

## Cre-LoxP 系统在炭疽芽胞杆菌基因敲除中的应用及 *eag* 基因的敲除

王艳春 姜娜 展德文 邱炎 袁盛凌 陶好霞 王令春 张兆山 刘纯杰\*

(军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

**摘要** 将 Cre-LoxP 系统应用于 *Bacillus anthracis* 中并成功敲除 *eag* 基因. 以 *B. anthracis* 基因组为模板扩增得到上下游同源臂, 联合两端带有 LoxP 位点的壮观霉素抗性基因片段构建好同源重组载体, 转化 *B. anthracis* AP422, 通过一系列筛选得到带有抗性标记的重组菌. 然后, 通过转入 Cre 重组酶表达质粒, 去除抗性标记, 得到 *eag* 基因缺失的重组菌, 并在 DNA 水平、RNA 水平和蛋白质水平进行了系统的鉴定. 最终建立了 Cre-LoxP 系统在 *B. anthracis* 中的应用方法, 并成功敲除 *eag* 基因.

**关键词** 炭疽芽胞杆菌, Cre-LoxP 系统, *eag* 基因, 同源重组, 基因敲除

**学科分类号** Q93

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00687

基因敲除(gene knockout)技术是研究相关基因功能最常用的实验方法, 通过构建相关基因的缺失突变体, 对基因功能进行深入的研究. Cre-loxP 系统是近年来普遍应用的一种条件性敲除基因的方法, 这一系统主要通过位点特异性的 Cre 重组酶识别 34 bp 的部分反转重复的 LoxP 序列(ATAACTT-CGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT), 通过分子内重组将方向相同的 2 个 LoxP 位点间的序列删除, 留下 1 个 LoxP 位点. 目前该系统已经成功用于多种真核细胞和细菌的基因敲除<sup>[1,2]</sup>.

炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)是一种革兰氏阳性菌, 它引起的炭疽是一种烈性传染病, 为人兽共患, 在我国被列为乙类传染病. 同时它又是一种潜在的生物战剂. 因此, 对炭疽杆菌致病机理和相关基因功能的研究就成为当前研究的热点, 在炭疽芽胞杆菌中建立实用有效的基因敲除方法也就有十分重要的意义. 目前, 在炭疽杆菌中进行基因敲除的方法主要分为两大类, 一类是利用转座子进行基因随机突变, 然后通过相应的筛选得到目标基因的突变菌株. 如 Missiakas 等利用转座子系统构建约 10<sup>3</sup> 个炭疽杆菌的基因突变体<sup>[3]</sup>. 另一类是通过同源重组的方式对特定基因实现定点敲除. 如 Shatalin 等<sup>[4]</sup>利用同源重组原理, 建立了一种高效

的炭疽基因敲除的方法, 并成功地对多个靶基因进行敲除验证了系统的可行性. 但上述两种方法都有一定的局限性, 前者由于突变的发生是随机的, 因此寻找特定基因突变的菌株工作相对比较费事, 工作量也大. 后者在构建得到基因突变菌株的同时, 在相应菌株的基因组内残留了抗生素抗性基因, 这必然会限制重组菌的进一步应用. 因此, 建立一种高效而且没有抗生素抗性基因残留的基因敲除方法就显得很有必要. 而 Cre-LoxP 系统则正好可以满足上述要求, 将这一系统引入到炭疽杆菌的基因敲除工作中来有着十分重要的意义.

EA1(extracellular antigen 1)蛋白是炭疽芽胞杆菌 S-层蛋白的重要组成部分, 分子质量为 91.36 ku, 在菌体生长的稳定期表达水平相对较高, 其表达水平变化可直接通过全菌蛋白 SDS-PAGE 分析进行检测<sup>[5]</sup>. EA1 蛋白的编码基因 *eag* 在基因组内表现为单拷贝基因, 且 *eag* 基因突变后可在多个水平很容易地鉴定, 因此选其作为靶标进行敲除实验, 以

\* 通讯联系人.

Tel: 010-66948834, E-mail: liucj@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-10-08, 接受日期: 2009-03-25

期建立 Cre-LoxP 系统在炭疽杆菌中进行实验的方案.

本研究建立了 Cre-loxP 在炭疽芽胞杆菌中进行基因敲除的实验方法, 并对 *eag* 基因进行了成功的敲除, 也为进行相关基因功能研究打下了很好的实验基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1** 质粒和菌株. 实验中用的关键质粒和菌株见表 1.

**1.1.2** 引物. 本研究所涉及到的引物见表 2.

**Table 1 Important plasmids and strains used in this study**

Plasmids and strains	Relevant characteristics	Source
pMAD	Shuttle vector, Amp <sup>r</sup> in <i>E. coli</i> and Em <sup>r</sup> in <i>B. anthracis</i> , Ts	[6]
pHY304	Shuttle vector, Em <sup>r</sup> both in <i>E. coli</i> and <i>B. anthracis</i> , Ts	[7]
pSET4s	Shuttle vector, Spc <sup>r</sup> both in <i>E. coli</i> and <i>B. anthracis</i> , Ts	[8]
pBE-PA	pBE2 with AmyR1 fragment	This lab
pCol-Cre	Contains whole cre recombinase gene	Prof. Yang Xiao
<i>E. coli</i> SCS110	<i>Dam</i> <sup>-</sup> <i>dcn</i> <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup>	Stratagene
<i>B. anthracis</i> AP422	pXO1 <sup>-</sup> pXO2 <sup>-</sup> , driving from A16R	This lab

**Table 2 Primers used in this study**

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction sites
loxpF	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGACATAACTTCGTATA	<i>Sal</i> I
loxpR	GAATTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGTCGACATAACTT	<i>Eco</i> R I, <i>Sal</i> I
spcF	ACGCGTCGACGTAACAATCACTAGCC	<i>Sal</i> I
SpcR	ACGCGTCGACAGCTTATTTTCCTTG	<i>Sal</i> I
eag-uF	CGGGGTACC ACGCGTAAAAGAGCAAAAAGTAGAAT	<i>Kpn</i> I, <i>Mlu</i> I
eag-uR	GCGGATCCTTTATAAATTCCTCCTCA	<i>Bam</i> H I
eag-dF	CCGGAATTCGTCGATTATAGATAAAGTGA	<i>Eco</i> R I
eag-dR	CCGCTCGAGAGGAAAATTTAAATTACTT	<i>Xho</i> I
amyF	GCGGATCCGACGACAGGGGGATTC	<i>Bam</i> H I
amyR	CCCAAGCTTCTTGACTCCTTAT	<i>Hind</i> III
creF	CCCAAGCTTATGTCCAATTTACTG	<i>Hind</i> III
creR	CCGCTCGAGCTAATCGCCATCTTCC	<i>Xho</i> I
eag-iF	TGAAAAACCTGACAGTTGTAAA	
eag-iR	CAAAAACGAATGCATTATCA	
eagF	ATGGCAAAGACTAACTCTTAC	
eagR	TTATAGATTTGGGTTATTAAG	

**1.1.3** 其他实验材料. 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品, T 载体、HiFiTaq、pfu 及其他 PCR 相关试剂为全式金公司产品. 各种抗生素购自 Sigma 公司, BHI 培养基为 BD 公司产品, 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自 Promega 公司. Trizol 为 Invitrogen 公司产品, 反转录酶为 Toyobo 公司产品. 兔抗炭疽杆菌 S 层蛋白 EA1 的 SLH 蛋白结构域多抗血清为本实验室自制(相关结果未发表), 羊抗兔 IgG 为 Jackson 公司产品, HRP 显色试剂盒购自天根生化科技公司. PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 打靶载体的构建.

利用引物 loxpF 和 loxpR 合成一段含 2 个 loxP 位点的 DNA 片段, 其中间为 *Sal* I 的酶切位点. 片段切胶纯化后与 T 载体 pEASY-T1 连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 得到重组质粒 pT-loxP, 进行酶切鉴定和测序分析.

以质粒 pSET4s 为模板, 利用引物 spcF 和 SpcR 扩增得到壮观霉素抗性基因元件(Spc<sup>r</sup> cassette). 扩增片段用 *Sal* I 酶切后与用同样的酶酶切的质粒 pT-loxP 连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 得到重组质

粒 pT-loxP::spc, 进行酶切鉴定和测序分析.

以 *B. anthracis* 基因组为模板设计引物, 用 pfu 扩增出 *eag* 基因上下游各约 800 bp 的片段, 连接到 pEASY-Blunt Simple 载体上转化 DH5 $\alpha$ , 取连接正确的质粒进行测序. 下游同源臂用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后与用同样的酶双酶切的质粒 pT-loxP::spc 连接, 得到的质粒再用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切, 与同样酶双酶切的上游同源臂连接, 最终得到 pT-*eag*::spc.

质粒 pT-*eag*::spc 用 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切后与用 *Sal* I 和 *Mlu* I 双酶切的质粒 pMAD 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ . 得到的重组质粒酶切鉴定正确后再电转化 *E. coli* SCS110.

**1.2.2 Cre 重组酶表达质粒构建.** 以质粒 pBE-PA 为模板, 利用引物 amyR<sub>F</sub> 和 amyR<sub>R</sub> 扩增得到淀粉酶启动子 AmyR<sub>1</sub>, 并在两端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind*III 位点. 回收的片段用这两个酶双酶切处理后与经同样的内切酶双酶切的质粒 pHY304 连接后转化 *E. coli* Top10, 得到的重组质粒酶切和测序鉴定, 鉴定正确的质粒命名为 pHY-AmyR. 然后以质粒 pColx-Cre 为模板扩增 Cre 重组酶基因, 并在两端分别引入 *Hind*III 和 *Xho* I 位点. Cre 重组酶基因片段用 *Hind*III 和 *Xho* I 双酶切后与经过同样双酶切的质粒 pHY-AmyR 连接转化 *E. coli* Top10, 得到的重组质粒酶切和测序鉴定, 鉴定正确质粒命名为 pHY-Cre. 质粒 pHY-Cre 再转化 *E. coli* SCS110.

**1.2.3 *eag* 基因的无痕敲除.**

从 -70°C 保存的 *B. anthracis* AP422 菌种中划线分离单菌落, 接种于 5 ml BHIG (HBI 培养基加 0.5% 甘油) 培养基中, 37°C 过夜培养. 将过夜培养物按 1% 的比例接种到 100 ml 新的 BHIG 培养基中, 37°C 剧烈振荡培养. 当  $A_{600}$  值达到 0.5~0.6 时 (约 2 h), 从摇床中取出, 按文献[4]所述方法制备感受态.

每 80  $\mu$ l 感受态细胞加 5  $\mu$ l (约 1.5  $\mu$ g) 质粒 pMAD-*eag*::spc, 混合后于 0.2 cm 电击杯中冰浴 5 min, 然后用 Bio-Rad 电转仪进行电转化, 条件为: 2.5 kV、200 $\Omega$  和 25  $\mu$ F. 电击完毕后立即加入 1 ml 冰冷的 LB 培养基, 30°C 孵育 2.5 h. 分别取 100  $\mu$ l 和 200  $\mu$ l 涂布于含红霉素 (5 mg/L) 和 X-gal (50 mg/L) 的 LB 平板上, 30°C 过夜培养.

挑取一个蓝色菌落, 接种到 5 ml LB 培养基中, 30°C 培养 2 h, 然后转到 42°C 培养 2 h. 取 5  $\mu$ l 培养物梯度稀释, 取  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  稀释液

各 100  $\mu$ l 涂布于含壮观霉素 (50 mg/L) 和 X-gal (50 mg/L) 的 LB 平板上, 42°C 过夜培养.

取于 42°C 培养生长出的白色菌落, 取 50 个接种到含壮观霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中, 37°C 培养过夜. 取过夜培养物 5  $\mu$ l 进行全菌 PCR 鉴定, 引物用 *eag*-iF 和 *eag*-iR, 同时以正常 *B. anthracis* AP422 菌株做对照.

上一步骤鉴定发生重组的菌在无抗生素存在的条件下传 5 代, 通过抗生素抗性分析证明不再有红霉素抗性后, 按照前述方法制备感受态, 转入质粒 pHY-Cre, 方法同样采用电转化, 条件同前述. 电击完毕后立即加入 1 ml 冰冷的 BHIG 培养基, 30°C 孵育 2.5 h. 取 50  $\mu$ l 涂布于含红霉素 (5 mg/L) 的 LB 平板上, 30°C 过夜培养.

得到的重组菌在含红霉素 (5 mg/L) 的 LB 液体培养基中 30°C 传 2 代后, 再在无抗生素存在的条件下 37°C 传 3 代, 然后在不含抗生素的 LB 平板上划线分离单菌落并进行抗生素抗性分析.

**1.2.4 重组菌的 PCR 鉴定.** 对于 AP422 及带壮观霉素抗性重组菌和最后得到的不含抗生素基因的重组菌, 提取基因组作为模板进行 PCR 鉴定, 并对 PCR 产物连接到 T 载体后进行测序鉴定.

**1.2.5 *eag* 基因缺失突变株的 RT-PCR 分析.** 取突变株和对照株 AP422 的单菌落, 接种到 BHIG 培养基中, 37°C 过夜培养. 取 5  $\mu$ l 过夜培养物分别接种到 5 ml BHIG 培养基中, 37°C 过夜培养. 取 1.5 ml 培养物 (约  $10^9$  CFU), 离心收集菌体, 500  $\mu$ l TE 缓冲液重悬后加入溶菌酶 (终浓度为 30 g/L) 处理 3 h, 然后用 Trizol 提取菌体的总 RNA, 具体操作按照说明书所述方法稍加改进进行. 得到的总 RNA 测定后浓度取约 1  $\mu$ g 作为模板, 利用随机引物反转录合成 cDNA 第一链, 然后再以此 cDNA 作为模板, 使用引物 *eag*F 和 *eag*R 进行 RT-PCR 分析.

**1.2.6 重组菌全菌蛋白分析.**

对通过 PCR 鉴定在基因水平确认发生重组的菌, 取 500  $\mu$ l 过夜培养物, 17 000 g 离心 5 min, 弃上清, 再用等体积 PBS 洗涤一次, 最后用 30  $\mu$ l PBS 重悬菌体, 按照实验手册制备全菌蛋白样品, 用 12% 凝胶进行 SDS-PAGE 分析, 在蛋白质水平观察 EA1 表达水平的变化, 同时以正常 AP422 菌株作为对照.

在 SDS-PAGE 分析的基础上, 进行免疫印迹分析. 将 AP422 和重组菌全菌蛋白用 12% 凝胶进

行 SDS-PAGE, 然后转移到 NC 膜上. 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 再与抗 EA1 蛋白 SLH 结构域的抗血清(1:20 000 稀释)37℃ 共孵育 2 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000 稀释)共孵育 1 h, 最后将膜用 PBST 洗干净后用 HRP 显色试剂盒进行显色.

## 2 结 果

### 2.1 打靶载体的构建与鉴定

扩增得到的同源臂及两端带有 loxP 位点的壮观霉素抗性基因元件连接到 T 载体后酶切鉴定结果, 如图 1 所示, 3 个片段均成功地连接到 T 载体上, 分子质量分别约为 800 bp、800 bp 和 1 200 bp. 且经测序鉴定没有发生突变.

测序正确的片段按 *Spc* 抗性元件、下游同源臂和上游同源臂的顺序用相应的内切酶进行双酶切处理后依次与载体质粒 pT-loxP 连接, 最后得到含有 *eag::loxP-spc-loxP* 这一核心片段的质粒 pT-*eag::spc*.

上述核心片段从质粒上切下后连接到穿梭载体 pMAD 后得到打靶载体 pMAD-*eag::spc*. 打靶载体再转化 *E. coli* SCS110, 得到非甲基化的质粒, 用于转化 *B. anthracis*. 具体的构建过程如图 2 所示.

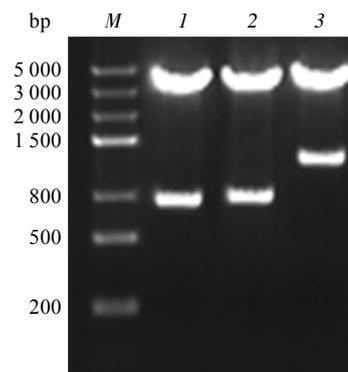


Fig. 1 Enzyme analysis of homologous arms and *spc*<sup>r</sup> cassette with LoxP sites

M: DNA marker; 1: pT-up-eag; 2: pT-down-eag; 3: pT-loxP::spc.

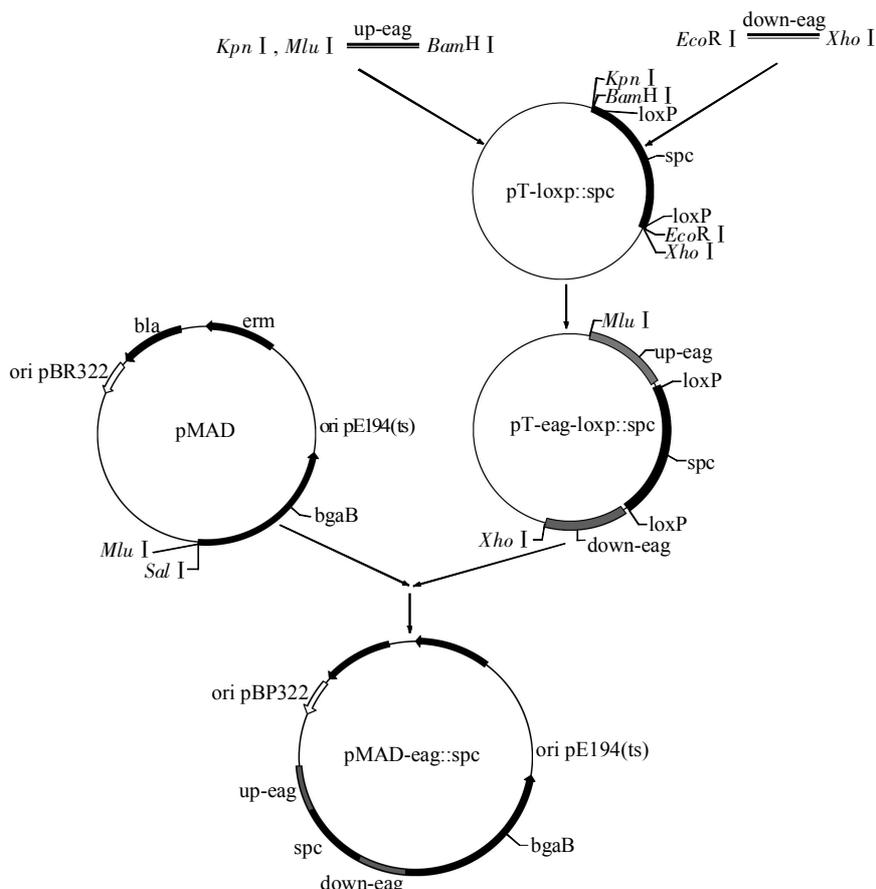


Fig. 2 Construction of plasmid pMAD-*eag::spc*

### 2.2 Cre 重组酶表达载体的构建

重组质粒 pHY-AmyR 及 pHY-Cre 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 及 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶

切鉴定结果如图 3 所示, 从图 3 中我们可以看出, 相应的目标片段均成功地与载体质粒 pHY304 连接, 并经过测序鉴定序列完成正确. 这说明带有淀

粉酶启动子 Cre 重组酶的表达质粒 pHY-Cre 构建成功. 质粒 pHY-Cre 最后转化 *E. coli* SCS110, 得到非甲基化的质粒, 用于转化 *B. anthracis*.

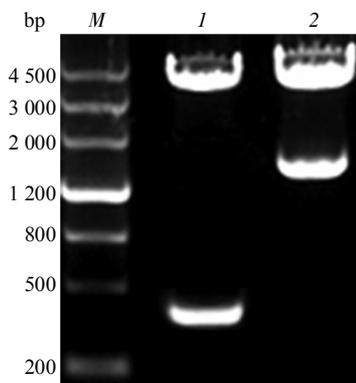


Fig. 3 The identification of plasmid pHY-AmyR and pHY-Cre

M: DNA marker; 1: pHY-AmyR; 2: pHY-Cre.

### 2.3 *eag* 基因的无痕敲除

整个基因敲除中所采用的策略如图 4 所示.

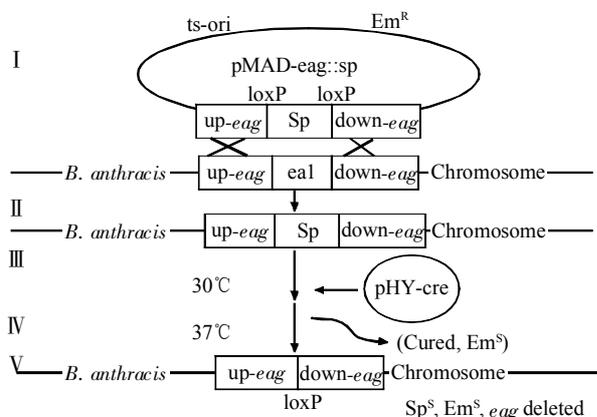


Fig. 4 The procedure for knock-out of the *eag* gene in *B. anthracis*

Structures of all intermediates were confirmed by PCR. Note that the recombination can occur between the upstream portion and the downstream portion.

由于质粒 pMAD 上含有  $\beta$ - 半乳糖苷酶基因, 因此在 X-gal 存在的情况下, 能够显蓝色, 所以如果质粒与基因组没有发生重组, 那么菌落就是蓝色的, 只有菌落为白色的菌才有可能发生了同源重组. 因此按照 1.2.3 中所述的方法进行系列操作后, 随机挑取 50 个白色单菌落, 用引物进行 PCR 鉴定. 用 *eag* 基因上游同源臂外侧 30 bp 处的 *eag*-iF 和下游同源臂外侧 34 bp 的 *eag*-iR 两对引物对重组转化子进行 PCR 鉴定, 同时用 *B. anthracis* AP422

作为对照. 图 5 是部分菌进行菌落 PCR 鉴定的结果, 扩增的结果分两种, 多数菌 PCR 扩增产物长度约 4.3 kb, 这与以正常 *B. anthracis* AP422 为模板扩增的结果一致(第一泳道), 另一个(第 7 泳道) PCR 产物片段长度约 3.0 kb, 这与发生重组后的菌在基因组上两个引物间的理论长度一致, 这说明对应的菌株可能已经在 *eag* 基因位点发生了重组, 1.4 kb 左右的 *Spc<sup>r</sup>* 线性化片段插入到了基因组中并替换了 *eag* 基因(2.6 kb). 将该 3.0 kb 的片段克隆到 pT1-EASY 载体中后进行克隆和测序, 结果显示, 该序列的上下游分别含有 *eag* 基因上下游同源臂的片段, 中间为壮观霉素抗性基因元件, 这与理论目标相一致, 说明重组已经成功, 新菌株命名为 AP422 $\Delta$ *eag*::*spc*. 得到的重组菌在 42°C 条件下连续传 3 代, 彻底去除可能的红霉素抗性.

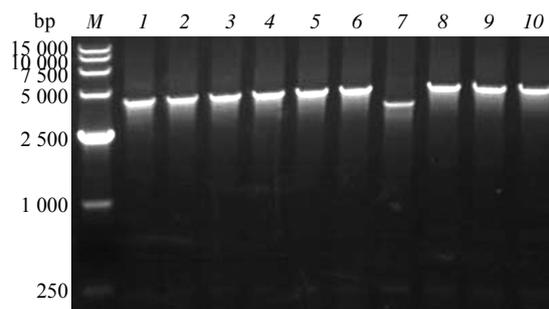


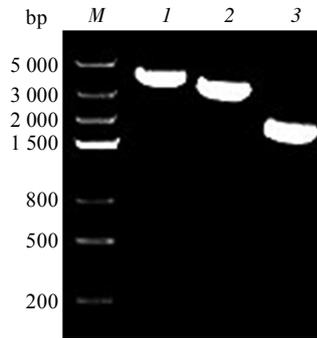
Fig. 5 Identification of recombinant bacteria by PCR

M: DNA marker; 1: *B. anthracis* AP422; 2~10: Potential recombinant.

得到的重组菌转入质粒 pHY-Cre, 按 1.2.3 中所述方法进行的操作后, 取单菌落, 在 37°C 无抗生素存在的条件下连续传 3 代, 并通过抗生素抗性分析, 最终得到不含有残留质粒的重组菌, 且表型鉴定为 *Spc<sup>s</sup>* 和 *Em<sup>s</sup>*, 得到的重组菌命名为 *B. anthracis* AP422 $\Delta$ *eag*.

### 2.4 *eag* 基因缺失突变株的 PCR 鉴定

用 AP422、AP422 $\Delta$ *eag*::*spc* 和 AP422 $\Delta$ *eag* 三株菌的基因组作为模板, 以引物 *eag*-iF 和 *eag*-iR 进行 PCR 验证的结果如图 6. 从图 6 中我们可以看出, 重组菌 AP422 $\Delta$ *eag* 基因组用上述引物扩出的片段长度约 1.7 kb, 这与理论值相当, 而两个对照菌 AP422 和 AP422 $\Delta$ *eag*::*spc* 扩增得到的片段长度与得到重组菌明显不同, 分别为 4.3 kb 和 3.0 kb 左右. 扩增得到的片段连接到 T 载体后测序, 结果显示 *eag* 基因已经完全缺失, 相应位点处只剩下一个 loxP 位点, 这就在基因水平上证实了 *eag* 基因敲除成功.

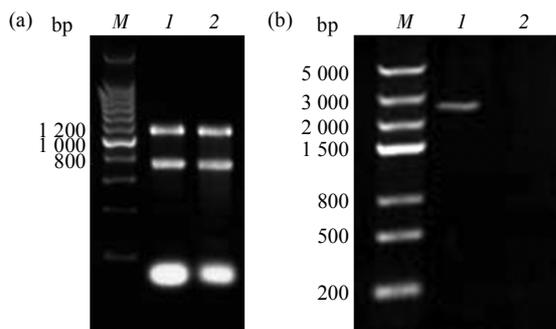


**Fig. 6 Identification of *B. anthracis* AP422 *eag* by PCR**

*M*: DNA marker; *1*: *B. anthracis* AP422; *2*: *B. anthracis* AP422Δ*eag*::*spc*; *3*: *B. anthracis* AP422Δ*eag*.

## 2.5 *eag* 基因缺失突变株的 RT-PCR 分析

对于 DNA 水平鉴定正确的菌株, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 结果如图 7a. 以 *eag* 基因特异性的引物 *eagF* 和 *eagR* 进行 RT-PCR 鉴定, 结果如图 7b 所示. 理论上, 对于 *eag* 基因完全敲除株来讲, 用引物 *eagF* 和 *eagR* 是扩增不出条带的, 而对照菌株 AP422 的总 RNA 应该能够扩增出相应的 *eag* 基因, 长度约为 2.6 kb. 实验结果与理论值完全吻合, 这也就在 RNA 水平上说明, *eag* 基因已经被成功敲除, 不再转录.



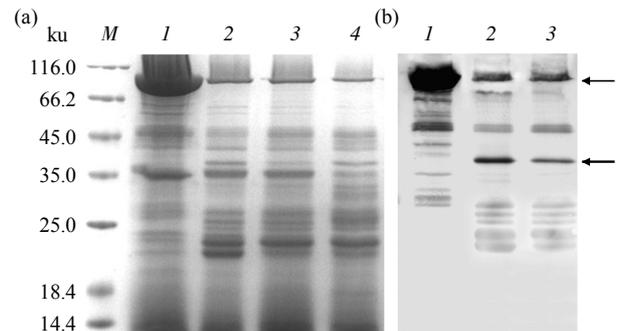
**Fig. 7 Identification of *B. anthracis* AP422 *eag* by RT-PCR**

(a) Total RNA of *B. anthracis* AP422 and the mutant. (b) RT-PCR result. *M*: DNA marker; *1*: *B. anthracis* AP422; *2*: *B. anthracis* AP422 Δ*eag*.

## 2.6 *eag* 基因缺失突变株的全菌蛋白分析

对于基因水平鉴定正确的 *eag* 基因缺失的菌株 (共 3 株) 用 12% 凝胶进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 8a. EA1 蛋白分子质量大小为 91.36 ku, 在电泳上样量大致相当的情况下, 对照菌株 *B. anthracis* AP422 的 EA1 蛋白表达水平很高, 而相比之下, 缺失株在对应位置表达的蛋白质却很少, 可能只是

其他大小相当的蛋白质(较粗箭头所指位置). 这一结果也就从蛋白质水平进一步证实 *eag* 基因敲除成功. 另外, 以抗 EA1 蛋白 SLH 结构域的兔抗血清做为一抗进行对其中两株重组菌进行免疫印迹分析的结果(图 8b), 也从另一个侧面证实了上述实验结果.



**Fig. 8 Analysis of *eag* gene mutant strains**

About 20  $\mu$ l total bacteria proteins sample were separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto NC membrane, blotted with rabbit unpurified anti-SLH domain serum (1 : 20 000 dilution), goat anti-rabbit IgG (1 : 5 000 dilution). (a) SDS-PAGE analysis. *M*: Protein molecular mass marker; *1*: *B. anthracis* AP422; *2*~*4*: *B. anthracis* AP422Δ*eag*. (b) Western blot analysis. *1*: *B. anthracis* AP422; *2*, *3*: *B. anthracis* AP422 Δ*eag*.

## 3 讨 论

利用 Cre-LoxP 系统, 我们通过对 *B. anthracis* AP422 *eag* 基因的成功敲除, 建立了这一系统在革兰氏阳性菌 *B. anthracis* 中的应用方案, 为以后进行该菌相关基因功能的研究奠定了良好的实验基础. 该方法能够特异性地针对某个基因进行缺失, 而且筛选效率相对较高, 明显优于传统的利用转座子进行基因灭活的方法. 此外, 最重要的一点是, 利用这一方法进行基因敲除, 最后得到的重组菌不携带任何抗性筛选标记, 在其使用过程中可以避免抗生素的应用, 为将菌株改造后和进行相关的疫苗研究提供了一个非常有效的手段, 完全符合当前对疫苗候选菌株进行改造的要求.

在 *eag* 基因敲除后, 除了 EA1 蛋白表达发生变化外, 其他蛋白质的表达也有不同程度的变化, 其中最为明显的是, 一个分子质量 35~40 ku 的蛋白质在 *eag* 基因敲除株中的表达水平明显上调(图 8 中较细箭头所指). 以抗 EA1 蛋白 SLH 结构域的兔多抗血清做为一抗进行免疫印迹分析的结果表明, 该蛋白质能够很好地与 SLH 的抗血清反应, 说明

这一蛋白质有可能也是 S- 层蛋白. 这是因为, 我们做免疫印迹所用的多抗血清是针对 S- 层蛋白保守结构域 SLH domain 的, 所有含有这保守结构域的蛋白质都可能与之相互作用. 当 EA1 蛋白不表达时, S 层的合成受到抑制, 于是菌体通过表达其他可能的 S- 层蛋白来维持或部分维持 S- 层的合成. 表达明显上调的这一蛋白质可能正是在这种状态下实现的表达变化, 从而对 S- 层的合成起到代偿作用. 当然, 这只是一种猜测, 真正的解释还有待于进一步实验的证实.

另外, 本研究所用打靶载体质粒 pMAD 内带有  $\beta$ - 半乳糖苷酶基因. 游离存在的质粒在 *B. anthracis* 中能够表达  $\beta$ - 半乳糖苷酶, 在底物 X-gal 存在的情况下, X-gal 的代谢产物能够使菌落显蓝色. 当发生同源重组后, 在只存在相应的壮观霉素筛选压力的情况下, 质粒不再存在, 此时菌落就呈现白色, 这在一定程度上大大减少了筛选重组菌时的工作量, 因此也有着很重要的作用.

**致谢** 感谢加州大学圣地亚哥分校的 Victor Nizet 教授、军事医学科学院的杨晓教授和刘先凯博士提供实验中所需的部分质粒及其他相关帮助.

## 参 考 文 献

- 1 Le Y, Sauer B. Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Mol Biotechnol*, 2001, **17**(3): 269~275
- 2 Pomerantsev A P, Sitaraman R, Galloway C R, *et al.* Genome engineering in *Bacillus anthracis* using Cre recombinase. *Infect Immun*, 2006, **72**(1): 682~693
- 3 Tam C, Glass E M, Anderson D M, *et al.* Transposon mutagenesis of *Bacillus anthracis* strain Sterne using *Bursa aurealis*. *Plasmid*, 2006, **56**(1): 74~77
- 4 Shatalin K Y, Neyfakh A A. Efficient gene inactivation in *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **245**(2): 315~319
- 5 Mesnage S, Tosi-Couture E, Mock M, *et al.* Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Mol Microbiol*, 1997, **23**(6): 1147~1155
- 6 Arnaud M, Chastanet A, De'barbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microb*, 2004, **70**(11): 6887~6891
- 7 Jeng A, Sakota V, Nizet V, *et al.* Molecular genetic analysis of a group a streptococcus operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX. *J Bacteriol*, 2003, **185**(4): 1208~1217
- 8 Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicidevectors for gene replacement in streptococcus suis. *Plasmid*, 2001, **46**(2): 140~148

## Application of Cre-LoxP System in The Gene Knockout of *Bacillus anthracis* and The Knockout of *eag* Gene

WANG Yan-Chun, JIANG Na, ZHAN De-Wen, QIU Yan, YUAN SHENG-Ling,

TAO Hao-Xia, WANG Ling-Chun, ZHANG Zhao-Shan, LIU Chun-Jie\*

(Beijing Institute of Biotechnology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Beijing 100071, China)

**Abstract** Cre-LoxP homologous recombinant system was used to disrupt *eag* gene in *B. anthracis* AP422. To construct the recombinant vector, homologous regions and  $\text{Spc}^r$  cassette with two loxP sites were amplified from the corresponding templates. The produced shuttle vector was then transformed into *B. anthracis* AP422. Under the pressure of temperature and antibiotic, homologous recombination occurred between the vector and genome of the host bacterium and the recombinants were selected by agar media with spectinomycin (Spc) and X-gal. To remove the  $\text{Spc}^r$  cassette, a plasmid with Cre recombinase was introduced into the recombinant to delete the relevant DNA fragment, resulting in a single loxP site within the targeted genomic segment. The markerless mutant strains were detected by genome PCR, RT-PCR, total proteins SDS-PAGE analysis and Western blot. The results showed that the *eag* gene was successfully deleted.

**Key words** *Bacillus anthracis*, Cre-LoxP system, *eag* gene, homologous recombination, gene knockout

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00687

\*Corresponding author. Tel: 86-10-66948834, E-mail: liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: October 8, 2008 Accepted: March 25, 2009