



## 论 文

## 鸡毒支原体通用型 mini-Tn4001 转座子的构建

陈鸿军, 赵春梅, 沈欣悦, 陈丹青, 于圣青, 丁铲\*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

\* 联系人, E-mail: shovelden@shvri.ac.cn

收稿日期: 2009-06-01; 接受日期: 2009-07-26

国家自然科学基金(批准号: 30871883)和上海市科技兴农重点攻关项目(批准号: 2007-11-313)资助

**摘要** 为了实现以鸡毒支原体(MG)为载体携带和表达其他呼吸道病原保护性抗原, 达到多种病原体共同保护的效果, 本研究拟构建一套 mini-Tn4001 转座子(pMT4)。该微型转座子具备以下特征: 含四环素抗性基因; 两臂是转座酶识别的 Inner 和 Outer 插入重复区; 转座酶位于插入区之外, 在整合起始点处促进转座; 多克隆位点便于插入外源基因。这一微型转座子载体的成功构建为 MG 非必需区缺失工作奠定了基础, 对下一步 MG 功能基因的靶向缺失技术以及外源蛋白的表达建立了有效的基因操作工具。

**关键词**鸡毒支原体  
mini-Tn4001  
转座子  
构建

鸡慢性呼吸道疾病, 又称鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)感染, 常引起鸡群持续性感染, 造成免疫抑制, 作为最主要的背景性疾病引起其他重要传染病并发和继发, 造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。鉴于此, 使用联合鸡毒支原体的多价疫苗必然是防治家禽呼吸道传染病的首选。

MG 可以黏附在上呼吸道黏膜固有层, 弱毒疫苗株可以通过喷雾方式进行免疫, 能使疫苗毒株直达气囊部位, 这是其他弱毒疫苗难以到达和免疫的部位。这些疫苗不仅能有效地阻断鸡毒支原体经蛋传递, 也能保护被免鸡群免受感染。同时, 由于 MG 本身独特的免疫逃逸机制, 可逃避机体的清除, 长期定居于鸡的上呼吸道和气囊<sup>[1]</sup>。因此, 利用 MG 构建新型基因靶向载体疫苗, 可以产生针对多种病原主要保护性抗原的特异性免疫, 将成为研制高效多价疫苗的新途径。

对 MG 的基因操作方法比较少, 这主要是因为 MG 基因组结构十分精简, 不存在质粒系统, 天然排斥外源质粒。这大大降低了同源重组的成功几率<sup>[2]</sup>。除此之外, 转座技术也被广泛尝试。然而, 迄今为止,

仅有两种 G<sup>+</sup>菌转座子可以用于支原体: Tn916 和 Tn4001<sup>[3,4]</sup>。Tn916 长达 18 kb, 难以克隆操作, 而 Tn4001 结构与 Tn5 相似, 该转座子大小为 4.7 kb, 含 G<sup>+</sup>菌源 Class 转座子, 编码庆大霉素、卡那霉素和妥布霉素, 转座插入元件为 1.324 kb 的 IS256。每一个 IS256 元件含一个 390 aa 的 ORF, 编码转座酶基因(*tnp*)。Tn4001 具有很多功能性优势, 包括表型易筛选、染色体上存在多个插入位点、易操作和精确性高等特点<sup>[5]</sup>。Tn4001 转座子现已被广泛用于多种支原体, 如: 生殖支原体和肺炎支原体等的缺失研究<sup>[6-9]</sup>。

本研究拟构建通用型 mini-Tn4001 转座子载体, 并将其作为一种新的基因转移工具, 旨在构建以 MG 为载体携带和表达其他呼吸道病原保护性抗原, 以达到多种病原体共同保护的效果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 毒株、细菌和质粒

鸡毒支原体 R<sub>low</sub> 强毒株、S<sub>6</sub> 中等强毒株和 F 弱毒株由本室保存; F<sub>36</sub> 弱毒株购自南京天邦生物技术有限公司; Vaxsafe MG Ts-11 弱毒株购自梅里亚公司;

Nobilis MG 6/85 弱毒株购自英特威公司; 粪肠球菌 JC120(含 Tn916 转座子 *tetM* 抗性基因)由南京农业大学陆承平教授惠赠; pLacRBS(+)载体由西班牙巴塞罗那大学 Jaume Pinol 博士惠赠, 该质粒包含 Tn4001 骨架载体部分, 筛选基因为 *tetM*, 由生殖支原体 *mga438* 基因的启动子启动表达<sup>[10,11]</sup>; *E. coli* DH5 $\alpha$  工程菌由本室保存。

## 1.2 载体与试剂

pGEM-T easy 载体购于美国 Promega 公司; pBluescript-SK(+)载体由本实验室保存; T<sub>4</sub> 连接酶购于美国 Promega 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒、凝胶回收 DNA 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; pMD-18T 载体和 *Bam*H<sup>I</sup>, *Eco*R<sup>I</sup> 等限制性核酸内切酶均购自大连宝生物有限公司; DNA Marker DL5000, DL2000 购自广州东盛生物有限公司; PPLO 固体和液体培养基购于 Difco 公司; 灭活马血清和猪血清购自 Gibco 公司; 细菌培养用 Tryptone, Yeast Extract 购自 OXOID 公司。

## 1.3 mini-Tn4001 转座载体的构建

(1) 转座子包含基因引物设计. 本研究转座载体包含有外置的金黄色葡萄球菌转座酶基因(*tnp*)和 IS256 重复序列(含 Inner 和 Outer), 筛选基因为粪肠球菌 Tn916 转座子的四环素抗性基因(*tetM*). 根据 Tn4001 的转座酶基因序列、四环素抗性基因 *tetM* 的序列和 MG R<sub>low</sub> 的全基因序列(登录号: NC\_004829), 设计转座酶 *tnp* 引物, 四环素抗性基因 *tetM* 引物、Inner 插入重复区引物和 Outer 插入重复区引物等, 同

表 1 引物序列

目的基因	名称	序列(5'→3')
转座酶 <i>tnp</i>	<i>tnpF</i>	CTGGTACCGTGTA AAAAGTAAAAGGCC
	<i>tnpR</i>	CTGTCGACTACTTATCAAAAATTGATG
<i>tetM</i> 基因	<i>tetF</i>	TAGAATTCCATGTGATTCTAAAAGTATCC
	<i>tetR</i>	GCGAATTCCTTATTTAACAAGAAACC
IS256 inner 插入重复区	ISIF	CCGAGCTCGGTTTCTCTTGGATAC
	ISIR	ATGAGCTCAGTCAAGTCCAGACTCCTGTGTAAAACTAGTGGATCCCCC
LacZ	LF	CAGGATCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC
	LR	CAGCTCGAGCCCCTGCCCGTTATTAT
TetM1	<i>Tet1</i>	CAGCCACGGATGGGAGTTTTAGCTCATGTT
	<i>Tet2</i>	GCCTCGAGCTTATTTAACAAGAAACC

时根据 pLacRBS(+)载体序列设计扩增 *lacZ* 基因的引物(表 1). 所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

(2) 转座酶基因和 IS256 outer 插入重复区的获取. 根据金黄色葡萄球菌的转座酶基因序列, 以 pLacRBS(+)载体 DNA 为模板 PCR 扩增 *Tnp* 表达盒和 IS256 outer 插入重复区, 共 1314 bp. 随后将该片段连入 pMD-18T 载体中, 转化 DH5 $\alpha$ , 提取质粒 DNA, 用 *Kpn*I 及 *Eco*R<sup>I</sup> 酶切鉴定 *tnp* 基因和 IS256 Outer 插入重复区。

(3) *tetM* 抗性基因的获取. 粪肠球菌 JC120 用 LB 培养基复苏, 37°C 静置培养 24 h, 使用细菌基因组快速提取试剂盒(北京博大泰克公司)抽提基因组(详细步骤见说明书). 利用 *tetM* 基因引物 *tetF* 和 *tetR* 扩增 *tetM*(表 1), 常规 PCR 进行扩增. PCR 反应体系: JC120 细菌基因组 DNA 1  $\mu$ L, *tetM* 基因上下游引物 1  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L, *pfu* 酶 1  $\mu$ L, 补水至 50  $\mu$ L; 反应条件: 95°C, 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C, 10 min.

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 利用 QIAGEN 公司凝胶回收试剂盒回收, 与 pGEM-T easy 载体按 1 : 8 摩尔比于 4°C 连接 16 h, 转化 DH5 $\alpha$ , 用 AIX(含 0.1 mg/mL Amp, 0.1 mg/mL IPTG, 0.02 mL X-gal)平板筛选蓝白斑, 提取白斑的质粒 DNA, *Eco*R<sup>I</sup> 单酶切鉴定 *tetM* 基因, 筛选阳性克隆, 同时利用 *Hind*III 鉴别正反方向, 并送上海 Invitrogen 公司测序。

(4) 靶向转座载体骨架构建. 将克隆有 *tnp* 基因和 IS256 Outer 插入重复区的 T 载体, 利用 *Kpn*I 和

*EcoR* 双酶切, 插入相同酶切的 pBluescript-SK(+)载体中, 再将 *tetM* 基因通过 *EcoR* 单酶切插入其中, 用 *Kpn* 鉴定 *tetM* 基因的正反方向. 正向克隆的作为阳性质粒, 命名为 pISM4001.

(5) IS256 Inner 插入重复区的扩增. 以 pISM4001 质粒为模板, 利用 IS256 Inner 插入重复区引物 ISIF 和 ISIR, 常规 PCR 扩增, 将其产物回收后, 用 *Sac* 单酶切, 与相同酶切的 pISM4001 载体连接, 转化, 筛选阳性重组质粒. 由于是单一酶切位点, 需要鉴定连接正反方向. 为了进一步确定成功构建靶向转座载体, 对其整个转座载体基因序列进行测序, 构建获得 mini-Tn4001tetM 载体, 命名为 pMT4.

### 1.4 转座载体的电转化

提取本研究构建和改造的 pMT4 和 pLacRBS 的质粒 DNA, 并去除内毒素, 测定 DNA 含量, -20℃ 保存.

MG 电转化方法参照 Reddy 等人<sup>[12]</sup>的方法进行一些修改. 简单介绍如下: 收获 MG Rlow 株对数生长期的培养物, 约为  $1 \times 10^7$  颜色变化单位(CCU), 8500×g 离心 20 min, 沉淀用等量的的无菌电转化缓冲液(8 mmol/L Herpes, 272 mmol/L Sucrose)重悬后离心, 沉淀用原来一半体积的电转化缓冲液悬浮并离心, 沉淀再用原体积的 1/300 电转化缓冲液悬浮, 立即放在冰上 1 h; 用超纯水或者电转化缓冲液稀释大约 10 μg 的 DNA 添加待转化管中, 立即将细胞转移到提前预冷的 0.2 mm 电转化杯(Bio-Rad 公司产品)中. 转化条件是: 电压 2500 kV, 电阻 129 Ω, 电容 50 μF. 电穿孔时间: 5 ms, 置冰浴中 30 min, 随后添加 1 mL 预热的 PPLO 培养基于电转化杯中, 37℃ 培养 2 h.

### 1.5 重组 MG 的初步筛选

取 200 μL pMT4 载体转化的 MG 涂布于含 20 μg/mL 四环素的 PPLO 固体培养基中, 于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 7~10 天; pLacRBS 重组子则用蓝白斑方式筛选, 取 200 μL MG 涂布于加有 100 μg/mL X-gal 和 100 μg/mL IPTG 的 PPLO 平板中, 于 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 7~15 天.

挑取固体平板中生长良好的 MG 固体菌落, 置于提前预热的液体中扩大培养 5~7 天, 当培养基的 pH 值下降一个单位时, 取 100 μL 涂布固体培养基, 一部

分用于接种扩大培养, 其余用于基因组的提取, 进行 PCR 鉴定. 通过光学显微镜观察每代次支原体的具体形态, 对固体培养物进行 PCR 鉴定, 检测各代次质粒在支原体内的整合稳定性.

## 2 结果

### 2.1 mini-Tn4001tet 转座子构建

(1) 转座酶 *tnp* 基因鉴定和四环素抗性 *tetM* 基因扩增. 转座酶基因和 IS256 Outer 插入重复区插入到 pMD-18T 载体中, 用 *Kpn* 及 *EcoR* 酶切鉴定 *tnp* 基因和 IS256 Outer 插入重复区(图 1). 筛选抗性 *tetM* 基因从含有 Tn916 的粪肠球菌中通过常规 PCR 扩增得到(图 2), IS256 Inner 插入重复区通过设计相应的引物被扩增(图 3).

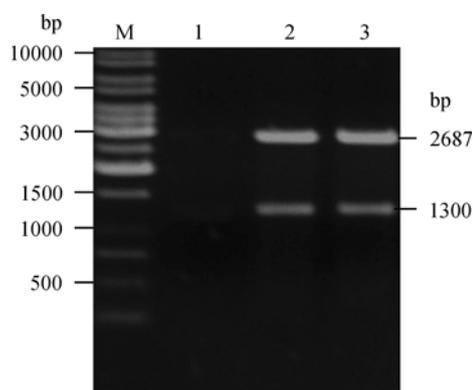


图 1 *tnp* 连接鉴定

M: 1 kb DNA Ladder; 泳道 1: PCR 阴性对照; 泳道 2,3: pMD18T+*tnp* 阳性克隆

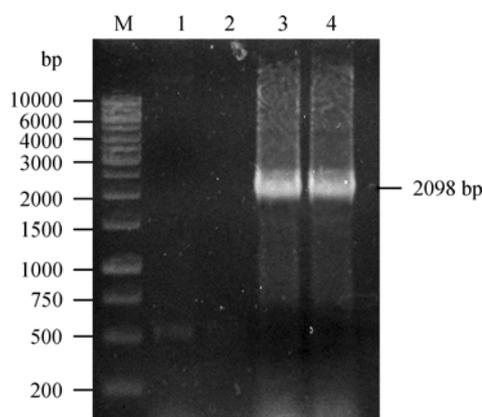


图 2 PCR 扩增 *tetM* 基因结果

M: 1 kb DNA Marker; 泳道 1,2: PCR 阴性对照; 泳道 3,4: PCR 产物

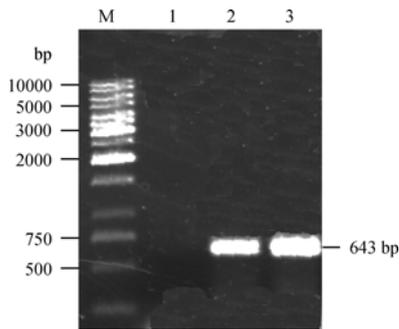


图3 IS256 序列

M: 1 kb DNA Ladder; 泳道 1: PCR 对照;  
泳道 2,3: 包含 IS256 片段

(2) mini-Tn4001tetM 构建. 本研究构建的 mini-Tn4001tetM 转座子(以下简称 pMT4), 是以载体 pBluescript SK(+)为构造基础, 首先在 *Kpn* 及 *EcoR* 处插入转座酶 *tnp* 基因和 IS256 Outer 插入重复区(pISP4001); 然后在载体 pISP4001 载体 *EcoR* 处插入合成的四环素抗性基因 *tetM* 基因(pISM4001), 利用 *Kpn* 酶鉴别正反方向; 再以载体 pISM4001 为模板, 利用设计的引物插入 IS256 Inner 重复区, 并测序鉴定正反方向; 整个 pMT4 所有元件成功插入, 并且将构建的 pMT4 整个基因序列进行测序, 测序结果完全正确, 成功地构建具有四环素筛选的 pMT4 转座子.

### 2.2 重组子筛选鉴定结果

经 20 μg/mL 四环素筛选后, pMT4 载体电转化后的 MG  $R_{low}$  和 F 株在形态上比较规则, 分为大小不等菌落. 其中,  $R_{low}$  株形态未出现明显的“脐”状, 而 F 株形态典型, 形成典型的“脐”状菌落, F<sub>36</sub>, ts-11 和 6/85 毒株的生长情况与 F 株相同; 对照 MG 各毒株在四环素平板上不生长(图4). pLacRBS 载体转化  $R_{low}$ , F, F<sub>36</sub>,

ts-11 和 6/85 后, 经蓝白斑筛选, 均未出现阳性蓝斑. 在 pMT4 转座子转化的平板中, 随机各挑取 120 个 MG 单克隆菌落, 转预热的 PPLO 液体培养基中培养 1 代, 通过 PCR 扩增 *tnp* 基因. 结果显示, pMT4 转座子转化的平板中,  $R_{low}$  株有 6 个为阳性(图5), 而 PPLO 液体培养基转接种后, 传到第 4 代时仅剩 1 个为阳性(图6), 到第 5 代以后, 该质粒从 MG 中丢失.

### 3 讨论

支原体缺乏细胞壁, 基因组结构非常简单, 大小为 580 (生殖支原体, *Mycoplasma genitalium*)~1358 kb(渗透支原体, *Mycoplasma penetrans*), 是目前已知最小的自我复制生物<sup>[12]</sup>. 因此, 人们把支原体作为研究最小生命体组成的模型. 但支原体长期以来缺乏合适有效的基因工具<sup>[13]</sup>, 主要因为: (1) 外源基因在

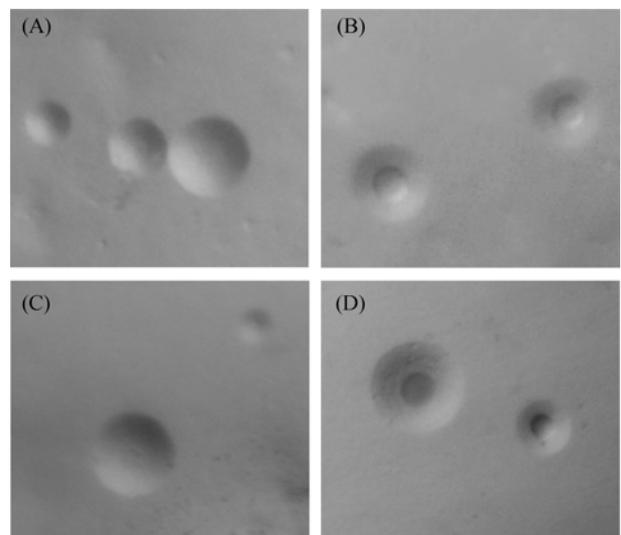


图4 pMT4 转化的 MG 筛选结果(×20)

(A) pMT4 转化的  $R_{low}$  株; (B) pMT4 转化的 F 株; (C) pMT4 转化的 D9604 株; (D) pMT4 转化的 F36 株

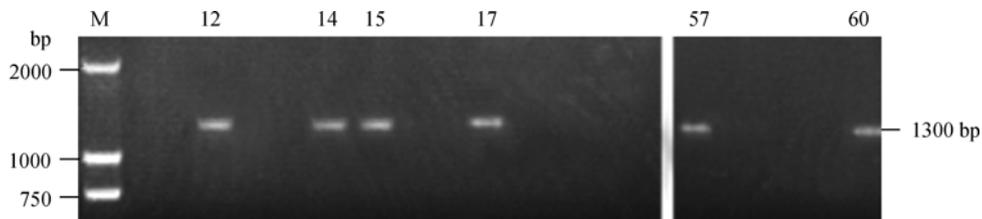


图5 pMT4 载体第 1 代阳性重组子

M: DL2000 Marker; 泳道 12,14,15,17,57,60: 阳性重组子编号

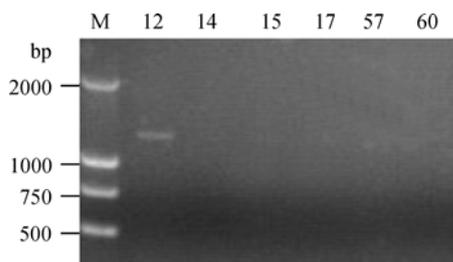


图 6 pMT4 载体第 4 代阳性重组子

M: DL2000 Marker; 泳道 12,14,15,17,57,60: 细菌编号

支原体体内不稳定; (2) 理想的定向突变载体构建难度很大, 支原体的基因组太精简, 具有严格的排他性, 以致于外源质粒载体在支原体中无法长期存在。

转座子被用于基因功能研究已有很多年, 但是大部分的转座子适用于标准生物体, 如模式菌枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌, 但并不适合支原体<sup>[3,4]</sup>。目前, 仅有两种 G<sup>+</sup>菌转座子: Tn916 和 Tn4001, 可用于支原体中, 分别来源于粪球杆菌和金黄色葡萄球菌<sup>[4]</sup>。为了避免 Tn916 长度过大和 Tn4001 的遗传不稳定性缺点, 微型转座子应运而生。在此类转座子中, 转座酶基因位于插入重复区的外部, 如: mini-Tn5, mini-Tn10, mini-Tn3, mini-Tn7 和 mini-Tn1000 等。然而, 由于支原体自身的特殊性, 这些转座子并不能被有效地利用<sup>[2]</sup>。

为了克服 Tn4001 的插入位点多且随机性强, 进而导致筛选工作量大的困难, 本研究旨在构建一套 mini-Tn4001tetM 转座元件系统(pMT4)。该微型转座子具备以下结构: 含有一种抗性基因, 比如四环素抗性基因 *tetM*; 抗性基因表达盒的两臂是转座酶识别的 IS256 Inner 和 Outer 插入重复区; 转座酶位于插入

区之外, 在整合起始点处促进转座; 微型转座子的多克隆位点便于插入外源基因。通过该转座工具证实, MG 的细胞黏附素基因 *gapA* 和辅助成分 *crmA* 是非必需基因, 但对 MG 的黏附和毒力是必需的<sup>[1]</sup>。这一载体在其他支原体的转化中亦有成功的例子<sup>[6-8]</sup>。

本研究构建的 pMT4 转座子与 Tn5 结构相似。该转座子大小仅为 3.7 kb, 含革兰氏阳性菌类转座子, 编码四环素抗性基因, 转座插入元件为 1.324 kb 的 IS256。由于转座子转化支原体生长周期较长, 转化效率极低, 一般在 10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup> 比例不等<sup>[2,13]</sup>。因此, 本实验先采用 PCR 方法进行初筛, 再进行 Southern blot 和 Western blot 细致筛选<sup>[1]</sup>。但本实验尚未成功转化获得阳性 pMT4 重组子。而利用涂布有 X-gal 的 PPLO 平板进行筛选, 转化后的 MG 亦未见有蓝斑出现。

通过特异性 PCR 鉴定 *tnp* 基因, 结果可见, 微型 pMT4 转座子存在于一些电转化后的 MG 菌体中, 但液体传代至第 4 代时, 仅有 1 个阳性重组子。而当在传至第 5 代时, PCR 则呈阴性, 此时, MG 亦不能在含四环素的液体培养基中生长。这暗示 pMT4 质粒很可能被排斥出 MG 菌体之外。以上结果说明, 虽然 pMT4 载体尚未与基因组整合, 但 *tetM* 表达盒中的异源启动子可以顺利地在 MG 菌体内正常启动, 可表达四环素抗性基因。这一结果为下一步优化电转化条件积累了实践经验。

在国内, mini-Tn4001tetM 微型转座子的成功构建及在 MG 中的应用尚属首次。该转座系统可能成为 MG 功能基因的靶向缺失以及外源蛋白的表达有效的基因操作工具。

## 参考文献

- Papazisi L S, Frasca Jr M, Gladd, et al. GapA and crmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun*, 2002, 70: 6839—6845
- Pour-El I, Adams C, Minion F C. Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid*, 2002, 47: 129—137
- Dybvig K, Cassell G H. Transposition of gram-positive transposon Tn916 in *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma pulmonis*. *Science*, 1987, 253: 1392—1394
- Lyon B R, May J W, Skurray R A. Tn4001: agentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 1984, 193, 554—556
- Byrne M E, Rouch D A, Skurray R A. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene*, 1989, 81: 361—367
- Hasselbring B M, Page C A, Sheppard E S, et al. Transposon mutagenesis identifies genes associated with *Mycoplasma pneumoniae*

- gliding motility. *Bacteriol*, 2006, 188: 6335—6345
- 7 Cao J, Kapke P A, Minion F C. Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors. *Bacteriol*, 1994, 176: 4459—4462
  - 8 Hahn T, Mothershed E A, Waldo R H, et al. Construction and analysis of a modified Tn4001 conferring chloramphenicol resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Plasmid*, 1999, 41: 120—124
  - 9 Hedreyda C T, Lee K K, Krause D C. Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. *Plasmid*, 1993, 30: 170—175
  - 10 Pich O Q, Burgos R, Planell R, et al. Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology*, 2006, 152: 519—527
  - 11 Maria L, Miquel V, Enrique Q, et al. A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in *Mycoplasma genitalium*. *Microbiology*, 2007, 153: 2743—2752
  - 12 Reddy S P, Rasmussen W G, Baseman J B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Med Microbiol*, 1996, 15: 199—211
  - 13 Sven H, Jorg S. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Med Microbiol*, 2007, 297 (1): 37—44