DOI:10.16016/j.1000-5404.201602029

类鼻疽伯克霍尔德菌 BPSL1549 基因敲除株的构建及鉴定

胡治强,方 瑶,朱 攀,任春艳,胡 艺,马腾飞,毛旭虎 (400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室)

[摘要] **目的** 构建类鼻疽菌 BPSL1549 基因敲除株[BP(△BPSL1549)],建立有效的类鼻疽菌毒力基因敲除平台。**方法** 设计引物扩增类鼻疽菌 BPSL1549 基因上下游同源臂,连接至 pK18mobSacB 自杀质粒上,通过大肠杆菌 S17-1λpir 以接合方式将其转入类鼻疽菌中。利用同源重组原理替换野生株中的 BPSL1549 基因,经过蔗糖筛选靶标基因敲除株,并采用 PCR、Western blot 检测方法鉴定敲除株,利用动物模型评价敲除株表型变化。**结果** BP(△BPSL1549)菌株与野生株的 BPSL1549 基因两侧同源臂片段 PCR 产物相比缺少 600 bp,Western blot 检测敲除株不表达 BPSL1549 基因编码蛋白,成功构建类鼻疽菌 BPSL1549 基因敲除株。动物实验证实敲除株相比野生株毒力显著降低($P<0.05$)。**结论** 利用同源重组原理成功构建类鼻疽菌 BPSL1549 基因敲除株,完善了类鼻疽菌敲除平台和评价体系。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌;基因敲除;BPSL1549 基因
[中图法分类号] R372;R378.99;R394-33 [文献标志码] A

Construction and identification of *Burkholderia pseudomallei* BPSL1549 gene knockout mutant strain

Hu Zhiqiang, Fang Yao, Zhu Pan, Ren Chunyan, Hu Yi, Ma Tengfei, Mao Xuhu (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To construct *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) BPSL1549 gene knockout mutant strain, and establish efficient *B. pseudomallei* virulence gene knockout platform. Methods Primers were designed to amplify upstream and downstream homologous arms of BPSL1549 gene, and then the arms were linked to pK18mobSacB suicide plasmid. The recombinant suicide plasmid was introduced into *B. pseudomallei* BPC006 from *Escherichia coli* S17-1λpir by conjugation. BPSL1549 gene in wild strain was knocked out by homologous recombination, and the target gene knockout mutant strain was selected by sucrose screening. PCR and Western blotting were used to identify BPSL1549 gene knockout mutant strain. Mouse model was established to evaluate the phenotypic variation of the mutant strain. Results BPSL1549 gene homologous arm fragments of *B. pseudomallei* mutant strain (△BPSL1549) had a lack of 600 bp compared with the wild strain. Western blotting showed that the mutant strain did not express BPSL1549 proteins, indicating that *B. pseudomallei* BPSL1549 gene knockout mutant strain was successfully constructed. In the animal experiments, the virulence of the mutant strain was significantly lower than that of the wild strain ($P<0.05$). Conclusion *B. pseudomallei* BPSL1549 gene knockout mutant strain is successfully constructed by homologous recombination, which improves *B. pseudomallei* gene knockout platform and evaluation system.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; gene knockout; BPSL1549 gene

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471914). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471914)
[通信作者] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160408.1356.004.html(2016-04-08)

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,BP)简称类鼻疽菌,是一种革兰阴性球杆菌,两端钝圆、两极浓染、无芽孢、有鞭毛和菌毛,运动活跃[1],该菌可通过直接接触或吸入气溶胶等方式经破损的皮肤黏膜、呼吸道和消化道引起人或动物感染,造成类鼻疽[2]。类鼻疽虽然最常累及肺部,但几乎可侵犯宿主每一器官[3]。有糖尿病、肾病等基础疾病患者更易患类鼻疽。类鼻疽在流行地区死亡率高,泰国东北部高达50%,尤其急性败血症病死率高达90%以上;且具有较高的复发率(约20%),需要长期使用抗生素防止复发[4]。目前类鼻疽菌的一些毒力因子相关基因已经得到确认,包括荚膜多糖、菌毛、脂多糖、Ⅲ型分泌系统、Ⅵ型分泌系统,如自转运蛋白 BimA、bacA、bacB[5-6],Cif 同源蛋白 CHBP[7]等,其中研究人员发现 BPSL1549 编码的类鼻疽伯克霍尔德菌致死因子(*Burkholderia* lethal factor 1,BLF1)能抑制宿主细胞翻译起始因子 eIF4A 的解旋酶活性,抑制蛋白质合成从而直接杀伤宿主细胞[8]。本研究采用自杀性载体同源重组的方法构建类鼻疽菌 BPSL1549 基因敲除株[BP(△BPSL1549)],建立类鼻疽菌基因敲除平台,同时为进一步研究 BLF1 及其他毒力因子在致病机制中的功能奠定相关技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要菌种和试剂 类鼻疽伯克霍尔德菌 BPC006[9],自杀性质粒 pK18mobSacB(本实验室保存),大肠杆菌 S17-1λpir(第三军医大学基础医学部微生物学教研室惠赠),小鼠巨噬细胞 RAW264.7(ATCC:TIB-71),细菌基因组 DNA 提取试剂盒,质粒小量提取试剂盒,凝胶回收试剂盒,DMEM 培养基(GBI-CO 公司),胎牛血清(Gibco 公司),卡那霉素(Kanamycin,北京天根),限制性内切酶、T_4 连接酶、Primer star® *Taq* 酶、DNA marker(TaKaRa 公司),庆大霉素(Gentamicin,上海生工),0.45 μm 滤膜(Merck Millipore)。

1.1.2 实验动物 健康雌性 BALB/c 小鼠[第三军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0011;实验动物使用许可证号:SYXK(军)2012-0035]16 只,6 周龄,SPF 级,体质量 20~25 g。

1.2 BPSL1549 基因敲除株的构建

1.2.1 重组自杀性载体 pK18mobSacB::△BPSL1549 的构建 根据 NCBI 数据库中类鼻疽菌 BPC006 全基因组序列中 BPSL1549 基因及其两侧序列,设计 3 对引物分别扩增 BPSL1549 基因及其两端的同源臂(表1),送上海生工生物工程公司合成,用于后续载体的构建及验证。

将 BP 接种到 LB 液体培养基中,37℃振荡培养过夜,收集细菌,提取基因组。利用设计的引物 pL1/pL2 和 pR1/pR2 以 BP 基因组为模板分别进行 PCR 扩增。PCR 反应总体系为 20 μL,反应条件为 95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,57 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 ℃终延伸 7 min。反应结束取 10 μL 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将 PCR 扩增的 L-BPSL1549 和 R-BPSL1549 片段切胶回收保存。把 pK18mobSacB 质粒和 L-BPSL1549 片段分别用 *Eco*RⅠ和 *Xba*Ⅰ双酶切后使用 T_4 DNA 连接酶 16 ℃连接 12 h,连接产物转化入 TOP10 感受态细胞,涂布于含卡那霉素(250 μg/mL)的 LB 平板,37 ℃培养过夜,挑取单菌落振荡培养并提取质粒双酶切鉴定。得到的阳性重组质粒与 R-BPSL1549 片段使用 *Xba*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切,然后用 T_4 DNA 连接酶连接,连接产物转入 TOP10 感受态细胞,在卡那霉素抗性 LB 平板上进行筛选,提取质粒酶切鉴定,将构建的阳性重组自杀性质粒命名为 pK18mobSacB::△BPSL1549。

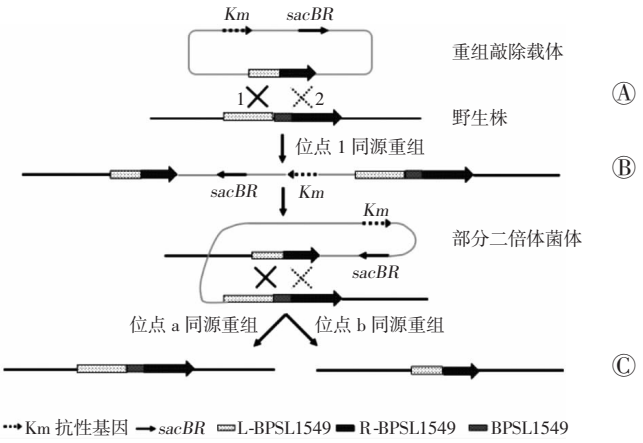
1.2.2 重组自杀性载体的转导 用 $CaCl_2$ 转化法制备 S17-1λpir 感受态细胞,将 pK18mobSacB::△BPSL1549 质粒转化至 S17-1λpir 感受态细胞,筛选鉴定含有重组自杀质粒的 S17-1λpir 细菌。将受体菌 BP(Gm^R)和供体菌 S17-1λpir(pK18mobSacB::△BPSL1549)分别接种 10 mL LB(Gm 100 μg/mL)和 LB(Km 250 μg/mL)

表1 引物序列与产物长度

扩增片段	引物名称	序列	产物长度(bp)
BPSL1549	p1	5′-AGGCCGTTCGATCGGATACGTT-3′	600
	p2	5′-CGAACCGGATCATCGAAGTGTC-3′	
bpsl549 左侧翼序列(L-BPSL1549)	pL1	5′-CGGAATTCGATTTGCCGCCCAGTTCGAG-3′(*Eco*RⅠ)	1100
	pL2	5′-GCTCTAGAGGCCTGGCGAATCTGAGCT-3′(*Xba*Ⅰ)	
bpsl549 右侧翼序列(R-BPSL1549)	pR1	5′-GCTCTAGAGCGGCAGCGGCTCGCCTTCG-3′(*Xba*Ⅰ)	1100
	pR2	5′-CCCAAGCTTCAACTACGACGACTACATGCTC-3′(*Hind*Ⅲ)	

划线部分为设计的酶切位点

液体培养基中,37 ℃振荡过夜培养,按 1∶100 进行活化,D(600)值达到 0.4 ~ 0.5 时,按照 1∶4比例把受体菌和供体菌混匀,0.45 μm 孔径滤膜过滤,将滤膜置于无抗性的 LB 平板 37 ℃培养过夜(注意不要倒置平板),收集滤膜上的细菌,用 LB 液体倍比稀释后涂布于 LB(Gm 100 μg/mL,Km 250 μg/mL)双抗平板上。重组自杀性质粒通过接合方式从供体菌转移到受体菌,与细菌基因组 DNA 发生第 1 次同源重组(图 1A、B),通过抗生素筛选和 PCR 鉴定 BPSL1549 基因二倍体菌株 BP(pK18mobSacB∷△BPSL1549);然后利用 SacB 基因的蔗糖筛选压力使部分二倍体上的重组载体丢失发生第 2 次同源重组(图 1C),最终获得目的基因敲除株。



A:自杀性载体的构建;B:第 1 次同源重组;2:第 2 次同源重组

图 1　自杀性载体 pK18mobSacB∷△BPSL1549 同源重组示意图

1.2.3　BPSL1549 基因敲除株的筛选与鉴定　　将 BP(pK18mobSacB∷△BPSL1549)二倍体接种到 LB(Gm 100 μg/mL)培养基中 37 ℃振荡培养 12 h。对过夜培养物稀释数倍后涂布于 LB(Gm 100 μg/mL,蔗糖 10%,无 NaCl)蔗糖琼脂平板,24 ℃静置培养 48 h。用接种环挑取蔗糖平板上长出的单个菌落分别接种到 LB(Gm 100 μg/mL)和 LB(Km 250 μg/mL)琼脂平板,对 Gm^R、Km^S 菌株进行 PCR 扩增,序列测定。鉴定 BPSL1549 基因敲除株,即 BP(△BPSL1549)。

1.2.4　BPSL1549 基因敲除株的 Western blot 检测

用本实验室制备的兔抗 BPSL1549 纯化蛋白为一抗(稀释倍数 1∶2 000),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗(稀释倍数为 1∶5 000,中杉金桥),对野生型和突变型 BP 全菌蛋白进行 Western blot 检测分析,具体操作方法见参考文献[8]。

1.2.5　BPSL1549 基因敲除株的毒力检测试验　　将 BP(△BPSL1549)和野生株 BP 接种于 10 mL LB 液体培养基中,37 ℃振荡过夜培养,第 2 天以 1∶100 活化,当 D(600)达到 1 时,用倍比稀释法进行细菌计数;把 16 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠分成 2 组,每组8 只,以滴鼻方式接种细菌,每只小鼠接种 1.0×10^5 CFU 活菌;每天观察小鼠临床表现、记录发病和死亡情况,连续观察 30 d。

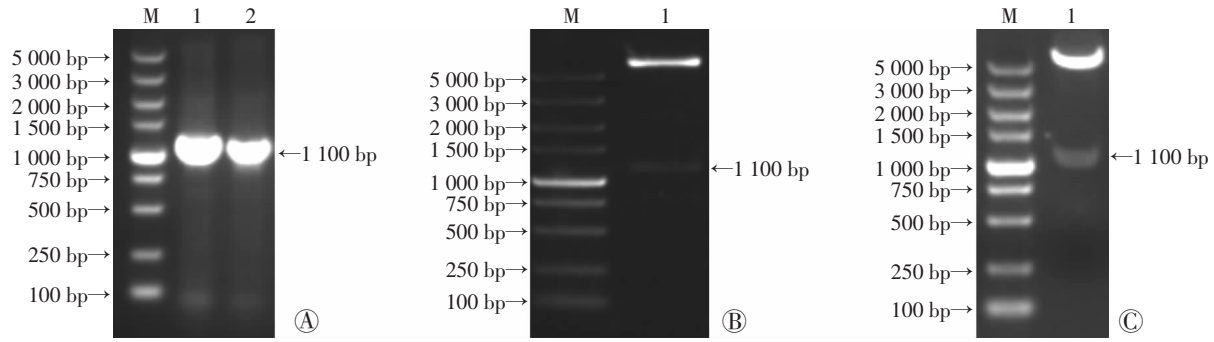
1.3　统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 5 统计学软件进行处理。

2　结果

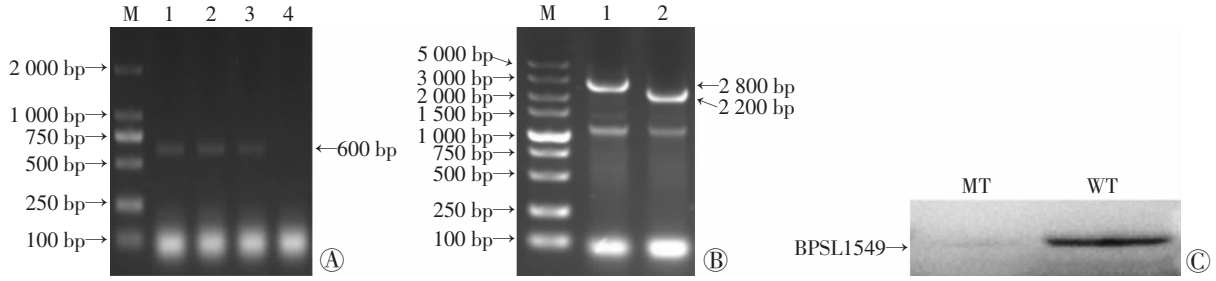
2.1　重组自杀性载体 pK18mobSacB∷△BPSL1549 的鉴定

BP 基因组为模板,分别以 pL1/pL2 和 pR1/pR2 为引物对,PCR 扩增 L-BPSL1549 和 R-BPSL1549 目的基因片段均约为 1 100 bp(图 2A)。以重组质粒 pK18mobSacB∷△BPSL1549 为模板,用引物 pL1/pL2 和 pR1/pR2 可以分别扩增出约 1 100 bp 片段,再分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Xba* Ⅰ,*Xba* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定获得符合预期的 1 100 bp 条带(图 2B、C)。



A:BPSL1549 两端同源臂扩增片段　M:标准(DL5000);1:L-BPSL1549 目的片段;2:R-BPSL1549 目的片段;B:L-BPSL1549 酶切鉴定　M:标准(DL5000);1:pK18mobSacB∷△BPSL1549/(*Eco*R Ⅰ + *Xba* Ⅰ);C:R-BPSL1549 酶切鉴定　M:标准(DL5000);1:pK18mobSacB∷△BPSL1549/(*Xba* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)

图 2　重组自杀性载体 pK18mobSacB∷△BPSL1549 的鉴定



A:筛选克隆 BPSL1549 片段扩增　M:标准(DL2000);1~3:阴性克隆;4:阳性克隆;B:阳性克隆鉴定　M:标准 DL5000;1:野生株(L-BPSL1549-R);2:敲除株(L-BPSL1549-R);C:Western blot 检测敲除株和野生株 BPSL1549 蛋白表达　MT:敲除株;WT:野生株

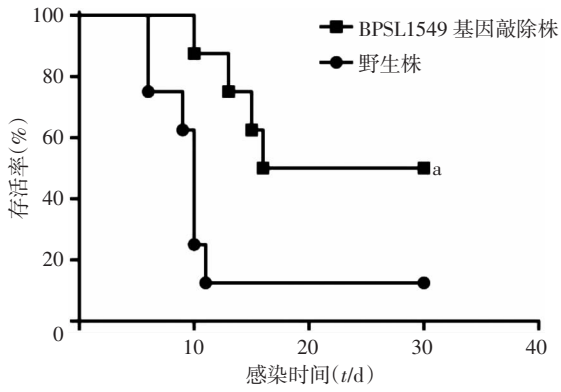
图 3　BPSL1549 基因敲除株的筛选与鉴定

2.2　BPSL1549 基因敲除株的筛选与鉴定

用蔗糖平板筛选出 Gm^R、Km^S菌落,说明该菌落已经丢失重组自杀性载体 pK18mobSacB::△BPSL1549,发生了同源重组交换。分别将长出的菌落接种到 LB(Gm 100 μg/mL)液体培养基中 37 ℃培养过夜,提取细菌基因组,用引物 p1/p2 进行 PCR 鉴定。在挑取的菌落中只有 1 个菌落扩增不出约 600 bp 的 BPSL1549 基因片段(图 3A),该菌落可能是敲除成功菌株,用引物 pL1/pR2 分别扩增该菌株和野生株的 BPSL1549 基因两侧同源臂片段(L-BPSL1549-R)获得约 2 200 bp 和 2 800 bp 条带(图 3B),将两片段的测序结果进行比对分析,结果显示该菌株比野生株缺失了 BPSL1549 基因片段,与实验预期一致。同时 BP 全菌蛋白 Western blot 检测分析进一步证明该菌株因缺失 BPSL1549 基因无法表达其蛋白(图 3C)。

2.3　BPSL1549 基因敲除株的毒力检测

对分别滴鼻接种 BP(△BPSL1549)和野生株的小鼠进行观察,接种野生株的小鼠 4 d 后开始出现毛发蓬乱、精神萎靡、闭眼蜷缩、食欲减退等表现,5 d 即开始出现死亡,解剖后发现小鼠脾脏后端、肝脏右叶出现脓肿,12 d 内 8 只小鼠死亡 7 只。而接种 BP(△BPSL1549)菌株小鼠在 10 d 后才开始出现相似症状,发病较慢,死亡率低,30 d 内 8 只小鼠仅死亡 4 只。生存曲线见图 4。同时,观察到野生株组小鼠产生神经损伤现象如转圈、打滚等,而 BP(△BPSL1549)菌株组小鼠未见明显的神经损伤症状。表明 BP(△BPSL1549)菌株的毒力与野生株相比明显降低。



a:$P<0.05$,与野生株比较

图 4　BPSL1549 基因敲除株和野生株感染小鼠的生存曲线

3　讨论

类鼻疽菌具有高致病性、强抵抗力和气溶胶传播的特性,可作为潜在的生物武器,被 WHO 列为 B 类生物恐怖剂[10],对公共卫生安全造成巨大潜在威胁。类鼻疽菌基因组全长 7.14 Mb,编码多种毒力因子和抗原结构,主要包括荚膜多糖、鞭毛、菌毛、群体感应分子、Ⅲ型分泌系统及Ⅵ型分泌系统等[11],不同类鼻疽菌株之间还存在多种基因组岛。对这些毒力因子基因和基因岛进行缺失突变对于类鼻疽的毒力研究、疫苗开发以及发现新的诊断靶标都具有重要的理论指导意义。因此,急需建立一种高效同时不引入其他选择标记的基因敲除或突变的技术。

本研究根据同源 DNA 片段可发生同源重组的原理,采用 pK18mobSacB 自杀性质粒系统构建基因缺失突变株,该质粒含有缺陷的 R6K 复制子,必须在 pir 基因

编码的π蛋白作用下才能发挥作用,因此pK18mobSacB只能在表达π蛋白的特定宿主菌(如大肠杆菌S17-1λpir)内才能复制,而在其他非特定细菌中会逐渐丢失[12]。同时,pK18mobSacB含有枯草杆菌的果聚糖蔗糖酶基因(SacB基因),能编码果聚糖蔗糖酶,催化蔗糖水解为对多数革兰阴性菌有毒性作用的果聚糖。因此,在含有蔗糖的培养基中,含有该质粒的菌株将不能生长。尽管类鼻疽菌全基因组能够编码SacB基因,但实际上类鼻疽菌对蔗糖并不敏感,可能是由于携带SacB基因的不同宿主菌对蔗糖的敏感性不同,其次培养温度也会影响SacB基因的表达,因此需要选择合适的蔗糖浓度及温度才能使SacB基因发挥作用。

2007年,对类鼻疽菌和泰国伯克霍尔德菌的蛋白质组学分析发现了14个功能未知的预测蛋白[13]。Cruz-Migoni等[8]采用X射线晶体衍射技术对其中的BPSL1549蛋白结构进行解析,确定该蛋白是类鼻疽菌的首个能直接杀伤宿主细胞的毒力因子。因此,BPSL1549蛋白又称为类鼻疽伯克霍尔德致死因子1(BLF1)。BLF1由BPSL1549基因编码,含有211个氨基酸,相对分子质量为23×10^3[14]。BLF1可作用于真核细胞起始翻译因子eIF4A的Gln339使其脱酰胺变为Glu339,抑制RNA解旋酶活性,使细胞蛋白质合成受到广泛抑制从而导致宿主疾病。BPSL1549基因作为类鼻疽菌的重要毒力因子,构建BPSL1549基因敲除株,有助于类鼻疽发病机制的研究及其减毒活疫苗的开发。同时以该方法为例建立了便捷高效的类鼻疽菌基因敲除平台,为类鼻疽菌其他相关毒力因子的进一步研究奠定基础。

参考文献:

[1] Cheng A C, Currie B J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 383-416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005

[2] Leelarasamee A. Recent development in melioidosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17(2): 131-136.

[3] Currie B J, Fisher D A, Anstey N M, *et al*. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000, 94(3): 301-304.

[4] Stevens M P, Haque A, Atkins T, *et al*. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type Ⅲ secretion mutant in murine models of melioidosis[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 8): 2669-2676. DOI: 10.1099/mic.0.27146-0

[5] Campos C G, Borst L, Cotter P A. Characterization of BcaA, a putative classical autotransporter protein in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Infect Immun, 2013, 81(4): 1121-1128. DOI: 10.1128/IAI.01453-12

[6] Lazar Adler N R, Stevens J M, Stevens M P, *et al*. Autotransporters and Their Role in the Virulence of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 151. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00151

[7] Pumirat P, Broek C V, Juntawieng N, *et al*. Analysis of the prevalence, secretion and function of a cell cycle-inhibiting factor in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei*[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96298. DOI: 10.1371/journal.pone.0096298

[8] Cruz-Migoni A, Hautbergue G M, Artymiuk P J, *et al*. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A[J]. Science, 2011, 334(6057): 821-824. DOI: 10.1126/science.1211915

[9] Fang Y, Huang Y, Li Q, *et al*. First genome sequence of a *Burkholderia pseudomallei* Isolate in China, strain BPC006, obtained from a melioidosis patient in Hainan[J]. J Bacteriol, 2012, 194(23): 6604-6605. DOI: 10.1128/JB.01577-12

[10] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013

[11] D'Cruze T, Gong L, Treerat P, *et al*. Role for the *Burkholderia pseudomallei* type three secretion system cluster 1 bpscN gene in virulence[J]. Infect Immun, 2011, 79(9): 3659-3664. 10.1128/iai.01351-10

[12] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, *et al*. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum[J]. Gene, 1994, 145(1): 69-73.

[13] Wongtrakoongate P, Mongkoldhumrongkul N, Chaijan S, *et al*. Comparative proteomic profiles and the potential markers between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*[J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(2): 81-91. DOI: 10.1016/j.mcp.2006.08.006

[14] 任春艳, 李倩. 类鼻疽伯克霍尔德致死因子[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(3): 47-50. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2015.03.011

(**收稿**:2016-02-12;**修回**:2016-03-14)

(编辑 王 红)