

## · 口腔微生物学研究 ·

变形链球菌耐氟菌株 *gtfB* 基因失活菌株的构建

李文月 高爽 张志鹰 张红 超博 武玉凤 李贺 王春萌 张志民\*

(吉林大学口腔医院牙体牙髓科 吉林 长春 130021)

**[摘要]** 目的:构建变形链球菌(*S. mutans*)耐氟菌株 UA159-FR 中 *gtfB* 基因失活株,为研究耐氟菌株 *gtfB* 基因的功能奠定基础。方法:培养 UA159-FR 并以其为模板扩增 *gtfB* 基因上游、下游同源臂片段,以质粒 pEGFP-N1 为模板扩增 *kan* 基因;通过重叠延伸聚合酶链反应法(overlap extension polymerase chain reaction, OE-PCR)获取上述 3 个片段的同源重组片段;与 pEASY-Blunt Cloning Vector 连接形成重组质粒后,进行 PCR 鉴定和测序鉴定;将重组片段电转化入 UA159-FR 感受态细胞中得到 *gtfB* 基因失活菌株,并进行 PCR 鉴定。结果:经 PCR 鉴定和测序鉴定,含有 *gtfB* 基因重组片段的重组质粒构建成功;经 PCR 鉴定,UA159-FR 的 *gtfB* 基因失活株构建成功。结论:成功构建了含有 *gtfB* 基因重组片段的重组质粒和 *S. mutans* 耐氟菌株 UA159-FR 的 *gtfB* 基因失活株,可用于 *gtfB* 基因功能的研究。

**[关键词]** 变形链球菌耐氟菌株 *gtfB* 基因 重叠延伸聚合酶链反应 同源重组 基因失活

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2018)05-0490-05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.05.008

**Construction of Streptococcus Mutans Fluoride-resistant Strain with GtfB Gene Inactive.** LI Wen-yue, GAO Shuang, ZHANG Zhi-ying, ZHANG Hong, CHAO Bo, WU Yu-feng, LI He, WANG Chun-meng, ZHANG Zhi-min\*. Department of Endodontics School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China.

**[Abstract]** **Objective:** To construct Streptococcus mutans (*S. mutans*) fluoride-resistant strain UA159-FR with *gtfB* gene inactive to investigate the function of *gtfB* gene in fluoride-resistant strain. **Methods:** The *S. mutans* fluoride-resistant strain UA159-FR was cultured and used as a template to amplify the upstream and downstream homologous arm fragments of the *gtfB* gene. The *kan* gene was amplified by using the plasmid pEGFP-N1 as a template. Homologous recombination fragments of three fragments were obtained by overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR) and ligated with pEASY-Blunt Cloning Vector to form recombinant plasmids. The recombinant plasmids were identified by PCR and sequencing. The recombinant fragment was electrotransformed into UA159-FR competent cells to obtain the inactivated strain and identified by PCR. **Results:** The recombinant plasmids were successfully constructed via being identified by PCR and sequencing. It was identified by PCR that UA159-FR with *gtfB* gene inactive was obtained. **Conclusion:** The recombinant fragments of *gtfB* gene of *S. mutans* with its recombinant plasmids and the *S. mutans* fluoride-resistant strain UA159-FR with *gtfB* gene inactive were successfully constructed and could be used to study the function of *gtfB* gene.

**[Key words]** Fluoride-resistant streptococcus mutans GtfB gene Overlap extension polymerase chain reaction Homologous recombination Gene inactivation

变形链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)是人类龋病的主要致病菌之一,其致龋的主要毒力因子有黏附、产酸和耐酸<sup>[1]</sup>。黏附作为引发龋病的基础,可分为非蔗糖依赖性黏附和蔗糖依赖性

黏附。*gtfB* 基因作为调节 *S. mutans* 黏附和集聚的重要基因之一,主要功能包括编码葡糖基转移酶催化蔗糖合成水不溶性葡聚糖<sup>[2]</sup>,介导细菌黏附和聚集。近年来,随着人类生活中氟化物的长期应用导致耐氟菌株选择性生长<sup>[3]</sup>,致使菌株内部大量基因发生突变,并且此类突变菌株的致龋性大幅度增强。笔者在前期研究发现,*S. mutans* 耐氟菌株与其亲代菌株相比存在 20 个突变基因,其中介导黏附的基因

**作者简介** 李文月(1991~),女,河北唐山人,硕士在读,主要研究龋病黏附机制。

\* 通讯作者 张志民, E-mail: zhangzm1964@sina.com

之一——gtfB 基因存在 7 个突变位点,且其编码的氨基酸发生错义突变,由天冬酰胺变为精氨酸<sup>[4]</sup>。为了进一步研究 gtfB 基因突变是否导致 *S. mutans* 耐氟菌株黏附功能发生改变,需要构建 gtfB 基因的失活株以及该基因的回补株进行对比验证。本实验通过构建 gtfB 基因重组片段并将其电转化转入 UA159-FR 的感受态细胞中,成功构建了 *S. mutans*耐氟菌株 UA159-FR 的 gtfB 基因失活株,为下一步研究 gtfB 基因的功能进行了重要的前期准备工作。

**1 材料与方 法**

**1.1 主要试剂与仪器** *S. mutans* UA159 来自吉林大学口腔医学院;带有卡那霉素基因的质粒 pEGFP-N1 由吉林大学动物科学学院郝林琳教授惠赠;BHI 培养基(青岛海博生物技术有限公司);聚合酶链反应(polymerase chain reaction ,PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司);自动梯度 PCR 仪(中国赛默飞世尔科技有限公司);电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司);电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一生物科技有限公司);多功能凝胶成像系统(美国 Cell & Biosciences 公司);-80 °C 低温冰箱(日本 SANYO 公司);引物序列通过生物软件 Primer Premier 5.0 设计完成,由库美生物科技有限公司合成,序列见表 1。

**1.2 方 法**

**1.2.1 *S. mutans* UA159-FR 的诱导及鉴定** 将 -80 °C 甘油保存的 *S. mutans* UA159 取出,接种于 BHI 液体培养基,37 °C 微需氧(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)培养 24 h 后,再次接种于 BHI 固体培养基,上述相同条件培养 24 h。观察菌落形态,革兰氏染色镜检。将所得菌株按逐步诱导法<sup>[5]</sup>处理得到耐氟菌株 UA159-FR,在含 1000 mg/L 氟化钠的 BHI 固体培养基上接种,37 °C 微需氧(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)培养 24 h,观察菌落形态,进行革兰染色、生化反应鉴定,并送库美生物有限公司进行 16SrDNA 序列测序。

**1.2.2 同源重组片段 gtfB1-kan-gtfB2 及其重组质粒的构建**

**1.2.2.1 PCR 扩增 gtfB 上游、下游同源臂片段和卡那霉素基因** 将细菌接种于 BHI 液体培养基,37 °C 微需氧(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)培养至对数生长期,取 3 μL 菌液为模板,用引物 G1-F、G1-R 扩增 gtfB 上游基因片段并命名为 gtfB1,反应体系见表 2,反应条件见表 3。取 3 μL 菌液为模板,用引物 G2-F、G2-R 扩增 gtfB 下游基因片段并命名为 gtfB2,反应体系见表 2,反应条件见表 4。以质粒为模板,用引物 kan-F 和 kan-R 扩增卡那霉素基因 kan。反应体系见表 2,反应条件见表 5。PCR 反应完成后,利用琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物 gtfB1、gtfB2 和 kan,采用凝胶回收试剂盒纯化回收扩增产物。

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Primers used in experiments and their sequences

引物名称	引物序列(5'→3')	序列长度/bp
G1-F	ATGGACAAGAAAGTGCGTTATAAAC	390
G1-R	AGCAGCAGCTTCAGAAGTTTTG	
kan-F	GACAAAACCTTCTGAAGCTGCTGCTAAGGGGTGTTATGAGCCATATT	826
kan-R	TTCGGTTGTTTGTCTTACTAATATTATTTTAGAAAAACTCATCGAGCATCA	
G2-F	AATAATATTAGTAAACAAACAACCGAA	300
G2-R	TGCAGAGCGATCATAAACTTG	

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

试剂	使用量/μL				
	gtfB1	gtfB2	kan	gtfB1-kan	gtfB1-kan-gtfB2
目的基因					
模板量	3	3	3	3	3
上/下游引物(10 μmol/L)	1	1	1	1	1
高保真 DNA 聚合酶	1	1	1	1	1
dNTPs(2.5 mmol/L)	4	4	4	4	4
5×TransStart FastPfu Fly Buffer	10	10	10	10	10
MgSO <sub>4</sub> (50 mmol/L)	0	0	3	0	0
ddH <sub>2</sub> O	30	30	27	30	30
总体积	50	50	50	50	50

表 3 gtfB1 片段 PCR 反应条件

Table 3 PCR reaction conditions of gtfB1 fragment

PCR 步骤	温度/℃	时间	循环数
预变性	95	5 min	1
变性	95	30 s	
退火	55.8	30 s	30
延伸	72	50 s	
延伸	72	10 min	1

表 4 gtfB2 基因 PCR 反应条件

Table 4 Drop PCR reaction conditions of gtfB2

PCR 步骤	温度/℃	时间	循环数
预变性	95	5 min	1
变性	95	30 s	
退火	58℃开始,每个循环降低 0.5℃	30 s	30
延伸	72	50 s	
延伸	72	10 min	1

表 5 kan 基因 PCR 反应条件

Table 5 PCR reaction conditions of kanamycin gene

PCR 步骤	温度/℃	时间	循环数
预变性	95	5 min	1
变性	95	30 s	
退火	56	30 s	30
延伸	72	50 s	
延伸	72	10 min	1

1.2.2.2 重叠延伸聚合酶链反应法 以 gtfB1、kan 纯化产物为模板,用引物 G1-F 和引物 kan-R 扩增构建重组片段 gtfB1-kan。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,并采用凝胶回收试剂盒纯化产物。以纯化的 gtfB1-kan 和 gtfB2 为模板,用引物 G1-F 和引物 G2-R 扩增构建同源重组片段 gtfB1-kan-gtfB2。反应体系见表 2,反应条件见表 6。

表 6 OE-PCR 反应条件

Table 6 OE-PCR reaction conditions

PCR 步骤	温度/℃	时间	循环数
预变性	95	5 min	1
变性	95	30 s	
退火	57	50 s	30
延伸	72	1 min	
延伸	72	10 min	1

1.2.2.3 重组质粒构建并转化入大肠杆菌 将得到的片段经凝胶回收纯化,紫外分光光度法测其浓度,加入 1 μL 载体,按载体与重组片段 DNA 摩尔比是 1:7 的比例加入纯化的重组片段,加纯水至终体积为 5 μL。轻轻混匀,16℃过夜。取 50 mL 大

肠杆菌感受态细胞置于冰上,细胞复苏后,加入过夜产物,冰浴 30 min,42℃热激 90 s,立即置于冰上 5 min,加入 200 μL 的 LB 培养基,200 r/min、37℃培养 1 h。取 8 μL 500 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG) 和 40 μL 20 g/L 的 X-gal 混合,均匀涂在准备好的平板上,37℃培养箱上放置 30 min。待 IPTG 和 X-gal 被吸收后,取 200 μL 菌液均匀地涂在平板上,在 37℃培养箱中培养 12~14 h。挑选白色菌落接种于含卡那霉素(0.05 mg/L)的 LB 液体培养基中,200 r/min、37℃培养 6 h,观察菌液浑浊,进行 PCR 鉴定,按表 2 加入 PCR 反应体系,反应条件见表 6。

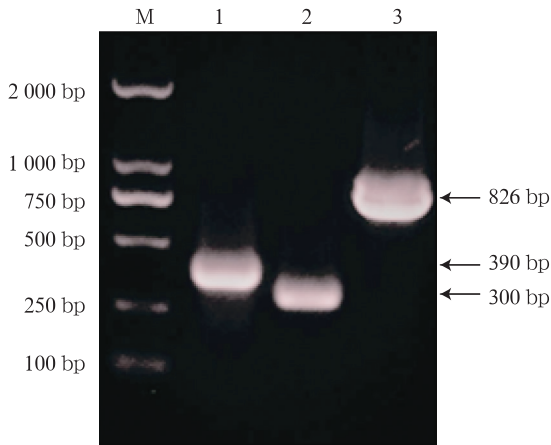
### 1.2.3 电转化制备 gtfB 基因失活株

1.2.3.1 UA159-FR 感受态细胞的制备 挑 UA159-FR 单菌落接种于 5 mL BHI 液体培养基,37℃微需氧(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)培养至对数生长期,取 1 mL UA159-FR 菌液接种于 100 mL BHI 液体培养基,上述相同条件培养至对数生长期。将菌液置于冰上冰浴 30 min,转入 50 mL 预冷离心管中,4℃,3500 r/min 离心 10 min;弃上清,加入 5 mL 预冷的 ddH<sub>2</sub>O 使沉淀重悬,4℃,3500 r/min 离心 10 min,重复此步骤 1 次;弃上清,加入 5 mL 预冷的 10%甘油使沉淀重悬,4℃,3500 r/min 离心 10 min,重复此步骤 1 次。加入 1 mL 10%甘油使沉淀重悬,分装为 100 μL,-80℃冰箱冻存。

1.2.3.2 重组片段经乙醇沉淀纯化 取 200 μL 凝胶回收的重组片段,与 1:10 体积的醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇混合,混合物于-80℃冰箱过夜。混合物取出后,4℃,12000 r/min 离心 20 min;小心弃去上清,加入 75%预冷乙醇 1 mL,4℃,12000 r/min 离心 10 min,重复此步骤 1 次;加入 30 μL ddH<sub>2</sub>O 使其重悬。-20℃冻存。

1.2.3.3 细菌转染及鉴定 取 30 μL 纯化的重组片段 gtfB1-kan-gtfB2 加入到 50 μL UA159-FR 的感受态细胞中,混匀,于冰上静置 10 min;将混合物转移至预冷的电转杯中,放入电转仪进行电转;电转后立即向杯中加入 100 μL BHI 液体培养基,重悬后,37℃,180 r/min 震荡培养 4 h,涂于含有卡那霉素(10 mg/L)的 BHI 固体培养基上,37℃微需氧(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)培养 24~48 h。挑阳性克隆接种于含卡那霉素(10 mg/L)的 BHI 液体培养基增菌后,革兰染色及生化鉴定为 S.

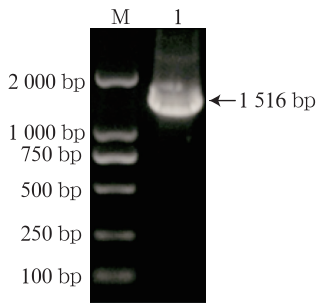
mutans。采用菌液 PCR 进行鉴定,PCR 引物及条件与重组片段构建的条件一致。



M: D2000; 1: gtFB1 (390 bp); 2: gtFB2 (300 bp); 3: kan (826 bp)

图 1 gtFB1、gtFB2 和 kan 扩增片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Analysis of gtFB1, gtFB2, and kanamycin amplified fragment by agarose gel electrophoresis.



M: D2000; 1: gtFB1 + kan + gtFB2 (1516 bp)

图 2 重组质粒克隆产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid cloning product by agarose gel electrophoresis.

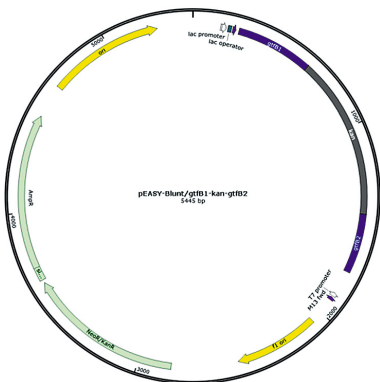


图 3 质粒构建结果图 图片中蓝色部分为重组片段 gtFB1 + kan + gtFB2, 分子量大小约 1500 bp

Fig. 3 Plasmid construction map. The blue part of the picture was the recombinant fragment gtFB1 + kan + gtFB2, with a molecular weight of about 1500 bp.

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果 凝胶电泳分析显示 gtFB1、

gtFB2 及 kan 分子量大小结果正确,分别为 390、826 和 300 bp(图 1)。

2.2 重组质粒构建及鉴定结果 重组质粒经 PCR 扩增后,产物凝胶电泳分析显示 gtFB1-kan-gtFB2 片段大小结果正确,为 1516 bp(图 2),说明 3 个片段连接成功并成功转入克隆质粒。测序结果经 BLAST 比对,片段重组成功且序列正确,重组质粒构建结果图和示意图见图 3 和图 4。

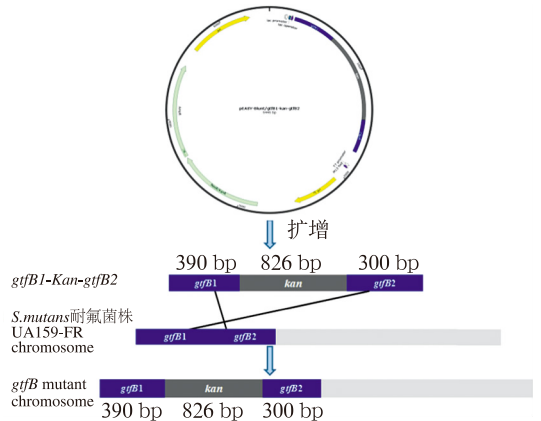


图 4 通过同源重组构建 gtFB 基因失活株的原理示意图

Fig. 4 Schematic diagram of gtFB gene inactivation by homologous recombination.

2.4 gtFB 基因失活株的 PCR 鉴定结果 菌液 PCR 扩增得到的产物片段大约 1500 bp(图 5),初步鉴定 S. mutans UA159-FR 的 gtFB 基因失活株构建成功。



M: D2000; 1: gtFB1 + kan + gtFB2 (1516 bp)

图 5 gtFB 基因失活株的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5 Electrophoresis results of PCR products of gtFB gene inactivated strains.

## 3 讨论

变形链球菌黏附于牙面是形成菌斑和致龋的重要条件。变形链球菌中的 gtFB 基因可以编码葡糖基转移酶,从而催化蔗糖转化为水不溶性葡聚糖,水不溶性葡聚糖通过  $\alpha-1,3$  糖苷键将葡糖基彼此连接成葡聚糖,具有黏性,导致微生物通过有粘性的葡聚糖黏附在牙齿上,使其成为导致龋齿发生和菌斑形成的主要原因之一。近年来,利用氟化物防龋是



一种有效手段,但其大量应用导致口腔中的耐氟菌株选择性生长,使得此类突变菌株致龋性大幅度增强。其中与黏附密切相关的 *gtfB* 基因编码的氨基酸发生错义突变<sup>[4]</sup>,这一突变是否导致该基因在耐氟菌株中的功能发生改变,目前尚不清楚。因此通过某种方法构建 UA159-FR 的 *gtfB* 基因敲除株是研究其功能的有效手段。

基因替代失活是目前研究基因功能的一种有效手段<sup>[6]</sup>。其原理如下,首先构建两侧目的基因的上、下游同源臂,中间是耐药或荧光筛选基因的重组 DNA,接着利用电转化或化学转化等方法将重组 DNA 转入细菌感受态细胞内,然后在菌株内发生基因重组,最后产生替代失活菌株。常规的重组 DNA 技术依赖于重组质粒的构建,利用大肠杆菌质粒载体,通过酶切方法构建重组质粒<sup>[7]</sup>。这种技术耗时长,效率低,而且由于酶切具有不稳定性,所以容易失败。

通过 OE-PCR 构建重组 DNA,是近年来一种简单、可靠、有效的重组 DNA 技术。与传统技术相比,OE-PCR 不需要经过限制性酶切和 DNA 连接等操作,只需通过设计引物,进行两步 PCR,即可构建重组片段,过程简单,耗时少,容易操作<sup>[8]</sup>。但早期研究表明通过 OE-PCR 方法难以构建大于 20 kb 的片段。Shevchuk 等<sup>[9]</sup>在 2004 年通过实验证明 OE-PCR 对于构建大于 20 kb 的 DNA 重组大片段亦有效。不仅如此,OE-PCR 还可以用于定点突变的研究<sup>[10,11]</sup>。

本实验先利用 PCR 扩增 *gtfB* 上游、下游同源臂和 *kan* 基因,然后进行第 2 步和第 3 步连接反应,成功构建重组片段 *gtfB1-kan* 和 *gtfB1-kan-gtfB2*。此步反应关键在于引物设计,尽量让所有引物的熔解温度 ( $T_m$ ) 值接近或相等,以便于反应进行。为了确保 PCR 反应中不发生点突变,PCR 反应中使用高保真聚合酶。为了提高反应效率,本实验在扩增 *gtfB* 上、下游同源臂时,直接进行菌液 PCR。在反应过程中,将 95 °C 变性时间延长至 5 min,可以使细菌充分裂解,释放大量 DNA。可将菌液直接加入反应体系中,无需任何处理,与传统的方法相比,该反应省去了提取细菌基因组的过程,直接利用菌液提取目的片段,节省了大量时间和成本。此法亦可用于实验后续重组菌株的筛选。

本实验通过卡那霉素进行筛选,由于 *kan* 基因是一种编码氨基糖苷磷酸转移酶的基因,该酶可使卡那霉素磷酸化,干扰抗生素向细胞内移动,因而阻

断了抗生素向周围未转化成功的细菌移动,使其存活;*S. mutans* 及其耐氟菌株是兼性厌氧菌,而氨基糖苷类抗生素对厌氧菌无效<sup>[12]</sup>。因此造成抗性培养基上未转化成功的细菌大量生长,需经大量 PCR 筛选鉴定,筛选过程效率低、耗时长、花费大。提示我们在将来的遗传转化工作中可以将卡那霉素抗性标记转变成荧光基因标记,以更直观地观察获取转化结果,提高实验效率。

综上,本实验成功构建了 UA159-FR 的 *gtfB* 基因失活株,为 *gtfB* 基因功能的研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, et al. Dental caries [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3(Suppl. 1): 17030
- [2] Komatsu H, Abe Y, Eguchi K, et al. Kinetics of dextran-independent  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan synthesis by *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase [J]. Febs J, 2011, 278(3): 531-540
- [3] Ying L, Brandt BW, Li J, et al. Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review [J]. J Oral Microbiol, 2017, 9(1): 1344509
- [4] 卢春英. 变形链球菌耐氟菌株全基因组测序[D]. 吉林大学, 2014
- [5] 李朋莲, 张志民, 李振玲, 等. siRNA 干扰对变形链球菌耐氟菌 *ffh* 基因产酸能力的影响 [J]. 口腔医学研究, 2015, 31(2): 105-108
- [6] Li JF, Aach J, Norville JE, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated plant genome editing via guide RNA/Cas9 [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 688-691
- [7] Jajeskniak P, Wong TS. QuickStep-Cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids [J]. J Biol Eng, 2015, 9(1): 15
- [8] Li G, Dong BX, Liu YH, et al. Gene synthesis method based on overlap extension PCR and DNAworks program [M]. Humana Press, 2013
- [9] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(2): e19
- [10] Wäneskog M, Bjerling P. Multi-fragment site-directed mutagenic overlap extension polymerase chain reaction as a competitive alternative to the enzymatic assembly method [J]. Anal Biochem, 2014, 444: 32-37
- [11] Xiao YH, Pei Y. Asymmetric overlap extension PCR method for site-directed mutagenesis [J]. Methods Mol Biol, 2011, 687: 277-282
- [12] 杨世杰. 药理学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 397-398

[收稿日期: 2017-09-29]

(本文编辑 关隽)