

优化分枝杆菌重组工程系统构建分枝杆菌突变株筛选方法^{*}

王楚涵, 马鹏娇, 罗 涛, 鲍 朗[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 感染免疫研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 通过为分枝杆菌重组工程系统(pJV53)加筛选标记,建立一种分枝杆菌突变株的筛选方法。**方法** 为pJV53加入蔗糖反筛选基因 *SacB* 和突变的潮霉素抗性基因 *hyg^S*,通过潮霉素抗性恢复指示耻垢分枝杆菌(*Ms*)体内同源重组的成功,为突变株的筛选提供标记;通过蔗糖反筛选挑选脱去质粒的突变株。**结果** 成功构建重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S*,筛选出 MSMEG_4487 G188A 突变株以及利福平耐药的 *Ms rpoB* D516Y 和 *Ms rpoB* H526Q 突变株,并成功将以上突变株脱去质粒。**结论** pJV53-*SacB-hyg^S* 能够有效帮助构建筛选突变株,并对突变株进行脱质粒操作,具有普遍应用价值;结核分枝杆菌 *rpoB* 基因 D516Y 和 H526Q 的突变与该菌对利福平的耐药有关。

【关键词】 质粒优化 耻垢分枝杆菌 突变株筛选 脱质粒 利福平耐药

Optimizing *Mycobacterium* Recombineering System (pJV53) to Promote the Screening of the *Mycobacterium* Mutants
WANG Chu-han, MA Peng-jiao, LUO Tao, BAO Lang[△]. Laboratory of Infection and Immunity, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: baolang@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a way for screening *Mycobacterium* mutants through adding the screening markers into pJV53. **Methods** The sucrose counter selection gene *SacB* and mutant hygromycin-resistant gene *hyg^S* were inserted into pJV53; The recovery of the hygromycin-resistance indicated the successful homologous recombination in *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*), which could serve as mutant screening marker; The sucrose counter selection could be used to screen the plasmid-free mutants. **Results** The recombinant plasmid pJV53-*SacB-hyg^S* were successfully constructed. The rifampin-resistant *rpoB* D516Y and *rpoB* H526Q mutants and MSMEG_4487 G188A mutant were efficiently screened out. All mutants had shed the plasmid successfully. **Conclusion** pJV53-*SacB-hyg^S* can efficiently contribute to construct and screen the mutants and to get the mutants shedding the plasmid self, which has high value of extensive application; the D516Y and H526Q mutations in gene *rpoB* of *Mycobacterium tuberculosis* contribute to its rifampin-resistance.

【Key words】 Plasmid optimization *Mycobacterium smegmatis* Mutant screening Plasmid shedding Rifampin resistance

同源重组是生物体内广泛存在的一种 DNA 损伤修复机制。利用同源重组可在微生物体内对其基因进行改变,现在已经成为微生物研究的一种基本方法。大肠杆菌原噬菌体 *Rac* 同源重组系统主要由 *RecE* 和 *RecT* 组成;*RecE* 为双链 DNA 核酸外切酶,能够从外源 DNA 的 5'端切除单核苷酸,暴露出 3' DNA 单链;*RecT* 为单链 DNA 结合蛋白,会与单链核苷酸段结合,在保护单链的同时,促进其与细菌基因组复制叉上的同源互补区结合;此类系统的引入极大提高了在大肠杆菌体内进行同源重组的效率^[1]。然而大肠杆菌的同源重组系统在分枝杆菌中并不适用^[2-3],为了提高对分枝杆菌的基因操作效

率,分枝杆菌噬菌体 Che9c 中 *RecE* 和 *RecT* 的同源体 gp60 和 gp61 被应用于分枝杆菌重组工程系统(pJV53)的构建,极大提高了分枝杆菌体内的同源重组效率^[4-6]。

在 pJV53 中,gp60 和 gp61 重组酶的表达受到乙酰胺酶启动子的控制,在用乙酰胺进行诱导的条件下,重组酶才会高效转录表达。然而由于存在启动子泄漏现象^[7],在未使用乙酰胺进行诱导的条件下,这些重组酶仍然有少量表达,可能会造成一些随机突变,增加研究的不确定性;另一方面,当前利用该系统进行分枝杆菌基因组点突变的研究大都为耐药相关变异^[8-9],相关目标菌株可通过抗生素培养基进行筛选,然而表型变化不明确的突变株却难以筛选。有研究^[10]显示,采用先进行基因敲除,再回补突变基因的方式进行筛选,此方法耗时费力。如

^{*} 国家传染病重大科技专项(No. 2012ZX10003008004)资助

[△] 通信作者, E-mail: baolang@scu.edu.cn

何高效筛选表型变化不明的突变株是一个亟待解决的问题。为此,本研究在 pJV53 上构建了蔗糖反筛选标记 *SacB* 以及带有终止密码突变的潮霉素抗性标记 *hyg^S*,较好的解决了表型变化不明的突变株筛选以及脱质粒的问题。同时也验证了结核分枝杆菌(Mtb)*rpoB* 基因突变 D516Y 和 H526Q 与该菌对一线抗结核药物利福平耐药的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pJV53、pSMT3 和 pGOAL19 由本实验保存;pUCm-T 载体购自上海生工;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根公司;耻垢分枝杆菌 *mc²155*(Ms)国际标准株由本实验室传代培养和保存。

1.1.2 主要试剂 *hyg^S* 和 *SacB* 引物、*rpoB* 点突变构建寡核苷酸链(分别命名为 RIF16 和 RIF26)、MSMEG_4487 点突变构建寡核苷酸链(命名为 oligo 4487)和纠正 *hyg^S* 终止密码突变寡核苷酸链(命名为 oligo *Hyg^R*)由上海生工合成;2 $\times$ Taq PCR Master Mix 购自诺唯赞公司;限制性内切酶 *Xba* I、*Spe* I、T4 DNA 连接酶购自赛默飞公司;质粒小提试剂盒购自天根公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工;7H9 液体培养基购自美国 BDdifo 公司, 7H10 固体培养基购自索莱宝公司;氨苄青霉素、卡那霉素、潮霉素、蔗糖和乙酰胺购自上海生工。

1.2 *SacB* 与 *hyg^S* 的扩增与构建

用 Primer 3.0 设计扩增 *SacB*(包括其启动子区)的引物, PF(5'-3'): GCTCTAGAGCGTTTTTATTTGTAACT, PR(5'-3'): GCTCTAGAGACCGGTGAGTCGTAAGGTC(下划线部分为 *Xba*I 酶切位点)。用 Primer 5.0 设计构建 *hyg^S*(包括其启动子区)的引物, UPPF(5'-3'): CGGACTAGTAAGCAGCAGATTACGCGCAGA;UPPR(5'-3'): CAGGCTCGCGTAGGACTACTACGAATCAATACGGTCG; DownPF(5'-3'): CGACCGTATTGATTCGTAAGTATCCTACGCGAGCCTG; DownPR(5'-3'): CGGACTAGTACCACCCTGGAGGAGATGAT(下划线部分为 *Spe* I 酶切位点, 双下划线部分为终止密码突变)。pGOAL19 作为模板 PCR 扩增 *SacB*;pSMT3 作为模板,重叠延伸 PCR 构建 *hyg^S*;产物连接到 pUCm-T 载体上,再转化 DH5 α ,提取质粒,送上海生工测序,测序结果用

Geneious R9 软件进行比对分析。酶切 T 载体,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收基因片段。

1.3 重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S* 的构建与鉴定

pJV53-*sacB hyg^S* 构建示意图见图 1。用限制性内切酶 *Spe* I 对 pJV53 进行酶切,然后以 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收酶切产物。T4 DNA 连接酶连接回收 *hyg^S* 片段与质粒,并转化 DH5 α 。用含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板筛选培养,通过菌落 PCR 挑选出阳性菌落扩菌,提取质粒,*Spe* I 酶切后,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。再用 *Xba* I 对以上获得的 pJV53-*hyg^S* 进行酶切处理,然而以相同的方法将片段 *SacB* 构入 pJV53-*hyg^S* 并进行菌落 PCR 筛选和 *Xba* I 酶切验证(*Xba* I 酶切 pJV53-*SacB* 为对照),最终获得重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S*。

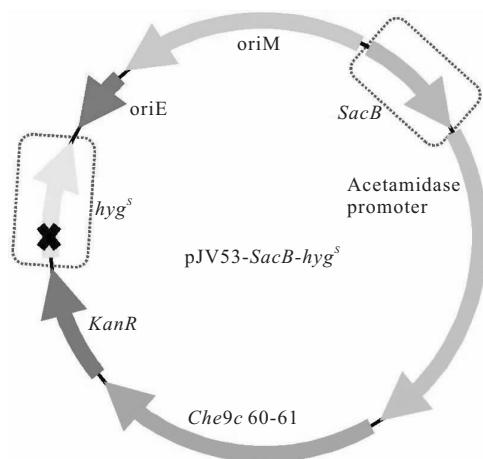


图 1 pJV53-*SacB-hyg^S* 构建示意图

Fig 1 The construction scheme of pJV53-*SacB-hyg^S*. The mutant hygromycin-resistant marker *hyg^S* and the sucrose counter selection marker *SacB* were constructed into pJV53

1.4 构建 pJV53-*SacB-hyg^S* 重组菌

首先制备 Ms 感受态细胞:将野生饱和菌液转至冰上,冰浴 30 min,4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 10 min 后收集全部菌体,用 4 $^{\circ}$ C 预冷灭菌 10%甘油重复洗涤 4 次,最后重悬于菌液 1/20 体积 4 $^{\circ}$ C 10%甘油中。然后进行重组质粒的电转化:将获得的重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S* 与感受态细胞混匀,冰上孵育 30 min,转入电转杯中,在 2.5 kV、50 μ F、700 Ω 条件下进行电转化,用含 25 μ g/mL 卡那霉素的 7H10 固体培养基筛选 pJV53-*SacB-hyg^S* 重组菌(Ms_pJV53-*SacB-hyg^S*)。

1.5 潮霉素抗性的恢复以及突变株的构建

用 Geneious R9 设计突变构建寡核苷酸链

(oligo) oligo Hyg^R: AATCCCTGTTACTTCTCG ACCGTATTGATTCGGATGATTCCTACGCGA GCCTGCGGAA; RIF16: CGACAGCGGGTTGTT CTGGTACATGAACTGCGACAGCTGGCTGGT GCCGAAGAACTC, RIF26: GGGGCCAGCGCC GAAAGACGACGCTTCTGGGTCAGACCCGAC AGCGGGTTGTTCTG; oligo 4487: GCCACCGC GGGCGTCGTCGACACGTTGCACACCGACACC GGTGAGTCGGTGTACCGC(双下划线部分为突变点); 用 primer 3.0 设计测序引物: rif F(5'-3'): TGATCAACATCCGTCCCGTC; rif R (5'-3'): AGGTAGTCGATCTGGTCGGT(检测 RIF16 与 RIF26 所构建突变); 4487F(5'-3'): CAGGAGC TGCACGACGAG; 4487R(5'-3'): CAGGTCTCG ACGTCACCG(检测 oligo 4487 所构建突变); 将 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 接种于含 25 μg/mL 卡那霉素的 7H9 培养基中, 培养至光密度(optical density, OD)OD₆₀₀ 值约为 0.4, 添加乙酰胺溶液使其终浓度达到 0.2%, 然后诱导培养 4 h。按上述方法制备 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 并将 10 μmol/L oligo Hyg^R 10 μL 电转入 200 μL 感受态中, 铺板含 100 μg/mL 潮霉素的 7H10 固体培养基, 观察细菌生长状况。将 10 μL 100 μmol/L RIF16 和 RIF26 分别电转入 200 μL Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 铺板含 30 μg/mL 利福平的 7H10 固体培养基; 将 10 μL 100 μmol/L oligo 4487 和 5 μL 10 μmol/L oligo Hyg^R 共电转入 200 μL Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 铺板含 100 μg/mL 潮霉素的 7H10 固体培养基; 37 °C 培养, 菌落用煮沸法提取基因组作为模板, PCR 扩增突变所在片段, 产物送上海生工测序, 测序结果用 Geneious R9 软件进行比对分析。计数并观察以下指标。耐药克隆数: 每转化 100 μmol RIF16、RIF26、oligo Hyg^R 在含有相应抗生素平板上所得到的克隆数; 通过测序得耐药克隆中点突变克隆所占比例(M/R); 估计点突变克隆数: 根据 M/R 估计, 每转化 100 μmol RIF16、RIF26、oligo 4487 所能得到的突变克隆数。

1.6 蔗糖反筛选验证及突变株反筛选

制备 50% 蔗糖溶液, 过滤除菌后, 加入含卡那霉素(25 μg/mL)的 7H10 固体培养基中制成含 15% 蔗糖的固体培养基。收集 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 与 pJV53 重组菌(Ms_pJV53), 用含 25 μg/mL 卡那霉素的 7H9 制备单细胞悬液, 再将悬液 OD₆₀₀ 调至 0.5, 稀释至 10⁻⁴ 倍后, 取 100 μL 菌液, 分别铺

于含 15% 蔗糖和不含蔗糖的卡那霉素固体培养基, 37 °C 培养, 观察细菌生长状况。挑选测序验证的突变株 Z9、Z10、R16、R26 分别于 7H9 液体培养基中培养 24 h, 每 24 h 传一代, 共传 3 代。分别取第 3 代菌液 1 mL, 在不含抗生素的 15% 蔗糖 7H0 固体培养基上按上述方法进行蔗糖反筛选实验。之后在同一菌落上挑菌, 接种 7H9 液体培养基和含有 25 μg/mL 卡那霉素的 7H9 液体培养基培养 24 h, 观察细菌的生长状况。

2 结果

2.1 SacB 扩增和构建 hyg^S

PCR 扩增 *SacB*, 目的片段大小约 1 716 bp, 未见非特异性扩增带, 与基因 *SacB*(包括其启动子区) 大小一致。重叠延伸 PCR 构建带有终止密码突变的基因片段 *hyg^S*, 电泳结果显示, 目的片段大小约 1 626 bp, 未见非特异性扩增带, 与潮霉素抗性基因 *hyg^R*(包括其启动子区) 大小一致, 表明上下游片段重叠延伸成功; 测序结果显示带有终止密码突变的 *hyg^S* 构建成功(图 2)。

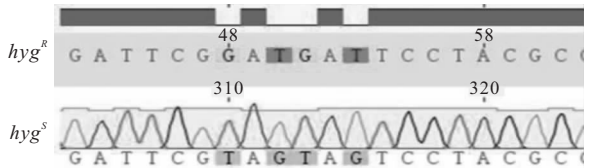


图 2 重叠延伸 PCR 产物 *hyg^S* 测序结果比对
Fig 2 The sequencing and alignment of SOE-PCR product *hyg^S*

2.2 构建 pJV53-*SacB-hyg^S* 重组质粒

重组质粒 pJV53-*hyg^S* 转化进 DH5α 后, 筛选出阳性克隆(图 3A); 质粒酶切验证, *Spe* I 共酶切出两条大小约为 8 801 bp、1 626 bp 的条带, 分别与 pJV53、*hyg^S* 大小一致, 标志着重组质粒 pJV53-*hyg^S* 构建成功(图 3B)。以 pJV53-*hyg^S* 为载体, 经酶切和连接得到的重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S* 转化进 DH5α 后, 筛选出阳性克隆(图 3C); 酶切验证, *Xba* I 共切出两条大小约为 10 427 bp 和 1 716 bp 的条带, 分别与 pJV53-*hyg^S* 以及 *SacB* 大小一致, 标志着重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S* 构建成功(图 3D)。

2.3 潮霉素抗性恢复验证及点突变株的构建

将 oligo Hyg^R 转化乙酰胺诱导的 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 涂含有 100 μg/mL 潮霉素的

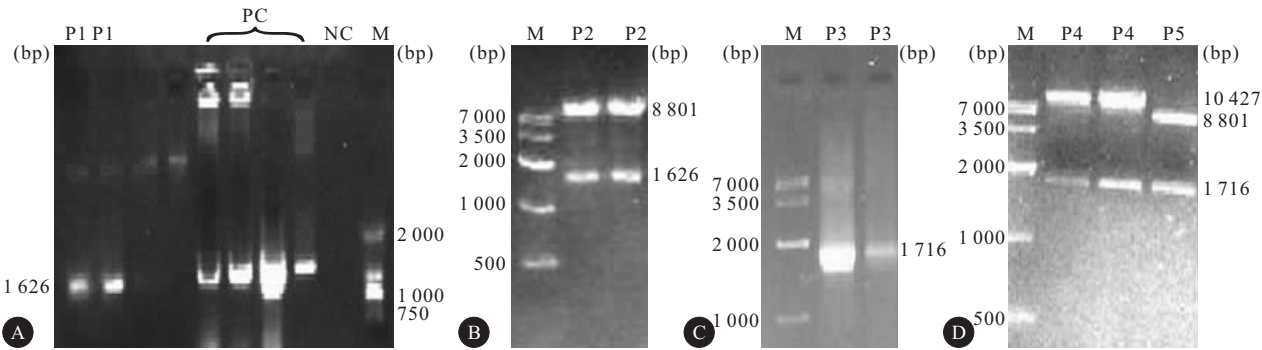


图 3 重组质粒 pJV53-*SacB-hyg^S* 的构建

Fig 3 The construction of the recombinant plasmid pJV53-*SacB-hyg^S*

M: DNA marker; PC: Positive control; NC: Negative control; P1: The colony PCR product of pJV53-*hyg^S*; P2: The *Spe* I digestion product of pJV53-*hyg^S*; P3: The colony PCR product of pJV53-*SacB-hyg^S*; P4: The *Xba* I digestion product of pJV53-*SacB-hyg^S*; P5: The *Xba* I digestion product of pJV53-*SacB*

7H10 培养基, 耐药克隆长出, 表明潮霉素抗性标记构建成功。将 RIF16、RIF26 转化经乙酰胺诱导的 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 涂板含 30 μg/mL 利福平的 7H10 培养基; 将 oligo 4487 与 oligo Hyg^R 共转化经乙酰胺诱导的 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 感受态, 涂板含 100 μg/mL 潮霉素的 7H10 培养基。耐药克隆突变率见表 1。培养基上均长出耐药克隆, 测序结果证明(图 4), 所构建突变成功。

2.4 *SacB* 的功能验证及突变株反筛选

蔗糖反筛选结果显示(图 5), Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 和 Ms_pJV53 在不含蔗糖, 含 25 μg/mL 卡那霉素的培养基上都生长良好; Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* 却几乎无法在含 15% 蔗糖、25 μg/mL 卡那霉素的培养基上生长, 而 Ms_pJV53 在含 15% 蔗糖、25 μg/mL 卡那霉素的培养基上的生长基本不受影响, 表明 *SacB* 基因在 Ms 体内成功表达, 且起到了

有效的反筛选作用。突变株 Z9、Z10、R16、R26 在 7H9 中均生长良好, 在含有 25 μg/mL 卡那霉素的 7H9 中均不生长。表明所挑取突变株已经成功脱去重组质粒。

表 1 耐药克隆突变率

Table 1 The mutant rate of the specific antibiotic-resistant colonies

Item	Numbers of drug-resistant colonies ^a	M/R ^b	Estimated numbers of point mutant colonies ^c
RIF16	6.1	100%	6.1
RIF26	2.0	100%	2.0
Oligo Hyg ^R + oligo 4487	42	20%	8.4

a: The colony number recovered following transformation with 100 μmol RIF16, RIF26, oligo Hyg^R on the culture media containing the specific antibiotic; b: The point mutant ratio in the specific antibiotic-resistant colonies; c: The point mutant colony number following transformation with 100 μmol RIF16, RIF26, oligo 4487 according to the M/R

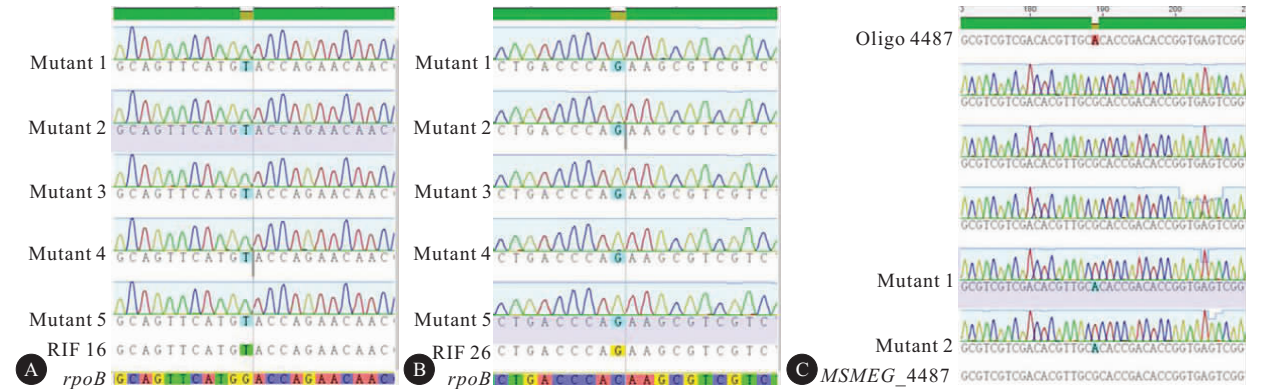


图 4 耐药克隆的测序结果

Fig 4 Sequencing results of specific antibiotic-resistant colonies

A: *rpoB* D516Y mutation; B: *rpoB* H526Q mutation; C: *MSMEG_4487* G188A mutation

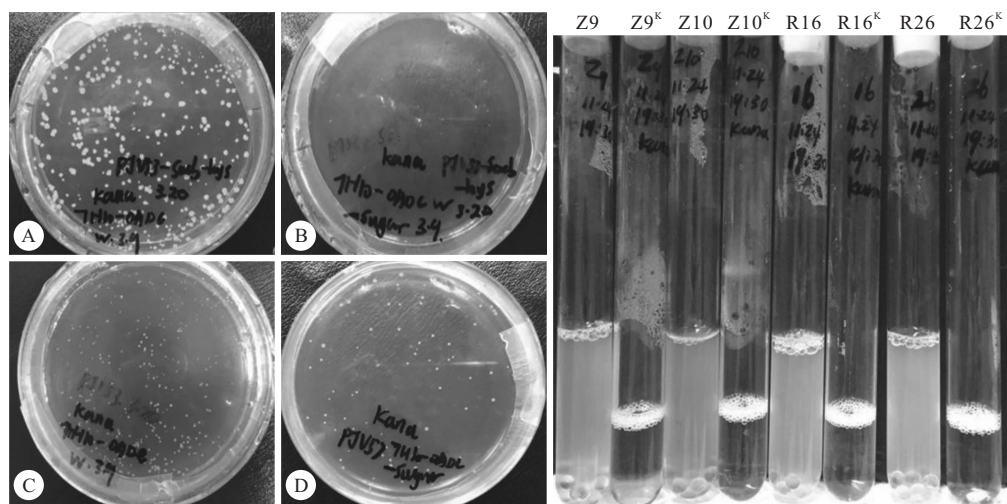


图 5 Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* (A,B) 和 Ms_pJV53 (C,D) 在蔗糖 (B,D) 与非蔗糖 (A,C) 培养基上生长情况;反筛选突变株在 7H9 与含 25 µg/mL 卡那霉素的 7H9 中的生长比较

Fig 5 The growth of Ms_pJV53-*SacB-hyg^S* (A,B) and Ms_pJV53 (C,D) on sucrose-free (A,C) and sucrose (B,D) culture media; The growth comparison of the mutants in 7H9 and 7H9 containing 25 µg/mL kanamycin after counter selection. K: 7H9 containing 25 µg/mL kanamycin

3 讨论

分枝杆菌由于普遍生长缓慢,外源 DNA 摄取率低,且胞内随机重组率高,较难在其体内进行基因操作。随着分枝杆菌噬菌体研究进入基因组时代,迄今为止已发现超过 15 万个分枝杆菌噬菌体基因,为我们进一步理解与操控分枝杆菌提供了大量资源^[11]。其中大肠杆菌重组系统 Rac 和 λRed 系统的同源体 gp60、gp61 被发现,并被用于构建分枝杆菌同源重组系统,极大提高了分枝杆菌体内的同源重组率^[4],甚至在一些条件下使用该系统,短寡核苷酸链(50~100 nt)的重组率能与 λRed 在大肠杆菌中的重组率持平^[2],极大方便了对分枝杆菌的基因进行操作。在此基础上,为了进一步利用此同源重组系统构建筛选表型变化未知的突变株,并在成功构建突变后,筛选出脱去该重组系统的突变株,以方便对突变株进行研究或做进一步的基因操作。本研究在分枝杆菌同源重组系统 pJV53 上成功构建了带有终止密码突变的潮霉素抗性标记 *hyg^S* 以及蔗糖反筛选标记 *SacB*。

基因 *SacB* 编码果聚糖蔗糖酶,能够将蔗糖分解后的果糖聚合为果聚糖,累积在分枝杆菌的周质导致细菌裂解死亡^[12-14]。由于质粒在菌体内也并非稳定存在^[15],所以本实验在 pJV53 质粒上加入了 *SacB*,可以在蔗糖固体培养基上对脱去质粒的细菌进行筛选。实验证明构入的 *SacB* 在 Ms 体内成功

表达,并能有效的抑止 Ms 在含 15% 蔗糖的固体培养基上生长;之后利用 *SacB* 也成功筛选到了脱去 pJV53-*SacB-hyg^S* 的突变株。在利用乙酰胺诱导 pJV53-*SacB-hyg^S* 的重组酶 gp60、gp61 表达后,转入能够纠正 *hyg^S* 上终止密码突变的短寡核苷酸链 oligo Hyg^R, Ms 即获得了潮霉素抗性,表明 oligo Hyg^R 在 *hyg^S* 上重组成功。因此细菌潮霉素抗性的获得即可作为菌体内发生成功重组的标志。以上实验也说明 *SacB* 与 *hyg^S* 能在 Ms 中发挥筛选功能,且不影响重组工程系统的功能。

分枝杆菌的 *rpoB* 基因编码了 RNA 聚合酶的 β 亚基,是一线结核病治疗药物利福平的作用靶标^[16], Mtb 常在 *rpoB* 基因耐药决定区 (RRDR) 上积累突变从而获得对利福平的耐药性^[17-18]。然而,该区域内的部分变异与利福平的耐药关系仍存在争议,如 H526Q^[19]。为了验证突变对 Mtb 对利福平敏感性的影响,本研究利用 pJV53-*SacB-hyg^S* 在 Ms *rpoB* 的 RRDR 内构建了相应突变,结果证明突变 *rpoB* D516Y 和 *rpoB* H526Q 确实赋予了 Ms 对利福平的耐药性;高效的突变率也证明 *SacB* 和 *hyg^S* 的插入并未影响重组工程系统在细菌基因组发挥同源重组的功能。

MSMEG_4487 是 Mtb 基因 *Zur* 的同源基因, *Zur* 编码了锌离子依赖的 DNA 结合蛋白,在 Mtb 中调节了许多锌、铁等必要微量元素摄取相关基因的表达^[20-21]。序列比对分析表明 Mtb 在进化过程

中获得了 *Zur* G191A 的突变,提示该突变可能在 *Mtb* 与机体共进化适应机体压力环境的过程中扮演了重要的作用。所以本研究决定模拟构建相应突变 *MSMEG_4487* G188A。利用在 *pJV53-SacB-hyg^S* 中构建的 *hyg^S*,将能够纠正 *hyg^S* 上终止密码突变的短寡核苷酸链 oligo *Hyg^R* 与突变构建短寡核苷酸链 oligo 4487 共转化经乙酰胺诱导的 *Ms_pJV53-SacB-hyg^S* 感受态后,在潮霉素抗性恢复的菌落(也意味着在这些细菌体内有很高的概率发生了有效重组)高效筛选到了目标突变株,为研究此突变所带来的影响奠定了基础。

综上所述,*Mtb* 突变 *rpoB* D516Y 和 *rpoB* H526Q 与其对利福平的耐药有关,*MSMEG_4487* G188A 突变株的高效筛选则证明在 *pJV53* 上构建带有终止密码突变的潮霉素抗性标记 *hyg^S* 和蔗糖反筛选标记 *SacB* 能够有效的帮助筛选表型变化不明的突变株,并对突变株进行脱质粒操作,具有普遍的应用价值。

参 考 文 献

- [1] COURT D L, SAWITZKE J A, THOMASON L C. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*,2002,36:361-388[2018-11-27]. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.061102.093104>.
- [2] VAN KESSEL J C, HATFULL G F. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol Microbiol*,2008,67(5):1094-1107.
- [3] HATFULL G F, PEDULLA M L, JACOBS-SERA D, *et al.* Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet*,2006,2(6): e92[2018-12-04]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020092>.
- [4] VAN KESSEL J C, HATFULL G F. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods*,2007,4(2):147-152.
- [5] VAN KESSEL J C, HATFULL G F. Mycobacterial recombineering. *Methods Mol Biol*, 2008, 435: 203-215 [2018-12-04]. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-59745-232-8_15. doi: 10.1007/978-1-59745-232-8_15.
- [6] VAN KESSEL J C, MARINELLI L J, HATFULL G F. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol*,2008,6(11):851-857.
- [7] HUANG L, YUAN Z, LIU P, *et al.* Effects of promoter leakage on dynamics of gene expression. *BMC Syst Biol*, 2015,9:16[2018-12-04]. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0157-z>.
- [8] RAJU A, KULKARNI S, RAY M K, *et al.* E84G mutation in dihydrofolate reductase from drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mumbai, India) leads to

- increased interaction with Trimethoprim. *Int J Mycobacteriol*,2015,4(2):97-103.
- [9] NEBENZAHL-GUIMARAES H, JACOBSON K R, FARHAT M R, *et al.* Systematic review of allelic exchange experiments aimed at identifying mutations that confer drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*,2014,69(2):331-342.
 - [10] KHAN M Z, BHASKAR A, UPADHYAY S, *et al.* Protein kinase G confers survival advantage to *Mycobacterium tuberculosis* during latency-like conditions. *J Biol Chem*, 2017,292(39):16093-16108.
 - [11] HATFULL G F. Mycobacteriophages. *Microbiol Spectr*, 2018,6(5) [2018-12-04]. <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018>. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018.
 - [12] PELICIC V, REYRAT J M, GICQUEL B. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*,1996,178(4):1197-1199.
 - [13] JACKSON M, REINALDO CAMACHO L, GICQUEL B, *et al.* Gene replacement and transposon delivery using the negative selection marker *sacB*. *Methods Mol Med*,2001,54: 59-75[2018-12-05]. <https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7>;059.
 - [14] MENDEZ-LORENZO L, PORRAS-DOMINGUEZ J R, RAGA-CARBAJAL E, *et al.* Intrinsic Levanase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (*SacB*). *PLoS One*,2015,10(11):e0143394[2018-12-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143394>.
 - [15] SATYAGAL V N, AGRAWAL P. Modeling the behavior of plasmid-harboring cells in nonselective media. *Biotechnol Bioeng*,1989,34(2):265-272.
 - [16] MILLER L P, CRAWFORD J T, SHINNICK T M. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*,1994,38(4):805-811.
 - [17] HORNG Y T, JENG W Y, CHEN Y Y, *et al.* Molecular analysis of codon 548 in the *rpoB* gene involved in *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*,2015,59(3):1542-1548.
 - [18] SRIVASTAVA G, TRIPATHI S, KUMAR A, *et al.* Molecular insight into multiple *RpoB* clinical mutants of *Mycobacterium tuberculosis*: an attempt to probe structural variations in rifampicin binding site underlying drug resistance. *Int J Biol Macromol*,2018,120(Pt B):2200-2214.
 - [19] JAMIESON F B, GUTHRIE J L, NEEMUCHWALA A, *et al.* Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2014,52(6):2157-2162.
 - [20] MACIAG A, DAINESE E, RODRIGUEZ G M, *et al.* Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis Zur* (*FurB*) regulon. *J Bacteriol*,2007,189(3):730-740.
 - [21] SERAFINI A, BOLDRIN F, PALU G, *et al.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *J Bacteriol*,2009,191(20):6340-6344.

(2019-03-13 收稿,2019-06-15 修回)

编辑 沈 进