

B 群脑膜炎球菌 *lpxL2* 基因敲除突变株 的构建及初步鉴定^{* 1}

李晓晶, 姬秋彦, 肖红剑, 彭正华, 罗娜, 杨增福, 杨槐, 李健峰, 李智华, 徐维明
(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118)

摘要:应用基因敲除技术的方法和原理,通过 PCR 扩增 B 群脑膜炎球菌 *lpxL2* 基因及载体 pGBK T7 上的 Kan 抗性片段, *lpxL2* 片段与 puc-18 载体连接得到重组质粒 *msb-puc*, 以重组质粒 *msb-puc* 为基础, 分别通过反向 PCR 和酶切 2 种方法构建 *lpxL2* 基因中间片段的缺失, 并在缺失位点连入 Kan 抗性表达盒, 从而得到重组质粒 mpK, mpK 转化 B 群脑膜炎球菌, 并用 PCR 的方法对转化子进行初步筛选鉴定, 初步确定突变株 1 株. 本研究通过基因敲除 MenB 中 LPS 合成途径相关基因 *lpxL2* 的方法, 降低 LPS 毒性, 为 B 群脑膜炎球菌 OMV 疫苗的研发做了铺垫.

关键词:脑膜炎奈瑟氏菌; 外膜囊泡; 基因敲除; 脂多糖

中图分类号:R 392.11; Q 782; Q 784 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2011)06-0710-06

脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*, Nm) 是引起细菌性脑膜炎的主要致病菌之一, 通过呼吸道传播引起急性化脓性脑膜炎. 在我国, 近年来由于疫苗的广泛接种, A 群引起的感染得到有效控制, 而由 B 群引起的病例相对增多^[1]. 至今国内外尚缺乏有效的 B 群 Nm 菌苗. 因此研究此菌苗是流脑预防中急需解决的一个课题.

天然外膜囊泡 (native Outer Membrane Vesicle, nOMV) 疫苗目前用来鼻内接种预防 B 群脑膜炎的流行, 可安全有效地激发局部及全身免疫, 但由于其脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 毒性的限制, 还不能用来注射接种^[2-4]. 而影响 LPS 毒性的因素除其磷酸化的程度外, 主要是其中脂质 A 酰基化的数量和性质. 在 *E. coli* 中发现, *msbB* 是编码酰基转移酶的基因, 而它们所编码的酰基转移酶的作用是在脂质 A 合成的后期阶段修饰脂质 IV A, 即 *msbB* 编码的蛋白参与了脂质 A 的合成, 之后这个基因被命名为 *lpxL2*^[5]. 本研究通过基因敲除 MenB 中 LPS 合成途径相关基因 *lpxL2* 的方法, 获得低 LPS 毒性的

突变株, 为后期获得低毒的 nOMV 做了铺垫.

1 材料和方法

1.1 菌株及其培养 大肠杆菌用 LB 培养基在 37 °C 培养, 按照需要添加抗生素 (氨苄青霉素 50 μg/mL, 卡那霉素 40 μg/mL). 脑膜炎奈瑟氏菌 B 群菌株 (菌号 29315) 购自中国药品生物制品检定所. 野生型脑膜炎奈瑟氏菌用 10% 羊血普通琼脂培养基培养; 敲除株用血清肉汤/琼脂培养基培养, 其中小牛血清质量分数 10%, 葡萄糖质量分数 1%, 卡那霉素 200 μg/mL. 脑膜炎平板培养条件为 37 °C, 5% CO₂.

1.2 *lpxL2* 敲除株的构建 *E. coli* DH5α, 载体 puc18, pGBK T7 由医学生物学研究所保存. 质粒小提试剂盒购自博亚生物制品有限公司, 柱式离心胶回收试剂盒购自鼎国生物制品有限公司, TaKaRa *taq*, TaKaRa *Ex taq*, DNA ligation Kit, DNA 限制性内切酶 *Xba* I, *Hind* III, *Bgl* II, *Bss*H II, pMD-18 T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司. 本文所用引物序列见表 1.

* 收稿日期: 2011-03-17

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2009ZC168M).

作者简介: 李晓晶 (1984-), 河北人, 女, 硕士生, 主要从事基因工程产品开发与研究.

通讯作者: 李智华 (1972-), 男, 云南人, 副主任技师, 主要从事病原生物学及其相关疫苗研究, E-mail: liwisch@imbcams.com.cn.

表 1 研究中所用引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物	序列(5' to 3')	说明
<i>msbB</i> - S1	CCCAAGCTTGATACTTAAATAGCAGC	以 NmB 为模板扩增 <i>lpxL2</i> 的上游引物
<i>msbB</i> - A1	GCTCTAGAGCCGCTCTGAACCGTCTGAAT	以 NmB 为模板扩增 <i>lpxL2</i> 的下游引物
<i>msbB</i> - S2	GAAGATCTGAGGAACGCGTGCGCGAACAT	反向 PCR 构建 <i>lpxL2</i> 中间片段缺失的上游引物
<i>msbB</i> - A2	GAAGATCTAAGCGCGTACACCGCCATCTC	反向 PCR 构建 <i>lpxL2</i> 中间片段缺失的下游引物
KanS - bg	GGAAGATCTGTCTGACGCTCAGTGGAAC	以 pGBK T7 为模板扩增 Kan 抗性表达盒的上游引物
KanA - bg	GGAAGATCTATGCTTCGTTCCAGGTGGC	以 pGBK T7 为模板扩增 Kan 抗性表达盒的下游引物
KanS - bs	TTGGCGCGCGTCTGACGCTCAGTGGAAC	以 pGBK T7 为模板扩增 Kan 抗性表达盒的上游引物
KanA - bs	TTGGCGCGCATGCTTCGTTCCAGGTGGC	以 pGBK T7 为模板扩增 Kan 抗性表达盒的下游引物
scrF1	GGATGCAGGTCAAGCGCGGA	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的上游引物
scrR1	ATGCCCGACGGCGAGGATCT	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的下游引物
scrF2	ATCGGGAGCGCGGATACCGT	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的上游引物
scrR2	CGGCTTTACCCGCGTAGCTCA	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的下游引物
scrF3	GCCGGAGAACCTGCCGTGCAA	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的上游引物
scrR3	CCCGCGTAGCTCAACTCTACGC	筛选 <i>lpxL2</i> 突变株的下游引物

1.2.1 *lpxL2* 基因扩增 NmB 过夜培养的菌液煮沸 10 min 后作为模板,以 *msbB* - S1, *msbB* - A1 为上下游引物扩增 *lpxL2* 基因片段(991 bp). 在引物中除基因序列和酶切位点外,还包括一段吸收序列 GCCGTCTGAA,使重组质粒能在自然条件下转化入 NmB^[6]. 反应条件:预变性 94 °C 3 min;94 °C 10 s,57 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环;72 °C 10 min.

1.2.2 重组质粒构建

方法一: *lpxL2* 片段用 *Xba* I, *Hind* III 双酶切后接入用相同酶切过的 puc18 载体中,得到重组质粒 *msb* - puc. 以 *msb* - puc 为模板, *msbB* - S2, *msbB* - A2 为引物进行反向 PCR,反应条件:预变性 94 °C 3 min; 94 °C 10 s,58 °C 30 s,72 °C 1 min 30 s,共 36 个循环;72 °C 10 min. 得到的产物缺失了 *lpxL2* 基因中间的 380 bp,PCR 产物纯化后,用 *Bgl* II 进行酶切. 同时以载体 pGBK T7 为模板, KanS - bg, KanA - bg 为引物进行 PCR,得到带有强终止子的卡那抗性表达盒,将其连入 pMD - 18 T 载体中得到重组质粒 Kan - T. 用 *Bgl* II 对 Kan - T 酶切后胶回收得到 Kan - bg 片段,并将其连入到酶切后的 *msbB* - puc 反向 PCR 产物中,得到重组质粒 mpK1 和 mpK2,1 个质粒只是卡那抗性表达盒方向不同,在

后续试验的使用中没有差别^[5].

方法二:重组质粒 *msb* - puc 经 *Bss* H II 进行酶切,缺失了 *lpxL2* 基因中间的 32 bp. 同时以载体 pGBK T7 为模板, KanS - bs, KanA - bs 为引物进行 PCR,得到带有强终止子的卡那抗性表达盒, *Bss* H II 酶切后与 *msb* - puc 酶切产物连接,得到重组质粒 mpK3 和 mpK4,2 个质粒在后续试验中的使用没有差别.

1.2.3 NmB 转化和减毒突变株的筛选 NmB 细胞在血平板上,37 °C,5% CO₂ 培养箱中过夜培养. 将长好的 NmB 细胞收集至 2 mL 含 10 mmol/L MgCl₂ 的血清肉汤液体培养基中,稀释到 550 nm 吸光度 0.1. 在以上悬浊液中加入 2 mg 重组质粒 mpK1/2 或 mpK3/4,37 °C,180 r/min 摇床培养 6 h. 取 100 μL 培养物接种到含有 200 μg/mL 卡那霉素的血清肉汤琼脂培养基上,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后出现重组菌落^[7].

分别以 3 对引物:scrF1 - scrR1;scrF2 - scrR2;scrF3 - scrR3 对转化株进行筛选. 3 对引物所在位置见图 1. 一般来说,未发生突变的菌株由于没有抗性基因的插入,因此 3 对引物均不能扩增出任何片段,而发生重组的突变株则能扩增出相应大小的

片段,其中 scrF1 - R1 扩增的产物大小应为 1 403 bp,scrF2 - R2 扩增产物应为 1 853 bp,scrF3 - R3 扩增产物应为 1 133 bp.

2 结果

2.1 *lpxL2* 基因敲除及筛选方案 本文所述的 *lpxL2* 基因敲除方法原理如图 2 所示,步骤如下:从 NmB 染色体上 PCR 扩增 *lpxL2* 基因,并将其克隆入合适的载体中,在该基因中部选择合适的酶切位点酶切,或者通过反向 PCR 扩增获得含有两同源臂的载体后,与 Kan 抗性表达盒连接,获得含有同源臂 1 - Kan - 同源臂 2(即突变盒)的重组质粒.用该质粒转化 NmB 野生株,突变盒的两同源臂与目的基因进行双交换,将目的基因替换.

对通过卡那抗性筛选得到的转化子进行 PCR 筛选.由于转化子原 *lpxL2* 基因被含有 Kan 抗性基因的突变盒替换,而野生株的 *lpxL2* 基因中间没有 Kan 抗性基因,因此,筛选的上下游引物中,其中一引物位于 Kan 抗性基因上,而另一引物则位于 *lpxL2* 基因的上游或下游.依此设计 3 对筛选引物同时进行筛选,以最大限度排除可能因引物不特异性造成的假阳性结果.3 对引物所在位点如图 1 所示.

2.2 *lpxL2* 基因扩增及重组质粒构建 以 NmB 菌液为模板 PCR 扩增出 991 bp 的 *lpxL2* 目的基因片段(图 2),基因测序结果与 GenBank MC58 *msbB* 基因序列相似度为 95%.将 *lpxL2* 连入 puc - 18 载体得到重组质粒 *msb - puc*,经 *Xba* I, *Hind* III 双酶

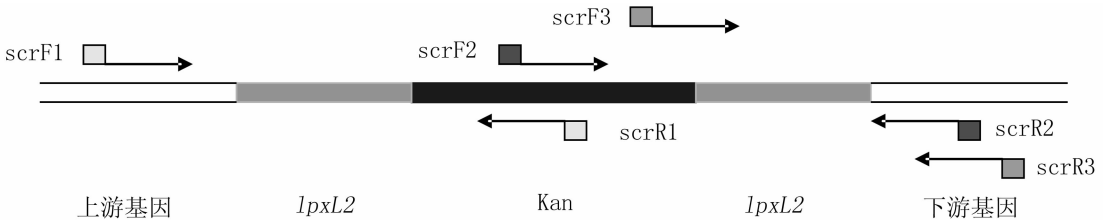


图 1 引物设计位点

Fig. 1 Primer design sites

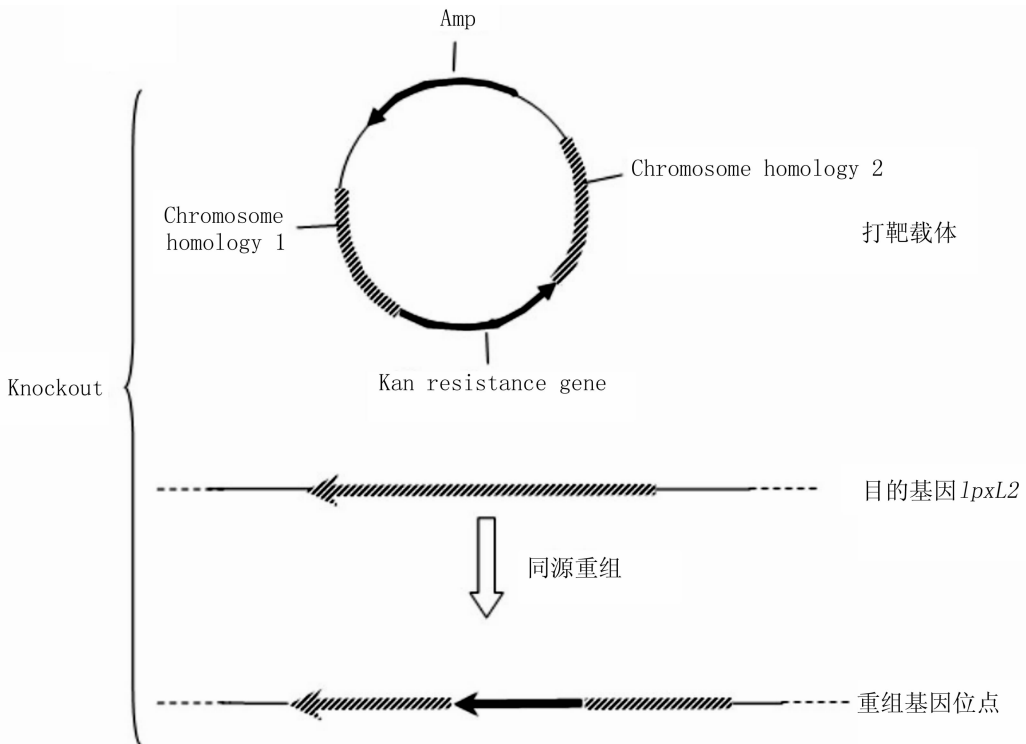
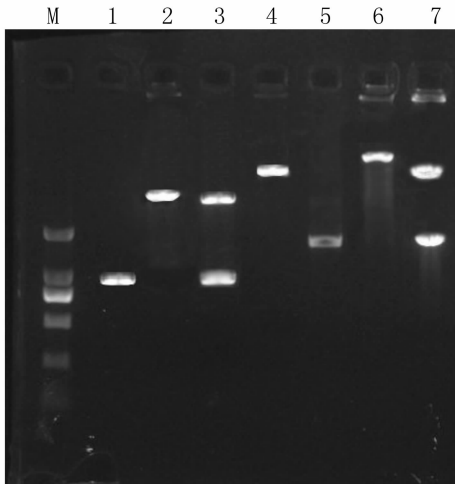


图 2 *lpxL2* 基因删除原理示意图

Fig. 2 Principles of *lpxL2* inactivation approach

切获得与理论值相符的目的条带(图3).以重组质粒 *msb*-*puc* 为模板反向 PCR,得到约 3 300 bp 的片段.以 pGBK T7 为模板扩增出约 1 500 bp 的卡纳抗性片段 Kan-bg,基因测序结果与设计的目标序列完全一致.以上 2 个片段经 *Bgl* II 酶切后连接,得到重组质粒 mpK1/2,质粒测序结果与设计序列一致.mpK1/2 经 *Bgl* II 酶切获得与理论值相符的目的条带(图3).

以 pGBK T7 为模板扩增出约 1 500 bp 的卡纳抗性片段 Kan-bs(图4),基因测序结果与设计的目标序列完全一致.重组质粒 *msb*-*puc* 经 *Bss*H II 酶切后电泳条带与未酶切质粒相比电泳速度慢,证明质粒已经完全酶切,与同样经 *Bss*H II 酶切后的 Kan-bs 片段连接,得到重组质粒 mpK3/4,重组质粒经 *Xba* I, *Hind* III 酶切后产生与理论相符的片段(图5),且测序结果与设计序列一致.

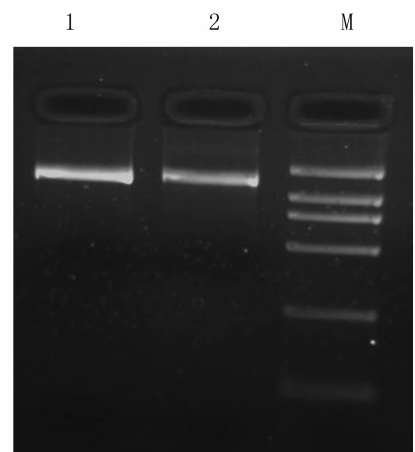


M: DL 2 000 DNA marker 由上往下依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp; 1: PCR 产物 *msbB*, 991 bp; 2: 质粒 *msb*-*puc*, 3 677 bp; 3: 重组质粒 *msb*-*puc* 经 *Xba* I, *Hind* III 双酶切鉴定; 4: 重组质粒 *msb*-*puc* 反向 PCR 产物, 3 297 bp; 5: PCR 产物 Kan-bg, 1 500 bp; 6: 重组质粒 mpK1/2, 4 797 bp; 7: 重组质粒 mpK1/2 经 *Bgl* II 酶切鉴定

图3 核酸电泳分析(方法一)

Fig. 3 Nucleic acid electrophoresis analysis (Method 1)

2.3 NmB 转化和减毒突变株的筛选 转化培养物接种到卡纳抗性平板上,培养 48 h 后开始出现转化株,每板 1~10 株.用 3 对引物同时对数批转化株进行筛选,最终得到一株由 mpK3/4 转化的突变株,3 对引物所扩增出的片段与理论值相符,而野生株则未扩增(图6).

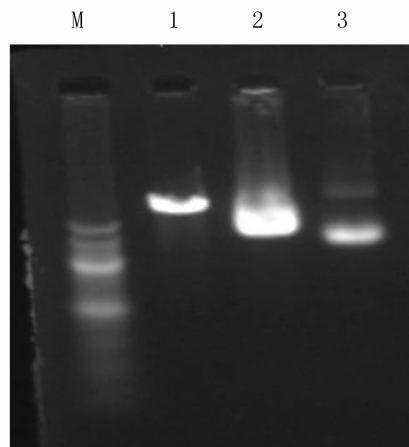


M: DL 2 000 DNA marker;

1, 2: PCR 产物 Kan-bs, 1 500 bp

图4 Kan 基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析

Fig. 4 Analysis of PCR amplified Kan gene



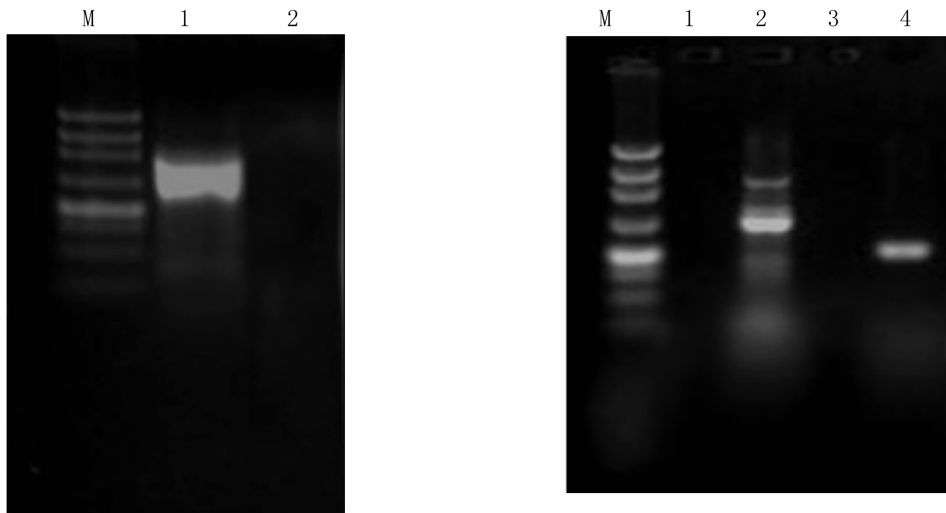
M: 200 bp DNA ladder marker 由上往下依次为 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 800, 1 600, 1 400, 1 200, 1 000 bp, ... 其中 2 000 bp 和 1 000 bp 为指示带,显示亮带; 1: 重组质粒 *msb*-*puc* 经 *Bss*H II 酶切后电泳, 3 645 bp; 2: 重组质粒 *msb*-*puc*, 3 677 bp; 3: 重组质粒 mpK3/4 经 *Xba* I, *Hind* III 酶切鉴定

图5 核酸电泳分析(方法二)

Fig. 5 Nucleic acid electrophoresis analysis (Method 2)

3 讨论

脑膜炎奈瑟氏菌也称为脑膜炎球菌(*Meningococcus*),是一类革兰氏阴性双球菌,主要通过呼吸道传播引发流行性脑脊髓膜炎(流脑)^[8].由于多糖及其结合菌苗的应用,A,C,Y,W135 群所引发的脑膜炎目前已基本得到控制.与其它群不同,B 群脑膜炎奈瑟氏菌(serogroup B *N. meningitidis*, MenB)荚膜多糖的免疫原性很低,同时,由于其结



M:250 bp DNA ladder marker 由上往下依次为 4 500, 3 000, 2 250, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp; 1:引物 scr1 在不同的退火温度对转化株 PCR 扩增结果, 1 403 bp; 2:引物 scr1 在不同退火温度对野生株的 PCR 结果

M:250 bp DNA ladder marker 由上往下依次为 4 500, 3 000, 2 250, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp; 1:引物 scr2 在不同退火温度对野生株的 PCR 结果; 2:引物 scr2 对转化株 PCR 扩增结果, 1 853 bp; 3:引物 scr3 对野生株的 PCR 扩增结果; 4:引物 scr3 对转化株 PCR 扩增结果, 1 133 bp

图6 转化株 PCR 鉴定电泳图谱

Fig. 6 PCR identification of *lpxL2* mutants

构与人体正在发育的神经组织及少数成熟组织中的神经细胞黏附分子同源,不能激发机体有效的保护性免疫^[9],至今大部分国家地区尚缺乏有效的 B 群 Nm 疫苗,该菌在各国成为引起地方性脑膜炎的首要病原菌,北美 30%~40% 的脑膜炎病例是由 B 群感染所致^[10-11],某些欧洲国家该比例高达 80%^[12-13],在我国由 B 群引起的病例比例也呈增高趋势^[6]. 目前国内外针对外膜蛋白 OMP、脂寡糖 LOS、外膜微泡 OMV 及天然的外膜微泡 NOMV 的菌苗研究取得了一定的成效,但都存在一定的局限性,如 PorA, PorB 等外膜蛋白菌苗虽然对大龄儿童有保护效果,但对易被 B 群 Nm 感染的幼儿却无保护作用;用 Nm 外膜微泡 OMV 制备的菌苗,由于制备过程中去污剂的使用,可能会改变 OMVs 的构象和(或)暴露的表位,其诱发杀菌性抗体的能力下降;nOMV 的提取未使用去污剂,现用于鼻内接种,但 LPS 的毒性限制了其应用^[5].

本研究分别用反向 PCR、酶切 2 种方法构建了敲除 *lpxL2* 毒性基因的重组质粒,由于吸收序列的存在,质粒能在自然条件下被吸收入菌体内,并发生同源重组以实现靶基因的敲除. 其中反向 PCR 法所构建的重组质粒 mpK1/2 的左右同源臂长分别为 211, 400 bp, 酶切法所构建的重组质粒 mpK3/

4 的左右同源臂长分别为 500, 450 bp. 据文献报道,更长的同源臂可以提高突变盒基因片段重组于染色体上的效率^[14]. 本研究所筛选的突变株由 mpK3/4 转化而来,除偶然因素外,可能是由于其同源臂较长,提高了突变效率. 但酶切法有较大的局限性,构建突变的目的基因需要有合适的酶切位点才能够进行,而反向 PCR 法则不会受到限制. 重组质粒在自然条件下被吸收入菌体内,每板所得到的转化株不超过 10 株,在今后的实验中可以考虑电转化的方法,以提高转化效率. 为了降低引物非特异性结合产生假阳性的情况,研究中同时用 3 对引物进行筛选,最终得到 3 对引物所扩增的目的片段均为理论值大小的突变株,为今后制备低毒 nOMV 打下了基础. 但突变株的 LPS 毒性是否较野生株低,转化株在生长过程中卡那霉素的使用是否对其造成相关影响,由突变株所提取的 nOMV 的毒性及免疫效果较野生株发生了何种变化,能否安全注射接种并有效激发全身免疫等,这些问题在今后还需要深入展开研究.

参考文献:

- [1] 李新式,胡绪敬,高立慧,等. 我国群脑膜炎奈瑟氏菌单克隆抗体分型及其流行病学意义[J]. 疾病监测,

- 1994,9(2):33-35.
- [2] SADARANGANI M, POLLARD A J. Serogroup B meningococcal vaccines – an unfinished story [J]. *Lancet Infect*, 2010, 10(2):112-124.
- [3] DRABICK J J, BRANDT B L, MORAN E E, et al. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers [J]. *Vaccine*, 1999, 18(1/2):160-172.
- [4] KATIAL R K, BRANDT B L, MORAN E E, et al. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(2):702-707.
- [5] FISSEHA M, CHEN P, BRANDT B, et al. Characterization of native outer membrane vesicles from *lpxL* mutant strains of *Neisseria meningitidis* for use in paraenteral vaccination [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(7):4070-4080.
- [6] AMBUR O H, FRYE S A, TØNJUM T. New functional identity for the DNA uptake sequence in transformation and its presence in transcriptional terminators [J]. *J Bacteriol*. 2007, 189(5):2077-2085.
- [7] WEYNANTS V, DENOEL P, DEVOS N, et al. Genetically Modified L3, 7 and L2 Lipooligosaccharides from *Neisseria meningitidis* Serogroup B confer a broad cross – bactericidal response [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(5):2084-2093.
- [8] 邵祝军, 李艺星. B群脑膜炎球菌疫苗研究进展 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2009, 15(6):542-545.
- [9] FINNEJ J, LEINONEN M, MAKELA P H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis [J]. *Lancet*, 1983, 322(8346):355-357.
- [10] SHARIP A, SORVILLO F, REDELINGS M D, et al. Population – based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990—2002 [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(3):191-194.
- [11] KAPLAN S L, SCHUTZE G E, LEAKE J A, et al. Multi-center surveillance of invasive meningococcal infections in children [J]. *Pediatrics*, 2006, 118(4):979-984.
- [12] TROTTER C L, CHANDRA M, CANO R, et al. A surveillance network for meningococcal disease in Europe [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, 31(1):27-36.
- [13] GRAY S J, TROTTER C L, RAMSAY M E, et al. Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the meningococcal reference Unit [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(7):887-896.
- [14] 周丽, 牛丹丹, 李宁, 等. 基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6):923-928.

Construction and primary identification of meningococcal serogroup B mutant strain that knocked out gene *LpxL2*

LI Xiao-jing, JI Qiu-yan, XIAO Hong-jian, PENG Zheng-hua, LUO Na, YANG Zeng-fu, YANG Huai, LI Jian-feng, LI Zhi-hua, XU Wei-ming

(Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infections Diseases, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: To construct *lpxL2* deletion mutants of meningococcal serogroup B, the *lpxL2* gene and Kan resistance gene was amplified from wild – type N. meningitidis serogroup B strain 29325 and plasmid pGBK T7 respectively. The *lpxL2* gene was cloned into plasmid puc – 18 to constitute plasmid *msb* – puc. Based on *msb* – puc, inverse PCR and restriction enzyme digestion were performed respectively to delete some internal fragments, the resulting products were digested and ligated with the Kan resistance gene, yielding recombinant plasmid mpK which was used to transform into wild – type strain 29325. Antibiotic – resistant transformants were screened by using PCR, and a mutant strain was primary identified. The LPS biosynthesis gene *lpxL2* mutants can reduce toxicity by means of knocking out gene *lpxL2*, which established approach for the development of OMV vaccine against Nm serogroup B.

Key words: *Neisseria meningitidis*; OMV; gene knockout; lipopolysaccharide