

一种构建马链球菌兽疫亚种血红素受体基因缺失突变株的方法

李尧, 蓝小玲, 李学如*, 郭泰林, 姚宁, 江南屏, 任瑶瑶

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

摘要:【目的】探讨一种构建马链球菌兽疫亚种基因缺失突变株的方法。【方法】PCR 扩增目的基因, 用 pJR700 温度敏感载体系统, 构建目的基因载体; 反向 PCR 扩增目的基因缺失载体片段, 连接, 产生目的基因缺失载体; 电转化缺失重组质粒导入感受态细胞, 先在 37℃ 卡拉霉素 (kan) 培养基中连续培养, 然后在 30℃ 不含 kan 液体培养基中传代, 挑取抗生素敏感菌落, PCR 扩增检测抗生素敏感菌染色体上目的基因片段和链黑霉素抗性实验确认血红素受体基因缺失。【结果】获得不含抗生素基因的马链球菌兽疫亚种血红素受体基因缺失突变株。【结论】用 pJR700 温度敏感载体系统, 构建马链球菌兽疫亚种基因缺失突变株是可行的。

关键词: 温度敏感质粒; 血红素受体基因; 缺失突变株; 马链球菌兽疫亚

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0822-06

铁是生物体生命活动所必需的营养元素, 宿主体内可利用铁的状况, 是决定病原菌能否突破宿主的天然自身免疫系统, 造成感染的发生与发展的重要原因^[1]。哺乳动物 70% 以上的有效铁是以血红素的形式存在, 血红素是病原菌最完美的铁源^[2], 特别是某些不具备其他病原菌分泌铁运载体 siderophore 能力的链球菌, 不能从机体的转铁蛋白、乳铁蛋白中获取铁, 因此血红素铁是这些链球菌主要的铁元素来源^[3]。在化脓性链球菌 (GAS) 中, 目前至少发现了 3 种 ABC 铁吸收转运系统, 其中一个由 10 个基因组成的称作 Sia 或 Hts 的操纵子, 专性血红素铁的吸收转运, 该操纵子的第一个基因编码链球菌血红素蛋白受体 (streptococcal hemoprotein receptor, Shr), shr 基因突变表现出菌体胞内铁离子浓度减少, 毒力降低^[4-5], 进一步研究证实, Shr 为化脓性链球菌广谱表面受体蛋白, 除参与血红素铁的吸收外, 具有细菌黏附素的功能, 为链球菌重要毒力因子, 在细菌感染发生与发展过程中起着重要作用,

在小鼠感染模型中, 小鼠腹腔注射化脓性链球菌, 体内检测到了 Shr 抗体存在, 注入 Shr 抗体能降低小鼠的死亡率^[6]。

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*, GCS) 由于没有宿主专嗜性, 可通过消化道、外伤、手术、注射疫苗或治疗等途径感染多种动物, 引发败血症、脑膜炎、心内膜炎、关节炎、乳腺炎等。由马链球菌兽疫亚种引起猪的链球菌病, 曾在我国华南、西南和华东等地区广泛流行, 给我国养猪业造成危害^[7], 近年来国内外不断有人感染马链球菌兽疫亚种的报道^[8], 因此研究马链球菌兽疫亚种致病机理受到关注。

从目前公布的马链球菌兽疫亚种的全基因组序列与化脓性链球菌全基因组序列中的相关毒力因子的蛋白序列对比分析发现, 马链球菌兽疫亚种除没有链球菌致热外毒素 SpeB 外, 几乎具有化脓性链球菌业已证实的所有毒力因子, 是目前已知的少数几个具有血红素铁吸收转运操纵子的链球菌, 马链球

基金项目: 西南交通大学科研启动基金 (X1200512470141); 中央高校基本科研业务费专项基金 (SWJTU092T28)

* 通信作者。Tel: +86-28-87600990; E-mail: xueruli@sina.com

作者简介: 李尧 (1983 -), 四川省眉山人, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学专业。

收稿日期: 2009-11-14; **修回日期:** 2010-02-03

菌兽疫亚种与化脓性链球菌 *Sia* 血红素受体的同源性高达 58.6% (图 1 所示), 基于化脓性链球菌 *Shr* 在感染发生发展过程中的重要性, 因此对马链球菌兽疫亚种血红素受体功能的研究, 对于了解马链球菌兽疫亚种感染发生与发展和寻找新的疫苗具有积极意义, 为此, 我们利用化脓性链球菌特异性温度敏感基因缺失敲除突变系统, 构建马链球菌兽疫亚种血红素受体蛋白基因缺失突变株, 探讨该系统用于构建马链球菌兽疫亚种基因缺失突变株的可能性, 为进一步研究马链球菌兽疫亚种血红素受体功能的提供有用材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、培养基和生长条件: 质粒 pJR700 由美国 Georgia 州立大学 Dr. Eichenbaum 实验室惠赠, 卡拉霉素 (Kanamycin, Kan) 抗性, 温度敏感。马链球菌兽疫亚种 CVCC562 (*S. zooepidemicus*) 中国兽医药品监察所购得。链球菌 THY 液体培养基: 3% Tod-Hewitt, 0.2% Yeast extract; TH 固体培养基: THY 液体培养基加 1.8% 琼脂; TH 铁螯合剂

培养基^[5]: 3% Tod-Hewitt, 0.2% Yeast extract, 10 mmol/L 氨基三氯乙酸 (NTA), 其它盐溶液 MgCl₂、MnCl₂、CaCl₂ 和 ZnCl₂ 各 0.55 mmol/L; 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 感受态为本实验室保存, 培养于 LB (Luria-Bertani) 培养基中。在细菌培养需要时, 将 Kan 加入固体或液体培养基中, 浓度为 70 mg/L。培养方法及条件, 按文献[9]进行, 链球菌接种于装有 5 mL THYB 培养基的带螺旋盖的无菌聚丙烯离心管中, 37 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C 静态培养, 大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C 摇瓶培养。

1.1.2 主要试剂: 链球菌 Tod-Hewitt 培养基购自 Bacto 公司; 内切酶 *Cla*I, *Bam*HI, T4 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购于宝生物工程(大连)有限公司; NTA 和高保真 DNA 聚合酶购自 Sigma 公司; DNA 提取试剂盒购自 Epicentre 生物技术公司; 质粒提取试剂盒购于美国 Promega 公司。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.1.3 引物: 用 Vector NTI AdvanceTM 11 软件 (Invitrogen 公司) 完成实验所用引物设计 (表 1)。其它相关生物信息及分析用 NCBI 和 SMART 数据库完成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Strand	Sequence(5'→3')	Restriction site
XLS1	+	GGGGATCGATGCTTCTTCTGCTTTAAAGGCAAAGGAGTAGAGGAC	<i>Cla</i> I
XLR1	-	GGGGATCGATGCTTCTTCTGCTTTAAAGGCAAAGGAGTAGAGGAC	<i>Cla</i> I
XLS2	+	TTGGATCCGTCACAGTTGATGAGAGACGCTCTG	<i>Bam</i> H I
XLR2	-	TTCCTGCTGGGATCCCTTGTCCCTGCTTT	<i>Bam</i> H I

1.2 马链球菌兽疫亚种基因组 DNA 提取

马链球菌兽疫亚种基因组 DNA 的提取方法按 Epicentre 生物技术公司 MasterPurTM 革兰阳性 DNA 纯化试剂盒指导进行。

1.3 马链球菌兽疫亚种感受态细胞的制作^[5]

马链球菌兽疫亚种接种在加 0.6% 的甘氨酸的 THY 培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 按 1:30 的比例将过夜培养物接种到新鲜培养基中 (按 100 mg/L 浓度加入透明质酸酶), 37 $^{\circ}$ C 培养到 OD₆₀₀ 值 0.20 - 0.3, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 等体积的冷无菌双蒸水洗一次, 15% 冷甘油溶液洗两次后, 将细胞悬于 15% 甘油溶液中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 马链球菌兽疫亚种 *shr* 缺失突变株的构建^[10]

用温度敏感自杀性质粒 pJR700 构建马链球菌兽疫亚种 *shr* 缺失突变株按下述步骤进行:

1.4.1 *shr* 基因载体 pJR700-*shr* 质粒 pXL28 构建: 根据 GenBank 中报道的马链球菌兽疫亚种全基因

组序列, 用 Vector NTI 软件设计含 *Cla*I 酶切位点的一对引物 XLS1 和 XLR1, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *shr*, *Cla*I 酶切 PCR 产物和 pJR700, T4 连接酶连接, 获得 pJR700-*shr* 质粒载体。

1.4.2 *shr* 基因缺失载体 pJR Δ *shr* 质粒 pXL30 的构建: 在 *shr* 基因 1034 bp 处有一 *Bam*H I 酶切位点, 用 *Bam*H I 酶切 pJR700-*shr* 质粒后, 以此线性载体为模板, 在 *shr* 基因 1034 bp 和 2877 bp 两个不同位点, 用 Vector NTI 软件设计含有 *Bam*H I 酶切位点的一对引物 XLS2 和 XLR2, 反向 PCR 扩增获得 *shr* 基因缺失载体片段, *Bam*H I 酶切, 连接片段, 获得携带 *shr* 基因缺失的温度敏感性质粒载体 pJR700 Δ *shr* (pXL30)。

1.4.3 *shr* 基因缺失载体 pJR700 Δ *shr* 的电转化和 *shr* 缺失突变株的筛选: 采用电转化方法将温度敏感性 *shr* 基因缺失重组质粒 pJR700 Δ *shr* 导入到马链球菌兽疫亚种 CVCC562 感受态细胞, 涂 kan 平板,

37℃ 过夜培养,挑取单菌落,接种到含 kan 的液体培养基中,37℃ 培养到对数生长末期,按 1:100 接种于新鲜的含 kan 的液体培养基中,重复 3-5 次,取最后一次培养液,以 XLS1 和 XLR1 为引物,用快速 PCR 方法确定细菌染色体上是否存在缺失和非缺失 *shr* 基因,取具有缺失和非缺失 *shr* 两条带的 37℃ 培养液,按 1:100 接种到不含 kan 液体培养基中,30℃ 培养到对数生长末期,按 1:100 又接种到不含 kan 液体培养基中,重复 3-5 次,取适量稀释菌液涂布于不含 kan 平板,37℃ 培养过夜。挑取数个单菌落分别点接到含 kan 和不含 kan 平板,37℃ 过夜培养,选取在含 kan 平板上不生长的 kan 敏感菌株,接种于新鲜液体培养基,37℃ 过夜培养,以 XLS1 和 XLR1 为引物,用快速 PCR 方法确定细菌 *shr* 基因,根据 *shr* 条带大小确定 kan 敏感菌株是野生型还是突变型。

1.5 *shr* 基因缺失突变株的确定

以马链球菌兽疫亚种 CVCC562 和上述初步确定的 *shr* 缺失突变株基因组 DNA 为模板,XLS1 和 XLR1 为引物,进行 PCR 扩增,确认反应产物,获得 *shr* 基因缺失突变株。

1.6 *shr* 缺失突变株链黑霉素敏感性实验^[5]

将野生菌株和突变菌株分别接种到含有

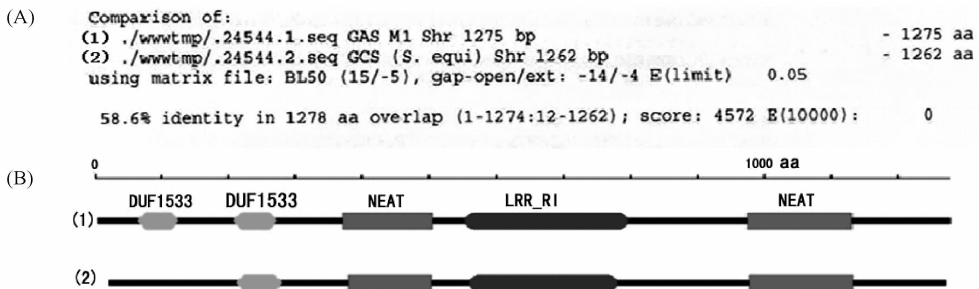


图 1 马链球菌兽疫亚种和化脓性链球菌血红素蛋白受体 Shr 氨基酸序列同源性及其结构分析

Fig.1 The SMART algorithm (<http://smart.embl-heidelberg.de>) was used for the homologous and structural analysis of streptococcal hemoprotein receptor of GAS and GCS. The amino acid residues of streptococcal hemoprotein receptor are 58.6% identical in GAS (A1) and GCS (A2). The location of protein domains (expressed as amino acid numbers) of Shr are shown (B1: GAS, B2: GCS).

2.2 *shr* 基因载体 pJR700-*shr* 质粒 pXL28 构建

用温度敏感 pJR700 载体系统,构建马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因缺失突变株的原理图 2 所示。以马链球菌兽疫亚种 CVCC562 染色体 DNA 为模板,以 XLS1 和 XLR1 为引物,PCR 扩增 *shr* 基因,获得 4017 bp 的 *shr* 基因片段,内切酶 *Cla*I 酶切 PCR 产物和质粒载体 pJR700 得到 4017 bp 与 5842 bp 的 *shr* 基因和质粒载体 DNA 片段,T4 连接酶连接 *shr* 与温度敏感自杀性质粒载体 pJR700,获得携带 *shr* 基因的质粒载体 pXL28,凝胶电泳显示,质粒 pXL28

1.6 μmol/L 链黑霉素的整合剂培养基,37℃ 过夜培养,测定 OD_{600} 值,确定菌体生长情况,比较耐药性差异。

1.7 用于 PCR 快速检测 *shr* 基因 DNA 的提取方法

吸取 500 μL 培养液,离心,用 100 μL 去离子水悬浮菌体,100℃ 大肠杆菌处理 5 min,链球菌处理 3 min,冷却到室温离心,取上清液 2-3 μL 为 DNA 模板进行 PCR 扩增目的基因。

2 结果

2.1 化脓性链球菌与马链球菌兽疫亚种血红素受体同源性分析

运用 NCBI 和 SMART 数据库,对马链球菌兽疫亚种全基因组序列与化脓性链球菌全基因组序列中的相关蛋白序列对比分析发现,马链球菌兽疫亚种和化脓性链球菌血红素铁吸收转运操纵子都是由 10 个基因组成,它们的血红素受体基因 *shr* 分别编码 1262 和 1275 个氨基酸残基,两者的同源性高达 58.6% (图 1-A),保守序列结构域分析图 1-B 显示,两者具有相似结构域,都有两个血红素结合位点 NEAT 结构域 (near transporter domain) 和一 LRR 结构域。

比 pJR700 增加了 4000 bp 左右的碱基,表明 pJR700-*shr* 质粒构建成功。

2.3 *shr* 基因缺失载体 pJR700 Δ*shr* 质粒 pXL30 的构建

以质粒载体 pXL28 为模板,在 *shr* 基因 1046 bp 和 2877 bp 两个不同位点,以 XLS2 和 XLR2 为引物,反向 PCR 扩增获得 *shr* 基因 NEAT1 和 NEAT2 结构域部分缺失和 LRR 完全缺失的载体片段,*Bam*HI 酶切后,连接此片段,获得携带 *shr* 基因结构内 (in-frame) 缺失的温度敏感性质粒载体 pJR700

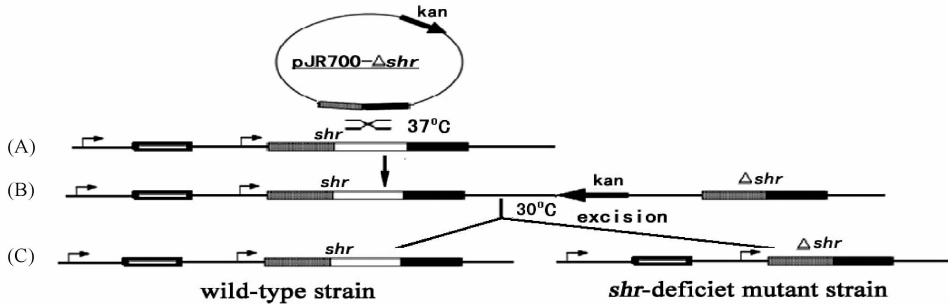


图2 质粒 pJR700 构建马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因缺失突变株原理

Fig.2 Construction of streptococcal hemoprotein receptor in-frame deletion mutant. The plasmid (depicted as a circle) bearing streptococcal hemoprotein receptor gene with an in-frame deletion was constructed as described in Materials and Methods and was introduced into *S. zooepidemicus* CVCC562 with electroporation. Homologous recombination (A) was induced by growing the bacteria at 37°C (which is nonpermissive for replication of the plasmid), and transformants were selected according to kanamycin resistance. A second intrachromosomal homologous recombination event was triggered by growing the bacteria at 30°C without antibiotics (B), resulting in excision of the indicated fragment, leaving the organism kanamycin sensitive and with the in-frame deletion in streptococcal hemoprotein receptor gene or wild type in streptococcal hemoprotein receptor gene (C). This construct was verified by PCR, as stated in Materials and Methods

Δshr (pXL30), 琼脂糖凝胶电泳显示, 质粒 pXL30 较 pXL28 缺失了大约 2000 bp 左右的碱基, 表明 pJR700 Δshr 质粒构建成功。

2.4 马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因缺失株的构建

电转化 pXL30 到马链球菌兽疫亚种 CVCC562 感受态细胞, 37°C 在 kan 选择培养基中自杀性载体上携带 *shr* 基因缺失片段与宿主染色体上的同源序列发生交换重组, 形成载体上所携带的基因与原来染色体上的基因同时稳定共存于染色体上, 以 XLS1 和 XLR1 为引物, 采用快速 PCR 方法扩增 *shr* 基因, 获得 4017 bp 和 2210 bp 的两条 DNA 条带 (图 3-A), 将具有两条 DNA 条带链球菌培养液, 转接到无抗生素的培养基, 30°C 培养, 自杀性载体上的启动子启动, 在 DNA 复制过程中被切离。在没有了的抗生素选择压力下, 30°C 培养传代, 形成没有抗生素标记的

染色体基因缺失突变株和野生菌株, 图 3-B 琼脂糖凝胶电泳图显示, 4# 和 9# 染色体上 *shr* 基因发生了缺失, 其它菌株的 *shr* 片段与发菌株相同为野生菌株。

2.5 马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因缺失株分析

2.5.1 PCR 确定 *shr* 基因缺失: 以马链球菌兽疫亚种 CVCC562 和快速 PCR 方法确定的 *shr* 缺失突变株基因组 DNA 为模板, 以 XLS1 和 XLR1 为引物, PCR 扩增染色体 *shr* 基因, 琼脂糖凝胶电泳结果图 3-C 所示, 以突变株染色体 DNA 模板, 只扩增出大约 2000 bp 的 DNA 片段, 表明所获得的突变株为染色体 *shr* 基因缺失突变株。

2.5.2 *shr* 缺失突变株对链黑霉素抗性: 链黑霉素具有广泛的生物学活性, 能抗细菌、真菌、线虫、病毒和肿瘤细胞, 其生物活性高度依赖于与金属离子尤

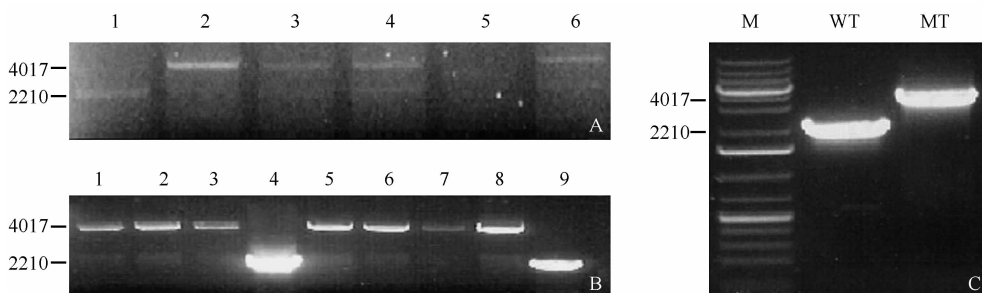


图3 PCR 检测马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因

Fig.3 PCR analysis of streptococcal hemoprotein receptor gene in wild type strain and mutant strain. Homologous recombination was induced by growing the bacteria in medium with kan at 37°C. there are two binds in the cell, short one is deletion streptococcal hemoprotein receptor gene, the long is streptococcal hemoprotein receptor gene (A); A second intrachromosomal homologous recombination event was triggered by growing the bacteria at 30°C without antibiotics, resulting in excision of the indicated fragment, leaving the organism kanamycin sensitive and with the in-frame deletion in streptococcal hemoprotein receptor gene (B-4 and B-9). Identification of streptococcal hemoprotein receptor gene deletion mutant by PCR (C); M: marker; WT: wild strain; MT: *shr*- deficient mutant strain.

其是铁离子的相互作用。铁吸收系统突变会增加生物体对链黑霉素的抗性^[11],比较野生菌株和我们所构建的 *shr* 缺失突变株对链黑霉素敏感结果图 4 所示,过夜培养的 *shr* 缺失突变株 OD_{600} 值显著高于野生菌株,表明 *shr* 缺失突变株比野生株耐链黑霉素,缺失突变株的铁吸收受到影响,所获得的缺失突变株为 *shr* 缺失突变株。

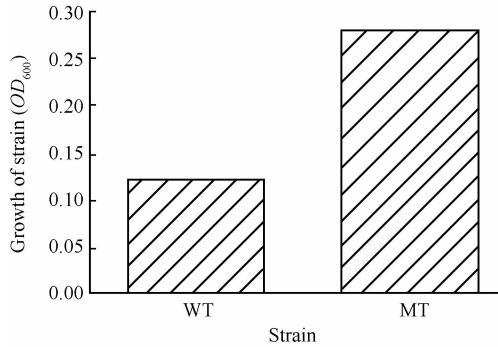


图 4 马链球菌兽疫亚种野生菌株和血红素受体突变菌株对链黑霉素的抗性

Fig. 4 Sensitivity to streptonigrin of the wild-type and the *shr* mutant strain. Cells were used to inoculate (1:1,000 dilution) fresh ZTH medium contained 1.6 $\mu\text{mol/L}$ streptonigrin. The culture optical density (OD_{600}) was determined after overnight incubation (17 h). The results are from seven independent experiments. WT: wild strain; MT: *shr*- deficient mutant strain.

3 讨论

基因敲除是研究基因功能的重要手段之一,目前通过质粒载体系统,敲除染色体基因的方法主要有两种,一是在基因内某一位点插入抗生素表达盒(cassette),灭活该基因,通过抗生素平板,筛选耐该抗生素的菌株,该方法在基因内插入了抗生素表达盒,因此,构建的突变株称为插入突变株,由于有抗生素选择标记,容易筛选到突变株,因而被大多数研究者所选用,但是该方法目前认为存在一定的局限性,①抗生素表达盒插入,可能会影响下游基因的正常表达;②培养突变株需要加入抗生素,可能引起细菌某些特性的改变,给目的基因功能的研究结果增加了不确定性;③由于构建每一基因突变株,都需要插入一抗生素表达盒,因此该系统很难用于多基因缺失突变株的构建。这些局限性很有可能是造成文献所报道的化脓性链球菌同一基因对链球菌致热外毒素 SpeB 表达和成熟产生相反结果的原因之一。另一种构建突变株的方法就是在基因内(in-frame)敲除一段重要碱基片段,使该基因失去其功能,用这种方法构建的突变株称为缺失突变株,由于该方法

克服了插入突变的局限性,广泛用于细菌基因突变株的构建。本研究使用链球菌特异性温度敏感基因缺失敲除系统,近年来被广泛用于化脓性链球菌单个或多基因缺失突变株的构建,我们运用此系统也成功地构建马链球菌兽疫亚种血红素蛋白受体基因(*shr*)大片段缺失突变株,表明该系统用于革兰阳性链球菌基因缺失突变株的构建是可行的,为我们进一步研究性血红素铁吸收转运操纵子在细菌感染的发生与发展过程中的作用打下了基础。

致谢 马链球菌兽疫亚种 *shr* 基因缺失突变株构建方法参照通讯作者在美国 Georgia 州立大学 Dr. Eichenbaum 实验室所建立的构建化脓性链球菌基因缺失突变株的方法进行。

参考文献

- [1] Eugene DW. Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790: 600-605.
- [2] Rouault TA. Pathogenic bacteria prefer heme. *Science*, 2004, 305:1577-1578.
- [3] Heinrichs DE, Rahn A, Dale SE. *Staphylococcus, Streptococcus, and Bacillus*. In *Iron Transport in Bacteria* Edited by Crosa JH, Mey AR, Payne SM. Washington DC: ASM Press; 2004:394-296.
- [4] Griselle EM, Melody NN, and Eichenbaum Z. The streptococcal iron uptake (Siu) transporter is required for iron uptake and virulence in a zebrafish infection model. *Microbiology*, 2005, 151: 3749-3757.
- [5] Bates CS, Griselle EM, Woods CR, Vincent RM, Eichenbaum Z. Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in Binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infection and Immunity*, 2003, 71:1042-1055.
- [6] Fisher M, Huang YS, Li XR, McIver KS, Chadia T, Eichenbaum Z, Shr is a broad-spectrum surface receptor that contributes to adherence and virulence in *Group A Streptococcus*, *Infection and Immunity*, 2008, 76(11): 5006-5015.
- [7] 范红结, 陆承平. 马链球菌兽疫亚种毒力因子. 中国人兽共患病学报(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2006, 22(3):927.
- [8] 孙永丽, 李香兰, 周春兰. 马链球菌兽疫亚种引起化脓性脑膜炎分析. 中国民康医学(*Medical Journal of Chinese People's Health*), 2008, 10(13):20.
- [9] 李学如, 李尧, 王艳, 姚宁, 郭泰林, 孟涛. 酪素平板法检测临床分离 A 族链球菌致热外毒素 B 活性研究 中华检验医学杂志(*Chinese Journal of Laboratory Medicine*), 2009, 32(6):699-700.

[10] Ma Y, Bryant AE, Salmi DB, Susan MH, Eric M, Michael JA, Dennis LS. Identification and Characterization of Bicistronic *speB* and *prsA* Gene Expression in the Group A *Streptococcus*. *Journal Bacteriology*, 2006, 188(21):7626-7634.

[11] Brown JS, Gilliland SM, Holden and DW. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Molecular Microbiology*, 2001, 40:572-585.

Construction of in-frame deletion streptococcal hemoprotein receptor gene mutant in *streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Yao Li, Xiaoling Lan, Xueru Li^{*}, Tailin Guo, Ning Yao, Nanping Jiang, Yaoyao Ren

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: [Objective] To construct the in-frame deletion gene mutants in *streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* by (S. *zooepidemicus*) by pJR700 plasmid, a thermosensitive delivery vector system. [Method] With PCR we amplified a 4017-bp DNA fragment of streptococcal hemoprotein receptor gene from chromosome DNA. This DNA fragment was subcloned into the pJR700 plasmid to create pXL28. Using pXL28 as the template we got the DNA fragment deleted 1831 bp in streptococcal hemoprotein receptor gene by inverse PCR amplification and ligated the in-frame deletion DNA fragment by T4DNase to create pXL30. Then pXL30 was transformed into *S. Zooepidemicus* by electroperation. The kanamycin(kan)-resistant clones were selected at 37°C in the presence of kan for three rounds. To induce excision of the plasmid vector sequence, the culture was shifted to 30°C and grown without antibiotics for four rounds. Colonies with kan sensitivity, which indicated that the plasmid had been excised, were selected by plating on THY agar at 37°C. *S. Zooepidemicus* mutants were identified through PCR with primers homologous to the flanking regions and the streptonigrin sensitive test. [Result] The in-frame deletion streptococcal hemoprotein receptor mutants were successfully built in *S. Zooepidemicus*. [Conclusion] The thermosensitive delivery vector system of pJR700 could be utilized to construct the in-frame deletion gene mutant strains of *S. Zooepidemicus*.

Keywords: thermosensitive plasmid; streptococcal hemoprotein receptor; deletion mutant; *S. Zooepidemicus*

(本文责编:王晋芳)