

## • 论著 •

## 结核分枝杆菌毒素-抗毒素系统 *mazEF6* 缺失突变株的构建及其表型的初步探讨

申爱平, 曹帅丽, 邢建新, 袁俐

石河子大学医学院病原生物学与免疫学教研室, 石河子 832002

**摘要:**为构建结核分枝杆菌毒素-抗毒素系统 *mazEF6* 缺失突变株, 并对其表型进行初步探讨, 首先用聚合酶链反应(PCR)分别从 H37Rv 标准株和 PUC-19K 质粒扩增出 *mazEF6* 基因的同源臂及卡那霉素抗性基因 *kan*; 然后应用融合 PCR 技术将 *mazEF6* 基因的同源臂与 *kan* 基因进行杂交拼接, 获得目的融合片段, 将该融合片段克隆于 pMD-19T(simple)载体形成自杀质粒 pMD-19T- $\Delta$ *mazEF6-kan*, 并将自杀质粒转化至大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中; 最后利用电穿孔技术将自杀质粒电转至 H37Rv 标准株中, 在卡那霉素抗性改良罗氏培养基上筛选 H37Rv  $\Delta$ *mazEF6* 缺失突变株单个菌落, 提取阳性菌株全基因组 DNA 为模板, PCR 扩增克隆片段并测序。将所获得的 H37Rv  $\Delta$ *mazEF6* 缺失突变株进行遗传稳定性检测后, 对其表型进行初步研究。结果显示, 该缺失株在 15 代内未发生回复性突变; 与野生株相比, 缺失株生长速度缓慢且细菌形态短小。本研究证实, 融合 PCR 技术便于快速获得结核分枝杆菌缺失突变株; 结核分枝杆菌在缺失毒素-抗毒素系统 *mazEF6* 基因后生存能力下降, 这为进一步研究毒素-抗毒素系统的作用奠定了基础。

**关键词:**结核分枝杆菌; 毒素-抗毒素系统; 缺失突变株

## Construction and characterization of toxin-antitoxin system *mazEF6* deletion in *Mycobacterium tuberculosis*

SHEN Ai-Ping, CAO Shuai-Li, XING Jian-Xin, YUAN Li

Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China

**Abstract:** To study the toxin-antitoxin system *mazEF6* of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), deletion mutants were constructed and subjected to phenotype analysis. First, the flanking (homology arms) of *mazEF6* gene from H37Rv and kanamycin resistance gene (*kan* gene) from plasmid PUC-19K were amplified by polymerase chain reaction (PCR) respectively. Second, fusion PCR was used for the hybrid splicing of *mazEF6* homology arms and *kan* gene, and the desired fusion fragment was obtained. Then the fragment was cloned into pMD-19T (simple) vector to form a suicide plasmid (pMD-19T- $\Delta$ *mazEF6-kan*), and the suicide plasmid was transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$ . At last, the constructed plasmid was transformed into H37Rv by electroporation. Single colonies of *M. tuberculosis* were screened on L-J medium with kanamycin, the genomic DNA of positive strains were extracted, and the targeted fragments were amplified by PCR and sequenced. The genetic stability and other phenotypes of the H37Rv  $\Delta$ *mazEF6* deletion mutant were studied. The results showed that the deletion mutant strains did not present

基金项目:国家自然科学基金(81160368、81341079)

通信作者:袁俐

Corresponding author. YUAN Li, E-mail: yuanli832000@sina.com

reverse mutant within 15 generations. Compared with the wild-type strains, H37Rv  $\Delta mazEF6$  deletion mutant strains grew more slowly and the bacterial cell was relatively shorter. This study demonstrated that it is practical to obtain *M. tuberculosis* deletion mutant by fusion PCR technology, and the survival ability of *M. tuberculosis* without toxin-antitoxin *mazEF6* gene is decreased.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Toxin-antitoxin system; Deletion mutant strain

结核病(tuberculosis, TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起最常见的、人兽共患慢性传染病。随着结核分枝杆菌耐药率升高、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)合并结核分枝杆菌感染增多,结核病在全球的流行日趋增强。

结核分枝杆菌的毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TAS)也被称为成瘾或自杀模块,由一个自动调节的操纵子组成,该操纵子编码稳定的毒素 *mazF* 和不稳定的抗毒素 *mazE*<sup>[1]</sup>。在应激条件下,亲和性复合物中的抗毒素被降解,毒素释放后干扰或改变细菌的代谢及生物合成,介导细菌死亡、耐药或持留生存形成<sup>[2]</sup>,也可减慢、抑制细胞生长,甚至杀死细胞<sup>[3]</sup>。结核分枝杆菌的 TAS 可能与促进细菌适应不断变化的生长速率、长期休眠和产

生多重耐药有关<sup>[4]</sup>,对其功能的研究有利于了解结核分枝杆菌致病机制,为开发新的抗结核药提供新靶点。

本研究通过构建结核分枝杆菌 TAS *mazEF6* 缺失突变株,并对其表型进行初步研究,为进一步揭示 TAS 对细菌生存能力的影响提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 结核分枝杆菌 H37Rv、PUC-19K 质粒、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

**1.1.2 引物** 所用引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of PCR primers

Primer	Sequence (5' → 3')
MazEF6-N-F	TTCATTACGGCGTGGCT
MazEF6-N-R	GACATTCCAGGTGCCCTTTGTCTATTGATTGTCATGT
MazEF6-C-F	<i>TCTGGGGTCGAAATGACCGAATTGCGGCCGAGGACAAGGCTCA</i>
MazEF6-C-R	CGCTATTGCTGGTCAAACAC
Kan-F	GCCACCTGGATGAATGTC
Kan-R	CGGTCATTCGAACCCCCAGA
MazEF6-N'-F	AAGTCGTTGCTTGTGAGGCGTTGG
MazEF6-C'-R	AGCTCGCAGATCATGTGGC

Italics indicates overlapping connector.

### 1.2 方法

**1.2.1 *mazEF6* 同源臂及卡那霉素抗性基因 *kan* 的扩增** 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组和 PUC-19K 质粒为模板,应用高保真 DNA 聚合酶,扩增出 *mazEF6* 的 N、C 端同源臂及卡那霉素抗性基因 *kan*。反应条件见表 2。所得产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 凝胶试剂盒回收,−20 °C 保存备用。

**1.2.2 重叠延伸拼接-聚合酶链反应扩增构建体外 *mazEF6* 基因的同源重组片段** 将回收的 *mazEF6* 同源臂及 *kan* 基因的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物按(N 端同源臂的量)×(N 端同源臂片段长度)<sup>-1</sup>:(*kan* 基因的量)×(*kan* 基因片段长度)<sup>-1</sup>:(*C* 端同源臂的量)×(*C* 端同源臂片段长度)<sup>-1</sup>=1:1:1 的比例混合,不加引物,用 2×Taq PCR MasterMix 进行 3 个片段的

互补延伸,以形成全长的融合 PCR 产物(中间产物)。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,45 °C 3 min,72 °C 3 min,1个循环;72 °C 10 min。再以中间产物为模板,加入引物 MazEF6-N-F、MazEF6-

C-R,进行融合片段的全长扩增。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,51 °C 30 s,72 °C 2 min,35个循环;72 °C 10 min(图 1)。

表 2 PCR 反应条件

Tab. 2 The reaction conditions of PCR

Gene	Primer	Template	The reaction conditions of PCR
<i>mazEF6-N</i>	MazEF6-N-F	H37Rv	94 °C 5 min;94 °C 30 s,64 °C 30 s,
	MazEF6-N-R		72 °C 30 s,35 cycles;72 °C 8 min
<i>mazEF6-C</i>	MazEF6-C-F	H37Rv	94 °C 5 min;94 °C 30 s,61 °C 30 s,
	MazEF6-C-R		72 °C 30 s,35 cycles;72 °C 8 min
<i>kan</i>	Kan-F	PUC-19K	94 °C 5 min;94 °C 30 s,51 °C 30 s,
	Kan-R		72 °C 1 min,35 cycles;72 °C 10 min

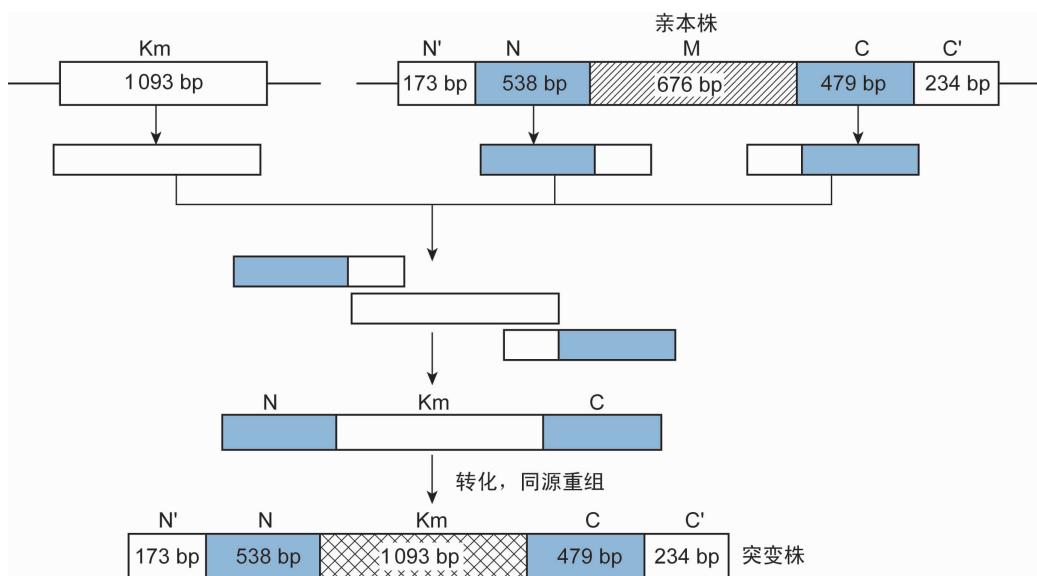


图 1 T载体克隆构建结核分枝杆菌突变株的原理

Fig. 1 The principle of construction of *M. tuberculosis* mutant using T vector cloning

**1.2.3 pMD-19T-Δ*mazEF6-kan* 同源重组质粒的构建** 所得同源重组片段 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收,用 *T4* DNA 连接酶(Thermo 公司)将所得克隆片段连接 pMD19-T (simple) (TaKaRa 公司)载体后,转化入大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  克隆菌株,在氨苄西林和卡那霉素双抗培养基上筛选出阳性菌,进行菌液 PCR,将能扩增出克隆片段的阳性菌株送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序正确的菌株扩大培养后,用质粒小提试剂盒提取质粒,−20 °C 保存备用。

**1.2.4 结核分枝杆菌 H37Rv Δ*MazEF6* 缺失突变株的筛选和鉴定** 取约 2  $\mu$ l 自杀质粒,加入 200  $\mu$ l

结核分枝杆菌 H37Rv 感受态细胞中,混匀,冰上静置 20 min,移入 1 mm 电击杯中,E=2.5 kV/cm 电击 1 次,立即加入 37 °C 预热的 2 ml 7H9 培养基中(BD 公司)。37 °C 摆床培养 24 h,8 000 r/min 离心 3 min,吹打均匀,接种于卡那霉素抗性罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司)。培养 2~3 周后,挑取单菌落分别接种至 7H9 液体培养基,2 周后提取结核分枝杆菌全基因组 DNA,分别以引物 MazEF6-N-F、Kan-R,引物 Kan-F、MazEF6-C-R,引物 MazEF6-N'-F、MazEF6-C'-R 扩增出片段 N-K、K-C、N-C 及外延后片段 N'-C',并对 PCR 产物进行测

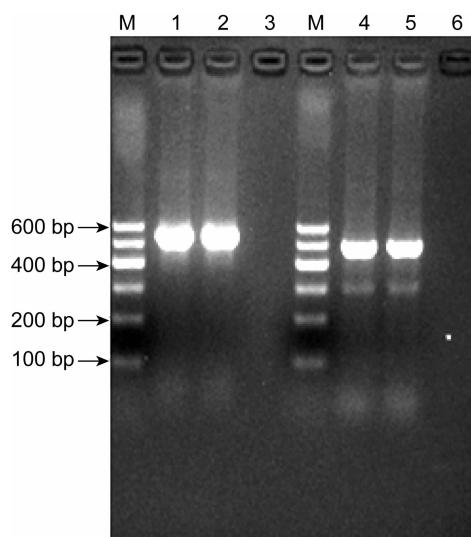
序。将测序正确的菌株接种于改良罗氏培养基,传至 15 代,得到稳定的 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变株,再次测序。以上实验在石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室完成。

**1.2.5 结核分枝杆菌 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变株生存能力的初步检测** 选取在改良罗氏培养基上生长旺盛的结核分枝杆菌标准株 H37Rv 和 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变菌株,接种至 7H9 液体培养基,置于 37 ℃恒温摇床培养。当细菌生长达对数期时,将细菌密度调整至 1 个标准麦氏单位,各取 100  $\mu$ l 菌液分别接种于 10 ml 7H9 液体培养基中<sup>[5]</sup>,置于 37 ℃恒温摇床培养。在培养过程中的不同时间点(第 3、6、9、12、15、18、21 天)对菌液密度进行测定,同时取等量菌液进行一系列 10 倍稀释后接种至改良罗氏培养基,37 ℃培养 3~4 周,观察菌落生长状态,并对各时间点的菌株进行结核分枝杆菌抗酸染色,观察野生株与突变株在显微镜下的形态差异。

## 2 结果

### 2.1 *mazEF6* 同源臂和卡那霉素抗性基因 *kan* 的扩增及鉴定

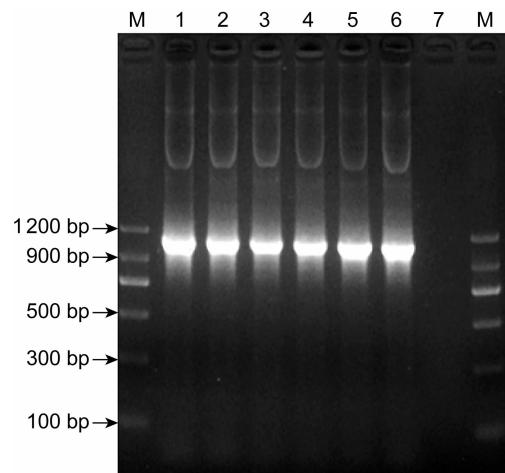
以结核分枝杆菌 H37Rv 标准株为模板扩增出 *mazEF6* 的 N 端同源臂条带大小为 538 bp,扩增出 *mazEF6* 的 C 端同源臂条带大小为 479 bp(图 2),以 PUC-19K 质粒为模板扩增出 *kan* 基因条带大小为 1 093 bp(图 3),目的条带大小均与预期一致。



M, DNA marker; 1 and 2, *MazEF6*-6 homologous arm of N-terminal; 3 and 6, negative control; 4 and 5, *MazEF6*-6 homologous arm of C-terminal.

图 2 *MazEF6* 同源臂 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *MazEF6* homologous arm



M, DNA marker; 1 to 6, *kan* gene; 7, negative control.

图 3 *kan* 基因的扩增片段

Fig. 3 PCR amplification of *kan* gene

### 2.2 pMD-19T- $\Delta mazEF6$ -*kan* 同源重组质粒的鉴定

由于 pMD19-T(simple)载体本身含氨苄西林抗性,克隆片段具有卡那霉素抗性,故构建成功的自杀质粒可在含有氨苄西林和卡那霉素的 LB 固体培养基上生长。以阳性菌的质粒为模板,用引物 *MazEF6-N-F* 和 *MazEF6-C-R* 扩增出的同源重组片段大小为 2 110 bp,结果与预期一致(图 4、5)。

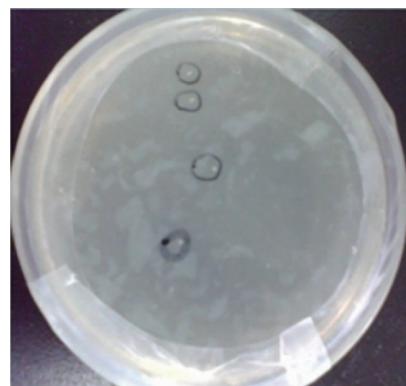


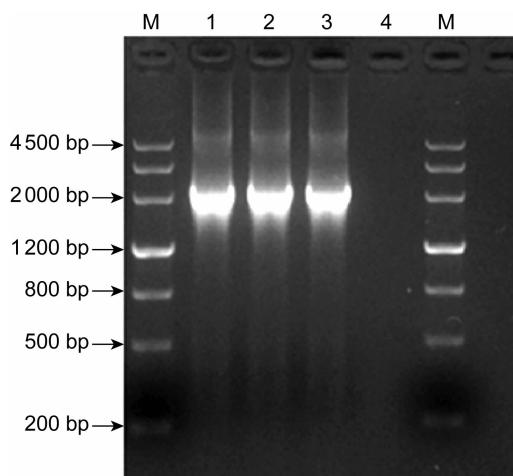
图 4 构建成功的同源重组质粒

Fig. 4 Construction of homologous recombination plasmid

### 2.3 结核分枝杆菌 H37Rv $\Delta mazEF6$ 缺失突变株的筛选

挑取电转后在卡那霉素抗性培养基中生长的结核分枝杆菌单个菌落,提取全基因组 DNA 为模板,分别以引物 *MazEF6-N-F*、*Kan-R*,引物 *Kan-F*、*MazEF6-C-R*,引物 *MazEF6-N-F*、*MazEF6-C-R*,外延引物 *MazEF6-N'-F*、*MazEF6-C'-R* 扩增出的 N-K 条带大小为 1 631 bp, K-C 条带大小为 1 572 bp, N-C 条带大小为 2 110 bp,外延后 N'-C' 条带大小为 2 517 bp(图 6)。目的条带大小均与预期一致,证明

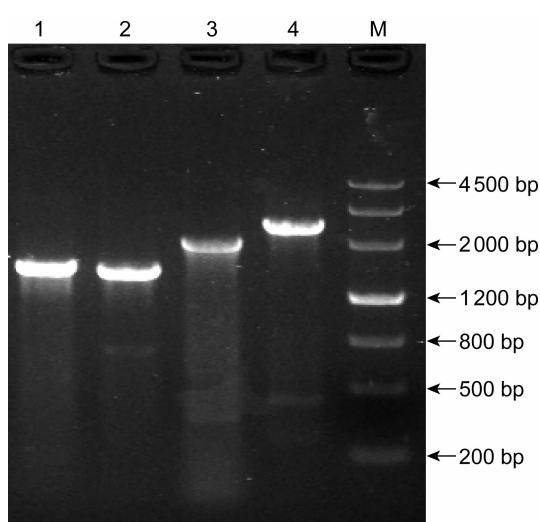
成功获得结核分枝杆菌 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变株。



M, DNA marker; 1 to 3, homologous recombination plasmid; 4, negative control.

图 5 同源重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of homologous recombination plasmid



M, DNA marker; 1, N-K; 2, K-C; 3, N-C; 4, N'-C'.

图 6 以缺失株为模板扩增出的 N-K、K-C、N-C、N'-C' 片段

Fig. 6 Amplification of N-K, K-C, N-C and N'-C' fragments with deletion mutant as a template

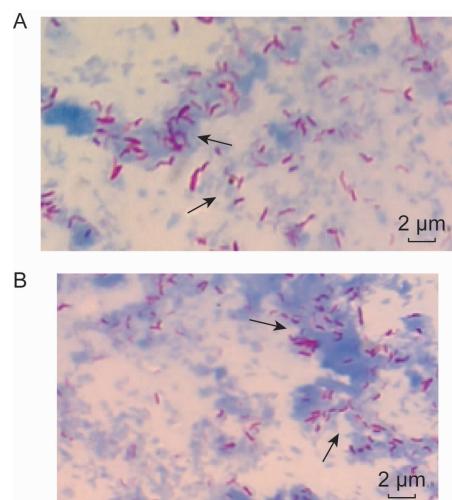
## 2.4 结核分枝杆菌 H37Rv $\Delta MazEF6$ 缺失突变株的遗传稳定性检测

将所获得的基因缺失株送上海生工生物技术服务有限公司测序,所得结果与克隆片段基因比对同源度为 100%,传至第 15 代,再次测序,未发生回复性突变,成功获得具有遗传稳定性的 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失株。

## 2.5 结核分枝杆菌 H37Rv $\Delta MazEF6$ 缺失突变株的生长情况

在改良罗氏培养基上, H37Rv 和 H37Rv

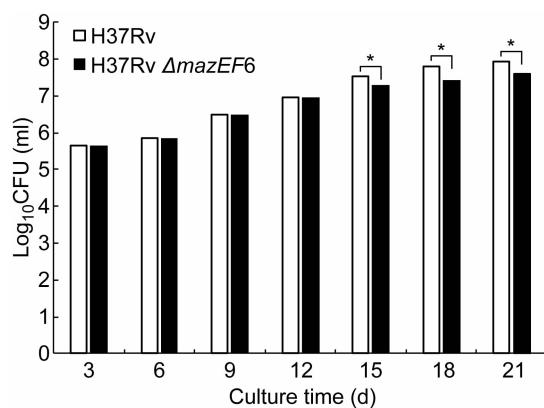
$\Delta mazEF6$  缺失突变菌株均为淡黄色菌落,呈菜花样生长。H37Rv 和 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变菌株在各时间点的抗酸染色显示,与野生株相比,突变株形态较短小(图 7)。观察比较不同时间点 H37Rv 与 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变菌株的活菌数,结果显示,在培养第 3、6、9 和 12 天, H37Rv 与 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变菌株的活菌数不同,但差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。在培养的第 15、18 和 21 天, H37Rv 菌株的活菌数显著高于 H37Rv  $\Delta mazEF6$  缺失突变菌株,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 8)。



A: H37Rv. B: H37Rv  $\Delta mazEF6$ .

图 7 H37Rv 和 H37Rv  $\Delta mazEF6$  对数期染色图片

Fig. 7 H37Rv and H37Rv  $\Delta mazEF6$  in the logarithmic phase



\*  $P < 0.05$ .

图 8 不同培养时间点结核分枝杆菌的活菌数( $\log_{10}$ /ml)

Fig. 8 The counts of live bacteria at different culture time points

## 3 讨论

结核病是一种由结核分枝杆菌引起的慢性感染性疾病,严重威胁人类健康,其致死率在感染性疾病

中位于第 2,仅次于 HIV 感染。结核分枝杆菌可引起潜伏感染,发病前细菌可持留生存多年。结核分枝杆菌的持留性<sup>[6]</sup>,即于逆境下能保持稳定和对环境适应的特性,对结核分枝杆菌潜伏感染及结核病病程的迁延和复发起着重要作用。分枝杆菌中存在大量 TAS 模块。在结核分枝杆菌基因组中发现 88 个假定的 TAS,其中 30 个已被确认具有 TAS 的功能<sup>[7]</sup>。在结核分枝杆菌已确定的 9 个 *mazF* 同系物中,有 7 个在大肠埃希菌中表达时会造成生长停滞<sup>[8]</sup>。

未知基因功能的研究得力于突变株的构建,因此快速、高效地构建基因突变株可大大提高基因功能研究的效率。基因重叠延伸拼接-PCR (splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR) 法构建自杀质粒是利用基因搭桥法快速获得目的融合片段(即基因克隆片段),在一定程度上避免了双酶切法的繁琐性。同时,应用抗性基因替换构建基因缺失菌株,不仅减少了质粒整合带来的问题,还提供了一个筛选标记,能通过一次筛选即可得到突变株<sup>[9]</sup>。基于以上方法,本课题组成功构建了自杀质粒 pMD-19T-*ΔmazEF6-kan*,并利用电穿孔技术成功构建了结核分枝杆菌 *mazEF6* 缺失突变株,为结核分枝杆菌突变株的构建提供了快速、有效的方法,也为进一步揭示 *mazEF6* 的生物学作用奠定了基础。

TAS 在细菌内的相互作用可介导应激诱发的非复制状态<sup>[10]</sup>。张俊杰等研究表明,毒素蛋白 Rv1991c (*MazF6*)、Rv2801c (*MazF9*) 和 Rv1102c (*MazF3*) 通过切割 RNA 发挥抑菌或杀菌活性;且 Rv1991a-1991c (*MazEF6*) 和 Rv2801a-2801c (*MazEF9*) 系统可能参与结核分枝杆菌在营养匮乏条件下的生长调控<sup>[11]</sup>。结核分枝杆菌对 Rv1991c (*MazF6*) 的表达非常敏感,即使在非常低的水平也能显著降低细菌存活率<sup>[12]</sup>。本研究通过在不同培养时间点分别对 H37Rv 和 H37Rv *ΔmazEF6* 缺失突变菌株进行计数和结核分枝杆菌抗酸染色,比较缺失株与野生株在表型上的差异。结果发现,H37Rv *ΔmazEF6* 缺失突变菌株不但生长速度较慢,而且在显微镜下的形态也较野生株短小,推测结核分枝杆菌较强的生存能力可能与 TAS 相关。

关于 TAS 的功能,Zorzini 等提出了不同的观点:①自私的基因;②可保护特定染色体片段的稳定性;③在细菌应激反应和持留形成过程中发挥作用<sup>[13]</sup>。结核分枝杆菌较强的生存能力可能与 TAS 相关,但该系统在结核分枝杆菌中的作用机制尚不

清楚,有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(5): 371-82.
- [2] Schuster CF, Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate [J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 340(2): 73-85.
- [3] Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin-antitoxin systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(11): 779-90.
- [4] Han JS, Lee JJ, Anandan T, Zeng M, Sripathi S, Jahng WJ, Lee SH, Suh JW, Kang CM. Characterization of a chromosomal toxin-antitoxin, Rv1102c-Rv1103c system in Mycobacterium tuberculosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(3): 293-298.
- [5] Peñuelas-Urquides K, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Rivadeneira-Espinoza L, Said-Fernández S, de León MB. Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units [J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(1): 287-289.
- [6] Gomez JE, McKinney JD. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance [J]. Tuberculosis (Edinb), 2004, 84 (1-2): 29-44.
- [7] Hansen S, Vulić M, Min J, Yen TJ, Schumacher MA, Brennan RG, Lewis K. Regulation of the Escherichia coli HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39185.
- [8] Zhu L, Zhang Y, Teh JS, Zhang J, Connell N, Rubin H, Inouye M. Characterization of mRNA interferases from Mycobacterium tuberculosis [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (27): 18638-18643.
- [9] 乔凤,陈泽良,王玉飞,赵瑾,杜昕颖,于雅琴,黄留玉. pUC19K 质粒的构建及其在布鲁氏菌突变株构建中的应用 [J]. 中国生物工程杂志,2007, 27(12): 1-5.
- [10] Carroll P, Brown AC, Hartridge AR, Parish T. Expression of Mycobacterium tuberculosis Rv1991c using an arabinose-inducible promoter demonstrates its role as a toxin [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 274(1): 73-82.
- [11] 贤一博,崔丽丹,张俊杰. 结核分枝杆菌中毒素-抗毒素系统的鉴定[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 214-223.
- [12] Schifano JM, Edifor R, Sharp JD, Ouyang M, Konkimalla A, Husson RN, Woychik NA. Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110 (21): 8501-8506.
- [13] Zorzini V, Haesaerts S, Donegan NP, Fu Z, Cheung AL, van Nuland NA, Loris R. Crystallization of the *Staphylococcus aureus* MazF mRNA interferase [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011, 67(Pt 3): 386-389.

(收稿日期:2014-04-08)