

炭疽芽孢杆菌 A16R 株 *eag* 基因缺失突变株构建

高美琴^{1,2} #, 刘先凯² #, 冯尔玲², 唐恒明², 朱力², 陈福生¹, 王恒樑^{2*}

(¹华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

(²军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要 【目的】构建炭疽芽孢杆菌 A16R 株 *eag* 基因缺失突变株, 为研究 *eag* 基因的功能奠定了基础。【方法】本研究以我国人用炭疽杆菌活疫苗 A16R 株中 *eag* 基因为目的缺失基因, 根据炭疽芽孢杆菌 Ames 株基因组序列, 利用软件设计了扩增上下游同源臂以及抗性基因引物, 构建了重组质粒, 将该重组质粒电击转入炭疽杆菌 A16R 感受态细胞中, 利用同源重组原理筛选到炭疽杆菌 A16R 株 *eag* 基因缺失突变株。在分子水平及蛋白质组学方面对基因缺失突变株进行验证。【结果】成功构建了重组质粒, 经同源重组后获得 *eag* 基因缺失突变株。PCR 鉴定表明目的基因已经丢失, SDS PAGE 表明野生株与突变株在 93 kDa 处有差异蛋白条带, 经质谱鉴定分析该条带为目的基因所表达的 EA1 蛋白, 双向电泳结果显示突变株与野生株比较明显缺失 3 个蛋白点, 经质谱分析后确定这 3 个点都是 EA1 蛋白。【结论】成功获得炭疽芽孢杆菌 A16R 株 *eag* 基因缺失突变株, 为深入研究 *eag* 基因的功能奠定了基础, 同时也为炭疽芽孢杆菌重要基因功能的研究建立了一个良好的技术平台。

关键词: 炭疽芽孢杆菌 A16R 株; 同源重组; 缺失突变体; 双向电泳

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)01-0023-09

炭疽是人畜共患的急性传染病, 1876 年 Koch 和 Pasteur 证明其病原菌是炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*), 简称炭疽杆菌, 它属革兰氏阳性菌。炭疽杆菌通过皮肤伤口、消化道或者呼吸道上皮接触吸入空气中的炭疽芽孢后, 导致皮肤炭疽、肺炭疽、肠道炭疽等程度不同的疾病^[1]。其中以肺炭疽最为严重, 会很快导致疾病和死亡^[2]。炭疽病是五大人畜共患病之一, 对畜牧业及人类健康的危害很大。此外, 炭疽杆菌还被用作首要的生物战剂和制造生物恐怖, 对社会稳定造成很大威胁^[3-4]。因此对炭疽杆菌的研究一直是生命科学领域的热点之一。

近几十年的研究发现, 在不少古细菌和真细菌

细胞壁的最外层均存在一种蛋白性质的类晶体(paracrystalline)结构, 称之为表面层(Surface layer)或 S-层(S-layer)^[5-6]。炭疽杆菌的 S-层主要由胞外抗原 1(extracellular antigen 1, EA1)和表面排列蛋白(surface array protein, Sap)组成^[7], 分别由 *eag* 和 *sap* 基因编码, 大小分别约为 91 kDa 和 87 kDa, 两种蛋白总量可占到全菌体蛋白量的 5% ~ 10%^[8]。

EA1 和 Sap 这两个蛋白分别形成不同的晶格结构, 并且两蛋白的表达还与生长时相相关, Mignot 等提出了假想的生长时相调控模型^[9]。在对数生长期, *sap* 被 $E\sigma^A$ 转录激活, 蛋白表达在细胞表面, 由同一蛋白间的相互作用形成 S-层晶格结构。此时由于

基金项目: 国家自然科学基金(30670104)

* 通信作者。Tel : + 86-10-66948836 E-mail : wanghl@nic.bmi.ac.cn

作者简介: # 并列第一作者。高美琴(1983 -)女, 内蒙古鄂尔多斯市, 硕士研究生; 刘先凯(1970 -)男, 河南省新野县, 副研究员, 主要从事病原微生物功能基因组研究。E-mail : liuxk007@163.com

收稿日期: 2008-07-21; 修回日期: 2008-10-15

Sap 通过与 *eag* 启动子结合,直接抑制了基因的转录而导致 EA1 几乎没有合成。到稳定期时,可利用的 σ^A 减少 *sap* 的转录发生了变化。这使得原先结合于 *eag* 启动子处的 Sap 释放,去除了对 EA1 合成的阻遏,*eag* 在 $E\sigma^H$ (σ^H 在对数生长期时合成也是被抑制的)的催化下转录。EA1 的表达占据了 S-层的可能位点,通过相同蛋白之间的相互作用形成晶格结构,并使 Sap 晶格结构变得不稳定,EA1 晶格结构更易扩散从而取代了 Sap。被替代下来的 Sap 可在上清中检出,而由于 EA1 对 *eag* 的表达有负反馈作用,可直接或间接减少 *eag* 的转录,使其表达量恰能覆盖菌体,因此在上清中很少能见到。

S-层蛋白具有保护细胞、连接细胞外酶类、分子筛和细胞黏附等作用^[10]在病原体中还可抵抗宿主的免疫攻击,很可能是一种毒力因子^[11]。根据炭疽杆菌 S-层组成和位置的特点,推测在与宿主的相互作用中,可能与荚膜一起发挥协同作用。虽然这一推测还缺少特别明确的实验验证,但是目前已了解到 S-层蛋白与炭疽毒力调控网络有关^[12]。pXO1 质粒上 *atxA* 所编码的 AtxA 在整个调控网络中处于中心位置,可影响约 70 个基因的表达。它不仅增强 pXO1 上 3 个毒力基因(*pagA*、*lef*、*cya*)的转录,还可影响 pXO2 上荚膜合成基因(*capBCA*),同时染色体上 S-层蛋白基因的表达也受到它的调控。*pagR* 的编码产物 PagR 是 AtxA 调控网络中的下游效应蛋白,可将炭疽毒素与表面 S-层蛋白的表达偶联起来^[13]。PagR 可抑制 *pag* 和 *sap* 的活性,而它与另一个未确知的 pXO1 质粒编码的调控蛋白共同作用,可使 *eag* 的转录活性增强,故暗示了 EA1 在与宿主的相互作用中可能扮演着某种角色。为探索炭疽杆菌 A16R 株中 *eag* 基因的功能,本研究根据同源重

组的原理获得了炭疽杆菌 A16R 株 *eag* 基因缺失突变株,并在核酸和蛋白水平对该突变株进行了验证。这为深入研究 *eag* 基因的功能奠定了基础,同时也为炭疽芽孢杆菌重要基因功能的研究建立了一个良好的技术平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、SCS110[*rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44* Δ (*lac-proAB*)]为本室保存,炭疽杆菌疫苗株 A16R 为本室保存;pKSV7 质粒是大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒,温度敏感型,含有氨苄抗性和氯霉素抗性基因,为中科院微生物所刘刚教授惠赠;pSET4s 质粒是一个温度敏感型自杀质粒,含有壮观霉素抗性基因,由军事医学科学院微生物与流行病学研究所姜永强教授惠赠。

1.1.2 酶和试剂:限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,*Pyrobest* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒,DNA 凝胶回收试剂盒,PCR 回收试剂盒购自东胜生物公司;细菌基因组提取试剂盒购自 TIANGEN 生物公司;氨苄青霉素(Ap)、氯霉素(Cm)、壮观霉素(Spc)购自 TIANGEN 生物公司;溶菌酶购自 Sangon 公司;蛋白胨,酵母提取物购自 OXIOD 公司;脑心浸液(BHI)购自美国 BD 公司。尿素(电泳级)、硫脲购自 Sigma 公司;IPG 干胶条(18cm;pH4-7)、IPG 缓冲液(pH4-7)、矿物油、二硫苏糖醇(DTT)、Tris 碱、溴酚蓝、蛋白定量试剂盒(2-D Quant Kit)、蛋白纯化试剂盒(2-D Clean-up Kit)购自 GE Healthcare 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自 BBI 公司;过

Table 1 The primers used in this research

Primers	Primer sequences (5'→3')	Template	Length/bp	Introductions
Spc .SalF	ACGCGTCGACGTTTCGTGAATACATGTTATA	pSET4s	1200	Amplification of Spectinomycin resistance cassette
Spc .BamR	CCGGGATCCGTTTTCTAAAAATCTGAT			
<i>eag</i> U .PstF	AACGCTGCAGCAACAAACAAAGAAGGTA	A16R chromosome	1156	Amplification of the upstream region of <i>eag</i> gene
<i>eag</i> U .SalR	CCGCGTCGACTAGAAAAGCCATAAAAACA			
<i>eag</i> D .BamF	CGCGGATCCGTCGATTATAGATAAAAGTGA	A16R chromosome	1004	Amplification of the downstream region of <i>eag</i> gene
<i>eag</i> D .EcoR	CCCAGGATTCTAAGTATGATAAATGGC			
pKSV7 .F	ATGTGCTGCAAGGCCGATTA	pKSV7spcp	1200	Amplification of the recombinant plasmid
pKSV7 .R	CCCAGGCTTTACACTTTATG		3360	
Id1 .F	TGCAGCAGGTCAAGAAGC	A16R Δ <i>eag</i> chromosome	2018	Two pairs of outer primers for the identification of mutant
Id1 .R	GCTCTTGTAACCATTTCTCC			
Id2 .F	CTGAATCTTCTCCATTAG	A16R Δ <i>eag</i> chromosome	1505	
Id2 .R	CATCTGTATTATCGGTTT			
In .F	GGCGAGTTAGTTACGACA	A16R Δ <i>eag</i> chromosome	1003	To affirm the destination gene was deleted from the mutant
In .R	CAGCCTCAGCAGTAATGTAG			

The underlined letters at 5' end of primers indicate the enzyme digestion sites.

硫酸铵、TEMED、硫代硫酸钠、CHAPS、甘氨酸、SDS、考马斯亮蓝 G-250、RNase A 购自 AMRESCO 公司; 碘乙酰胺购自 ACROS 公司; 蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitor cocktail tablets) 测序级胰蛋白酶购自 Roche 公司; 甘油为国产优级纯; 乙腈为国产一级色谱纯; 吸头与离心管购自 AxyGen 公司; 其他试剂均为分析纯。引物合成由英骏生物公司完成, DNA 测序国家

生物学分析中心 DNA 合成和序列分析实验室完成。

1.1.3 引物: 实验中所使用的引物和用途见表 1。

1.2 重组质粒 pKSV7usd (pKSV7 + *eagup* + *spc* + *eagdwn*) 的构建

使用 Primer premier 5.0 软件, 根据 pSET4s 质粒序列设计扩增壮观霉素抗性基因 (*spc*) 序列的引物, 根据炭疽杆菌 Ames 株染色体上 *eag* 基因上、下游序

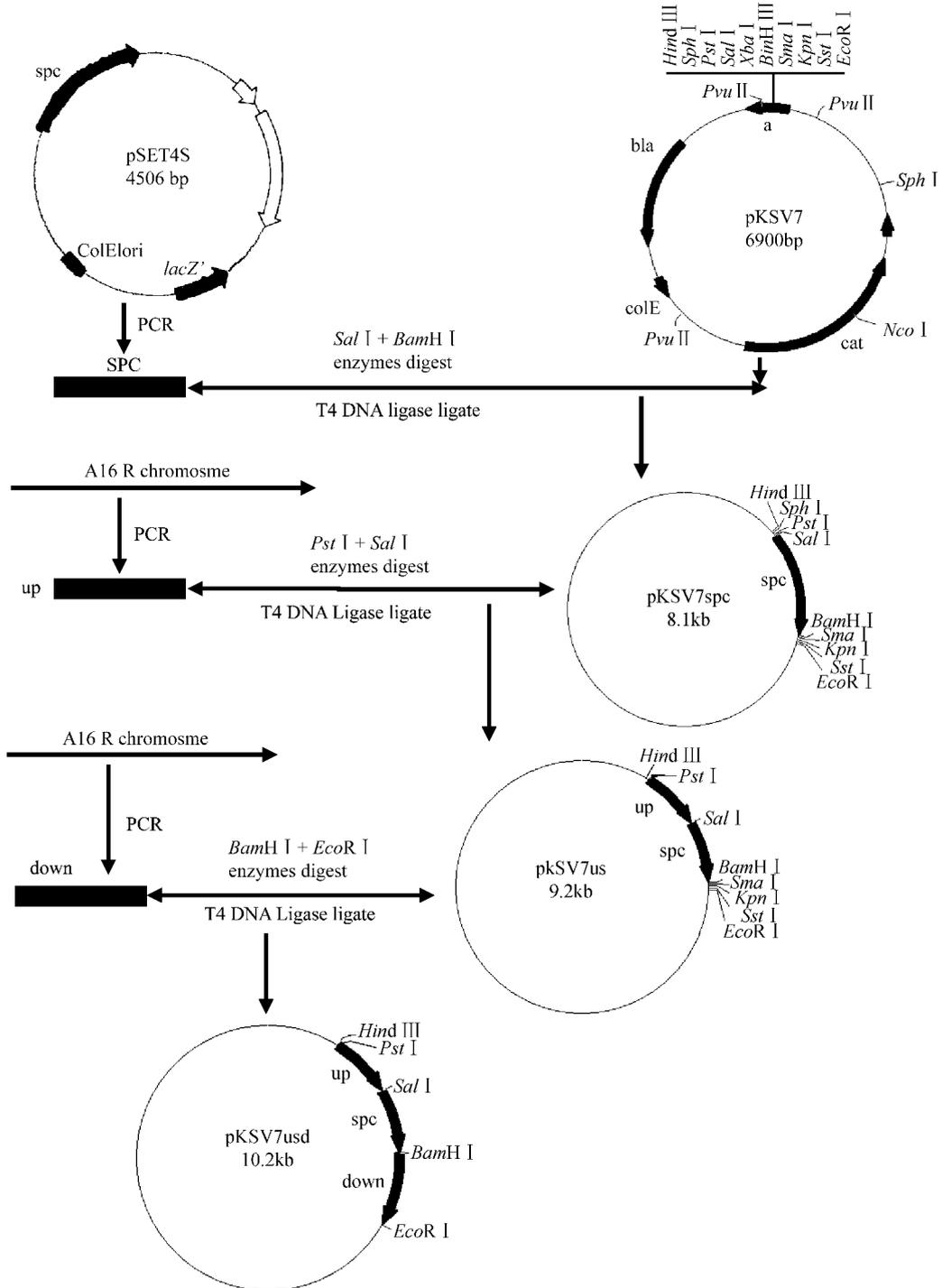


图 1 重组质粒 pKSV7usd (pKSV7 + up + *spc* + down) 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant pKSV7usd.

列,设计目的缺失基因 *eag* 上下游同源臂序列的引物(表 1)。

分别以 pSET4s 质粒、A16R 基因组为模板,用 *Pyrobest* DNA 聚合酶扩增 *spc* 及 *eag* 基因上下游同源臂(分别称为 up 片段和 down 片段),PCR 条件如下:94℃ 5 min,94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 7 min。体系为 100 μL,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。用 PCR 回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

用 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切质粒 pKSV7 和 *spc*,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶在 16℃ 连接过夜;电转大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,菌落 PCR 鉴定,将鉴定正确克隆进行 DNA 序列测定,将测序正确的克隆命名为 pKSV7_{spc}。

用 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切质粒 pKSV7_{spc} 和 up 片段,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶在 16℃ 连接过夜;电击转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,菌落 PCR 鉴定,将鉴定正确克隆进行 DNA 序列测定,将测序正确的克隆命名为 pKSV7_{us}。

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pKSV7_{us} 和 down 片段,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶在 16℃ 连接过夜;电转大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,用菌落 PCR 鉴定和质粒酶切鉴定,将鉴定正确克隆进行 DNA 序列测定,将测序正确的克隆命名为 pKSV7_{usd}(图 1)。

1.3 pKSV7_{usd} 重组质粒电击转化 SCS110 感受态

电转化条件:电击杯,0.2 cm;电压,2.5 kv;电阻,200 Ω;电容,25 μF。

1.4 从 SCS110 中提取质粒 pKSV7_{usd} 并电击转化 A16R 感受态

A16R 感受态制备方法参照 Koehler 等人的方法^[14-15]并作部分修改:将过夜菌按 1% 转接于含无抗性的 100 mL BHI 培养液(BHI 液体培养基加 0.5% 的甘油)的 500 mL 的三角瓶中,37℃ 摇床培养到 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,冰浴 15 min,4℃,6000 × g (HITACHI CR22E,Nr.41)离心 3 min 收集菌体。然后用电转化洗液(1 mmol/L Hepes,10% 甘油,用 1 mol/L NaOH 调 pH 值为 7.0)洗涤两次,最后剩余 1 mL 的电转化洗液将菌体混匀,分装 40 μL/管。电转化条件:电击杯,0.1 cm;电压,0.6 kv;电阻,500 Ω;电容,25 μF。电击后立即加入 1 mL 复苏液(BHI 液体培养基中含 10% 甘油,0.4% 葡萄糖,10 mmol/L MgCl₂·6H₂O),30℃ 摇床摇 2 h,涂 Cm 抗性板,置于 30℃ 温箱培养 10~12 h。菌落 PCR 鉴定,提取阳性克隆质粒,进行 DNA 序列测定。

1.5 突变株 A16R△*eag* 的筛选

将鉴定到的 A16R/pKSV7_{usd} 阳性克隆接种到 4 mL Luria-Bertan(LB)培养液中,先在摇床上 30℃、225 r/min 震荡培养过夜,之后按照 1:100 转接到 4 mL LB 新鲜培养液中,在 40℃、225 r/min 震荡培养 10~12 h,在 40℃ 重复转接 4 次培养,使质粒充分丢失,选择合适的稀释度分别涂布 Cm(5 ug/mL) Spc(300 ug/mL)两种抗生素板,次日挑取 Spc 抗生素板上的单克隆分别点 Cm、Spc 抗生素板,筛选 Spc 抗生素板上生长而在 Cm 抗生素板上不生长的克隆(Spc^rCm^s)。对得到的 Spc^rCm^s 克隆重复进行点板筛选 3 次。

将上述筛选到筛选到的克隆(Spc^rCm^s)分别接含 Spc 和 Cm 抗生素的试管,在 30℃、225 r/min 震荡培养过夜,肉眼观察试管,把在含 Spc 试管中生长而在含 Cm 的试管中不生长的菌液稀释 10⁻⁴ 后分别涂 Spc 和 Cm 板,结果 Cm 抗生素板上没有任何克隆生长,Spc 抗生素板上有克隆生长,随机挑取十几个克隆,再次分别在 Spc 和 Cm 抗生素平板上划线,30℃ 培养过夜,此时筛选到的 Spc^rCm^s 克隆几乎全部都是重组成功的克隆,即为 A16R△*eag* :*spc* 突变株。

1.6 突变株 A16R△*eag* :*spc* 的验证

1.6.1 突变株 A16R△*eag* :*spc* 重组区的 PCR 鉴定及 DNA 序列的测定:分别使用外部验证引物和内部验证引物进行突变体的 PCR 验证,并把 2 对外部引物扩增的产物纯化后,进行 DNA 序列测定。3 对验证引物的序列见表 1,它们在 A16R 和 A16R△*eag* 染色体上的位置见图 2。

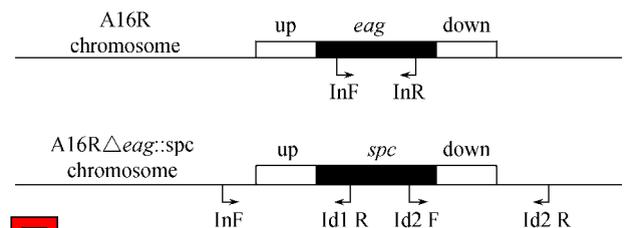


图 2 突变株验证引物在 A16R 及 A16R△*eag* :*spc* 染色体上的位置示意图

Fig.2 The locations of primers on the chromosome of A16R and A16R△*eag* :*spc*.

1.6.2 突变株 A16R△*eag* :*spc* 的 SDS PAGE 鉴定和质谱分析:将野生株 A16R 和突变株 A16R△*eag* :*spc* 单菌落接种到含 4 mL LB 培养液的 20 mL 试管中,摇床上 37℃、225 r/min 震荡培养过夜,取 1 mL 菌液离心收集菌体,尽量去上清。然后加 50 μL 无菌水重悬,再加入 50 μL 2 × SDS 上样缓

冲液混匀,煮沸变性,离心后取上清 15 μ L 进行 12% SDS PAGE,观测 *eag* 基因在野生株和突变株菌体中的表达差异情况,用刀片切取差异表达条带,进行 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)分析,登陆 <http://www.matrixscience.com>,用 Mascot 程序对 MALDI-TOF-MS 检测得到的肽质量指纹图谱(Peptide Mass Fingerprinting,PMF)进行检索。

1.6.3 野生株 A16R 和突变株 A16R Δ *eag* ::*spc* 全菌蛋白的双向电泳和质谱分析 野生株 A16R 和突变株 A16R Δ *eag* ::*spc* 全菌蛋白样品的制备 将野生株 A16R 和突变株 A16R Δ *eag* ::*spc* 单菌落接种到含 4 mL LB 培养液的 20 mL 试管中,摇床上 37 $^{\circ}$ C, 225 r/min 培养过夜,取 1 mL 过夜菌接种到 100 mL 新鲜 LB 培养基中,摇床上 37 $^{\circ}$ C, 225 r/min 培养 17 h 至稳定期。4 $^{\circ}$ C, 6000 \times g (SIGMA 3K12, Nr. 12150) 离心 10 min 收集菌体,用预冷的低盐 PBS 清洗菌体 4 次。细胞沉淀重悬于 5 mL 裂解液 I 中(7 mmol/L 尿素(电泳级), 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 1% DTT),加入半片蛋白酶抑制剂,冰浴超声 15 min(脉冲 2 s, 停 2 s, 最大功率的 25%)。超声后,加入 1.25 mg RNaseA、50 单位的 RQ1 DNase。于室温放置 1 h 后, 26000 \times g (SIGMA 3K30, Nr. 12154) 离心 30 min 去除不溶性沉淀。取上清用蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度,按每管 800 μ g 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。将分装样品用蛋白纯化试剂盒纯化,用 pH4-7 干胶条进行一向等电聚焦(IEF),然后进行二向 SDS PAGE,经考马斯亮蓝染色、冰乙酸脱色、图像扫描后用 ImageMaster 2D Platinum v5.0 分析表达差异点;用剪过的吸头(孔径约 1.5 mm)戳取差异点,进行脱色、胶内酶切,然后进行 MALDI-TOF-MS 分析,登陆 <http://www.matrixscience.com>,用 Mascot 程序对 MALDI-TOF-MS 检测得到的 PMF 进行检索。

2 结果

2.1 重组质粒 pKSV7usd 的构建

壮观霉素抗性基因(*spc*)和 *eag* 基因上下游同源臂(up、down)PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖电泳。扩增片段大小分别为 1156、1200、1004 bp 左右,其大小与预期的完全一致。

根据重组质粒的组成部分,用 3 对引物:eagU-PstF 和 eagU-SalR ;Spc-SalF 和 Spc-BamR ;eagD-BamF

和 eagD-EcoR 对重组质粒 pKSV7usd 进行 PCR 鉴定,扩增结果与预期结果完全一致。然后提取阳性克隆的质粒做双酶切鉴定,可以切出 3.2 kb 大小的片段,与预期相符合。将阳性克隆的质粒进行 DNA 序列测定,测定结果经过比对分析,证明我们获得的重组质粒 pKSV7usd 完全正确。

2.2 重组质粒 pKSV7usd 质粒电击转化大肠杆菌 SCS110 及炭疽杆菌 A16R

将 pKSV7usd 质粒电击转大肠杆菌 SCS110 感受态细胞后,挑取克隆做 PCR 鉴定,扩增出与预期相符的片段,说明 pKSV7usd 质粒成功转入 SCS110 细胞。然后从大肠杆菌 SCS110 中提取 pKSV7usd 质粒,电击转化炭疽杆菌 A16R 感受态细胞,挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定,扩增的片段长度与预期相符,说明 pKSV7usd 质粒成功转入炭疽杆菌 A16R 中,提取质粒进行 DNA 序列测定,测定结果经过比对分析,表明我们已经成功的把重组质粒转入炭疽杆菌 A16R 中。

2.3 A16R Δ *eag* ::*spc* 突变株的筛选和验证

经过二次筛选得到的 Spc^rCm^s 克隆几乎全部都是重组成功的克隆。这些克隆即为突变株 A16R Δ *eag* ::*spc*。我们随后从核酸和蛋白水平对突变株进行验证。

2.3.1 A16R Δ *eag* ::*spc* 突变株的核酸水平验证: 提取 A16R Δ *eag* ::*spc* 突变株的基因组,分别用两对外部引物、一对内部引物和抗性基因的引物进行验证(引物见表 1),结果显示:两对外部引物和抗性基因引物分别在 A16R Δ *eag* ::*spc* 染色体上扩增出大约 2 kb 和 1.5 kb 的片段,而在 A16R 染色体和 pKSV7usd 重组质粒上都没有扩增出特异条带,而内部引物在 A16R 染色体上扩增出大约 1 kb 的目标条带,而在 A16R Δ *eag* ::*spc* 突变株染色体上则没有这条条带,这都与预期完全相符;用抗性基因引物在 A16R Δ *eag* ::*spc* 突变株染色体上和 pKSV7usd 重组质粒上都扩增出约 1.2 kb 的目标条带,而在 A16R 染色体上则没有这条条带,这说明抗性基因已经将目的基因置换(图 3)。用两对外部引物扩增的 DNA 片段进行序列测定,证明所获得的克隆已经成功发生重组。

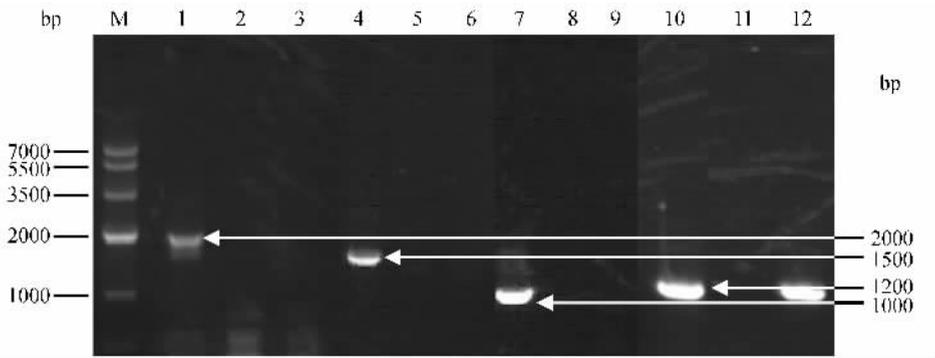


图3 外部引物、内部引物和壮观霉素抗性基因引物验证突变株 $A16R\Delta eag::spc$

Fig.3 PCR identification of mutant $A16R\Delta eag::spc$ using outer, inner and spectinomycin resistance gene primer pairs. M, Marker; 1-3, Id1_F and Id1_R; 4-6, Id2_F and Id2_R; 7-9, InF and InR; 10-12, Spc_SalF and Spc_BamR; 1, 4, 7, 10, $A16R\Delta eag::spc$ chromosome; 2, 5, 8, 11, $A16R$ chromosome; 3, 6, 9, 12, pKSV7usd.

2.3.2 野生株 $A16R$ 和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 的 SDS PAGE 和质谱分析 :少量制备野生株 $A16R$ 和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 的全菌蛋白进行 SDS PAGE 检测。从图中箭头所指的条带可知,它们有很明显

的差异。这条在野生株全菌体中的分子量约为 93 kDa 的条带在突变株中缺失(图 4-A);对箭头所示的差异条带进行质谱分析结果表明该条带为 EA1,正是我们目标缺失蛋白(图 4-B)。

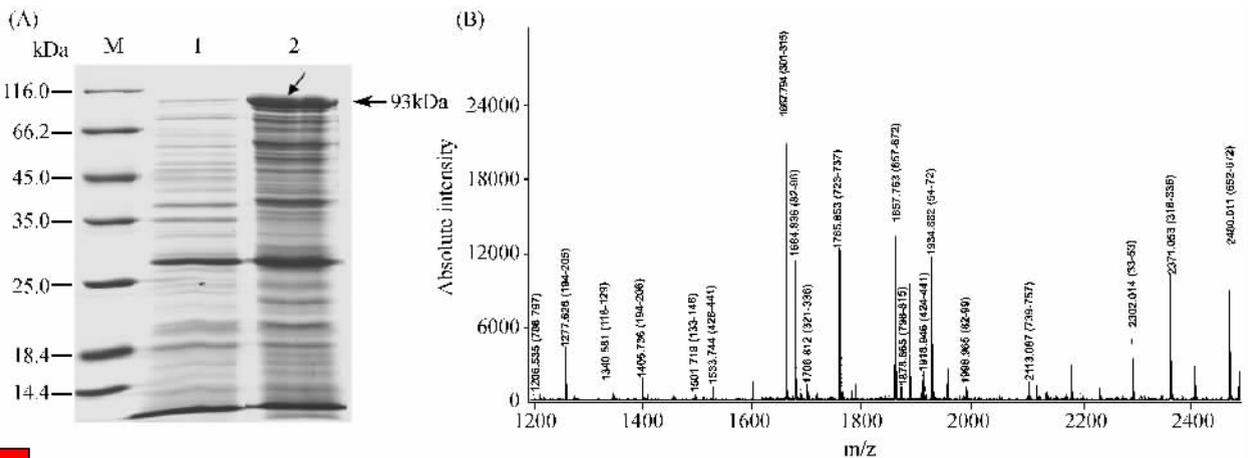


图4 野生株和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 的 SDS PAGE(A)及差异条带 MALDI-TOF-MS 分析(B)

Fig.4 SDS PAGE analysis of wild strain $A16R$ and mutant strain $A16R\Delta eag::spc$ (A) and MALDI-TOF-MS analysis of the differential protein band(B). M, protein Marker; 1, mutant strain $A16R\Delta eag::spc$; 2, wild strain $A16R$. The band pointed by the black arrow in $A16R$ is absent from the mutant strain $A16R\Delta eag::spc$.

2.3.3 野生株 $A16R$ 和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 全菌蛋白的双向电泳和质谱分析 :制备野生株 $A16R$ 和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 生长 17 h 的全菌体蛋白,用 pH4-7 干胶条进行双向电泳的验证,结果显示野生株 $A16R$ 和突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 在大约 93 kDa 处有 3 个明显的表达差异点(黑圈里标出),野生株 $A16R$ 的这 3 个蛋白点在突变株 $A16R\Delta eag::spc$ 全菌体蛋白双向电泳图中消失(图 5-A);对这 3 个点进行质谱分析,结果证明它们都是目标蛋白 EA1(图 5-B)。这表明 $A16R\Delta eag::spc$ 突变体构建成功。

3 讨论

基因敲除是研究基因功能的有效手段之一。即将目的基因缺失,然后分析突变株与野生株的差异,结合相应的功能基因组学方法,研究该基因与其他基因间相互关系的改变,获得与该基因功能相关的一些信息,达到阐明该基因功能的目的^[16]。其中,如何对细菌的基因进行缺失突变是此类研究的前提。对于革兰氏阴性菌,人们已经研究了很多,而且利用 λ 噬菌体 Red 重组系统构建了基因缺失的良好平台^[17]。但是炭疽芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌,在

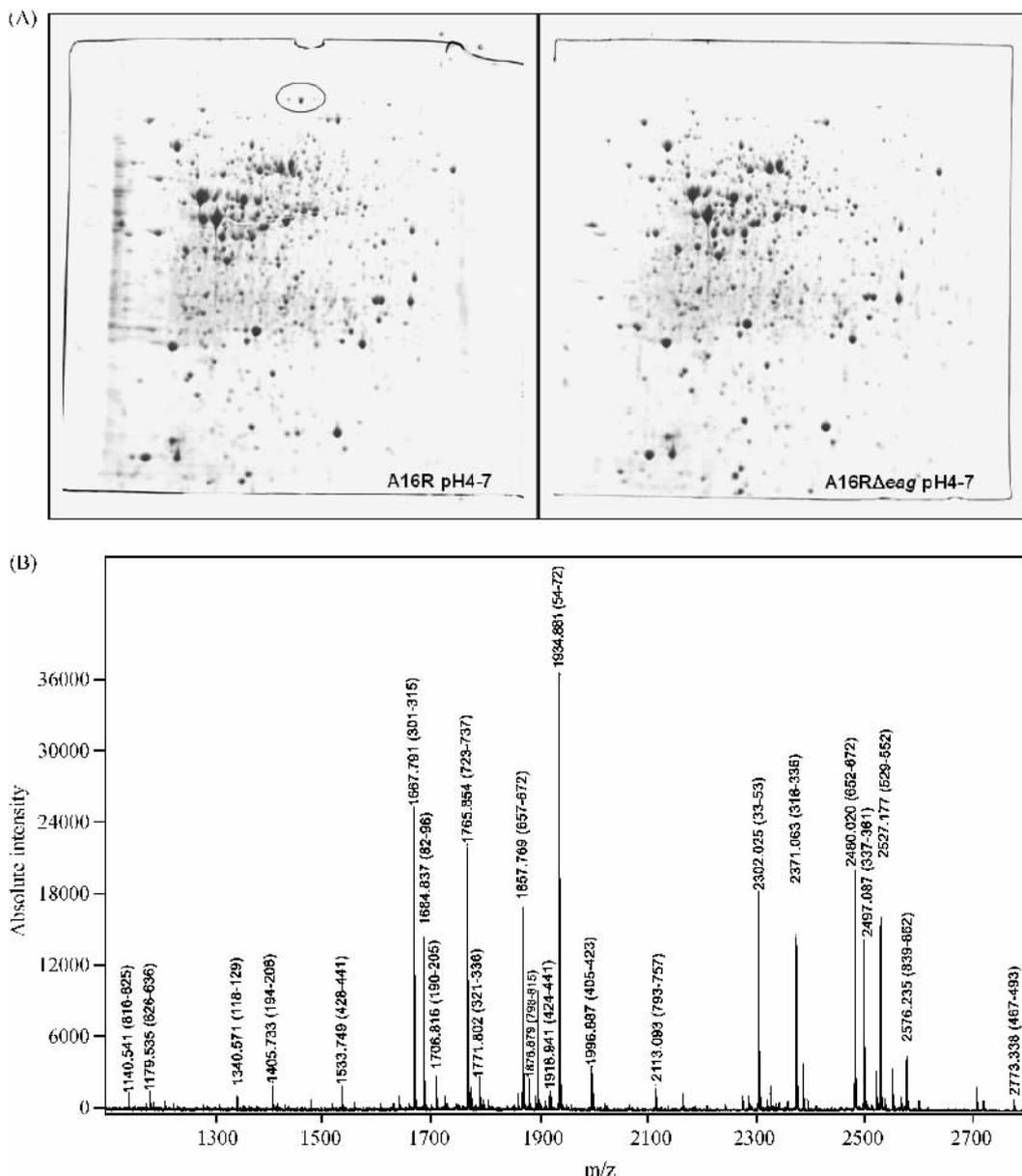


图5 野生株 A16R 和突变株 A16R Δ *eag* : :*spc* 双向电泳图(A)及差异蛋白点的 MALDI-TOF-MS 分析(B)

Fig.5 Two-dimensional gel electrophoresis map of pH4-7 of the whole cell proteins of wild strain A16R and mutant strain A16R Δ *eag* : :*spc* (A) and the MALDI-TOF-MS analysis of the different protein spot. The left map of A is wild strain A16R and the right map of A is mutant strain A16R Δ *eag* : :*spc*. The three protein spots in the black circle of the strain A16R are absent from the mutant strain A16R Δ *eag* : :*spc*.

其突变体的构建过程中,存在许多需要解决的问题。

首先,载体质粒的选择。本实验用 pKSV7 质粒作为载体,是由于它是大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒,温度敏感型,在 30℃ 时能够复制,在 37℃ ~ 42℃ 时不复制,有利于基因缺失质粒的构建及最后的缺失突变体的筛选^[18-19];其次,炭疽杆菌转化体系的构建困难。由于它是革兰氏阳性菌,有厚厚的细胞壁结构,进行质粒转化非常困难,获得对炭疽杆菌的

高效转化也是对炭疽杆菌进行基因操作非常关键的步骤。我们经过查阅文献^[20-21]和不断的改进实验条件最终成功获得了良好的转化体系。主要是:第一,A16R 电转化感受态的制备方法,细胞的 OD_{600} 值控制在 0.4 ~ 0.6;要配制专用的电转化洗液和复苏液,这些液体对于改变感受态细胞的渗透压和细胞膜的通透性具有重要的作用;离心时要控制转速为 $4000 \times g$,尽量缩短每次洗涤后的离心时间大约

2 min,用增大每次的洗液量来减少洗涤的次数,只洗涤2次即可。第二,由于炭疽杆菌对外源甲基化的DNA会发生降解作用,因此进入炭疽杆菌的质粒必须去甲基化。SCS110为Dam Dcm两个甲基化酶缺陷的大肠杆菌菌株,故质粒在其体内复制后是不会发生碱基甲基化。因此质粒在转炭疽之前,先转入该菌中复制,然后提取质粒再转化炭疽芽孢杆菌。在大肠杆菌SCS110中提取的质粒浓度和每次转化的总质量对转化效率的影响很大,质粒的浓度 $>300\text{ ng}/\mu\text{L}$,每次电击转化的质粒总量 $>1\ \mu\text{g}$ 。第三,Δ16R电转化条件,本实验摸索了很多条件包括电压、电阻等方面,最终确定在低电压(6.00 KV/cm)高电阻(500 Ω)的条件下可以获得最佳转化效率。再次,炭疽杆菌中质粒和染色体提取。炭疽芽孢杆菌是一类革兰氏阳性菌,具有厚厚的细胞壁,质粒不好提取,目前炭疽杆菌质粒提取尚没有一种好的方法。常规的质粒提取试剂盒不能直接用于该菌的质粒提取,文献报道的方法大多数需要配制很多液体并且步骤也比较繁琐。我们利用现有的质粒提取试剂盒,只是在菌体收集之后增加一步破壁的过程,其它的过程就与试剂盒完全相同。我们从炭疽芽孢杆菌中提取质粒时只需要配制TE(pH 8.0)和溶菌酶(50 mg/mL)两种试剂,其它的试剂都使用试剂盒中试剂,步骤也完全相同。所以用这种方法提取质粒配液少,并且操作步骤轻车熟路,提取的质粒的浓度和纯度都比较好控制。并且这种方法也适合于从其它革兰氏阳性菌中提取质粒,同样的改进可以用于炭疽杆菌基因组的提取。最后,突变株筛选方法的改进^[22-23]。炭疽芽孢杆菌发生重组率低,所用的温敏型质粒pKSV7不易丢失(文献报道其它的质粒也相同),所以筛选同源重组的克隆是繁重工作,如何提高筛选的效率非常重要。本实验通过在初次对转化的克隆进行筛选时,试管的培养基内不加抗生素,由于没有抗生素的压力,有一部分质粒就会丢失掉,由于初次筛选得到的突变体有很高的假阳性,故把这些克隆转入非限制温度(30℃)进行再次筛选,此时筛选到的克隆大部分都是真正的突变株。此方法明显的提高了筛选的准确性。

本实验在核酸水平和蛋白水平上对筛选到的突变株进行验证。在野生株和突变株的比较蛋白质组学研究中,由于阳性菌具有厚厚的细胞壁,在蛋白样品的制备时超声时间为15 min,一般的阴性菌只须超声8 min即可。由野生株与突变株的双向电泳图

比较可知,目的基因已经缺失,突变株构建成功。这为深入研究eag基因奠定了基础,同时也为炭疽芽孢杆菌重要基因功能的研究建立了一个良好的技术平台。

参考文献

- [1] Turnbull PC. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Current Topics Microbiology Immunology*, 2002, 271: 1-19.
- [2] Friz DL, Jaax NK, Lawrence WB, et al. Pathology of experimental inhalation anthrax in the Rhesus monkey. *Laboratory Investigation*, 1995, 73: 691-702.
- [3] Borio L, Frank D, Mani V, et al. Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. *Journal of the American Medical Association*, 2002, 286(20): 2554-2559.
- [4] Lydia A, Barakat HL, Quentzel JA, et al. Fatal inhalational anthrax in a 94-year-old Connecticut woman. *Journal of the American Medical Association*, 2002, 287(7): 863-868.
- [5] Sleytr UB. Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly and function. *International Review of Cytology*, 1978, 53: 1-64.
- [6] Sleytr UB, Messner P, Pum D, et al. Crystalline bacterial cell surface layers. *Molecular Microbiology*, 1993, 10: 911-916.
- [7] Mesnage S, Tosi-Couture E, Mock M, et al. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Molecular Microbiology*, 1997, 23: 1147-1155.
- [8] Mesnage S, Tosi-Couture E, Mock M, et al. The S-layer homology domain as a means for anchoring heterologous proteins on the cell surface of *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87: 256-260.
- [9] Mignot T, Mesnage S, Couture-Tosi E, et al. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 2002, 43: 1615-1627.
- [10] Beveridge TJ, Pouwels PH, Sara M, et al. Functions of S-layers. *Federation of European Microbiology Reviews*, 1997, 20: 99-149.
- [11] Pei Z, Blaser MJ. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 1990, 85: 1036-1043.
- [12] Agnès Fouet, Michèle Mock. Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9: 160-166.
- [13] Mignot T, Mock M, Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in

- Bacillus anthracis. *Molecular Microbiology* 2003 47 917 – 927.
- [14] Koehler ,Dai Z , Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* Protective Antigen CO₂ and a trans-Acting Element Activate Transcription from One of Two Promoters. *Journal of Bacteriology* ,1994 ,176 586 – 595.
- [15] Quinn CP ,Dancer BN. Transformation of vegetative cells of *Bacillus anthracis* with plasmid DNA. *Journal of General Microbiology* ,1990 ,136 :1211 – 1215.
- [16] Winzeler EA ,Shoemaker DD ,Astromoff A ,et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* ,1999 ,285(5429) :901 – 906.
- [17] Datsenko KA , Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *E. coli* K-12 using PCR products. *Proceeding of the National Academy of Science* ,2000 ,97 (12) 6640 – 6645.
- [18] Arnaud M ,Chastanet A ,Débarbouillé M. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable , Low-GC-Content , Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environment Microbiology* 2004 70 6887 – 6891.
- [19] Smith K ,Youngman P. Use of a new integrational vector to investigate Compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* spollM gene. *Biochimie* ,1992 ,74 705 – 711.
- [20] Green BD ,Battisti L ,Koehler TM ,et al. Demonstration of a Capsule Plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity* ,1985 49(2) 291 – 297.
- [21] Kado CI , Liu ST. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology* ,1981 ,145(3) :1365 – 1373.
- [22] Brunsing RL ,Clair CL ,Tang S ,et al. Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Bacillus anthracis* . *Journal of Bacteriology* 2005 ,187(20) 6972 – 6981.
- [23] Bongioni C , Stoessel R , Shoemaker D , et al. Rap Phosphatase of Virulence Plasmid pXO1 Inhibits *Bacillus anthracis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* ,2006 ,188 (2) 487 – 498.

Construction of *eag* Deletion Mutant of *Bacillus anthracis* vaccine Strain A16R

Meiqin Gao^{1 2#} , Xiankai Liu^{2#} , Erling Feng² , Hengming Tang² , Li Zhu² , Fusheng Chen¹ , Hengliang Wang^{2*}

(¹ Collage of Food Science and Technology ,Huazhong Agariculture University ,Wuhan 430070 ,China)

(² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity ,Beijing Institute of Biotechnology ,Beijing 100071 ,China)

Abstract [Objective] Construction of *eag* deletion mutant of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R. **[Methods]** To study the function of the gene *eag* of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R ,according to the sequence of *Bacillus anthracis* Ames strain , we designed primers and constructed a recombinant plasmid by the spectinomycin resistance cassette ,upstream homologous fragment and downstream homologous fragment of *eag* cloned in tandem in pKSV7. We introduced the recombinant into A16R by electroporation and screened the mutant using the principle of homologous recombination. We checked the mutant using the PCR and proteomics. **[Results]** We constructed the recombinant plasmid successfully and got the *eag* deletion mutant. PCR results showed the gene *eag* was deleted ; SDS PAGE showed evident differences between prime strain and mutant strain. Two-dimensional gel electrophoresis results displayed three EA1 protein points of prime strain were absent in the mutant strain. **[Conclusion]** We constructed *eag* deletion mutant of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R. This research will be helpful to study the functions of *eag* gene and the other important genes of *Bacillus anthracis*.

Keywords : *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R ; homologous recombination ; deletion mutation ; two-dimensional gel electrophoresis

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670104)

* Corresponding author. Tel : + 86-10-66948836 ; E-mail : wanghl@nic.bmi.ac.cn

These authors contributed equally to this work.

Received 21 July 2008/Revised :15 October 2008