

研究报告

鸟分枝杆菌 PhoP 功能分析及其基因突变株的构建

何时义 丁峰山 王爱妍 付鑫 杨东君 凌敏*

(广西医科大学生物化学与分子生物学教研室 广西高校生物分子医学研究重点实验室
广西 南宁 530021)

摘要:【目的】对鸟分枝杆菌 PhoP 的功能进行分析及构建 *PhoP* 基因突变株, 为深入研究 PhoP 的调控机制打下基础。【方法】利用 PCR 扩增出鸟分枝杆菌 PhoP DNA 结合区(PhoPC)编码序列, 与表达载体 pGEX-4T-3 连接后, 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中表达 GST-PhoPC 融合蛋白。用凝血酶去除 GST 标签, 制备 PhoPC 蛋白; 利用 PCR 扩增出鸟分枝杆菌 *PhoP* 基因及其下游基因 *MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 的启动子片段, 采用凝胶迁移率移动试验(EMSA)分别检测 PhoPC 与 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 的启动子结合的情况。通过 PCR 扩增 *PhoP* 基因上、下游片段, 构建 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段, 与自杀质粒 pGMB151 连接后, 通过电转化导入鸟分枝杆菌进行同源交换, 利用 PCR 筛选出 *PhoP* 基因缺失突变株。【结果】EMSA 结果显示, 鸟分枝杆菌 PhoP 能与 *PhoP*、*MAV0127* 及 *Amt* 基因启动子结合, 不能与 *PhoU* 结合。通过 PCR 和序列分析证实基因突变株的 *PhoP* 基因缺失了 309 个碱基。【结论】PhoP 不仅可调控其下游基因 *MAV0127* 和 *Amt* 的转录水平, 还可调控其自身基因的转录, 但不参与调节 PhoU 二元调控系统。构建了 *PhoP* 基因缺失突变株, 为进一步研究其在鸟分枝杆菌的调控功能奠定了基础。

关键词: 鸟分枝杆菌, PhoP, 凝胶迁移率移动试验, *PhoP* 基因突变株

Characterization of PhoP of *Mycobacterium avium* and construction of its mutant harboring defective *PhoP* gene

HE Shi-Yi DINH Phong-Son WANG Ai-Yan FU Xin YANG Dong-Jun LING Min*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: [Objective] To understand the regulatory mechanism of PhoP of *Mycobacterium avium*, the function of PhoP was analyzed and a *Mycobacterium avium* strain with defective *PhoP* gene was constructed. [Methods] DNA fragment of PhoP DNA-binding domain (PhoPC) amplified by PCR was cloned into the pGEX-4T-3 vector, and then the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression of GST-PhoPC protein. PhoPC protein was prepared through removal of GST-tag from GST-PhoPC protein by thrombin cleaving. The promoter regions

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81260245)

*Corresponding author: Tel: 86-771-5358817; E-mail: lingmin70@163.com

Received: March 25, 2016; Accepted: June 07, 2016; Published online (www.cnki.net): June 21, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81260245)

*通讯作者: Tel: 86-771-5358817; E-mail: lingmin70@163.com

收稿日期: 2016-03-25; 接受日期: 2016-06-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

of *PhoP*, *MAV0127*, *PhoU* and *Amt* were amplified by PCR, respectively. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was carried out to analyze the binding activity of PhoPC to these promoter fragments. For construction of a *Mycobacterium avium* strain with defective *PhoP* gene, *PhoP* homologous recombinant DNA fragment with defective mutation was obtained by ligating the upper-stream and down-stream regions of *PhoP* gene, which were amplified by PCR. The *PhoP* recombinant DNA fragment was cloned into the suicide plasmid pGMB151. The recombinant plasmid was then transferred into cells of *Mycobacterium avium* by using electroporation for homologous recombination. The strains harboring defective *PhoP* gene were selected and identified by PCR. **[Results]** EMSA results show that PhoPC protein could bind to the promoters of *PhoP*, *MAV0127* and *Amt* genes, but not bind to the promoter of *PhoU*. A deletion of 309 bp of the defective *PhoP* gene was confirmed by PCR and DNA sequencing. **[Conclusion]** PhoP can regulate the transcription of its downstream genes *MAV0127* and *Amt*, and also regulate the transcription of *PhoP* gene itself. However, PhoP does not participate in regulating PhoU two-component system. A *Mycobacterium avium* strain with defective *PhoP* gene was successfully constructed, which contributes to further study on the role of PhoP in transcription regulation in *Mycobacterium avium*.

Keywords: *Mycobacterium avium*, PhoP, EMSA, *PhoP* gene deletion mutation

临床数据表明,近年来 HIV 阳性患者合并分枝杆菌感染中非结核分枝杆菌(NTM)所占比例不断增大,其中鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)感染比例可高达 95%以上^[1-4]。鸟分枝杆菌感染的临床症状与肺结核相似,影像学表现也无明显差异,但其治疗方法却与结核病不同^[5-6]。因此加强对分枝杆菌的鉴定及其致病机理的研究,对指导临床治疗具有重要意义。

鸟分枝杆菌是细胞内寄生菌,其致病性与其在宿主巨噬细胞内的存活能力有关,而细菌在巨噬细胞中的生存能力主要受二元调控系统的调节。PhoPR 二元调控系统是结核分枝杆菌等致病菌最基本、最重要的二元调控系统,在调控细菌的胞内寄生和毒力方面起着重要作用^[7-9]。当前二元调控系统的研究热点主要集中在 PhoP 调节蛋白上,已有不少文献报道了 PhoP 在结核分枝杆菌中的一系列调节功能,但其在鸟分枝杆菌中的调节作用尚不够明确。随着鸟分枝杆菌全基因组测序的完成,从整体和分子水平上认识 PhoP 在鸟分枝杆菌中的调节功能将成为可能。本文选取鸟分枝杆菌中 4 个基因(*PhoP* 及其下游的 *MAV0127*、*PhoU*、*Amt*)进行凝胶迁移率移动试验,分析这些基因的启动子与 PhoP DNA 结合区的相互作用,对鸟分枝杆菌 PhoP 调控

转录的机制做了研究。此外,本研究还通过基因敲除技术,构建了 *PhoP* 基因缺失突变株,为进一步深入研究 PhoP 的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 鸟分枝杆菌 HIV/AIDS 临床分离株由广西疾控中心结核病研究所提供。自杀质粒 pGMB151、*Escherichia coli* SPY372 λ pir、*E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pGEX-4T-3 均为本课题组保存。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌培养基为 LB 培养基^[10], 37 °C 培养。鸟分枝杆菌培养基为 Middle brook 7H9/OADC 培养基(液体)和 Middle brook 7H10/OADC 培养基(固体)^[11], 购于美国 BD 公司, 37 °C 培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: 质粒提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;DNA 胶回收试剂盒,北京全式金公司;各种内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司;Pierce Glutathione Agarose, Thermo Scientific 公司。Tpersonal PCR 仪,德国 Biometra 公司;凝胶成像系统 UVI-7600Z,英国 UVItec 公司;电转化仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.1.4 引物: 用于扩增 PhoP DNA 结合区(PhoPC) 编码序列的引物为 PhoPC-F 和 PhoPC-R, 用于扩增 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 及 *Amt* 启动子片段的引物分别为 PhoP-F/R、MAV0127-F/R、PhoU-F/R 和 Amt-F/R, 用于构建 *PhoP* 突变株的引物包括 PhoP-N-F/R 和 PhoP-C-F/R (图 1), 引物的合成委托上海生工生物工程有限公司。各引物的序列见表 1。

1.2 PhoPC 编码序列的克隆、表达及 PhoPC 蛋白的制备

以鸟分枝杆菌临床分离株基因组 DNA 为模板, 利用引物 PhoPC-F 和 PhoPC-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 正、反向引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 模板 (约 300 mg/L) 0.5 μ L, 用超纯水补至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR 产物与 pGEX-4T-3 质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pGEX-PhoPC 转化入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}=0.4-0.6$, 加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 2 h。12 000 r/min

离心 1 min 收集菌体, 菌体用 PBS 重悬后超声破碎。12 000 r/min 离心 10 min, 将上清进行 SDS-PAGE 检测。利用谷胱甘肽琼脂糖珠进行亲和层析 (方法见产品说明书), 分离纯化上清中的 GST-PhoPC 融合蛋白。用 BCA 法测定 GST-PhoPC 融合蛋白浓度, 根据每 mg 的蛋白加入 10 U 的凝血酶, 室温作用 16 h 后, 过 Glutathione Agarose 亲和柱, 用适量的 PBS 洗脱, 收集流出液进行 SDS-PAGE 检测。

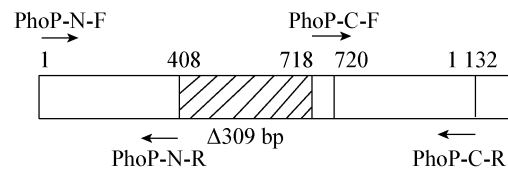


图 1 鸟分枝杆菌 *PhoP* 基因缺失用的引物设计

Figure 1 Design of primers for constructed a *Mycobacterium avium* strain with defective *PhoP* gene

注: 1-720 为 *PhoP* 基因编码区, PhoP-N-F/R 和 PhoP-C-F/R 为 *PhoP* 基因上、下游引物, PCR 扩增后将上、下游片段连接成为 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段, 缺失区域为该基因的 408-718 bp 区域, 共 309 bp。

Note: The sequences 1 to 720 bp were the coding region of the *PhoP* gene. PhoP-N-F/R and PhoP-C-F/R were two pair primers of upper-stream and down-stream of the *PhoP* gene which could prepare homologous recombinant DNA fragment of the defective target gene. The deletion region of the *PhoP* gene was from 408 to 718 bp, 309 bp was deleted in total.

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of each primers

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	用途 Usage
PhoPC-F	CGCGGATCCGCCGAACACGACGCGCCCGA (<i>Bam</i> H I)	PhoPC 蛋白表达
PhoPC-R	CCGCTCGAGGCGCGGTTCCCGCAGCACA (<i>Xho</i> I)	PhoPC 蛋白表达
PhoP-F	CGCTGGCCACGCTCAGACCC	凝胶迁移率移动试验
PhoP-R	GTGGGGGTGGCCGATGTCAT	凝胶迁移率移动试验
MAV0127-F	AGCTCTCGCGCACGAAATGC	凝胶迁移率移动试验
MAV0127-R	TTCCAGGCCACCGGGGGTTA	凝胶迁移率移动试验
PhoU-F	GAAGATCTTCTCCAACCCCA	凝胶迁移率移动试验
PhoU-R	ACGAAACCCGCCTCGCAGTA	凝胶迁移率移动试验
Amt-F	CGGGCCAGGGCCCCGTCGGGG	凝胶迁移率移动试验
Amt-R	GGCCGGATCGATTCCGTGCA	凝胶迁移率移动试验
PhoP-N-F	GGCGGATCCATGACATCGGCCACCCCACTGACG (<i>Bam</i> H I)	构建 <i>PhoP</i> 基因突变株
PhoP-N-R	CCGGAATTCGGCCCCGCCCTTGCCGGCGCGCCGC (<i>Eco</i> R I)	构建 <i>PhoP</i> 基因突变株
PhoP-C-F	GCCGAATCTGAGCGCGCTCGGCCACCGCGG (<i>Eco</i> R I)	构建 <i>PhoP</i> 基因突变株
PhoP-C-R	CCGGGATCCTGTTCTGACTTCGACCAGCGGCCGCA (<i>Bam</i> H I)	构建 <i>PhoP</i> 基因突变株

1.3 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU*、*Amt* 启动子片段的克隆

根据鸟分枝杆菌 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU*、*Amt* 4 个基因的启动子序列设计相应的引物(表 1), 利用 PCR (同 1.2) 扩增各个基因转录起始点上游 270 bp 长度的启动子片段。PCR 产物经胶回收纯化。

1.4 凝胶迁移率移动试验(EMSA)

各取 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 4 个基因的启动子片段 1–2 μg 分别与 6 μg PhoPC 蛋白混合, 加入相应体积 GSM 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L EDTA, 10%甘油), 使三者反应总体积为 20 μL , 30 °C 孵育 30 min 后进行非变性 PAGE 凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 用凝胶成像系统对非变性胶进行成像。

1.5 *PhoP* 突变株的构建

1.5.1 重组自杀质粒的构建及鉴定: 以鸟分枝杆菌临床分离株基因组 DNA 为模板, 利用引物 PhoP-N-R/F 和 PhoP-C-R/F 进行 PCR 反应体系(25 μL): 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μL , dNTP Mixture 2 μL , 10 \times GC Enhancer 2 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 正、反向引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 模板(约 300 mg/L) 0.5 μL , 用超纯水补至 25 μL 。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增出 *PhoP* 基因的上、下游核苷酸片段, 用 *EcoR* I 将两个片段酶切之后进行定向连接, 得到 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段; 将该片段与自杀质粒 pGMB151 用 *BamH* I 酶切后, 在 T4 DNA 连接酶作用下 16 °C 连接过夜, 将连接产物转化感受态细胞 *E. coli* SPY372 λ pir, 利用氨苄抗性筛选阳性菌落, 提取质粒后用 PCR 和 *BamH* I 酶切鉴定, 将阳性质粒测序。

1.5.2 *PhoP* 基因缺失突变株的筛选及鉴定: 将鸟分枝杆菌培养至对数生长期, 用 0 °C 灭菌水反复洗涤 3 遍, 制备成电转化用感受态细胞。取 1 μg 重组自杀质粒与 50 μL 鸟分枝杆菌感受态细胞混合后加入到预冷的 0.1 cm 电转化杯中, 电击参数: 2.5 kV,

25 μF , 200 Ω 。电击之后立即加入 1 mL 37 °C 预热的不含抗生素的 Middle brook 7H9/OADC 液体培养基, 37 °C 复苏 28 h 后将菌液涂布于含氨苄青霉素和链霉素的 Middle brook 7H10/OADC 培养基, 37 °C 培养。将在含氨苄青霉素和链霉素的培养基上筛选到的抗性菌落转到含 5%蔗糖的 Middle brook 7H10/OADC 培养基上, 以诱导同源重组, 利用 PCR 来筛选发生同源重组的菌株。将重组变异阳性菌株连续传代培养, 选取连续 3 次传代以上都有稳定的完全重组的菌株作为 *PhoP* 基因缺失突变株, 并经 DNA 序列分析验证。

2 结果与分析

2.1 *PhoPC* 编码序列和 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU*、*Amt* 启动子片段的 PCR 扩增

利用 PCR 扩增 *PhoPC* 编码序列(312 bp)及 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU*、*Amt* 启动子片段(长度均为 270 bp), 各 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 得到与预期相符的 DNA 条带(图 2)。

2.2 *PhoPC* 蛋白的表达纯化

将构建的重组表达质粒 pGEX-*PhoPC* 转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达, 菌液通过超声破碎后, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。结果显示其上清中有分子量约为 39.4 kD 的目的蛋白条带出现(图 3 中泳道 2), 表明 GST-*PhoPC* 融合蛋白在大

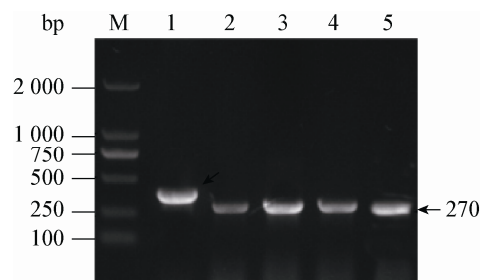


图 2 PCR 扩增结果

Figure 2 Electrophoresis result of PCR amplification

注: M: DNA marker; 1: *PhoPC* 编码序列 PCR 产物; 2、3、4、5: *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 启动子片段。

Note: M: DNA marker; 1: DNA fragment of *PhoPC*; 2, 3, 4, 5 represent of *PhoP*, *MAV0127*, *PhoU* and *Amt* promoter fragments respectively.

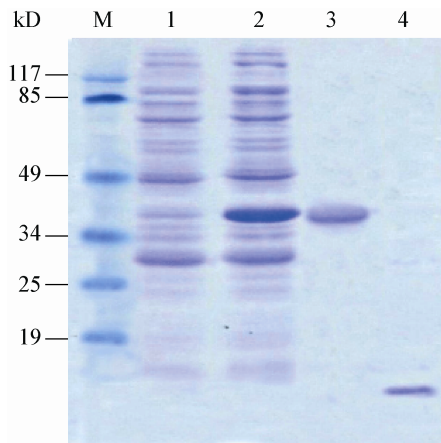


图3 PhoPC 蛋白的表达与纯化

Figure 3 Expression and purification of PhoPC protein

注：M：蛋白 Marker；1、2：分别为含 pGEX-4T-3 质粒(对照)和 pGEX-PhoPC 重组质粒菌体的超声破菌液上清；3：经谷胱甘肽琼脂糖珠纯化后的 GST-PhoPC 蛋白；4：切除 GST 标签后的 PhoPC 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1, 2: The supernatants of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pGEX-4T-3 (control) and pGEX-PhoPC, respectively; 3: Purification of GST-PhoPC protein by Glutathione Agarose; 4: PhoPC protein after cleavage of GST-tag.

肠杆菌中得到可溶性表达。上清 GST-PhoPC 融合蛋白经谷胱甘肽琼脂糖珠分离纯化后用凝血酶切除 GST 标签，获得分子量约为 13.4 kD 的 PhoPC 蛋白(图 3 中泳道 4)。

2.3 凝胶迁移率移动试验

为了研究 *PhoP* 及其下游基因 *MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 是否直接受 *PhoP* 调控，设计凝胶阻滞试验，以分析 *PhoP* 能否与 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 的启动子片段结合。将适当浓度的 *PhoPC* 蛋白分别与 *PhoP*、*MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 启动子片段混合，在 GSM 缓冲液中 30 °C 孵育 30 min 后进行非变性 PAGE 凝胶电泳，结果显示 *PhoPC* 能与 *PhoP*、*MAV0127* 和 *Amt* 启动子片段结合，而不能与 *PhoU* 启动子片段结合(图 4)，提示 *PhoP* 能直接调控 *PhoP*、*MAV0127* 及 *Amt* 基因，而对 *PhoU* 基因的调控可能为间接作用。

2.4 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段的制备

以鸟分枝杆菌临床分离株基因组 DNA 为模板，

用 *PhoP*-N-R/F 和 *PhoP*-C-R/F 两对引物分别扩增出 *PhoP* 基因上、下游同源核苷酸片段 F1 (408 bp) 和 F2 (618 bp)，见图 5。将这两个片段 F1 和 F2 用 *EcoR* I 消化之后进行定向连接，得到 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段(F1+F2)。

2.5 重组自杀质粒的构建及鉴定

将 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段克隆入自

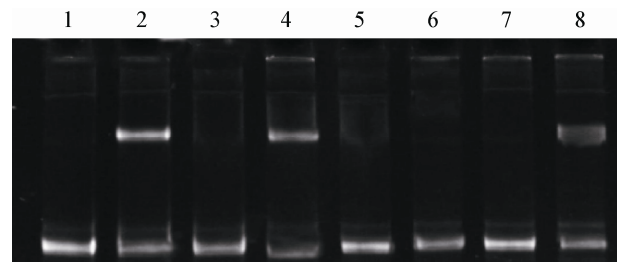


图4 凝胶迁移率移动试验结果

Figure 4 Results of electrophoretic mobility shift assay

Note: 1: *PhoP* promoter fragment; 2: PhoPC+*PhoP* promoter fragment; 3: *MAV0127* promoter fragment; 4: PhoPC+*MAV0127* promoter fragment; 5: *PhoU* promoter fragment; 6: PhoPC+*PhoU* promoter fragment; 7: *Amt* promoter fragment; 8: PhoPC+*Amt* promoter fragment.

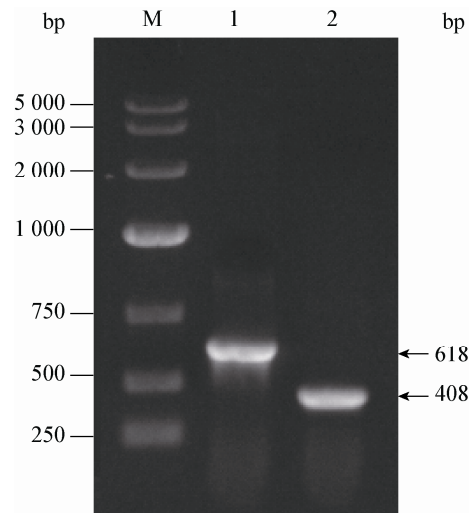


图5 鸟分枝杆菌 *PhoP* 基因上、下游片段的 PCR 扩增
Figure 5 PCR amplification of the upper and down-stream fragments of the *PhoP* gene in *Mycobacterium avium*

注：M：DNA marker；1：*PhoP* 基因下游片段；2：*PhoP* 基因上游片段。

Note: M: DNA marker; 1: Down-stream fragment of the *PhoP* gene; 2: Upper-stream fragment of the *PhoP* gene.

杀质粒 pGMB151 并转化 *E. coli* SPY372 λ pir, 利用氨苄抗性筛选阳性菌落, 提取重组质粒, 用 PhoP-N-F 和 PhoP-C-R 两条引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测显示扩增出一条约为 1 032 bp 的片段, 经 *Bam*H I 酶切后同样也切下同一大小的片段(图 6), 结果表明, 含 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段的重组自杀质粒 pGMB151 构建成功。经 DNA 序列分析, *PhoP* 基因上、下游两条片段之间 309 bp 的片段被 *Eco*R I 位点的 6 个碱基所取代。

2.6 *PhoP* 基因缺失突变株的筛选及鉴定

经含 5%蔗糖 Middle brook 7H10/OADC 平板上筛选的菌落, 用 *PhoP* 基因上、下游引物 PhoP-N-F 和 PhoP-C-R 进行 PCR 扩增, 筛选发生同源重组的菌株。第一次通过 Middle brook 7H10 蔗糖平板筛选的菌株, 经 PCR 鉴定发现大部分菌株未发生同源重组, 另外有少部分的细菌出现大片段和小片段共存的现象, 提示目的基因未完全被置换。将重组突变株进行连续传代培养, 经过 3-6 次的筛选, 结果显示菌株已完全重组并稳定存在(图 7)。经 DNA 序列分析, 突变株的 *PhoP* 基因已缺失 309 bp。

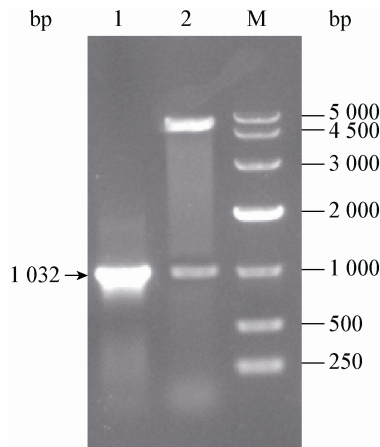


图 6 重组自杀质粒 pGMB151 的鉴定

Figure 6 Identification of the recombinant suicide plasmid pGMB151

注: 1: 重组自杀质粒的 PCR 鉴定; 2: 重组自杀质粒的酶切分析; M: DNA marker.

Note: 1: PCR identification of the recombinant suicide plasmid; 2: Restriction analysis of the recombinant suicide plasmid; M: DNA marker.

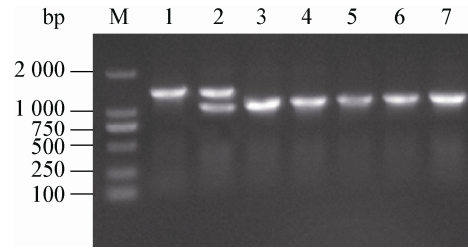


图 7 鸟分枝杆菌 *PhoP* 基因缺失突变株的 PCR 筛选及稳定性检测

Figure 7 Selection and identification of genetic stability of the *Mycobacterium avium* strain with defective *PhoP* gene by PCR

注: M: DNA DL2000 marker; 1: 鸟分枝杆菌野生株; 2: 初次筛选时出现的双重组变异; 3-7: 2-6 代鸟分枝杆菌 *PhoP* 基因缺失突变株菌落 PCR 鉴定.

Note: M: DNA DL2000 marker; 1: Wild strain of *Mycobacterium avium*; 2: Bidirectional recombinant variant appeared in the first time selection; 3-7: *PhoP* deleted mutant strain of 2, 3, 4, 5, 6 generation, respectively.

3 结论与讨论

PhoP 调控基因属于 *PhoB/OmpR* 家族, 这个家族成员的反应调控器含有两个区域, 一个是位于氨基末端的调控区域, 另外一个位于羧基末端的 DNA 结合区(反应区域)。研究表明, 这些反应调控器与其靶基因的启动子结合是通过识别位于启动子上游-35 区的串联重复序列结合位点, 以二聚体的形式相结合^[12]。*PhoP* 212 位的丝氨酸残基(在减毒株 H37Ra 的 *PhoP* 中突变为亮氨酸)是通过氢键与 DNA 相连。运用含 *PhoP* 启动子区域的 238 bp 的片段与 *PhoP* (H37Rv 和 H37Ra) 的结合试验表明, H37Ra 中 *PhoP* 的点突变导致了其 *PhoP* 与 DNA 结合力的下降^[13-14], 其原因可能是 212 位丝氨酸突变为含有大量疏水基的亮氨酸, 丧失了氢键导致空间排斥, 从而与 DNA 结合的亲和力和特异性受到影响。在以往的工作中, 我们曾对一株鸟分枝杆菌 HIV/AIDS 临床分离株 *PhoP* 基因的全长进行克隆与分析, 分析显示该鸟分枝杆菌 *PhoP* 的基因和氨基酸序列与结核分枝杆菌毒力株 H37Rv 的相似性分别为 86% 和 94%, 其 *PhoP* DNA 结合区的氨基酸序列与结核分枝杆菌比较仅有 3 个氨基酸残基差异 [在鸟分枝杆菌中为丙氨酸(137 位)、丝氨酸(141 位)]

和丙氨酸(142位),而在结核杆菌毒力株 H37Rv 中分别为赖氨酸、天冬酰胺和缬氨酸],这表明二者的 PhoP 有较高的相似性。该分离株 PhoP 212 位的氨基酸残基为丝氨酸残基,这与结核分枝杆菌毒力株 H37Rv 相同,提示 PhoP 在鸟分枝杆菌中的作用机制与结核分枝杆菌有相似之处。

为了解鸟分枝杆菌中哪些基因受 PhoP 直接调控,经生物信息学分析,本文选取了 *PhoP* 及其下游 *MAV0127*、*PhoU* 和 *Amt* 基因为靶标,通过凝胶迁移率移动试验来验证它们是否与 PhoP 结合,结果表明 PhoP 不仅可以直接调控其下游基因 *MAV0127* 和 *Amt* 的转录水平,还可以调控其自身基因的转录。目前我们正利用 DNAaseI 足迹实验分析 PhoP 蛋白与 *PhoP*、*MAV0127* 和 *Amt* 启动子上的结合位点,以期获得 PhoP 调控这些基因的机制。

从整体水平上研究 PhoP 在鸟分枝杆菌中的调节功能,通常需要构建 PhoP 突变体。我们利用自杀质粒 PGMB151 介导的同源重组,构建 *PhoP* 基因缺失突变株。结果显示,通过设计特异性引物,经 PCR 扩增出 *PhoP* 基因上、下游片段并定向连接,制备了 *PhoP* 基因缺失性同源核苷酸片段,在全长为 720 bp 的 *PhoP* 基因中,缺失了 309 bp。为了避免 *PhoP* 基因敲除后引起的下游基因移码突变,在设计特异性引物时,通过在引物末端加上酶切位点,以便于 *PhoP* 基因上、下游同源核苷酸片段进行定向连接,并且使得缺失区域的碱基数(309 bp)为 3 的倍数。在筛选 *PhoP* 基因缺失突变株的过程中,由于在蔗糖培养基上生长出的耐蔗糖菌株可能含有 *PhoP* 基因回复突变株,因此可通过连续传代培养来筛选,以连续传代 3 次以上都有稳定的完全重组的菌株作为 *PhoP* 基因缺失突变株。PhoP 是 PhoP-PhoR 二元调控系统中重要的调控因子,通过 PhoP 突变或缺失等方法,来研究调节蛋白作用于下游基因后有关转录组或表达谱的变化,以了解 PhoP 在鸟分枝杆菌致病、持留存活中的作用,将是我们以后要重点开展的工作。

致谢:本研究得到广西疾病预防控制中心结核病防治所蓝如束所长的协助,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007, 175(4): 367-416
- [2] Mirsaeidi M, Machado RF, Carcia JGN, et al. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91879
- [3] Gunaydin M, Yanik K, Eroglu C, et al. Distribution of nontuberculous mycobacteria strains[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2013, 12: 33
- [4] Wang HS, Wu QX. The infection of nontuberculosis mycobacteria and AIDS[J]. Foreign Medical Sciences Section of Dermatology and Venereology, 2005, 31(3): 166-168 (in Chinese)
王洪生, 吴勤学. 非结核分枝杆菌感染与艾滋病[J]. 国外医学皮肤病学分册, 2005, 31(3): 166-168
- [5] Chinese Society for Tuberculosis, Chinese Medical Association. The diagnosis and treatment of nontuberculosis mycobacteria disease experts consensus[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2012, 35(8): 572-580 (in Chinese)
中华医学会结核病学分会, 《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8): 572-580
- [6] Sun Q, Sha W. Comparison and analysis of the clinical features in nontuberculosis mycobacteria and tuberculosis lung disease[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2011, 33(2): 120-122 (in Chinese)
孙勤, 沙巍. 非结核分枝杆菌肺病与肺结核患者的临床特征对比分析[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(2): 120-122
- [7] Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis[J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(2): 312-330
- [8] Pérez E, Samper S, Bordas Y, et al. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(1): 179-187
- [9] Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, et al. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence[J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3496
- [10] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 2344
- [11] Saito H. Laboratory media for the cultivation of tubercle bacillus[J]. Kekkaku, 1998, 73(5): 329-337
- [12] Wang SS, Engohang-Ndong J, Smith I. Structure of the DNA-binding domain of the response regulator PhoP from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Biochemistry, 2007, 46(51): 14751-14761
- [13] Gonzalo-Asensio J, Soto CY, Arbués A, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* *phoPR* operon is positively autoregulated in the virulent strain H37Rv[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(21): 7068-7078
- [14] Lee JS, Krause R, Schreiber J, et al. Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain[J]. Cell Host & Microbe, 2008, 3(2): 97-103