

动物及兽医生物技术

金黄色葡萄球菌核酸酶 A 与不同外源 DNA 片段融合表达的作用比较

付立霞¹, 冀德君¹, 卢徐斌¹, 韩先干², 魏文志¹

1 扬州大学动物科学与技术学院 江苏省人畜共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

付立霞, 冀德君, 卢徐斌, 等. 金黄色葡萄球菌核酸酶 A 与不同外源 DNA 片段融合表达的作用比较. 生物工程学报, 2016, 32(12): 1654–1663.

Fu LX, Ji DJ, Lu XB, et al. Comparison of effects of staphylococcal nuclease A fused with different exogenous DNA fragments. Chin J Biotech, 2016, 32(12): 1654–1663.

摘要: 金黄色葡萄球菌核酸酶 A (Staphylococcal nuclease A, SNA) 可用于菌蛻制备中宿主菌的进一步灭活及残存遗传物质的去除。关于 SNA 在去除了信号肽后是否仍能分泌至胞外以及是否需要融合其他氨基酸片段才能在宿主菌胞质中发挥作用尚存争议。为厘清这一争议, 分别构建一系列含 SNA、SNA 与 λ 噬菌体 *cro* 基因或结核杆菌脲酶基因部分序列的融合片段 cSNA 或 uSNA 的温控质粒并对其在大肠杆菌内的作用进行评价。结果显示, SNA、cSNA 和 uSNA 的表达产物对大肠杆菌的 4 h 灭活率分别为 99.9%、99.8% 和 74.2%。升温诱导 30 min 后, SNA 和 cSNA 即可在宿主菌胞内被检出, 而 uSNA 需 1 h; 相较之下, SNA 和 cSNA 在培养液上清中的被检出时间要晚 1 h, uSNA 则晚 2 h。对三者的核酸酶活性检测均为: SNA > cSNA > uSNA, 且胞外活性都显著低于胞内。此外, SNA 和 cSNA 在诱导 2 h 后即将宿主基因组成功降解, 而 uSNA 则在整个实验期间均未能使宿主基因组完全降解。这表明 SNA、cSNA 和 uSNA 的表达产物均具有核酸酶活性, 可被动释放至胞外, 外源 DNA 片段的融入反而会降低 SNA 的核酸酶活性。

关键词: 菌蛻, *cro* 基因, 裂解基因 *E*, 金黄色葡萄球菌核酸酶 A, 脲酶基因

Received: May 9, 2016; **Accepted:** September 18, 2016

Supported by: The Open Project Program of Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis (No. R1510), Shanghai Key Project on Agricultural Development through Science and Technology (No. 2015HNG1-9), Project of Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biological Technology and Safety Control (No. K14009).

Corresponding author: Wenzhi Wei. Tel: +86-514-87979096; Fax: +86-514-87350440; E-mail: wzwei@yzu.edu.cn

江苏省人畜共患病学重点实验室项目 (No. R1510), 上海市科技兴农重点攻关项目 (No. 2015HNG1-9), 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室课题 (No. K14009) 资助。

网络出版时间: 2016-09-26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160926.1452.002.html>

Comparison of effects of staphylococcal nuclease A fused with different exogenous DNA fragments

Lixia Fu¹, Dejun Ji¹, Xubin Lu¹, Xian'gan Han², and Wenzhi Wei¹

¹ Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

² Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: Staphylococcal nuclease A (SNA) may be used to produce bacterial ghosts for further inactivation of host bacteria and elimination of residual genetic materials. It is still controversial if SNA without signal peptide can be secreted to extracellular matrix and if fusion with other peptide is required for its function in the cytoplasm of host bacteria. To clarify this dispute, a series of temperature-inducible plasmids carrying *SNA* alone or *SNA* fused with partial sequences of λ phage *cro* gene (cSNA) or *Mycobacterium tuberculosis* urease gene (uSNA) were constructed and evaluated in *Escherichia coli*. Results show that the percentages of inactivated *E. coli* by SNA, cSNA and uSNA after 4 h of induction were 99.9%, 99.8% and 74.2%, respectively. Moreover, SNA and cSNA in the cytoplasm of host bacteria were initially detectable after 30 min of induction, whereas uSNA was after 1 h. In comparison, SNA and cSNA in culture supernatant were initially detectable 1 h later, whereas uSNA was 2 h later. The nuclease activity in the cytoplasm or supernatant was ranked as follows: SNA > cSNA > uSNA, and the activity in the supernatant was significantly lower than that in the cytoplasm. Furthermore, host genomic DNA was degraded by SNA or cSNA after 2 h of induction but not by uSNA even throughout the whole experiment. In conclusion, this study indicates that SNA, cSNA and uSNA expressed in host bacteria all have nuclease activity, the enzymes can be released to culture media, and fusion with exogenous peptide negatively reduces the nuclease activity of SNA.

Keywords: bacterial ghosts, *cro* gene, lysis gene *E*, staphylococcal nuclease A, urease gene

菌蛻是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 裂解基因 *E* 的诱导表达产物裂解后所形成的不含胞质内含物的完整细菌空壳。由于保留了细菌原有的表面结构和特性, 菌蛻具有疫苗和佐剂的双重功能, 可刺激机体产生更强的免疫反应, 因而较常规疫苗具有更好的免疫保护效果^[1-4], 其更进一步的优点是可以作为抗原、核酸和药物的高级递送载体^[5-7]。正是由于具有这些优点, 使得菌蛻日益成为当前疫苗研究的热点。在菌蛻的制备过程中, 尽管大多数实验细菌可被裂解基因 *E* 所介导的裂解作用完全灭活, 但也有些细菌尤其是大肠杆菌不易被完全灭活, 而

且在溶菌诱导后期会出现反弹性生长^[7-9]。为了解决这一问题, 具有核酸降解能力的金黄色葡萄球菌核酸酶被作为辅助致死蛋白引入菌蛻疫苗的制备之中, 以使宿主菌进一步被灭活, 同时去除残存的遗传物质, 消除潜在的生物安全风险^[10-13]。

由于金黄色葡萄球菌核酸酶在基因组成上除了结构基因之外, 前端还包括前体序列和信号肽序列^[14], 在将其应用于菌蛻制备时为避免可能的分泌作用影响效果, 只克隆表达其结构基因。但 Lee 等在相关研究中却发现由 λ 噬菌体启动子 pR 指导的 *SNA* 的基因表达产物不能

降解细菌基因组 DNA，而通过融合 Cro 蛋白 N 端 26 个氨基酸片段可成功解决这一问题，他因此推测 SNA 可能在缺失信号肽的情况下仍能被分泌至胞外^[12]，与之相应的是 Recchi 等在将金黄色葡萄球菌核酸酶用于耻垢分枝杆菌外泌蛋白筛选时也观察到类似现象^[15]。不过，Fu 等在后续研究中却再次证实 SNA 基因的单纯表达产物即可成功降解细菌基因组 DNA，并推断 SNA 并非必须与其他基因融合，基因的表达效率才是关键^[16]。

鉴于目前关于 SNA 在菌蜕制备中应用形式方面存在的上述争议，本研究通过对争议中所涉及的 SNA 结构基因及其相关融合片段进行克隆及温控表达，并对相应表达产物的核酸酶活性及对宿主菌的作用效果进行比较，以期厘清这一争

议，为高效安全菌蜕疫苗的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司，质粒 pFLX107、pBV220-SNA 由本实验构建保存^[16-17]。限制性内切酶 *Xcm* I 为 New England BioLabs 产品，*Kpn* I、*Pst* I、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR HS (Premix)、Premix ExTaq、DL5000、DL10000 等均购自于 TaKaRa。DNA Mini Kit、High-Speed Plasmid Mini Kit 和 Gel/PCR DNA 等为 Geneaid 产品。甲苯胺蓝 DNA 琼脂购自杭州滨和微生物试剂有限公司。所有引物 (表 1) 均由赛默飞世尔 (Thermo Fisher) 旗下英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

表 1 本研究中所用引物序列

Table 1 Primers sequence used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
SNA-F	CGGGGTACCATGGCAACTTCAACTAAAAA	<i>Kpn</i> I
SNA-R	AAACTGCAGTTATTGACCTGAATCAGCGT	<i>Pst</i> I
tSNA-F	ATGGCAACTTCAACTAAAAA	
tSNA-R	TTATTGACCTGAATCAGCGT	
Cro-F	CGGGGTACCATGGAACAACGCATAACCCT	<i>Kpn</i> I
Cro-R	AGTTGCATATACGCCGAGATCTTTAGCTGTCTTGG	
cSNA-F	ATCTCGGCGTATATGCAACTTCAACTAAAAAATT	
cSNA-R	AAACTGCAGTTATTGACCTGAATCAGCGT	<i>Pst</i> I
Ure-F	CGGGGTACCATGCGCCTGACGCCGCAC	<i>Kpn</i> I
Ure-R	GTTGAAGTTGCGCGGGCCCGACGCCGGCG	
uSNA-F	CGCGCAACTTCAACTAAAAAATTAC	
uSNA-R	AAACTGCAGTTATTGACCTGAATCAGC	<i>Pst</i> I
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13-48	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	

1.2 质粒 pFLX107-SNA 的构建

以质粒 pBV220-SNA 为模板, 利用引物 SNA-F/SNA-R 扩增 SNA。反应体系为 50 μ L, 其中模板和正反向引物各 1 μ L, PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 灭菌双蒸水 22 μ L。PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后切胶回收。用 *Kpn* I 和 *Pst* I 对回收目的片段进行双酶切, 然后连入同样经 *Kpn* I / *Pst* I 双酶切的 pFLX107 质粒中, 最终构建成功的质粒命名为 pFLX107-SNA (图 1)。

1.3 质粒 pFLX107-tSNA 的构建

质粒 pFLX107-tSNA 为通过 TA 克隆的方式

构建。以质粒 pBV220-SNA 为模板, 利用引物 tSNA-F/tSNA-R 和 Premix ExTaq 扩增 SNA 基因, 然后回收连入经 *Xcm* I 酶切回收的 pFLX107 中, 将经测序验证 SNA 为反向插入的质粒命名为 pFLX107-tSNA, 作为后续实验的空白对照 (图 1)。

1.4 质粒 pFLX107-cSNA 的构建

以质粒 pBV220-SNA 为模板, 先通过引物 Cro-F/Cro-R 和 cSNA-F/cSNA-R 分别扩增 *cro* 5'端序列和 SNA 基因, 然后以回收的 *Cro* 片段和 SNA 片段为混合模板、以 Cro-F/cSNA-R 为引物, 通过重叠 PCR 将 *Cro* 片段与 SNA 融合, 最后经 *Kpn* I / *Pst* I 酶切后连入 pFLX107 相应酶切位点, 构建成质粒 pFLX107-cSNA (图 1)。

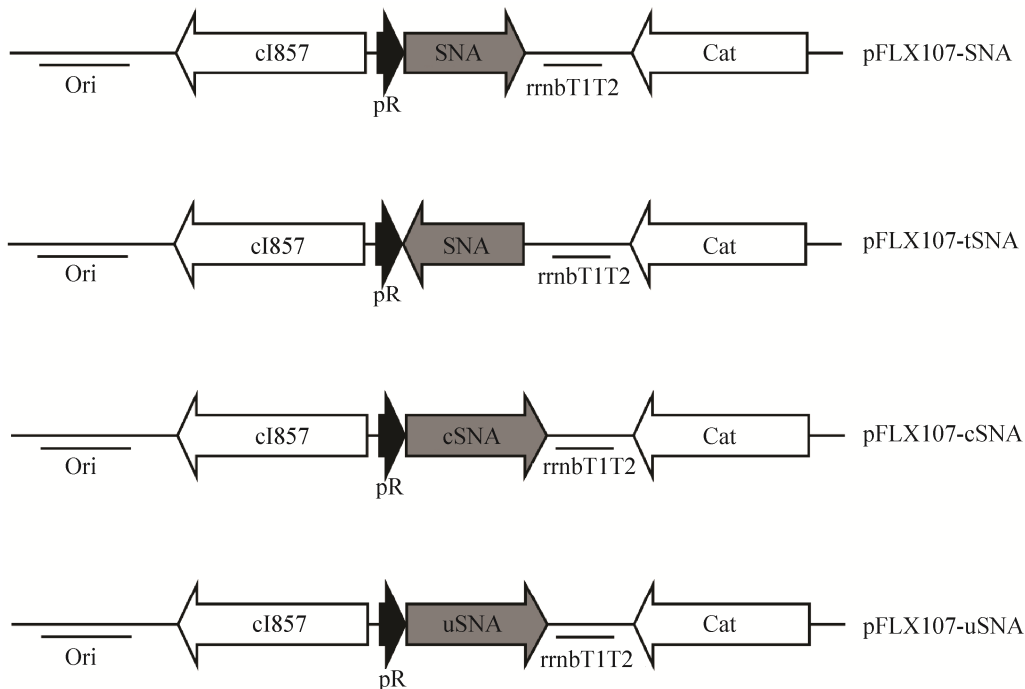


图 1 温控表达质粒图谱

Fig. 1 Maps of thermo-inducible plasmids. Cat: chloramphenicol acetyltransferase gene; Ori: origins of replication; pR: the rightward lambda promoter; cI857: a temperature sensitive repressor cI857; rrnBT1T2: ribosomal RNA operon T1T2 terminator; SNA: staphylococcal nuclease A gene; cSNA: SNA fused with Cro; uSNA: SNA fused with UreA.

1.5 质粒 pFLX107-uSNA 的构建

根据已发布序列委托合成结核分枝杆菌脲酶 A 基因 (*ureA*) 5'端序列^[18], 然后利用引物 Ure-F/Ure-R 扩增 *ureA* 基因 5'端序列。同时, 以质粒 pBV220-SNA 为模板, 利用引物 uSNA-F/uSNA-R 扩增 *SNA* 基因。最后通过上述方法将 *ureA* 序列与 *SNA* 融合并克隆至质粒 pFLX107, 构建成质粒 pFLX107-uSNA (图 1)。

1.6 不同 *SNA* 基因的诱导表达

所有构建成功的质粒均转化至大肠杆菌 DH5 α 。诱导表达前, 将含有相应质粒的大肠杆菌 DH5 α , 接种至 100 mL 含氯霉素 (35 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C 振荡培养。当培养液 OD_{600} 达到 0.3–0.4 时, 将温度升至 42 $^{\circ}$ C 诱导基因的表达, 同时向培养液中加入 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$, 使终浓度分别为 10 mmol/L 和 1 mmol/L, 以发挥 *SNA* 的最大活性。每隔一定时间取样测定培养物的 OD_{600} , 监测细菌的生长情况。对诱导后 0、2 和 4 h 的菌液做适当稀释后, 进行平板活菌计数, 计算 *SNA* 所介导的灭活效率。计算公式为:

$$\text{灭活率} = (1 - \text{诱导后 CFU} / \text{诱导前 CFU}) \times 100\%$$

1.7 基因组检测

诱导后每隔 1 h 取 1 mL 细菌培养液提取总基因组, 确认核酸酶的降解活性。基因组的提取使用 Genomic DNA Mini Kit, 整个操作按照产品说明书进行。核酸酶对基因组的降解活性通过 0.8% 琼脂糖电泳分析。

1.8 核酸酶活性测定

核酸酶活性的测定参照唐俊妮等^[19]的方法, 通过甲苯胺蓝 DNA 琼脂平板进行并略有改动。具体操作为: 先配置甲苯胺蓝 DNA 琼脂, 灭菌后倒入平皿中, 待凝固后, 用直径 3 mm 的

打孔器均匀打孔, 取出孔中琼脂。然后待升温诱导后每隔一定时间取样离心, 取 10 μ L 上清加入孔中以测定培养液上清中核酸酶的活性, 然后弃上清, 以等量灭菌 LB 液体对沉淀菌体进行重悬, 煮沸 15 min, 再离心取 10 μ L 上清加入其他孔中以测定胞内核酸酶的活性, 加样后的平板均置于 28 $^{\circ}$ C 过夜培养。上样孔周围蓝色消退出现粉红色圆圈者为阳性反应, 无变色为阴性反应, 通过测量粉红圈的直径 (不含孔径) 以判定核酸酶活性, 阴性反应则记录为零。

2 结果与分析

2.1 pFLX107 系列衍生质粒的构建

以质粒 pBV220-SNA 为模板, *SNA*-F/*SNA*-R、*tSNA*-F/*tSNA*-R、*Cro*-F/*Cro*-R、*cSNA*-F/*cSNA*-R 和 *uSNA*-F/*uSNA*-R, 引物对成功扩增出大小分别为 468 bp (含限制性酶切位点和保护碱基, 后同)、450、93、473 和 462 bp 的预期目的片段 (图 2); 以人工合成 *ureA* 基因为模板, 引物 Ure-F/Ure-R 成功扩增出大小为 98 bp 的目的片段 (图 2)。运用重叠 PCR 技术, 分别以 *Cro*-F/*cSNA*-R 和 Ure-F/*uSNA*-R 为引物, 均成功扩增出大小约为 546 bp 的融合片段 (图 2)。

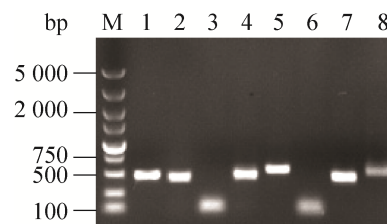


图 2 目的基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of target gene. M: DNA marker DL5000; 1: *SNA*; 2: *tSNA*; 3: *cro*; 4: *SNA* for constructing *cSNA*; 5: *cSNA*; 6: *ureA*; 7: *SNA* for constructing *uSNA*; 8: *uSNA*.

对构建成功的质粒 pFLX107-SNA、pFLX107-tSNA、pFLX107-cSNA、pFLX107-uSNA 以 M13-47/M13-48 引物进行 PCR 鉴定均能扩增出预期目的片段,分别为 673、571、748 和 748 bp (图 3), 测序结果表明, 成功构建上述质粒。

2.2 大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线比较

转化有上述构建质粒的大肠杆菌 DH5 α 在 28 °C 培养至 OD_{600} 值约为 0.3–0.4 后, 升温至 42 °C 并加入 $MgCl_2/CaCl_2$ 进行 SNA 基因的诱导表达, 在核酸酶的作用下其 OD_{600} 表现出不同的变化规律。

含质粒 pFLX107-SNA、pFLX107-cSNA、pFLX107-uSNA 的大肠杆菌 DH5 α 经升温诱导后, OD_{600} 均经历一段快速增长后缓慢下降最后趋于平稳, 其中大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-SNA) OD_{600} 在 120 min 达到最大值后开始缓慢下降, 180 min 后稳定于约 1.0 左右; 大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-cSNA) 的 OD_{600} 于 150 min 达到最大值后缓慢下降, 210 min 后稳定于 1.1 左右; 大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-uSNA) 的 OD_{600} 于 210 min 达到最大值后一直稳定维持于 1.4 左右。作为对照的大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-tSNA) OD_{600} 则在整个实验期间一直持续增长直至达到平台期 ($OD_{600}=1.8$) (图 4)。

平板活菌计数从另一方面反映了 SNA 的作用效果。诱导后 2 h 和 4 h 转化有质粒 pFLX107-SNA 或 pFLX107-cSNA 的大肠杆菌 DH5 α 活菌数均较诱导前下降了 2–3 个数量级, 大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-SNA) 的灭活率分别为 99.7% 和 99.9%, 大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-cSNA) 的灭活率分别为 99.5% 和 99.8%; 而转化有质粒 pFLX107-uSNA 的大肠杆菌 DH5 α 活菌数则只

较诱导前降低了不到 1 个数量级, 灭活率分别为 55.7% 和 74.2%。相较之下, 大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-tSNA) 活菌数在实验期间一直处于增长之中, 诱导后 2 h 和 4 h 的活菌数分别为诱导前的 1.6 倍和 3.5 倍 (表 2)。

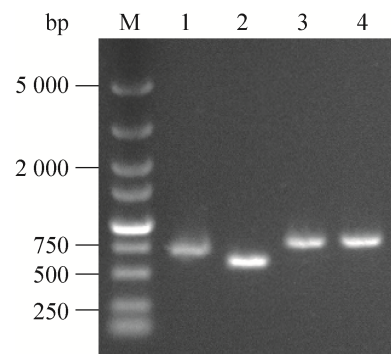


图 3 构建质粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of constructed plasmids. M: DNA marker DL5000; 1: pFLX107-SNA; 2: pFLX107-tSNA; 3: pFLX107-cSNA; 4: pFLX107-uSNA.

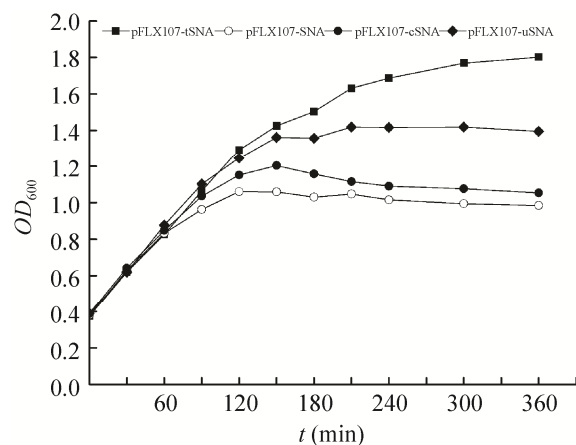


图 4 大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of *E. coli* DH5 α carrying pFLX107-SNA, pFLX107-tSNA, pFLX107-cSNA and pFLX107-uSNA, respectively. The cells were grown at 28 °C until the OD_{600} reached 0.3–0.4, and then was induced by the upshift of temperature from 28 °C to 42 °C. Mg^{2+} and Ca^{2+} were added to the culture simultaneously.

2.3 核酸酶活性

为了解不同重组质粒中金黄色葡萄球菌核酸酶基因的诱导表达及可能存在的外泌情况,对诱导后不同时间段的培养液上清和胞内核酸酶进行活性检测。活性检测阳性反应会在点样孔周围形成粉红色圆圈,其直径大小可在一定程度上反映核酸酶的活性。

升温诱导 90 min 后,大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-SNA) 和大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-cSNA) 培养液上清中可首次检测到核酸酶,此后呈缓慢增加趋势,以最后 4 组测量值计算的平均粉红圈直径分别为 (4.7 \pm 0.3) mm 和 (3.7 \pm 0.2) mm (后同);大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-uSNA) 则在诱导 180 min 后方在其培养液上清中检测到核酸酶,平均粉

红圈直径为 (3.1 \pm 0.2) mm (图 5A)。与之相对的是,大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-SNA) 和大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-cSNA) 胞内核酸酶在诱导 30 min 后即可被检测到,大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-uSNA) 则在诱导 60 min 后可检测到胞内核酸酶,三者的平均粉红圈直径分别为 (10.5 \pm 1.1) mm、(7.2 \pm 0.4) mm 和 (4.1 \pm 0.3) mm (图 5B)。而作为空白对照的大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-tSNA) 则在历次核酸酶活性检测中均为阴性 (图 5)。

2.4 宿主菌基因组电泳检测

在钙、镁离子存在时,升温诱导 2 h 后,大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-SNA) 和大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-cSNA) 的基因组即被成功降解 (图 6),而大肠杆菌 DH5 α (pFLX107-uSNA) 和大肠杆菌

表 2 大肠杆菌 DH5 α 的诱导灭活

Table 2 Inactivation of *E. coli* DH5 α harboring pFLX107-SNA, pFLX107-tSNA, pFLX107-cSNA and pFLX107-uSNA, respectively, after induction by temperature upshift

Bacteria (plasmid)	Number of CFU (Inactivation rate)		
	0 h	2 h	4 h
<i>E. coli</i> DH5 α (pFLX107-tSNA)	8.6×10^7	1.4×10^8	3.0×10^8
<i>E. coli</i> DH5 α (pFLX107-SNA)	1.4×10^8	3.8×10^5 (99.7%)	2.1×10^5 (99.9%)
<i>E. coli</i> DH5 α (pFLX107-cSNA)	1.1×10^8	5.1×10^5 (99.5%)	1.9×10^5 (99.8%)
<i>E. coli</i> DH5 α (pFLX107-uSNA)	9.7×10^7	4.3×10^7 (55.7%)	2.5×10^7 (74.2%)

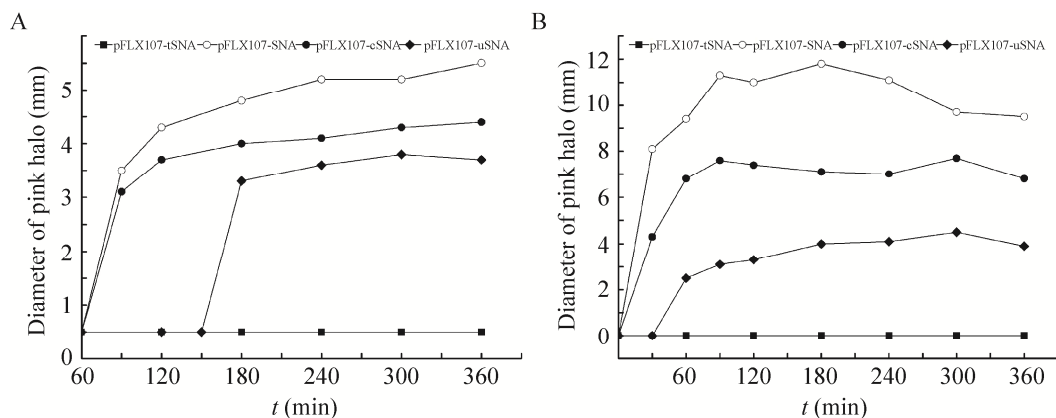


图 5 大肠杆菌 DH5 α 培养液上清 (A) 和胞内 (B) 核酸酶活性

Fig. 5 Nuclease activity of culture supernatant (A) and intracellular nuclease activity (B) of *E. coli* DH5 α carrying pFLX107-SNA, pFLX107-tSNA, pFLX107-cSNA and pFLX107-uSNA, respectively.

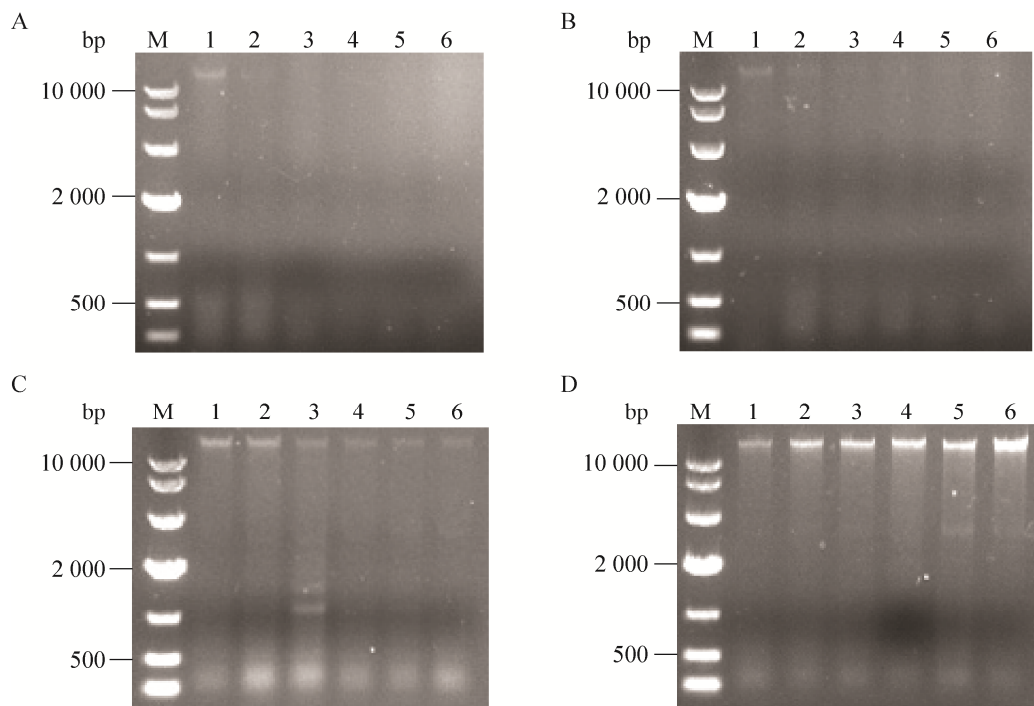


图 6 大肠杆菌 DH5 α 总基因组电泳分析

Fig. 6 Electrophoretic analysis of total DNA of *E. coli* DH5 α harboring pFLX107-SNA (A), pFLX107-cSNA (B), pFLX107-uSNA (C) and pFLX107-tSNA (D), respectively. M: DNA marker DL10000; Lane 1–6: samples prepared from the induced culture every one hour after induction.

DH5 α (pFLX107-tSNA) 的基因组在整个实验期间则始终可被检测到，但通过电泳条带的明暗强度可看出前者基因组浓度诱导后期较诱导前期有所下降 (图 6C)，而后者基因组浓度则不断增加 (图 6D)。

3 讨论

作为一种新型的疫苗技术，菌蛻较传统疫苗的优势已在各类实验中一再得到证实^[1-4]，但在菌蛻的制备过程中，单纯基因 *E* 所介导的裂解作用并不足以使宿主菌完全灭活^[7-9]。出于生物安全考虑，SNA 被作为辅助致死基因引入菌蛻的制备之中，但如前所述，目前关于 SNA 在菌蛻制备中的应用形式存在争议，与之对应的

理论解释也截然相反^[10-13]，因此厘清这一争议对于高效安全菌蛻疫苗的生产或制备无疑具有十分重要的理论意义和经济价值。

本研究通过对争议中所涉及的 SNA 结构基因及其相关融合片段进行克隆及温控表达，并从不同方面对其作用效果进行了比较。本次研究中，无论是 SNA 的单纯表达产物还是其与 Cro 或脲酶 N 端氨基序列的融合产物均具有核酸酶活性，而且综合比较之下单纯 SNA 的活性最强，cSNA 次之，uSNA 则活性最低，显示外源片段的融入反而会在一定程度上降低 SNA 的活性，降低程度则因融入的片段而异，这可能与融入片段会影响到 SNA 的折叠并进而影响到其活性有关。此外，升温诱导后三者 in 宿主菌胞内被

检出的时间均要早于其在培养液上清中被检出的时间,且对应胞内核酸酶活性均显著高于培养液上清中的核酸酶活性,这表明三者可能皆如 Recchi 等对 uSNA 所描述的那样不能外泌,只是由于过表达和宿主菌灭活致死才被动释放至胞外。

另一方面,在菌蜕的制备过程中,裂解基因 *E* 会在宿主菌表面形成平均直径约 40–200 nm 的跨膜通道,导致胞质内容物的释放^[20],这意味着将 SNA 应用于菌蜕制备时无论其自身能否外泌均会被释放至胞外,因此 Lee 等认为核酸酶只有在胞内才能发挥作用的解释值得商榷。根据其描述通过软件重构相关质粒发现,当 SNA 基因被直接置于 pR 控制之下时,SD 盒与起始密码子之间的距离为 57 bp,包含有许多起始构建质粒 pGEM-T easy vector 自身酶切位点及居间序列,并非如之前所分析的那样只是增加了一个限制性酶切位点^[16],而这一距离的最适范围通常为 5–13 bp,超过 20 bp 就会阻碍后续基因的表达^[21],因此两者之间距离过长可能才是导致 SNA 诱导后不能发挥作用的真正原因。进一步分析显示,当 Lee 等进行 Cro 和 SNA 融合时,并没如其所言用 pR-Cro 元件替换质粒中的 pR,而是直接将这一组合元件插入在前述 57 bp 序列中的 *Sal* I 和 *Nde* I 酶切位点之间,对应于 Cro 蛋白 N 端 26 个氨基酸片段的核酸序列实际上也只包含 65 bp 的 Cro 5'端序列,鉴于此后这一存在移码的 Cro 和 SNA 的表达产物仍能正常发挥作用,一种可能的解释是这 65 bp 序列中存在着能影响基因转录或表达的序列元件,类似现象曾在裂解基因 *E* 的体外 DNA 重组 (DNA shuffling) 中出现过,缺失了 1 个起始碱基的基因 *E* 反而具有更高的裂解效率^[22]。此时, Cro

和 SNA 的融合表达产物实际上仍为单纯 SNA。

最后,本次研究中 uSNA 在整个实验期间尽管表现出了对 DNA 的降解能力但并不能使宿主基因组完全降解,对宿主菌的灭活也不到一个数量级,而 SNA 和 cSNA 在升温诱导 2 h 后即将宿主基因组成功降解,对宿主菌的灭活效果也较 uSNA 高出 1–2 个数量级,则从另一方面反映了一个值得注意的问题,即核酸酶的活性才是决定对宿主菌的灭活水平和对基因组降解能力的关键。

REFERENCES

- [1] Mayr UB, Kudela P, Atrasheuskaya A, et al. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157: H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microb Biotechnol*, 2012, 5(2): 283–294.
- [2] Jawale CV, Lee JH. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of adjuvanted *Salmonella typhimurium* ghost vaccine against salmonellosis in chickens. *Vet Quart*, 2016, 36(3): 130–136.
- [3] Liu J, Li Y, Sun Y, et al. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 166(3/4): 138–144.
- [4] Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, et al. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0144397.
- [5] Muhammad A, Champeimont J, Mayr UB, et al. Bacterial ghosts as carriers of protein subunit and DNA-encoded antigens for vaccine applications. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(1): 97–116.
- [6] Ganeshpurkar A, Ganeshpurkar A, Pandey V, et al. Harnessing the potential of bacterial ghost for the effective delivery of drugs and biotherapeutics. *Int J Pharm Investig*, 2014, 4(1): 1–4.

- [7] Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, et al. The bacterial ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs*, 2010, 1(5): 326–336.
- [8] Haidinger W, Szostak MP, Beisker W, et al. Green fluorescent protein (GFP)-dependent separation of bacterial ghosts from intact cells by FACS. *Cytometry*, 2001, 44(2): 106–112.
- [9] Haidinger W, Mayr UB, Szostak MP, et al. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene *E* and staphylococcal nuclease. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6106–6113.
- [10] Mayr UB, Haller C, Haidinger W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157: H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect Immun*, 2005, 73(8): 4810–4817.
- [11] Liu J, Wang WD, Liu YJ, et al. Mice vaccinated with enteropathogenic *Escherichia coli* ghosts show significant protection against lethal challenges. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 54(3): 255–262.
- [12] Lee DJ, Kwon SR, Zenke K, et al. Generation of safety enhanced *Edwardsiella tarda* ghost vaccine. *Dis Aquat Organ*, 2008, 81(3): 249–254.
- [13] Kwon SR, Kang YJ, Lee DJ, et al. Generation of *Vibrio anguillarum* ghost by coexpression of phiX174 lysis *E* gene and staphylococcal nuclease *A* gene. *Mol Biotechnol*, 2009, 42(2): 154–159.
- [14] Shortle D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*, 1983, 22(2–3): 181–189.
- [15] Recchi C, Rauzier J, Gicquel B, et al. Signal-sequence-independent secretion of the staphylococcal nuclease in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 2): 529–536.
- [16] Fu LX, Lu CP. A novel dual vector coexpressing phiX174 lysis *E* gene and staphylococcal nuclease *A* gene on the basis of lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 436–444.
- [17] Fu LX, Wei WZ, Wang XY. Temperature-controlled zero background T-vector precursor and construction method and application thereof: China, CN 201310488129.7. 2015-01-07 (in Chinese). 付立霞, 魏文志, 王秀英. 一种温控零背景 T 载体前体及其构建方法和应用: 中国, CN 201310488129.7. 2015-01-07.
- [18] Clemens DL, Lee BF, Horwitz MA. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol*, 1995, 177(19): 5644–5652.
- [19] Tang JN, Shi XM, Zhang R, et al. The influences of different conditions on thermonuclease activity in *Staphylococcus aureus*. *J Southwest Univ Nationalities: Nat Sci Ed*, 2010, 36(6): 589–592 (in Chinese). 唐俊妮, 史贤明, 张荣, 等. 不同条件对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性影响的研究. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(6): 589–592.
- [20] Witte A, Wanner G, Bläsi U, et al. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phiX174 lysis protein E. *J Bacteriol*, 1990, 172(7): 4109–4114.
- [21] Ma Y, Li AX, Wang YC, et al. Construction and experimental application of a highly efficient temperature-selection T-vector. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 53(4): 247–251.
- [22] Yu SY, Peng W, Si W, et al. Enhancement of bacteriolysis of shuffled phage phiX174 gene *E*. *Virol J*, 2011, 8(1): 1–6.

(本文责编 郝丽芳)