

网络出版时间: 2023-12-28 11:17:19 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0752.003>

基于同源重组原理快速验证 *fim* 家族基因簇 对鲍曼不动杆菌蹭动的影响

孙千姿^{1,2}, 宁年智², 王 慧^{1,2}

摘要 目的 旨在利用含有抗生素耐药盒的线性 PCR 片段对鲍曼不动杆菌靶基因片段进行同源重组替换, 实现基因的快速敲除及功能验证。方法 以鲍曼不动杆菌 Ab4294 菌株为研究对象, PCR 分别扩增 *fim* 基因簇(全长 4 980 bp)上游 901 bp、下游 1 028 bp 的序列作为重组的同源臂; 从 pUC57 质粒中扩增获得卡那霉素抗生素耐药盒(*KanR*); 利用重叠延伸 PCR 技术将上述 3 个片段连接, 并将连接片段转化至鲍曼不动杆菌 Ab4294 中, 筛选获得基因缺失突变株, 构建质粒回补株, 对所得菌株进行表型鉴定, 探究 *fim* 基因簇的功能。结果 利用含有抗生素耐药盒的线性 PCR 片段同源替换的方法成功构建了 *fim* 基因簇缺失的鲍曼不动杆菌 Ab4294 突变菌株; 缺失菌株与野生株相比生长速率无明显差异, 蹭动运动能力明显下降, 回补该基因簇后表型恢复。结论 利用含有抗性耐药盒的线性 PCR 片段同源替换的方法成功敲除鲍曼不动杆菌 Ab4294 的 *fim* 家族基因簇, 该基因簇编码产物参与鲍曼不动杆菌的蹭动运动。

关键词 鲍曼不动杆菌; 基因敲除; *fim* 基因簇; 蹭动运动

中图分类号 R 378

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)01-0008-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.002

鲍曼不动杆菌是一种常见的医院感染革兰阴性细菌, 可以引起多种感染, 包括皮肤和软组织感染、菌血症、尿路感染和肺炎等^[1]。鲍曼不动杆菌具有广泛的抗生素耐药性, 可通过菌毛摄取外源质粒等可移动遗传原件增加其抗生素耐药性^[2]。菌毛是一种覆盖在细菌菌体表面的毛发状结构, 研究^[3-7]表明, I 型菌毛系统与尿道致病性大肠埃希菌(UP-EC)、血清型鼠伤寒沙门菌、肺炎克雷伯菌等菌株的毒力及运动性有关, 或者通过菌毛黏附于生物和非

生物的表面。

目前常用的基因敲除方法有利用 Red 重组系统敲除相关基因^[8]、利用 pMO130 自杀质粒敲除相关基因^[9]、利用穿梭质粒载体敲除相关基因^[10]等。本实验室已经建立了利用 pMO130-TelR 敲除鲍曼不动杆菌相关基因的方法^[11], 该方法使用 10% 蔗糖筛选基因突变株为限速步骤, 需要多次传代才可获得基因突变株。该研究利用含有抗生素耐药盒的线性 PCR 片段对鲍曼不动杆菌 Ab4294 的 *fim* 基因簇进行敲除, 用以探索此基因簇的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 鲍曼不动杆菌 Ab4294 菌株 (GenBank GCA_029931545.1) 为临床分离菌株, 由军事医学研究院感染免疫与防治研究室保存。质粒 pUC57、pKK223-3、pWH1266、pET15b-*abori* 由本实验室保存, 质粒 pET15b-*abori-fim* 为本研究构建。鲍曼不动杆菌 4294 Δ *fim*、4294 Δ *fim*-pET15b-*fim* 为本研究构建(表 1)。

1.1.2 主要试剂 基因组 DNA 提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司(货号: DP302); 高保真酶购自日本 Takara 公司(货号: R045A); DNA Marker (货号: BM141)、DNA Loading Buffer (货号: GH101)、TRIzol UP(货号: ER501) 均购于北京全式金生物技术有限公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒购于上海迈跟生物科技有限公司(货号: D2111-02); 蛋白胨(货号: LP0042) 和酵母提取物(货号: LP0021) 购于英国 OXOID 公司; NaCl 购于国药集团化学试剂北京有限公司(货号: 10019308)。

1.1.3 主要仪器 恒温振荡培养箱购于苏州培英实验设备有限公司(型号: HZQ-X100); 离心机购于德国 Eppendorf 公司(型号: Centrifuge 5418 R); 电泳仪购于北京市六一仪器厂(型号: JY600C); 全自动凝胶成像分析系统购于北京赛智创业公司(型号: ChampGel™ 5000 plus); PCR 热循环仪购于美国 Bio-Rad 公司(型号: T100); NanoDrop 超微量分光光

2023-11-15 接收

基金项目: 病原微生物生物安全全国重点实验室自主研究课题(编号: SKLPBS2228)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

²军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

作者简介: 孙千姿, 女, 硕士研究生;

王 慧, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: geno0109@vip.sina.com

度计购于美国 Thermo 公司(型号: NanoDrop 1000); 实时荧光定量 PCR 仪购于瑞士 Roche 公司(型号: LightCycler 96)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据本实验室前期测序得到的鲍曼不动杆菌 Ab4294 的全基因组序列,通过序列比对查找所需敲除基因 *fim* 基因簇全长 4 980 bp 的位置,选取上游 901 bp、下游 1 028 bp 的同源臂序列,同时用 *KanR* 基因序列(921 bp)替换 *fim* 基因簇序列(图 1)。根据 *fim* 基因簇同源臂设计引物 P1、P2,并在 P2 的 5'端加入 20 bp 的 *KanR* 的 5'端片段,在下游同源臂设计引物 P5、P6,并在 P5 的 5'端加入 22 bp 的 *KanR* 的 3'端片段,根据质粒 pUC57 上的 *KanR* 基因序列设计引物 P3、P4,并在 P3 的 5'端加入 25 bp 上游同源臂的 3'序列,在 P4 的 5'端加入 25 bp 下游同源臂的 5'序列, P3 和 P2、P4 和 P5 完全反向互补, *fim* 基因簇完全被删除并由卡那霉素抗生素耐药盒替换。引物由北京天一辉远生物公司合成(表 2)。

1.2.2 扩增 *fim* 基因簇上下游及替换基因 *KanR* 片段 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取 Ab4294 基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,用 P1/P2 引物对扩增 *fim* 基因簇的上游同源臂序列,用 P5/P6 引物对扩增 *fim* 基因簇下游同源臂序列。以提取的 pUC57 质粒为模板,使用 P3/P4 引物对扩增替换片段 *KanR*。PCR 反应体系:模板 1 μ l,上下游引物各 1 μ l,高保真酶 25 μ l,去离子水 22 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C、1 min;94 $^{\circ}$ C、30 s,52 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C、5 min。用胶回收试剂盒对目的片段回收。

1.2.3 重叠延伸 PCR 连接 *fim* 基因簇上下游同源臂及 *KanR* 片段 以上述 *fim* 基因簇上下游同源臂片段以及替换片段 *KanR* 的 PCR 回收产物为模板,以 P1/P6 引物对为引物。PCR 反应体系:模板为上下游同源臂片段及 *KanR* 的片段摩尔浓度比约等于 1:1:1,共 2 μ l,上下游引物各 1 μ l,高保真酶 25 μ l,去离子水 22 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C、1 min;94 $^{\circ}$ C、30 s,53 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、240 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C、

表 1 本研究所用菌株与质粒

菌株或质粒	特征	来源
Ab4294	鲍曼不动杆菌临床分离株	本实验室保存
4294 Δ <i>fim</i>	<i>fim</i> 基因簇敲除的 Ab4294	本研究构建
4294 Δ <i>fim</i> -pET15b- <i>fim</i>	<i>fim</i> 基因簇敲除并通过 pET15b- <i>abori-fim</i> 质粒回补 <i>fim</i> 基因簇的 Ab4294	本研究构建
pUC57	Km 抗性	本实验室保存
pKK223-3	Amp 抗性	本实验室保存
pWH1266	Amp 抗性	本实验室保存
pET15b- <i>abori</i>	Amp 抗性	本实验室保存
pET15b- <i>abori-fim</i>	Amp 抗性	本研究构建

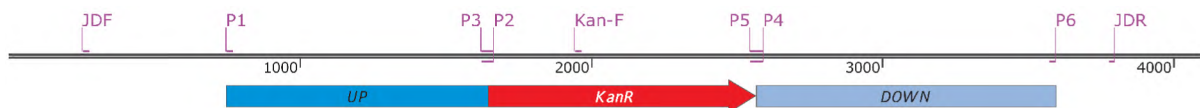


图 1 鲍曼不动杆菌基因敲除线性片段构建及引物设计

表 2 本实验所用引物

引物名称	序列(5'→3')	产物大小(bp)
P1	AGTGAGATACGGGTCACATATTGTT	P1/P2: 901; P1/P6: 2 850
P2	AAACAAATAGGGGTTCGCGAGTGTTTTCTCAAAAAATCTGGAT	901
P3	TATCCAGATTTTTGAGAAAACACTCGCGGAACCCCTATTTGTTT	921
P4	AGATTTAAAACTATTGAATATGATTAGAAAACTCATCGAGCATC	921
P5	GATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCATATTCATAGTTTTTAAATCTA	1 028
P6	ACGGTCAGTAATGAGTTTCATTAGAC	P5/P6: 1 028; P1/P6: 2 850
JD-R	AACACATACCATGCCTCTACAAG	Kan-F/JD-R: 1 858
Kan-F	ATGTTACAGATGAGATGGTCAGAC	Kan-F/JD-R: 1 858
<i>c</i> <i>fim</i> -F	AACCTTAAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAACTTGCTTTGATCGC	5 025
<i>c</i> <i>fim</i> -R	GGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTAATCATATTCATAGTTACAG	5 025
pET5b-JD-F	AGCTGCTATAGGGTTGCGTTCTTC	空 442 bp 插入目的片段: 5 354
pET5b-JD-R	ATGCGCTCATCGTCATCCTCG	空 442 bp 插入目的片段: 5 354

5 min。用胶回收试剂盒对目的片段回收,得到线性片段 up-*KanR*-down。

1.2.4 线性 PCR 片段转化 通过自然转化的方式,利用细菌的同源重组特性,将含有同源臂的 up-*KanR*-down 片段导入鲍曼不动杆菌 Ab4294 中。将待敲除鲍曼不动杆菌 Ab4294 用 Mueller-Hinton (MH) 培养基于 37 ℃、200 r/min 培养过夜后,以 1:100 的接种量加入 96 孔板中,每孔加入 200 μ l 菌液;加入上述重叠延伸 PCR 所得连接片段,每孔 1 000 ng,置于 37 ℃ 培养 12 h;取 100 μ l 涂布含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 Luria-Bertani (LB) 固体平板上,37 ℃ 培养过夜。

1.2.5 基因敲除菌株验证 挑取上述筛选平板中的单克隆进行 PCR 鉴定,所用引物对为 KanR-F/JD-R,该引物对扩增范围从 *KanR* 基因内部扩增至下游同源臂外侧。PCR 反应体系:模板 1 μ l,上下游引物各 1 μ l,高保真酶 25 μ l,去离子水 22 μ l。PCR 反应条件:94 ℃、5 min;94 ℃、30 s;52 ℃、30 s;72 ℃、2 min,30 个循环;72 ℃、5 min。将 PCR 产物送至北京天一辉远生物公司测序。

1.2.6 回补质粒 pET15b-abori-*fim* 的构建 首先将 pKK223-3 质粒的 *tac* promoter 片段以及 pWH1266 的 *Ab ori* 片段连接,并将其替换至 pET15b 质粒的酶切位点 *Sph*I 之后以及 *promoter* 片段,构建成 pET15b-*Abori* 质粒,然后将需要回补的 *fim* 基因簇片段插入进 pET15b-*Abori* 质粒的 *Bam*H I 和 *Neo* I 酶切位点之间,构建成 pET15b-abori-*fim* 质粒。

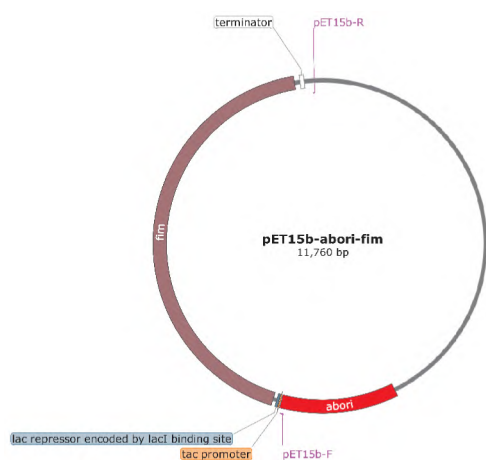


图2 pET15b-abori-*fim* 质粒图谱

1.2.7 pET15b-abori-*fim* 质粒电转化 4294 Δ *fim* 细胞 将鲍曼不动杆菌 4294 Δ *fim* 菌株活化,培养至 600 nm 吸光度 (absorbance, *A*) 值约为 0.6,收集菌液,以 5 000 r/min、4 ℃ 离心 2 min,用无菌蒸馏水清

洗 3 次后,用 10% 甘油清洗 3 次,最后用 100 μ l 的 10% 甘油重悬菌体,冰上静置 10 min 后,加入 2 μ l pET15b-abori-*fim* 质粒,在冰上放置 15 min 后,将混合菌液转移至电转杯,电转条件为:2.5 kV、200 Ω 、25 μ F,电转结束后,向混合液中加入 1 ml LB 培养基,放入 37 ℃ 摇床,200 r/min 孵育 40 min,取 100 μ l 菌液涂布于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 固体平板上,37 ℃ 培养过夜。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 鉴定 所有菌株均培养至生长对数期 ($A_{600\text{ nm}} = 0.6$),采用 TRIzol 法提取细菌总 RNA,使用 NanoDrop 测定 RNA 纯度和浓度。实时荧光定量 PCR 采用 Roche 公司的 LightCycler 96 定量 PCR 系统,并用 Takara TB Green 作为染料,对反转录的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 检测。反应体系为:TB Green 12.5 μ l; Forward-Primer 1 μ l; Reverse-Primer 1 μ l; 模板 cDNA 2 μ l; H₂O 8.5 μ l。反应条件为:95 ℃、30 s;95 ℃、5 s;60 ℃、30 s,40 个循环;95 ℃、5 s;60 ℃、1 min;95 ℃、1 s;50 ℃、30 s。基因表达量用 *A. baumannii gyrB* 基因归一化处理,相对度采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。引物见表 3。

表3 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	序列(5'-3')
<i>A. baumannii gyrB</i>	F: AGCGGTAGAGCAAGCAAT
	R: GCACTCTTACGGCGTGTC
<i>fim</i>	F: AACCAAGGTGCAACTGTTGAC
	R: TCAGCACTTGACCTTCAGC

1.2.9 生长曲线测定 取鲍曼不动杆菌 Ab4294 与鉴定替换成功的 4294 Δ *fim* 及回补成功的 4294 Δ *fim*-pET15b-abori-*fim* 单克隆加入 5 ml LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 过夜培养,过夜菌按 1:100 比例接种至 200 μ l LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养,每 1 h 测定 1 次菌液的 $A_{600\text{ nm}}$ 值,每个菌种设置 3 个重复,置于 96 孔板培养,共培养测定 12 h。以培养时间为横坐标,以 $A_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标,统计各菌种在不同时间的 $A_{600\text{ nm}}$ 值,绘制鲍曼不动杆菌在 LB 中的生长曲线。

1.2.10 细菌蹭动运动能力检测 蹭动运动 (twitching motility) 是指细菌在固体表面的移动^[12],参考文献^[13]方法,取鲍曼不动杆菌 Ab4294、4294 Δ *fim* 和 4294 Δ *fim*-pET15b-abori-*fim* 分别加入 5 ml LB 培养基过夜培养,用无菌牙签分别蘸取 Ab4294、4294 Δ *fim* 和 4294 Δ *fim*-pET15b-abori-*fim* 过夜菌液,垂直穿刺至琼脂含量 1% 的 LB 平板上,需穿刺至平皿

的塑料表面,将平皿正置于 37 ℃ 培养箱 18 h,揭去固体培养基,用 0.1% 结晶紫溶液染色 10 min,倒去多余染液,用水清洗平皿并风干,观察细菌蹭动轨迹,拍照并分别量取蹭动轨迹的长轴直径及短轴直径,计算面积并统计。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad prism 8.0 软件进行统计学分析,生长曲线统计采用双因素方差分析,细菌运动能力比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *fim* 基因簇序列比对 本研究运用生物信息学技术,将鲍曼不动杆菌 *fim* 基因簇 (QE150_01963、QE150_01964、QE150_01965、QE150_01966) 与其他表达 I 型菌毛的革兰氏阴性细菌大肠埃希菌 (Genebank GCA_000005845.2)、肺炎克雷伯菌 (Genebank GCA_000364385.3)、鼠伤寒沙门氏菌 (Genebank GCA_000715155.2) 以及鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 (Genebank GCA_009759685.1) 进行同源比对,推断 QE150_01963-QE150_01966 为编码鲍曼不动杆菌 Ab4294 I 型菌毛组装蛋白之一。见表 4。

2.2 线性 PCR 片段的构建及验证 首先以鲍曼不动杆菌 Ab4294 的基因组 DNA 为模板扩增 *fim* 基因簇的上下游同源片段,成功获得上下游同源臂片段

及替换片段 *KanR* 如图 3A 所示。然后通过重叠延伸 PCR 和切胶回收获得 up-*KanR*-down 片段,产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 3B 所示,获得大小为 2 850 bp 的含有同源臂的替换片段。

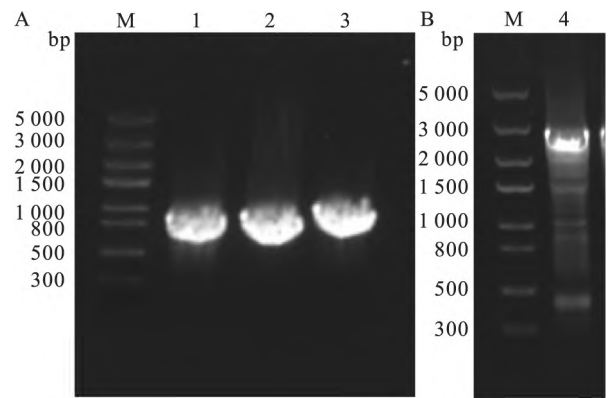


图 3 基因敲除线性片段的合成

A: PCR 扩增 *fim* 基因簇上下游及替换基因 *KanR* 片段; B: 通过重叠延伸 PCR 将 3 个基因片段连接,获得 up-*KanR*-down 片段; 1: *fim* 基因簇上游 1 006 bp 片段; 2: *KanR* 基因 816 bp 片段; 3: *fim* 基因簇下游 1 028 bp 片段; 4: up-*KanR*-down 连接片段 2 850 bp; M: marker

2.3 基因敲除菌株筛选及鉴定 含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选敲除菌株,平板上生长的阳性克隆使用 KanR-F/JD-R 引物对进行 PCR 鉴定,扩增产物为 1 858 bp,见图 4 A。将 PCR 产物

表 4 *Fim* 基因簇序列比对

基因编号	基因编码产物	同源基因			
		大肠埃希菌 (ACC × × × ×)	肺炎克雷伯菌 (AHI × × × ×)	鼠伤寒沙门菌 (AIE × × × ×)	鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 (QGX × × × ×)
QE150_01963	FimA, 菌毛组装蛋白	FimG(77275)	I 型菌毛蛋白(34778)	FimF(03952)	菌毛蛋白(51309)
QE150_01964	FimC, 菌毛组装蛋白	菌毛伴侣蛋白(73251)	FimC(37874)	FimC(03948)	菌毛伴侣蛋白(51554)
QE150_01965	FimD, 菌毛组装蛋白	I 型菌毛引导蛋白(77273)	FimD(37875)	FimD(03949)	菌毛外膜引导蛋白(51553)
QE150_01966	菌毛家族蛋白	FimF(77274)	菌毛黏附蛋白(37862)	菌毛蛋白(04112)	菌毛蛋白(51552)

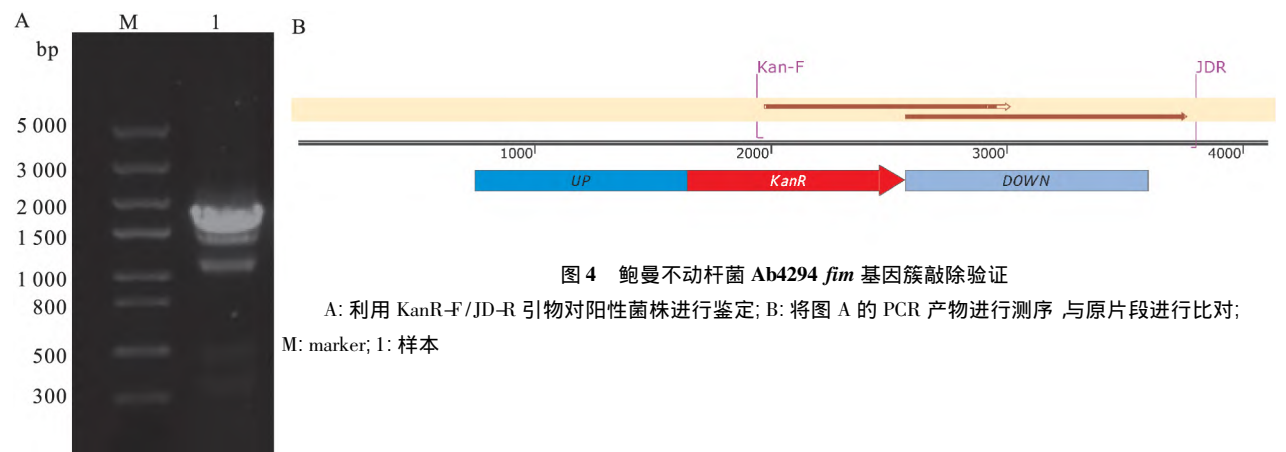


图 4 鲍曼不动杆菌 Ab4294 *fim* 基因簇敲除验证

A: 利用 KanR-F/JD-R 引物对阳性菌株进行鉴定; B: 将图 A 的 PCR 产物进行测序,与原片段进行比对; M: marker; 1: 样本

送至北京天一辉远生物公司测序,测序结果显示 *fim* 基因簇已成功被 *KanR* 替换,见图 4B。鉴定正确的菌株命名为 4294 Δfim 。

2.4 回补菌株筛选及鉴定 用含有 100 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选回补菌株,用鉴定引物 pET5b-JD-F/R 进行 PCR 检测,阳性条带大小为 5 354 bp。将正确克隆命名为 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim*。见图 5。

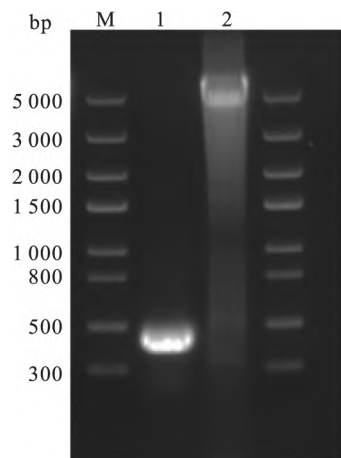


图5 4294 Δfim 回补 *fim* 基因簇鉴定

M: Marker; 1: 鲍曼不动杆菌 Ab4294; 2: 回补株 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim*

2.5 实时荧光定量 PCR 鉴定 为了证实 *fim* 基因敲除及回补成功,本研究测量了 *fim* 基因簇的转录水平,并于亲本菌株鲍曼不动杆菌 Ab4294 中相应基因的转录水平进行比较。与亲本菌株相比,4294 Δfim 突变体的 *fim* 基因簇的转录水平显著降低,而该菌株回补 *fim* 基因簇后 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim* 突变体中,该基因转录水平恢复到亲本水平。见图 6。

2.6 生长曲线测定 实验结果显示,与野生株 Ab4294 相比,4294 Δfim 和 4294 Δfim -pET15b-abori-

fim 在 LB 培养基中生长没有明显的变化,说明 *fim* 基因簇的缺失对鲍曼不动杆菌的生长没有影响。见图 7。

2.7 细菌运动能力测定 对比观察结晶紫染色后的 Ab4294、4294 Δfim 和 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim* 在培养皿表面的蹭动运动印迹圈,结果显示,基因缺失株印迹圈小于野生株,而回补株的蹭动印迹圈完全恢复,表明 *fim* 基因簇的缺失影响鲍曼不动杆菌的蹭动运动能力。见图 8。

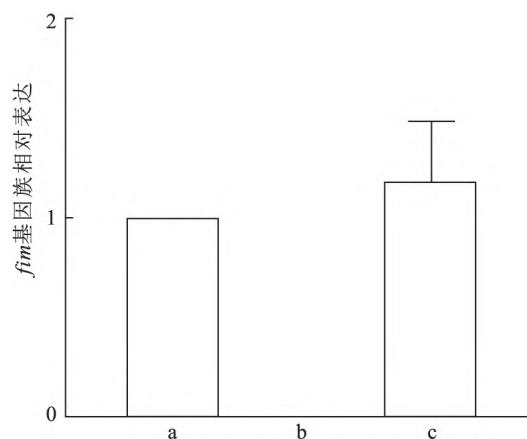


图6 *fim* 基因敲除回补实时荧光定量 PCR 验证

a: Ab4294; b: 4294 Δfim ; c: 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim*

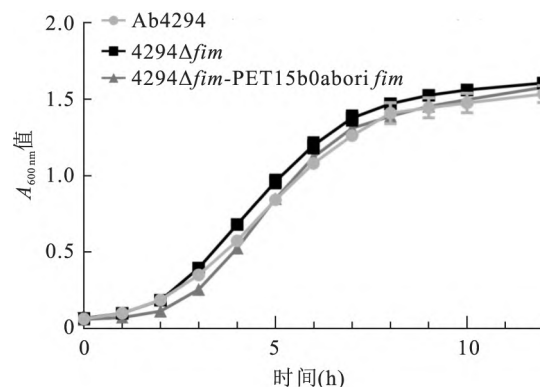


图7 鲍曼不动杆菌野生株与 *fim* 基因簇敲除株以及回补株生长曲线

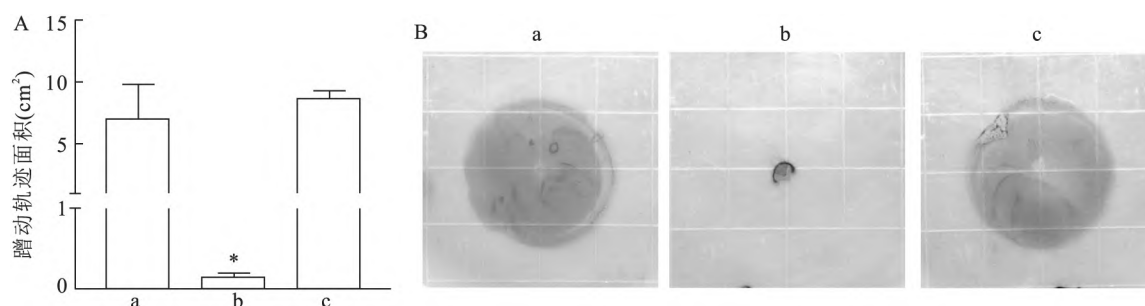


图8 鲍曼不动杆菌野生株与 *fim* 基因簇敲除株以及回补株运动能力检测

A: 蹭动印迹圈统计图 ($n = 4$); B: 蹭动印迹圈; a: Ab4294; b: 4294 Δfim ; c: 4294 Δfim -pET15b-abori-*fim*; 与 Ab4294 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

基因敲除技术是研究鲍曼不动杆菌基因功能的重要分子生物学技术,但由于鲍曼不动杆菌的多耐药性,导致在进行基因敲除时会出现种种问题,因此对多耐药性的鲍曼不动杆菌进行基因敲除从而获得基因缺失株的方法需要进一步探究。近年来, Amin et al^[9]建立了抗亚碲酸盐自杀载体 pMO130-TelR,用于鲍曼不动杆菌的无痕基因敲除,该方法首先将目的基因的上下游约 1 000 bp 的同源臂克隆到自杀质粒载体 pMO130-TelR 上,通过 2 次重组事件替换掉目标基因,最终获得突变体。此方法的优点是可以获得完全无痕的基因缺失株,但由于在使用 10% 蔗糖筛选阳性克隆为限速步骤,需要多次传代才能获得基因缺失菌株。本研究中无限速步骤,通过抗生素筛选即可获得阳性克隆,只需 3~4 d 就可获得基因缺失菌株,提高效率。

Tucker et al^[14]在鲍曼不动杆菌菌株 IS-123 中发现了一个 RecET 重组酶系统,并将其作为鲍曼不动杆菌基因敲除的工具,成功敲除鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 和鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 中的不同大小和编码不同生物学功能的基因片段。Li et al^[15]用此方法构建了鲍曼不动杆菌 *asaA* 和 *tssM* 基因突变体,用以探究其功能。该方法需要先将表达重组酶的质粒导入进入鲍曼不动杆菌中,随后将目标基因的 PCR 产物电穿孔到鲍曼不动杆菌中,测序确认阳性克隆后,将表达重组酶的质粒转化到突变体中,用以产生无标记的突变体。该方法在敲除过程中需要同时引入 3 种质粒载体,依赖于 2 种不同的抗生素,因此阻碍了这种方法在多耐药菌株中的应用。本研究在基因敲除过程中,无需构建质粒,而是通过构建含有上下游同源臂的线性 PCR 片段,对待敲除基因进行同源替换,从而实现对目的基因的敲除。

许多革兰阴性菌通过 I 型菌毛使细菌黏附在生物和非生物的表面,是细菌侵入靶细胞并持续存在的原因。有研究^[6,16]表明, I 型菌毛由 *fim* 基因簇编码,且在大肠埃希菌中和鼠伤寒沙门菌中的 *fim* 基因簇有遗传和功能的差异。而 *fim* 基因簇在鲍曼不动杆菌中的功能还没有报道,因此,本研究根据 NCBI 公布的鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 和鲍曼不动杆菌 Ab4294 基因组序列信息,与大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鼠伤寒沙门氏菌等革兰阴性菌的基因同源比对,推断 *fim* 基因簇(QE150_01963-QE150_

01966) 为编码鲍曼不动杆菌 Ab4294 I 型菌毛组装蛋白之一,并成功构建该基因簇的缺失菌株。与野生株 Ab4294 相比, *fim* 基因簇缺失株在正常环境下生长状态无变化,而通过观察蹭动印迹圈发现其蹭动运动能力明显下降,回补 *fim* 基因簇后运动能力恢复,表明 *fim* 基因簇编码产物参与细菌蹭动运动。

综上所述,利用含有抗生素耐药盒的线性 PCR 片段成功敲除了鲍曼不动杆菌 *fim* 基因簇,该方法能够在不引入外源质粒的情况下,快速地对鲍曼不动杆菌进行基因敲除。此外,鲍曼不动杆菌 Ab4294 *fim* 基因簇编码产物参与细菌蹭动运动,这些结果对进一步阐明 I 型菌毛系统在鲍曼不动杆菌中的作用具有重要意义。

参考文献

- [1] Mea H J, Yong P V C, Wong E H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: motility, adherence and biofilm formation [J]. Microbiol Res, 2021, 247: 126722.
- [2] Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy I M S, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(10): 6987-98.
- [3] Mannan T, Rafique M W, Bhatti M H, et al. Type 1 fimbriae and motility play a pivotal role during interactions of *Salmonella typhimurium* with *Acanthamoeba castellanii* (T4 Genotype) [J]. Curr Microbiol, 2020, 77(5): 836-45.
- [4] Capitani G, Eidam O, Glockshuber R, et al. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli* [J]. Microbes Infect, 2006, 8(8): 2284-90.
- [5] Lane M C, Simms A N, Mobley H L T. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(15): 5523-33.
- [6] Zeiner S A, Dwyer B E, Clegg S. FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. Infect Immun, 2012, 80(9): 3289-96.
- [7] Struve C, Bojer M, Krogfelt K A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence [J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 4055-65.
- [8] Liu Z, Wang L, Yu Y, et al. SteE Enhances the virulence of *Salmonella pullorum* in chickens by regulating the inflammation response [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 926505.
- [9] Amin I M, Richmond G E, Sen P, et al. A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 158.
- [10] 高彩虹,戴媛媛,常文娇,等.金黄色葡萄球菌二元调控系统 *vraSR* 基因敲除菌株的构建及其致病性研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(10): 1651-5.
- [11] 南楠,高洁,宫赛赛,等.鲍曼不动杆菌 *bauA* 与 *basD* 基

- 因缺失株的构建及其生物学功能研究[J]. 军事医学, 2022, 46(3): 179–83.
- [12] Henrichsen J. Twitching motility[J]. Annual review of microbiology, 1983, 37: 81–93.
- [13] Harding C M, Tracy E N, Carruthers M D, et al. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility[J]. mBio, 2013, 4(4): e00360–13.
- [14] Tucker A T, Nowicki E M, Boll J M, et al. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation[J]. mBio, 2014, 5(4): e01313–4.
- [15] Li L, Wang Y N, Jia H B, et al. The type VI secretion system protein AsaA in *Acinetobacter baumannii* is a periplasmic protein physically interacting with TssM and required for T6SS assembly[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9438.
- [16] Alonso-Caballero A, Schönfelder J, Poly S, et al. Mechanical architecture and folding of *E. coli* type 1 pilus domains[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 2758.

Rapid verification of the effect of *fim* family genes on the motility of *Acinetobacter baumannii* based on homologous recombination

Sun Qianzi^{1,2}, Ning Nianzhi², Wang Hui^{1,2}

(¹School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100071)

Abstract Objective To use linear PCR fragment containing antibiotic resistance cassette to carry out homologous recombination and replacement of target gene fragment of *Acinetobacter baumannii* to achieve rapid gene knockout and functional verification. **Methods** *Acinetobacter baumannii* Ab4294 was used as the research object, and the upper (901 bp) and lower (1 028 bp) reaches of *fim* gene cluster (4 980 bp in length) were amplified by PCR, which was used as the recombinant homologous arm. Kanamycin antibiotic resistance cassette (*KanR*) was amplified from pUC57 plasmid. The above three fragments were connected by overlapping extended PCR technique, and the connected fragments were transformed into wild *Acinetobacter baumannii* strains. The gene deletion mutant was screened, and the plasmid complement strain was constructed. The phenotype of the obtained strains was identified, and the function of *fim* gene cluster was explored. **Results** A mutant strain of *Acinetobacter baumannii* Ab4294 with deletion of *fim* gene cluster was successfully constructed by homologous substitution of linear PCR fragment containing antibiotic resistance cassette. Compared with the wild strain, the growth curve of the deletion strain had no significant difference, and the rubbing ability significantly decreased, and the phenotype recovered after complementing the gene cluster. **Conclusion** The *fim* family genes of *Acinetobacter baumannii* Ab4294 is successfully knocked out by homologous substitution of linear PCR fragment containing antibiotic resistance cassette, which encodes the product involved in the motile movement of *Acinetobacter baumannii*.

Key words *Acinetobacter baumannii*; deletion mutant; *fim* gene cluster; twitching motility