

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.12.002

• 基础研究 •

## 变异链球菌 hit 基因缺陷菌株的构建

赖扬帆<sup>1</sup>, 王鹏<sup>1</sup>, 乔里<sup>2</sup>, 刘中静<sup>2</sup>, 叶朝阳<sup>2</sup>, 梁燕<sup>1</sup>

1. 贵州医科大学附属医院口腔医院牙体牙髓科, 贵州 贵阳(550004); 2. 贵州医科大学附属医院临床医学研究中心, 贵州 贵阳(550004)

**【摘要】** 目的 构建 hit 基因缺陷型变异链球菌并验证其细胞周期调控的功能。方法 从变异链球菌 ATCC25175 中提取基因组 DNA, 采用 PCR 扩增技术, 将 hit 基因上下游片段克隆到 pFW5 质粒(壮观霉素抗性)上以构建重组质粒; 利用该菌株天然遗传转化机制, 将线性化重组质粒转入由其感受刺激多肽(competence stimulating peptide, CSP)刺激产生变异链球菌感受态中, 进行同源重组; 再通过壮观霉素抗性筛选, 结合 PCR 产物电泳和 Sanger 法测序, 筛选鉴定 hit 基因缺陷型变异链球菌株; 最后在 BHI 培养基中培养, 检测其生长速率。结果 从 ATCC25175 变异链球菌基因组 DNA 中, 克隆 hit 基因上游约 856 bp、下游约 519 bp 片段到 pFW5 质粒的两个多克隆位点区间(MCS-I 和 MCS-II), 经双酶切和 PCR 测序鉴定, 得到重组质粒 pFW5\_hit\_Up\_Down。线性化该重组质粒, 转入由 CSP 刺激产生变异链球菌感受态中进行同源重组; 再通过壮观霉素 BHI 培养基多次抗性筛选, hit 基因片段的 PCR 产物电泳和 Sanger 测序筛选出 hit 基因缺陷变异链球菌株, 该缺陷菌株较其亲本菌株生长更快速( $P < 0.001$ )。结论 获得具有遗传性状 hit 基因缺陷变异链球菌株, hit 基因产物调控变异链球菌生长周期。

**【关键词】** 变异链球菌; hit 基因; pFW5 质粒; 天然遗传转化; 同源重组; hit 基因缺陷突变菌株; 细菌生长; 周期调控

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)12-0801-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

**【引用著录格式】** 赖扬帆, 王鹏, 乔里, 等. 变异链球菌 hit 基因缺陷菌株的构建[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(12): 801-808. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.12.002.

**Construction of the hit-deficient mutant strain of *Streptococcus mutans* ATCC25175** LAI Yangfan<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, QIAO Li<sup>2</sup>, LIU Zhongjing<sup>2</sup>, YE Zhaoyang<sup>2</sup>, LIANG Yan<sup>1</sup>. 1. Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Clinical Research Center (Affiliated Hospital), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Corresponding author: LIANG Yan, Email: 519573688@qq.com, Tel: 86 - 13608521661; YE Zhaoyang, Email: yezy@gmc.edu.cn, Tel: 86-13621392273

**【Abstract】** **Objective** To construct a hit-deficient mutant strain of *S. mutans* ATCC25175 and verify its cell cycle regulatory function. **Method** Genomic DNA was extracted from *S. mutans* ATCC25175 strains, and then the upstream and downstream DNA fragments of the hit gene were cloned into the pFW5 vector (spectinomycin resistant) to construct recombinant plasmids using PCR amplification. Third, employed by natural genetic transformation in *S. mutans* ATCC25175 strains, the linearized recombinant plasmids were transformed into their genetic competence, induced by the synthesized competence-stimulating peptide (CSP), and then, homologous recombination was utilized to produce crossover and noncrossover products. Fourth, the hit-deficient mutant strains of *S. mutans* ATCC25175 were screened through the spectinomycin-resistance marker and identified by the electrophoresis of PCR products and PCR Sanger se-

**【收稿日期】** 2021-02-02; **【修回日期】** 2021-04-23

**【基金项目】** 贵州省科学技术基金项目(ZK[2021]438); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwjkj2019-1-172)

**【作者简介】** 赖扬帆, 医师, 硕士研究生, Email: 1392559217@qq.com

**【通信作者】** 梁燕, 主任医师, 硕士, Email: 519573688@qq.com, Tel: 86-13608521661; 叶朝阳, 副教授, 博士, Email: yezy@gmc.edu.cn, Tel: 86-13621392273

quencing. Finally, its growth rate in vegetative BHI medium was also investigated. **Results** The upstream (856 bp) and downstream (519 bp) DNA fragments of the hit gene from the genomic DNA materials of *S. mutans* ATCC25175 were cloned into two multiple cloning sites (MCS-I and MCS-II) of the pFW5 vector, respectively, and the recombinant plasmid pFW5\_hit\_Up\_Down was constructed and identified by double-enzyme digestion and PCR Sanger sequencing. The linearized recombinant plasmids were transformed into their genetic competence, induced by the synthetic CSP, and then, homologous recombination was utilized to produce various products. The hit-deficient mutant strains of *S. mutans* ATCC25175 were screened through the spectinomycin resistance marker and identified by the electrophoresis of PCR products and Sanger sequencing. The growth rate of the hit-deficient mutant strains *versus* their parental *S. mutans* ATCC25175 strains was increased greatly ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The hit-deficient mutant strains of *S. mutans* ATCC25175, having heritable traits, were successfully constructed, and the encoding Hit protein is growth-phase regulated in the cell cycle.

**[Key words]** *Streptococcus mutans*; hit gene; pFW5 vector; natural genetic transformation; homologous recombination; hit-deficient mutant strain; cell growth; cell-cycle regulation

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(12): 801-808.**

**[Competing interests]** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Guizhou Science and Technology Fund (No. ZK[2021]438); Guizhou Health Science and Technology Fund (No.gzwjkj2019-1-172).

作为人类口腔中的主要致龋菌,变异链球菌大量繁殖形成牙菌斑生物膜附着在牙齿表面,其代谢形成局部酸环境长期作用于牙齿导致其脱矿,进而发生龋病<sup>[1]</sup>。目前对于变异链球菌基因功能研究仍主要集中在与其致龋性相关的生物膜形成、产酸耐酸“毒力因子”及其调控基因方面,如直接毒力侵染因子糖基转移酶(glucosyltransferases, GTFs)和葡聚糖结合蛋白(glucna-binding proteins, GBPs)。SMU.833糖基转移酶通过影响葡聚糖合成进而影响生物膜形成<sup>[2]</sup>,SMU.940则调控葡聚糖结合蛋白C表达来影响生物膜形成<sup>[3-4]</sup>。变异链球菌胞壁(被膜)相关基因不仅可调控胞壁生物合成、细菌生长、分裂繁殖,也间接与致龋生物膜形成、产酸耐酸密切相关,如编码鼠李糖-葡萄糖胞壁多糖合成酶(rhamnose-glucose polysaccharide G, rgpG),编码生物膜调控蛋白(biofilm regulatory protein A, brpA)和编码青霉素结合蛋白5合成抑制蛋白(penicillin-sensitive repressor protein, psr)基因,当三者同时突变时,与标准株相比,三缺陷菌(rgpG/ brpA/psr)不仅显著降低生长速率,还加剧菌体分裂“紊乱”形态(“短杆状”菌体“肿胀”变大,出现多重非对称中间隔),严重影响生物膜形成<sup>[5]</sup>。

变异链球菌基因组中, hit 基因编码 HIT 家族蛋白 SMU.412c, 且该基因与 brpA (lytR) 基因邻近<sup>[6]</sup>。同时,生物信息学分析表明, HIT 家族蛋白广泛存在于原核生物、真核生物、哺乳类动物,而

且高度保守,具有重要生理功能<sup>[7]</sup>。hit 基因是否可以调控变异链球菌增殖及生长周期尚不清楚。本研究利用基因同源重组方法敲除变异链球菌 ATCC25175 标准株 hit 基因片段,构建 hit 基因缺陷菌株,为后续研究变异链球菌 hit 基因与上述 brpA、psr 和 rgpG 等基因间互相作用,及其在变异链球菌生长繁殖以及生物膜形成、产酸耐酸等致龋性方面研究提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

BHI (brain heart infusion) 培养基(杭州百思生物技术有限公司,中国); LB (Luria-Bertani) 培养基(OXOID 公司,英国); 壮观霉素(上海生工生物工程股份有限公司,中国); 十六烷基三甲基溴化铵(北京索莱宝科技有限公司,中国); 限制性内切酶[宝生物技术(大连)有限公司,中国]; 质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司,中国); 普通 DNA 产物纯化回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司,中国); DNA maker (北京全式金生物技术有限公司,中国); 厌氧产气袋(三菱集团,日本); 质粒 pFW5 (上海沪震公司,中国); 变异链球菌 ATCC25175 (NCTC10449) 标准株(北京中科质检生物技术有限公司,中国)。

### 1.2 菌株及培养条件

变异链球菌 ATCC25175 (NCTC10449) 标准株

(类型: *Streptococcus mutans* Clarke, 来源: 牙本质龋)培养条件: ①培养基是BHI脑心浸出液肉汤, 3.7 g/100 mL液体或1%琼脂粉培养基, 按121 °C/0.1 MPa灭菌20 min; ②37 °C, 厌氧孵育, 静置(或小摇床200 rpm)培养24~48 h。

大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$  (本实验室保存菌种)培养条件: ①培养基: LB液体或1% (w/v) 琼脂固体培养基; ②37 °C孵育静置(或小摇床220 rpm)培养过夜。

### 1.3 变异链球菌全基因组DNA提取

取变异链球菌ATCC25175甘油菌种, 室温复苏, 划线接种于BHI固体培养板, 37 °C厌氧培养48 h, 挑取单克隆菌斑, 接种于BHI液体培养基, 24 h后取出, 菌液离心后收集菌体, 用CTAB法提取基因组DNA, -20 °C保存备用。

### 1.4 基因扩增引物

变异链球菌ATCC25175标准株基因组全序: NCBI Reference Sequence: NZ\_LS483349.1, 大小为2 019 343 bp, 其hit基因大小为420 bp; 本课题研究hit基因上下游序列范围为: 1664202~1665870, 大小为1 669 bp。质粒载体pFW5序列: GenBank, ACCESSION: U41082, 大小为2 726 bp<sup>[8]</sup>, 由上海沪震公司提供测序报告, 利用生物软件Primer Pre-

mier 5.00设计相关PCR扩增引物序列, 如表1所示。以提取的变异链球菌基因组DNA为模板, 配制PCR反应扩增液, 进行PCR反应, 然后用1% (wt/vol) 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.5 重组质粒pFW5(hit-Up-pFW5-Down)构建

配制双酶切反应液, 将hit基因上游片段与载体pFW5质粒进行双酶切, 37 °C酶切反应3~6 h, 酶切产物使用普通DNA产物纯化试剂盒进行纯化, 再分别检测pFW5质粒与hit上游片段双酶切后的浓度。

根据T4 DNA Ligase产品说明书, 配置pFW5质粒与hit基因上游片段连接反应液。连接后的产物热激转入DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 涂布于Spe<sup>+</sup> (0.1 mg/mL) 抗性LB固体培养基圆板, 37 °C倒置静置过夜培养, 提取阳性单克隆菌斑质粒。同样的方法再将hit基因下游片段插入已构建好的质粒中, 获得hit基因缺陷重组质粒(编号为20#和141#)。在pFW5载体的两个多克隆位点区(MCS-I和MCS-II)前后, 设计了pFW5(PCR)两对引物(pFW5-F/pFW5-R1和pFW5-F1/pFW5-R, 见表1), 对20#、141#及对照空质粒pFW5进行PCR扩增双酶切鉴定, 挑选出正确大小的质粒送检测序。测序结果在NCBI上进行Blast对比拼接。

表1 实验所用引物及其序列

Table 1 Primers and sequences used in the experiment

| Primers   | Sequence (5'-3')                                                                                                                            |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hit(Up)   | F: CCGCTCGAGTCAACCCTCTTTAGTCAAAGTCATAT(XhoI)<br>R: CCCAAGCTTGTCTCCTATAAACTTTTGATAGAGGAATGT(HindIII)                                         |
| hit(Down) | F: GGAATTCCATATGCCTGACTTTACCCGTCTTGACAAT(NdeI)<br>R: GGACTAGTAAATAAAAAATAAGGTGGAAGGGTAT(SpeI)                                               |
| pFW5(PCR) | F: AGGATGAGGAGGCAGATTGCCTTGAATAT<br>R1: ATTCTCTGACGAATCCATAATGGCTCTT<br>F1: ATATACGGAAATTATGACTTAGAGGAATT<br>R: CGCAGCGAGAAAAAGGCCCACTTTTGT |
| hit(PCR)  | F: CATGACGTTTCTTTCTAACTTTGATAT<br>R: GTTTGTAATACATCTGATAAAGACCGGCT                                                                          |

### 1.6 变异链球菌hit基因缺陷菌株的构建

选取变异链球菌ATCC25175标准株单克隆菌斑接种入BHI液体培养基, 培养至对数生长期, 抽取100  $\mu$ L菌液接种至2 mL BHI液体培养基, 继续培养2 h, 取300  $\mu$ L上述菌液加入2.4  $\mu$ L浓度为1 mg/mL的感受态刺激肽CSP溶液<sup>[9]</sup>, 轻轻混匀, 孵育0.5 h。

将单酶切线性化纯化后的hit-Up-pFW5-Down

质粒4  $\mu$ g加入到上述菌液中, 轻轻摇晃培养3 h后将菌液涂布于Spe<sup>+</sup> (0.1 mg/mL) 抗性的BHI培养板培养48 h。选取阳性单克隆菌斑, 用CTAB法提取基因组, 送检测序。

### 1.7 变异链球菌hit基因缺陷菌株遗传稳定性

将构建成功的变异链球菌hit基因缺陷菌株提高壮观霉素质量分数(1 mg/mL)后多次传代, 提取基因组DNA, 再次送检测序。



## 1.8 变异链球菌 hit 基因缺陷菌株生长曲线测定

①甘油菌种经 BHI 固体培养基划线活化后,挑选单克隆菌斑接种于 BHI 液体培养基,厌氧培养约 20 h;取部分种子菌液,用无抗 BHI 培养基稀释到 0.5 麦氏比浊浓度,然后稀释 100 倍为工作菌液  $[(1 \sim 2) \times 10^6 \text{ CFU/mL}]$ 。②取 96 孔细胞培养板,其中每孔加入 180  $\mu\text{L}$  无抗 BHI 培养基和 20  $\mu\text{L}$  工作菌液,厌氧培养,监测其在 48 h 内  $\text{OD}_{600}$  值变化。设置三组平行实验,变异链球菌 ATCC25175 标准株进行生长对照。生长速率计算方法:生长速率  $= [(\text{OD}_{600})_t - (\text{OD}_{600})_0] / t$ 。

## 1.9 统计学分析

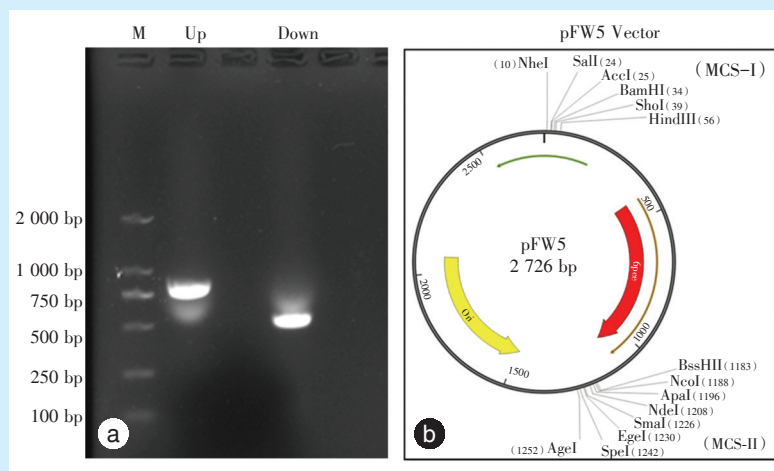
采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,定量资料服

从正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 hit 基因上下游片段扩增

以变异链球菌 ATCC25175 标准株基因组 DNA 为模板,分别利用 hit 上下游引物对,扩增 hit 基因上下游片段, hit 上游片段大小为 850 bp,下游片段大小为 519 bp。扩增产物经核酸电泳鉴定, hit 基因上下游扩增产物均为单一明亮条带,大小与预计大小相近(图 1a)。质粒载体 pFW5 有上下两个多克隆位点(MCS-I 和 MCS-II),两者被壮观霉素抗性基因 *aad9* 所分隔开(图 1b)。



a: DNA electrophoresis of PCR products of the upstream and downstream DNA fragments of the hit gene; M: marker; Up: the upstream DNA fragment of approximately 850 bp; Down: the downstream DNA fragment of approximately 500 bp; b: the vector pFW5 carries two multiple cloning sites, MCS-I and MCS-II, which are separated by the *aad9* spectinomycin-resistance gene sequence

Figure 1 Electrophoresis of PCR products of the upstream and downstream sequences of the hit gene and the circle map of the pFW5 vector  
图 1 hit 基因上游、下游片段 PCR 产物电泳和 pFW5 载体图

## 2.2 pFW5 重组质粒构建

重组质粒 20#和 141#PCR 扩增电泳结果如图 2a 所示。在 MCS-I 区插入 hit 基因上游片段部分 PCR 产物大小为 1 774 bp;在 MCS-II 区插入 hit 基因下游部分 PCR 产物为 1 078 bp,其对应空载体 pFW5 为 935 bp 和 571 bp,表明重组质粒上游部分插入约 800 bp 的 hit 基因上游片段和约 500 bp 的 hit 基因下游片段。

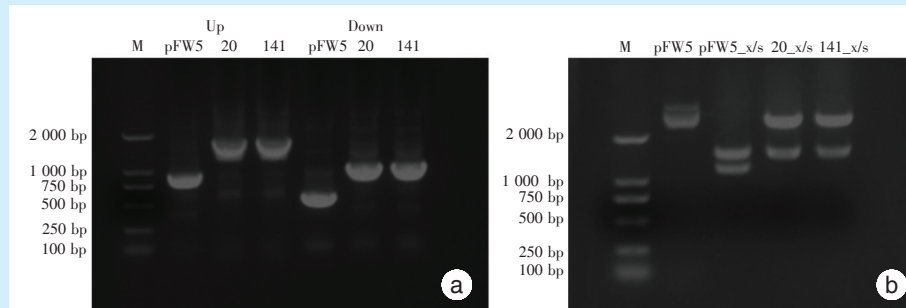
重组质粒 20#和 141#样品经 *XhoI* 和 *SpeI* 双酶切后电泳鉴定,未经酶切的空载体 pFW5 可见一条大小约 2 700 bp 明亮条带,与空载体大小相同;空载体 pFW5 经 *XhoI* 和 *SpeI* 双酶切后,两条带大小分别约为 1 500 bp 和 1 100 bp,符合预期大小;重组质粒 20#、141# 经过双酶切后呈现两条清晰的条带,大小分别约为 1 500 bp 和 2 500 bp,如图 2b 所示。

## 2.3 hit-Up-pFW5-Down 重组质粒测序

为了精准确定重组质粒克隆构建,将 pFW5 (hit-Up-pFW5-Down)重组质粒 20#、141# 送公司测序,并将样本测序结果在 NCBI 数据库里进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对和拼接。对比显示:上下游片段成功插入 pFW5 载体的 MCS-I 和 MCS-II 区间。变异链球菌 hit 基因缺陷重组质粒的连接顺序为:hit 基因上游片段、*Spe*<sup>+</sup> 抗性基因、hit 基因下游片段,以上片段以正确序列与 pFW5 质粒连接构成基因缺陷质粒。

## 2.4 变异链球菌 hit 基因缺陷菌株筛选

将重组质粒转入变异链球菌后随机选取阳性单克隆菌斑若干,提取基因组 DNA,进行 PCR 克隆鉴定,如图 3 所示。hit 基因片段的 PCR 产物样本电泳图中,都出现大小一致明暗不同的两条带,分别约为 1 400 bp 和 550 bp,提示 pFW5 重组质粒转



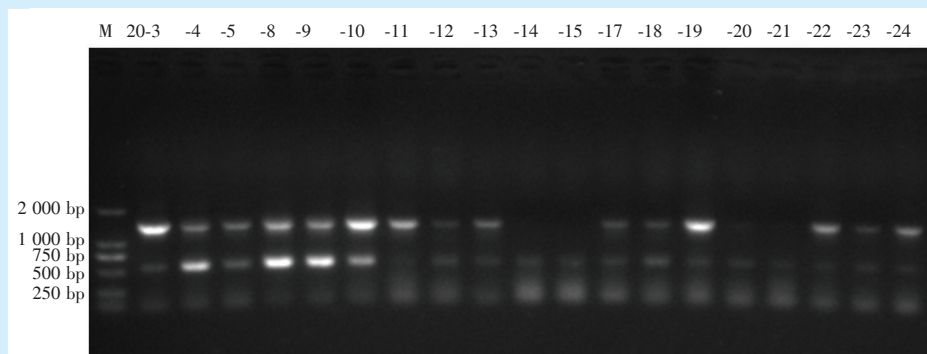
a: DNA electrophoresis of the PCR products of the MCS- I - and MCS- II - region DNA fragments of the recombinant plasmids pFW5 (20# and 141#); b: DNA electrophoresis of the products (20\_x/s and 141\_x/s) of the recombinant plasmids pFW5 (20# and 141#) digested by XhoI and SpeI. The pFW5 vector and pFW5\_x/s served as the control. M: Marker

Figure 2 Electrophoresis of PCR- and double digested-products of the recombinant plasmid pFW5

图2 重组质粒pFW5的PCR产物与其双酶切产物电泳

入变异链球菌 ATCC25175 标准株后,部分与标准株本身 hit 基因实现同源重组;同时,也存在转入未

被线性化重组质粒而又未实现同源重组菌株(菌斑显阳性,550 bp 条带明亮),如 20-8、20-9 样本。



Lanes 20-3, 20-4 to 20-24 correspond to 19 random positive colony forming units on an aad9 spectinomycin-resistant BHI agar plate, respectively

Figure 3 DNA electrophoresis of PCR products of the hit gene DNA fragments from the *Streptococcus mutans* genome of plasmid (20#) genetic transformation

图3 质粒(20#)遗传转化变异链球菌株基因组的 hit 基因片段 PCR 产物核酸电泳

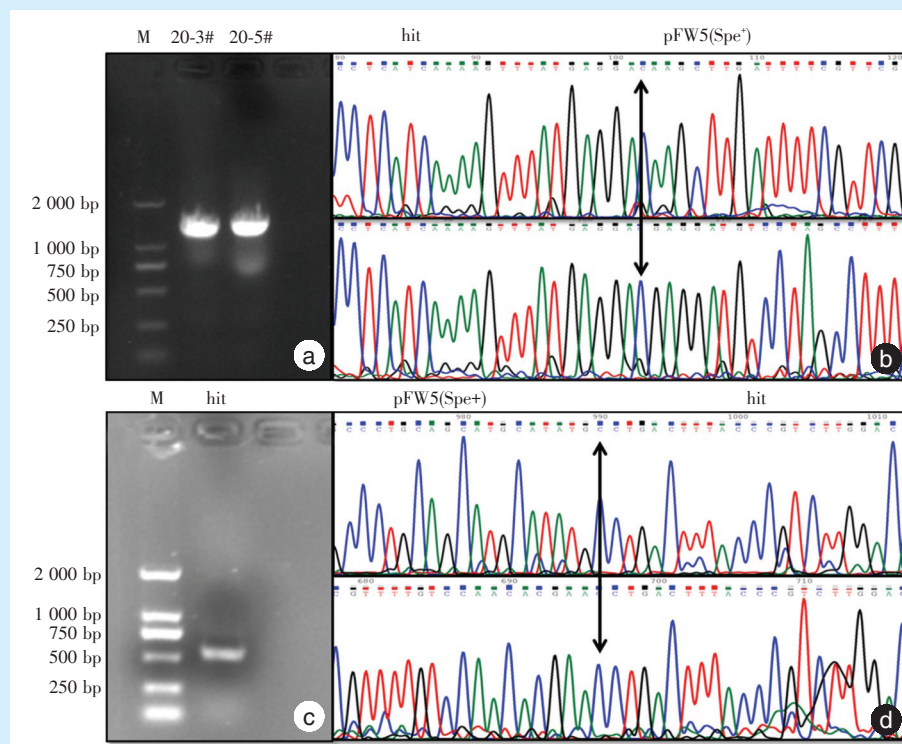
选择 hit 基因条带(550 bp)较弱或无该条带的样品,如 20-3#、20-5#等,并对照变异链球菌 ATCC25175 标准株,进行 hit 基因片段 PCR 产物测序,其电泳条带和 Sanger 测序如图 4 所示。hit 基因片段的 PCR 产物大小约为 1 400 bp(图 4a),而没有出现模式菌株 ATCC25175 大小约为 550 bp 的条带(图 4c),表明原有的 hit 基因片段里都已插入了长达近 900 bp 碱基片段。PCR 产物 Sanger 测序,正向测序读图显示:hit 基因残余碱基序列片段碱基 C(图 4b,双箭头)后,紧接碱基序列片段的碱基 A,该序列与载体 pFW5 上连接 aad9 壮观霉素抗性基

因的连接序列相同,与相应位置处正常 hit 基因碱基序列明显对照(图 4b,双箭头右侧部分)。

反向测序读图显示:hit 基因残余碱基序列碱基 C(图 4d,双箭头)前,紧靠碱基序列碱基 G,该序列与载体 pFW5 上连接 aad9 壮观霉素抗性基因的连接序列相同,也与对应位置处正常 hit 基因碱基序列明显对照(图 4d,双箭头左侧部分),表明变异链球菌 hit 基因缺陷菌株构建成功。

## 2.5 变异链球菌 hit 基因缺陷菌株遗传稳定筛选

将图 3 中的样品进行多次抗性筛选和鉴定,筛选后的缺陷菌株基因组的 hit 基因片段 PCR 产物电



a: DNA electrophoresis of PCR products of the hit gene DNA fragments of the 20-3# and 20-5# strains; b: Sanger forward sequencing chromatograms of the PCR products of 20-3# strain (the top panel) and its parent strain ATCC25175 (the down panel); c: DNA electrophoresis of the PCR products of the hit gene DNA fragments of *Streptococcus mutans* ATCC25175; d: Sanger reversed sequencing chromatograms of the PCR products of 20-3# strain (the top panel) and its parent strain ATCC25175 (the down panel)

Figure 4 Electrophoresis and Sanger sequencing of PCR products of the hit gene fragment from the hit-deficient mutant strains and their parental *S. mutans* ATCC25175

图4 变异链球菌 hit 基因缺陷突变菌株及其标准株 ATCC25175 的 hit 基因片段 PCR 产物电泳和 Sanger 测序图

泳和 Sanger 测序,如图 5 所示。PCR 产物电泳只有单一大小约 1 400 bp 条带(图 5a)。PCR 产物 Sanger 测序,正向测序显示:hit 基因残余碱基序列碱基 C(图 5b,粗黑箭头)后,紧接碱基序列的碱基 A,该序列为载体 pFW5 上连接 aad9 壮观霉素抗性基因的连接序列;反向测序显示:hit 基因残余碱基序列碱基 C(图 5c,粗黑箭头)前,紧靠碱基序列碱基 G,该序列也是载体 pFW5 上连接 aad9 壮观霉素抗性基因的连接序列,都与之前初筛时的 Sanger 测序结果相一致,表明获得遗传稳定 hit 基因缺陷变异链球菌突变菌株。

## 2.6 变异链球菌 hit 基因调控细菌生长周期

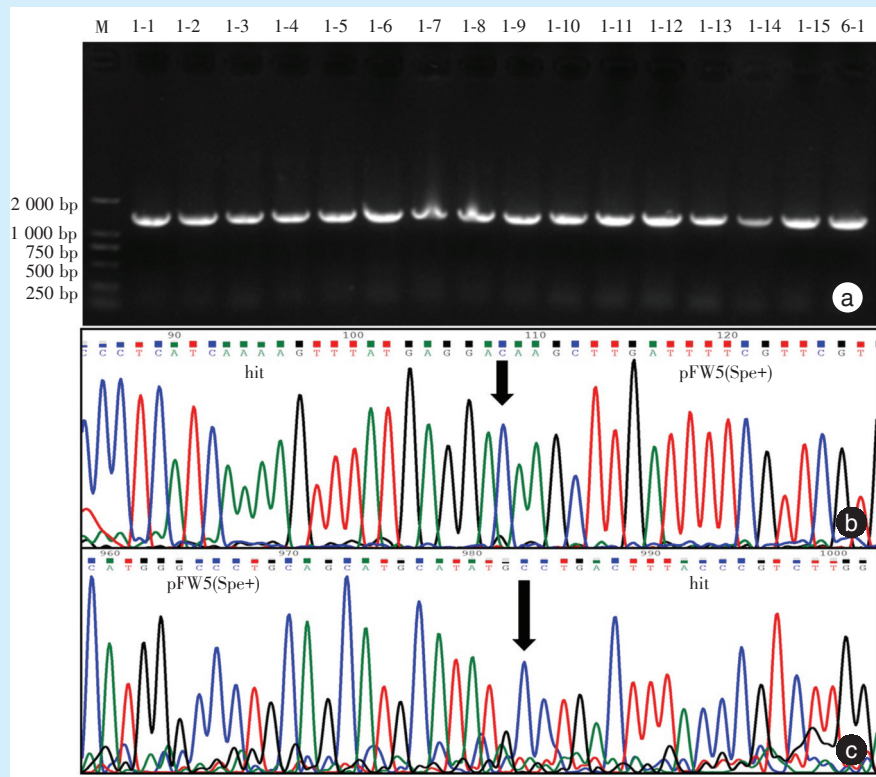
hit 基因缺陷型变异链球菌突变菌株(*Smu.Δhit*)生长普遍都要比变异链球菌 ATCC25175 标准株更快速(图 6):*Smu.Δhit* 缺陷菌株迟缓期从 15 h 缩短到 5 h 左右;*Smu.Δhit* 缺陷菌株进入对数期持续快速生长约 12 h 后,ATCC25175 才开始从迟缓期进

入对数生长期,持续快速生长约 12 h 后到达峰值,逐渐进入稳定期,此时生长速率开始下降,呈现比较典型细菌生长周期特征。而 *Smu.Δhit* 缺陷菌株在进入对数期持续快速生长约 12 h 后,生长速率出现较明显波动,约 4 h 后也达到其生长速率峰值,比较 ATCC25175 标准株提前约 4 h 进入生长速率下降的稳定期。从整个生长周期看来,*Smu.Δhit* 缺陷菌株生长速率都要明显高于标准菌株 *Smu.25175* ( $P < 0.001$ ),表明变异链球菌 hit 基因调控细菌生长周期。

## 3 讨论

本课题组利用基因同源重组方法,构建变异链球菌 hit 基因缺陷突变菌株,在 BHI 培养基中,hit 基因缺陷变异链球菌菌株整个生长周期普遍比变异链球菌 ATCC25175 标准株更为快速,初步证实了 GenBank 注释所推测的调控细胞周期功能。

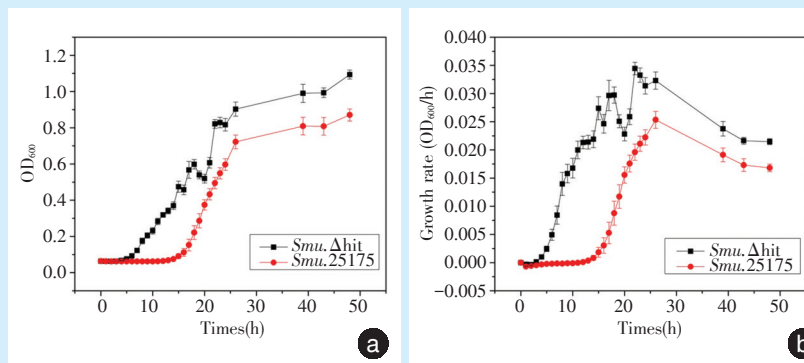




a: DNA electrophoresis of PCR products of the hit gene DNA fragments of the 1-1-1-15 and 6-1 strains. b&c: sanger forward sequencing (b) and reversed sequencing chromatograms (c) of the PCR products of 6-1 strains

Figure 5 Electrophoresis and Sanger sequencing chromatograms of the PCR products of the hit gene DNA fragments from the hit-deficient mutant strains

图5 遗传稳定 hit 基因缺陷变链突变菌株的 hit 基因片段 PCR 产物电泳和 Sanger 测序图



a: the hit - deficient mutant strains (*Smu.Δhit*) and their parent strains ATCC25175 have similar growth curves; b: the growth rate of the hit-deficient mutant strains (*Smu.Δhit*) is much faster than that of their parent strains ATCC25175 at 48-hour intervals

Figure 6 Growth curve and growth rate of the hit-deficient mutant strains versus *Streptococcus mutans*

图6 hit 基因缺陷型变异链球菌突变菌株和标准株生长曲线和生长速率曲线

在 ATCC25175 标准株基因组全序中 hit 基因毗邻 *brgA* (*lytR*) 基因(通过调控自溶素酶表达来控制细菌生长周期<sup>[10]</sup>)和 ABC(ATP-Binding Cassette) 相关基因,他们可能会组成一个“调控基因簇”,hit 基因调控 *lytR* (*brgA*) 转录因子的转录活性。hit 基因突变菌株成功构建,为 hit 基因在细菌生长繁殖致生物膜形成、产酸耐酸致龋性方面的研究提供条件。

细菌为适应环境变化,具有从环境中吸收和整合外源游离 DNA 的“天然遗传转化”机制,以获得新基因或新遗传性状,促进细菌抗抗生素和遗

传变异的出现以及毒力因子快速进化<sup>[11-13]</sup>。这在链球菌中也广泛存在,如变异链球菌、唾液链球菌和肺炎链球菌中的“ComCDE 基因簇”群体感应系统<sup>[14-15]</sup>。链球菌通过群体感应系统来诱导其进入遗传感受状态,主要是依赖于感受态刺激肽信号系统<sup>[16-17]</sup>。环境变化对其天然转化感受态产生巨大影响,细菌产生和分泌 CSP 信息素的能力也与转化效率相关,使用人工合成 CSP 可以避免细菌生产和分泌内源性 CSP 所需要的苛刻条件,人工合成 CSP 加入将转化效率提高了几个数量级,即使在野生型菌株中也是如此,扩大了可转化的菌株范围,

在突变体构建中则可利用这一特性<sup>[18]</sup>。利用人工合成变异链球菌 ATCC25175 标准株刺激肽 CSP (GenBank: SQF47995.1) 成熟肽, 诱导变异链球菌标准株进入遗传感受状态, 利用该天然转化方法成功地使重组质粒转入标准株内进行同源重组, 获得 hit 基因缺陷突变菌株。这与目前常用的电转化方法相比具有明显优势: 无需专用电转仪, 简单方便有效又不电击损伤变异链球菌体。本研究为深入了解变异链球菌 hit 基因功能及致病性提供了基础。

**【Author contributions】** Lai YF, Liang Y wrote the article. Lai YF, Wang P, Liu ZJ and Qiao L performed the experiments. Ye ZY designed the study, analyzed the data and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

### 参考文献

- [1] Banas JA, Takanami E, Hemsley RM, et al. Evaluating the relationship between acidogenicity and acid tolerance for oral streptococci from children with or without a history of caries[J]. J Oral Microbiol, 2020, 12(1): 1688449. doi: 10.1080/20002297.2019.1688449.
- [2] Rainey K, Michalek SM, Wen ZT, et al. Glycosyltransferase-mediated biofilm matrix dynamics and virulence of *Streptococcus mutans*[J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(5): e02218-e02247. doi: 10.1128/AEM.02247-18.
- [3] Senpuku H, Yonezawa H, Yoneda S, et al. SMU.940 regulates dextran-dependent aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*[J]. Mol Oral Microbiol, 2018, 33(1): 47-58. doi: 10.1111/omi.12196.
- [4] Takashima Y, Fujita K, Ardin AC, et al. Characterization of the dextran-binding domain in the glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans*[J]. J Appl Microbiol, 2015, 119(4): 1148-1157. doi: 10.1111/jam.12895.
- [5] De A, Liao S, Bitoun JP, et al. Deficiency of RgpG causes major defects in cell division and biofilm formation, and deficiency of LytR-CpsA-Psr family proteins leads to accumulation of cell wall antigens in culture medium by *Streptococcus mutans*[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(17): e00917-e00928. doi: 10.1128/AEM.00928-17.
- [6] Bitoun JP, Liao S, Yao X, et al. BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in *Streptococcus mutans*[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2914 - 2922. doi: 10.1128/AEM.07823-11.
- [7] Lima CD, Klein MG, Hendrickson WA. Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family[J]. Science, 1997, 278(5336): 286-290. doi: 10.1126/science.278.5336.286.
- [8] Podbielski A, Spellerberg B, Woischnik M, et al. Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A *Streptococci* (GAS)[J]. Gene, 1996, 177(1/2): 137 - 147. doi: 10.1016/0378-1119(96)84178-3.
- [9] Li YH, Lau PC, Lee JH, et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms[J]. J Bacteriol, 2001, 183(3): 897-908. doi: 10.1128/JB.183.3.897-908.2001.
- [10] Chatfield CH, Koo H, Quivey RG. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth - phase regulated[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 2): 625 - 631. doi: 10.1099/mic.0.27604-0.
- [11] Attaiech L, Charpentier X. Silently transformable: the many ways bacteria conceal their built - in capacity of genetic exchange[J]. Curr Genet, 2017, 63(3): 451-455. doi: 10.1007/s00294-016-0663-6.
- [12] Lam T, Brennan MD, Morrison DA, et al. Femtoliter droplet confinement of *Streptococcus pneumoniae*: bacterial genetic transformation by cell-cell interaction in droplets[J]. Lab Chip, 2019, 19(4): 682-692. doi: 10.1039/c8lc01367e.
- [13] Saak CC, Dinh CB, Dutton RJ. Experimental approaches to tracking mobile genetic elements in microbial communities[J]. FEMS Microbiol Rev, 2020, 44(5): 606 - 630. doi: 10.1093/femsre/fuaa025.
- [14] Aspar JR, Walker AR. Expanding the vocabulary of peptide signals in *Streptococcus mutans*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 194. doi: 10.3389/fcimb.2019.00194.
- [15] Fontaine L, Wahl A, Fléhard M, et al. Regulation of competence for natural transformation in *Streptococci*[J]. Infect Genet Evol, 2015, 33(33): 343-360. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.010.
- [16] Shanker E, Federle MJ. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*[J]. Genes (Basel), 2017, 8(1): 15. doi: 10.3390/genes8010015.
- [17] Dufour D, Mankovskaia A, Chan Y, et al. A tripartite toxin-antitoxin module induced by quorum sensing is associated with the persistence phenotype in *Streptococcus mutans*[J]. Mol Oral Microbiol, 2018, 33(6): 420-429. doi: 10.1111/omi.12245.
- [18] Salvadori G, Junges R, Khan R, et al. Natural transformation of oral *Streptococci* by use of synthetic pheromones[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1537: 219-232. doi: 10.1007/978-1-4939-6685-1\_13.

(编辑 曾曙光)



官网



公众号