

## 研究报告

## 结核分枝杆菌牛变种 C68001 转座子突变体库的构建

时文健<sup>#1,2</sup>, 徐磊<sup>#3</sup>, 张泽<sup>1</sup>, 杨蕊<sup>1</sup>, 张广智<sup>1</sup>, 许霄峰<sup>1</sup>, 辛凌翔<sup>3</sup>, 王楠<sup>3</sup>, 鑫婷<sup>\*1</sup>

- 1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方) 农业农村部兽用生物制品与化学药品重点实验室, 北京 100193
- 2 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009
- 3 中国兽医药品监察所, 北京 100081

时文健, 徐磊, 张泽, 杨蕊, 张广智, 许霄峰, 辛凌翔, 王楠, 鑫婷. 结核分枝杆菌牛变种 C68001 转座子突变体库的构建[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 703-712.

SHI Wenjian, XU Lei, ZHANG Ze, YANG Rui, ZHANG Guangzhi, XU Xiaofeng, XIN Lingxiang, WANG Nan, XIN Ting. Construction of an insertional mutant library of *Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 703-712.

**摘要:**【背景】结核分枝杆菌牛变种(*Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis*)可以感染人和多种动物, 是重要的人兽共患病原菌。【目的】以结核分枝杆菌牛变种 C68001 为母本菌株, 利用 MycoMar T7 转座子系统, 构建结核分枝杆菌牛变种突变体库, 为深入探究结核分枝杆菌牛变种基因功能和致病机制提供技术平台。【方法】以 C68001 为母本菌株, 对其全基因序列进行分析预测; 筛选温敏型噬菌体, 优化噬菌体扩增条件和侵染条件; 获得高库容的结核分枝杆菌牛变种 C68001 突变体库。【结果】基于 Nanopore 三代和二代测序技术绘制细菌基因组完成图, C68001 的完整基因组大小为 4.342 Mb, 含有 4 093 个基因。成功筛选到温敏型噬菌体, 并且滴度高于  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10 侵染菌株 C68001 3 h 后获得 9 216 个单克隆的转座子突变体, 随机挑选 7 个克隆进行 PCR 鉴定, 证实转座子成功插入母本菌株。【结论】成功构建了结核分枝杆菌牛变种 C68001 的突变体库。

**关键词:** 结核分枝杆菌牛变种; MycoMar T7; 突变体库; 噬菌体

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项课题(2022-YWF-ZYSQ-01)

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2022-YWF-ZYSQ-01).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: xinting@caas.cn

Received: 2024-11-07; Accepted: 2025-01-14; Published online: 2025-01-20

## Construction of an insertional mutant library of *Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis*

SHI Wenjian<sup>#1,2</sup>, XU Lei<sup>#3</sup>, ZHANG Ze<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1</sup>, ZHANG Guangzhi<sup>1</sup>, XU Xiaofeng<sup>1</sup>, XIN Lingxiang<sup>3</sup>, WANG Nan<sup>3</sup>, XIN Ting<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (North) & Key Laboratory of Veterinary Biological Products and Chemical Drugs of MARA, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Background] *Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis* is a zoonotic pathogen capable of causing tuberculosis in both humans and animals. [Objective] To construct a mutant library of *M. tuberculosis* var. *bovis* with *M. tuberculosis* var. *bovis* C68001 as the maternal strain and the MycoMar T7 transposon system, providing a technical platform for further investigation of the gene functions and pathogenic mechanisms of *M. tuberculosis* var. *bovis*. [Methods] The whole genome sequence of *M. tuberculosis* var. *bovis* C68001 was systematically analyzed. The temperature-sensitive phages were screened and the conditions of phage proliferation and infection were optimized. Finally, a mutant library with high storage capacity for *M. tuberculosis* var. *bovis* C68001 was obtained. [Results] Based on Nanopore third-generation and second-generation sequencing technology, the whole genome of C68001 was 4.342 Mb in size and contained 4 093 genes. A temperature-sensitive phage with a titer higher than  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL was successfully screened. After infecting C68001 at MOI=10 for 3 h, 9 216 monoclonal transposon mutants were obtained. Seven clones were randomly selected for PCR, which confirmed that transposons were successfully inserted into C68001. [Conclusion] The mutant library of *M. tuberculosis* var. *bovis* C68001 was successfully constructed.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis*; MycoMar T7; mutant library; phage

结核分枝杆菌牛变种 (*Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis*) 是结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) 中的一员, 可感染多种野生动物、家畜<sup>[1-2]</sup>, 还可以通过接触患病动物或摄入带菌动物产品而感染人<sup>[3-4]</sup>。世界卫生组织统计数据显示, 每年有 1 000 万人罹患结核病, 150 万人死于结核病感染, 其中罹患人兽共患结核病的人数在 14 万以上, 死亡人数超过 1.2 万<sup>[5-6]</sup>。深入研究结核分枝杆菌牛变种对于理解结核病病原演化、宿

主适应性及致病机制至关重要, 也为开发新的结核病疫苗和诊断工具提供理论基础。

在表型筛选和调控网络分析领域, 突变体文库发挥着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。构建突变体文库的过程中, 常用的方法包括有理化诱变、CRISPR/Cas9 系统和转座子随机插入诱变等。其中, 转座子诱变技术因其操作简单、易于筛选突变体, 并且能够与高通量测序技术相结合进行大规模筛选, 已经成为发现新基因、克隆功能基因、探索已知基因的新功能及研究蛋白质

功能的重要工具<sup>[9-10]</sup>。转座子诱变技术作为一种高效的文库构建方法，能够迅速产生大量的突变体，并且每个突变位点都可以通过插入的转座子序列进行精确定位<sup>[11]</sup>。1990年，Martin等<sup>[12]</sup>首次将 Tn610 转座子系统应用于耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的研究中，随后 Guilhot等<sup>[13]</sup>利用一种能在 30 °C 复制但在 37 °C 无法复制的条件复制型载体，成功构建了一个包含 30 000 个突变体的 Tn611 随机插入突变体文库<sup>[12-13]</sup>。随后，由 Himar1 衍生的 MycoMar T7 转座子因其具备能在 30 °C 复制而 37 °C 无法复制的条件复制特性和识别序列短小 (5'-TA-3') 的优势，TA' 二核苷酸在分枝杆菌基因组中的出现频率约为 50 个核苷酸 1 次，出现频次和分布较为平滑，因此以 Himar1 为基础的转座子系统插入效率高且无明显偏好，还能够无抗生素选择的情况下稳定遗传，能够产生高饱和度且稳定的突变库，被许多研究人员用于分枝杆菌突变体库的构建，为深入了解分枝杆菌的生物学特性和致病机制提供了强有力的工具<sup>[14-16]</sup>。

本研究采用中国兽医药品监察所标准强毒株结核分枝杆菌牛变种 C68001 作为母本菌株，拟绘制细菌完成图，并预测突变文库库容及非必需基因。同时，本研究计划筛选温敏型 MycoMar T7 噬菌体，探索其最优侵染条件，以期获得高库容的结核分枝杆菌牛变种 C68001 突变体库，进而为研究结核分枝杆菌牛变种的基因功能、致病机制和疫苗开发提供技术平台。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株、噬菌体

结核分枝杆菌牛变种 C68001 由中国兽医药品监察所保存。耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) mc<sup>2</sup> 155 和噬菌体 ΦMycoMar T7 由复旦大学基

础医学院高谦教授惠赠。

### 1.2 主要试剂和仪器

Middlebrook OADC 增菌液, Becton Dickinson (BD) 公司; 硫酸卡那霉素, MedChemExpress (MCE) 公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、Tyloxapol 和琼脂粉, Sigma-Aldrich 公司; MP 缓冲液 (含 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 高压灭菌后备用)。恒温培养箱, Thermo Fisher 公司; 冷冻离心机, Eppendorf 公司; 恒温振荡培养箱, 上海右一仪器有限公司; 旋转混匀仪, Biologix 公司。

### 1.3 培养基

Middlebrook 7H9 肉汤培养基和 Middlebrook 7H10 琼脂培养基, Becton Dickinson (BD) 公司; 7H9-OADC-Ty、7H9-OADC-Ty-kana (含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素)、7H10、7H10-OADC 及 7H10-OADC-kana (含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素) 按照参考文献<sup>[16]</sup>配制。

Top agar: 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 4 g/L 琼脂粉。121 °C 灭菌 20 min。

### 1.4 结核分枝杆菌牛变种 C68001 的全基因序列测定

取冻存的菌株 C68001 接种 7H9-OADC-Ty 培养基, 于恒温培养箱中 37 °C 静置培养 2-3 周, 使用 CTAB 法提取基因组, 基于 Nanopore 三代和二代测序技术进行测序, 过滤接头、短片段和低质量数据后通过 Unicycler 对过滤后的 reads 进行组装, 使用 R 包 circize 绘制细菌基因组完成图。使用 Prokka 对组装后的基因组进行编码序列 (coding sequence, CDS) 预测和注释, 并与 UniProt 数据库进行 BLAST+ 比对, 得到基因功能注释结果, 通过与 DEG database 进行 BLAST 预测必需基因, 通过基因组浏览器 Ensemble 统计 TA' 二核苷酸位点。

## 1.5 噬菌体的制备

### 1.5.1 MycoMar T7 噬菌体扩增

取冻存的菌株 mc<sup>2</sup> 155 划线接种于 7H10-OADC 平板, 挑取单菌落转接 10 mL 7H9-OADC-Ty 培养基, 于 37 °C、110 r/min 培养至平台期( $OD_{600}=2.0$ ), 以 1% 接种量转接 7H9-OADC-Ty 培养基, 振荡培养至  $OD_{600}$  为 1.0。用 MP 缓冲液对  $\Phi$ MycoMar T7 毒种进行连续 10 倍梯度稀释, 分别取 100  $\mu$ L 稀释后的噬菌体与 300  $\mu$ L 的菌液混匀, 37 °C 孵育 30 min, 加入 6 mL 提前融化的 Top agar 中, 颠倒混匀后立即倒入 7H10 平板, 室温冷却凝固后, 倒扣于 30 °C 培养 3 d。

### 1.5.2 温敏型 MycoMar T7 噬菌体的筛选

向 500  $\mu$ L  $OD_{600}$  为 1.0 的菌株 mc<sup>2</sup> 155 菌液加入 6 mL 提前融化的 Top agar, 颠倒混匀后立即倒入 7H10 平板, 室温冷却凝固。从 1.5.1 扩增噬菌体的平板上随机挑取 50 个噬菌斑同步接种于 2 块铺有菌株 mc<sup>2</sup> 155 的平板, 分别置于 30 °C 和 37 °C 培养 3 d, 挑取 4 个在 30 °C 增殖而 37 °C 不复制的噬菌斑加入 EP 管, 添加 200  $\mu$ L MP 缓冲液于 4 °C 孵育过夜后, 12 000 r/min 离心 3 min 后取上清, 用 MP 缓冲液进行连续 10 倍梯度稀释, 分别取 100  $\mu$ L 稀释后的噬菌体与 300  $\mu$ L 的菌液混匀, 37 °C 孵育 30 min 后加入 Top agar, 颠倒混匀后立即倒入 7H10 平板, 室温冷却凝固后倒扣于 30 °C 培养 3 d。选择噬菌斑紧密相连的平板, 加入 2 mL MP 缓冲液, 刮取琼脂, 在 4 °C 旋转混匀过夜, 12 000 r/min 离心 3 min 取上清经 0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌。

### 1.5.3 温敏型 MycoMar T7 噬菌体扩增及效价测定

取 1.5.2 筛选的温敏型噬菌体按照 1.5.1 步骤连续扩增 3 代, 将第 3 代的噬菌体用 MP 缓

冲液连续 10 倍稀释, 分别取 100  $\mu$ L 稀释后的噬菌体与 300  $\mu$ L 菌液混匀, 37 °C 孵育 30 min 后加入 Top Agar, 颠倒混匀后立即倒入 7H10 平板, 室温冷却凝固后倒扣于 30 °C 培养 3 d。选择 30–300 个噬菌斑的平板进行计数, 计算噬菌体滴度。并随机选择数个噬菌斑按照 1.5.2 的方法复测温敏性。选择滴度大于  $10^{11}$  PFU/mL 且温敏特性稳定的噬菌体用于建库。

## 1.6 侵染条件优化

### 1.6.1 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)的确定

取 C68001-P1 划线接种于 7H10-OADC 平板, 挑取单菌落转接 10 mL 7H9-OADC-Ty 培养基至平台期, 按照 1% 接种量接种于 50 mL 7H9-OADC-Ty 培养 2 周至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0。12 000 r/min 离心 3 min 后去除上清, 加入 MP 缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 5 mL MP 缓冲液。1 mL 菌液涂布于 7H10-OADC-kana 平板, 检测自发突变率。100  $\mu$ L 菌液 10 倍连续梯度稀释用于计算 CFU。3 mL 菌液分别以 MOI (噬菌体:细菌)=10、5、1 的比例在 37 °C 侵染 24 h, 涂布 7H10-OADC-kana 平板, 37 °C 连续培养 3–4 周, 计算不同 MOI 的阳性克隆数, 确定最佳 MOI。

### 1.6.2 最佳侵染时间和菌液稀释浓度的优化

按照 1.6.1 步骤, 以最佳的 MOI 分别在 37 °C 侵染 3 h 和 24 h, 侵染结束后, 分别将菌液稀释成 2、20、100、200 倍, 各取 50  $\mu$ L 涂布 7H10-OADC-kana 平板, 放入培养箱中 37 °C 倒置培养 3–4 周, 计算不同条件下阳性克隆数, 确定最佳侵染时间和菌液涂布浓度。

## 1.7 转座子突变体库的建立

按照 1.4 的方法扩增 100 mL 的 C68001, 洗涤后用 10 mL MP 缓冲液重悬。取 5 mL 菌液以最佳 MOI 加入噬菌体, 振荡混匀后于 37 °C 温育。侵染后的菌液经以最佳稀释度涂布

7H10-OADC-kana 平板, 37 °C 培养 3–4 周。取剩余 1 mL 浓缩后的菌液涂布 7H10-OADC-kana 平板, 检测自发突变率, 另取 100  $\mu$ L 菌液进行 10 倍连续梯度稀释, 涂布 7H10-OADC 平板上测定 CFU。待平板上长出单菌落时, 将单菌落挑取至预先加入 200  $\mu$ L/孔的 7H9-OADC-Ty-kana 96 孔板中, 需挑取 9 216 株, 在 37 °C 培养 2–3 周, 加入终浓度为 20% 的甘油, 冻存于 -80 °C。

### 1.8 转座子突变体库的鉴定

随机挑取平板上的单菌落用 PCR 扩增转座子上的 *aphII* 卡那霉素耐药基因, 上游引物 KanF: 5'-GATGGATTGCACGCAGGTTC-3', 下游引物 KanR: 5'-ATATCACGGGTAGCCAACGC-3', 以野生型 C68001 作为阴性对照, 以噬菌体 DNA 作为阳性对照。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 纯水 8.5  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 总延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

### 1.9 突变体库转座子插入位点定位

为鉴定 9 216 株突变克隆的转座子插入位点, 以 Vandewalle 等<sup>[17]</sup>的方法将 96 孔板中的菌液进行混合。提取得到的 40 个混池基因组 DNA, 在对所有 DNA 样品进行 NGS 测序后, 使用 Groomer 对测序数据进行质量过滤, 去除低质量的 reads。通过 ClipAdaptor 去除接头和 index 序列, 并过滤去除不含转座子末端序列 (CAACCTGT) 的 reads, 将剩余序列使用 Trim 修剪至 25 bp 并通过 Bowtie2 映射到结核分枝杆菌牛变种 C68001 基因组, 得到插入位点信息, 通过对 40 个混池的插入位点计算及反卷积, 可

以回溯所有突变株的转座子插入位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 结核分枝杆菌牛变种 C68001 的鉴定

菌株 C68001 的完整基因组大小为 4.342 Mb (图 1), G+C 含量为 65.64%, 使用 Ensemble 查找到 73 389 个 TA'位点, 通过 Prokka 注释出 4 093 个基因; 与 DEG database BLAST 预测出必需基因数量为 929 个(29.4%), 含有 20 175 个(27.5%) TA'二核苷酸位点; 非必需基因数量为 3 164 个(70.6%), 含有 53 214 个(72.5%) TA'二核苷酸位点(表 1)。全基因组图谱的绘制为后期定位转座子插入位点提供参考依据。

### 2.2 温敏型噬菌体的筛选结果

噬菌体在 4 °C 保存后容易丢失温敏特性, 所以我们对噬菌体进行了 2 次筛选, 并且在侵染结核分枝杆菌牛变种前测定噬菌体滴度, 从噬菌斑中随机挑选 19 个噬菌斑同步接种 2 块铺有耻垢分枝杆菌的平板, 分别放置于 30 °C 和 37 °C 培养 3 d, 可见 37 °C 培养平板无噬菌斑, 而 30 °C 培养的平板可见噬菌斑(图 2), 证实侵染试验所用的噬菌体的温敏特性稳定, 并且滴度为  $2 \times 10^{11}$  PFU/mL, 可以用于构建随机突变文库。

### 2.3 最佳侵染条件

如表 2 所示, 噬菌体与 C68001-P1 按照 MOI (噬菌体:细菌) 为 10、5、1 在 37 °C 反应 24 h, 分别涂布 7H10-OADC-kana 平板, 37 °C 连续培养 3–4 周后, 阳性克隆分别约为 2 000、1 000 和 70 个, 所以 MOI=10 作为最佳的感染比例。由于侵染 24 h 时获得的阳性克隆过多, 难以获得单克隆, 在 MOI=10 的侵染比例下, 37 °C 分别反应 3 h 和 24 h, 并用 MP 缓冲液将反应后的菌液稀释 2、20、100 和 200 倍涂板, 连续培养

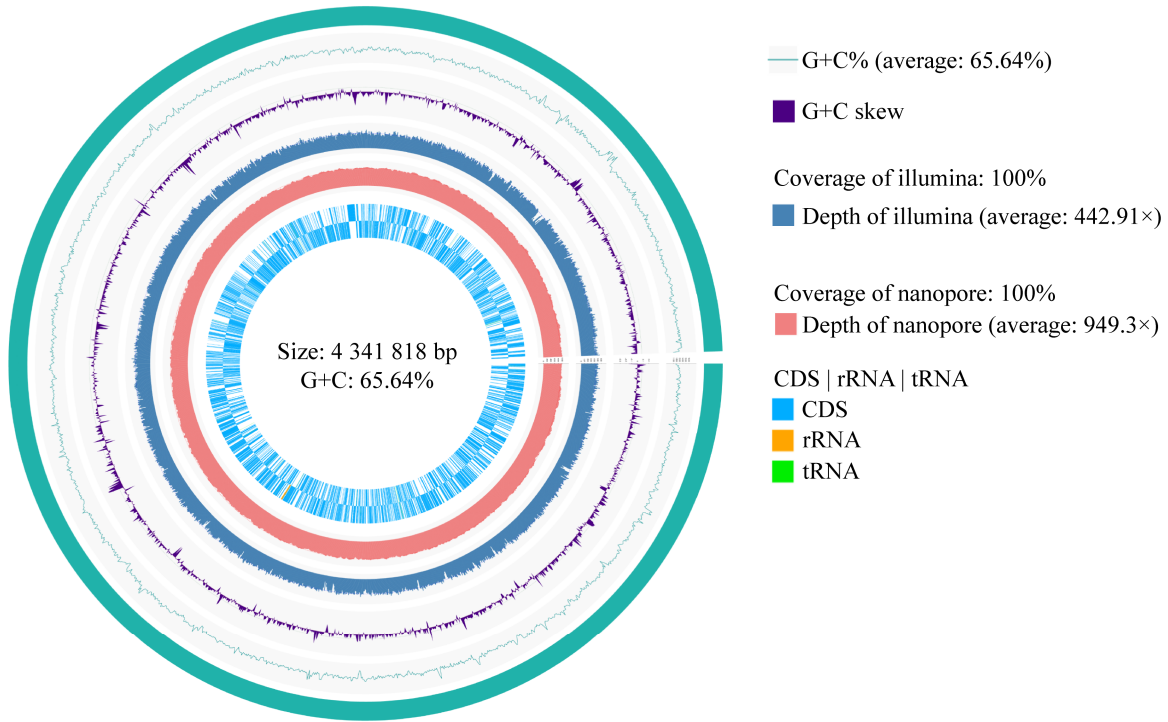


图 1 结核分枝杆菌牛变种 C68001 全基因组序列圈图

Figure 1 *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis C68001 whole-genome sequence circle plot.

表 1 结核分枝杆菌牛变种 C68001 基因组信息统计

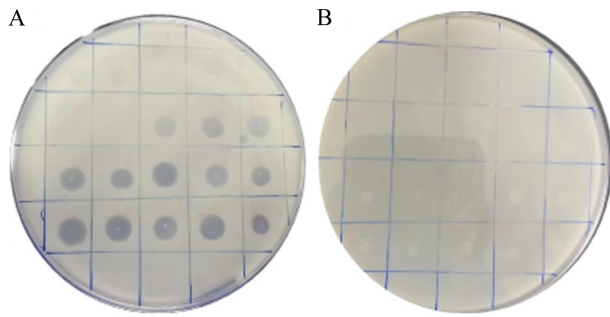
Table 1 Statistics on the genome information of the bovine variant C68001 of *Mycobacterium tuberculosis*

Item	C68001
基因组大小 Genome size (bp)	4 345 492
基因数目 Number of genes	4 093
非必需基因 Non-essential gene	3 164 (70.6%)
必需基因 Essential gene	929 (29.4%)
基因组中 TA'数目 TA' site in genome	73 389
非必需基因中 TA'数目 TA' site in non-essential gene	53 214 (72.5%)
必需基因中 TA'数目 TA' site in essential gene	20 175 (27.5%)
TA'中位数 Median number of TA' site	12
模型中基因组非必需基因数量 Non-essential gene in the model	4 435
饱和非必需基因突变库大小 Size of saturated mutation library	39 803

3-4 周后侵染 24 h 获得的克隆仍然过多, 而将侵染时间调整为 3 h 时, 每块平板可获得 450-592 个单菌落, 数量理想, 此时以 20 倍稀释涂板最适合挑取单菌落(图 3)。

## 2.4 转座子突变体库的鉴定结果

噬菌体以最佳条件(MOI=10, 37 °C作用 3 h)侵染结核分枝杆菌 C68001-P1, 菌液以 MP 缓冲液稀释 20 倍, 50 μL/板, 涂布 7H10-OADC-kana



**图 2**  $\Phi$ MycoMar T7 噬菌体温度敏感性测试结果  
A: 30 °C 培养, 可见噬菌斑; B: 37 °C 培养, 无噬菌斑。

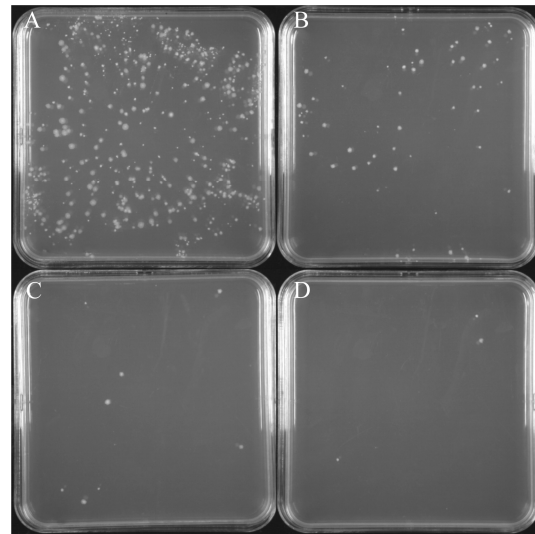
Figure 2 Results of the temperature sensitivity test for the  $\Phi$ MycoMar T7 phage. A: Phages replicate at 30 °C, forming plaques; B: Phages do not replicate at 37 °C, none plaques.

**表 2** 不同 MycoMar T7 噬菌体侵染结核分枝杆菌牛变的侵染时间菌落数量统计

Table 2 Statistics of colony numbers at different infection times of *M. tuberculosis* variant *bovis* infected by MycoMar T7 phages at various MOIs

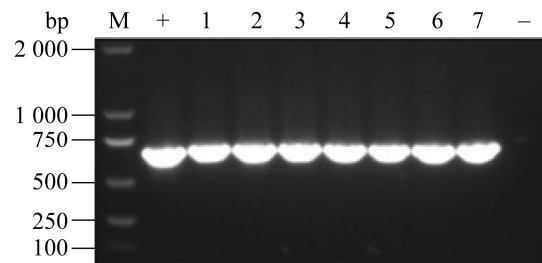
MOI	侵染时间 Infection duration (h)	计数 Count (number per plate)	P value
10	24	2 388	0.034
		2 104	
		2 161	
5	24	768	0.045
		824	
		852	
1	24	113	0.012
		74	
		69	

平板, 37 °C 培养 3-4 周, 挑取单菌落接种于 96 孔细胞培养板, 共获得 9 216 株转座子随机突变菌株。本次建库所用浓缩菌液计数结果为  $3 \times 10^9$  CFU/mL, 转导效率为  $3.38 \times 10^{-6}$ , 自发突变率为  $6.67 \times 10^{-10}$ 。随机挑取 7 个单菌落, PCR 扩增卡那霉素耐药基因 *aphII*, 条带大小与测序结果均正确, 证实生长的克隆均为转座子突变株(图 4)。



**图 3** 噬菌体侵染后结核分枝杆菌牛变种 C68001 不同稀释倍数菌落生长情况(MOI=10, 侵染 3 h)  
A: 2 倍稀释; B: 20 倍稀释; C: 100 倍稀释; D: 200 倍稀释。

Figure 3 The growth of *M. tuberculosis* variant *bovis* C68001 colonies at different dilution factors following phage infection (MOI=10, 3 h). A: 2-fold dilution; B: 20-fold dilution; C: 100-fold dilution; D: 200-fold dilution.



**图 4** 突变株单菌落 PCR 扩增 *aphII* 基因产物凝胶电泳 M: DL2000 DNA Marker; +: 噬菌体 DNA; 1-7: 突变株; -: C68001。

Figure 4 PCR amplification of the *aphII* gene product from single colonies of mutant strains and agarose gel electrophoresis. M: DL2000 DNA Marker; +: Phage DNA; 1-7: Mutants; -: C68001.

## 2.5 突变体库转座子插入位点定位结果

如表 3 所示, 经过对测序下机数据的分析, 共鉴定到 13 856 个转座子插入位点。将所有插

表3 本研究与其他研究转座子插入位点定位与结果对比

Table 3 Transposon insertion site identification and comparison with other study

研究项目 Project	参考文献[17]中 In reference [17]	本研究中 In this study
菌株 Strain	BCG-Pasteur	<i>M. tuberculosis</i> variant <i>bovis</i> C68001
库容量 Library size	9 216	9 216
转座子定位数 Transposon insertion localizations	8 259	13 856
单次插入突变株定位比例 Ratio of single-insertion transposon mutation strains	48.12% (4 435/9 216)	67.57% (5 814/9 216)
非必需基因覆盖率 Coverage of non-essential genes	64.42% (2 164/3 359)	70.03% (2 216/3 164)

入位点信息进行回溯后得到 5 814 个仅发生过一次转座子插入的突变株, 约占库容量的 67.57% (5 814/9 216)。其中共命中了 2 216 个非必需基因区域, 约占全部非必需基因的 70.03% (2 216/3 164)。

### 3 讨论

转座子插入突变体文库技术在探究基因功能方面发挥着关键作用, 常用的诱变方法如 CRISPR/Cas9 等操作复杂繁琐, 具有易脱靶和难以进行后续鉴定等缺陷, 分枝杆菌尤其是结核分枝杆菌生长缓慢, 理化诱变等方法需要较长时间且效率较低, 后续鉴定也需花费大量时间和费用, 转座子插入诱变具有操作简便、高覆盖率、易筛选、低偏好性和稳定遗传的优点, 配合高通量测序技术尤其适用于大量样本的表型筛选<sup>[15,18-20]</sup>。本研究采用源自 Himar1 的 MycoMar T7 转座子系统具有更短的识别序列 (5'-TA-3'), 而分枝杆菌基因组中约每 50 个核苷酸就包含一个 TA'二核苷酸, 相较于经典的 T5 转座子系统, 更易于实现转座子插入, 本研究使用该转座子系统成功构建了结核分枝杆菌牛变种 C68001 高饱和度的突变体文库<sup>[14,21-22]</sup>。

本研究以中国兽医药品监察所标准菌株 C68001 为母本菌株, 并对其全基因序列进行测定, 采用三代之内的菌株构建文库, 确保母本菌

株的表型和基因组的稳定, 也为后续文库中转座子插入区域定位提供了数据支撑。利用 MycoMar T7 系统构建随机突变文库时, 不同的分枝杆菌转导率存在较大差异<sup>[23]</sup>, 以 C68001 作为母本菌株时, 侵染 24 h 转导率过高, 一次侵染即可获得 10 万克隆, 转座子多次插入或细菌在被转座子插入后发生复制, 导致阳性克隆过多, 不利于挑取单克隆, 并且增加了后期数据的分析难度。虽然 Braunstein 等<sup>[24]</sup>研究指出, 降低 MOI 可以有效减少转座子多次插入, 但 MOI=5 或 1 时, 转座率过低, 一次侵染仅能获得 10 000 和 700 个克隆, 可挑取的单克隆则过少, 需要多次建库。因此, 我们在哈佛大学医学院 Eric Rubin 教授的建议下, 将侵染时间缩短至 3 h, 并优化了转导后菌液稀释倍数, 从而降低转座子多次插入和插入后发生复制的概率, 有效降低菌落密度, 确保得到高质量的突变体文库, 成功获得转导效率为  $3.38 \times 10^{-6}$ , 库容为 9 216 的随机突变库。

本研究共鉴定到 13 856 个转座子插入位点, 测得 5 814 个仅发生过一次转座子插入的突变株, 约占库容量 67.57%, 略高于 Vandewalle 等<sup>[17]</sup>的结果(表 3), 推测原因是本研究测序时深度更大, 同时开展研究时所选取的菌株也不同。C68001 具有 4 093 个基因, 含 73 389 个 TA' 位点, 位于非必需基因上的约有 53 214 个,



非必需基因中 TA'位点的中位数为 12,推测共有 4 435 个(53 214/12)非必需基因组区域。计算每个非必需基因至少被插入一次所需的库容,库容量  $E(T)$ 和非必需基因数量  $n$  的关系可用公式表示为  $E(T) = \sum_{k=1}^n \frac{n}{k}$ , 据此计算 9 216 株突变株可以覆盖结核分枝杆菌牛变种 C68001 基因组中 70%以上的非必需基因,这与本研究所得 70.03% 的覆盖度相吻合,而要获得覆盖度为 100%的突变文库,预测库容量为 41 409。

结核分枝杆菌牛变种属于慢生菌,液体培养需要 10–14 d, 固体培养基培养需要 3–4 周,构建基因缺失菌株需要花费 5–8 个月,功能基因和表型研究中花费的时间成本巨大,所以本研究采取优化方法所建立的随机突变文库突变效率高,具有高库容的基因突变菌株,并且建库成本低廉,操作便捷,为结核分枝杆菌牛变种的致病力研究和疫苗开发提供了重要的技术平台。我们将在后续的研究中利用文库对结核分枝杆菌牛变种的抗酸、抗氧化等表型进行筛选,为牛结核病的防控提供参考。

## 4 结论

本研究利用 MycoMar T7 转座子系统成功构建了结核分枝杆菌牛变种 C68001 的突变文库,为研究结核分枝杆菌牛变种的基因功能和致病机制提供了重要工具。

## 致谢

感谢复旦大学基础医学院高谦教授团队、哈佛大学医学院 Eric Rubin 教授、根特大学生物化学和微生物学系 Nico Callewaert 教授为本研究提供的技术指导和帮助。

## REFERENCES

[1] MEIRING C, van HELDEN PD, GOOSEN WJ. TB

- control in humans and animals in South Africa: a perspective on problems and successes[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 298.
- [2] COUSINS DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock[J]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2001, 20(1): 71-85.
- [3] COSIVI O, GRANGE JM, DABORN CJ, RAVIGLIONE MC, FUJIKURA T, COUSINS D, ROBINSON RA, HUCHZERMAYER HF, de KANTOR I, MESLIN FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1998, 4(1): 59-70.
- [4] AYELE WY, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa[J]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2004, 8(8): 924-937.
- [5] OLEA-POPELKA F, MUWONGE A, PERERA A, DEAN AS, MUMFORD E, ERLACHER-VINDEL E, FORCELLA S, SILK BJ, DITIU L, EL IDRISSE A, RAVIGLIONE M, COSIVI O, LoBUE P, FUJIWARA PI. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*: a call for action[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(1): e21-e25.
- [6] WHO, Global tuberculosis report 2024[R]. 2024, World Health Organization: 20, avenue Appia, CH-1211 Geneva 27.
- [7] GUBELMANN C, WASZAK SM, ISAKOVA A, HOLCOMBE W, HENS K, IAGOVITINA A, FEUZ JD, RAGHAV SK, SIMICEVIC J, DEPLANCKE B. A yeast one-hybrid and microfluidics-based pipeline to map mammalian gene regulatory networks[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 682.
- [8] NICHOLS RJ, SEN S, CHOO YJ, BELTRAO P, ZIETEK M, CHABA R, LEE S, KAZMIERCZAK KM, LEE KJ, WONG A, SHALES M, LOVETT S, WINKLER ME, KROGAN NJ, TYPAS A, GROSS CA. Phenotypic landscape of a bacterial cell[J]. *Cell*, 2011, 144(1): 143-156.
- [9] LEVITAN A, GALE AN, DALLON EK, KOZAN DW, CUNNINGHAM KW, SHARAN R, BERMAN J. Comparing the utility of *in vivo* transposon mutagenesis approaches in yeast species to infer gene essentiality[J]. *Current Genetics*, 2020, 66(6): 1117-1134.
- [10] 李明磊. *Mariner* 转座子体内随机突变苏云金芽胞杆菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2009.
- LI ML. Study on *Mariner* transposon random mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* *in vivo*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huangzhong Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [11] HAMER L, DeZWAAN TM, MONTENEGRO-CHAMORRO MV, FRANK SA, HAMER JE. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(1): 67-73.
- [12] MARTIN C, TIMM J, RAUZIER J, GOMEZ-LUS R, DAVIES J, GICQUEL B. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria[J]. *Nature*, 1990,

- 345(6277): 739-743.
- [13] GUILHOT C, OTAL I, van ROMPAEY I, MARTIN C, GICQUEL B. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 535-539.
- [14] RATHNAIAH G, BANNANTINE JP, BAYLES DO, ZINNIEL DK, STABEL JR, GRÖHN YT, BARLETTA RG. Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutant libraries reveals loci-dependent transposition biases and strategies for novel mutant discovery[J]. Microbiology, 2016, 162(4): 633-641.
- [15] DING QF, TAN KS. *Himar1* transposon for efficient random mutagenesis in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1842.
- [16] MAJUMDAR G, MBAU R, SINGH V, WARNER DF, DRAGSET MS, MUKHERJEE R. Genome-wide transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1498: 321-335.
- [17] VANDEWALLE K, FESTJENS N, PLETS E, VUYLSTEKE M, SAEYS Y, CALLEWAERT N. Characterization of genome-wide ordered sequence-tagged *Mycobacterium* mutant libraries by Cartesian Pooling-Coordinate Sequencing[J]. Nature Communications, 2015, 6: 7106.
- [18] CANEVARI CASTELÃO AB, NISHIBE C, MOURA A, de ALENCAR AP, de AZEVEDO ISSA M, HODON MA, MOTA PMPC, SALES EB, FONSECA JÚNIOR AA, ALMEIDA NF, ARAÚJO FR. Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain AN5, used for production of purified protein derivative[J]. Genome Announcements, 2014, 2(2): e00277-14.
- [19] GARNIER T, EIGLMEIER K, CAMUS JC, MEDINA N, MANSOOR H, PRYOR M, DUTHOY S, GRONDIN S, LACROIX C, MONSEMPE C, SIMON S, HARRIS B, ATKIN R, DOGGETT J, MAYES R, KEATING L, WHEELER PR, PARKHILL J, BARRELL BG, COLE ST, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(13): 7877-7882.
- [20] 闫玫瑰. CRISPR-Cas 辅助的基因组编辑系统在分枝杆菌中的构建及应用[D]. 北京: 北京协和医院博士学位论文, 2019.
- [21] LAMPE DJ, CHURCHILL ME, ROBERTSON HM. A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*[J]. EMBO Journal, 1996, 15(19): 5470-5479.
- [22] LAMPE DJ, GRANT TE, ROBERTSON HM. Factors affecting transposition of the *Himar1* mariner transposon *in vitro*[J]. Genetics, 1998, 149(1): 179-187.
- [23] 谢宇晴, 沈也驰, 李昕, 徐正中. 结核分枝杆菌转座突变库的建立及应用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2022, 43(3): 34-39.
- XIE YQ, SHEN YC, LI X, XU ZZ. Establishment and application of the *Mycobacterium tuberculosis* transposon mutation library[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2022, 43(3): 34-39 (in Chinese).
- [24] BRAUNSTEIN M, BARDAROV SS, JACOBS WR. Genetic methods for deciphering virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Methods in Enzymology, 2002, 358: 67-99.