



# 基于谷氨酸消旋酶基因(*murI*)构建杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗株的染色体-质粒平衡致死表达系统

张明明<sup>1</sup>, 叶浩达<sup>2</sup>, 张朝政<sup>1</sup>, 王鹏程<sup>1</sup>, 王克詮<sup>1</sup>, 严小军<sup>1</sup>, 陶震<sup>1\*</sup>

1 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022

2 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

张明明, 叶浩达, 张朝政, 王鹏程, 王克詮, 严小军, 陶震. 基于谷氨酸消旋酶基因(*murI*)构建杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗株的染色体-质粒平衡致死表达系统[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 767-779.

ZHANG Mingming, YE Haoda, ZHANG Chaozheng, WANG Pengcheng, WANG Kequan, YAN Xiaojun, TAO Zhen. Construction of a chromosome-plasmid balanced lethal system based on *murI* in the attenuated live vaccine strain of *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 767-779.

**摘要:** 【目的】构建一种基于谷氨酸消旋酶(*MurI*)基因的染色体-质粒平衡致死系统, 用于杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗株(*Pseudomonas plecoglossicida*  $\Delta$ *tssD-1*, *Pp*  $\Delta$ *tssD-1*)中表达外源抗原, 为开发多联活疫苗提供新的思路和方法。【方法】利用同源重组技术, 将亲本株 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* 中的 *murI* 基因敲除, 构建 *murI* 基因缺失突变株; 将广宿主穿梭质粒 pBBR1MCS-2 的卡那霉素抗性基因替换为 *murI* 基因, 构建平衡致死质粒(即无抗性回补质粒); 在平衡致死质粒的多克隆位点处插入绿色荧光蛋白以检测外源抗原是否稳定表达, 对重组菌株进行生物学特性分析, 包括生长曲线、质粒稳定性和外源抗原表达水平。【结果】*murI* 基因缺失株在不含 D-谷氨酸的 LB 培养基上无法生长; 无抗性回补株在不含 D-谷氨酸的 LB 培养基上恢复了生长能力, 但生长速度低于亲本株; 经鉴定外源抗原可在无抗性质粒中稳定表达, 并可在荧光显微镜下观察到明显的绿色荧光信号; 此外, 平衡致死质粒在重组菌株中具有良好的遗传稳定性。【结论】本研究以 *murI* 为靶点构建了新型的染色体-质粒平衡致死系统, 可在无抗性筛选条件下在 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* 中表达外源抗原, 为开发多联活疫苗提供了新的策略和方法。

**关键词:** 杀香鱼假单胞菌  $\Delta$ *tssD-1* 株; 营养缺陷株; 平衡致死系统; D-谷氨酸

资助项目: 国家自然科学基金(42376108)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42376108).

\*Corresponding author. E-mail: taozhen123@zjou.edu.cn

Received: 2023-08-01; Accepted: 2023-10-17; Published online: 2023-10-19

# Construction of a chromosome-plasmid balanced lethal system based on *murI* in the attenuated live vaccine strain of *Pseudomonas plecoglossicida*

ZHANG Mingming<sup>1</sup>, YE Haoda<sup>2</sup>, ZHANG Chaozheng<sup>1</sup>, WANG Pengcheng<sup>1</sup>, WANG Kequan<sup>1</sup>, YAN Xiaojun<sup>1</sup>, TAO Zhen<sup>1\*</sup>

1 School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

2 School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] To construct a chromosome-plasmid balanced lethal system based on the glutamate racemase (MurI) gene for the expression of exogenous antigens in the attenuated vaccine strain of *Pseudomonas plecoglossicida* (*Pp*  $\Delta$ *tssD-1*), so as to provide new ideas and methods for the development of multi-component live vaccines. [Methods] We constructed a *murI*-deleted strain from *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* by homologous recombination. First, we replaced the kanamycin resistance gene of the pBBR1MCS-2 plasmid with *murI* to construct a balanced lethal plasmid. Subsequently, we inserted the green fluorescent protein gene into the multicloning site of the plasmid to examine the expression stability of the exogenous antigen. Finally, we characterized the recombinant strain in terms of the growth curve, plasmid stability, and expression of the exogenous antigen. [Results] The *murI*-deleted strain was unable to grow in the lysogeny broth medium without D-glutamate. The non-resistant complemented strain regained growth capability in the lysogeny broth medium without D-glutamate. However, its growth was slower than that of the starting strain. Exogenously introduced antigens were identified as stable in the absence of antibiotic selection, and distinct green fluorescence signals were observed under a fluorescence microscope. Additionally, the balanced lethal plasmid exhibited high genetic stability within the recombinant strain. [Conclusion] A novel chromosome-plasmid balanced lethal system targeting *murI* was developed in this study. It enabled the expression of exogenous antigens in *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* without the need for antibiotic selection. This system provides a new method for the development of multi-component live vaccines, with no need of antibiotic resistance markers and high plasmid stability.

**Keywords:** *Pseudomonas plecoglossicida*  $\Delta$ *tssD-1*; auxotroph; balanced lethal system; D-glutamate

大黄鱼是我国重要的海水经济养殖鱼类之一，其养殖过程中面临多种疾病威胁，尤其是大黄鱼内脏白点病(visceral granulomas disease)，该病由杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)引起，具有流行范围广和发病死亡率高等特点，给大黄鱼养殖业造成了严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。为

了能安全有效地防治大黄鱼内脏白点病，研究人员已经通过基因工程方法，敲除了杀香鱼假单胞菌的一个毒力基因 *tssD-1* (type VI secretion system tube protein Hcp, 基因位点 DVB73\_06795)，构建了一株杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗候选株 (*Pp*  $\Delta$ *tssD-1*)，并证实 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* 在大黄鱼中的

高免疫效价和安全性<sup>[3]</sup>。然而, *Pp ΔtssD-1* 只能预防由杀香鱼假单胞菌引起的大黄鱼内脏白点病, 不能预防其他常见的细菌性疾病, 如弧菌病、诺卡氏菌病等<sup>[4-5]</sup>。因此, 研发广谱多联疫苗成为新方向。

将多种外源抗原导入到安全的活细菌载体中进行表达是一种构建多联疫苗的技术方法。然而, 传统的含抗性基因的质粒系统存在一些缺陷, 如安全性风险和质粒丢失导致抗原无法表达等<sup>[6]</sup>。为解决这一问题, 研究人员提出了染色体-质粒平衡致死系统(chromosome-plasmid balanced-lethal system)这一新型抗原表达递送策略<sup>[7-8]</sup>。该系统通过敲除染色体上对生长必需的基因并由质粒补偿实现, 非抗性筛选压力下即可稳定存在和表达外源抗原。目前, 平衡致死系统多基于营养合成相关基因, 如 *asd*、*thyA* 和 *glnA* 等<sup>[9-11]</sup>。谷氨酸消旋酶(glutamate racemase, MurI) (EC5.1.1.3)催化 L-谷氨酸向 D-谷氨酸的转

化, 是肽聚糖合成途径中的关键一步<sup>[12]</sup>。因此, *murI* 可能是构建新型平衡致死系统的理想靶点。为验证这一假设, 本研究以 *Pp ΔtssD-1* 为亲本株, 基于细胞壁合成关键基因 *murI*, 构建一种新型平衡致死系统。该系统能够在无抗生素选择压力下稳定存在并表达外源抗原, 确保外源抗原的稳定表达和高效递送。由于 *murI* 基因在细菌细胞壁合成中至关重要且高度保守<sup>[13]</sup>, 所以该方法可能具有较广泛的适用性和可移植性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及培养条件

本研究所用菌株和质粒见表 1。大肠杆菌菌株在 37 °C 条件下培养, 杀香鱼假单胞菌菌株在 30 °C 条件下培养。所有菌株均用 LB 固体或液体培养基进行培养, 必要时添加合适浓度抗生素或 D-谷氨酸。液体培养物在摇床中振荡培养时, 使用的转速为 150–200 r/min。

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Source
Strains		
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>		
<i>Pp ΔtssD-1</i>	Wilde type knocked out the <i>tssD-1</i> , gene site is DVB73_06795; Cam <sup>r</sup>	[14]
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5α	Clone strain	Vazyme
<i>E. coli</i> S17-1λpir	Host for π requiring plasmids, conjugal donor	[14]
Plasmids		
pK18mobsacB	<i>sacB</i> -based gene replacement vector; Kan <sup>r</sup>	[14]
pBBR1MCS-2	Mobilizable shuttle and expression vector. Replicates in many Gram-negative bacteria; Kan <sup>r</sup>	[15]
pDSK- <i>gfpuv</i>	Broad host green fluorescent expression; Kan <sup>r</sup>	[16]
pK18- <i>murI</i>	<i>sacB</i> -based gene replacement vector and <i>murI</i> homologous arms upstream and downstream of the <i>murI</i> gene; Kan <sup>r</sup>	This study
pBBR1- <i>murI</i>	pBBR1MCS-2 expressing vector, containing gene encoding <i>murI</i>	This study
pBBR1- <i>murI-gfpuv</i>	pBBR1MCS-2 expressing vector, containing gene encoding green fluorescent protein and <i>murI</i>	This study

Cam: Chloramphenicol; Kan: Kanamycin.

## 1.2 主要试剂

实验中所需抗生素如氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)及氯霉素(chloramphenicol, Chl)等购自生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌培养基购自青岛海博生物有限公司;2×ES Taq Master Mix、DNA 提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;限制性内切酶、T4 连接酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;高保真 PCR 预混液 2×Phanta Max Master Mix、FastPure Plasmid Mini Kit 及 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit (吉普森克隆)试剂盒购自诺维赞生物科技有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司;D-谷氨酸购自北京索莱宝科技有限公司。

## 1.3 引物设计及合成

参照 GenBank 中公布的杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 基因组(登录号: NZ\_CP031146)、

pK18mobsacB 质粒(登录号: FJ437239)序列, 以及 Addgene 网站(www.addgene.org)公布的 pBBR1MCS-2 质粒及 pDSK-*gfpuv* 质粒序列设计引物(除 P5/P6 外)。参照 Izumi 等的方法合成验证杀香鱼假单胞菌特异性引物(P5/P6)<sup>[17]</sup>。引物序列见表 2。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.4 杀香鱼假单胞菌 *murI* 基因的鉴定

为鉴定杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 基因组中的 *murI* 基因, 以 *Escherichia coli* K12 菌株 MurI 蛋白的氨基酸序列(GenBank 登录号: AAC76949.2)作为查询序列, 利用假单胞菌数据库(www.pseudomonas.com)提供的在线工具 BLASTp, 在杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 基因组编码的蛋白数据库中寻找同源蛋白, BLASTp 比对使用系统默认参数。使用 NCBI 提供的在线工具 Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/CDSearch/>)

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
P1	AATGAATTCGCGTGGGCGAACTGC	600
P2	ACGTTTTTTTAAAGCCATCGCGCTTGCCGCATA	
P3	AGCGCGATGGCTTAAAAAACGTGAAAAACCGCTGAACTATCAAG	600
P4	AATGGATCCAGGGTATAGGTTTCAACCCCATCG	
P5	TGCTGAAGGACGAGCGTTCG	520
P6	ATCATCTTGCCGACAACAGC	
P7	TGGACTGCTCCGACAACCTTC	1 472/674
P8	CCGTCCCAATAGCCAGTCAG	
P9	ATGGCTGAGCGTTCGGCGCC	798
P10	AGGCAGCGTGCAGCCTTTTCAGTTGTAA	
P11	CAGGATGAGGATCGTTTCGCATGGCTGAGCGTTCGGCGC	798
P12	TTCGAACCCAGAGTCCCCTTACAAGTAAAAGGCTGCACGCTGCCT	
P13	TGCAGCCTTTTCAGTTGTAAGCGGACTCTGGGGTTCGAAAT	4 352
P14	GGCGCCGAACGCTCAGCCATGCGAAACGATCCTCATCCTGT	
P15	CAGGTAGCTTGCAAGTGGGCTTAC	1 094
P16	CCAACCTTTCATAGAAGGCGGC	
P17	AATGGATCCGTAAAACGACGGCCAGTGAATTC	995
P18	AATCCGCGGTTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTG	

Restriction sites are underlined.

ncbi.nlm.nih.gov/cdd/)对目标蛋白的保守结构域进行鉴定。蛋白的氨基酸序列使用 Clustal Omega 进行了多序列比对<sup>[18]</sup>, 使用 ESPript 工具对序列比对结果进行可视化<sup>[19]</sup>。

### 1.5 *murI* 基因缺失突变株( $\Delta murI$ )的构建及鉴定

本研究基于质粒 pK18mobsacB 同源重组双交换的方法, 实现 *Pp*  $\Delta tssD-1$  基因组中 *murI* 基因的无痕敲除, 实验过程参考 Tao 等的方法<sup>[14]</sup>。在 *Pp*  $\Delta tssD-1$  基因组中 *murI* (基因位点 DVB73\_RS19840) 基因处, 分别用引物对 P1/P2 和 P3/P4 扩增 *murI* 基因上下游 600 bp 的同源臂片段, 将 2 个片段连接到已双酶切的 pK18mobsacB 质粒 (酶切位点: *EcoR* I、*Bam*H I) 中, 得到 *murI* 基因敲除质粒 pK18-*murI*。再将连接产物转化至 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆菌落, 进行 PCR 检测, 并通过测序进行验证。选择验证后的阳性克隆菌落, 扩大培养后提取质粒, 将其转化至 *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir 中。将含有重组质粒的 *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir 与受体菌株 *Pp*  $\Delta tssD-1$  按 1:10 比例结合培养, 在含卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL) 和氯霉素 (35  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上筛选阳性克隆菌落。用引物对 P5/P6 和 P7/P8 进行 PCR 验证, 选择 P5/P6 扩增阳性且 P7/P8 扩增得到双条带 (674 bp 和 1 472 bp) 的重组菌株, 在含有 10% 蔗糖、10 mmol/L D-谷氨酸和氯霉素 (35  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上进行筛选培养, 用引物对 P5/P6、P7/P8 及 *murI* 检测引物 P9/P10 进行 PCR 检测 (以亲本菌株 *Pp*  $\Delta tssD-1$  作为对照), 筛选 *Pp*  $\Delta tssD-1$  的 *murI* 基因缺失株, 即 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$ 。

### 1.6 *Pp* $\Delta tssD-1\Delta murI$ 的表型及遗传稳定性检测

将 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  的菌液分别接种于普通 LB 平板和含 10 mmol/L D-谷氨酸的 LB 平板

上, 培养 24 h 观察生长情况, 确认 D-谷氨酸营养缺陷表型。此外, 将 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  转接至含 10 mmol/L D-谷氨酸的 LB 液体培养基中, 连续传代培养 40 代 (每 12 h 重新接种 1 次, 计为一代), 每 10 代取样 1 次, 提取基因组 DNA, 利用引物对 P7/P8 进行 PCR 鉴定, 以确定缺失基因在传代过程中的稳定性。

### 1.7 平衡致死质粒的构建及鉴定

以广宿主穿梭载体 pBBR1MCS-2 质粒为载体, 使用 Gibson assembly 克隆方法, 将质粒上的卡那霉素抗性基因 *nptII* 替换为 *Pp*  $\Delta tssD-1$  的 *murI* 基因, 构建平衡致死质粒 (无抗性回补质粒) (图 1)。以 *Pp*  $\Delta tssD-1$  的 DNA 为模板, 用引物对 P11/P12 进行 PCR 扩增, 获得 *murI* 基因片段; 同时以 pBBR1MCS-2 质粒为模板, 使用引物 P13/P14 进行 PCR 扩增, 获得不含 *nptII* 基因的线性化质粒片段。将 2 个片段连接后转化至 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$ , 30  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 挑取单克隆菌落进行培养, 用引物 P15/P16 进行 PCR 鉴定, 以 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  为阴性对照, 同时进行测序验证, 将重组质粒命名为 pBBR1-*murI*, 携带有该质粒的重组菌株命名为 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  (pBBR1-*murI*)。

### 1.8 重组菌株的生物学特性分析

#### 1.8.1 pBBR1-*murI* 质粒在重组菌株中的稳定性检测

将重组菌株 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  (pBBR1-*murI*) 接种至 LB 液体培养基, 并进行连续传代培养, 每次按 1:50 的比例接种至新鲜的 LB 培养基中, 连续转接 60 次。每隔 10 次取部分培养物, 用引物 P9/P10 进行 PCR 扩增检测, 验证 pBBR1-*murI* 质粒在重组菌株中的遗传稳定性。

#### 1.8.2 重组菌株的生长特性鉴定

分别将 *Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  (pBBR1-*murI*)、*Pp*  $\Delta tssD-1\Delta murI$  和 *Pp*  $\Delta tssD-1$  菌株接种于 LB

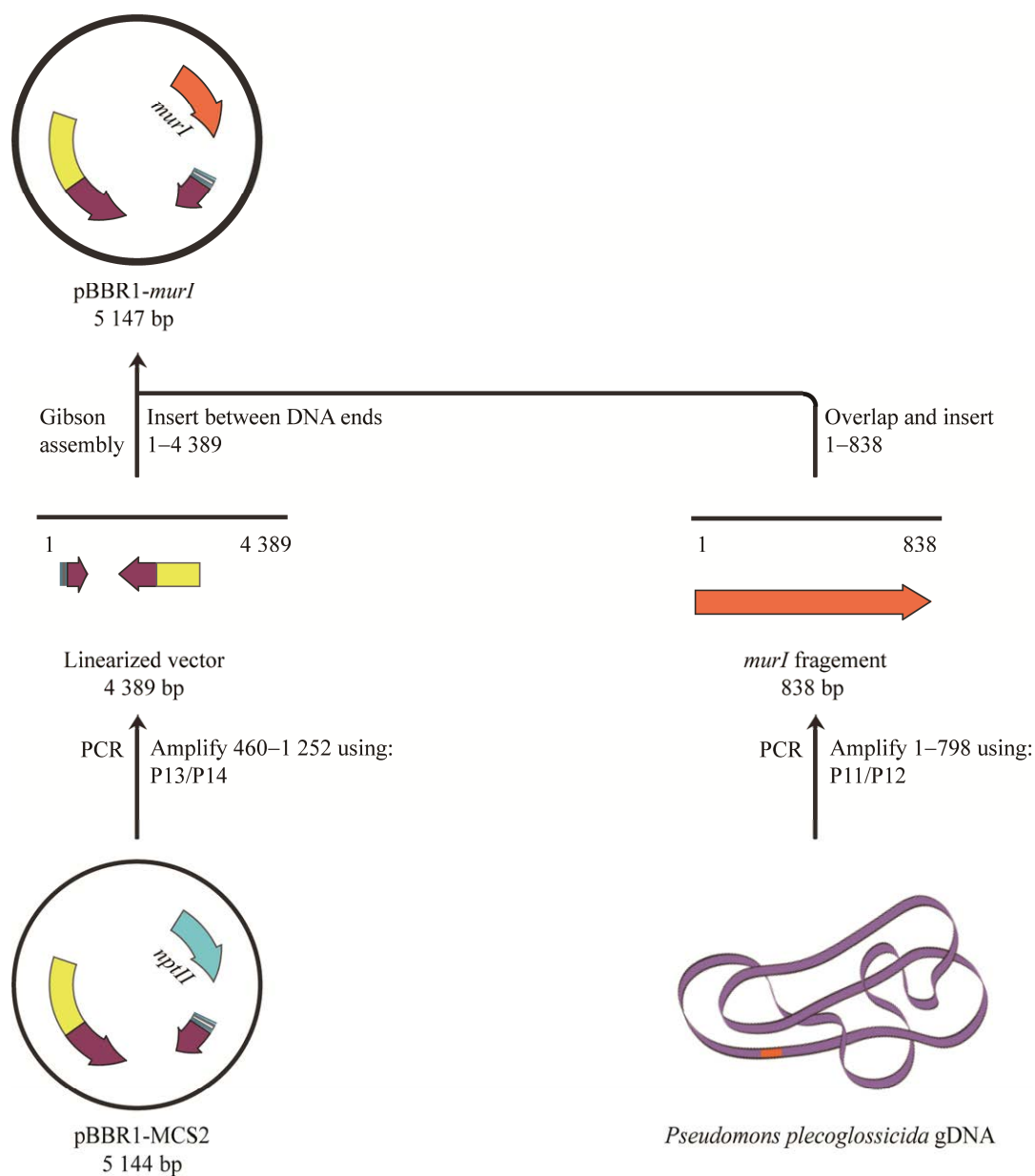


图 1 构建平衡致死质粒 *pBBR1-murI* 示意图

Figure 1 Schematic diagram of the construction of the balanced-lethal plasmid *pBBR1-murI*.

液体培养基(按需添加 D-谷氨酸)中培养过夜,按 1:100 稀释在新鲜培养基中,振荡培养至  $OD_{600}$  在 0.5–0.8,  $4\ 000\times g$  离心 10 min,弃上清后加入不含 D-谷氨酸的 LB 液体培养基,并分别将浓度调整至  $OD_{600}$  值为 0.1。然后,将上述重悬菌液按  $200\ \mu\text{L}$ /孔转至 96 孔板中,  $30\ ^\circ\text{C}$ 、

$150\ \text{r}/\text{min}$  振荡培养,每隔 2 h 在酶标仪上测定  $OD_{600}$  值,连续测定 12 h,绘制生长曲线。

**1.9 外源基因在重组菌株中的表达情况鉴定**  
使用引物 P17/P18 扩增 pDSK-*gfpuv* 中的编码绿色荧光蛋白的 *gfpuv* 基因及其启动区域 (995 bp),将该片段插入 *pBBR1-murI* 质粒的 *Sac* I

和 *Bam*H I 酶切位点之间, 构建 pBBR1-*murI-gfpuv* 质粒。然后将该质粒转化至 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* 菌株, 并在无 D-谷氨酸的 LB 平板上进行筛选。挑取单菌落培养, 使用引物 P17/P18 进行 PCR 鉴定, 并通过测序进行验证, 经过验证的重组菌株命名为 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI-gfpuv*)。然后, 在 LB 液体培养基中培养至对数生长期, 取样进行荧光显微镜观察, 检测 GFPuv 蛋白的表达情况, *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*)作为阴性对照。

### 1.10 数据处理

生长曲线数据采用 Graphpad Prism 8 软件进行绘制和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 基因组中 *murI* 基因的鉴定

使用 *E. coli* K12 菌株 MurI 蛋白的氨基酸序列作为查询序列, 在杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 的蛋白数据库中进行 BLASTp 比对。结果显示, 只有一个蛋白与查询序列具有显著的同源

性, 其编码基因位于 XSDHY-P 基因组(GenBank 登录号: NZ\_CP031146.1)的 DVB73\_RS19840 位点, 长度为 798 bp。该基因编码的蛋白与 *E. coli* K12 菌株的 MurI 蛋白之间的氨基酸序列一致性为 37.8%, 并且在一些关键位点上具有保守性(图 2)。此外, 利用 Conserved Domain Search 工具对该蛋白进行了保守结构域的分析, 结果表明该蛋白是 MurI 超家族(COG0796)成员, 参与细胞壁合成的关键步骤。综上所述, 将 DVB73\_RS19840 位点基因鉴定为 *murI* 基因。

### 2.2 *Pp* $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* 的构建及鉴定

利用基因敲除质粒 pK18mobsacB 的两步同源重组方法, 在 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* 菌株中敲除 *murI* 基因。第 1 步同源重组时, 重组染色体带有卡那霉素抗性基因, 作为筛选标记; 第 2 步同源重组时, 利用 *sacB* 蔗糖敏感性, 作为负筛选标记, 在含有 10%蔗糖、10 mmol/L D-谷氨酸和 35  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 平板上培养, 选择能够生长的菌落作为可能成功构建的 *murI* 缺失株。通过以下 3 对引物对 *murI* 基因缺失株进行 PCR

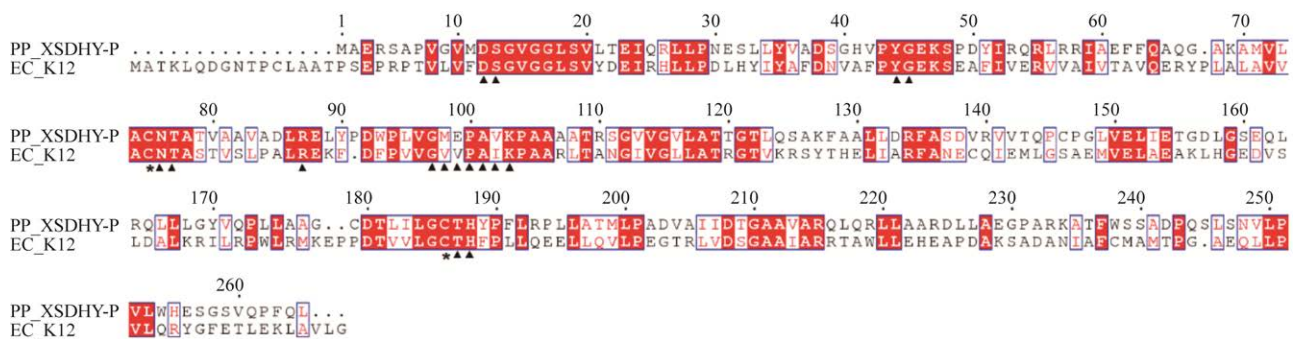


图 2 MurI 蛋白的序列比对图

Figure 2 Alignments of MurI proteins of *Pseudomonas plecoglossicida* XSDHY-P and *Escherichia coli* K12. The residues are colored according to their conservation and similarity. Strictly conserved residues are shown in white text on the red background, and 75% conserved or similarly substituted residues are shown in red text on the white background. The UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanine and L-glutamine binding-site residues are indicated by hollow and solid triangles under the sequences, respectively. The active sites are indicated by asterisks under the sequences<sup>[20]</sup>.



验证: P7/P8 用于检测目标染色体上下游同源臂内侧融合片段(图 3A), P9/P10 用于检测 *murI* 基因是否完全缺失(图 3B), P5/P6 用于检测杀香鱼假单胞菌特异性序列(图 3C)。只有当 P7/P8 扩增出单一条带(674 bp), P9/P10 扩增阴性, 以及 P5/P6 扩增阳性(520 bp)时, 才能确认为 *murI* 缺失株。图 3 显示了 PCR 产物电泳胶图的结果, 其中泳道 3、7、9、13 符合上述标准, 为 *murI*

基因敲除株 *Pp ΔtssD-1ΔmurI*。

### 2.3 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 的表型及遗传稳定性检测

体外培养实验结果显示, *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 丧失了普通 LB 平板上生长的能力(图 4A), 但在补充 10 mmol/L D-谷氨酸后恢复了生长(图 4B), 表明该菌株为 D-谷氨酸营养缺陷型。此外, 将 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 在含 D-谷氨酸的 LB 液体培养

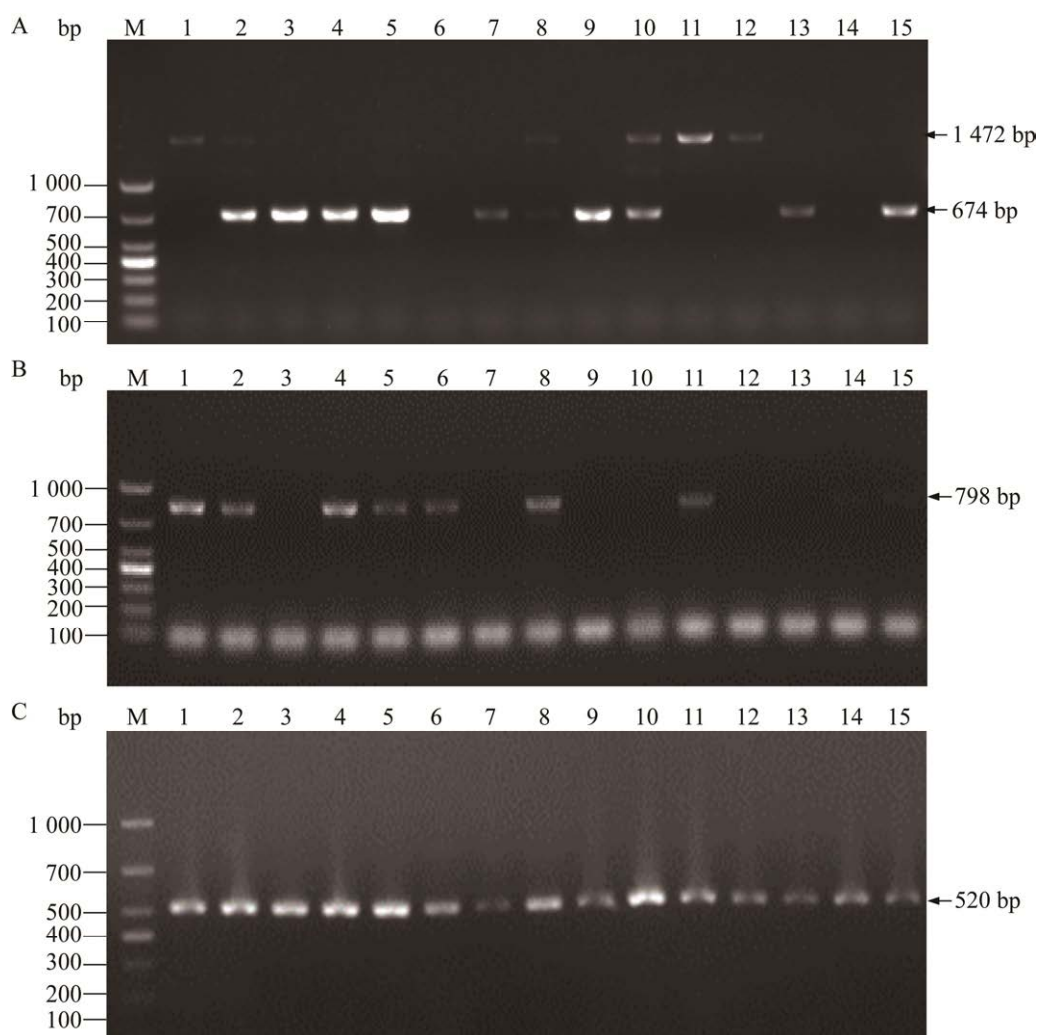


图 3 *murI* 基因敲除株的鉴定

Figure 3 Construction of the *murI* gene knockout strain of *Pseudomonas plecoglossicida Pp ΔtssD-1*. A: PCR detection of the merged flanking arms using primers P7/P8. B: PCR detection of *murI* gene using primers P9/P10. C: PCR identification of *P. plecoglossicida* using primers P5/P6. M: DL1000 marker; Lane 1: *Pp ΔtssD-1*; Lane 2–15: Putative positive colonies.



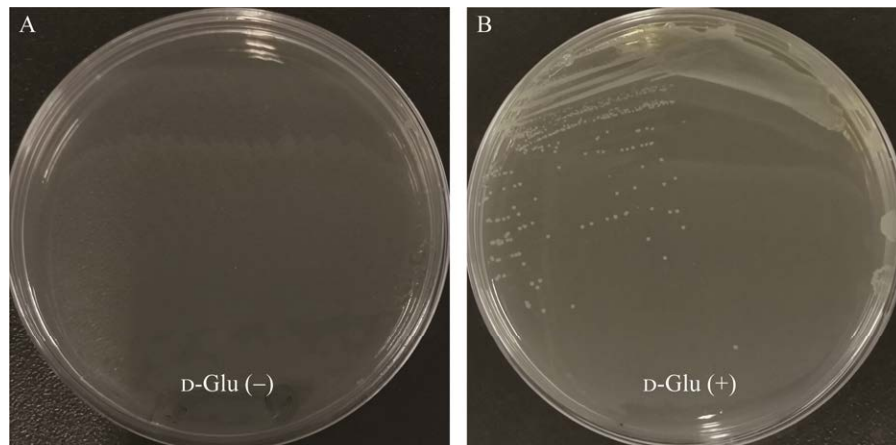


图 4 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 在无 D-谷氨酸 LB 平板(A)和含 D-谷氨酸 LB 平板(B)上的生长情况

Figure 4 Growth of *Pp ΔtssD-1ΔmurI* on LB agar without 10 mmol/L D-glutamate (A) and LB with 10 mmol/L D-glutamate (B).

基中连续培养 40 代, 取 10、20、30、40 代的菌种, 用 P9/P10 引物检测 *murI* 基因。结果显示, 所有代次的菌种检测结果均为阴性(均无扩增条带, 结果未显示), 表明该营养缺陷型可以稳定遗传。

#### 2.4 平衡致死质粒 pBBR1-*murI* 的构建及鉴定

本研究通过 Gibson assembly 克隆的方法构建了平衡致死质粒 pBBR1-*murI*, 并将其转化至 *Pp ΔtssD-1ΔmurI*, 在无 D-谷氨酸添加的 LB 平板上进行筛选。挑取阳性克隆, 进行 PCR 验证。结果如图 5 所示, 使用引物对 P15/P16 进行 PCR 扩增检测, 携带有 pBBR1-*murI* 质粒的菌株在 1 094 bp 处有明显条带; 阴性对照组(*Pp ΔtssD-1ΔmurI*)则无条带。结合 PCR 验证和测序结果, 表明平衡致死质粒 pBBR1-*murI* 构建成功。

#### 2.5 重组菌株的生物学特性分析

##### 2.5.1 pBBR1-*murI* 质粒在 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 中的稳定性检测

随机挑取一株重组菌株 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI*), 在不含 D-谷氨酸的 LB 液体培养基中连续传代 60 次, 取第 10、20、30、40、

50、60 次的菌种, 用 P9/P10 引物进行 PCR 扩增检测, 均可获得 798 bp 的目标条带(图 6), 测序结果比对正确, 表明 pBBR1-*murI* 质粒可以在无抗生素选择压力下稳定存在于 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 中。

##### 2.5.2 重组菌株的生长特性鉴定

在 LB 培养基中无外源 D-谷氨酸补充条件下, 如果重组菌株可以在此培养基中生长, 则

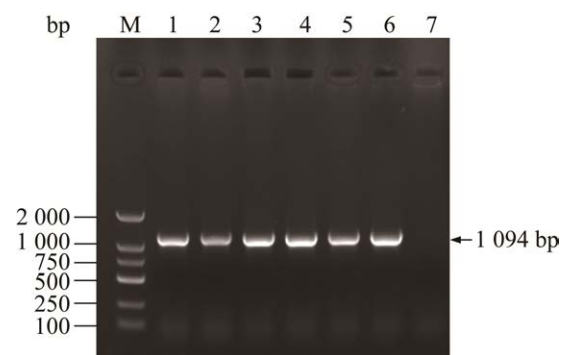


图 5 pBBR1-*murI* 质粒鉴定

Figure 5 PCR verification of the plasmid pBBR1-*murI* using primers P15/P16. M: DL2000 marker; Lane 1-6: PCR amplification of the putative colonies of recombinant strain *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI*); Lane 7: Negative control.

说明重组菌株在回补了质粒 pBBR1-*murI* 后可以自身合成 D-谷氨酸。如图 7 所示, 亲本株 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* 生长良好, 说明该菌株具有合成 D-谷氨酸的能力。与亲本株相比 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* 几乎未生长, *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*) 恢复了生长, 但生长速度低于亲本株。

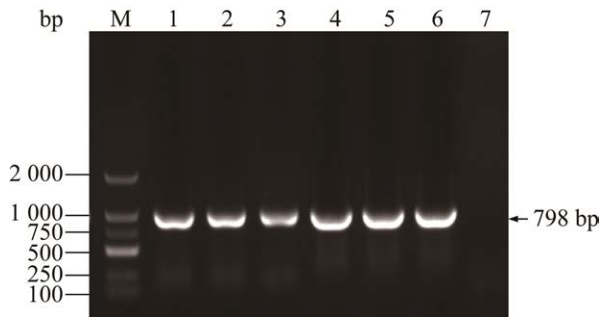


图 6 pBBR1-*murI* 质粒稳定性验证

Figure 6 Confirmation of genetic stability of *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*). M: DL2000 marker; Lane 1–6: PCR amplification of the 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 40<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 60<sup>th</sup> generation of *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*) using primers P9/P10; Lane 7: Negative control.

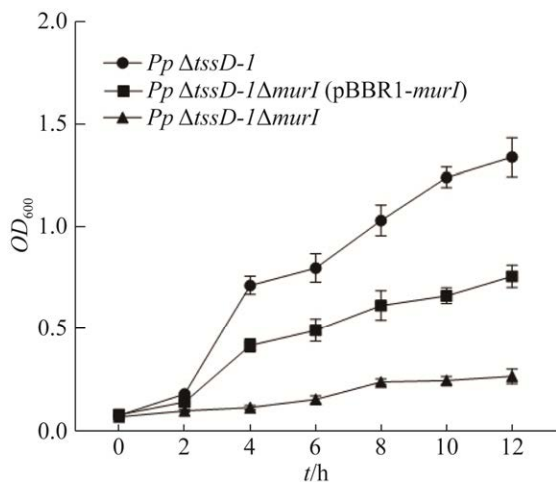


图 7 不同菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线

Figure 7 The growth curves for different strains in lysogeny broth medium. The optical density ( $OD_{600}$ ) values are plotted as the average  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ) at each sampling time.

## 2.6 外源抗原在重组菌株中的表达情况鉴定

将表达绿色荧光蛋白的 *gfpuv* 基因克隆至 pBBR1-*murI* 中构建质粒 pBBR1-*murI*-*gfpuv*, 并电转至 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* 菌株, 用引物 P17/P18 进行 PCR 扩增, 在 995 bp 处有明显条带(图 8)。对所得产物进行测序分析, 综合 PCR 验证和测序结果, 证明 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*-*gfpuv*) 构建成功。将 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*-*gfpuv*) 与对照菌株 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*) 的菌液取样进行荧光显微观察, 在 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*-*gfpuv*) 中观察到明显的绿色荧光(图 9A), 而对照菌株 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*) 未观察到荧光信号(图 9B), 表明以载体 pBBR1-*murI* 为基础构建含 *gfpuv* 基因的重组质粒可以在 *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* 中稳定表达外源基因。

## 3 讨论

本研究采用以 *murI* 为靶点构建染色体-质粒平衡致死系统的方法, 实现了在杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗株中稳定地表达外源蛋白的目

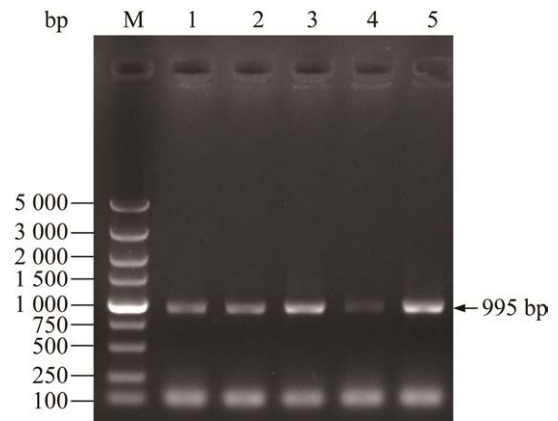


图 8 质粒 pBBR1-*murI*-*gfpuv* 验证

Figure 8 Construction of the plasmid of pBBR1-*murI*-*gfpuv*. M: DL5000 marker; Lane 1–5: PCR amplification of the putative colonies of recombinant strain *Pp*  $\Delta$ *tssD-1* $\Delta$ *murI* (pBBR1-*murI*-*gfpuv*).

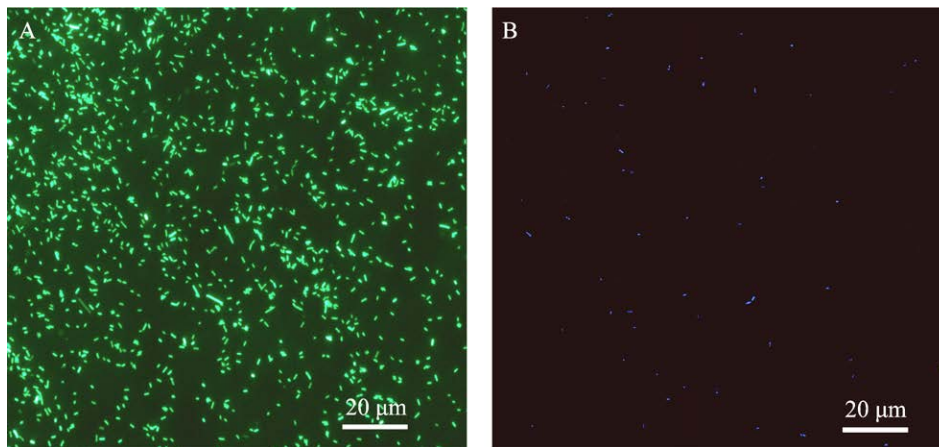


图9 *gfpuv* 基因在重组菌株中的表达(400×)

Figure 9 Expression of *gfpuv* in the recombinant strains (400×). A: *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI-gfpuv*). B: *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI*).

的。该系统通过敲除 *Pp ΔtssD-1* 菌株中的 *murI* 基因, 使其成为 D-谷氨酸营养缺陷株, 并利用广宿主穿梭载体 pBBR1MCS-2 同时表达 *murI* 基因和外源抗原基因, 从而实现了在无抗生素选择压力下的稳定表达。该系统具备以下几个特征: 首先, 与传统方法相比, 该系统无须使用抗生素抗性基因作为筛选标记, 避免了潜在的生物安全问题和耐药性传播的风险。质粒在宿主中的稳定维持和表达不再依赖外源抗生素, 而是通过细菌生存所必需的基因来实现。其次, D-谷氨酸是一种特异于原核生物的氨基酸, 在哺乳动物和鱼类体内不存在或仅以微量存在<sup>[21-22]</sup>。通过破坏 *Pp ΔtssD-1* 菌株的 D-谷氨酸合成途径, 使其无法在鱼体内获得足够的 D-谷氨酸, 从而导致细菌失去生存能力。这种基于营养缺陷的策略确保了质粒的稳定存在和高效表达。

染色体-质粒平衡致死系统是一种利用非抗生素标记的载体表达系统, 其宿主菌是染色体上某些关键基因的缺陷型突变体, 这些基因对细菌的生存和代谢是必需的<sup>[7]</sup>。当这些缺陷型突变体导入带有相应互补基因的质粒后, 就

形成了染色体-质粒平衡致死系统, 质粒对宿主菌起到了功能性互补的作用。如果质粒丢失, 细菌就会因为缺乏必需物质而死亡。在先前的研究中, 已经选择了其他营养代谢途径中的必需基因, 如 *asd*、*thyA* 和 *glnA* 等作为靶点<sup>[23-27]</sup>, 在不同的细菌中构建了平衡致死系统, 并实现了稳定的抗原表达。

本研究选择杀香鱼假单胞菌基因组中单一拷贝的 *murI* 基因作为靶点, 该基因广泛存在于细菌中。经过敲除 *murI* 基因, 成功构建了 D-谷氨酸营养缺陷株 *Pp ΔtssD-1ΔmurI*。实验结果表明, *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 在普通 LB 培养基中失去生长能力, 但在补充外源 D-谷氨酸后恢复生长, 验证了其 D-谷氨酸营养缺陷株。通过转化含有 *murI* 基因的 pBBR1-*murI* 质粒, *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI*) 在 LB 平板上恢复了生长能力, 证明了互补质粒上 *murI* 基因在体外成功表达。同时, 传代实验结果显示, 该系统在体外的遗传稳定性良好。

然而, 本研究观察到 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* (pBBR1-*murI*) 的生长速度似乎低于亲本株 *Pp ΔtssD-1*。这可能是由于宿主细胞内存在多个拷贝

的质粒,可能导致 MurI 蛋白的过量表达,从而改变了细胞的活性,进而影响了细胞的分裂<sup>[28]</sup>。此外,质粒的复制和维持也可能会对细胞的代谢造成负担,消耗了细胞的资源和能量,从而降低了细胞的生长速率<sup>[29]</sup>。为了提高重组菌株的生长效率,未来的研究需要进一步优化该表达系统。值得注意的是,本研究通过转入含有 *gfpuv* 基因的 pBBR1-*murI*-*gfpuv* 重组质粒,在 *Pp ΔtssD-1ΔmurI* 菌株中成功表达了 GFPuv 蛋白。这为将质粒中的 *gfpuv* 基因替换为特定的外源抗原基因,实现对外源抗原的高效表达提供了可能性。

## 4 结论

本研究构建了一种基于 *murI* 基因的染色体-质粒平衡致死表达系统,用于在杀香鱼假单胞菌减毒活疫苗株中高效表达外源抗原,为多联活疫苗的开发提供了一种创新的策略。

## 参考文献

- [1] 刘家富, 余祚澍, 林永添, 陈洪清, 谢文秋. 大黄鱼假单胞菌病的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 5-7, 80.  
LIU JF, YU ZJ, LIN YT, CHEN HQ, XIE WQ. Studies on the *Pseudomonas* disease of large yellow croaker[J]. Marine Sciences, 2004, 28(2): 5-7, 80 (in Chinese).
- [2] ZHANG JT, ZHOU SM, AN SW, CHEN L, WANG GL. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(2): 113-121.
- [3] YE HD, XU ZJ, TAO Z, LI WY, LI YY, YANG AM, WANG W, YIN XL, YAN XJ. Efficacy and safety of *Pseudomonas plecoglossicida* mutant *ΔtssD-1* as a live attenuated vaccine for the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735976.
- [4] 鄢庆枇, 王军, 苏永全, 张蕉南. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(3): 191-196.
- YAN QP, WANG J, SU YQ, ZHANG JN. Studies on vibriosis in caged-cultured *Pseudosciaena crocea* (Richardson)[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2001, 6(3): 191-196 (in Chinese).
- [5] 王国良, 袁思平, 金珊. 大黄鱼结节病原菌-诺卡氏菌的鉴定及其系统发育分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 410-414.  
WANG GL, YUAN SP, JIN S. Identification and phylogenetic analysis of a strain of *Nocardia*, a pathogen of large yellow croakers (*Larimichthys crocea*) with tuberculosis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 410-414 (in Chinese).
- [6] ROLAND KL, BRENNEMAN KE. *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle[J]. Expert Review of Vaccines, 2013, 12(9): 1033-1045.
- [7] SANTANDER J, XIN W, YANG Z, CURTISS R. The aspartate-semialdehyde dehydrogenase of *Edwardsiella ictaluri* and its use as balanced-lethal system in fish vaccinology[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15944.
- [8] LEI Y, ZHOU YZ, ZHANG YW, LIU SJ, TIAN SC, OU Q, LIU T, HUANG H, TANG T, WANG C. A *Listeria ivanovii* balanced-lethal system may be a promising antigen carrier for vaccine construction[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(11): 2831-2844.
- [9] GALÁN JE, NAKAYAMA K, CURTISS III R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains[J]. Gene, 1990, 94(1): 29-35.
- [10] 黄维, 曹诚, 李平, 钟辉, 马清钧. 通过大肠杆菌 *thyA* 染色体-质粒平衡致死系统构建无抗性基因表达载体[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 521-526.  
HUANG W, CAO C, LI P, ZHONG H, MA QJ. Expression plasmid-host strain using chromosome-plasmid balanced lethal system based on the *Escherichia coli* *thyA*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(5): 521-526 (in Chinese).
- [11] 李敬业. 大肠杆菌 Nissle1917 染色体-质粒平衡致死系统的构建及功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2010.  
LI JY. Construction and application of the chromosome-plasmid balanced lethal system based on *E. coli* Nissle 1917[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Normal University, 2010 (in Chinese).
- [12] DOUBLET P, van HEIJENOORT J, BOHIN JP, MENGIN-LECREULX D. The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity[J]. Journal of Bacteriology,

- 1993, 175(10): 2970-2979.
- [13] CABRAL MP, GARCÍA P, BECEIRO A, RUMBO C, PÉREZ A, MOSCOSO M, BOU G. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15480.
- [14] TAO Z, XU Y, ZHOU SM, QIAN D, LIU MH, LI WY, XU WJ, YAN XJ. Acquisition of a type VI secretion system is critical for *Pseudomonas plecoglossicida* induced granulomas in fish internal organs[J]. *Aquaculture*, 2020, 516: 734629.
- [15] HAO LK, LIU XM, WANG HY, LIN JQ, PANG X, LIN JQ. Detection and validation of a small broad-host-range plasmid pBBR1MCS-2 for use in genetic manipulation of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus* sp.[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 90(3): 309-314.
- [16] WANG KR, KANG L, ANAND A, LAZAROVITS G, MYSORE KS. Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv[J]. *The New Phytologist*, 2007, 174(1): 212-223.
- [17] IZUMI S, YAMAMOTO M, SUZUKI K, SHIMIZU A, ARANISHI F. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(7): 391-397.
- [18] SIEVERS F, WILM A, DINEEN D, GIBSON TJ, KARPLUS K, LI WZ, LOPEZ R, McWILLIAM H, REMMERT M, SÖDING J, THOMPSON JD, HIGGINS DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7(1): 539.
- [19] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [20] LUNDQVIST T, FISHER SL, KERN G, FOLMER RHA, XUE YF, NEWTON DT, KEATING TA, ALM RA, de JONGE BLM. Exploitation of structural and regulatory diversity in glutamate racemases[J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 817-822.
- [21] LI XY, ZHENG SX, WU GY. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(5): 671-691.
- [22] WOLF AJ, UNDERHILL DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18(4): 243-254.
- [23] FU XL, XU JG. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker[J]. *Microbiology and Immunology*, 2000, 44(7): 551-556.
- [24] LIANG AX, RIAZ H, DONG FX, LUO X, YU X, HAN YG, CHONG ZL, HAN L, GUO AZ, YANG LG. Evaluation of efficacy, biodistribution and safety of antibiotic-free plasmid encoding somatostatin genes delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar choleraesuis[J]. *Vaccine*, 2014, 32(12): 1368-1374.
- [25] PEDRO-ROIG L, CAMACHO M, BONETE MJ. Regulation of ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*: interaction between glutamine synthetase and two GlnK proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(1): 16-23.
- [26] RYAN ET, CREAN TI, KOCHI SK, JOHN M, LUCIANO AA, KILLEEN KP, KLOSE KE, CALDERWOOD SB. Development of a deltaglnA balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(1): 221-226.
- [27] YAN YJ, MU W, ZHANG LZ, GUAN LY, LIU Q, ZHANG YX. Asd-based balanced-lethal system in attenuated *Edwardsiella tarda* to express a heterologous antigen for a multivalent bacterial vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1188-1194.
- [28] SENGUPTA S, NAGARAJA V. Inhibition of DNA gyrase activity by *Mycobacterium smegmatis* MurI[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 279(1): 40-47.
- [29] WEIN T, DAGAN T. Plasmid evolution[J]. *Current Biology*, 2020, 30(19): R1158-R1163.