和 H37Ra 的 *pabB*, *lpdA* 启动子重组探针载体转入耻垢分枝杆菌后, 培养至对数期 (OD_{600} 约 0.6) 提取 RNA, 具体操作按说明书进行。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定提取 RNA 的完整性。用核酸紫外分析仪测定 RNA 样品的浓度和纯度。采用 RT-PCR 试剂盒进行反转录, 具体操作按照说明书进行。反转录反应: 50℃, 50 min, 85℃, 5 min。用内参基因 *sigA* 的引物, 取 1 μL 逆转录的 cDNA 进行 PCR 验证。

1.6 Quantitative Real Time PCR

目的基因 *lacZ*、内参基因 *sigA* 的引物用 OLIGO 3.0 设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表 1。标准品的制备: *lacZ*, *sigA* 基因片段的 PCR 回收产物, 用紫外分光光度计测定其浓度, 并根据回收片段的分子量及阿伏伽德罗常数换算成拷贝数, 再分别用灭菌的双蒸水 1:10 稀释成 $10^8 \sim 10^0$ 拷贝/μL 系列浓度的模板。Real Time PCR 具体按说明书进行操作。步骤 1: 预变性 95℃ 30 s; 步骤 2: 两步法扩增 95℃ 3 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 步骤 3: 熔解曲线 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s (ABI 7500 Fast 系统)。每个反应管均设置 2 个

平行重复, 每个模板浓度重复试验 4 次。Quantitative Real Time PCR 结果采用双标准曲线法分析。采用 *t* 检验比较分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra *pabB*, *lpdA* 的启动子对下游 *lacZ* 报告基因转录的影响。

表 1 Real Time PCR 引物

Table 1 Real Time PCR Primers

Gene	Primers	Sequences(5'→3')	Gene location	Size/bp
<i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> -F	GTCTGAATTTGACCTGAGC	485	200
	<i>lacZ</i> -R	AATCATCATTAAGCGAGTG	684	
<i>sigA</i>	<i>sigA</i> -F	TCGAGAAGTTCGACTACACC	808	135
	<i>sigA</i> -R	TGATCACCTCGACCATGT	925	

2 结果

2.1 启动子的预测结果

用生物信息学软件“Neural Network Promoter Prediction” (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测结核分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra 的 *pabB*, *lpdA* 的启动子, 如图 1 中 I、II、III 区所示。其中 I、III 区为启动子上下游基因的编码序列, H37Ra *pabB* 的单碱基突变如图 1 中 (*pabB*) II 区所示, *lpdA* 的 58 bp 串联重复序列插入突变如图 1 中 (*lpdA*) 灰色部分所示。

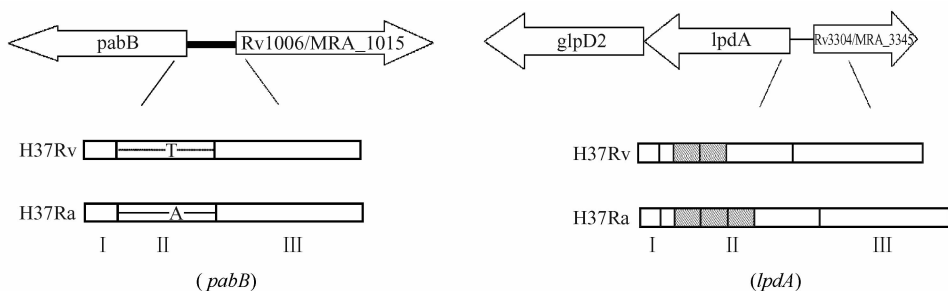


图 1 预测的 *pabB*, *lpdA* 的启动子区域

Fig. 1 The predicted promoter of *pabB* and *lpdA*.

2.2 重组质粒的筛选和鉴定

转化耻垢分枝杆菌后, 带有 H37Rv 和 H37Ra *pabB*, *lpdA* 启动子探针重组质粒的克隆经 PCR 和双酶切验证 (图 2) 均为阳性克隆, 把阳性克隆送上海英俊生物公司测序验证, 结果表明克隆的 H37Rv 和 H37Ra *pabB*, *lpdA* 启动子的序列与 GenBank 上提交的序列完全一致。

2.3 Real time PCR 检测报告基因 *lacZ* 表达水平的差异

pMC210 载体可以通过检测 β-半乳糖苷酶的活性来评价插入启动子的活力^[14], 但由于此方法的

局限性, 我们采用了实时荧光定量 PCR 的方法来检测 *pabB* 和 *lpdA* 的启动子的活性。含有 H37Rv 和 H37Ra 的 *pabB* 和 *lpdA* 的启动子探针重组质粒的耻垢分枝杆菌, 培养至对数期 (OD_{600} 约 0.7) 后提取总 RNA, 核酸紫外分析仪检测 OD_{260}/OD_{280} 值 1.9-2.15, 说明 RNA 未被蛋白质、酚污染。经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 23S、16S 条带清晰可见, 而且比率接近 2:1, 说明其完整性较好, 条带间无明显拖尾现象, 表明 RNA 无降解。RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示内参基因的目的条带 135 bp, 其大小与预期值相符合。

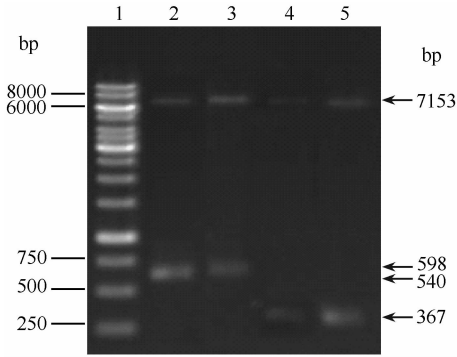


图2 重组质粒双酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Electrophoresis results of recombinant plasmids digested by two enzymes. 1. 1 kb DNA marker; 2. pMC210-Rv-*lpdA* (*Bam*HI/*Xba*I); 3. pMC210-Ra-*lpdA* (*Bam*HI/*Xba*I); 4. pMC210-Rv-*pabB* (*Bam*HI/*Kpn*I); 5. pMC210-Ra-*pabB* (*Bam*HI/*Kpn*I).

sigA 和 *lacZ* 溶解曲线(图3)只有单峰值,排除了非特异性扩增和引物二聚体的影响。我们采用了双标准曲线的方法对 Real time RT-PCR 数据进行了分析,结果如图4所示,结核分枝杆菌有毒株 H37Rv 和无毒株 H37Ra 的 *pabB*, *lpdA* 启动子对 *lacZ* 报告基因表达的影响差异显著 ($p < 0.05$)。其中 H37Ra 的 *pabB* 启动子所调节 *lacZ* 基因的表达水平比 H37Rv *pabB* 启动子大约高 6 倍。H37Ra *lpdA* 启动子调节 *lacZ* 表达水平比 H37Rv *lpdA* 启动子低 2 倍左右。

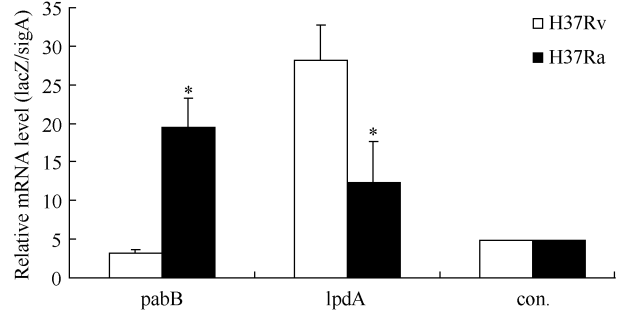


图4 荧光定量 PCR 结果

Fig. 4 The results of Real Time PCR.

3 讨论

通过对结核分枝杆菌无毒株 H37Ra 全基因组 (NC_009525) 序列与 H37Rv 基因组 (NC_000962) 序列的比较分析,发现了 6 个基因 (*MRA_0391/Rv0383c*, *pabB*, *phoH2*, *sigC*, *nrdH*, *lpdA*) 预测的启动子有突变,但我们在构建克隆的过程中,测序发现:以 H37Ra 国际标准株(复旦大学保存)的基因组为模板扩增的基因 *MRA_0391/Rv0383c*, *phoH2* (*MRA_1106/Rv1095*), *sigC* (*MRA_2083/Rv2069*) 预测启动子的序列与提交至 GenBank 的 H37Ra 全基因组 (NC_009525) 中的序列不一致。根据我们的测序结果,这 3 个基因预测启动子的序列在 H37Ra 全基因组 (NC_009525) 与 H37Rv 全基因组 (NC_000962) 中是一致的,比较分析发现并无突变发生。同时也发现以 H37Rv 国际标准株(复旦大学保存)的基因组为模板扩增的基因 *nrdH* (*Rv3053c/MRA_3085*) 预测启动子的序列与提交至 GenBank 的 H37Rv 全基因组 (NC_000962) 中的序列也是不一致的, *nrdH* (*Rv3053c/MRA_3085*) 预测启动子的序列在 H37Ra 全基因组 (NC_009525) 与 H37Rv 全基因组 (NC_000962) 中也是相同的。所以最后得到确认的只有 *pabB* 和 *lpdA* 基因在 H37Ra 菌株中相对于 H37Rv 菌株存在启动子突变。对于上述结果可能的解释

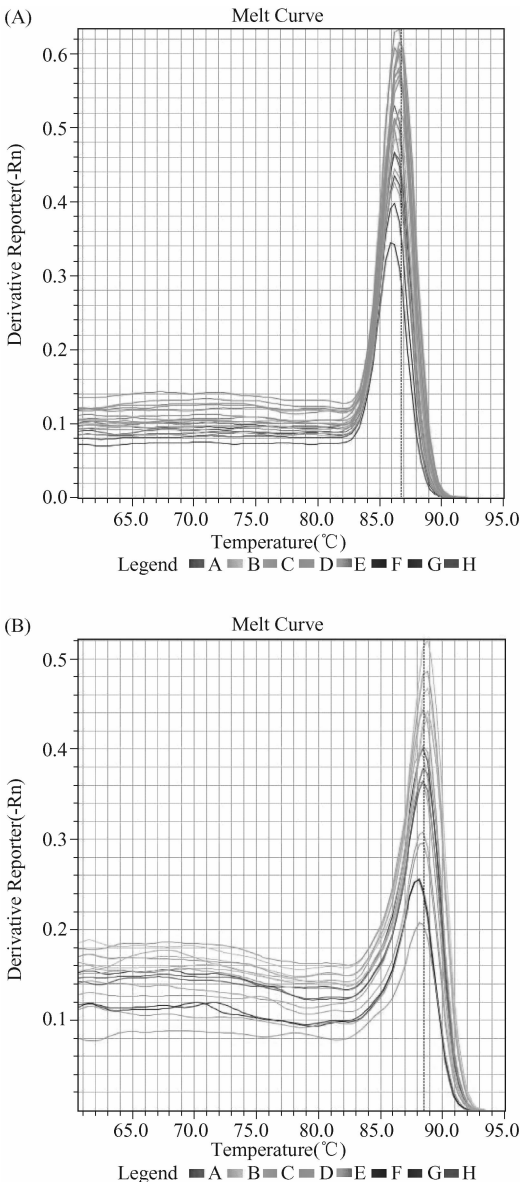


图3 *lacZ* (A) 和 *sigA* (B) 扩增产物的溶解曲线

Fig. 3 Melting curves of amplified products of *lacZ* and *sigA*. A: *lacZ*; B: *sigA*

是:我们构建克隆用的 H37Ra 国际标准株和 H37Rv 国际标准株经过实验室数年的体外传代培养,其基因组可能在长期传代过程中发生了突变,已不同于提交至 GenBank 的 H37Ra 和 H37Rv 两菌株的基因组。也有可能是提交至 GenBank 的 H37Ra 全基因组(NC_009525)和 H37Rv 全基因组(NC_000962)在这四个基因的预测启动子区存在原始的测序错误。

根据郑华军等^[5]发现结核分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra 在培养基中生长时,H37Ra 的 *sigC*、*nrhH*、*phoH2* 相对于 H37Rv 对应基因的表达量均是升高的,但是在巨噬细胞内生长时,H37Ra 的 *sigC*、*nrhH* 和 *phoH2* 相对于 H37Rv 对应基因的表达量却均是降低的。根据我们的测序结果,这几个基因预测的启动子在 H37Ra 菌株中并没有发生突变,那么 H37Rv 和 H37Ra 菌株在不同生长环境下 *sigC*、*nrhH* 和 *phoH2* 表达的差异可能是由其他的原因导致,并非与启动子突变有关。郑华军等^[5]还发现 H37Rv 和 H37Ra 菌株在巨噬细胞内生长时,H37Ra *pabB* 和 *lpdA* 的 mRNA 水平明显低于 H37Rv 的,而且 *lpdA* 的下调水平更加明显,以至于 H37Ra *lpdA* 在感染巨噬细胞 24 小时内几乎检测不到 *lpdA* 的表达,但在培养基中生长时,H37Ra 的 *pabB*、*lpdA* 相对于 H37Rv 对应基因的表达量却均是升高的^[5]。我们利用分枝杆菌启动子探针载体 pMC210^[14],采用荧光定量 PCR 检测发现 H37Ra *pabB* 启动子所调节 *lacZ* 基因的表达水平明显高于 H37Rv *pabB* 启动子,这与郑华军等的 qRT-PCR 实验结果相一致。PabB 参与 *P*-氨基苯甲酯(pABA)的生物合成,而 pABA 是叶酸盐生物合成的前体,H37Ra *pabB* 的高表达,理论上可能会直接导致 H37Ra 菌体内的 pABA 的合成升高,进而使菌体细胞内的叶酸总量升高。有文献^[15]报道只 pABA 的合成增加并不能导致菌体细胞内叶酸总量升高。而是 pABA 的过表达使叶酸在菌体细胞内的含量相对低于胞外叶酸水平,该文章推测其可能的机制为 pABA 的过表达反馈抑制了叶酸合成有关酶的活性。所以 H37Ra *pabB* 表达的升高只是减少了 H37Ra 菌株对培养基中叶酸合成所需前体物质的需求,并没有使 H37Ra 菌体细胞内叶酸总量增加。说明 H37Ra *pabB* 表达的升高可能并没有对 H37Ra 代谢产生很大的影响。

LpdA 和其下游的 *glpD2* 位于同一个操纵子内,*glpD2* (Rv3302c) 编码有氧呼吸所需的甘油-3-磷酸脱氢酶,而 *glpD2* 与无氧呼吸酶编码基因 *lpdA* 位于

同一个操纵子内说明 *GlpD2* 与同源的厌氧呼吸所需的甘油-3-磷酸脱氢酶(*GlpA*)在功能上相似,主要是参与无氧呼吸过程。58 bp 的串联重复序列 DNA 在 *lpdA*-*glpD2* 启动子区的插入突变,可能会影响到 *lpdA* 和 *glpD2* 的表达。根据我们的实验发现 H37Ra *lpdA* 启动子调节 *lacZ* 表达明显低于 H37Rv *lpdA* 启动子,说明 *lpdA* 启动子的突变可能会导致 H37Ra 在宿主组织的低氧环境下的生存能力降低,这点可以在一定程度上解释 H37Ra 毒力失活的潜在原因。我们的研究表明基因 *pabB* 和 *lpdA* 启动子在 H37Ra 菌株中的突变对其启动子活性产生了明显的影响。这可能会在一定程度上对 *pabB*、*lpdA* 两基因本身及其上下游基因的表达产生影响,进而对 H37Ra 的代谢或者毒力的丧失产生影响。这一结果可为后续对 H37Ra 菌株毒力丧失原因的进一步探索奠定基础。

参考文献

- [1] Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. *Lancet*, 2003, 362 (9387): 887-99.
- [2] Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *The New England journal of medicine*, 2003, 349 (12): 1149-56.
- [3] 李凡, 刘晶星主编, 徐志凯副主编. 医学微生物学. 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 2008. 1.
- [4] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, 393 (6685): 537-44.
- [5] Zheng H, Lu L, Wang B, et al. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One*, 2008, 3 (6): e2375.
- [6] Steenken W, Oatway WH, Petroff SA. Biological Studies of the Tubercle Bacillus: Iii. Dissociation and Pathogenicity of the R and S Variants of the Human Tubercle Bacillus (H(37)). *The Journal of experimental medicine*, 1934, 60 (4): 515-40.
- [7] Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce C. Virulence and Morphological Characteristics of Mammalian Tubercle Bacilli. *The Journal of experimental medicine*, 1947, 86 (2): 175-84.
- [8] Dubos RJ, Middlebrook G. Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. *American review of tuberculosis*, 1948, 58 (6): 698.
- [9] Hepler JQ, Clifton CE, Raffel S, et al. Virulence of the tubercle bacillus. I. Effect of oxygen tension upon respiration of virulent and avirulent bacilli. *The Journal of infectious diseases*, 1954, 94 (1): 90-8.

- [10] Alsaadi AI, Smith DW. The fate of virulent and attenuated Mycobacteria in guinea pigs infected by the respiratory route. *The American review of respiratory disease*, 1973, 107 (6):1041-6.
- [11] Cuccui J, Easton A, Chu KK, et al. Development of signature-tagged mutagenesis in Burkholderia pseudomallei to identify genes important in survival and pathogenesis. *Infection and immunity*, 2007, 75 (3): 1186-95.
- [12] Argyrou A, Vetting MW, Blanchard JS. Characterization of a new member of the flavoprotein disulfide reductase family of enzymes from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279 (50):52694-702.
- [13] Akhtar P, Srivastava S, Srivastava A, et al. Rv3303c of Mycobacterium tuberculosis protects tubercle bacilli against oxidative stress in vivo and contributes to virulence in mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2006, 8 (14-15):2855-62.
- [14] Fan XY, Ma H, Guo J, et al. A novel differential expression system for gene modulation in Mycobacteria. *Plasmid*, 2009, 61 (1):39-46.
- [15] Wegkamp A, van Oorschot W, de Vos WM, et al. Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by Lactococcus lactis. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73 (8): 2673-2681.

Comparison of the promoter activity of metabolism-related *pabB* and *lpdA* genes between *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and H37Ra

Qing Sun^{1,3}, Liangdong Lu², Yufeng Yao^{3*}, Yingwei Zhao^{1*}

(¹Institute of Preclinical Medicine and Biology Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

(²School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

(³Laboratory of Bacterial Pathogenesis, Department of Medical Microbiology and Parasitology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: [**Objective**] Comparative genomic study revealed mutations at the promoter regions of *pabB* and *lpdA* in avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra compared to its virulent counterpart strain H37Rv. We used *LacZ* reporter system to test whether those mutations will affect promoter activity and its potential relationship to virulence attenuation of H37Ra. [**Methods**] Promoter regions of *pabB* and *lpdA* were predicted by the “Neural Network Promoter Prediction” method (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Promoter sequences were PCR amplified and cloned into mycobacterial promoterless probe vector pMC210. Resultant recombinant plasmids were transformed into *M. smegmatis* by electroporation. The transcription activity of *lacZ* under the control of cloned promoters were monitored by Quantitative Real-Time RT-PCR. [**Results**] Quantitative Real Time PCR results showed that the promoter activity of H37Ra *pabB* was six times more than that of H37Rv *pabB* ($p < 0.05$), while the promoter activity of the H37Rv *lpdA* was two fold of that of H37Ra *lpdA* ($p < 0.05$). [**Conclusion**] The mutations in *pabB* and *lpdA* promoters affect its expression activity. The T-A mutation in *lpdA* promoter may be related to virulence attenuation of H37Ra.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; H37Rv; H37Ra; pMC210; *pabB*; *lpdA*

(本文责编: 张晓丽)

* Corresponding authors. Tel: + 86-512-65880132; Fax: + 86-512-65880103; E-mail: zhaoyingwei1993@sina.com (Yingwei Zhao); Tel: + 86-21-63846590-776590; Fax: + 86-21-64671226; E-mail: yfyao@sju.edu.cn (Yufeng Yao)