

分类号 R378.8

院校代码 88101

浙江省医学科学院

硕士学位论文

艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 蛋白表达、抗
体制备及其基因敲除株筛选

作者姓名：段慈东

学科专业：公共卫生与预防医学

指导教师：金大智 研究员

所在学院：公共卫生学院

提交日期：2024.06

**A dissertation submitted to Zhejiang Academy of
Medical Sciences for the Degree of Master**

**Expression of CamA Protein of Methyltransferase in
Clostridioides difficile, Preparation of its Antibodies and
Screening of *camA* gene Knockout Strain**

Candidate: Cidong Duan

Supervisor: Dazhi Jin, Ph.D. Professor

Major: Public Health and Preventive Medicine

Zhejiang Academy of Medical Sciences

Hangzhou 310013, P. R. China

June, 2024

目 录

缩略词说明表.....	8
第一章 绪论.....	10
1.1 引言.....	10
1.2 艰难拟梭菌概述.....	11
1.3 艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 研究进展.....	12
1.4 其他细菌 DNA 甲基化转移酶研究.....	13
1.5 论文的研究内容、意义与研究技术路线.....	14
1.5.1 论文的研究内容与意义.....	14
1.5.2 论文的技术路线.....	15
第二章 动物和人来源菌株中 camA 表达量检测.....	16
2.1 材料.....	16
2.1.1 实验菌株.....	16
2.1.2 实验试剂.....	16
2.1.3 实验仪器.....	17
2.1.4 CDCA 培养基配制.....	17
2.2 方法.....	17
2.2.1 细菌培养及 DNA 提取.....	17
2.2.2 多位点序列分型 MLST.....	18
2.2.3 相对定量 PCR 检测 camA 基因表达量.....	19
2.3 结果.....	21
2.3.1 动物和人来源菌株分子分型.....	22
2.3.2 动物来源菌株 camA 基因和 spoA 基因表达量.....	23
2.3.3 人来源菌株 camA 基因和 spoA 基因表达量.....	24
2.3.4 动物和人来源菌株的 camA 和 spoA 基因表达量分析.....	26
2.4 讨论.....	27
第三章 甲基转移酶 CamA 表达纯化、活性检测及抗体制备.....	30
3.1 材料.....	30
3.1.1 菌株和质粒.....	30
3.1.2 实验仪器.....	30
3.1.3 实验试剂.....	30
3.1.4 实验溶液配制.....	31
3.2 方法.....	33
3.2.1 重组载体构建.....	33
3.2.2 CamA 蛋白表达与纯化.....	34

3.2.3 CamA 蛋白体外甲基化活性测定	35
3.2.4 CamA 多克隆抗体制备及其性能检测	36
3.3 结果	39
3.3.1 重组载体构建	39
3.3.2 CamA 蛋白表达与纯化	40
3.3.3 CamA 蛋白体外甲基化活性测定	41
3.3.4 CamA 多克隆抗体 ELISA 效价分析	43
3.3.5 CamA 多克隆抗体 Western Blot 特异性检测	44
3.4 讨论	45
第四章 甲基转移酶 CamA 的 CRISPR-Cas 敲除系统构建	46
4.1 材料	46
4.1.1 菌株、质粒和引物	46
4.1.2 实验试剂	47
4.1.3 常用培养基及实验溶液配制	48
4.2 方法	48
4.2.1 菌株培养	48
4.2.2 敲除质粒及回补质粒的引物设计	49
4.2.3 敲除质粒的构建	57
4.2.4 回补质粒的构建	62
4.2.5 质粒电转化	62
4.2.6 三亲接合	62
4.2.7 诱导敲除	64
4.2.8 筛选敲除株	64
4.3 结果	65
4.3.1 gRNA 序列及同源臂扩增	65
4.3.2 敲除质粒和回补质粒的构建及验证	67
4.3.3 接合、诱导筛选敲除株	70
4.4 讨论	74
第五章 敲除株的芽孢形成能力和甲硝唑药敏表型研究	76
5.1 材料	76
5.1.1 菌株	76
5.1.2 实验仪器	76
5.1.3 实验试剂	76
5.1.4 实验培养基及溶液配制	76
5.2 方法	77
5.2.1 芽孢形成能力测定	77
5.2.2 甲硝唑敏感性测试	78
5.3 结果	78

5.3.1 芽孢形成能力检测.....	78
5.3.2 甲硝唑药敏实验结果.....	79
5.4 讨论.....	80
总结与展望.....	83
参考文献.....	84
细菌 DNA 甲基化综述.....	91
参考文献.....	101
附件 2 文章中所用引物序列	106

中文摘要

目的:

1. 研究动物和人来源菌株中艰难拟梭菌甲基化基因 $camA$ 和芽孢生成相关基因 $spoA$ 表达量,探究两种来源菌株基因表达量差异,验证两者基因间的相关性。
2. 检测甲基转移酶CamA体外活性,制备多克隆抗体并检测其效价和特异性。
3. 建立艰难拟梭菌CRISPR-Cas基因敲除技术体系,用Cas9和Cas12质粒敲除艰难拟梭菌标准菌株R20291的 $camA$ 基因,为后续研究艰难拟梭菌 $camA$ 基因调控的生物学功能奠定重要基础。

方法:

1. 通过专用显色培养基CDCA复苏本实验室保存的61份动物和人来源艰难拟梭菌分离株,厌氧培养后提取DNA,进行多位点序列分析MLST,获得特定等位基因谱;复苏的菌株经脑心浸出液肉汤增菌培养24 h后,提取RNA,开展甲基化相关基因 $camA$ 和芽孢生产相关基因 $spoA$ 的实时荧光定量PCR检测,分析动物和人来源艰难拟梭菌分离株的甲基化 $camA$ 表达量的差异以及验证 $camA$ 基因和 $spoA$ 基因的相关性。
2. 通过构建pGEX-4T-1-MBP- $camA$ 表达质粒体外诱导CamA蛋白并经SDS-PAGE蛋白电泳技术探究条件,利用淀粉树脂亲和层析柱获得CamA蛋白,经体外MTase-Glo™ Methyltransferase Assay试剂盒验证其活性;通过体外免疫兔子取其血清经亲和层析纯化获得CamA多克隆抗体,经间接法ELISA和Western Blot技术分析其抗体效价和特异性。
3. 通过PCR扩增针对 $camA$ 基因的gRNA和上下同源臂序列,经双酶切、切胶回收和无缝克隆技术构建于骨架pJK02上获得本实验室敲除 $camA$ 的Cas9和Cas12质粒,以三亲接合方式进入艰难拟梭菌标准菌株R20291,加入脱水四环素诱导,PCR筛选到敲除株,下一阶段将开展后续生物学研究;此外,借助体外切割技术,判定Cas12系统的gRNA是否具备靶向指挥Cas12切割目的基因的能力并以此作为选用gRNA参考,优化获得效率更高的gRNA并提高基因敲除概率;克隆 $camA$ 基因片段构建于骨架pMTL84151,获得回补质粒pMTL84151- $camA$ 用于后续相关生物学验证实验。

4. 通过琼脂稀释法开展缺失*camA*基因的敲除株甲硝唑敏感性测试，将甲硝唑工作液连续倍比稀释，配制好11个浓度梯度的药敏培养基，接种菌株并厌氧培养48 h后，参考CLSI标准对甲硝唑耐药的折点进行判定，即 $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ 为敏感， $16 \mu\text{g/mL}$ 为中介， $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 为耐药。

结果：

1. 28株动物来源菌株*camA*基因和*spoA*基因表达量均下降，而33株中有24株人来源菌株*camA*基因和*spoA*基因表达量升高；经Welch方差分析及Dunnett's T3多重比较可认为24株人来源菌株*camA*基因表达量高于28株动物菌株；分别采用Spearman相关性分析和Pearson相关性分析验证了动物和人来源菌株中*camA*基因表达量与其相对应*spoA*基因表达量两者间存在正相关。
2. PCR测序结果显示扩增的*camA*基因序列正确，未发生碱基突变；重组表达质粒pGEX-4T-1-MBP-*camA*经双酶切后显示1731 bp的*camA*基因已连接到载体质粒；重组大肠杆菌用1 mM IPTG诱导后表达的重组蛋白相对分子量约为108.8 KDa（含1个MBP标签）；再用Amylose Resin纯化用于体外甲基化活性检测，在20 μM DNA，20 μM SAM的条件下室温反应30 min，0.5 μg CamA能产生浓度约为 $101.60 \pm 0.94 \text{ nM SAH}$ ，酶活性为 $0.339 \pm 0.027 \text{ U/mg}$ ，结果表明CamA蛋白具有天然活性；通过间接法ELISA分析CamA多克隆抗体效价在1:2000处最佳且 $>1:128000$ 具有良好的检测能力；再经Western Blot验证 CamA多克隆抗体具有良好的特异性检测能力。
3. 构建了敲除*camA*基因的CRISPR-Cas9/Cas12质粒，筛选出缺失*camA*基因敲除株；开展了体外切割技术用于检测Cas12系统的gRNA是否具备靶向指挥Cas12切割目的基因的能力；构建了回补质粒pMTL84151-*camA*用于后续缺失甲基化基因*camA*敲除株相关生物学功能研究的回补验证实验。
4. 参照CLSI上推荐的艰难拟梭菌甲硝唑药物的折点判定标准解读时，缺失*camA*基因的敲除株对甲硝唑高度耐药。缺失*camA*基因的敲除株能在128 $\mu\text{g/mL}$ 的甲硝唑药敏平板上生长且含空质粒骨架pMTL84151的CD R2029I在甲硝唑药敏实验中生长的趋势与艰难拟梭菌标准菌株R2029I一致。

结论:

1. 国内首次对动物来源和人来源菌株甲基化基因*camA*表达量开展检测,发现两者间的甲基化水平不同,动物菌株*camA*表达量均降低而人来源菌株*camA*表达量大部分升高且33株人来源菌株中有24株的*camA*基因表达量高于28株动物菌株;不同菌株来源的甲基化基因*camA*表达量和芽孢生成相关基因*spoA*存在正相关。
2. 国内首次体外成功表达并纯化艰难拟梭菌甲基转移酶CamA蛋白并具有体外甲基化酶活性,制备的CamA多克隆抗体具有良好的检测能力和特异性。
3. 国内首次构建了Cas12质粒且改造了Cas9质粒用于敲除*camA*基因并成功诱导筛选到敲除株。
4. 国内首次开展了缺失*camA*基因敲除株的甲硝唑敏感性测试并发现其对甲硝唑高度耐药。

关键词:

艰难拟梭菌; *camA*基因; 甲基化酶CamA; 蛋白表达纯化; 多克隆抗体制备; CRISPR-Cas敲除系统

ABSTRACT

Objective:

1. To study the expression levels of methylation gene *camA* and sporulation related gene *spoA* of *Clostridioides difficile* in animal and human strains, explore the difference of gene expression levels between the two strains, and verify the correlation between the two genes.
2. To detect the activity of methyltransferase CamA in vitro, prepare polyclonal antibody and test its titer and specificity.
3. Establish a technical system for knocking out the CRISPR-Cas gene of *C. difficile*, and knock out the *camA* gene of the standard strain of *C. difficile* R20291 with Cas9 and Cas12 plasmid, which lays an important foundation for further study on the biological function of *camA* gene regulation of *C. difficile*.

Methods:

1. The 61 isolates of *C. difficile* isolated from animals and humans were recovered by special chromogenic medium CDCA. After anaerobic culture, DNA was extracted, and the specific allele spectrum was obtained by multi-locus sequence analysis MLST. After the resuscitated strain was enriched with brain-heart extract broth for 24 hours, RNA was extracted, and real-time fluorescence quantitative PCR detection of methylation-related gene *camA* and spore production-related gene *spoA* was carried out to analyze the difference of methylated *camA* expression between *C. difficile* isolates from animals and humans and to verify the correlation between *camA* and *spoA* gene.
2. The expression plasmid pGEX-4T-1-MBP-*camA* was constructed to induce CamA protein in vitro and the conditions were explored by SDS-PAGE, and the CamA protein was obtained by starch resin affinity chromatography column, and its activity was verified by methylation kit in vitro; The polyclonal antibody of CamA was obtained by affinity chromatography from the serum of rabbits immunized *in vitro*, and its titer and specificity were tested by indirect ELISA and Western Blot.
3. The gRNA and upper and lower homologous arm sequences of *camA* gene were

amplified by PCR, and the Cas9 and Cas12 plasmids of *camA*-knocked out in our laboratory were constructed on the skeleton pJK02 by double enzyme digestion, gel cutting recovery and seamless cloning techniques. They were introduced into the standard strain of *C. difficile* R20291 by triparental conjugation, induced by adding dehydrated tetracycline, and the knockout strains were screened by PCR, and the follow-up biological research will be carried out in the next stage. In addition, with the help of in vitro cutting technology, it is determined whether the gRNA of Cas12 system has the ability to target and direct Cas12 to cut the target gene, and this can be used as a reference for selecting gRNA, so as to optimize the probability of obtaining more efficient gRNA and improve the probability of gene knockout; The cloned *camA* gene fragment was constructed in the skeleton pMTL84151, and the complementary plasmid pMTL84151-*camA* was obtained for subsequent related biological verification experiments.

4. The sensitivity test of metronidazole was carried out by agar dilution method, and the metronidazole working solution was continuously diluted at multiple times to prepare 1 l concentration gradients of drug-sensitive media. After inoculating the strains and anaerobic culture for 48 hours, the breaking point of metronidazole resistance was judged with reference to CLSI standard, that is, $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ was the sensitivity, $16 \mu\text{g/mL}$ was the medium, and $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ was the resistance.

Results:

1. Compared with the standard strain of *C. difficile* R20291, the expression levels of *camA* and *spoA* genes in 28 animal isolates decreased, while the expression levels of *camA* and *spoA* genes in 24 of 33 human isolates mainly increased. According to Welch variance analysis and Dunnett's T3 multiple comparison, it can be concluded that the expression of *camA* gene in 24 strains of human origin is higher than that in 28 strains of animals. Spearman correlation analysis and Pearson correlation analysis were used to verify that there is a positive correlation between *camA* gene expression and its corresponding *spoA* gene expression in animal and human isolates.

2. The PCR sequencing results showed that the amplified *camA* gene sequence was

correct and there was no base mutation; The recombinant expression plasmid pGEX-4T-1-MBP-*camA* was digested with double enzymes, and the 1731 bp *camA* gene was linked to the vector plasmid. The relative molecular weight of recombinant protein expressed by recombinant *Escherichia coli* induced by 1 mM IPTG was about 108 800 (including one MBP tag). It was purified by Amylose Resin and used to detect methylation activity in vitro. Under the conditions of 20 μ M DNA and 20 μ M SAM, the reaction time was 30 min at room temperature, and 0.5 μ g CamA could produce SAH with a concentration of about 101.60 ± 0.94 nM and an enzyme activity of 0.339 ± 0.027 U/mg. The results showed that CamA protein had natural activity. The titer of CamA polyclonal antibody is the best at 1:2000 by indirect ELISA, and it has good detection ability when it is more than 1:128000. The Western Blot results showed that CamA polyclonal antibody had good specific detection ability.

3. The plasmid CRISPR-Cas9/Cas12 with *camA* gene knockout was constructed, and the *camA* gene knockout strain was screened out. In vitro cleavage technology was carried out to test whether gRNA of Cas12 system has the ability to target Cas12 to cleave the target gene. A complementary plasmid pMTL84151-*camA* was constructed for the subsequent research on biological functions of *camA* knockout strains with methylation gene deletion.

4. According to the breaking point criterion of metronidazole drugs of *C. difficile* recommended by CLSI, the knockout strains lacking *camA* gene were highly resistant to metronidazole. The knockout strain lacking *camA* gene can grow on the metronidazole drug-sensitive plate of 128 μ g/mL, and the growth trend of *CD R20291* containing empty plasmid skeleton pMTL84151 in metronidazole drug-sensitive experiment is consistent with the standard strain of *C. difficile R20291*.

Conclusions:

1. The expression levels of methylation gene *camA* in animal and human isolates were detected for the first time in China, and it was found that the methylation levels were different between them. The expression levels of *camA* in animal strains decreased, while the expression levels of *camA* in human strains mostly increased, and the expression levels of *camA* gene in 24 of 33 human strains were higher than that in 28 animal strains. There is a positive correlation between the expression of methylation gene *camA* from different strains and sporulation related gene *spoA*.
2. The CamA protein of *C. difficile* methyltransferase was successfully expressed and purified in vitro for the first time in China, and it has methylase activity in vitro. The prepared CamA polyclonal antibody had good detection ability and specificity.
3. The Cas12 plasmid was constructed for the first time in China and the Cas9 plasmid was modified to knock out *camA* gene. The knockout strains were successfully induced and screened.
4. The sensitivity test of metronidazole was carried out for the first time in China, and it was found that it was highly resistant to metronidazole.

Key Words:

Clostridioide difficile; *camA* gene; CamA; Protein expression and purification; Preparation of polyclonal antibody; Construction of CRISPR-Cas knockout system

缩略词说明表

缩略词	英文全称	中文全称
Ab	Antibody	抗体
APS	Ammonium persulphate	过硫酸铵
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AMR	Antimicrobial resistance	抗微生物药物耐药
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BHI	Brain heart infusion broth	脑心浸出液肉汤
CD	<i>Clostridioides difficile</i>	艰难拟梭菌
Chr	Chloramphenicol	氯霉素
CamA	<i>Clostridioides difficile</i> adenine methltransferase A	艰难拟梭菌腺嘌呤甲基转移酶
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> infection	艰难拟梭菌感染
CDAD	Antibiotic-associated diarrhea	抗生素相关性腹泻
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	美国临床和实验室标准协会
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DEPC	Diethylpyrocarbonate	二甲基亚硝基乙酰胺
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希氏杆菌
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
eATC	epianhydrotetracycline	脱水四环素
gRNA	guide RNA	向导 RNA
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosion	异丙基硫代- β -半乳糖苷

续表

缩略词	英文全称	中文全称
KDa	Kilo Dalton	千道尔顿
Kan	Kanamycin	卡那霉素
MLST	Multilocus sequence typing	多位点序列分型
mA	milli-ampere	毫安
MBP	Maltose Binding Protein	麦芽糖标签蛋白
RCF	Relative centrifugal force	相对离心力
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate buffered saline with tween20	含吐温 20 的磷酸盐缓冲液
RT	Ribotyping	核糖体分型
ST	Sequence type	序列型
TEV	Tobacco etch virus protease	烟草蚀纹病毒蛋白酶
Tm	Thiamphenicol	甲砒霉素
V	Volt	伏特
6mA	N ⁶ -methyladenine	N ⁶ -甲基腺嘌呤

第一章 绪论

1.1 引言

表观遗传调控是基因序列不发生改变的情况下在转录和（或）转录后水平上调控基因表达的生物学现象，如 DNA 甲基化、基因沉默、RNA 编辑和染色质构象变化等^[1-4]。DNA 甲基化是表观遗传学中常见的修饰方式，在 DNA 复制和修复、细胞周期、染色体分离和基因表达等生物过程发挥了重要作用^[2,5-7]。目前研究发现了 2200 多种细菌^[8]的甲基化组，表明细菌表观遗传调控现象普遍存在。细菌 DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferase, DNA MTase）^[5,8]可保护细胞自身甲基化的 DNA 序列不被与其配对的限制性核酸内切酶切割。在细菌中 N⁶-甲基腺嘌呤（N⁶-methyladenine, 6mA）是最常见的 DNA 甲基化形式^[2]，且细菌以 S-腺苷甲硫氨酸 SAM 作为甲基供体通过限制修饰系统相关甲基转移酶和孤儿甲基转移酶完成了 6mA 甲基化修饰，该类甲基化酶称为 N⁶-腺苷酸甲基转移酶（N⁶-adenylate methyltransferase, 6mA MTase）^[4,6,9]。原核生物中孤儿甲基转移酶可根据其编码基因和靶序列等特征进行划分，如首次分别在大肠杆菌和新月柄杆菌中发现的 DNA 腺嘌呤甲基化酶 Dam^[8]和细胞周期调控性甲基化酶 CcrM^[9]。Dam 和 CcrM 都可控制染色体复制、DNA 修复和基因表达等。在多种病原微生物中，甲基化酶均通过甲基化修饰行使生物学功能^[10]。

艰难拟梭菌（*Clostridioides difficile*, *C. difficile* 或 CD）是一种产芽孢革兰阳性条件致病菌，经本实验室研发的艰难拟梭菌显色培养基（*Clostridioides difficile* Chromogenic Agar, CDCA）厌氧培养^[11]，能在 CDCA 平板上长出表面呈灰白、粗糙，形状似扁平状特征的 *C. difficile* 菌落。*C. difficile* 产芽孢，通过粪-口途径传播，其发病机制主要依赖产生毒素（即毒素 A 和毒素 B）作用于机体肠道组织引发炎症而致病^[12, 13]。为了进一步对 *C. difficile* 研究，目前通过单分子实时测序技术（single-molecule real time sequencing, SMRT-seq）在艰难拟梭菌中新发现的 CamA 蛋白（*Clostridioides difficile* adenine methyltransferase A, CamA）也属于孤儿甲基转移酶^[14]。REBASE 技术^[15]证明甲基化酶 CamA 仅存在极少数其他梭状芽孢杆菌目和梭状杆菌目，却广泛存在于艰难拟梭菌。因此，甲基化

酶 CamA 是艰难拟梭菌高度保守的甲基转移酶，并依据艰难拟梭菌腺嘌呤甲基转移酶 A 相应英文字母进行命名。甲基化酶 CamA 的靶基序是一个不对称 6-bp 序列，即 CAAAAA（下划线为突出目标基因 A），该序列普遍存在于艰难拟梭菌的基因组中。CamA 介导了 CAAAAA 基因序列的甲基化修饰，与艰难拟梭菌芽孢发芽、生物膜形成以及在肠道定植等密切相关^[14]。

甲基转移酶 CamA 是艰难拟梭菌中广谱且高度保守 DNA 甲基化酶，参与芽孢生成、生物膜形成重要生物学的调节，并在艰难拟梭菌抵御外界压力和致病传播方面起到关键作用，但是其调控机制尚不清楚。所以，本实验从流行病学角度对动物和人来源艰难拟梭菌分离株开展 *camA* 基因的 mRNA 水平上表达检测，并验证 *camA* 基因与 *spoA* 基因表达量的相关性；通过原核表达并纯化后获得 CamA 蛋白，验证其体外生物学活性；将 CamA 蛋白体外免疫兔子制备多克隆抗体，体外验证其效价和特异性参数；构建针对 *camA* 基因 CRISPR 敲除质粒，旨在更深入研究艰难拟梭菌甲基化酶 CamA 的生物学功能并解析其调控机制，为临床医学在艰难拟梭菌感染发生、发展及治疗中的研究提供实验基础。

1.2 艰难拟梭菌概述

艰难梭菌是一种严格厌氧产芽孢革兰阳性细菌，属于条件致病菌^[11, 14]。2016 年 Lawson 等对梭菌属重新划分，并按照优先排列的命名原则将艰难梭菌从梭菌属划分到拟梭菌属，获得新的命名为艰难拟梭菌（*Clostridioides difficile*, *C.difficile*）于 2019 年被收录到美国生物学会颁发的《临床微生物学手册（第 12 版）》^[16]。利用艰难拟梭菌显色培养基（*Clostridioides difficile* Chromogenic Agar, CDCA）^[11]经 48 h 厌氧培养，能获得表面呈灰白、粗糙，形状似扁平状的菌落特征（图 1-1）。*C.difficile* 主要以粪-口途径的方式传播，并在机体肠道繁殖导致艰难拟梭菌感染（*Clostridioides difficile* infection, CDI）^[17]。

在 CDI 期间，*C.difficile* 主要产生肠毒素 A（TcdA）和细胞毒素 B（TcdB）作用于机体回肠部，引发肠黏膜损伤、内容物分泌和肠壁细胞坏死，最终使机体表现出临床特有的症状，如轻度至重度腹泻、结肠炎、伪膜性结肠炎、中毒性巨结肠等疾病，严重者甚至引发死亡^[18]。对于 CDI 的治疗，临床上采用抗生素作为首选方案，并根据欧洲临床微生物学和传染病学^[19]会发布的 CDI 治疗指南，对 CDI 的轻度和重度分别采用甲硝唑和万古霉素作为优先治疗方案^[20, 21]，

此外，具有抑制 RNA 合成的非达霉素^[22]也用于 CDI 治疗，但与前两种抗生素相比，非达霉素成本较高给患者带来的医疗负担较重，这限制了其在临床上的使用。临床上，由于抗生素的大量使用导致肠道微生态平衡被打乱，这不仅增加抗生素相关性腹泻（*Clostridioides difficile* Antibiotic-associated diarrhea, CDCA）症状的发生率，而且让 *C.difficile* 在肠道的厌氧环境中获得可乘之机逐渐成为优势菌，大量繁殖产毒导致艰难拟梭菌感染并促使其对临床常见抗生素耐药，艰难拟梭菌的耐药机制多种多样，包括化学修饰造成失效、药物靶点的修饰以及药物的主动外排等^[19, 23, 24]。

此外，*C.difficile* 也产生芽孢，芽孢位于菌体次极端，可在体外极端环境中存活数月以上，若其在适当的条件下，*C.difficile* 的芽孢会发芽并生长出致病性的营养形式这导致 *C.difficile* 在患者体内的持续生长和病情复发^[25-27]。近年来，CDI 的发病率、死亡率、严重程度以及医治成本逐年上升，从 2007 年美国受艰难拟梭菌感染的人数超过 30 万人且死亡人数达到 1.4 万人到 2011 年感染的人数达到 50 万人和死亡人数接近 3 万人^[28]，这表明 *C.difficile* 成为公共卫生与预防医学领域的主要威胁，急需采取干预措施。

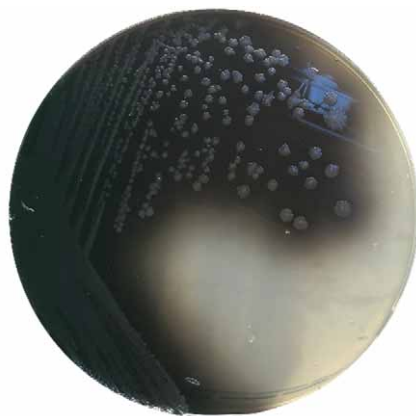


图 1-1 艰难拟梭菌在 CDCA 培养基上的菌落形态

Fig. 1-1 Colony morphology of *Clostridioides difficile* on CDCA medium

1.3 艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 研究进展

2019 年，Oliveira PH, Ribis JW, Garrett EM 等科学家^[14]使用单分子实时测序技术和比较表观基因组学对 36 份人类分离株和 300 多个全球艰难拟梭菌基因组进行全面的 DNA 甲基组分析，发现艰难拟梭菌中一种具有高水平的表观基因组多样性和保守性的 DNA 甲基转移酶 CamA，并通过多组学数据、遗传实验和小

鼠模型证实了 CamA 甲基化修饰与细胞长度、生物膜形成和宿主定殖有关，以及通过敲除实验从反面论证了 CamA 甲基转移酶基因的失活对芽孢形成产生负面影响。2021 年，Zhou J, Horton JR 等科学家^[15]从蛋白质层面解密了 CamA 含有一个催化甲基转移的 N-末端结构域和一个 C-末端 DNA 识别结构域，识别部位的结构域与凹槽 DNA 接触，通过碱基特定的氢键、van der Waals 接触和重新排列的 A:T 碱基对的 Watson-Crick 配对的方式提供了足够的序列辨别力，以确保高度的特异性；解析了与其相识别特异性 DNA 复合物序列 5'-CGATTCAA AAGTCCCAAG-3'；此外，甲基供体 S-腺苷-L-蛋氨酸（SAM）的弱结合可能为使用 SAM 类似物抑制 CamA 活性提供了新思路。2022 年，Zhou J, Horton JR, Yu D 等科学家^[29]基于 CamA 相关的动力学参数和结构特征，寻找到三种能够在体外低摩尔条件下抑制 CamA 活性的 SAM 类似物，分别是 SGC0946（DOT1L 的抑制剂）、JNJ-64619178（PrMT5 的抑制剂）和 SGC8158（PrMT7 的抑制剂）。这些科学家在 CamA 抑制剂方面迈出实质性的第一步，在短期内作为化学探针来研究 CamA 控制孢子形成和定植的细胞机制，并最终作为治疗艰难拟梭菌感染的治疗性抗毒力药物。近年来，艰难拟梭菌感染的流行性与致死率逐年上升，寻找有效的 CamA 抑制剂对艰难拟梭菌致病机制的研究具有重要的意义。

1.4 其他细菌 DNA 甲基化转移酶研究

大肠杆菌的 Dam 甲基化转移酶，且研究较为透彻的 MTase，也是已知的甲基化酶分类最为广泛的一类^[10]，Dam 在大多数 γ 杆菌中的甲基化位点为 GATC，参与着纠正复制错误的碱基。孤儿甲基化酶 Dam 不仅控制着 DNA 复制，还可以直接甲基化修饰腺嘌呤碱基来指导错配修复；在沙门菌中，Dam 介导的甲基化间接调控其毒力因子的表达，如 Wion 等^[2, 10]的研究表明，敲除 *dam* 导致的 GATC 甲基化缺失，引起相关分泌蛋白的变化导致毒力减弱，而 Cohen 等的研究表明，敲除 *dam* 使大肠杆菌对抗生素更加敏感。Yallaly 等^[22]也发现，Dam 蛋白活力缺失的大肠杆菌对 H_2O_2 会更加敏感，导致其存活率降低；而过表达 *dam* 并没有增强野生型大肠杆菌对 H_2O_2 抵抗力，反而更加降低了其存活率，他们推测，合适量的 Dam 能增加细菌抗氧化能力。新月柄杆菌的 CcrM 甲基化转移酶其甲基化位点为 GANTC，调控着其不对称细胞分裂周期，CcrM 参与至少 200 个基因的转录调控，其中至少 40 个直接受 CcrM 甲基化的影响^[6]。弯曲杆菌中

的 CtsM 甲基化转移酶携带至少一个甲基化 RAATTY 位点有利于 DNA 的摄取。Dcm 是一种孤儿 m5C MTase 修饰 CCWGG，其在整个埃希氏菌属和沙门氏菌属中是保守的，Dcm 甲基化能影响核糖体基因的表达，通过减少稳定期核糖体蛋白基因 *rplC* 和 *rpsJ* 以及耐药转运蛋白 *sugE* 的表达，从而影响初级代谢和次级代谢^[30]。伯克霍尔德氏菌的 M.BceJ 甲基化转移酶具有非常强的保守性，也存在于鼻疽杆菌、鼻疽杆菌、类鼻疽杆菌、泰国鼻疽杆菌^[31]。

1.5 论文的研究内容、意义与研究技术路线

1.5.1 论文的研究内容与意义

1. 国内首次开展动物和人来源菌株甲基化基因 *camA* 在 mRNA 水平上表达检测，利用 Welch 方差分析及 Dunnett's T3 多重比较证明动物和人来源艰难拟梭菌分离株的 *camA* 基因表达量差异具有统计学意义，其中大多数的人来源菌株 *camA* 基因表达量升高，为下一步开展临床样本甲基化检测工作做好了前期准备，拟从表观遗传学角度解析动物和人来源菌株艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 的差异奠定基础；验证了甲基化基因 *camA* 与芽孢相关基因 *spoA* 表达量具有相关性；
2. 国内首次原核表达纯化 CamA 蛋白并开展体外活性检测、制备 CamA 多克隆抗体并开展效价和特异性分析，为后续从蛋白水平检测艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 研究奠定了基础；
3. 目前在艰难拟梭菌基因敲除中以同源重组敲除技术为主而 CRISPR-Cas 基因编辑技术尚不成熟，为了建立艰难拟梭菌专用的 CRISPR-Cas 基因敲除平台。本文拟用改造的 Cas9 和国内首次构建的 Cas12 质粒敲除标准菌株 R20291 的 *camA* 基因获得敲除株，为研究 *camA* 基因调控的生物学特征并解析分子机制奠定基础；
4. 进一步开展敲除株的芽孢形成能力和甲硝唑药敏表型研究，由于甲基转移酶 CamA 是艰难拟梭菌中高度保守 DNA 甲基化酶，可能也参与除了芽孢形成外的生物学活动如药敏实验，因甲硝唑为临床上治疗艰难拟梭菌感染的一线药物但对甲硝唑作用于艰难拟梭菌的具体机制目前仍然不明确，尝试用缺失 *camA* 基因的敲除株进行甲硝唑敏感性测试发现其对甲硝唑高度耐药，后续将开展分子层面研究解析甲基唑治疗艰难拟梭菌感染的分子机制。

1.5.2 论文的技术路线

本文技术路线如图 1-2 所示。

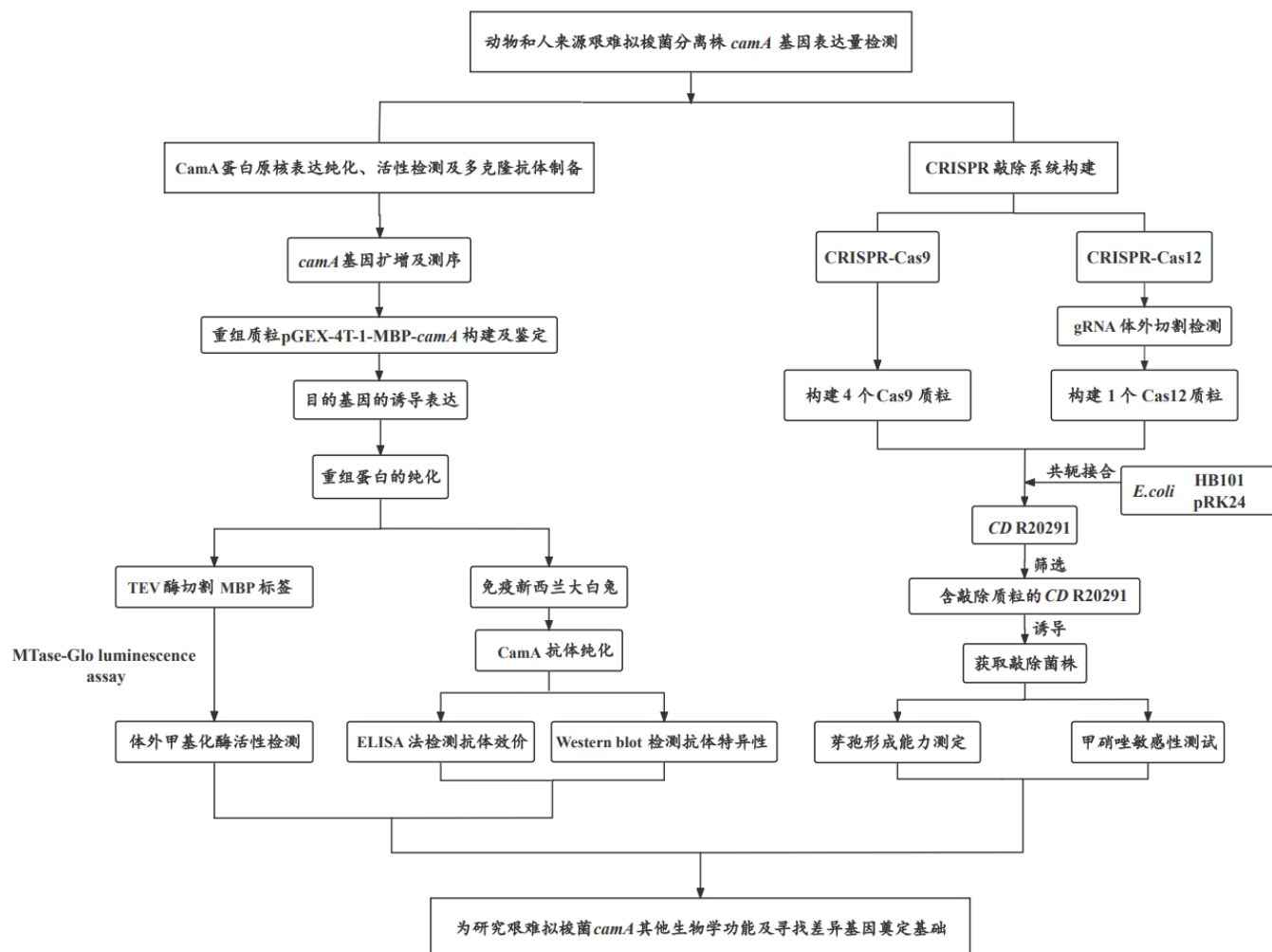


图 1-2 本文技术路线

Fig. 1-2 flow of this study

第二章 动物和人来源菌株中 *camA* 表达量检测

2.1 材料

2.1.1 实验菌株

一、动物和人来源菌株

28 株动物源菌株（包括 12 株 ST35 型、9 株 ST1 型、3 株 ST48、3 株 ST5 和 1 株 ST81），33 株 ST35 型人源菌株；61 株动物和人来源菌株均由课题组历年收集保存。

二、质控菌株

艰难拟梭菌标准菌株 *R20291*，简称 *CD R20291*（由西湖大学生命科学学院陶亮研究员提供）

2.1.2 实验试剂

本实验所使用的主要实验试剂见表 1-1。

表 1-1 本实验所使用的主要实验试剂

Table 1-1 The main reagents used in this study

试剂名称	试剂品牌
0.2 mL PCR 八联排管（含盖）	北京信科奥达生物科技有限公司
各型号移液枪头	美国 Axygen 公司
1.5 mL 微量离心管	德国 Eppendorf 公司
15 mL 与 50 mL 离心管	美国 Thermo 公司
一次性细菌培养皿	北京兰杰科技有限公司
一次性接种环	北京兰杰科技有限公司
无水乙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
Universal RNA Extraction Kit	北京宝日医生物技术有限公司
Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0	北京宝日医生物技术有限公司
一次性棉试子	意大利 COPAN 公司
荧光定量试剂盒 SYBR qPCR SuperMix Plus	苏州近岸蛋白科技股份有限公司
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	北京宝日医生物技术有限公司

2.1.3 实验仪器

本实验所使用的主要实验仪器见表 1-2。

表 1-2 本实验所使用的主要实验仪器

Table 1-2 Major instruments and equipment used in the study

仪器名称	仪器生产单位
-80℃超低温冰箱	美国 Thermo 公司
4℃及-20℃冰箱	中国海尔公司
生物安全柜	美国 Thermo 公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌锅	日本 Panasonic 公司
生化培养箱	浙江华盛源仪器有限公司
厌氧培养系统	杭州大微生物技术公司
各型号移液枪	德国 Eppendorf 公司
7500 qPCR 实时荧光定量仪	美国 Thermo 公司
PCR 基因扩增仪	美国 Bio-Rad 公司
超微量分光光度计	美国 Thermo 公司
qPCR 实时荧光定量仪	美国 Thermo 公司

2.1.4 CDCA 培养基配制

按照 CDCA 专利配方（申请号：201610380128.4）称取相应的成分，加入 800 mL ddH₂O；pH 调至 7.4±0.2；放入高压灭菌锅，参数设定为 121℃高压灭菌 15 min，冷却至 50℃左右；在生物安全柜中向培养基中加入 8 µg/mL 头孢西丁和 125 µg/mL 环丝氨酸，摇晃混匀，并分装至细菌培养皿（每块细菌培养皿分装 15 mL 左右），4℃储存待用。

2.2 方法

2.2.1 细菌培养及 DNA 提取

采用三区划线法将动物和人来源菌株复苏至 CDCA 厌氧培养 48 h 后，参照 TaKaRa 生物公司中细菌基因组提取试剂盒中的革兰阳性菌操作，具体如下：

1) 用 1.5 mL EP 管收集处于对数生长期的细胞，13,400×g，2 分钟，弃上清。

- 2) 向上述 EP 管中加入 500 μL Buffer BS 和 50 μL 的溶菌酶, 充分吸打混匀, 37°C, 温育 60 分钟。注: 溶菌酶浓度为 20 mg/mL。
- 3) 13,400 $\times g$, 5 分钟, 弃上清。
- 4) 加入试剂盒中 180 μL Buffer GL、20 μL 蛋白酶 K 和 10 μL RNase A, 充分吸打混匀, 56°C 温育 10 分钟, 使溶液呈透明、澄清状。注: 蛋白酶 K 浓度为 20 mg/mL, RNase A 浓度为 10 mg/mL。
- 5) 继续向该 EP 管中加入 200 μL Buffer GB 和 200 μL 无水乙醇, 充分混匀。
- 6) 组装 Spin Column 于 Collection Tube 上, 将 EP 管所有溶液移至 Spin Column 中 13,400 $\times g$, 2 分钟, 弃滤液。
- 7) 加入 500 μL Buffer WA 至 Spin Column 中, 13,400 $\times g$, 1 分钟, 弃滤液。
- 8) 加入 700 μL 含有指定体积 100%乙醇的 Buffer WB 至 Spin Column 中, 13,400 $\times g$, 1 分钟, 弃滤液。
- 9) 重复上述步骤 8) 一遍。
- 10) 将 Spin Column 组装于 Collection Tube 上, 13,400 $\times g$ 离心 2 分钟。
- 11) 将 Spin Column 组装于 1.5 mL 新的 EP 管上, 在 Spin Column 膜中央处加入 100 μL 的已经加热至 65°C 灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 5 分钟。
- 12) 洗脱 DNA, 13,400 $\times g$, 2 分钟。
- 13) 测定 DNA 浓度, 使用超微量分光光度计根据 DNA 在 260 nm 处有最大吸收峰测定 DNA 浓度。

2.2.2 多位点序列分型 MLST

2.2.2.1 管家基因的 PCR 扩增

多位点序列分型参照 Griffith 等^[32]的方法, 选取 *adk*、*atpA*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA*、*tpi* 7 个管家基因, 其引物序列见表 1-3, 通过 PCR 扩增测序并比对。以提取的艰难拟梭菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 总体系为 25 μL , 七个管家基因的 PCR 扩增体系如下: Taq DNA 聚合酶 0.2 μL , 10x PCR 缓冲液 2.5 μL , dNTP 2 μL , 上下游引物各 1 μL , 基因组 DNA 2 μL , 使用 ddH₂O 补足至 25 μL ; 通过第一阶段 94°C 预变性 15 min; 第二阶段 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 第三阶段 72°C 再延伸 5 min 的扩增程序扩增上述 7 个管家基因。

2.2.2.2 MLST 型别的判定

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，阳性结果送至上海生物工程有限公司测序，利用 Chromas 软件将峰图单一样本的 7 个管家基因序列上传至艰难拟梭菌的 MLST 数据库 (https://pubmlst.org/organisms/clostridioides_difficile/) 进行比对，从而获得相对应的 MLST 型别。

表 1-3 艰难拟梭菌 7 个管家基因的引物序列

Table 1-3 Primer Sequences of Seven Housekeeping Genes of *C.difficile*

管家基因	引物	碱基序列 5'—3'	条带大小 (bp)
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -F	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG	640
	<i>tpi</i> -R	TTGAAGGTTTAACACTTCCACC	
<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -F	TGATGATTTAAGTAAACAAGCTG	674
	<i>atpA</i> -R	AATCATGAGTGAAGTCTTCTCC	
<i>dxr</i>	<i>dxr</i> -F	GCTACTTTCCATTCTATCTG	525
	<i>dxr</i> -R	CCAACTCTTTGTGCTATAAA	
<i>glyA</i>	<i>glyA</i> -F	ATAGCTGATGAGGTTGGAGC	625
	<i>glyA</i> -R	TTCTAGCCTTAGATTCTTCATC	
<i>recA</i>	<i>recA</i> -F	CAGTAATGAAATTGGGAGAAGC	705
	<i>recA</i> -R	ATTCAGCTTGCTTAAATGGTG	
<i>sodA</i>	<i>sodA</i> -F	CCAGTTGTCAATGTATTCATTTC	585
	<i>sodA</i> -R	ATAACTTCATTTGCTTTTACACC	
<i>adK</i>	<i>adk</i> -F	TTACTTGGACCTCCAGGTGC	635
	<i>adk</i> -R	TTTCCACTTCCTAAGGCTGC	

2.2.3 相对定量 PCR 检测 *camA* 基因表达量

2.2.3.1 细菌 RNA 的提取

复苏的菌株经脑心浸出液肉汤 (BHI) 增菌培养 24 h 后按宝日医生物技术有限公司的 RNA 提取试剂盒说明书操作，具体步骤如下：

- 1) 将过夜培养的液体菌移入经 DEPC 水处理过的 EP 管中，8,000×g，2 分钟，4℃，弃上清。
- 2) 使用 1xPBS 清洗一次，8,000×g，2 分钟，4℃，弃上清。

- 3) 向收集的菌体沉淀中加入 600 μL 含 DTT 的 Buffer RL, 使用移液枪反复吹打直至无明显沉淀。
- 4) 放置冰上再裂解 5 分钟。
- 5) 加入等体积 70%乙醇可能会产生沉淀, 使用移液枪将溶液混匀。
- 6) 将上述液体转移到组装好的 RNA Spin Column 中。注: RNA Spin Column 最大加入溶液体积为 600 μL 。
- 7) 13,400 $\times g$, 1 分钟, 弃滤液。
- 8) 加入 500 μL Buffer RWA 至 RNA Spin Column 经 13,400 $\times g$, 30 秒, 弃滤液。
- 9) 加入 600 μL 含有指定体积 100%乙醇的 Buffer RWB 至 RNA Spin Column 中, 13,400 $\times g$, 30 秒, 弃滤液。再重复步骤 9) 一遍。
- 10) 将 RNA Spin Column 重新组装于 Collection Tube, 13,400 $\times g$, 2 分钟, 弃 Collection Tube 及其收集液。
- 11) 将 RNA Spin Column 再重新组装于 1.5 mL 新的 RNase Free Collection Tube 上, 向膜中央加入 100 μL 的 RNase Free ddH₂O, 室温静置 5 分钟。
- 12) 13,400 $\times g$, 2 分钟, 洗脱 RNA。
- 13) 使用超微量分光光度计测定 RNA 浓度。

2.2.3.2 总 RNA 的逆转录

(1) 去除 gDNA

按表 1-4 在冰上配制去除 gDNA 的反应体系, 先按多两个反应量配制混合液, 再分装到八联排管中, 最后加入先前提取的总 RNA, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min。

(2) 反转录反应

按表 1-5 在冰上配制逆转录的反应体系, 先按多两个反应量配制混合液, 再取 10 μL 分装到上述该八联排管中, 轻轻混匀后第一阶段经 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 第二阶段 85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s; 用于后续 qPCR 实验检测基因表达量。

表 1-4 去除 gDNA 的反应体系

Table 1-4 Reaction system for removing gDNA

试剂	使用量
5x gDNA Eraser Buffer	2 μL
gDNA Eraser	1 μL

Total RNA	1 μg
RNase Free ddH ₂ O	up to 10 μL

表 1-5 逆转录的反应体系

Table 1-5 Reverse transcription reaction system

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μL
RT Primer Mix	1 μL
5x PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 μL
RNase Free ddH ₂ O	4 μL
Total	20 μL

2.2.3.3 相对定量 PCR 检测流程

qPCR 体系配制如下：2x SuperMix 10 μL ，上下游引物各 1 μL ，艰难拟梭菌 cDNA 0.2 μL ，使用 ddH₂O 补足至 20 μL ；程序设置为：95°C 预变性 5 min；95°C 变性 15 s，60°C 退火 30 s 并在该步骤处采集荧光信号，共 40 个循环。qPCR 运行结束后，首先将实验菌株目的基因 *camA* 的 Ct 值减去内参基因 *rpoB* 的 Ct 值得到 ΔCt 值；其次，用实验菌株 ΔCt 值减去 *CD R20291* 的 ΔCt 值得到 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值；再次，计算各株菌的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值。注：2 为底数， $-\Delta\Delta\text{Ct}$ 值为指数。本章所使用引物见表 1-6。

表 1-6 本章所使用的引物

Table 1-6 The primers used in this study

引物	碱基序列 5'—3'
<i>qcamA</i> -F	AGAGATTGCTATCTGACGAATGGA
<i>qcamA</i> -R	AACGCTTTATCACACCCTGT
<i>spoA</i> -F	ATGGGGGGGATTTTGTAGTGG
<i>spoA</i> -R	TCATTGAGTCTCTTGAAGTGGTC
<i>rpoB</i> -F	ACCATGCTCTATCACAGGTGC
<i>rpoB</i> -R	TCAGCAGAAACATAACCTCTACC

2.3 结果

2.3.1 动物和人来源菌株分子分型

61 株动物和人来源菌株分子分型见表 1-7，通过比对艰难拟梭菌 MLST 数据库，证实 28 株动物源菌株中 12 株为 ST35 型、9 株为 ST1 型、3 株为 ST48、3 株为 ST5 和 1 为株 ST81，33 株人源菌株均为 ST35 型。

表 1-7 本实验动物和人来源菌株分子分型

Table 1-7 Molecular typing of animal and human isolates in this study

动物菌株编号	ST	人菌株编号	ST
SDA39	1	JE18	35
QZ105	1	AUS25	35
SC01	1	1529	35
SDA8	1	1517	35
SDA12	1	1841	35
SDA73	1	1849	35
LY113	1	1498	35
SDA37	1	ZJ45	35
SDA40	1	HK33	35
QZ291	5	1504	35
QZ48	5	FY56	35
QZ298	5	LE166	35
QZ76	35	YY14	35
QZ91	35	1511	35
QZ121	35	SH40	35
QZ297	35	SZ39	35
SX08	35	SR39	35
QZ65	35	BJ1282	35
QZ64	35	1329	35
SDA9	35	1536	35
QZ80	35	1347	35
QZ66	35	HB63	35
QZ59	35	1491	35
QZ58	35	JE29	35
NBA56	48	1855	35
LY64	48	LE99	35
QZ136	48	HB64	35
QZ74	81	LE23	35
		HK42	35
		FY56	35
		JE54	35
		679	35
		JE31	35

2.3.2 动物来源菌株 *camA* 基因和 *spoA* 基因表达量

28 株动物来源菌株的 cDNA 经 qPCR 反应，记录 CT 值并计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ，经 Graphpad Prism 9 软件分析，发现动物菌株和标准菌株 *CD R20291* 菌株 *camA* 基因表达量分别为 0.172 ± 0.111 和 1.012 ± 0.101 ，经两独立样本 T 检验 $P < 0.05$ ；发现动物菌株和标准菌株 *CD R20291* 的 *spoA* 基因表达量分别为【注：采用中位数（四分位数）进行统计描述】 0.149 （ $0.096, 0.199$ ）和 1.038 （ $0.920, 1.050$ ），经非参数 Mann-Whitney 检验 $P = 0.0004$ ；28 株动物菌株 *camA* 基因和 *spoA* 基因表达量与标准菌株 *CD R20291* 相比表达量均下降，见图 2-1 和图 2-2。综上，28 株动物来源菌株 *camA* 基因表达量和 *spoA* 基因表达量经统计分析中的 Spearman 相关性分析，相关系数 $r = 0.3083$ ， $P < 0.05$ ，则在动物来源菌株中 *camA* 基因表达量与 *spoA* 基因表达量具有正相关，见图 2-3。

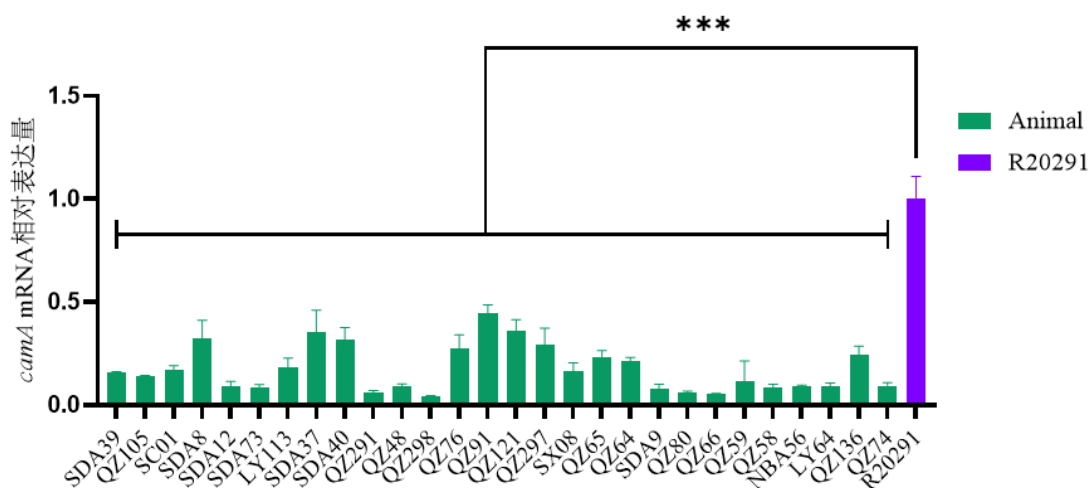
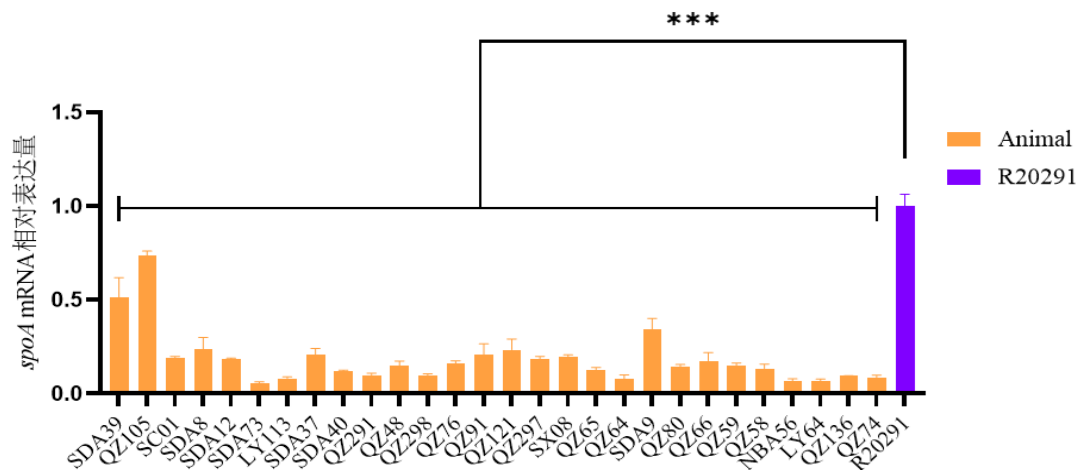
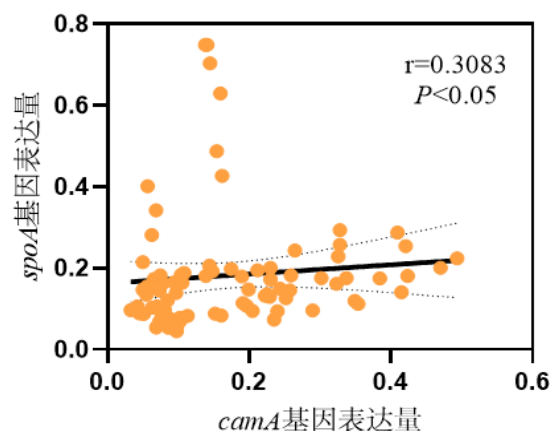
图 2-1 动物菌株 *camA* mRNA 相对表达量比较Fig. 2-1 Comparison of relative expression of *camA* mRNA in animal isolates

图 2-2 动物菌株 *spoA* mRNA 相对表达量比较Fig. 2-2 Comparison of relative expression of *spoA* mRNA in animal isolates图 2-3 动物菌株 *camA* 基因表达量和 *spoA* 基因表达量相关性分析Fig. 2-3 Correlation analysis between *camA* gene expression and *spoA* gene expression in animal isolates

2.3.3 人来源菌株 *camA* 基因和 *spoA* 基因表达量

33 株人来源菌株的 cDNA 经 qPCR 反应，记录 CT 值并计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，经 Graphpad Prism 9 软件及 SPSS 26.0 软件分析，发现 33 株人来源菌株与对照组相比较有 24 株 *camA* 基因表达量升高（72.73%），9 株 *camA* 基因表达量下降（27.27%），采用 Pearson 卡方检验 $\chi^2 = 33.572$ ， $P < 0.0001$ ，则人来源菌株中 *camA* 基因表达量主要呈升高趋势，见图 2-4 和表 1-8。

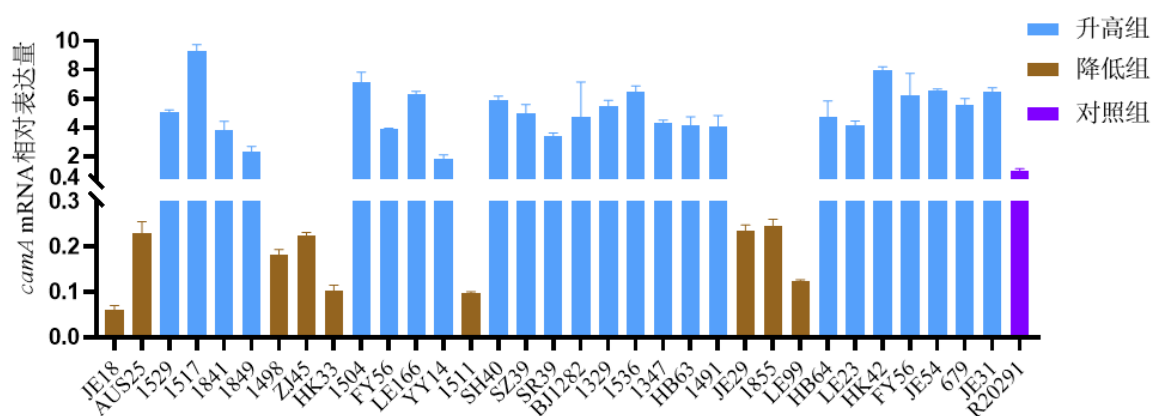
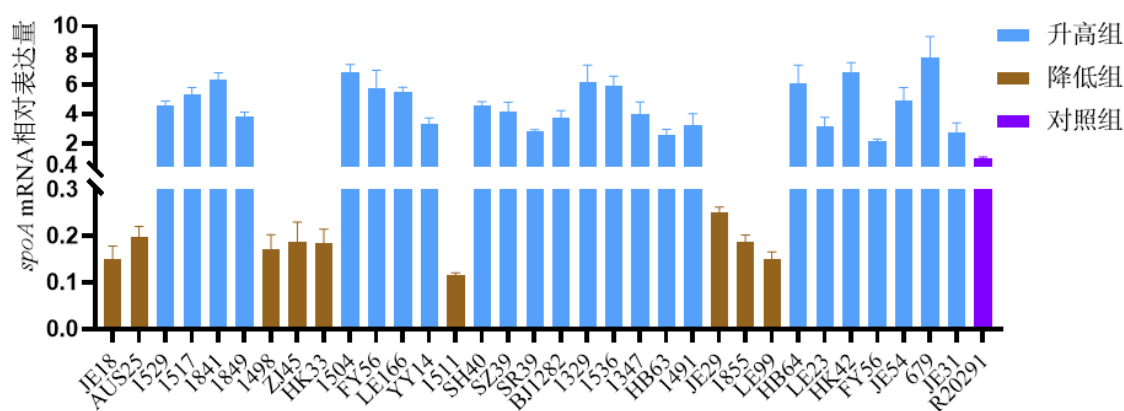
图 2-4 人来源菌株 *camA* mRNA 相对表达量比较Fig. 2-4 Comparison of relative expression of *camA* mRNA in human isolates

表 1-8 不同来源菌株 *camA* 基因表达量变化卡方检验分析结果Table 1-8 Chi-square test analysis results of *camA* gene expression changes from different isolates

菌株来源 (%)	<i>camA</i> 基因表达量变化		总计	χ^2	<i>P</i>
	升高	下降			
人来源菌株	24 (72.7)	9 (27.27)	33	33.572	< 0.0001
动物来源菌株	0	28 (100)	28		
总计	24	37	61		

注：样本总数大于 40 且最小计数期望为 11.02，适用 Pearson 卡方检验。

在 *spoA* 基因表达量统计分析中，33 株人来源菌株与对照组相比有 24 株 *spoA* 基因表达量升高（72.73%）但是有 9 株 *spoA* 基因表达量下降（27.27%），经 Pearson 卡方检验研究不同来源菌株 *spoA* 基因表达量变化， $\chi^2 = 33.572$ ， $P < 0.0001$ ，则人来源菌株中 *spoA* 基因表达量主要呈升高趋势，见图 2-5。综上，33 株人来源菌株 *camA* 基因表达量和 *spoA* 基因表达量经 Pearson 相关性分析，相关系数 $r = 0.7810$ ， $P < 0.0001$ ，则在人来源菌株中 *camA* 基因表达量和 *spoA* 基因表达量存在正相关关系且两变量之间具有较理想的线性关系，见图 2-6。

图 2-5 人来源菌株 *spoA* mRNA 相对表达量比较Fig. 2-5 Comparison of relative expression of *spoA* mRNA in human isolates

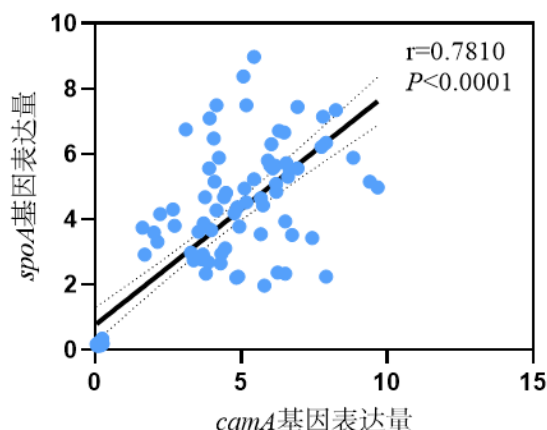


图 2-6 人来源菌株 *camA* 基因表达量和 *spoA* 基因表达量相关性分析

Fig. 2-6 Correlation analysis between *camA* gene expression and *spoA* gene expression in human isolates

2.3.4 动物和人来源菌株的 *camA* 和 *spoA* 基因表达量分析

相较于对照组标准菌株 *CD R20291* 的 *camA* 基因表达量, 61 株动物和人来源菌株中 28 株动物菌株 *camA* 基因表达量均下降而 33 株人来源菌株中有 24 株 *camA* 基因表达量升高。经 Graphpad Prism 9 软件分析 28 株动物菌株 *camA* 基因表达量为 0.172 ± 0.111 , 24 株人来源菌株 *camA* 基因表达量为 5.141 ± 1.712 , 标准菌株 *CD R20291* 的 *camA* 基因表达量为 1.012 ± 0.101 ; 采用 Welch 方差分析及 Dunnett's T3 多重比较, Welch 方差为 248.8, $P < 0.0001$, 则 28 株 *camA* 基因表达量下降的动物菌株、24 株 *camA* 基因表达量升高的人来源菌株和标准菌株 *CD R20291* 三组数据中存在统计学显著性差异, 并根据 Dunnett's T3 多重比较发现, 与对照组标准菌株 *CD R20291* 的 *camA* 基因表达量相比, 28 株动物菌株 *camA* 基因表达量均下降而 24 株人来源菌株 *camA* 基因表达量升高; 此外, 24 株人来源菌株 *camA* 基因表达量高于 28 株动物菌株, 见图 2-7。相较于对照组标准菌株 *CD R20291* 的 *spoA* 基因表达量, 61 株动物和人来源菌株中 28 株动物菌株 *spoA* 基因表达量均下降而 33 人来源菌株中有 24 株 *spoA* 基因表达量升高。经 Graphpad Prism 9 软件分析, 28 株动物菌株 *spoA* 基因表达量为 $0.149 (0.096, 0.199)$, 24 株人来源菌株 *spoA* 基因表达量为 $4.621 (3.209, 5.997)$, 标准菌株 *CD R20291* 的 *spoA* 基因表达量为 $1.038 (0.920, 1.050)$; 采用非参数 Kruskal-Wallis 检验和 Dunn's 多重比较, 发现 28 株动物菌株 *spoA* 基因表达量低于 24 株人来源菌株且 $P < 0.0001$ 则差异具有统计学意义, 但 28 株动物菌株与 24

株人来源菌株分别与对照组标准菌株 *CD R20291* 的 *spoA* 基因表达量两两比较 *P* 值分别为 0.076 和 0.155，均大于 0.05，则尚不能认为差异具有统计学意义，见图 2-8。

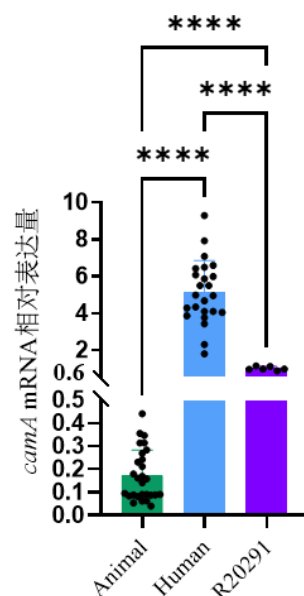


图 2-7 动物和人来源菌株的 *camA* 基因表达量比较

Fig. 2-7 Comparison of *camA* gene expression between animal and human isolates

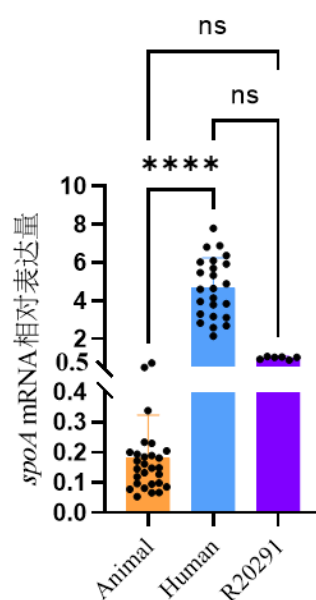


图 2-8 动物和人来源菌株的 *camA* 基因表达量比较

Fig. 2-8 Comparison of *camA* gene expression between animal and human isolates

2.4 讨论

利用艰难拟梭菌显色培养基CDCA复苏本实验室保存的28株动物和33株人来源艰难拟梭菌分离株厌氧培养后提取DNA，进行多位点序列分析（MLST），发现28株动物来源菌株中12株为ST35型、9株为ST1型、3株为ST48、3株为ST5以及1株为ST81，33株人来源菌株均为ST35型，国内东南地区如浙江省等优势型别为ST35型^[12, 13]；采用实时荧光定量PCR（qPCR）检测甲基化相关基因*camA*和芽孢生成相关基因*spoA*表达量，分析动物和人来源艰难拟梭菌分离株甲基化*camA*基因和*spoA*基因表达量分别与标准菌株CD R20291的差异以及分析*camA*基因和*spoA*基因表达量两者之间的关系。

首先，分别采用两独立样本t检验和非参数Mann-Whitney检验研究动物菌株和标准菌株CD R20291的*camA*基因和*spoA*基因表达量差异进行统计学分析，由于动物菌株和标准菌株CD R20291的*camA*基因表达量分别为 0.172 ± 0.111 和 1.012 ± 0.101 ， $P < 0.05$ 且动物菌株和标准菌株样本的*spoA*基因表达量分别为0.149（0.096，0.199）和1.038（0.920，1.050）， $P < 0.05$ ，所以28株动物菌株*camA*基因和*spoA*基因表达量与标准菌株CD R20291的相对表达量存在统计学差异，且低于标准菌株CD R20291的*camA*基因和*spoA*基因表达量，又经Spearman相关性分析，相关系数 $r = 0.3083$ ， $P < 0.05$ ，则在动物来源菌株中*camA*基因表达量与*spoA*基因表达量具有正相关关系；其次，经Graphpad Prism 9软件及SPSS 26.0软件分析，发现33株人来源菌株与对照组CD R20291相比较有24株（72.73%）*camA*基因表达量升高，9株（27.27%）*camA*基因表达量下降，经Pearson卡方检验研究不同来源菌株*camA*基因表达量变化， $\chi^2 = 33.572$ ， $P < 0.0001$ ，所以人来源菌株中*camA*基因表达量主要呈升高趋势；采用同样的统计学方法分析不同来源菌株*spoA*基因表达量变化， $P < 0.0001$ ，所以人来源菌株中*spoA*基因表达量也主要呈升高趋势；又采用Pearson相关性分析33株人来源菌株*camA*基因表达量和*spoA*基因表达量两者间关系，由于相关系数 $r = 0.7810$ ， $P < 0.0001$ ，则在人来源菌株中*camA*基因表达量和*spoA*基因表达量存在正相关关系且两变量之间具有较理想的线性关系。再次，采用Welch方差分析及Dunnett's T3多重比较研究28株*camA*基因表达量下降的动物菌株、24株*camA*基因表达量升高的人来源菌株和标准菌株CD R20291三组数据中是否存在统计学显著性差异，由于Welch方差为248.8， $P < 0.0001$ 且三组数据*camA*基因表达量分别为

0.172±0.111、5.141±1.712和1.012±0.101，所以28株*camA*基因表达量下降的动物菌株、24株*camA*基因表达量升高的人来源菌株和标准菌株*CD R20291*三组数据中存在统计学显著性差异，并根据Dunnett多重比较发现，与对照组标准菌株*CD R20291*的*camA*基因表达量相比，28株动物菌株*camA*基因表达量均下降而24株人来源菌株*camA*基因表达量升高且24株人来源菌株*camA*基因表达量高于28株动物菌株；此外，分析28株*spoA*基因表达量下降的动物菌株、24株*spoA*基因表达量升高的人来源菌株和标准菌株*CD R20291*三组数据统计学差异采用非参数Kruskal-Wallis检验和Dunn's多重比较，发现28株动物菌株*spoA*基因表达量低于24株人来源菌株且 $P < 0.0001$ ，则两组间的差异具有统计学意义；而28株动物菌株与24株人来源菌株分别与对照组标准菌株*CD R20291*的*spoA*基因表达量两两比较 P 值分别为0.076和0.155，均大于0.05，则尚不能认为两两比较的差异具有统计学意义，其中在分析28株动物菌株*spoA*基因表达量与对照组标准菌株*CD R20291*的*spoA*基因表达量两者间的差异结论与结果部分2.3.2中非参数Mann-Whitney检验结论相矛盾，可能是由于离群值存在所造成的。

综上，动物来源菌株与人来源菌株*camA*和*spoA*表达量呈相反趋势这引起了我们的关注，猜测是否因为动物来源菌株与人来源菌株之间甲基化差异而导致该结果的产生，并正因动物菌株*camA*表达量降低，其对应芽胞形成能力也低，依据文献^[17, 28, 33]推测以动物为传染源借助芽胞通过粪口途径感染人的传播流向可能性更高，导致了上述人来源菌株*camA*表达量的升高，其对应的芽胞形成相关基因*spoA*的表达量也升高。最终，由动物菌株产生的芽胞传播到人体的肠道，形成芽胞定植再加上肠道厌氧的环境，更加有利于从芽胞转变为致病的营养细胞这一过程进而存活下来，并抵抗外界因素诱发人体发病。为了解答上述科学问题我们先诱导表达获得CamA蛋白和多克隆抗体并建立基因敲除平台，为尽早验证上述观点奠定基础。

第三章 甲基转移酶 CamA 表达纯化、活性检测及抗体制备

3.1 材料

3.1.1 菌株和质粒

原核表达载体 pGEX4T-1 购买自美国 GE Healthcare 公司；大肠杆菌感受态细胞 HB101 购买自宝日生物工程（大连）有限公司；载体 pGEX4T-1-MBP 由本实验室构建。

3.1.2 实验仪器

本章节所用主要的实验仪器为 PCR 热循环仪 VeritiPro™和微量分光光度计 NanoDrop 2000c 购自美国 Thermal Fisher Scientific 公司；多功能酶标仪 Spark 购买自瑞士 Tecan 公司。

3.1.3 实验试剂

本章所使用的试剂见表 2-1。

表 2-1 本实验所使用的主要实验试剂

Table 2-1 The main reagents used in this study

试剂名称	试剂品牌
胰蛋白胨	英国 OXOID 公司
酵母提取物	英国 OXOID 公司
脑心浸出液肉汤	英国 OXOID 公司
氯化钠	上海生工
甘油	上海阿拉丁生化科技公司
硫酸卡那霉素	上海阿拉丁生化科技公司
氨苄青霉素	上海阿拉丁生化科技公司
L-半胱氨酸	上海阿拉丁生化科技公司
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	美国 Sigma 公司
Acryl/Bis 30% Solution (29:1)	上海生工
N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)	上海百赛
麦芽糖结合蛋白 (MBP)	美国 Sigma 公司
直链淀粉树脂 (Amylose Resin)	美国 NEB 公司
阴离子交换层析柱 Q	美国 GE 公司

浙江省医学科学院硕士学位论文

试剂名称	试剂品牌
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
续表 2-1	
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5x)	上海碧云天生物技术有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)	上海碧云天生物技术有限公司
RIPA 裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
蛋白酶抑制剂 (PMSF)	上海碧云天生物技术有限公司
烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶	美国 NEB 公司
MTase-Glo TM Methyltransferase Assay	美国 Promega 公司
脱脂奶粉	广州赛国生物科技有限公司
十二烷基硫酸钠 (SDS)	广州赛国生物科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	广州赛国生物科技有限公司
10x Western Transfer Buffer	上海生工
10x TBST WB 漂洗液	上海生工
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	上海百赛
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	上海百赛
甘氨酸	广州赛国生物科技有限公司
低分子量预染蛋白 Marker	北京索莱宝科技有限公司
考马斯快速染色液	北京索莱宝科技有限公司
冰醋酸	天津致远
碳酸氢钠	上海国药集团化学试剂有限公司
碳酸钠无水	上海生工
96 孔酶标板	美国 Corning 公司
TMB 显示液 (ELISA HRP 显色用)	上海碧云天生物技术有限公司
TMB 终止液 (ELISA HRP 显色用)	上海碧云天生物技术有限公司
小鼠抗 6x His 偶联 HRP 多克隆抗体	北京博奥龙生物科技有限公司
HRP-山羊抗兔 IgG (H+L)	北京博奥龙生物科技有限公司
100 mL 丽春红染色液	上海碧云天生物技术有限公司
500 mL Western 一抗稀释液	上海碧云天生物技术有限公司
500 mL Western 二抗稀释液	上海碧云天生物技术有限公司
甲醇	天津致远
PVDF 膜	美国 Merck 公司
0.22 μ M 微孔滤膜	美国 Merck 公司

3.1.4 实验溶液配制

3.1.4.1 蛋白表达与纯化实验相关试剂配制

- (1) 裂解缓冲液：2 mM EDTA 的 1x PBS；5 mM β -巯基乙醇，配制 500 mL 体系需要 178 μ L 的 β -巯基乙醇；0.2 mM PMSF；1 mM DTT；1% Triton X-100。
- (2) 洗脱缓冲液：使用 50 mM Tris, pH 8.0；150 mM NaCl, 5 mM DTT；20 mM 谷胱甘肽。
- (3) 渗析缓冲液：10 mM Tris, pH 7.5；50 mM NaCl；5 mM β -巯基乙醇。
- (4) 快速考马斯蓝染色缓冲液：0.2% 考马斯蓝 R-250；50% 乙醇；10% 乙酸。
- (5) 褪色缓冲液：10% 乙醇；5% 乙酸。

3.1.4.2 ELISA 实验相关试剂配制

- (1) 包被缓冲液（0.05 M 碳酸盐缓冲液，pH 9.6）：NaHCO₃ 1.59 g；Na₂CO₃ 2.93 g；加 ddH₂O 至 1000 mL。
- (2) 洗涤缓冲液（0.15 M PBST，pH 7.4）：KH₂PO₄ 0.2 g；Na₂HPO₄ 2.9 g；NaCl 8.0 g；KCl 0.2 g；0.05% Tween-20 500 μ L；加 ddH₂O 至 1000 mL。
- (3) 稀释液：称取牛血清白蛋白（BSA）0.1 g，加洗涤缓冲液至 100 mL。
- (4) 5% 封闭液：牛血清白蛋白（BSA）5 g 加洗涤缓冲液至 100 mL。
- (5) 终止液（2 M H₂SO₄）：ddH₂O 178.3 mL，逐滴加入 98% 浓硫酸 21.7 mL。
- (6) pH 5.0 底物缓冲液：0.2 M Na₂HPO₄ 25.7 mL；0.1 M 柠檬酸 24.3 mL；再加 ddH₂O 至 50 mL。

3.1.4.3 Western Blot 实验试剂配制

- (1) 10% 分离胶配制：30% Acr-Bis（29:1）3.3 mL；下层胶缓冲液（4x）2.5 mL；10% 凝胶聚合催化剂 100 μ L；TEMED 4 μ L，补 ddH₂O 至 10 mL。
- (2) 浓缩胶配制：30% Acr-Bis（29:1）500 μ L；上层胶缓冲液（4x）750 μ L；10% 凝胶聚合催化剂 30 μ L；TEMED 3 μ L。
- (3) 5x SDS-PAGE 电泳缓冲液：Tris 15.1 g；谷氨酸 94 g；SDS 5 g；加入约 800 mL 的 ddH₂O，搅拌溶解；加入 ddH₂O 将溶液定容至 1 L 后，室温保存。
- (4) TBST Buffer：称 NaCl 8.8 g；1M Tris-HCl（pH 8.0）20 mL；加入约 800 mL 的 ddH₂O，充分搅拌溶解；加入 0.5 mL Tween 20 后充分混匀；加 ddH₂O 将溶液定容至 1 L 后，4℃ 保存。
- (5) 封闭缓冲液：称量 5 g 脱脂奶粉加入到 100 mL 的 TBST Buffer 中，充分搅拌。

溶解；放置于 4℃保存待用。

3.1.4.4 培养基配制

- (1) LB 平板配制：称取蛋白胨 5 g，酵母提取物 2.5 g，氯化钠 2.5 g；琼脂 7.5 g，补足 ddH₂O 至 500 mL，调 pH 7.4±0.2，高压灭菌 121℃，15 min。
- (2) BHI 平板配制：称取 BHI 粉末 18.5 g，琼脂 7.5 g，补足 ddH₂O 至 500 mL，调 pH 7.4±0.2，121℃，15 min，冷却至 50℃左右分装至细菌培养皿，4℃储存待用；若配制 BHI 液体培养基则去除琼脂成分。
- (3) BHIS 平板配制：在 BHI 平板基础上添加 5 g/L 的酵母提取物和 0.1% L-半胱氨酸。如配制 500 mL 的 BHIS 固体培养基，在 BHI 平板配制中再加入 2.5 g 酵母提取物，补足 ddH₂O 至 450 mL，调 pH 7.4±0.2，121℃，15 min，冷却至 50℃左右，在生物安全柜中通过 0.22 μm 微孔滤膜加入提前准备好已溶于 50 mL ddH₂O 中 0.5 g 的 L-半胱氨酸，混匀并分装至细菌培养皿，4℃储存待用；若配制 BHIS 液体培养基则去除琼脂成分。

3.2 方法

3.2.1 重组载体构建

3.2.1.1 引物设计及合成

根据 GenBank 上的艰难拟梭菌 DNA 甲基转移酶 CamA 序列号（CEJ99386.1）见图 3-1，利用 SnapGene 3.2.1 软件设计引物，基因序列如下：上游：5'-AGGGAAGGATTTTCAGAATTCGATGATATATCTCAAGATAATTTTCTACT-3'（下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点），下游：5'-AAGTACAGATTTTTCGGATCCTTATATACCTAAAGAATCCATTATCAAG-3'（下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点），扩增片段大小为 1731 bp。引物由杭州有康生物技术有限公司合成并纯化。

putative N6 adenine-specific DNAmethyltransferase, N12 class [Clostridioides difficile]

GenBank: CEJ99386.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

```
>CEJ99386.1 putative N6 adenine-specific DNAmethyltransferase, N12 class [Clostridioides difficile]
MDDISQDNFLLSKEYENSLDVTKKASGIYYTPKIIVDYIVKTLKNHDIKNPYPRILDISCGGNFLL
EYVDILYDLFEENIYELKKYDENYWTVDNIHRHILNYCIYGADIDEKATISILKDSLTKKVVNDLDESD
TKINLFCCDSLKKWRYKFDYIVGNPPYTGHKLEKKYKFLLEKYSEVYKDKADLYFCFYKKIIDLKQ
GGIGSVITPRYFLESLSGKDLREYIKSNVNVQEIVDLFGANIFKNIGVSSCILTDFDKKTKETVIDVFKI
KNEDICINKFETLELLKSSKFEHFNINQRLSDSEWILVKNKDDTFYNKIQEKCKYSLEDIAISFQGIIT
GCDKAFILSKDDVKLNLVDDKFLKCKWIKSKINKYIVDKSEYRLIYSNDIDNENTNKRILDEIIGLYKTK
LENRECKSGIRKWEYELQWGREKLFERKKIMYPYKSNENRFAIDYDNFSSADVVSFFIKEEYLDKFSY
EYLVGLNSSVYDKYFKITARKMSKNYDYYPNKMIRIFRDNVYEEIENLSKQIISILLNKSIDKGV
EKLIQKMDNLIMDSLGI
```

图 3-1 NCBI 检索艰难拟梭菌 CamA 序列

Fig. 3-1 CamA of *C. difficile* was searched in NCBI

3.2.1.2 *camA* 基因序列的扩增

以艰难拟梭菌标准菌株基因组 DNA 为模板，采用 PCR 扩增 *camA* 基因，反应体系为：5x PCR Buffer 10 μ L，TaKaRa Ex Taq 0.25 μ L，上、下游引物各 1 μ L，基因组 DNA 10 μ L，灭菌 ddH₂O 27.75 μ L，总体积为 50 μ L。反应条件为：第一阶段 95°C 预变性 5 min；第二阶段需 35 个循环，以 95°C 变性 30 s，62°C 退火 30 s，72°C 延伸 1 min 为一个循环；第三阶段 72°C 再延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

3.2.1.3 *camA* 基因的测序

camA 基因的测序由杭州有康生物技术有限公司完成，采用双脱氧链终止法测序。测序结果采用 Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) 和 Jalview 2.11.1.4 软件与 GenBank 标准序列进行比对分析。

3.2.1.4 目的基因的克隆、重组质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 的构建及鉴定

目的基因片段切胶回收，载体 pGEX-4T-1-MBP 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切；将目的片段和载体按照摩尔比 3:1 进行混合，经 Solution I 连接技术在 16°C 条件下孵育过夜；次日把连接产物 pGEX4T-1-MBP-*camA* 转化至感受态大肠杆菌 HB101；挑取阳性单克隆接种 LB 液体培养基，37°C 震荡培养 16 小时，用质粒小提试剂盒（北京天根生化科技有限公司）参照说明书提取质粒，进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定，将鉴定正确的阳性克隆送杭州有康生物技术有限公司测序，以验证重组质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 的构建成功。

3.2.2 CamA 蛋白表达与纯化

取 1 μ L pGEX-4T-1-MBP-*camA* 质粒与 50 μ L HB101 感受态细胞轻柔混匀，冰浴 30 min 后；42°C 热激 90 s，迅速放回冰浴，静置 5 min；然后加 500 μ L 的 LB 液体培养基，轻轻混匀，37°C，160 rpm/min 震荡培养 1 h；7000 $\times$ g，离心 5 min，去掉 400 μ L 上清液；吹打混匀后，取 150 μ L 菌液涂布含有氨苄抗性的 LB 固体培养基，37°C，倒置培养 16 h。挑取单克隆到 LB 液体培养基，37°C，160 rpm/min 培养 6 h 后加 IPTG，16°C，160 rpm/min 诱导过夜培养，SDS-PAGE 验证蛋白表达。选取经鉴定高表达量的重组菌，100 μ L 菌液接种于 300 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中，37°C，160 rpm/min 过夜培养；取 10 mL 菌液过夜培养后接

种于 200 mL 含氨苄抗性的 LB 培养基, 37°C, 160 rpm/min 培养 3 h, 加终浓度为 1 mM IPTG, 37°C, 160 rpm/min 诱导过夜, 离心收集菌体, 加入预冷的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2 mmol/L EDTA 洗涤, 加入溶菌酶至 0.1 mg/mL 及 1/10 的 1% Triton X-100, 37°C 孵育 15 min, 再加入终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 (PMSF), 冰浴超声裂解菌体, 离心取上清液, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 经 Amylose Resin 纯化。纯化步骤如下: (1) 预处理方法: 收集诱导后的菌液, 7000 $\times g$, 4°C 离心 10 min, 收集菌体, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 重悬。超声 32 min (开 3 s, 停 7 s), 超声后 13,400 $\times g$, 4°C 离心 10 min, 收集上清液, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 7000 $\times g$, 4°C 离心 10 min, 再次收集上清液。(2) Amylose Resin 纯化: Amylose Resin 装柱 10 mL, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 平衡至基线平稳, 上样。10 mM 麦芽糖, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 洗脱。(3) 洗脱液 Q 柱纯化: Amylose Resin 纯化后的洗脱液 25 mM TE (pH 8.5), 4°C 搅拌透析 36 h 后, 过 Q 柱。25 mM TE (pH 8.5) 平衡 Q 柱, 0.05 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5), 0.1 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5), 0.2 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5), 0.5 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5) 洗脱。(4) 浓缩后透析: 将 Q 柱穿过液的目的蛋白蔗糖浓缩后, 150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 4°C 搅拌透析 48 h。

3.2.3 CamA 蛋白体外甲基化活性测定

3.2.3.1 重组蛋白 MBP 标签的酶切

在 5 μ g 纯化的重组蛋白中加入 TEV 蛋白酶, 反应总体积 10 μ L, 30°C 反应 1~3 h, SDS-PAGE 检测切割效率。反应体系如下: 10x buffer 【含 0.5 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L DTT 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 25°C)】1 μ L, CamA-MBP 重组蛋白 1 μ L, TEV 酶 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。

3.2.3.2 重组蛋白体外甲基化活性检测

(1) SAH 标准曲线的绘制: 参照 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 试剂盒说明书配制 4x Reaction Buffer, 并稀释至 1x Reaction Buffer 待用, 体系如下: ddH₂O 750 μ L, 4x Reaction Buffer 250 μ L, 总体积为 1 mL; 将试剂盒中的 15 μ mol/L SAH 标准品稀释至 1 μ mol/L, 体系如下: ddH₂O 136.7 μ L, 15 μ mol/L SAH 13.3 μ L, 4x Reaction buffer 50 μ L, 总体积为 200 μ L。在 96 孔板的 A2 至 A12 孔中加入 75 μ L 1x Reaction Buffer, 取制备好的 1 μ mol/L SAH

标准品溶液 150 μL 添加到 A1 孔中, 取出 75 μL 加至 A2 孔中, 依次连续倍比稀释至 A11 孔, 最后从 A11 孔中弃去 75 μL , 使得 A12 孔 SAH 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$; 从 A1-A12 孔中分别依次移取 20 μL 至 B1-B12 孔中, 加入 5 μL 5x MTase-GloTM Reagent, 室温孵育 30 min; 加入 25 μL MTase-GloTM Detection Solution, 室温 (23°C) 孵育 30 min; 利用多功能酶标仪检测发光值 RLU, 绘制横坐标为 SAH 标准品浓度且纵坐标为发光值的 SAH 标曲。

- (2) 甲基化活性检测: 取上述已切除 MBP 标签的 0.5 μg 纯化 CamA, 加入 5 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ SAM 供体和 5 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ DNA 底物 (实验组), 室温 (23°C) 孵育 30 min; 加入三氟乙酸 (TFA) 至终浓度为 0.2%, 终止反应; 加入 5 μL 5x MTase-GloTM Reagent, 室温 (23°C) 孵育 30 min; 加入 25 μL MTase-GloTM Detection Solution, 室温 (23°C) 孵育 30 min; 利用 TIANGEN 多功能酶标仪检测发光值 (RLU), 取均值; 在测定环境为 pH 7.5 和 23°C, 反应 30 min, 依据每分钟每毫克酶催化 1 nmol SAM 产生 SAH 的量计算酶活性, 阳性对照 (1 $\mu\text{mol/L}$ SAH + MTase-GloTM Reagent)、阴性对照 (20 $\mu\text{mol/L}$ SAM + MTase-GloTM Reagent) 和空白对照 (MTase-GloTM Reagent)。

3.2.4 CamA 多克隆抗体制备及其性能检测

3.2.4.1 制备路线

- (1) 免疫: 选取 2 只新西兰大白兔, 免疫前抽取 1 mL 血液, 分离制备免疫前血清。按表 2-2 用 CamA 蛋白作为抗原采用后腿肌肉注射 2-3 点, 免疫 2 只新西兰大白兔。

表 2-2 免疫时间及相关试剂用量

Table 2-2 Immune Time and Dosage of Related Reagents

免疫时间	蛋白量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	体积 (μL)	弗氏佐剂 (μL)	总体积 (μL)
Day1	200	300	100	400
Day8	100	300	100	400
Day15	100	300	100	400
Day22	100	300	100	400

- (2) 抗血清效价检测: 用间接 ELISA 方法检测第 4 次免疫后抗血清效价, 96 孔

板包被 CamA 蛋白，以免疫前血清为对照，以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体作为二抗，显色释放信号，要求抗血清效价 $>1:32000$ 。

- (3) 抗体纯化：若抗血清效价 $>1:32000$ 则收集抗血清，进行抗体亲和纯化。
- (4) 抗体效价检测：用间接 ELISA 方法检测第 4 次免疫后抗血清效价，96 孔板包被 CamA 蛋白，以免疫前血清为对照，以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体作为二抗，显色释放信号，要求纯化抗体效价 $>1:128000$ 。

3.2.4.2 ELISA 间接法分析抗体效价

- (1) 抗原包被过夜（12 h 以上）：用包被液稀释 CamA 抗原，100 μL /孔加入聚苯乙烯 96 孔反应板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。
- (2) 封闭：弃上清，加 100 μL /孔封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h。
- (3) 洗涤：加入 200 μL /孔 PBST 洗涤液，5 min/次，洗 3 次。
- (4) 孵一抗：将 CamA 多克隆抗体在已包被抗原的板上用 PBST 连续倍比稀释，从 1:1000 的比例开始，100 μL /孔，每个样品重复三次，小鼠阴性血清作为非特异性对照，抗血清作为阳性对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。
- (5) 洗涤：加入 200 μL /孔 PBST 洗涤液，5 min/次，洗 3 次。
- (6) 孵二抗（即 HRP 标抗兔抗体）：羊抗兔 IgG-HRP，用 PBST 按 1:4000 的比例稀释，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱温育 45 min。
- (7) 洗涤：加入 200 μL /孔 PBST 洗涤液，5 min/次，洗 3 次。
- (8) 显色：加入 100 μL /孔 TMB 显色液，放置抽屉中避光显色 10 min 变蓝色。
- (9) 终止反应：加入 100 μL /孔 TMB 显色终止液，颜色变黄。
- (10) 比色：用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光值，吸光度值最高处所对应的为待测样品的最佳效价，最大稀释度即为待测样品的效价。

3.2.4.3 Western Blot 特异性分析

- (1) 蛋白质的裂解：使用 1.5 mL EP 管收集菌液，13,400 $\times g$ 离心 1 分钟，弃上清；PBS 重悬再离心弃上清；向菌体中加入含 1 mM PMSF 的强裂解液，放置冰上直至完全溶解；13,400 $\times g$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 分钟，收集上清。
- (2) BCA 法蛋白质定量：按照试剂 A 与试剂 B 的比例为 50:1 配制 BCA 工作液；向 96 孔板中加入待测蛋白，按照每个样本 2 μL 加入 18 μL PBS，再加入 200 μL BCA 工作液，充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟；测 562 nm 处的 OD 值。

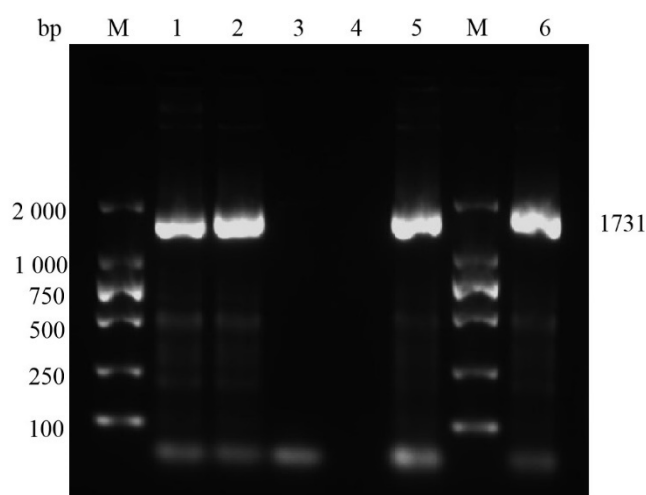
- (3) SDS-PAGE 凝胶制备：取干净的玻璃板组装好后固定于制胶架上加满 ddH₂O 验漏完毕后，将 ddH₂O 全部倒出并用吸水纸吸走残留水份；按照 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配制分离胶，再加其中的 10% AP 和 TEMED 后快速混匀并立刻加至玻璃板上沿 2 cm 处停止，加入 ddH₂O 压平分离胶并赶走气泡；待分离胶凝固后将 ddH₂O 倒出，用吸水纸将残留的 ddH₂O 吸走；再按照说明书配制浓缩胶，再加入 10% AP 和 TEMED 后快速混匀并立刻加至分离胶上层直至灌满，先将梳子一侧插入尚未凝固的浓缩胶中最终将梳子全部插进这样可以避免产生气泡，待上层浓缩胶凝固后使用。
- (4) 电泳：把上述制备好的胶于电泳槽中组装好后，先向内槽加入电泳缓冲液溢出至外槽相对应的指示线；再把上述制备好且浓度调致相同基线的样品加入孔中，并加入 5 μ L 蛋白 Marker；按红正黑负插好电极，90 V 30 min 慢跑至浓缩胶与分离胶的交界处，调电压至 120 V 将 Loading Buffer 全部跑出。
- (5) 转膜：将海绵和厚滤纸浸于转膜液中并裁剪稍大于胶大小的 PVDF 膜浸泡于甲醇溶液 30 s；再将玻璃板打开将胶取出切去浓缩胶部分；打开转膜夹，按照黑色（负极）在下，从下到上依次放上海绵、厚滤纸、胶、PVDF 膜、厚滤纸、海绵，并赶走胶与 PVDF 膜之间的气泡；夹好转膜夹放至于转膜架中，黑色与黑色对应，加入预冷的转膜液，300 mA 恒流转膜 90 min。
- (6) 封闭：打开转膜夹，取出膜，浸泡于 5% 牛奶封闭液并放置在摇床上，转速设为 65 转，封闭 1 h。
- (7) 洗膜：TBST 洗膜三次，每次 10 min。
- (8) 抗体孵育：将 PVDF 膜正面朝上浸于 1:2000 的 CamA 多克隆抗体孵育液中并放置在摇床上转速设为 65 转，连同摇床全部移置冰箱 4°C 过夜孵育；次日将 PVDF 膜从一抗孵育液中取出 TBST 洗膜三次每次 10 min，并将抗体回收至 EP 管放置 4°C 保存可重复使用；再将 PVDF 膜正面朝上浸于 1:4000 的 HRP 标记二抗孵育液中室温摇床上孵育 1 h；回收二抗孵育液至 EP 管放置 4°C 保存可重复使用，用 TBST 洗膜三次每次 10 min。
- (9) 化学发光：先用滤纸吸走 PVDF 膜表面残留水份；再各取 1 mL 的化学发光 A 液和 B 液按照 1:1 的比例混匀；滴加于 PVDF 膜上并覆盖整张膜。
- (10) 上机采集图像。

3.3 结果

3.3.1 重组载体构建

3.3.1.1 *camA* 基因的扩增

经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析，可见在 1000 bp ~ 2000 bp 之间出现特异性条带，与 GenBank 标准序列 1731 bp 比较，条带位置一致，见图 3-2。



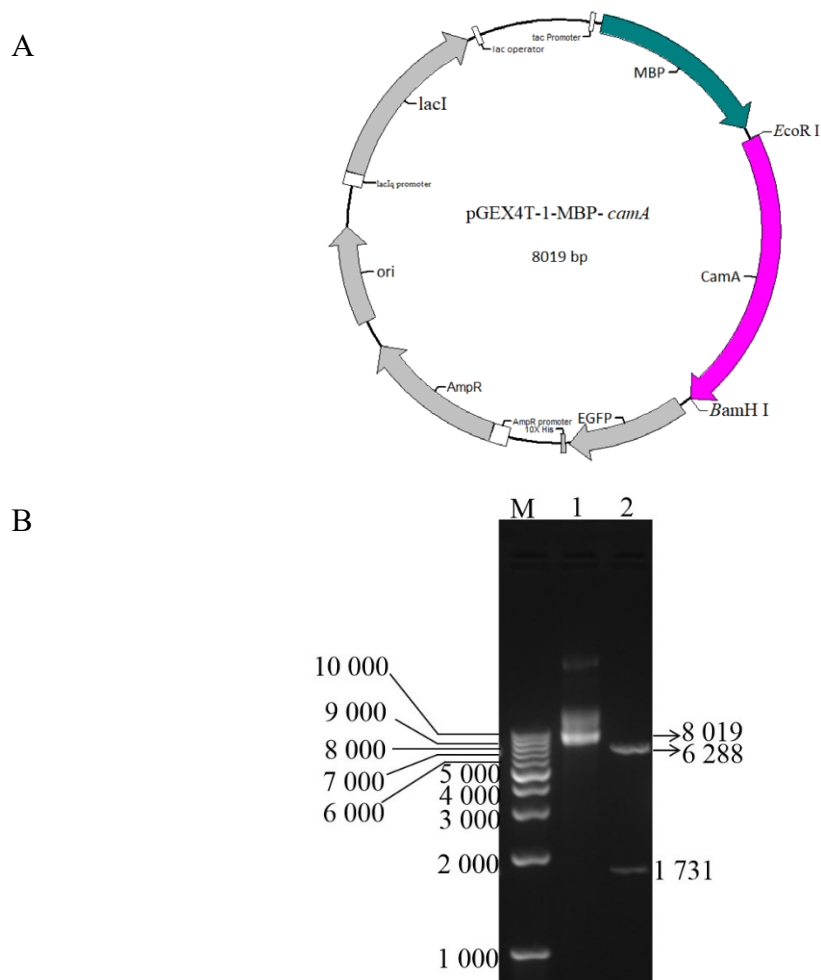
M: DNA Maker DL2,000; 1, 2, 5, 6: *camA* 基因扩增产物; 3: 阴性组; 4: 空白组

图 3-2 *camA* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3-2 Electrophoretic profile of PCR products of *camA* gene

3.3.1.2 重组质粒的鉴定

重组质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切后，产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析，可见在 1000 bp ~ 2000 bp 之间出现特异性条带，大小与预期条带相符，见图 3-3。测序结果表明，扩增序列与 GenBank 中登录的 *camA* (CEJ99386.1) 序列一致。



A: 重组质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 图谱; B: 重组质粒的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定;
M: 1kb DNA Ladder; 1: 重组质粒; 2: 质粒双酶切产物

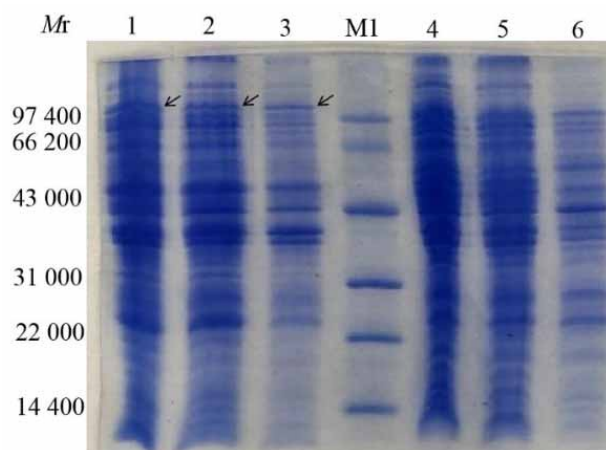
图 3-3 重组质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 的双酶切鉴定

Fig. 3-3 Restriction map of recombinant plasmid pGEX-4T-1-MBP-*camA*

3.3.2 CamA 蛋白表达与纯化

3.3.2.1 重组蛋白的鉴定

在大肠杆菌 HB101 中经 1 mM IPTG, 37°C, 160 rpm/min 过夜诱导表达获得重组蛋白 CamA 的相对分子质量约 108.8 KDa, 大小与理论值相符, 且主要在裂解上清中, 见图 3-4。



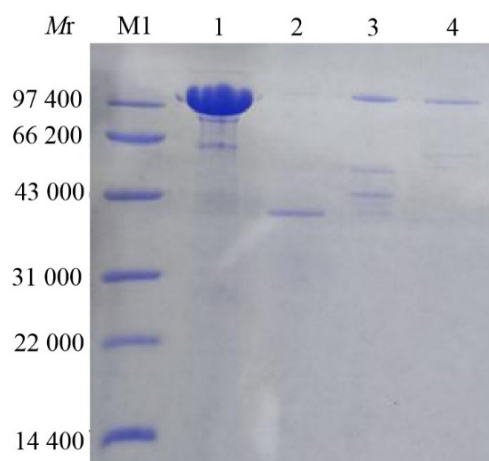
M: SDS-PAGE 分子量 (14.4 KDa-97.4 KDa)；1-3: 诱导后，分别表示全菌、菌体破碎上清、菌体破碎沉淀；4-6: 未诱导，分别表示全菌、菌体破碎上清、菌体破碎沉淀

图 3-4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3-4 SDS-PAGE profile of expressed products

3.3.2.2 CamA 目的蛋白的纯化

重组菌在 LB 培养基扩大培养后，超声裂解菌体，经 Amylose Resin 纯化，获得纯化后的重组蛋白 CamA，通过 SDS-PAGE 分析，可见相对分子质量约为 108.8 KDa 的目的蛋白条带，纯度为 90%以上，见图 3-5。



M: SDS-PAGE 分子量 (14.4 KDa - 97.4 KDa)；1: 收集 Q 柱穿过液里的目的蛋白 CamA；2: 0.1 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5) 洗脱液；3: 0.2 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5) 洗脱液；4: 0.5 mM NaCl 25 mM TE (pH 8.5) 洗脱液

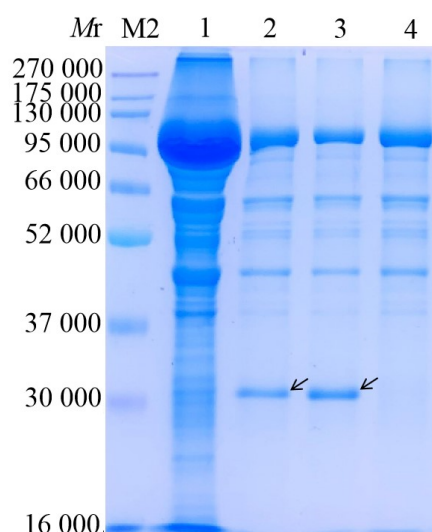
图 3-5 目的蛋白 CamA 经 Amylose Resin 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3-5 SDS-PAGE profile of the protein CamA purified by Amylose Resin

3.3.3 CamA 蛋白体外甲基化活性测定

3.3.3.1 重组蛋白 MBP 标签的酶切

40 KDa 的 MBP 标签被切割, 大小与预期一致, 见图 3-6。



1: 5 μ g CamA-MBP; 2, 3: 经 TEV 酶切 0.5 μ g CamA-MBP 1 h 和 3 h; 4: 0.5 μ g CamA-MBP

图 3-6 目的蛋白 CamA-MBP 经 TEV 酶切割的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3-6 SDS-PAGE profile of the protein CamA-MBP digestion by TEV Protease *in vitro*

3.3.3.2 重组蛋白的甲基化活性检测

绘制 0 μ M 到 1 μ M SAH 的标准曲线见图 3-7, 经计算获得标准曲线方程为 $y = -0.0494x^2 + 129.71x + 3974.3$, $R^2 = 0.9966$ 。0.5 μ g CamA 与 20 μ M DNA 和 20 μ M SAM 室温 (23 $^{\circ}$ C) 孵育 30 min 后, 用体外 MTase-GloTM Methyltransferase Assay 试剂盒检测, 经 TIANGEN 多功能酶标仪检测发现, 阴性组和实验组的发光值分别为 2411.00 ± 74.18 和 16643.25 ± 112.93 , 采用两独立样本 T 检验得, t 值为 210.7, $P < 0.0001$, 则可以认为两组数据之间得差异具有统计学意义, 并且相较于阴性组能产生 16643.25 ± 112.93 发光值 (RLU), 代入标准曲线方程其产生的 SAH 浓度约为 101.60 nM, 则酶活性为 0.339 ± 0.027 U/mg, 见表 2-3。

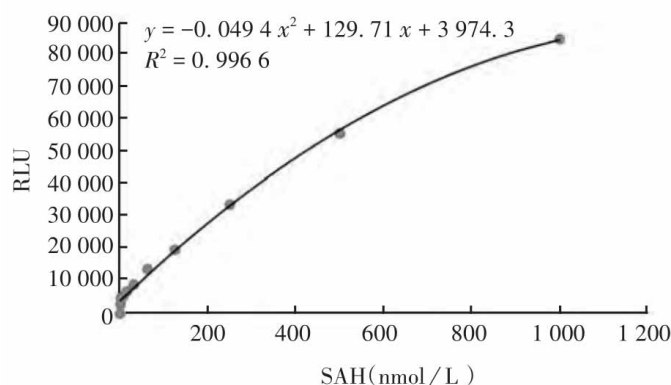


图 3-7 SAH 的标准曲线

Fig. 3-7 Standard curve of SAH

表 2-3 CamA 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

Table 2-3 Determination result of CamA activity ($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	RLU	SAH浓度(nM)	CamA酶活性(U/mg)
阳性组	84014.25±207.54	991.43±6.51	-
阴性组	2411.00±74.18	-12.00±0.57	-
空白组	0	0	-
实验组	16643.30±112.93	101.60±0.94	0.339±0.027

注： Positive group: 1 μ M SAH + Mtase-Glo™ Reagent; Negative group: 20 μ M SAM + Mtase-Glo™ Reagent; Blank group: Mtase-Glo™ Reagent; Experimental group: 0.5 μ g CamA + 20 μ M SAM + 20 μ M DNA + Mtase-Glo™ Reagent.

3.3.4 CamA 多克隆抗体 ELISA 效价分析

经 ELISA 间接法检测，发现 CamA 多克隆抗体的最佳效价为 1:2000，且其抗体效价>1:128000 具有良好的检测能力，见图 3-8 和表 2-4。

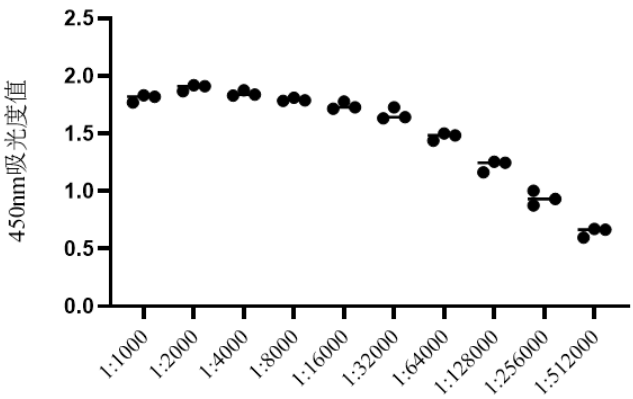


图 3-8 CamA 多克隆抗体的效价分析

Fig. 3-8 Valence analysis of CamA polyclonal antibody

表 2-4 CamA 多克隆抗体测定结果

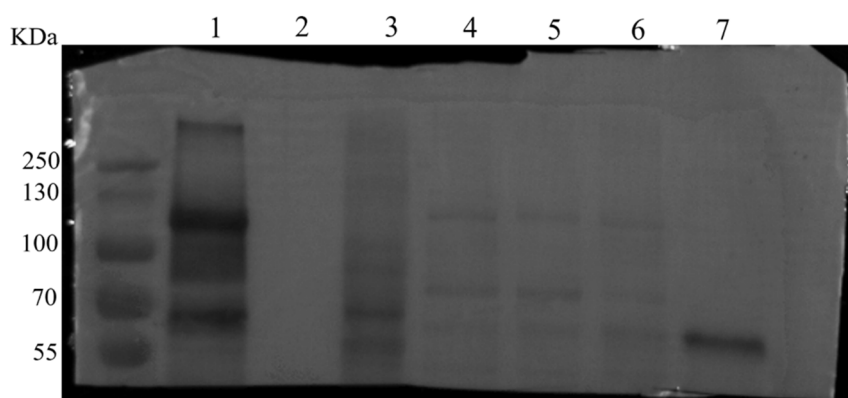
Table 2-4 Determination results of CamA polyclonal antibody

倍比稀释	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	1:512000
CamA蛋白	1.801	1.911	1.866	1.789	1.728	1.633	1.438	1.164	1.003	0.596
	1.832	1.920	1.875	1.795	1.777	1.729	1.485	1.246	0.877	0.665
	1.819	1.912	1.864	1.783	1.715	1.642	1.489	1.256	0.932	0.672
非特异性血清	0.071	0.072	0.071	0.073	0.071	0.073				
阳性血清	0.112	0.102	0.111	0.101	0.111	0.101				
空白对照	0.054	0.053	0.059	0.053	0.053	0.056				
	0.053	0.052	0.054	0.057	0.054	0.059				

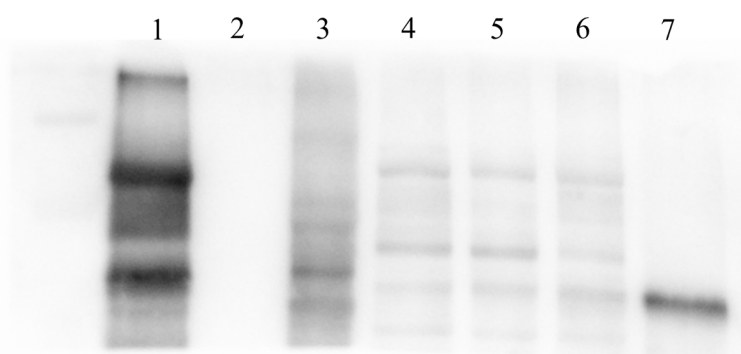
3.3.5 CamA 多克隆抗体 Western Blot 特异性检测

经 Western Blot 验证，通过与 CamA 纯化蛋白（不含 MBP 标签）组相比非特异性大肠杆菌抗原在约 68 KDa 位置处未产生特异性条带，则表明 CamA 多克隆抗体具有良好的特异性检测能力，见图 3-9。

A



B



A: Western Blot 叠加图, B: Western Blot 样品图; 1: 经 TEV 酶切除 MBP 标签的 CamA 浓缩蛋白; 2: 空白对照; 3: 大肠杆菌, 非特异性对照; 4: HB63, ST35 型人来源菌体裂解蛋白样本; 5: 1347, ST35 型人来源菌体裂解蛋白样本; 6: *CD R20291*, 标准菌株对照; 7: CamA 纯化蛋白（不含 MBP 标签）

图 3-9 CamA 多克隆抗体 Western Blot 检测

Fig. 3-9 Detection of CamA polyclonal antibody by Western Blot

3.4 讨论

在本章节中通过 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切和 *Sol*ution I 连接技术将 *camA* 目的片段克隆至质粒 pGEX-4T-1-MBP，经测序结果显示克隆的 *camA* 基因序列未发生碱基突变且重组表达质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA* 经双酶切后显示 1731 bp 的 *camA* 基因已连接到载体质粒；借助 MBP 标签具有提升目的蛋白表达水平、降低包涵体形成概率且加大目的蛋白可溶性的优势，在表达宿主大肠杆菌 HB101 中加入 1 mM IPTG，37°C，160 rpm/min 过夜诱导表达，获得目的蛋白 CamA 相对分子量约为 108.8 KDa（含 1 个 MBP 标签）且主要存在裂解上清中。

其次，利用 Amylose Resin 纯化目的蛋白 CamA 开展其体外甲基化活性检测，由于 MBP 蛋白约为 40 KDa 标签较大，可能会对体外 CamA 甲基化活性检测产生干扰，所以先采用烟草蚀纹病毒蛋白酶酶切 MBP 标签，30°C 体外反应 3 h 后，用于体外 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 技术验证其甲基化酶活性，经 TIANGEN 多功能酶标仪检测发现，阴性组的发光值为 2411.00 ± 74.18 ，实验组的发光值为 16643.25 ± 112.93 ，通过两独立样本 T 检验得，*t* 值为 210.7， $P < 0.0001$ ，则可以认为两组数据之间得差异具有统计学意义，并且相较于阴性组能产生 16643.25 ± 112.93 发光值，将其代入标准曲线方程其产生的 SAH 浓度约为 101.60 ± 0.94 nM，即表示在 20 μM DNA，20 μM SAM 的条件下室温反应 30 min，0.5 μg CamA 能产生浓度约为 101.60 ± 0.94 nM SAH，酶活性为 0.339 ± 0.027 U/mg，结果表明 CamA 蛋白具有天然活性，所以成功表达并纯化艰难拟梭菌 CamA 蛋白并证明其具有甲基化酶活性。

再次，将上述纯化目的蛋白作为抗原免疫动物为了制备 CamA 多克隆抗体，并通过 ELISA 和 Western Blot 实验对 CamA 多克隆抗体进行效价分析和特异性检测。选取 2 只新西兰大白兔作为 CamA 多克隆抗体的免疫动物，原因为新西兰大白兔具有较强的免疫应答能力且能够产生高质量抗体的机体优势；采用后腿肌肉注射方式经 4 次免疫且每次免疫的间隔周期为 7 天，经免疫亲和纯化获得 CamA 多克隆抗体；包埋 CamA 抗原采用间接法 ELISA 分析 CamA 多克隆抗体效价，经酶标仪测定 450 nm 的吸光度值最高在 1:2000 处，即 1:2000 为待测样品的最佳效价；最大稀释度 >1:128000 表示制备的 CamA 多克隆抗体具有良好

的检测能力。经 Western Blot 实验检测其特异性，通过与 CamA 纯化蛋白（不含 MBP 标签）组相比非特异性大肠杆菌抗原在约 68 KDa 位置处未产生特异性条带，则表明 CamA 多克隆抗体具有良好的特异性检测能力；此外，经 TEV 酶切除 MBP 标签的 CamA 浓缩蛋白与 CamA 纯化蛋白（不含 MBP 标签）组相比，在约 108.8 KDa 位置也产生条带，可能是由于 TEV 酶未完全切除 MBP 标签的缘故；还发现 2 株人来源菌体裂解蛋白与 *CD R2029I* 裂解蛋白相比，2 株人来源菌体裂解蛋白产生的条带颜色较深与 2.3.3 结果部分中的人来源样本 *camA* 基因表达量升高检测结果相一致，但 2 株人来源菌体裂解蛋白以及标准菌株 *CD R2029I* 裂解蛋白与 CamA 纯化蛋白（不含 MBP 标签）组相比产生的条带位置不一致，可能原因为 CamA 蛋白的折叠在机体内存在形式与体外诱导表达存在差异所导致。

综上，通过构建表达质粒、诱导表达 CamA 蛋白并纯化、体外甲基化活性检测、制备多克隆抗体及其性能检测为后续进一步研究 CamA 的功能及其在艰难拟梭菌感染发生、发展及治疗中的作用提供必要的前期基础。

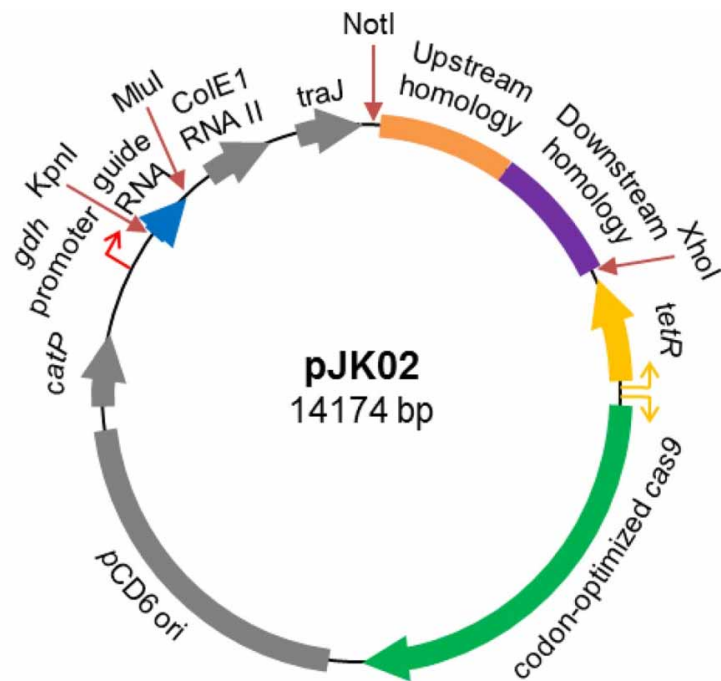
第四章 甲基转移酶 CamA 的 CRISPR-Cas 敲除系统构建

4.1 材料

4.1.1 菌株、质粒和引物

菌株 *CD R2029I* 和质粒 pMTL84151 由西湖大学生命科学学院陶亮研究员提供；接合辅助质粒 pRK24 购买自杭州包赛生物科技有限公司，菌株 *E.coli* HB101 pRK24 由本实验室转化至 *E.coli* HB101 宿主获得；质粒 pET28a-AsCas12a 购买自上海吐露港生物公司；骨架 pJK02 质粒购自武汉淼灵生物科技有限公司（骨架 pJK02 由质粒 pMTL84151 改装构建而成，即在质粒 pMTL84151 上增加 *gdh* 启动子驱动的 guide RNA (gRNA)、目的基因的上下同源臂、脱水四环素

诱导启动的化脓性链球菌 *cas9* 基因三个元件构建而成），其质粒结构见图 4-1。



注：质粒图来源 Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis.. doi:10.1038/s41598-017-15236-5

图 4-1 pJK02 质粒结构示意图

Fig. 4-1 Schematic diagram of plasmid structure of pJK02

4.1.2 实验试剂

本实验所使用的主要实验试剂，见表 3-1。

表 3-1 本实验所使用的主要实验试剂见

Table 3-1 The main reagents used in this study

试剂名称	试剂品牌
PrimeSTAR® GXL Premix Fast, Dye plus	北京宝日医生物技术有限公司
TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase	北京宝日医生物技术有限公司
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version	北京宝日医生物技术有限公司
T-Vector pMD™19 (Simple)	北京宝日医生物技术有限公司
MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	北京宝日医生物技术有限公司
TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0	北京宝日医生物技术有限公司
<i>E.coli</i> DH5α Electro-Cells	北京宝日医生物技术有限公司
<i>E.coli</i> HB101 Electro-Cells	北京宝日医生物技术有限公司

试剂名称	试剂品牌
QuickCut™ <i>Bam</i> H I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Mlu</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Not</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Sac</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Xho</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Kpn</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Nhe</i> I	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Pvu</i> II	北京宝日医生物技术有限公司
QuickCut™ <i>Eco</i> R I	北京宝日医生物技术有限公司
Perfect GelBlue Nucleic Acid Gel Stain	北京宝日医生物技术有限公司
DL2,000 DNA Marker	北京宝日医生物技术有限公司
DL5,000 DNA Marker	北京宝日医生物技术有限公司
DL15,000 DNA Marker	北京宝日医生物技术有限公司
高效无缝克隆试剂盒 (MC40101)	武汉莫纳生物科技有限公司
单片段无缝克隆试剂盒 (MC40201)	武汉莫纳生物科技有限公司
pET28TEV-LbCas12a 质粒	上海吐露港生物科技有限公司
pET28TEV-ASCas12a 质粒	上海吐露港生物科技有限公司
AsCas12a (CpfI) Nuclease	上海吐露港生物科技有限公司
LbCas12a (CpfI) Nuclease	上海吐露港生物科技有限公司
2x Ezmax® Universal CloneMix	上海吐露港生物科技有限公司

4.1.3 常用培养基及实验溶液配制

- (1) 5x 退火缓冲液: 50 mM Tris (pH 7.5-8.0), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA;
- (2) LB、BHI、BHIS 培养基配制参照第三章中的 3.1.4.4 部分进行配制。

4.2 方法

4.2.1 菌株培养

CD R20291 使用 BHIS 培养基, 厌氧培养, 48 h; *E.coli* pJK02 使用含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Chr 抗性的 LB 培养, 37°C, 250 rpm/min, 12-16 h; *E.coli* pMTL84151 使用含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Chr 抗性的 LB 培养, 37°C, 250 rpm/min, 12-16 h; *E.coli* HB101 PRK24 使用含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 抗性的 LB 培养, 37°C, 250 rpm/min, 12-16 h; *E.coli* pET28a-AsCas12a 使用含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 抗性的 LB 培养, 37°C, 250 rpm/min, 12-16 h。

4.2.2 敲除质粒及回补质粒的引物设计

4.2.2.1 Cas9 敲除质粒 gRNA 引物设计

利用 NCBI 的 GenBank 数据库检索 *CD R20291* 的 *camA* 基因, 用 BLAST 序列同源性比对确保同源性 100%, 见图 4-2 和图 4-3; 该基因是艰难拟梭菌中具有高度保守的 6mA 类甲基化转移酶, 所以成为本研究的重点敲除对象。因 NCBI 上显示 *camA* 基因的所有碱基序列都为 CDS 区, 故全部复制至张锋老师实验室 CRISPR 在线设计 gRNA 网站 (<http://crispor.tefor.net/>) 中 Step1 的基因序列框里; 在 Step2 中选择芽孢杆菌大类; 在 Step3 中选择由 20 个碱基组成 Cas9 质粒的 gRNA, 其 PAM 序列为 NGG (N 指任意的碱基) 并点击 Submit, 见图 4-4; 随机选取 4 条 gRNA 作为本研究中敲除 *camA* 基因的 gRNA, 并利用 Cas-OFFinder 网站 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) 分别分析该 4 条 gRNA 的脱靶预测。

Clostridioides difficile R20291 chromosome, complete genome

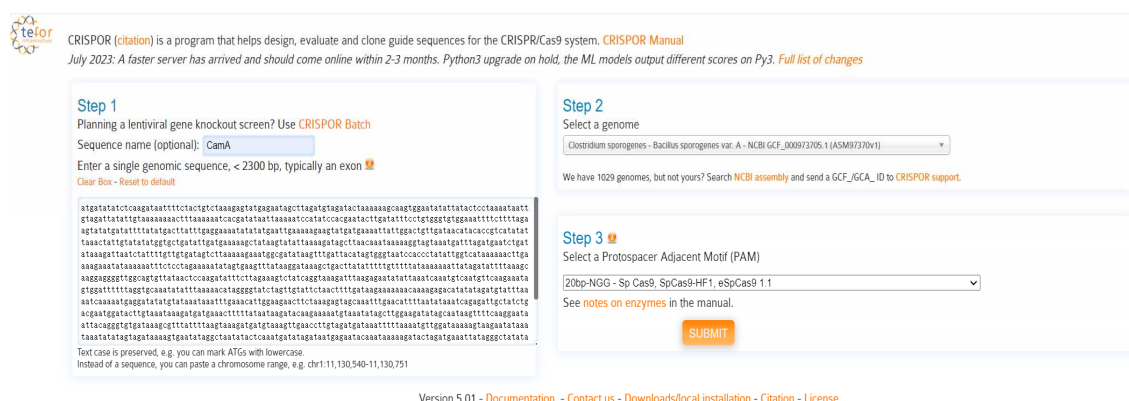
GenBank: CP115183.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>CP115183.1:3128693-3130423 Clostridioides difficile R20291 chromosome, complete genome
TTATATAGCTAAAGAAATCCATTATCAAGTATGCAATTTTATCTGCAATTTTCTACITTTCTCTTATCT
ATAGACTTATTAAATAAATGATATTATTTGCTTTGATAAATCTCTATCTCTTCATAATTATTATCCC
TAAAAATCCTTATCTTCAATAACCTTATTAGGATAGTAATCATATATATTTTACTCAITTTTATAGCAGT
TATTTTAAAGTATTATCATAAACACTGGAAATTTAAATCCAACAGATATTCATATGAAATTTATCT
AAATACCTCTCTTTTATAAAAAAGAAATATACATCTGCACTTGAAAAATGTTATCATAATCTATAGCAA
ATCTATTTTCAATTTGATTATAAGGATACATATCTTTTCTTCTCAAAGAAAGCTTTCTCTACCCCA
TTGAAGTTCATACCATTTCCTTATCCACTTTTACATCTCTCTGTTTCTAATTTTGTTTTATATAGC
CCTATAATTTCACTAGTATCTTTTATTGTATCTCATATATCATTTGAGTATATTAGCCTAT
ATTCACTTTTATCTCATATATATTTTATATTCTTACTTTTATCCAACATTTTAAAAATTTATCATC
TACAAGGTTCAACTTTACATCATCTTACTTAAATAAACGCTTATCACACCCCTGTAATTTTCTTGA
AACTTATTGCTATATCTTCCAAGCTATATTACATTTTCTTGATCTTATTATATAAAAGTTTCATCAT
CTTTATTACAGATATCCATTCGTAGATAGCAATCTCTGATTTATTTAAATGTTCAAATTTGCTACT
CTTTAGAAGTCTTCCAATGTTCAAATTTATTTATACATATATCTCTATTTGATTTTAAATACATCT
ATATATGCTCTTTTGTCTTTTCTTATCAAAAGTTAGAATACAACAGATAGATCCCTATGTTTAAATA
TATTGCACTTAAAAATCCACTATTTCTTGAACATTGACATTTGATTATATATTTCTTAAATCTTT
ACCTGATAGACTTTCTAAGAAATATCTTGGAGTTATAACACTGCCAACCCCTCTGCTTAAATATCT
ATAATTTTATAAAAAAATAAGTCACTTTATCTTATAAATCTCACTATTTTCTAGGA
GAAATTTTATATTTCTTTCAAGTTTATGACCAATATAGGGTGGATTACCCACTATGTAATCAA
CTTATATCGCACTTTCTTTAAGACTATCAACAATAAGATTAATCTTTATATCAGATCATCTAAA
TCATTTTATACCTTTTATTGTTAAGCTATCTTTTAAATATCTTATAGCTTTTTCATCAATATCAGAC
CATATATACAATAGTTTAAATATGACCGTGTATGTTATCAACAGTCCAATAATTTTATCATACTCTT
TTCAATTCATATATATTTTCCCTCAAAAGTCAATATAAAATATCATATCTCTTAAAGAAATTTCCA
CAGCAGACAGAAATTCAGATATTCGTGATATGCAATTTTAAATATATCGTCAATTTTAAAGTTTT
TTACAATATAATCTACAATTTTATAGGATATAATATTTCACTTCTTTTATGATCTCATCTTAA
GCTATTTCTACTCTTTAGACAGTAGAAAAATATCTTGAGATATATCATC
```

图 4-2 *CD R20291* 的 *camA* 基因序列Fig. 4-2 *camA* gene sequence of *CD R20291*

Sequences producing significant alignments			Download	Select columns	Show	100			
select all 100 sequences selected			GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per ident	Acc. Len	Accession
☒	Clostridioides difficile strain FDAARGOS_723 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4178106	CP046327.1
☒	Clostridioides difficile strain 020711 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4174406	CP028530.1
☒	Clostridioides difficile strain 020696 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119431	CP028528.1
☒	Clostridioides difficile strain 020695 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4174373	CP028527.1
☒	Clostridioides difficile strain 020588 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4221948	CP028526.1
☒	Clostridioides difficile strain 020474 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4108203	CP028523.1
☒	Clostridioides difficile strain 020482 chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4182371	CP028525.1
☒	Clostridioides difficile strain DSM 28196 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4205365	CP012320.1
☒	Clostridioides difficile strain DSM 27640 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4229629	CP011848.1
☒	Clostridioides difficile strain DSM 27638 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4229698	CP011846.1
☒	Clostridioides difficile strain 10-00253 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4120065	CP026598.1
☒	Clostridioides difficile strain 10-00078 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119749	CP026597.1
☒	Clostridioides difficile strain 09-00072 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119929	CP026599.1
☒	Clostridioides difficile strain 10-00071 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119720	CP026596.1
☒	Clostridioides difficile strain 12-00011 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119932	CP026595.1
☒	Clostridioides difficile strain 08-00495 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4177956	CP026594.1
☒	Clostridioides difficile strain CD-17-01474 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4201330	CP026591.1
☒	Clostridioides difficile strain CD-10-00484 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119484	CP026592.1
☒	Clostridioides difficile strain 12-00008 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4119604	CP026593.1
☒	Clostridioides difficile isolate MGYG-HGUT-02369 genome assembly chromosome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4190038	LR698984.1
☒	Clostridioides difficile strain TS3_3 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4116134	CP134872.1
☒	Clostridioides difficile strain M7404 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4178077	CP118685.1
☒	Clostridioides difficile strain CDI-01 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4256328	CP126076.1
☒	Clostridioides difficile strain P403A1.1 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4209110	CP117957.1
☒	Clostridioides difficile R20291 chromosome, complete genome	Clostridioides difficile R20291	3197	3197	100%	0.0	100.00%	4204886	CP115183.1

图 4-3 *CD R20291* 的 *camA* 基因的同源性比对Fig. 4-3 Homology comparison of *camA* gene of *CD R20291*图 4-4 利用 Cas9 敲除 *camA* 基因的 gRNA 在线设计Fig. 4-4 Online design of gRNA for *camA* gene knockout by Cas9

采用 Cas9 敲除质粒 gRNA 序列设计模板：5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNGUUUUUAGAACUAUGCUGAAAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG-3' (下划线区域表
 示与特异靶标序列互补配对的 spacer 区，其余区域为 direct repeat 区)，见图 4-
 5，将上述随机选取 4 条由 20 个 bp 组成的 gRNA 分别替换其 spacer 区域，并命
 名为 31T-gRNA、142T-gRNA、77T-gRNA 和 99T-gRNA，gRNA 序列见表 3-2；
 送至上海生物工程有限公司进行基因组合成，以质粒菌的形式合成送达实验室。



图 4-5 Cas9 系统 gRNA 设计的模式图

Fig. 4-5 Pattern diagram of gRNA design for Cas9 system

表 3-2 Cas9 质粒 gRNA 的序列

Table 3-2 gRNA sequences of Cas9 system

名称	碱基序列 5'—3'
31T-gRNA	AAGAAAATTTCCACACCCAC
142T-gRNA	GAATACTTGATATTTTCCTGT
77T-gRNA	TACAATAGTTTAATATATGA
99T-gRNA	AAGTTTTTTTATGACCAATAT

根据无缝克隆连接技术设计上述 4 条 gRNA 的克隆引物，其正向引物模板

为 5'-TGCTATAATTAAACTGTAAAGGTACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' (由前 20 个 bp 为载体序列, 下划线部分为 *Kpn* I 的酶切位点, N 表示为 gRNA 序列共同组成), 反向引物则为通用引物, 其序列为 5'-TAAAAATAGTTGCA GAGCTTACGCGTCACCGACTCGGTGCCACTTT-3' (由前 20 个 bp 为载体序列, 下划线部分为 *Mlu* I 的酶切位点, 后 20 个 bp 为 direct repeat 区序列共同组成), 引物序列见表 3-3; 采用 PCR 扩增, 切胶纯化后用于敲除质粒的 gRNA 构建。

表 3-3 Cas9 敲除质粒 gRNA 引物序列

Table 3-3 gRNA primer sequences of Cas9 knockout system

引物名称	碱基序列 5'—3'	描述
31T-gRNA	TGCTATAATTAAACTGTAAAGGTAC CAAGAAAATTTCCACACCCAC	31T-gRNA 克隆引物
142T-gRNA	TGCTATAATTAAACTGTAAAGGTAC CGAATACTTGATATTTTCCTGT	142T-gRNA 克隆引物
77T-gRNA	TGCTATAATTAAACTGTAAAGGTAC CTACAATAGTTTAAATATATGA	77T-gRNA 克隆引物
99T-gRNA	TGCTATAATTAAACTGTAAAGGTAC CAAGTTTTTTATGACCAATAT	99T-gRNA 克隆引物
gRNA-R	TAAAAATAGTTGCAGAGCTTACGC GTCACCGACTCGGTGCCACTTT	gRNA 扩增通用引物

4.2.2.2 Cas12 敲除质粒 gRNA 引物设计及体外切割验证

一、gRNA 引物设计

参照方法 4.2.2.1 中的 Cas9 的 gRNA 设计流程, 在张锋老师实验室 CRISPR 在线设计 gRNA 网站 (<http://crispor.tefor.net/>) 中的 Step3 选择由 23 个碱基组成 Cas12 质粒 gRNA, 其 PAM 序列为 TTTN (N 仅指 A、C 或 G) 点击 Submit, 见图 4-6; 随机选取 1 条 gRNA 作为本研究中敲除 *camA* 基因的 gRNA, 并利用 Cas-OFFinder 网站 (<http://www.rgenome.net/cas-offfinder/>) 分别分析该条 gRNA 的脱靶预测。

CRISPR (citation) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [CRISPR Manual](#)
July 2023: A faster server has arrived and should come online within 2-3 months. Python3 upgrade on hold, the ML models output different scores on Py3. [Full list of changes](#)

Step 1
Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPR Batch](#)
Sequence name (optional):
Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon
[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

Step 2
Select a genome

We have 1029 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF_ID to [CRISPR support](#).

Step 3
Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

See [notes on enzymes](#) in the manual.

[SUBMIT](#)

Version 5.01 - [Documentation](#) - [Contact us](#) - [Downloads/local installation](#) - [Citation](#) - [License](#)

图 4-6 利用 Cas12 敲除 *camA* 基因的 gRNA 在线设计Fig. 4-6 Online design of gRNA for *camA* gene knockout by Cas12

采用 Cas12 敲除质粒 gRNA 序列设计模板：5'-AAUUUCUACUCUUGUAG AUNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' (下划线区域表示与特异靶标序列互补配对的 spacer 区，其余区域为 direct repeat 区)，见图 4-7；但为了更好的发挥敲除功能我们在模板中引入了 T7 启动子序列，所以最终采用 gRNA 序列设计模板为 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTAAUUUCUACUCUUGUAGAUNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' (前 20 bp 为 T7 启动子序列，下划线区域表示与特异靶标序列互补配对的 spacer 区，其余区域为 direct repeat 区)，将该条随机选取由 23 bp 组成 gRNA 分别替换其 spacer 区域，并命名为 Cas12-gRNA1；由于 Cas12 敲除质粒 gRNA 序列设计模板（含 T7 启动子）共 63 bp，所以我们采用合成一对互补引物通过退火形成双链的方式，获得 Cas12-gRNA1 的模板，互补引物由上海生物公司进行合成并纯化。



图 4-7 Cas12 系统 gRNA 设计的模式图

Fig. 4-7 Pattern diagram of gRNA design for Cas12 system

根据无缝克隆连接技术设计本条 gRNA 的克隆引物，其正向引物模板为 5'-TGCTATAATTAAGTGTAAAGGTACCTAATACGACTCACTATAGGG-3' (由前 20 bp 为载体序列，下划线部分为 *Kpn I* 的酶切位点，后 20 bp 为 T7 启动子序列共同组成)，反向引物序列为 5'-TAAAAATAGTTGCAGAGCTTACGCGTCTT TAGAAGTTCTTCCAATGTTT-3' (由前 20 bp 为载体序列，下划线部分为 *Mlu I*

的酶切位点, 后 23 bp 为 gRNA 序列共同组成), 引物序列见表 3-4; 采用 PCR 扩增, 切胶纯化后用于 Cas12 敲除质粒的 gRNA 构建。

表 3-4 Cas12 敲除质粒 gRNA 序列及其引物序列

Table 3-4 gRNA and its primer sequences of Cas12 knockout system

名称	碱基序列 5'—3'	描述
Cas12-gRNA1	TAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCT ACTGTTGTAGATAAACATTGGAAGAAC TTCTAAAG	gRNA 序列
12a1F	GGTACCTAATACGACTCACTATAGGGT AATTTCTACTGTTGTAGATAAACATTGG AAGAACTTCTAAAGACGCGT	互补引物正向
12a1R	ACGCGTCTTTAGAAGTTCTTCCAATGTT TATCTACAACAGTAGAAATTACCCTAT AGTGAGTCGTATTAGGTACC	互补引物反向
P12a1F	TGCTATAATTAACTGTAAAGGTACCT AATACGACTCACTATAGGG	克隆引物正向
P12a1R	TAAAAATAGTTGCAGAGCTTACGCGTC TTAGAAGTTCTTCCAATGTTT	克隆引物反向

二、体外切割验证

1. 通过 *camA* 基因序列 PCR 扩增及切胶纯化, 获得体外切割实验的 Target DNA; 利用 NEB 公司的 T7 快速高产量 RNA 转录试剂盒体外获取 crRNA, 步骤如下:

- 1) 在冰上解冻试剂盒的成分, 涡旋振荡仪混合充分并在离心机中脉冲旋转, 将溶液收集到试管底部;
- 2) 采用说明书中的短转录物 (<0.3 kb) 反应体系按照表 3-5 进行配制;
- 3) 充分混合并在离心机中脉冲旋转。37°C 过夜诱导转录;
- 4) 为了去除步骤 2) 中剩余的模板 DNA, 向上述 30 μ L 转录反应体系中加入 45 μ L Nuclease-free water 和 3 μ L DNase I (RNase-free), 37°C 反应 15 min;
- 5) 灭活步骤 4) 反应体系中的 DNase I 酶活性, 步骤 4) 反应结束后再在 65°C 反应 15 min, 防止后续实验出现假阳性;

表 3-5 制备 crRNA 的反应体系

Table 3-5 Reaction system for preparing crRNA

试剂	加样量	终浓度
Nuclease-free water	16.3 μ L	
NTP Buffer Mix	10 μ L	6.7 mM each NTP final
Template DNA	0.2 μ L	1 μ g
0.1 M DTT	1.5 μ L	5 mM
T7 RNA Polymerase Mix	2 μ L	
总体系	30 μ L	

2. 利用 NEB 公司的 the Monarch RNA Cleanup Kits 试剂盒纯化产物 crRNA，到此获得纯的产物 crRNA 用于后续的体外切除实验，具体步骤如下：

- 1) 向待纯化 50 μ L 样品中加入 100 μ L 试剂盒中的 RNA Cleanup Binding Buffer；
- 2) 向步骤 1) 中添加 150 μ L 无水乙醇，轻轻混合；
- 3) 组装试剂盒中的柱子和收集管，将步骤 2) 中的样品装载到柱子里并关好盖子，16,000 g 离心 30 s，弃去废液；
- 4) 组装好柱子和收集管，向柱子中加入 500 μ L RNA Cleanup Wash Buffer，16,000 g 离心 30 s，弃去废液；
- 5) 重复步骤 4)；
- 6) 取出柱子装入新的 1.5 mL 无 RNase 的离心管中，向柱子正中央加入 20-100 μ L 的 nuclease-free water，静置 2 min，16,000 g 离心 30 s，收集的 RNA 用于后续反应或保存于 -70°C。

3. 利用吐露港生物公司 DNA 核酸内切酶中的 AsCas12a 验证本条 Cas12-gRNA1 的体外切割能力，具体步骤如下：

- 1) 顺式剪切实验按照表 3-6 在冰上配制体外顺式剪切反应体系；
- 2) 37°C 反应 1 h，85°C 灭活 5 min；
- 3) 核酸电泳分析顺式剪切产物。

表 3-6 体外剪切的反应体系

Table 3-6 In vitro shear reaction system

组分	体积	终浓度
----	----	-----

10x HOLMES Buffer 1	2 μ L	1x
10 μ M AsCas12a Nuclease	0.5 μ L	250 nM
10 μ M crRNA	0.5 μ L	250 nM
1 μ M Target DNA	0.5 μ L	25 nM
Nuclease-free water	Up to 20 μ L	

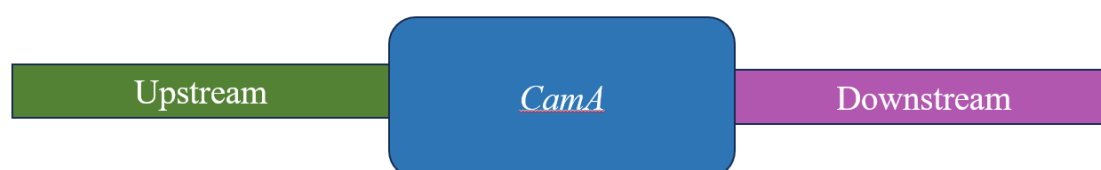
4.2.2.3 敲除质粒同源臂引物设计

利用 NCBI 的 GenBank 数据库检索 *CD R20291* 的 *camA* 基因前 1000 bp 和后 1000 bp 模板序列全长共 3731 bp 见图 4-8，通过反向互补网站 (https://detaibio.com/sms2/rev_comp.html) 选择其中反向互补功能，将模板序列转换成引物序列；根据无缝克隆连接技术设计 700 bp 左右大小的同源臂序列见图 4-9，其上游同源臂引物为 *camA*-UU: 5'-TTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCGCTTAACCTTTCACATGATTAAACG-3'（前半部分为载体序列，下划线部分为 *Not* I 的酶切位点，后半部分为 Upstream 序列），*camA*-UD: 5'-CAAAGAAAAGCTTTTCTCTACCCCATTA CTCTTTAGACAGTAGAAAATTATCTTGAG-3'（本条序列为 *camA*-DU 的反向互补序列）；下游同源臂引物为 *camA*-DU: 5'-CTCAAGATAATTTTCTACTGTCTAAAGAGTAATGGGGTAGAGAAAAGCTTTTCTTTG-3'（下划线部分为 Downstream 序列，其余部分为 Upstream 序列），*camA*-DD: 5'-CTGCGATCGCGCATGTCTGCAGGCCTCGAGCACCTACTATATCAAAAACGTTTCTG-3'（前半部分为载体序列，下划线部分为 *Xho* I 的酶切位点，后半部分为 Downstream 序列）。



图 4-8 NCBI 的 GenBank 数据库检索 *camA* 基因同源臂

Fig. 4-8 Searching *camA* gene homologous arm in GenBank database of NCBI



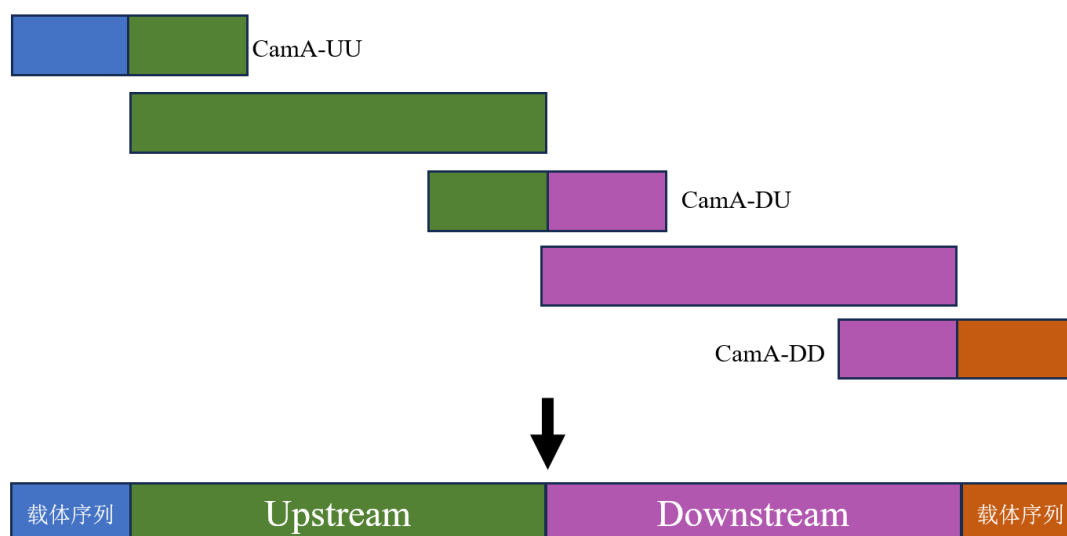


图 4-9 *camA* 基因上下同源臂结构图及引物设计示意图

Fig. 4-9 Structural diagram of upper and lower homologous arms of *camA* gene and schematic diagram of primer design

4.2.2.4 回补质粒引物设计

根据 GenBank 上的艰难拟梭菌 DNA 甲基转移酶 CamA 序列号 (CEJ99386.1)，利用 SnapGene 3.2.1 软件设计引物，基因序列如下：*camA*_HB-F: 5'-CCG CTCGAGGATGATATATCTCAAGATAATTTTCTACT-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点)，*camA*_HB-R: 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAatgatgatgatgatgattatatacctaagaatccattatcaag-3' (下划线部分为 *Not* I 酶切位点及小写部分为 6x His 标签)，引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并纯化。以艰难拟梭菌 R20291 的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *camA* 序列，并将其通过无缝克隆技术连接到经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切的线性载体 pMTL84151 中以产生 pMTL84151-*camA*。通过接合的方式+进入到 *CD R20291* 中。

4.2.2.5 Cas12 片段克隆引物设计

从吐露港生物公司购买 pET28a-AsCas12a 质粒，利用 SnapGene 3.2.1 软件设计引物，引物序列如下：Cas12a-F: 5'-ATCGTAGCGTTAACAGATCTGAGCTCatgacacagttcgagggtt-3' (前面大写部分为载体序列，下划线部分为 *Sac* I 酶切位点，后面小写部分为 AsCas12a 序列)，Cas12a-R: 5'-TGCAGGCTTCTTATTTTATGCTAGCctagttcctcagctcctgga-3' (前面大写部分为载体序列，大写下划线部分为 *Nhe* I 酶切位点，后面小写部分为 AsCas12a 序列)，见图 4-10；引物由生工生

物工程(上海)股份有限公司合成并纯化。



图 4-10 Cas12 克隆片段引物设计示意图

Fig. 4-10 Schematic diagram of primer design for Cas12 clone fragment

4.2.3 敲除质粒的构建

4.2.3.1 Cas9 敲除质粒的构建

一、gRNA 的构建

1. gRNA 克隆序列 PCR 的扩增及纯化

利用 PCR 技术扩增 gRNA 克隆序列。以含有 gRNA 片段的质粒菌为 DNA 模板，采用 PCR 扩增其反应体系为：10x *Ex Taq* Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 5 μL, *TaKaRa Ex Taq* (5 U/μL) 0.25 μL, dNTP Mixture 4 μL, 上、下游引物各 1 μL, 基因组 DNA 2 μL, 灭菌 ddH₂O 36.75 μL, 共 50 μL。反应条件为：第一阶段 95°C 预变性 10 min；第二阶段共 35 个循环，以 95°C 变性 30 s、58°C 退火 30 s、72°C 延伸 40 s 为一个循环；第三阶段 72°C 再延伸 5 min；PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

利用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收 gRNA 克隆序列为了用于后续的连接实验，其步骤如下：

- 1) 对目的 DNA 进行由 TAE 缓冲液制作的 1% 琼脂糖凝胶电泳；
- 2) 借助紫外灯切下含有目标 DNA 的琼脂糖凝胶，并尽可能避免切到不含目的 DNA 部分的凝胶，提高 DNA 回收率；
- 3) 切碎胶块可以加快胶块溶解时间进一步提高 DNA 回收率；
- 4) 称量胶块重量并按 1 mg=1 μL 计算胶块体积向胶块中加入 3 个凝胶体积量；
- 5) 放置 37°C, 10 min, 间断振荡混合可缩短溶胶时间；
- 6) 当纯化小于 400 bp 的 DNA 片段时需加入终浓度为 20% 的异丙醇；当纯化片段在 400 bp 以上时可忽略此操作；
- 7) 把 Spin Column 组装至 Collection Tube 上，并将步骤 6) 全部溶液转移至 Spin Column 中，13,400×g, 1 分钟，弃滤液；
- 8) 将 700 μL Buffer WB 加入 Spin Column 中，13,400×g, 30 秒钟，弃滤液；

- 9) 重复步骤 8);
- 10) 将 Spin Column 组装 Collection Tube 上, 13,400×g, 1 分钟, 弃除残留洗液;
- 11) 再把 Spin Column 组装至新的 1.5 mL 的离心管上, 向 Spin Column 膜的中央加入 30 μL 已经加热至 60°C 的灭菌水, 室温静置 1 分钟;
- 12) 洗脱 DNA, 13,400×g, 1 分钟。

2. pJK02 载体的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 的双酶切及纯化

采用 TaKaRa 公司质粒 DNA 小量纯化试剂盒从 *E.coli* pJK02 中提取 pJK02 载体。具体操作步骤如下:

- 1) 从平板培养基上挑选单菌落接种至 4 mL 含有氯霉素的液体培养基中, 37°C 过夜培养;
- 2) 取 4 mL 的过夜培养菌液, 13,400×g, 2 分钟, 弃上清;
- 3) 加入 250 μL Solution I (含 RNase A) 并使用振荡器充分悬浮细菌沉淀;
- 4) 加入 250 μL Solution II 轻轻上下翻转 5~6 次充分裂解菌体, 形成透明溶液;
- 5) 加入 350 μL 的 4°C 预冷的 Solution III, 轻轻上下翻转混合 5~6 次, 直至形成紧实凝集块;
- 6) 室温静置 2 分钟, 13,400×g 离心 10 分钟, 取上清进行下一步;
- 7) 把 Spin Column 安装至 Collection Tube 上, 将步骤 6) 的上清液转移至 Spin Column 中, 13,400×g, 1 分钟, 弃滤液;
- 8) 加入 500 μL Buffer WA 至 Spin Column, 13,400×g, 30 秒钟, 弃滤液;
- 9) 加入 700 μL Buffer WB 至 Spin Column 中, 13,400×g, 30 秒钟, 弃滤液;
- 10) 重复步骤 9) ;
- 11) 重新将 Spin Column 组装至 Collection Tube 上, 13,400×g, 1 分钟, 弃除残留洗液;
- 12) 把 Spin Column 组装至新的 1.5 mL 的离心管上, 向 Spin Column 膜的中央加入 50 μL 已经加热至 60°C 的灭菌水, 室温静置 1 分钟;
- 13) 洗脱质粒 DNA, 13,400×g, 1 分钟。

利用 TaKaRa 公司的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 限制性快切酶对 pJK02 载体进行双酶切, 其酶切反应体系: 10x QuickCut Green Buffer 5 μL, 质粒 DNA (≤ 1 μg) 2 μL, QuickCut *Mlu* I 1 μL, QuickCut *Kpn* I 1 μL, 灭菌水 41 μL, 酶切总体系为 50 μL;

轻轻混匀后瞬时离心；37°C反应 30 min；1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。通过切胶试剂盒纯化获得含有 *Kpn* I 和 *Mlu* I 的线性化载体 pJK02，用于后续的连接实验。

3. 无缝克隆连接 gRNA 至线性化质粒 pJK02

采用吐露港生物公司开发的一步法单片段/多片段通用型无缝克隆试剂盒构建 pJK02-gRNA 质粒。在冰上配制重组反应体系：2x Ezmax® Universal Clone Mix 10 μ L，线性化载体 20 ng/kb（最低 40 ng），外源 DNA 插入片段 40 ng/kb（最低 20 ng/每片段），总体系为 20 μ L，剩余的补 ddH₂O；37°C反应 30 min 后，将反应产物置于冰上 5 min 终止反应；反应产物直接用于后续的转化实验。

二、同源臂的构建

1. 同源臂克隆序列的扩增及纯化

利用 PCR 技术扩增同源臂克隆序列。以艰难拟梭菌标准株 *R20291* 基因组 DNA 为模板，其 PCR 扩增反应体系为：10x *Ex Taq* Buffer（20 mM Mg²⁺ plus）5 μ L，*TaKaRa Ex Taq*（5 U/ μ L）0.25 μ L，dNTP Mixture 4 μ L，上、下游引物各 1 μ L，基因组 DNA 2 μ L，灭菌 ddH₂O 36.75 μ L，共 50 μ L。反应条件为：第一阶段 95°C预变性 5 min；第二阶段共 35 个循环，以 95°C变性 30 s、58°C退火 30 s、72°C延伸 60 s 为一个循环，第三阶段 72°C再延伸 5 min；PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

利用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收同源臂克隆序列，用于后续的连接实验，具体回收操作参照前文相关步骤。

2. pJK02-gRNA 载体的 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切及纯化

采用 TaKaRa 公司质粒 DNA 小量纯化试剂盒从 *E.coli* pJK02-gRNA 中提取 pJK02-gRNA 载体，具体质粒提取步骤参照前文相关操作。

利用 TaKaRa 公司的 *Not* I 和 *Xho* I 限制性快切酶对 pJK02-gRNA 载体进行双酶切，其酶切反应体系：10x QuickCut Green Buffer 5 μ L，质粒 DNA（ ≤ 1 μ g）2 μ L，QuickCut *Not* I 1 μ L，QuickCut *Xho* I 1 μ L，灭菌水 41 μ L，酶切总体系为 50 μ L；轻轻混匀后瞬时离心；37°C反应 30 min；1%琼脂糖凝胶电泳鉴定；通过切胶试剂盒纯化获得含有 *Not* I 和 *Xho* I 的线性化载体 pJK02-gRNA，用于后续的连接实验。

3. 无缝克隆连接同源臂至线性化质粒 pJK02-gRNA 构成完整 Cas9 敲除质粒

采用吐露港生物公司开发的一步法单片段/多片段通用型无缝克隆试剂盒构建 pJK02-gRNA 质粒。在冰上配制重组反应体系：2x Ezmax[®] Universal Clone Mix 10 μ L，线性化载体 20 ng/kb（最低 40 ng），外源 DNA 插入片段 40 ng/kb（最低 20 ng/每片段），总体系为 20 μ L，剩余的补 ddH₂O；37°C 反应 5~30 min；反应结束后，将反应产物置于冰上 5 min 以终止反应；反应产物直接用于后续的转化实验或冻存于 -20°C 备用

4.2.3.2 Cas12 敲除质粒的构建

一、gRNA 的构建

1. gRNA 克隆序列 PCR 的扩增及纯化

利用 PCR 技术扩增 gRNA 克隆序列。以含有 cas12_gRNA 片段的质粒菌为 DNA 模板，采用 PCR 扩增其反应体系为：10x *Ex Taq* Buffer（20 mM Mg²⁺ plus）5 μ L，*TaKaRa Ex Taq*（5 U/ μ L）0.25 μ L，dNTP Mixture 4 μ L，上、下游引物各 1 μ L，基因组 DNA 2 μ L，灭菌 ddH₂O 36.75 μ L，共 50 μ L。反应条件为：第一阶段 95°C 预变性 10 min；第二阶段共 35 个循环，以 95°C 变性 30 s、58°C 退火 30 s、72°C 延伸 40 s 为一个循环；第三阶段 72°C 再延伸 5 min；PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

利用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收 cas12_gRNA 克隆序列，用于后续的连接实验，具体操作参照 Cas9 敲除质粒构建中的相关步骤。

2. Cas9 质粒的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 的双酶切及纯化

采用 TaKaRa 公司质粒 DNA 小量纯化试剂盒从 *E.coli* Cas9 中提取 Cas9 敲除载体，具体操作参照 Cas9 敲除质粒构建中的相关步骤。

利用 TaKaRa 公司的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 限制性快切酶对 Cas9 敲除载体进行双酶切，其酶切反应体系：10x QuickCut Green Buffer 5 μ L，Cas9 质粒 DNA（ $\leq 1 \mu$ g）2 μ L，QuickCut *Mlu* I 1 μ L，QuickCut *Kpn* I 1 μ L，灭菌水 41 μ L，酶切总体系为 50 μ L；轻轻混匀后瞬时离心；37°C 反应 30 min；1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。通过切胶试剂盒纯化获得含有 *Kpn* I 和 *Mlu* I 的线性化 Cas9 质粒用于后续连接实验。

3. 无缝克隆连接 cas12_gRNA 至线性化 Cas9 质粒构建 Cas9-cas12_gRNA 质粒

采用吐露港生物公司开发的一步法单片段/多片段通用型无缝克隆试剂盒构建 Cas9-cas12_gRNA 质粒，用于下一步 Cas12 片段的构建。在冰上配制重组反

应体系：2x Ezmax[®] Universal Clone Mix 10 μ L，线性化载体 20 ng/kb（最低 40 ng），外源 DNA 插入片段 40 ng/kb（最低 20ng/每片段），总体系为 20 μ L，剩余的补 ddH₂O；37°C 反应 30 min，将反应产物置于冰上 5 min 终止反应；反应产物直接用于后续的转化实验或冻存于 -20°C 备用。

二、Cas12 片段的构建

Cas12 片段构建于上一部分 cas12_gRNA 构建的 Cas9-cas12_gRNA 质粒基础。

1. Cas12 克隆片段的扩增及纯化

利用 PCR 技术扩增 Cas12 克隆片段。以公司购买的 pET28a-AsCas12a 质粒 DNA 为模板，其 PCR 扩增反应体系为：10x *Ex Taq* Buffer（20 mM Mg²⁺ plus）5 μ L，*TaKaRa Ex Taq*（5 U/ μ L）0.25 μ L，dNTP Mixture 4 μ L，上、下游引物各 1 μ L，质粒 DNA 2 μ L，灭菌 ddH₂O 36.75 μ L，共 50 μ L。反应条件为：第一阶段 95°C 预变性 5 min；第二阶段共 35 个循环，以 95°C 变性 30 s、58°C 退火 30 s、72°C 延伸 3 min 为一个循环；第三阶段 72°C 再延伸 5 min；PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

利用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收 Cas12 克隆片段，用于后续的连接实验，具体回收操作参照前文相关步骤。

2. Cas9-cas12_gRNA 载体的 *Sac* I 和 *Nhe* I 双酶切及纯化

采用 TaKaRa 公司质粒 DNA 小量纯化试剂盒从 *E.coli* Cas9-cas12_gRNA 中提取 Cas9-cas12_gRNA 载体，具体操作参照 Cas9 敲除质粒构建中的相关步骤。

利用 TaKaRa 公司的 *Sac* I 和 *Nhe* I 限制性快切酶对 Cas9-cas12_gRNA 载体进行双酶切，其酶切反应体系：10x QuickCut Green Buffer 5 μ L，Cas9 质粒 DNA（ $\leq 1 \mu$ g）2 μ L，QuickCut *Sac* I 1 μ L，QuickCut *Nhe* I 1 μ L，灭菌水 41 μ L，酶切总体系为 50 μ L；轻轻混匀后瞬时离心；37°C 反应 30 min；1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。通过切胶试剂盒纯化获得含有 *Sac* I 和 *Nhe* I 的线性化 Cas9 质粒，用于后续的连接实验。

3. 连接 Cas12 片段至线性化质粒 Cas9-cas12_gRNA 构成完整 Cas12 敲除质粒

采用吐露港生物公司开发的一步法单片段/多片段通用型无缝克隆试剂盒构建完整 Cas12 敲除质粒。在冰上配制重组反应体系：2x Ezmax[®] Universal Clone Mix 10 μ L，线性化载体 20 ng/kb（最低 40 ng），外源 DNA 插入片段 40 ng/kb

(最低 20 ng/每片段)，总体系为 20 μ L，剩余的补 ddH₂O；37°C 反应 30 min 后将反应产物置于冰上 5 min 终止反应；反应产物直接用于后续转化实验。

4.2.4 回补质粒的构建

PCR 扩增 *camA* 基因回补克隆序列，反应体系如下：10x *Ex Taq* Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 5 μ L，TaKaRa *Ex Taq* (5 U/ μ L) 0.25 μ L，dNTP Mixture 4 μ L，上、下游引物各 1 μ L，DNA 2 μ L，灭菌 ddH₂O 36.75 μ L，共 50 μ L。反应条件为：第一阶段 95°C 预变性 5 min；第二阶段共 35 个循环，以 95°C 变性 30 s、58°C 退火 30 s、72°C 延伸 60 s 为一个循环；第三阶段 72°C 再延伸 5 min；PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定；试剂盒纯化回收并将其通过无缝克隆技术连接到经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切的线性载体 pMTL84151 中以获得 *E.coli* pMTL84151-*camA* 质粒菌。

4.2.5 质粒电转化

由于本实验中敲除质粒均超过 14,000 bp，所以转化实验均采用电转化，具体操作步骤如下：

- 1) *E.coli* HB101 Electro-Cells (50 μ L) 使用前在冰上融化；
- 2) 在融化的细胞中假如 1~2 μ L DNA 溶液；
- 3) 将 *E.coli* HB101 Electro-Cells 和 DNA 混合液注入冰中预冷的 0.1 cm 电转杯；
- 4) 使用 BIO-RAD Gene Pulser 电转仪，参数设置为 200 Ω ，25 μ F，1.8 kV，电压冲击后，迅速置于冰中冷却，加入 1 mL 冰中预冷的 SOC 培养基；
- 5) 37°C，250 rpm 振荡培养 1 小时；
- 6) 取适量涂布含有抗生素的选择培养基（平板涂布量按照直径为 9 cm 的平板不超过 100 μ L；本部分所有 Cas9、Cas12 敲除质粒均涂至含有 50 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板，接合辅助质粒 *E.coli* HB101 pRK24 涂布至含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板）；37°C 过夜培养。

4.2.6 三亲接合

本部分采用三亲接合的方式，借助接合辅助质粒 *E.coli* HB101 pRK24 将上

述用于删除 *camA* 基因的 Cas9、Cas12 敲除质粒转入到艰难拟梭菌 *R20291*，加 100 ng/mL 的诱导剂，诱导敲除质粒发挥其功能并筛到敲除株，详细步骤如下：

一、重组敲除质粒菌与接合辅助质粒 *E.coli* HB101 pRK24 的共轭接合

- (1) 复苏 *E.coli* HB101 pRK24 接合辅助质粒和敲除 *camA* 的重组质粒菌，37℃，250 rpm/min 过夜摇菌；
- (2) 各取 2 mL，13,400×*g*，室温离心 1 min，去除培养基上清，留菌体；
- (3) 用无抗性的 LB 清洗两次，4500×*g*，室温离心 2 min，去上清，留菌体；
- (4) 再用 100 μL 的无抗性 LB 重悬；
- (5) 重组敲除质粒菌和 *E.coli* HB101 pRK24 质粒菌按 1:4 的比例混入，如 20 μL 的重组敲除质粒菌和 80 μL 的 *E.coli* HB101 pRK24 质粒菌混合于无菌 1.5 mL 的离心管中；
- (6) 斑点在无抗性的 LB 固体平板上，37℃，1 h（针对上述 100 μL 的混合菌，可按照 2 滴 20 μL 和 6 滴 10 μL 的菌液，进行斑点分布在平板上，彼此有一定间距，保障菌液能平铺，使表面积增加，进一步增加接合效率）；
- (7) 冲板，用 1 mL 的无抗性 LB 培养液冲板，使用 1.5 mL 的无菌离心管收集；
- (8) 稀释后（稀释比例按照 1:100，1:10,000，1:1000,000 进行）涂布到含有 100 μg/mL Amp 和 50 μg/mL Chr 的双抗 LB 培养基中，过夜培养，37℃；
- (9) 从双抗选择性平板上挑单克隆菌落进行菌落 PCR 验证，若筛到含有 pRK24 质粒和重组敲除质粒的 *E.coli* HB101 单克隆，转入到含有 100 μg/mL Amp 和 50 μg/mL Chr 的双抗 LB 液体培养基中，37℃，250 rpm/min，过夜摇菌（用于下一步结合至 *CD R20291*）。

二、含有双质粒（pRK24 和重组敲除质粒）*E.coli* HB101 与 *CD R20291* 的接合

- (1) 取 1 mL 添加 Amp 和 Chr 的 LB 液过夜培养物，6700×*g*，室温离心 2 min，去除培养基上清，留菌体；
- (2) 用无抗性的 LB 清洗两次，4500×*g*，离心 2 min，弃上清（注：第二次弃上清及后续操作需在厌氧工作站中进行，防止 *CD R20291* 的活性受影响）；
- (3) 取 500 μL 经 BHI 培养样液过夜培养的 *CD R20291*，进行热休克处理，利用金属浴 50℃，15 min，立即放到 37℃，冷却 2 min，
- (4) 再次将上述经热休克处理过的 *CD R20291* 立刻转移入厌氧工作站中，开盖

重悬含有 pRK24 质粒和重组敲除质粒的菌体沉淀；

- (5) 斑点于无抗性的 BHI 固体平板，厌氧环境下共轭接合 24 h；
- (6) 用 1 mL 的无抗性的 BHI 培养液冲板，使用 1.5 mL 的无菌离心管收集；
- (7) 取 100 μ L 的冲板菌液，涂布至添加有 100 μ g/mL 卡那霉素、15 μ g/mL 甲砒霉素和 250 μ g/mL 环丝氨酸的 BHIS 选择性平板上进行筛选，观察培养 2-3 天，首先使用引物 5'catP 3'和 3'catP 5'（*catP* 为质粒骨架上的特异片段）PCR 扩增验证重组敲除质粒是否成功进入 *CD R2029I*，直至筛到含有敲除质粒的 *CD R2029I* 则进行下一步诱导实验。

4.2.7 诱导敲除

- (1) 将含有重组敲除质粒的 *CD R2029I* 首先在含有 15 μ g/mL 甲砒霉素的 BHI 液体培养基中过夜培养，生长至其对数期（注意：该过程需严格无菌操作，防止引入外源污染）；
- (2) 次日将 250 μ L 过夜培养菌液添加到 4.75 mL 含有 15 μ g/mL 甲砒霉素和 100 ng/mL 的脱水四环素（epianhydrotetracycline, eATC）的 BHI 新鲜培养液中，诱导培养 24 h。
- (3) 用检测引物 2761F 和 2761R（见图 4-11）PCR 扩增后经琼脂糖凝胶电泳分析，筛选缺失 *camA* 基因的 *CD R2029I* 敲除株。

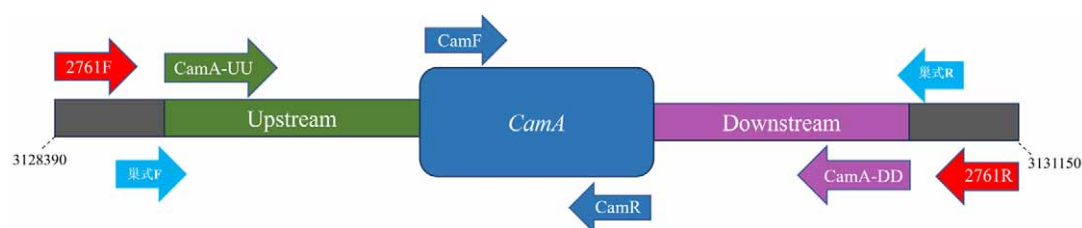


图 4-11 *CD R2029I* 基因组从 3128390 到 3131150 序列

Fig. 4-11 The genome sequence of *CD R2029I* ranges from 3128390 to 3131150

4.2.8 筛选敲除株

经脱水四环素诱导后的每管液体菌，利用 PCR 扩增及测序比对确认含有缺失 *camA* 基因的敲除株，则将该管诱导后的菌液取 50 μ L 涂至含有 15 μ g/mL 甲砒霉素的 BHI 固体平板上（注：严格无菌操作），厌氧培养 48 h 上长出单克隆菌，大量挑取单克隆菌，进行菌落 PCR 扩增检测引物，筛选验证，直至筛选到缺失 *camA* 的 *CD R2029I* 敲除株。

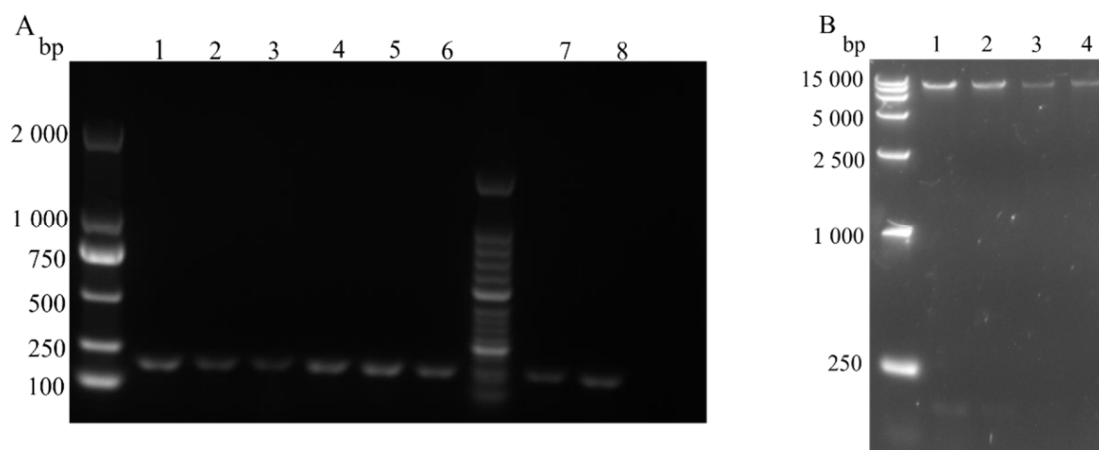
4.3 结果

4.3.1 gRNA 序列及同源臂扩增

4.3.1.1 *camA* 基因的 gRNA 序列的扩增

一、Cas9 系统的 4 条 gRNA 扩增纯化及线性载体酶切后纯化

Cas9 的 4 条 gRNA 依次经过 PCR 扩增和切胶纯化后，1%琼脂糖凝胶电泳分析显示大小与预期一致；质粒 pJK02 的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切后，经切胶纯化获得与预期一致的线性骨架用于后续的连接实验，见图 4-12。



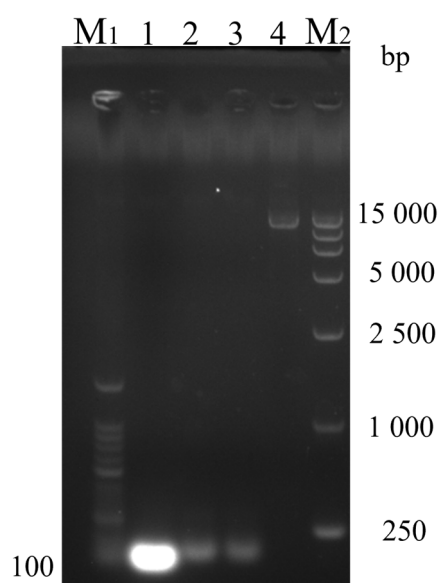
A: Cas9 系统 4 条 gRNA 扩增后纯化图，其中 M 为 DL2,000 DNA Marker，泳道 1,2 为 142T-gRNA，诱导 3,4 为 77T-gRNA，泳道 5,6 为 99T-gRNA，泳道 7,8 为 31T-gRNA；B: 质粒 pJK02 的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切，其中 M 为 DL15,000 DNA Marker，泳道 1,2 为质粒 pJK02 的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切图，泳道 3,4 为纯化回收线性骨架

图 4-12 Cas9 系统 gRNA 的扩增及线性骨架的回收

Fig. 4-12 Amplification of gRNA in Cas9 system and recovery of linear framework

二、Cas12 系统的 gRNA 扩增纯化及线性载体酶切后纯化

经 1%琼脂糖凝胶电泳分析，Cas12 系统的 gRNA PCR 扩增与预期大小一致；质粒 pJK02 的 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切后，经切胶纯化获得与预期一致的线性骨架用于后续的连接实验，见图 4-13。



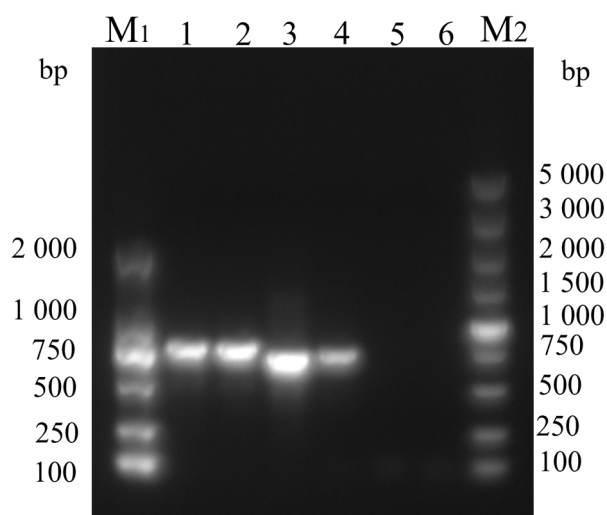
M1: 100 bp DNA Ladder; 1: Cas12 系统 gRNA 的 PCR 扩增, 2, 3: 切胶纯化; 4: 经 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切纯化后的线性骨架; M2: DL15,000 DNA Marker

图 4-13 Cas12 系统 gRNA 的扩增及线性骨架的回收

Fig. 4-13 Amplification of gRNA in Cas12 System and Recovery of Linear framework

4.3.1.2 *camA* 基因的同源臂扩增

采用 PCR 扩增 *camA* 基因的同源臂扩增大小与预期一致, 见图 4-14。



M1: DL2,000 DNA Marker; 1, 2: *camA* 上游同源臂; 3, 4: *camA* 下游同源臂; M2: DL5,000 DNA Marker

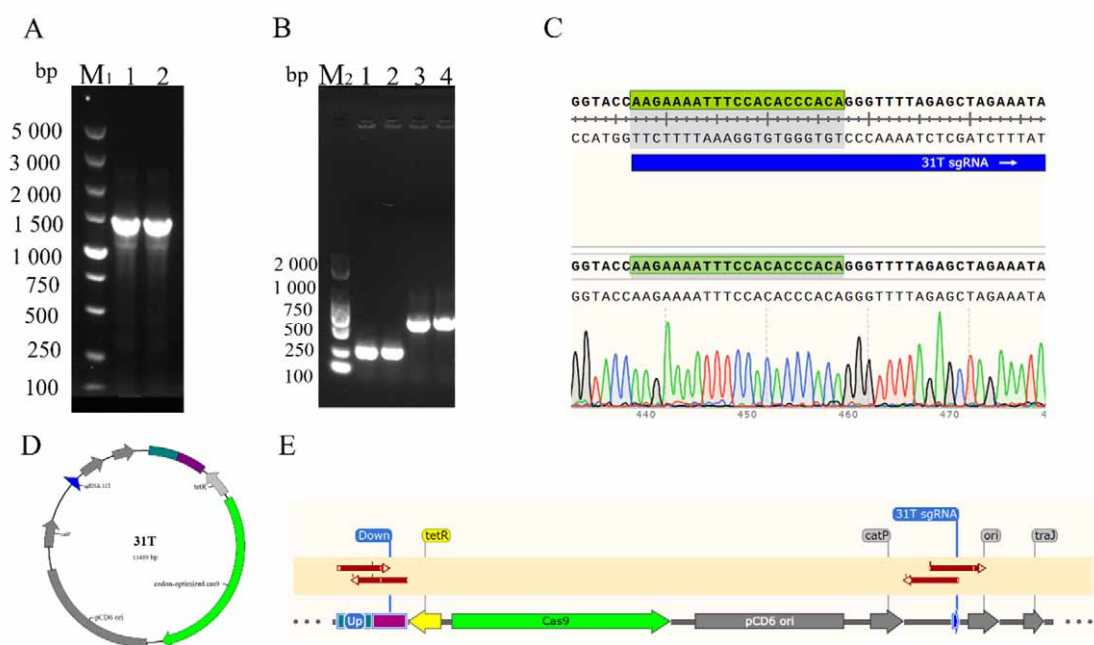
图 4-14 *camA* 基因的同源臂扩增

Fig. 4-14 Homologous arm amplification of *camA*

4.3.2 敲除质粒和回补质粒的构建及验证

4.3.2.1 Cas9 敲除质粒构建及验证

将纯化的 31T-gRNA 与经 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切的线性化骨架进行无缝连接，采用 *E.coli* HB101 Electro-Cells 进行电转化，经含有氯霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，提取 pJK02-31T-gRNA 质粒；使用 *Xho* I 和 *Not* I 对 pJK02-31T-gRNA 质粒进行双酶切后，与 *CamA* 上游同源臂和下游同源臂无缝连接以及采用 *E.coli* HB101 Electro-Cells 进行电转化，经含有氯霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，菌落 PCR 扩增验证，经软件 SnapGene 6.02 测序比对无误后，则本部分的 Cas9 敲除质粒中的 31T 敲除质粒就构建成功，见图 4-15；本部分的其他 3 个 Cas9 敲除质粒构建情况，见图 4-16。



A: *camA* 同源臂构建成功 PCR 扩增验证，M1: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1, 2: 构建 *camA* 同源臂阳性克隆的菌落 PCR; B: 31T-gRNA 构建成功的菌落 PCR 验证，M2: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1, 2: 使用 31T-gRNA 克隆引物和 gRNA 扩增通用引物验证，泳道 3, 4: 载体上设计的正向引物和 gRNA 扩增通用引物验证; C: 载体上设计的正向引物和 gRNA 扩增通用引物测序峰图，其中标记部分为 31T-gRNA 的序列; D: 敲除质粒 31T 示意图; E: 软件 SnapGene 6.02 测序比对图

图 4-15 31T 敲除质粒构建及验证

Fig. 4-15 Construction and verification of 31T knockout plasmid

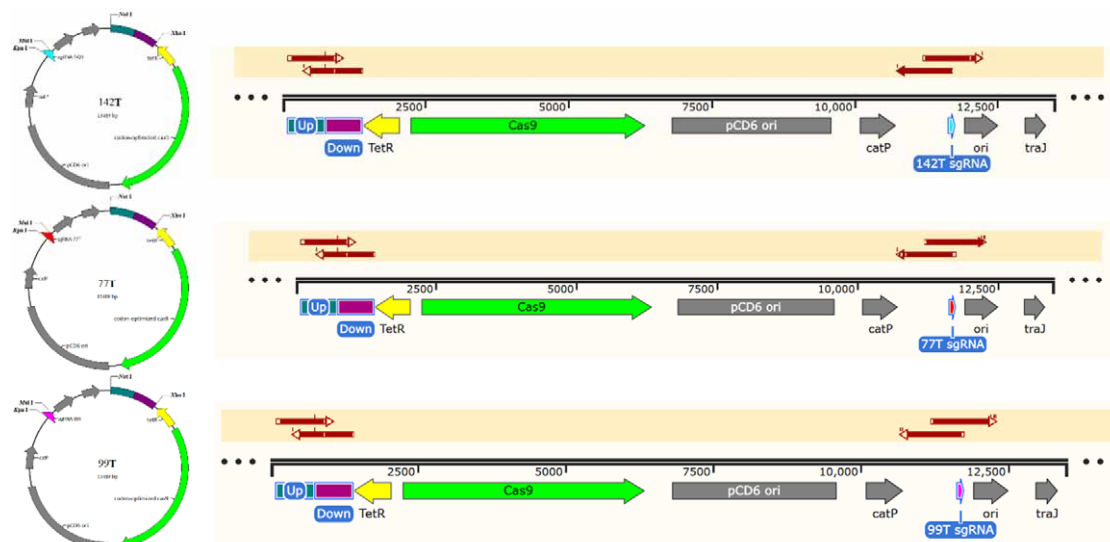


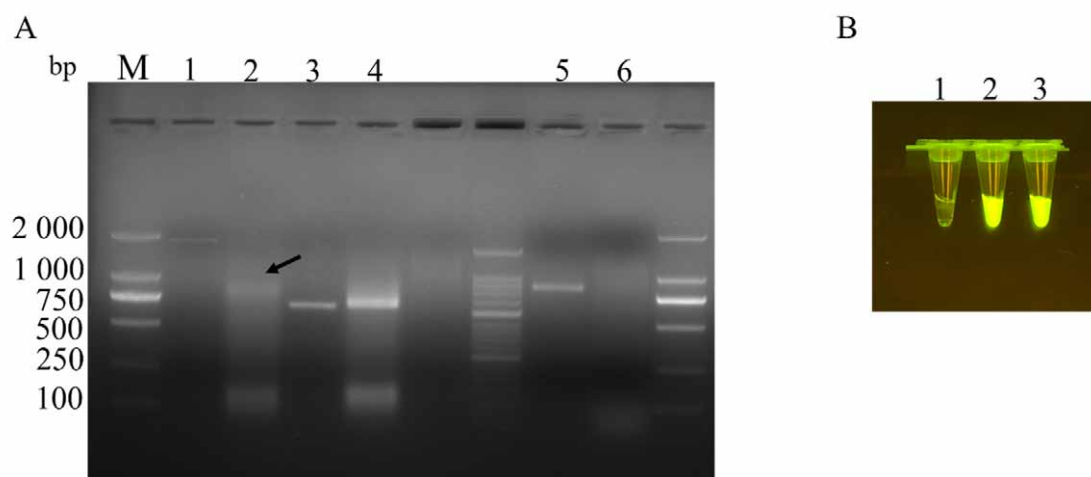
图 4-16 其他 3 个 Cas9 敲除质粒构建及验证

Fig. 4-16 Construction and verification of other three Cas9 knockout plasmids

4.3.2.2 Cas12 敲除质粒构建及验证

一、Cas12 系统的 gRNA 诱导发生体外切割

本条 Cas12_gRNA 在体外能引导 Cas12 蛋白识别 *camA* 基因，并发生切割后变短，符合预期结果，见图 4-17。



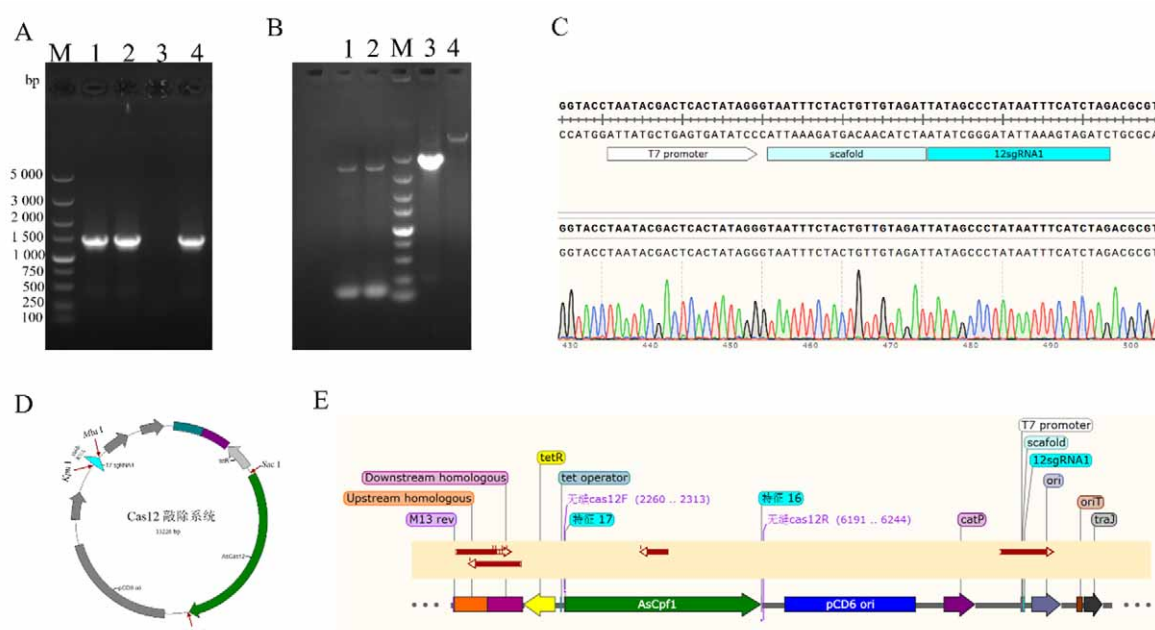
A: Cas12 系统的 gRNA 诱导发生体外切割验证，1: *camA*, 2: *camA*-Cas12-crRNA, 箭头所示为片段切割后变短，3: *tpi* 基因，4: *tpi*-Cas12-crRNA (crRNA 为针对 *camA* 基因设计)，5: control, 6: control-Cas12-control 的 crRNA; B: control 的体外切割其特异 ssDNA 验证，泳道 1: control-control 的 crRNA-探针，泳道 2, 3: control-Cas12-control 的 crRNA-探针

图 4-17 Cas12_gRNA 诱导体外切割检测

Fig. 4-17 Detection of *in vitro* cleavage induced by Cas12_gRNA

二、重组 Cas12 敲除质粒的构建及测序验证

将纯化 Cas12_gRNA 片段与经 *Kpn* I 和 *Mlu* I 双酶切的线性化骨架进行无缝连接，采用 *E.coli* HB101 Electro-Cells 进行电转化，经含有氯霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，提取 Cas12_gRNA 质粒；使用 *Sac* I 和 *Nhe* I 对 Cas12_gRNA 质粒进行双酶切与纯化的 Cas12 片段无缝连接后，采用 *E.coli* HB101 Electro-Cells 进行电转化，经含有氯霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，菌落 PCR 扩增验证，经软件 SnapGene 6.02 测序比对无误后，则本部分的 Cas12 敲除质粒就构建成功，见图 4-18。



A: *camA* 同源臂菌落 PCR 验证；M: DL5,000 DNA Marker；泳道 1, 2: 实验组菌落 PCR，证明 *camA* 同源臂在骨架上；泳道 3: 阴性对照，泳道 4: 阳性对照；B: Cas12 片段菌落 PCR 验证；M: DL5,000 DNA Marker；泳道 1, 2: 实验组菌落 PCR，证明 Cas12 片段与敲除系统骨架连接成功；泳道 3: Cas12 片段 PCR 扩增；泳道 4: 经 *Sac* I 和 *Nhe* I 双酶切的线性骨架 Cas12_gRNA；C: Cas12_gRNA 的测序比对及峰值图，本条 Cas12_gRNA 由 T7 启动子、scafold 和 23 bp 的 guide RNA 三部分组成；D: 敲除质粒 Cas12 示意图；E: 软件 SnapGene 6.02 测序比对图

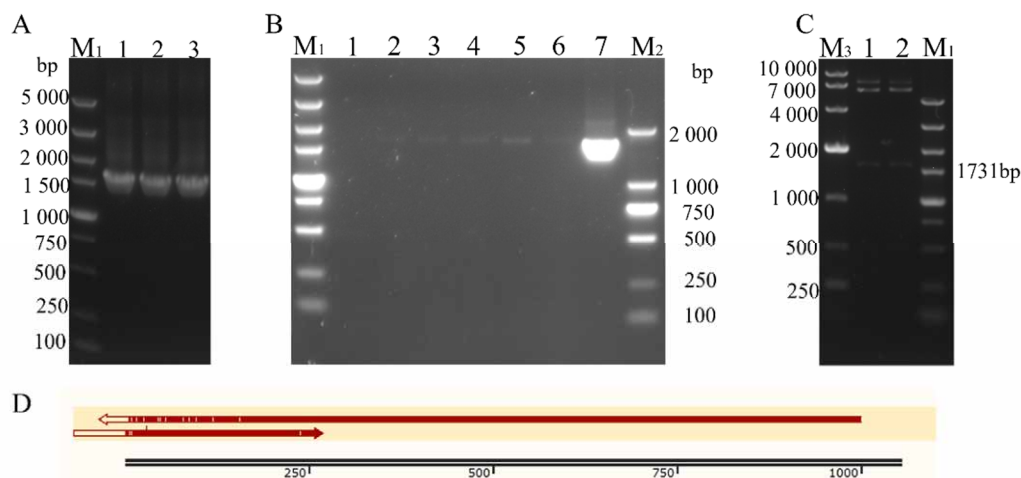
图 4-18 Cas12 敲除质粒构建及验证

Fig. 4-18 Construction and verification of Cas12 knockout plasmid

4.3.2.3 回补质粒构建及验证

纯化 *camA* 片段与经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切的线性化骨架进行无缝连接，采用 *E.coli* HB101 Electro-Cells 进行电转化，经含有氯霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，经 1% 琼脂糖凝胶电泳与测序分析与预期结果一致，则用于艰难拟梭菌

DNA 甲基化酶 *camA* 基因研究的回补质粒构建成功，见图 4-19。



A: *camA* 基因的 PCR 扩增；M1: DL5,000 DNA Marker；泳道 1-3: *CD R2029I* 为模板扩增 *camA* 片段并纯化，用于连接实验；B: 菌落 PCR，验证 *camA* 片段构建至回补质粒；M2: DL2,000 DNA Marker；泳道 1-6: 验证组，其中 5 号较亮，菌株保存后用于后续回补实验；C: *camA* 回补质粒 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切验证 1731 bp 处产生特异片段，M3: DL10,000 DNA Marker；泳道 1, 2: 菌株 5 号的提取质粒；D: 回补质粒菌的测序比对

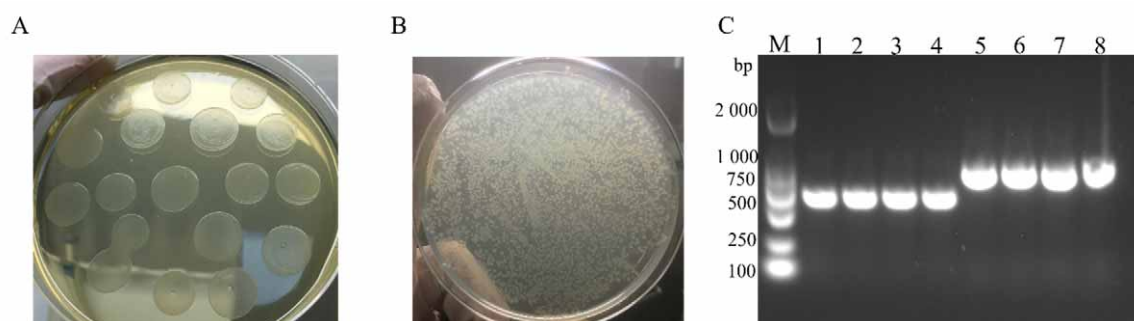
图 4-19 回补质粒构建及验证

Fig. 4-19 Construction and verification of complementary plasmid

4.3.3 接合、诱导筛选敲除株

一、以三亲接合方式获得含有重组敲除质粒的 *CD R2029I*

将重组敲除质粒菌与接合辅助质粒 *E.coli* HB101 pRK24 的共轭接合至一个 *E.coli* HB101，当挑取的单克隆能 PCR 扩增出敲除质粒和 pRK24 质粒上的片段则接合成功，见图 4-20。含有 pRK24 质粒和重组敲除质粒的一个 *E.coli* HB101 与 *CD R2029I* 的接合，PCR 扩增验证，筛选到含重组敲除质粒的 *CD R2029I*，见图 4-21。

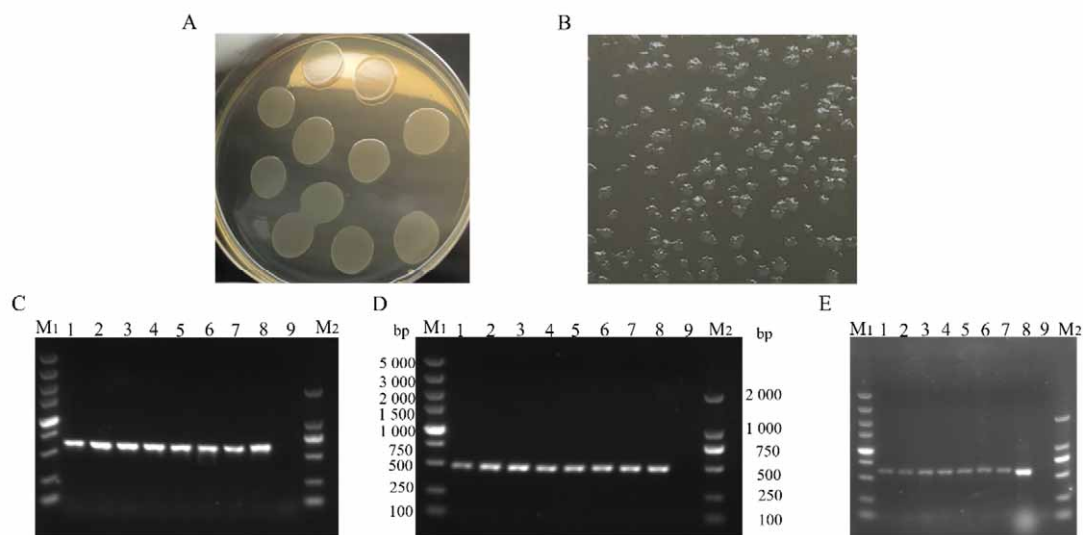


A: 重组敲除质粒菌和 *E.coli* HB101 pRK24 质粒菌按 1:4 比例混入，并斑点在无抗性的 LB 固体平板上 37°C，1 h；B: 冲板后按照 1:100 稀释，涂布至含有 100 µg/mL Amp 和 50 µg/mL Chr 的双抗 LB 培养基，过夜培养，37°C；C: 随机挑取图 B 平板上的 4 个单克隆，PCR 扩增验证一个 *E.coli* HB101 同时含有重组敲除质粒菌和 pRK24 接合辅助质粒；M: DL2,000

DNA Marker; 泳道 1-4: PCR 扩增 *catP* 基因, 证明含有重组敲除质粒; 泳道 5-8: 检测 HB101 pRK24 质粒引物, 证明含有接合辅助质粒 pRK24

图 4-20 重组敲除质粒菌与接合辅助质粒 *E.coli* HB101 pRK24 接合及验证

Fig. 4-20 Conjugation and verification of recombinant plasmid knockout bacteria with conjugation helper plasmid *E.coli* HB101 pRK24



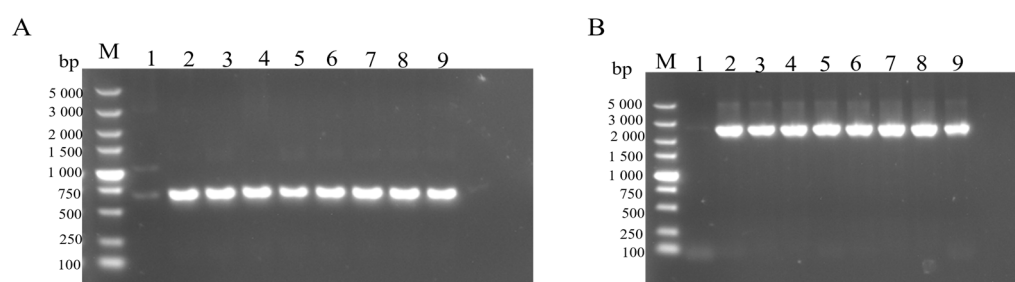
A: 热休克处理过的 *CD R20291* 和含有 pRK24 质粒和重组敲除质粒的菌体沉淀斑点于无抗性的 BHI 固体平板, 厌氧环境下共轭接合 24 h; B: 冲板菌液涂布至添加有 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、15 $\mu\text{g/mL}$ 甲砒霉素和 250 $\mu\text{g/mL}$ 环丝氨酸的 BHI 固体选择性平板上培养 2-3 天; C: 从图 B 中随机挑取 7 个单克隆, PCR 扩增艰难拟梭菌管家基因 *tpi*, M1: DL5,000 DNA Marker; M2: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1-7: 挑取的 7 个单克隆; 泳道 8: 野生型 *CD R20291*; 泳道 9: 阴性对照; D: 从图 B 中随机挑取 7 个单克隆, PCR 扩增艰难拟梭菌毒素 B 基因 *tcdB*; 泳道 1-7: 挑取的 7 个单克隆; 泳道 8: 野生型 *CD R20291*; 泳道 9: 阴性对照; E: 从图 B 中随机挑取 7 个单克隆, PCR 扩增敲除质粒骨架上特异性 *catP* 片段, 泳道 1-7: 挑取的 7 个单克隆; 泳道 8: 重组质粒, 即阳性对照; 泳道 9: 阴性对照

图 4-21 重组敲除质粒接合至 *CD R20291*

Fig. 4-21 The recombinant knockout plasmid was ligated to *CD R20291*

二、诱导筛选情况

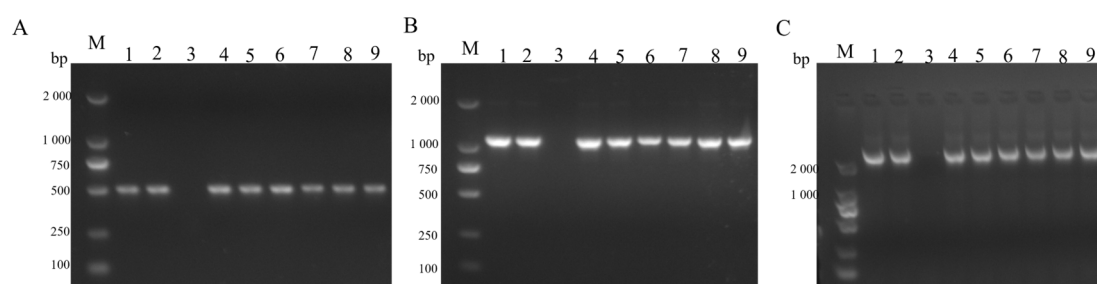
(一) 重组 Cas9 敲除质粒开展了 3 次诱导筛选情况, 其中: 第一次诱导筛选未发现突变株, PCR 扩增检测引物 2761F/R 发现筛选的 8 个单克隆均与野生型 *CD R20291* 条带位置一致, 见图 4-22。第二次诱导筛选也未发现突变株, PCR 扩增检测引物 2761F/R 发现筛选的 8 个单克隆均与野生型 *CD R20291* 条带位置一致, 见图 4-23。第三次诱导筛选经 1% 琼脂糖电泳分析发现两个突变株, 即泳道 2 和泳道 5, 经检测引物 PCR 扩增后产生 1000 bp 的小片段, 见图 4-24。泳道 2 号和泳道 5 号的巢式 PCR 验证以及测序比对, 发现与预期结果一致, 采用 Cas9 敲除质粒中的 31T 质粒, 成功敲掉 *camA* 基因, 见图 4-25。



A: PCR 扩增敲除质粒骨架上特异性 *catP* 片段; M: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9: 重组质粒, 即阳性对照; B: PCR 扩增检测引物 2761F/R 检测突变株; M: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9: *CD R20291*, 即阳性对照

图 4-22 第一次诱导筛选

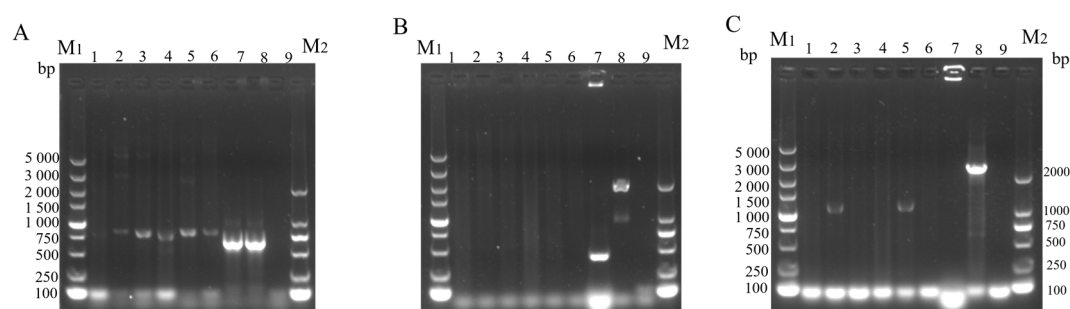
Fig. 4-22 First induction screening



A: PCR 扩增敲除质粒骨架上特异性 *catP* 片段; M: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9: 重组质粒, 即阳性对照; B: PCR 扩增引物 CamF/R 检测诱导后是否敲除成功, M: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9: *CD R20291* 即阳性对照; C: PCR 扩增检测引物 2761F/R 检测突变株; M: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9: *CD R20291*, 即阳性对照

图 4-23 第二次诱导筛选

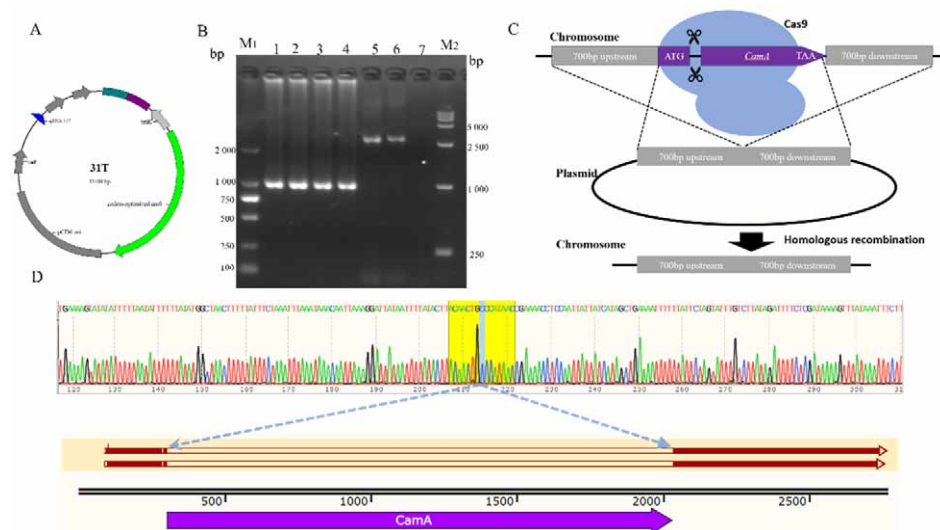
Fig. 4-23 Second induction screening



A: PCR 扩增艰难拟梭菌管家基因 *tpi*; M1: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1-7: 随机挑取 7 个单克隆; 泳道 8: *CD R20291*, 即阳性对照; 泳道 9: 阴性对照; B: PCR 扩增引物 CamF/R 检测诱导后是否敲除成功, 泳道 1-7: 随机挑取 7 个单克隆; 泳道 8: *CD R20291*, 即阳性对照; 泳道 9: 阴性对照; C: PCR 扩增检测引物 2761F/R 检测突变株; M2: DL2,000 DNA Marker; 泳道 1-7: 随机挑取 7 个单克隆; 泳道 8: *CD R20291*, 即阳性对照; 泳道 9: 阴性对照

图 4-24 第三次诱导筛选

Fig. 4-24 Third induction screening

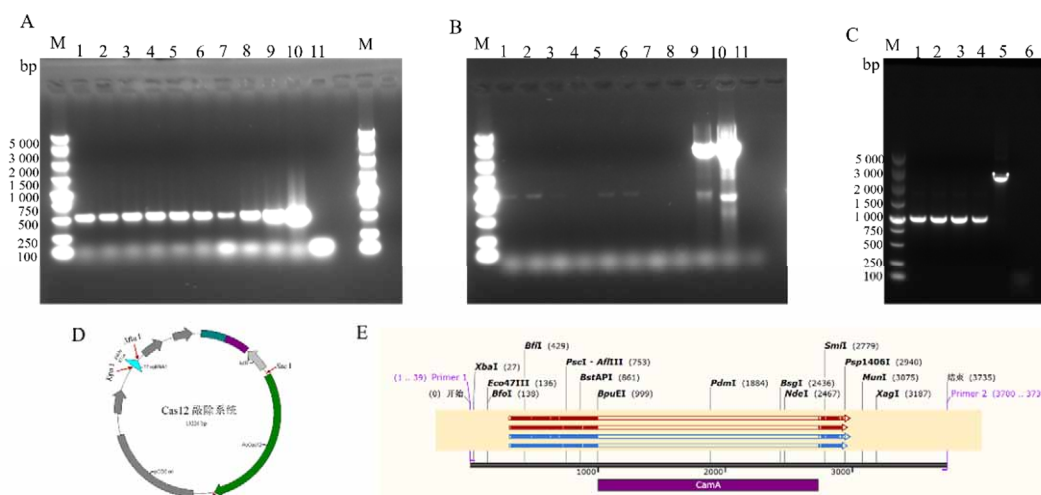


A: 31T 敲除质粒的示意图; B: 巢式 PCR 扩增 (以 2 号和 5 号 2761 的反应液作为模板) 验证; M1: DL2,000 DNA Marker; M2: DL15,000 DNA Marker; 泳道 1, 2: 菌液 2 号; 泳道 3, 4: 菌液 5 号; 泳道 5, 6: 野生型 *CD R2029I*; 泳道 7: 阴性对照; C: 模拟 31T 敲除质粒在 *CD R2029I* 敲除 *camA* 基因; D: 软件 SnapGene 6.02 测序比对图

图 4-25 质粒 31T 成功敲掉 *camA* 基因

Fig. 4-25 Plasmid 31T successfully knocked out *camA* gene

(二) 重组 Cas12 敲除质粒诱导筛选 1 次, 经 1% 琼脂糖电泳分析发现 4 个突变株, 即在 8 个单克隆中有 4 个发生切割缺失 *camA* 基因, 见图 4-26。



A: PCR 扩增艰难拟梭菌管家基因 *tpi*; M: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9, 10: *CD R2029I*, 即阳性对照; 泳道 11: 阴性对照; B: PCR 扩增检测引物 2761F/R 检测突变株, 泳道 1-8: 随机挑取 8 个单克隆; 泳道 9, 10: *CD R2029I*, 即阳性对照; 泳道 11: 阴性对照; C: 巢式 PCR 扩增 (以 2761F/R 一轮 PCR 扩增的反应液作为模板) 验证 M: DL5,000 DNA Marker; 泳道 1-4: 分别为图 B 中的菌液 1 号, 菌液 2 号, 菌液 5 号, 菌液 6 号; 泳道 5: 野生型 *CD R2029I*; 泳道 6: 阴性对照; D: Cas12 系统的结构示意图; E: 软件 SnapGene 6.02 测序比对图

图 4-26 重组 Cas12 敲除质粒诱导、筛选及测序

Fig. 4-26 Induction, screening and sequencing of recombinant Cas12 plasmid

4.4 讨论

本章节在 pJK02 骨架上改造了用于敲除艰难拟梭菌 *camA* 基因的 Cas9 和 Cas12 两种敲除质粒，改造的部分包括用于敲除 *camA* 基因的 4 条 Cas9 系统的 gRNA 和一条 Cas12 的 gRNA、*camA* 上下游同源臂以及用 Cas12 片段替换 pJK02 骨架上的 Cas9 片段共三大部分，并采用接合的方式将敲除质粒从大肠杆菌 HB101 转入 *CD R20291* 中，筛选到含敲除质粒的 *CD R20291*，加 100 ng/mL 脱水四环素诱导剂，大量筛选敲除株，经 PCR 扩增和测序验证，成功敲除 *CD R20291* 的 *camA* 基因。但在实验中我们也遇到了一些棘手的问题，首先在改造重组敲除质粒部分，由于 pJK02 骨架^[34]有 14,174 bp，骨架较大，我们采用常规的化学转化构建敲除质粒成功率不理想，后续实验更换为电转化，但采用电转化效率也不高；此外，在大肠杆菌中将敲除质粒构建好后，需要通过接合的方式转入到 *CD R20291* 中，该过程也需要不断的 PCR 筛选符合要求的接合菌用于下一步实验，所以迫切需要制备 *CD R20291* 感受态细胞，直接将无缝克隆连接结束的反应液，直接转入到 *CD R20291*，开始后续的诱导筛选实验；其次，在实验过程中我们发现 Cas9 敲除质粒存在脱靶现象且敲除效率不佳，所以不断更换了 4 条网站上模拟的 gRNA，即构建了 4 个 Cas9 质粒，不断的诱导筛选；最终，使用 Cas9 敲除质粒中的 31T 敲除质粒成功检测到缺失 *camA* 基因的 *CD R20291* 突变株，敲除质粒 31T 的 gRNA 网站上模拟敲除的评分为 75 而其余三条 gRNA 的评分分别为 81、81 和 67，发现这四条 gRNA 中网站模拟敲除评分最高的两条和最低的一条均未发生敲除 *camA* 基因，所以在进行敲除实验中也不能太依赖网站模拟得出的敲除评分参数，也需要开展大量的预实验对 gRNA 在敲除实验中所发挥的能力进行评估；并在使用 Cas9 质粒敲除 *camA* 基因失败期间，同时构建 Cas12 质粒作为备选方案，经诱导发现 Cas12 的切割能力要稍高一些^[27, 35-37]，所以后续实验我们将选用 Cas12 质粒作为敲除质粒。

综上，应用 CRISPR-cas 基因编辑技术敲除 *camA* 基因关键在于如何将 gRNA 和 Cas9/Cas12 有效递送至 *CD R20291* 且保证其所发挥的敲除功能。本研究采用的方法是将 gRNA 片段和 Cas9/Cas12 片段构建至敲除质粒，采用电转的方式转染进入 *CD R20291*，虽然看似简单的操作，但方式转染效率不高，后续实验我

们将采用噬菌粒^[38-41]作为载体，借助其高转染效率，提高 gRNA 和 Cas9 或 Cas12 有效递送至 *CD R20291* 成功机率，从而间接的增加敲除效率；此外，我们在后续敲除实验中也会引入带正电荷的穿膜肽（cell-penetrating peptides, CPP）^[42, 43]携带 gRNA 和 Cas9/Cas12 核酸，依据电荷吸引到带负电荷艰难拟梭菌细菌表面并有效进入菌体内，更加直接的发挥敲除作用，当然这是我们的一个设想，我们也会在接下来的实验中不断探究和改良敲除系统，提高艰难拟梭菌基因敲除的准确性和效率。

第五章 敲除株的芽孢形成能力和甲硝唑药敏表型研究

5.1 材料

5.1.1 菌株

缺失 *camA* 基因的敲除株；美国菌种保藏中心的艰难拟梭菌标准菌株药敏质控菌 ATCC 700057；艰难拟梭菌标准菌株 R20291；CD R20291-84151，即将质粒 pMTL84151 转入艰难拟梭菌标准菌株 R20291；CD R20291-84151-*camA*，即将回补质粒 pMTL84151-*camA* 转入艰难拟梭菌标准菌株 R20291。注：质粒 pMTL84151 为艰难拟梭菌敲除系统最原始骨架质粒，其相关介绍请看本论文第四章中材料介绍部分的 4.1.1 节。

5.1.2 实验仪器

本实验所使用的主要实验仪器为购买自北京大龙兴创实验仪器股份公司的电动移液器；购买自美国 Thermo 公司的 25 mL 移液管；购买自天津市恒奥科技发展有限公司的细菌多点接种仪；购买自美国 Corning 公司的比浊管；购买自法国 BioMérieux 公司的比浊仪。

5.1.3 实验试剂

用于复苏的哥伦比亚血琼脂基础粉末购买自英国 OXOID 公司；无菌脱纤维绵羊血；购买自上海阿拉丁生化科技公司的血红素；购买自上海生工的维生素 K1；芽孢形成能力实验部分购买自上海生工的牛磺胆酸盐，其能促进艰难拟梭菌芽孢形成，是一种孢子萌发剂^[44, 45]；甲硝唑药敏实验部分有购买自美国 Sigma 公司的甲硝唑，其为临床上治疗 CDI 的一线药物^[46, 47]。

5.1.4 实验培养基及溶液配制

5.1.4.1 哥伦比亚血琼脂培养基配制

500 mL 哥伦比亚血琼脂培养基的配制，称取 21.5 g 哥伦比亚血琼脂基础粉末，加入到 500 mL ddH₂O，调 pH 7.4±0.2，121℃，15 min，冷却至 50℃左右，加入 25 mL 的经 37℃预处理后的无菌脱纤维绵羊血，混匀后分装至细菌培养皿，4℃储存待用。

5.1.4.2 芽孢培养基配制

配制芽孢培养基，在第三章的溶液配制部分中 3.1.4.4 节 BHIS 平板配制的基础上，再加入 0.1% 的牛磺胆酸盐，如配制 500 mL 的芽孢培养基，在 BHIS 平板配制中加入 0.5 g 的牛磺胆酸盐补足 ddH₂O 至 500 mL，调 pH 7.4±0.2，121℃，15 min，冷却至 50℃左右分装至细菌培养皿，4℃储存待用。

5.1.4.3 甲硝唑储存液配制

配制甲硝唑储存液，先取 20.48 mg 甲硝唑，并装置 15 mL 离心管中，再加入 1 mL DMSO，涡旋仪充分振荡溶解，再加入 ddH₂O 定容至 10 mL，则 128 µg/mL 甲硝唑储存液配制完毕，分装于 10 个 1.5 mL 的离心管中并储存于-80℃待用。注：称取 20.48 g 的甲硝唑是根据药敏试验/实验中药敏平板的抗生素最高浓度为 128 µg/mL、甲硝唑储存液与布鲁斯培养基的体积比为 1:14、甲硝唑抗生素的效价及甲硝唑存储液配制的总体积为 10 mL 按照公式计算得出甲硝唑抗生素所需质量为 20.48 mg，该公式为：

$$\frac{128 \mu\text{g/mL} \times 15 \times 10 \text{ mL}}{\text{抗生素效价}}$$

5.2 方法

5.2.1 芽孢形成能力测定

根据 David^[45]等所采用的方法对艰难拟梭菌芽孢形成能力进行测定，具体操作步骤如下：

第一天，将缺失 *camA* 基因的敲除株和艰难拟梭菌 *R20291* 的甘油保存菌从-80℃冰箱取出待化冻后，用移液枪吸取 20 µL 至哥伦比亚血琼脂培养基（注意：严格无菌操作），用经酒精灯灼烧后的接种环三区划线，37℃厌氧培养 48 h；

第三天，从哥伦比亚血琼脂培养基上挑取 1~2 个单菌落至 BHIS 液体培养基中，置于 37℃厌氧培养 24 h；

第四天，使用比浊仪将缺失 *camA* 基因的敲除株和艰难拟梭菌 *R20291* 经 BHIS 培养后的菌液调至 1.0 麦氏浊度（相当于 3×10^8 个细菌数/ml）；取 1 mL 菌液至 1.5 mL EP 管中，置于 60℃水浴中热激 25 min^[48, 49]；使用无菌 PBS 菌液稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 梯度；吸取 100 µL 各稀释度的菌液至芽孢培养基上，置于 37℃厌氧培养 24 h；

第五天，计数芽孢生成数，按照每个平板上菌落数在 30~300 之间视为有效

数据^[44, 50], 并根据每毫升芽孢形成数 (spores/mL) = 菌落数 × 稀释倍数 × 10^[49, 51], 本次实验进行 3 次, 每个稀释度设置 3 重复。

5.2.2 甲硝唑敏感性测试

甲硝唑药敏实验采用琼脂稀释法, 甲硝唑耐药的折点判定参照美国临床和实验室标准协会推荐《厌氧菌药敏实验方法》(M11-A8)^[46, 47], 具体步骤如下:

首先, 制备药敏培养基。称取 21.5 g 布氏琼脂, 加入到 500 mL ddH₂O 中, 调 pH 7.4 ± 0.2, 121°C, 15 min;

在此期间, 制备甲硝唑工作液。取 1.5 mL 甲硝唑储存液, 用生理盐水连续 11 个梯度进行倍比稀释, 稀释比例分别为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048, 并分别向 11 个干净的一次性细菌培养皿中依次加入 1 mL 各稀释比例的甲硝唑;

其次, 待高压灭菌结束, 冷却至 50°C 左右, 向布氏琼脂中加入 2.5 mg 血红素、25 μL 维生素 K1 和 25 mL 的经 -80°C 冷冻过夜后经 37°C 预处理的无菌脱纤维绵羊血, 混匀, 使用电动移液器从中吸取 14 mL 的培养基与上述 11 个浓度梯度的 1 mL 甲硝唑充分混匀, 则甲硝唑药敏琼脂培养基的抗生素浓度为 128 μg/mL、64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL、0.5 μg/mL、0.25 μg/mL 和 0.125 μg/mL, 同时设置无抗性对照组且每组重复 2 次;

再次, 药敏实验菌液的制备。从已经复苏好分别含有敲除株、*CD R2029I*、*CD R2029I*-84151、*CD R2029I*-84151-*camA* 和 *ATCC 700057* 的 5 块哥伦比亚血琼脂培养基上挑取单菌落, 使用生理盐水和比浊仪分别将麦氏浊度调至 0.5;

最后, 按照制定好的上样顺序依次从麦氏浊度为 0.5 的 5 个比浊管移取 200 μL 菌液至 96 孔板中, 并将改装有菌液的 96 孔板组装在细菌多点接种仪上, 按启动按钮, 从低浓度至高浓度依次接种至甲硝唑药敏琼脂培养基上, 接种完毕后, 先静置 3~4 分钟使菌液和培养基充分吸收, 置于 37°C 厌氧培养 48 h, 按照 CLSI 上推荐的艰难拟梭菌甲硝唑药物的折点判定结果 (≤8 μg/mL 为敏感, 16 μg/mL 为中介, ≥32 μg/mL 为耐药)。

5.3 结果

5.3.1 芽孢形成能力检测

经第四章中的 Cas9 和 Cas12 敲除质粒诱导后筛选到缺失 *camA* 基因的敲除株在芽孢形成能力检测实验中发现，敲除株芽孢形成能力为 8667 ± 4163 spores/mL，艰难拟梭菌标准菌株 *R20291* 芽孢形成能力为 240333 ± 13204 spores/mL，经两独立样本 T 检验得 $t = 19.23$ ， $P < 0.0001$ ，则敲除株与艰难拟梭菌标准菌株 *R20291* 芽孢形成能力差异具有统计学意义，且敲除株芽孢形成能力低于艰难拟梭菌标准菌株 *R20291* 的芽孢形成能力，见图 5-1。

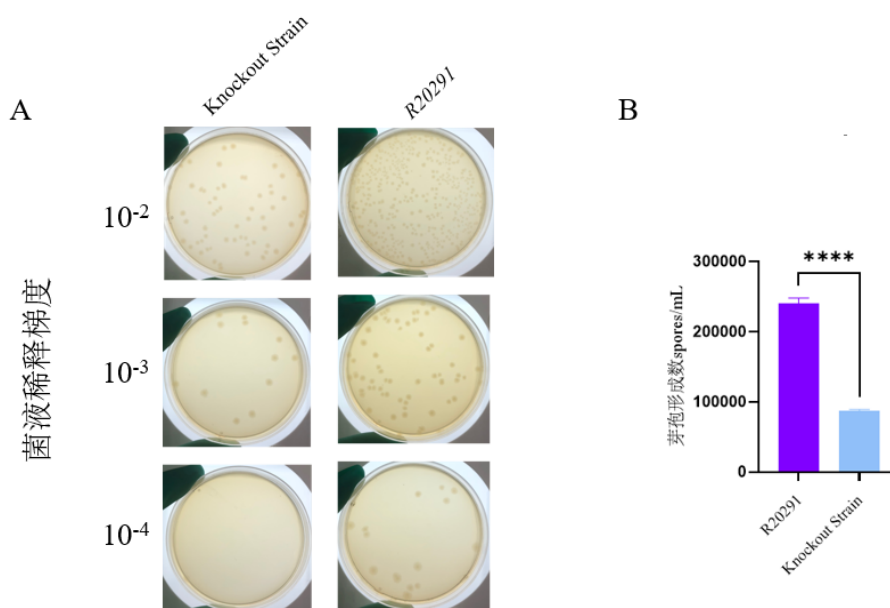


图 5-1 敲除株的芽孢形成能力

Fig. 5-1 Spore-forming ability of knockout Strain

5.3.2 甲硝唑药敏实验结果

在甲硝唑药敏实验中我们发现缺失 *camA* 基因的敲除株与艰难拟梭菌标准菌株 *CD R20291* 相比能在 $128 \mu\text{g/mL}$ 的甲硝唑药敏平板上生长，且含空质粒骨架 pMTL84151 的 *CD R20291*（即 *CD R20291*-84151）在甲硝唑药敏实验中生长的趋势与艰难拟梭菌标准菌株 *CD R20291* 一致，这结果表明当按照 CLSI 上推荐的艰难拟梭菌甲硝唑药物的折点判定标准解读时，缺失 *camA* 基因的敲除株对甲硝唑高度耐药，见图 5-2。

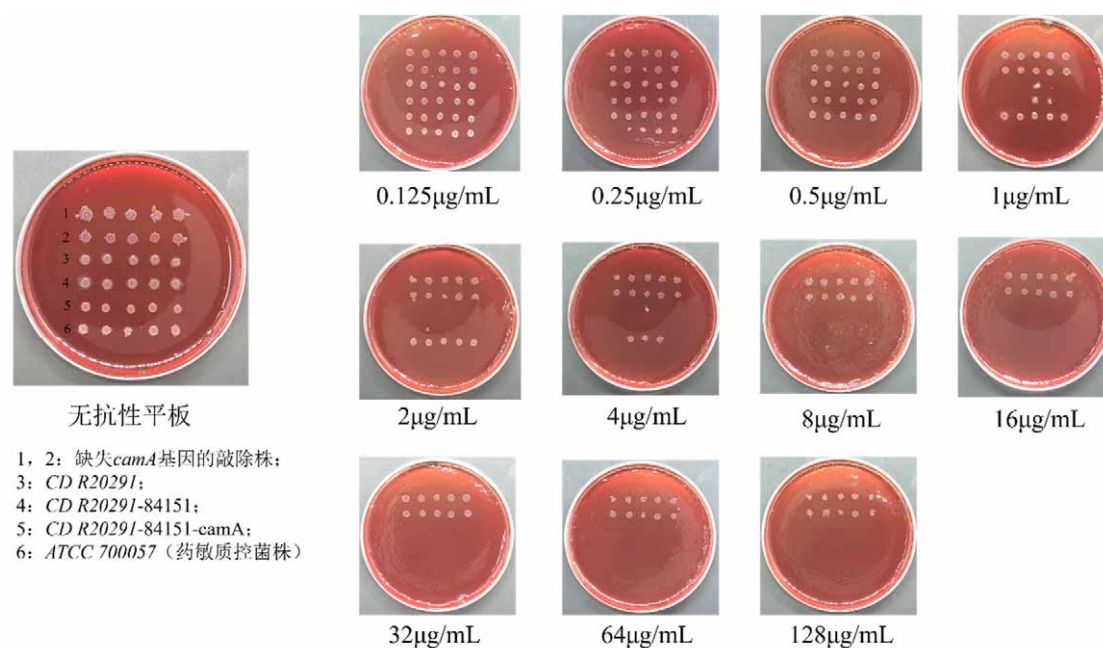


图 5-2 敲除株的甲硝唑敏感性测试

Fig. 5-2 Metronidazole sensitivity test of knockout strain

5.4 讨论

首先，在芽孢形成能力检测中发现，缺失 $camA$ 基因的敲除株和艰难拟梭菌标准菌株 $R2029I$ 的芽孢形成能力分别为 8667 ± 4163 和 240333 ± 13204 spores/mL，采用统计分析中的两独立样本 T 检验得 $t = 19.23$ ， $P < 0.0001$ ，则敲除株与艰难拟梭菌标准菌株 $R2029I$ 芽孢形成能力差异具有统计学意义，且敲除株芽孢形成能力低于艰难拟梭菌标准菌株 $R2029I$ 的芽孢形成能力，该结果与 2019 年 Oliveira PH 等国外科学家^[14]的 $camA$ 基因调控艰难拟梭菌芽孢形成能力测定的趋势一致，且 Oliveira PH 等人已经研究确定了 $camA$ 基因与艰难拟梭菌的芽孢形成能力和生物膜形成率两个生物学调控有关；结合本文第二章讨论中的推测 $camA$ 基因缺失导致芽孢数量减少这有利于动物来源的 *C. difficile* 向外传播扩散，增加动物传染人导致 CDI 的风险。

其次，艰难拟梭菌是一种多重耐药菌^[46]，虽然甲硝唑为临床上治疗 CDI 的一线药物^[47]，但长期抗生素治疗后导致机体正常肠道微生物群失调，又加上其具有多重耐药的特征，使得 *C. difficile* 在机体肠道内具有选择性生长的优势^[52]，产生 TcdA 和 TcdB 毒素造成 CDI，再加上其还具备形成芽孢能力促进 *C. difficile* 在医院内传播扩散^[53]，进一步导致 *C. difficile* 甲硝唑耐药基因在不同种群的传播

并增加其新的耐药机制的产生与获得^[54, 55]。从 1994 年 Pelaez 等^[56]研究者首次报道了 *C. difficile* 对甲硝唑耐药到近年来临床上已经发现艰难拟梭菌感染的病人对甲硝唑耐药的情况, 如 2010 年黄海辉等^[57]国内研究者从复旦大学附属华山医院腹泻患者粪便样本中分离出 18 (23.1%) 株耐甲硝唑的 *C. difficile*; 2017 年导师金大智研究员团队^[58]报道了从浙江大学医学院附属第一医院和杭州市第一人民医院腹泻患者粪便样本中检测出 64 (15.6%) 株耐甲硝唑的 *C. difficile*。可见 *C. difficile* 对一线治疗 CDI 的甲硝唑敏感性较前下降, 我们推测这可能与其获得了新的耐药机制有关。近年来, 抗微生物药物耐药 (Antimicrobial resistance, AMR) 渐成为全球公共卫生与预防医学面临的重要威胁^[59]。截至目前, 在 *C. difficile* 耐药性研究领域对大环内酯类和喹诺酮类药物的耐药机制研究较为充分^[46], 但对 CDI 一线治疗药物甲硝唑的耐药性及其机制研究尚处于起步阶段。甲硝唑属于前体药物, 其具体杀菌机制不明确, 相关研究推测与 *C. difficile* 等厌氧菌菌体内的氧化还原电位酶促反应有关, 该反应活化后伴随产生的硝基自由基对菌体产生毒性, 导致 *C. difficile* 等厌氧菌死亡, 从而达到临床治疗效果^[23]。国内外研究者认为 *C. difficile* 对甲硝唑耐药机制多元化, 如甲硝唑还原激活通路的改变^[60, 61], 当基因 *glyC* 和 *nifJ* 突变造成电子传递中断使 *C. difficile* 的能量代谢和菌体氧化还原电位发生变化, 最终使甲硝唑氧化还原激活率降低, 散失抗菌能力; 铁代谢与甲硝唑耐药有关, 由于在甲硝唑还原激活通路中铁离子发挥重要作用, Moura^[62]和 Lynch^[60]两个团队分别在甲硝唑耐药的 *C. difficile* 中发现存在铁蛋白缺失和铁摄取减少; DNA 错配修复基因的缺失使 *C. difficile* 对甲硝唑耐药^[63]; DNA 修复蛋白 RecA 差异表达也与 *C. difficile* 甲硝唑耐药有关^[62, 64]; 此外, 还发现 pCD-METRO 质粒介导 *C. difficile* 对甲硝唑耐药^[65-67]。其中, 甲硝唑氧化还原反应、铁代谢、DNA 错配修复基因和 DNA 修复蛋白 RecA 都与 DNA 甲基化修饰相关, 我们推测甲基转移酶 CamA 参加 *C. difficile* 的 DNA 甲基化修饰与其对甲硝唑耐药性之间存在一定的关系, 但表观遗传修饰同 *C. difficile* 耐药性之间的关联性仍属于尚未开拓的研究领域, 并且目前还未报道 *C. difficile* 中高度保守的甲基化基因 *camA* 与药敏相关基因的研究。而 DNA 甲基化修饰仅作为生物体基因表达调控的“开关”负责机体转录水平的调控, 目前没有研究能证明 DNA 甲基化修饰能直接作用到细菌的耐药机理中^[68, 69], 所以只有挖掘出 *C.*

difficile 对甲硝唑耐药的靶基因才能解释上述科学问题并助力于临床采用新措施应对耐甲硝唑 CDI 的挑战。又因在 *C. difficile* 研究领域 CRISPR-Cas 基因编辑技术尚不成熟，导致耐药菌株的来源只能通过临床上细菌分离培养检出或体外诱导培养再此基础上经全基因组测序获取耐药相关基因的信息^[70]，造成对 *C. difficile* 抗生素耐药机制的研究缓慢。所以本论文不仅利用第四章中的 CRISPR-Cas 基因编辑技术敲除艰难拟梭菌的 *camA* 基因而建立艰难拟梭菌专用的敲除平台，更为了通过敲除甲基化 *camA* 基因获得敲除株，为下一步预开展 *camA* 基因可能调节药敏相关基因（特别是甲硝唑相关基因）的生物学研究奠定基础；并在药敏初步实验中发现缺失 *camA* 基因的敲除株中与艰难拟梭菌标准菌株 R20291 相比，能在 128 µg/mL 的甲硝唑药敏平板上生长，且含空质粒骨架 pMTL84151 的 CD R20291（即 CD R20291-84151）在甲硝唑药敏实验中生长的趋势与标准菌株 CD R20291 一致，表明敲除 *camA* 基因后菌株对甲硝唑耐药。

最后，由于本次所开展的生物学初步实验还未将敲除株中的敲除系统消除，从第四章中的 4.1.1 节的骨架 pJK02 质粒图谱上可看出缺少了专用于消除的抗生素片段这决定了我们在进行消除实验中只能通过连续无抗性 BHIS 培养基中连续传代消除质粒，又因我们在筛选敲除株的时候经过多轮的脱水四环素诱导，导致我们在消除实验中用无抗性 BHIS 培养基连续传代 2~3 次敲除质粒仍出现不丢失的情况，后续敲除其他基因时我们将增加用于消除实验的抗生素片段，而对于 *camA* 基因的消除实验我们将继续用无抗性的 BHIS 培养基传代。所以为了更确切的验证缺失 *camA* 基因后能导致艰难拟梭菌对甲硝唑耐药这一观点，后续实验将把敲除株中的敲除质粒消除，获得稳定的突变株并将第四章中构建好的回补质粒（CD R20291-84151-*camA*）转入突变株中，再以丢失敲除质粒的突变株、含有回补质粒 CD R20291-84151-*camA* 的突变株、标准菌株 CD R20291、CD R20291-84151 和艰难拟梭菌标准菌株药敏质控菌 ATCC 700057 五个菌株开展甲硝唑药敏实验确认该观点；与此同时，将突变株送转录组测序以及利用 RNAseq 技术寻找 *camA* 基因调控艰难拟梭菌对甲硝唑耐药相关基因并进一步开展机制研究，为了从分子层面解析突变株与标准菌株 CD R20291 生物学功能产生差异的机制，更进一步探究艰难拟梭菌感染在分子层面的发生发展并为临床医学提供有价值的治疗方案。

总结与展望

1. 通过 61 株动物和人来源菌株的 *camA* 基因在 mRNA 水平上表达检测，其中 28 株动物来源菌株 *camA* 基因和 *spoA* 基因表达量与野生型 *CD R20291* 相比表达量均下降；33 株人来源菌株 *camA* 基因和 *spoA* 基因表达量与野生型 *CD R20291* 相比表达量大多数呈升高趋势，并且动物和人来源菌株中 *camA* 基因和 *spoA* 基因两者存在正相关关系，证明了动物和人来源艰难拟梭菌分离株的 *camA* 基因表达量差异具有统计学意义，为下一步开展临床样本甲基化检测，从表观遗传学角度解析通过人畜共患方式传播艰难拟梭菌的机制研究奠定基础。
2. 通过重组表达质粒 pGEX-4T-1-MBP-*camA*，经 1 mM IPTG 在 37°C 诱导表达，利用 Amylose Resin 纯化获取纯化重组目的蛋白 CamA，其相对分子量约为 108.8 KDa（含 1 个 MBP 标签），经体外 MTase-GloTM Methyltransferase Assay 检测发现在 20 μ M DNA，20 μ M SAM 的条件下室温反应 30 min，0.5 μ g CamA 能产生浓度约为 101.60 nM SAH，酶活性为 0.339 ± 0.027 U/mg，结果表明 CamA 蛋白具有天然活性；通过间接法 ELISA 分析 CamA 多克隆抗体效价在 1:2000 处最佳且 >1:128000 具有良好的检测能力；再经 Western Blot 验证，CamA 多克隆抗体具有良好的特异性检测能力，为后续开展艰难拟梭菌甲基转移酶 CamA 蛋白质方向研究迈出重要一步。
3. 构建了用于 *camA* 基因敲除的 CRISPR-Cas9/Cas12 敲除质粒并最终敲掉艰难拟梭菌标准菌株 *R20291* 的 *camA* 基因获得敲除株，表明用于艰难拟梭菌的 CRISPR-Cas 基因敲除平台构建成功，为开展艰难拟梭菌高通量基因工程改造技术奠定基础，从反面论证的角度更客观科学的研究 *camA* 基因调控的生物学功能。
4. 通过艰难拟梭菌敲除株的芽孢形成能力和甲硝唑药敏表型研究，发现敲除株的芽孢形成能力降低与文献报道结果趋势一致；发现缺失 *camA* 基因的敲除株对甲硝唑高度耐药，后续将利用转录组测序技术寻找 *camA* 基因调控甲硝唑耐药相关基因进一步开展机制研究，解析 *camA* 基因调控甲硝唑耐药的分子机制。

参考文献

- [1] Meng H, Cao Y, Qin J, *et al.* DNA methylation, its mediators and genome integrity [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5): 604-17.
- [2] Casdesus J, Sanchez-romero MA. DNA Methylation in Prokaryotes [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1389: 21-43.
- [3] Cui YH, Willkinson E, Peterson J, *et al.* ALKBH4 Stabilization Is Required for Arsenic-Induced 6mA DNA Methylation Inhibition, Keratinocyte Malignant Transformation, and Tumorigenicity [J]. *Water (Basel)*, 2022, 14(22).
- [4] Gao Q, Lu S, Wang Y, *et al.* Bacterial DNA methyltransferase: A key to the epigenetic world with lessons learned from proteobacteria [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1129437.
- [5] Anton BP, Roberts RJ. Beyond Restriction Modification: Epigenomic Roles of DNA Methylation in Prokaryotes [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2021, 75: 129-49.
- [6] Liu P, Wang D, Zhou Y, *et al.* DNA methyltransferase detection based on digestion triggering the combination of poly adenine DNA with gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 74-8.
- [7] Yang Y, Xu G, Liang J, *et al.* DNA Backbone Sulfur-Modification Expands Microbial Growth Range under Multiple Stresses by its anti-oxidation function [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3516.
- [8] Seong HJ, Han SW, Sul WJ. Prokaryotic DNA methylation and its functional roles [J]. *J Microbiol*, 2021, 59(3): 242-8.
- [9] Horton JR, Woodcock CB, Opat SB, *et al.* The cell cycle-regulated DNA adenine methyltransferase CcrM opens a bubble at its DNA recognition site [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4600.
- [10] Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(1): 131-48.
- [11] 边俏,罗芸,许星星等.一种用于艰难梭菌分离培养的新型显色培养基的性能评价[J].*临床检验杂志*, 2019, 37(04):301-304. 04.15.

- [12] Carmichael H, Asch SM, Bendavid E. *Clostridium difficile* and other adverse events from overprescribed antibiotics for acute upper respiratory infection [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2022, 293(4): 470-80.
- [13] Yang Z, Huang Q, Qin J, *et al.* Molecular Epidemiology and Risk Factors of *Clostridium difficile* ST81 Infection in a Teaching Hospital in Eastern China [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10.
- [14] Oliveira PH, Ribis JW, Garrett EM, *et al.* Epigenomic characterization of *Clostridioides difficile* finds a conserved DNA methyltransferase that mediates sporulation and pathogenesis [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(1): 166-80.
- [15] Zhou J, Horton JR, Blumenthal RM, *et al.* *Clostridioides difficile* specific DNA adenine methyltransferase CamA squeezes and flips adenine out of DNA helix [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3436.
- [16] 林珊,宋小军,屈平华等. 艰难拟梭菌重命名及相关致病因子研究进展 [J]. *疾病监测*, 2021, 36: 5.
- [17] Papedes-sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins [J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(7): 406-16.
- [18] Chan H, Li Q, Wang X, *et al.* Vitamin D3 and carbamazepine protect against *Clostridioides difficile* infection in mice by restoring macrophage lysosome acidification [J]. *Autophagy*, 2022, 18(9): 2050-67.
- [19] Ogrady K, Knight DR, Riley TV. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(12): 2459-78.
- [20] Lawley TD, Clare S, Walker AW, *et al.* Antibiotic Treatment of *Clostridium difficile* Carrier Mice Triggers a Supershedder State, Spore-Mediated Transmission, and Severe Disease in Immunocompromised Hosts [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(9): 3661-9.
- [21] MA C-T. Mechanisms underlying resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2014, 22(16).
- [22] Kupc M, Paunkov A, Strasser D, *et al.* Initial expression levels of nimA are

- decisive for protection against metronidazole in *Bacteroides fragilis* [J]. *Anaerobe*, 2022, 77: 102630.
- [23] Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(2):265-279.
- [24] Pirs T, Avbersek J, Zdovc I, *et al.* Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution [J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 9): 1478-85.
- [25] Metcalf D, Sharif S, Weese JS. Evaluation of candidate reference genes in *Clostridium difficile* for gene expression normalization [J]. *Anaerobe*, 2010, 16(4): 439-43.
- [26] Deshpande A, Wu X, Huo W, *et al.* Chromosomal Resistance to Metronidazole in *Clostridioides difficile* Can Be Mediated by Epistasis between Iron Homeostasis and Oxidoreductases [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, 64(8).
- [27] Zhu D, Sorg JA, Sun X. *Clostridioides difficile* Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for *C. difficile* Infection [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8.
- [28] Burns DA, Minton NP. Sporulation studies in *Clostridium difficile* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 87(2): 133-8.
- [29] Zhou J, Horton JR, Yu D, *et al.* Repurposing epigenetic inhibitors to target the *Clostridioides difficile*-specific DNA adenine methyltransferase and sporulation regulator CamA [J]. *Epigenetics*, 2022, 17(9): 970-81.
- [30] Murray IA, Morgan RD, Luyten Y, *et al.* The non-specific adenine DNA methyltransferase M.EcoGII [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(2): 840-8.
- [31] Jvdwe, C. T J, V zaa, *et al.* Review article: nitroimidazole resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000.
- [32] Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, *et al.* Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile* [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2010, 48(3):770-778.

- [33] Shen A, Edwards AN, Sarker MR, *et al.* Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens [J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(6).
- [34] Mcallister KN, Bouillaut L, Kahn JN, *et al.* Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).
- [35] Zhu D, Bullock J, He Y, *et al.* Cwp22, a novel peptidoglycan cross - linking enzyme, plays pleiotropic roles in *Clostridioides difficile* [J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(8): 3076-90.
- [36] Zhu D, Patabendige HMLW, Tomlinson BR, *et al.* Cwl0971, a novel peptidoglycan hydrolase, plays pleiotropic roles in *Clostridioides difficile* R20291 [J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(9): 5222-38.
- [37] Zhu D, Wang S, Sun X. FliW and CsrA Govern Flagellin (FliC) Synthesis and Play Pleiotropic Roles in Virulence and Physiology of *Clostridioides difficile* R20291 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12.
- [38] Campa CC, Weisbach NR, Santinha AJ, *et al.* Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 887-93.
- [39] Fang H, Culver JN, Niedz RP, *et al.* Delivery of CRISPR-Cas12a Ribonucleoprotein Complex for Genome Editing in an Embryogenic Citrus Cell Line [M]. *Plant Genome Engineering*. 2023: 153-71.
- [40] Granados-riveron JT, Aquino-Jarquín G. CRISPR/Cas13 Based Approaches for ultrasensitive and Specific Detection of microRNAs [J]. *Cells*, 2021, 10(7).
- [41] Kohabir KAV, Nooi LO, Brink A, *et al.* In Vitro CRISPR-Cas12a-Based Detection of Cancer-Associated TP53 Hotspot Mutations Beyond the crRNA Seed Region [J]. *The CRISPR Journal*, 2023, 6(2): 127-39.
- [42] Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Delivery of Cas9 Protein and Guide RNA for Genome Editing [M]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1507: 81-94.
- [43] Wang S, Hong W, Dong S, *et al.* Genome engineering of *Clostridium difficile*

- using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(10):10959.
- [44] Dan FD, Yi BP, Li HZ, *et al.* Enqiang. Clinical and microbiological characterization of *Clostridium difficile* infection in a tertiary care hospital in Shanghai, China [J]. *Chinese Medical Journal*, 2014,127(9):p 1601-1607.
- [45] Burns DA, Heap JT, Minton NP. SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate [J]. *J Bacteriol.* 2010;192(3):657-664.
- [46] Peng Z, Jin D, Kim HB, *et al.* Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing [J]. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):1998-2008.
- [47] Weinstein MP, Lewis JS. The Clinical and Laboratory Standards Institute Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Background, Organization, Functions, and Processes [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(3): e01864-19.
- [48] Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence [J]. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(10):609-620.
- [49] Barra-Carrasco J, Paredes-Sabja D. *Clostridium difficile* spores: a major threat to the hospital environment [J]. *Future Microbiol.* 2014;9(4):475-486.
- [50] Kochan TJ, Foley MH, Shoshiev MS, *et al.* Updates to *Clostridium difficile* Spore Germination [J]. *J Bacteriol.* 2018;200(16):e00218-18.
- [51] Barbut F. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment [J]. *J Hosp Infect.* 2015;89(4):287-295.
- [52] Fitzpatrick F, Safdar N, van Prehn J, *et al.* How can patients with *Clostridioides difficile* infection on concomitant antibiotic treatment be best managed? [J]. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(11):e336-e340.
- [53] Owens RC Jr, Donskey CJ, Gaynes RP, *et al.* Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection [J]. *Clin Infect Dis.* 2008;46 Suppl 1:S19-S31.
- [54] Khoruts A, Staley C, Sadowsky MJ. Faecal microbiota transplantation for

- Clostridioides difficile*: mechanisms and pharmacology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(1):67-80.
- [55] O'Grady K, Knight DR, Riley TV. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(12): 2459-78.
- [56] Peláez T, Sanchez R, Blazquez R, *et al.* Abstract E-34. Presented at the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy [J]. *Orlando, FL*, OCTOBER, 1994:50.
- [57] Huang H, Weintraub A, Hong F, *et al.* AntiMICrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridioides difficile* strains [J]. *Anaerobe*, 2010, 16(6): 633-635.
- [58] Jin D, Luo Y, Huang C, *et al.* Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Patients in Eastern China [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(3):801-810.
- [59] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399(10325):629-655.
- [60] Lynch T, Chong P, Zhang J, *et al.* Characterization of a stable, metronidazole-resistant *Clostridium difficile* clinical isolate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53757.
- [61] Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(2):401-427.
- [62] Moura I, Monot M, Tani C, *et al.* Multidisciplinary analysis of a nontoxigenic *Clostridium difficile* strain with stable resistance to metronidazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8):4957-4960.
- [63] Deshpande A, Wu X, Huo W, *et al.* Chromosomal Resistance to Metronidazole in *Clostridioides difficile* Can Be Mediated by Epistasis between Iron Homeostasis and Oxidoreductases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(8):e00415-20.
- [64] Chong PM, Lynch T, McCorrister S, *et al.* Proteomic analysis of a NAP1

- Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e82622.
- [65] Lynch T, Chong P, Zhang J, et al. Characterization of a stable, metronidazole-resistant *Clostridium difficile* clinical isolate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53757.
- [66] Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H. Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review [J]. *Anaerobe*, 2019, 55: 40-53.
- [67] Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E, et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 598.
- [68] 董玉玮, 侯进慧, 朱必才等. 表观遗传学的相关概念和研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2005, (01):1-3.
- [69] 张文婷, 姚玉峰. 细菌 DNA 甲基化研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(10):1026-1038.
- [70] Dembek M, Barquist L, Boinett CJ, et al. High-throughput analysis of gene essentiality and sporulation in *Clostridium difficile* [J]. *mBio*, 2015, 6(2):e02383.

细菌 DNA 甲基化综述

摘要:

表观遗传现象是在双链 DNA 中基因序列不发生改变的情况下研究转录和（或）转录后水平上基因表达发生的可遗传的变化，如 DNA 甲基化、基因沉默、RNA 编辑和染色质构象变化等。DNA 甲基化是表观遗传学中最常见的修饰方式，原核生物虽然缺少构成 DNA 结构的组蛋白和核酸，但在原核生物中 DNA 甲基化修饰很常见，在原核生物的宿主防御、细胞增殖、基因代谢和危机环境的毒力产生等许多生物过程发挥了重要作用。如在大肠杆菌和新月柄杆菌中发现的 DNA 腺嘌呤甲基化酶（Dam）和细胞周期调控性甲基化酶（CcrM）。Dam 和 CcrM 都可控制染色体复制、DNA 修复和基因表达等。在多种病原微生物中，甲基化酶均通过甲基化修饰行使生物学功能。

DNA 甲基化是由甲基转移酶（MTases）催化的，根据靶碱基甲基化的位置，把 DNA 甲基转移酶分为外环的 5mC 和内环的 6mA 和 4mC^[1]。DNA 甲基化发生于复制后，将甲基从 S-腺苷-1-蛋氨酸（SAM）转移到 DNA 中。从 1948 年到 1983 年就已经证实了这种机制。1948 年发现细菌 DNA 中存在 C⁵-甲基胞嘧啶；1955 年，细菌 DNA 甲基化研究首次报道，该研究发现在胸腺嘧啶缺乏的条件下，大肠杆菌中的甲基改变了腺嘌呤 N6 位置^[2]；1962 年，Arber 和 Dussoix 发现 DNA 甲基转移酶调控 RM 系统^[3]。此后，对位点特异性 DNA REases 和 DNA 甲基转移酶（MTase）研究持续增长；1963 年，S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的 DNA 聚合体的酶促甲基化首次被证实；1983 年，在大肠杆菌 BcnI 甲基转移酶（CCSGG）中发现 4mC，该甲基化转移酶 4mC 最初只在原核生物中被发现。该机制允许 DNA 在四个标准碱基之外合并甲基化碱基。该过程是可逆的，不改变原始的遗传序列，并通过调节蛋白质结合亲和力，调控表观遗传功能^[1-3]。

关键词:

细菌；DNA 甲基化；Dam 甲基化转移酶；CcrM 甲基化转移酶；CtsM 甲基化转移酶；Dcm 甲基化转移酶；M.BceJ 甲基化转移酶；CamA 甲基化转移酶

正文:

DNA 甲基化的发生与限制性内切酶修饰 (RM) 系统中的甲基转移酶 (MTases) 和同源限制性内切酶 (REases) 相关调控有关。RM 系统是一种细菌防御机制, 用于保护宿主基因组免受转座子和病毒 DNA 的入侵。RM 系统通过碱基调控修改区分外源 DNA, 并保护自己的 DNA 免受限制性内切酶的伤害。MTases 维持宿主基因组中特定序列的甲基化状态, 如当外源 DNA 入侵时, REase 识别出甲基化缺失, 确定它来自外源, 并裂解^[4]; 虽然 RM 系统在功能上相似, 但根据它们的亚基结构、裂解位点、序列识别和辅因子特点^[5], RM 系统在细菌中基于蛋白质化学计量学和整体作用模式被分为四种主要类型 (I 型、II 型、III 型和 IV 型)。

Type I 系统是由三个独立结构域构成的多亚基系统, 分别是 1. REase 和驱动蛋白; 2. HsdM (M, DNA 甲基转移酶基因); 3. HsdR (R, 核酸内切酶基因), 和 HsdS (S, 序列识别基因)^[4-6]。I 型 MTase (甲基转移酶) 由两个 MTase 和一个 S 亚基复合体 (M2S1) 组成, 而 REase 由两个甲基转移酶和两个内切酶以及一个 S 亚基组成复合体 (R2M2S1)。每个 S 亚基包含两个 TRDs, 识别一个双部基序 (bipartite motif) 如 AACNNNNNNGTGC, 并且 I 型 RM 系统的甲基化发生在双部基序中。Type I 系统甲基化由 M2S 蛋白复合体执行, 发生在两部分 TS 的两条链上然而 I 型 R 亚基对 DNA 序列的切割发生在距离识别位点数 Kb 的位置, 因为 R 亚基作用于 DNA 上, 然后进行 ATP 依赖的 DNA 易位切割。

Type II 系统是 RM 系统中最具有特征性的一组, 由独立的 MTase 和 REase 酶组成, 分为 IIG 型、IIB 型和 IIC 型系统(其中一些可能是从 I 型系统进化而来的)。所以, Type II 系统具有 REase 和 MTase 酶功能, 这些功能是由不同的蛋白质执行的。MTase 以单体的形式被激活, 而 REase 以单体通过各种复杂的结合转换至四聚体的形式激活^[3]。它们大多与短的回文基序 (如 GATC) 结合, 使基序甲基化或裂解外源的 DNA 或识别相关的调控位点。然而结合 MTase 和 REase 的 IIG 型系统识别非回文序列 (如, GCCCAG) 并在 DNA 结合位点外切割。

Type III 系统由 mod 和 res 基因构成, 编码识别序列 (Mod), 修饰 (Mod) 以及水解 (Res) 基因, 其特异性仅由 Mod 蛋白决定。MTase 由两个 Mod 亚基

组成, 因为只有 Mod-亚基包含特异性结合 DNA 的结构域; 而 REase 由一个 Res 亚基和两个 Mod 亚基组成的复合体 (R1M2) 构成^[5]。TypeIII 系统甲基化由 Mod2 执行, 而切割由 Res1mod2 执行; MTase (Mod-二聚体) 结合到短的 4-6 bp 长的序列并甲基化非回文基序 (如 CGAAT); 而 REase 通常在距离识别位点 25-27 bp 的地方以 DNA 易位作用裂解。

Type IV 系统识别和切割甲基化的 TS, 并包括一个 Rease, 有时还包括一个必须不起作用的 MTase。IV 型 RM 系统与上述类型的 RM 系统不同, IV 型 RM 系统仅包含 REase, 是一种攻击修饰噬菌体 DNA 的甲基化依赖限制性内切系统。由于细菌和噬菌体之间的进化军备竞赛, IV 型 RM 系统已经进化到具有低序列识别特异性 (与其他的 RM 系统不同), 借此保护未甲基化的宿主细胞免受各种甲基化模式的广泛外源 DNA 的影响。

总的来说, DNA 甲基化具有序列专一性、组织专一性、对称性和遗传性的特性; DNA 甲基化生物功能包括: 蛋白质和核酸的相互作用、影响 DNA 复制、重组和突变以及限制作用和修饰作用。目前研究发现了 2200 多种细菌的甲基化组, 这表明细菌中表观遗传调控现象很普遍。目前研究发现大多数细菌的 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNA MTase) 能保护细胞自身甲基化的 DNA 序列不被与其配对的限制性核酸内切酶切割。在细菌界中 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyladenine, 6mA) 是最常见 DNA 甲基化的形式, 且细菌以 S-腺苷甲硫氨酸 SAM 作为甲基供体通过限制修饰系统相关甲基转移酶和孤儿甲基转移酶完成了 6mA 的甲基化修饰, 该类甲基转移酶称为 N⁶-腺苷酸甲基化酶 (N⁶-adenylate methyltransferase, 6mA MTase)^[6]。甲基化修饰作为蛋白质翻译后修饰的一种重要形式, 参与了真核生物和原核生物的多种细胞进程。原核生物的蛋白质可以通过小分子化合物修饰, 比如糖基化、脂基化、甲基化、磷酸化、生物素化、烷基化等几十种类型来改变蛋白质的稳定性、结构和功能^[2]。

对原核生物中孤儿甲基转移酶深入研究发现, 可根据其编码基因、靶序列、是否分泌毒素等特征进行划分, 如首次分别在大肠杆菌和新月柄杆菌中发现的 DNA 腺嘌呤甲基化酶 (Dam) 和细胞周期调控性甲基化酶 (CcrM)^[7, 8]。Dam 和 CcrM 都发挥着控制染色体复制、DNA 修复和基因表达的功能。甲基化酶 Dam 属于 α 型 MTase, 以单体形式发挥功能, 构成其每条多肽都具有识别 DNA 序

列和发挥甲基化的功能，当 DNA 被 Dam 催化发生甲基化修饰，则不会被限制性内切酶 *Mbo* I 切割。研究证实 *dam* 序列在许多肠道菌群如大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、灵杆菌、假结核耶尔森菌和霍乱弧菌中高度保守，而在幽门螺杆菌中未发现 *dam* 序列。甲基化酶 CcrM 属于 β 型 MTase，通常以二聚体的形式存在才能发挥生物学功能，单体不具有活性，与 Dam 相似构成其每条多肽都具有识别 DNA 序列和发挥甲基化的功能，*Hinf* I 限制性内切酶可以切割未甲基化的 GANTC，而不能切割 CcrM 催化的甲基化序列。两者差异在于 CcrM 的表达只发生在染色体复制后期，而 Dam 的表达伴随着整个细胞周期。下文整理了目前具有代表性的细菌 DNA 甲基转移酶相关研究，侧重于艰难拟梭菌分离株中一种具有明确特异性的孤儿 DNA 甲基转移酶 CamA，本课题的顺利实施将为研究艰难拟梭菌感染的重要基因功能及其分子机制提供基础，也为其感染的预防应用研究提供重要平台。

1. Dam 甲基化转移酶

Dam 是研究较为透彻的 MTase，也是已知的甲基化酶分类最为广泛的一类，Dam 在大多数 γ 杆菌中的甲基化位点为 GATC。Dam 的作用是维持甲基化，使半甲基化状态转变为全甲基化，也能够使甲基化重新进行。Dam 的两个主要功能都处于半甲基化状态，在 DNA 复制过程中直接存在于复制叉的后面。首先，在纠正复制错误的错配修复系统中，它与在错配位点组装的修复复合物 MutSLH 一起发挥作用，指导对未甲基化子链的修复。第二，在 *dnaA* 介导的 DNA 复制起始后，位于复制 *oriC* 起点和 DnaA 启动子区的半甲基化 Dam 位点簇被 SeqA 结合(隔离),防止不适当的第二轮复制，直到下一个细胞周期。最近显示 Dam 还防止了在某些突变菌株中可能发生的异常的、非 *oriC* 依赖性的复制。Dam 甲基化也调节基因表达，既通过细胞周期依赖的甲基化状态，也通过在关键位点与 DNA 结合蛋白竞争。最近的研究已经确定了可能具有重要功能的未甲基化和未甲基化位点。编码 Dam 的基因在弧菌中是必需的，在弧菌中它是局部染色体解链以启动复制所必需的，并且在沙门氏菌、嗜血杆菌、耶氏弧菌和弧菌中它是毒力的关键，在弧菌中它调节菌毛粘附素、参与入侵的粘附素和其它粘附素的基因的表达。系统发育分析表明，*dam* 是在肠杆菌目、巴氏杆菌目、弧菌目、气单胞菌目和交替单胞菌目与其他 γ 原生菌目分离后，在共同祖先中获得的。

这种孤儿的保留可能是通过同时获得 *seqA*、*mutH* 和几个其他功能性连锁基因而稳定下来的。这为孤儿 MT 酶的选择和保留以及它们向谱系特异性家族的扩展提供了一个可能的模型^[2]。N⁶-甲基腺嘌呤甲基化修饰日益成为原核生物主要的表观遗传学，科学家们近年来对 Dam 甲基化转移酶的剖析如下： γ -变形菌门中的 Dam 参与的甲基化修饰指导的 DNA 错配修复。首先识别不匹配的碱基对(即 DNA 复制错误)，通过 MutS 检测错配招募 MutH 和 MutL，并装配 MutHLS 复合物；第三步，MutH 介导的新合成 DNA 链的内核裂解发生在最近的 GATC；第四步，DNA 解旋酶和核酸外切酶形成单链间隙；第五步，在 DNA 连接酶作用下形成磷酸二酯键，DNA 聚合酶 III 指导子体 DNA 链的再合成；最后，半甲基化的 GATC 被 Dam 甲基转移酶甲基化^[9]。

2. CcrM 甲基化转移酶

甲基化 GATC 的 CcrM 广泛存在于 (α -变形菌) 中，可能是由红螺菌目、鞘氨醇菌目、根瘤菌目、红菌目和茎杆菌目的共同祖先获得的。它在新月柄杆菌中研究最多，新月柄杆菌是不对称细胞分裂的模式生物，在细胞周期调节中起关键作用。它的表达受到非常严格的控制，在 S 期结束时被激活一段短暂的时间，紧接在染色体复制之后并在细胞分裂之前。因此，新生拷贝在整个复制过程中保持半甲基化的状态，并在细胞分裂开始时转化为完全甲基化状态。在细胞分裂后和下一轮复制之前，CcrM 在群集细胞中被 Lon 蛋白酶破坏，并隔离在具有复制能力的柄细胞的细胞极。与 Dam 不同，CcrM^[7]不是复制启动或错配修复所必需的，而是主要通过时间细胞周期依赖性甲基化状态变化充当全局转录调节因子。CcrM 甲基化状态影响转录因子 GcrA 的结合特性，导致包括调节复制的 *dnaA* 和 *ctrA* 在内的其他全局调节因子的甲基化依赖性表达 GcrA 在 P1 启动子半甲基化时激活 *ctrA* 表达，而在完全甲基化时不激活。在复制过程中，两条子染色体在相对的链上半甲基化，GcrA 仅在编码链甲基化的拷贝中激活 *creS*，从而产生不对称性。总的来说，在新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 中 CcrM 及其调控配偶体影响至少 200 个基因的转录，其中至少 40 个直接受 CcrM 甲基化的影响。

3. CtsM 甲基化转移酶

一种孤儿甲基转移酶修饰 RAATTY 在弯曲杆菌中高度保守, 弯曲杆菌是一种具有天然感受性的 ϵ -变形杆菌。在空肠弯曲菌 81 - 176 基因组中, 这种转移酶出现的频率是预期的 4 倍, *ctsM* 的存在加上这种过量保证了大部分源于弯曲杆菌细胞的 DNA 片段将携带至少一个甲基化 RAATTY 位点。这种甲基化标记促进了 DNA 的摄取, 并且是有效的自然转化所必需的, 从而在弯曲杆菌属中建立了优先的 HGT 密码子^[10]。这种区别并不依赖于一种 REase, 其机制有待进一步研究。在不动杆菌和螺旋体中, RAATTY 位点的甲基化也高度保守, 至少在后者中, 未甲基化位点的存在表明其具有转录调节作用。因此, 这个相同的表观遗传标记可能在不同的谱系中具有不同的功能^[11]。

4. Dcm 甲基化转移酶

Dcm 是一种孤儿 5mC MTase 修饰 CCWGG, 其在整个埃希氏菌属和沙门氏菌属中是保守的。最近表明, 大肠杆菌编码的 Dcm 甲基转移酶负责 DNA 的 5-甲基胞嘧啶修饰, Dcm 甲基化能影响核糖体基因的表达, 通过减少稳定期核糖体蛋白基因 *rplC* 和 *rpsJ* 以及耐药转运蛋白 SugE 的表达, 从而影响初级代谢和次级代谢。总的来说, *dcm* 的缺失不会导致明显的表现型, 因此尽管进行了几十年的研究, 其选择性保留的原因仍不清楚。此外, 它与编码一个内切酶的 *vsr* 基因共转录, 特异性地修复由 5mC 脱氨导致的 T:G 错配, 这种安排可能旨在减少 Dcm 甲基化的诱变效应。最近, 中国的高婕, 韩铁生, 贺新义科学家用变铅青链霉菌的 DNA 无甲基化修饰这一特点, 将大肠杆菌 *dcm* 基因导入变铅青链霉菌, 研究了 5-甲基胞嘧啶修饰在变铅青链霉菌中的功能^[12]。结果发现, 5-甲基胞嘧啶修饰不仅可影响变铅青链霉菌的形态和生理分化, 而且还能激活放线紫红素沉默基因的表达。尽管如此, 在存在 *dcm* 的自然细菌种群中, CCWGG 位点显示突变率增加了 8 倍, 所以 *dcm* 基因参与调控机制复杂, 还需更进一步的研究。

5. M.BceJ 甲基化转移酶

M.BceJIV 是识别 GTWWAC 的 T 型 II 孤儿, M.BceJI 是识别 CACAG 的完整 T 型 III RM 系统。这两种 MT 酶^[13]属于四种伯克霍尔德氏菌的核心基因组(鼻疽杆菌、鼻疽杆菌、类鼻疽杆菌、泰国鼻疽杆菌), 具有非常强的保守性。研究

发现, *bceJIVM* 缺失导致生物膜形态改变, 聚集和膜形成增加, 而 *bceJIM* 突变体^[14]表现出运动性下降。已经鉴定出野生型和突变株之间有差异表达的基因, 其中一些在其启动子区域有相关的转录起始位点, 这表明甲基化状态对表达有直接影响。

6. CamA 甲基化转移酶

艰难拟梭菌是一种革兰氏阳性、产芽孢、专性厌氧细菌, 是医院相关性腹泻的主要病原体, 也是发达国家医院内抗生素相关疾病的主要原因。艰难梭状芽孢杆菌感染是一个紧迫的医学问题。虽然对艰难拟梭菌基因组的了解已经取得了实质性进展, 但艰难拟梭菌的表观遗传基因组及其功能影响还没有得到系统的研究。2019 年, Oliveira PH, Ribis JW, Garrett EM 等科学家使用单分子实时测序技术和比较表观基因组学对 36 个人类分离株对艰难拟梭菌进行全面的 DNA 甲基组分析, 观察到艰难拟梭菌分离株中一种具有明确特异性的孤儿 DNA 甲基转移酶 CamA 并观察到高水平的表观基因组多样性和保守型, 并在 300 多个全球艰难拟梭菌基因组中都是高度保守的, 这些科学家通过多组学数据、遗传实验和小鼠模型证实了 CamA 甲基转移酶基因的失活对芽孢形成产生负面影响, 芽孢形成是艰难拟梭菌疾病传播的关键步骤, 并在后续进一步的实验和转录组学分析表明, CamA 甲基化修饰与细胞长度、生物膜形成和宿主定殖有关。这些发现有望推动未来沿着新的表观遗传学维度进行的研究, 以表征并潜在地抑制这种重要病原体的医学相关生物学过程^[5, 15]。2021 年, Zhou J, Horton JR 等^[4, 16]科学家从蛋白质层面解密了 CamA 相关的动力学参数和结构特征, 并确定了其与含有识别序列的 DNA 复合物。CamA 含有一个催化甲基转移的 N-末端结构域和一个 C-末端 DNA 识别结构域。识别部位的主要和次要凹槽 DNA 接触涉及碱基特定的氢键、van der Waals 接触和重新排列的 A:T 碱基对的 Watson-Crick 配对。这些都提供了足够的序列辨别力, 以确保高度的特异性。最后, 甲基供体 S-腺苷-L-蛋氨酸 (SAM) 令人惊讶的弱结合可能为使用 SAM 类似物抑制 CamA 活性提供了途径。抑制 CamA 活性作为一种新的治疗靶点的潜力, 这是一种急性医疗需求, 以控制艰难拟梭菌引起的胃肠道感染。因为在发达国家, 艰难拟梭菌是医院获得性感染的主要原因之一, 通常发生在抗生素治疗之后。这种病原体产生内生孢子, 使治疗变得困难, 它通过产生大量毒素, 并通过使结肠

细菌种群（微生物群或微生物组）稳定在不健康的分布，引起致命的感染。美国疾病控制与预防中心已将艰难拟梭菌感染列为一项紧急医疗风险，与大量发病率和死亡率相关。到目前为止，治疗艰难拟梭菌感染及其复发的治疗策略尚未满足医疗需求。目前迫切需要新的靶向治疗方法来对抗艰难拟梭菌感染。2022年，Zhou J, Horton JR, Yu D等科学家^[17]基于 CamA 相关的动力学参数和结构特征，寻找到三种能够在体外低摩尔条件下抑制 CamA 活性的 SAM 类似物，分别是 SGC0946（DOT1L 的抑制剂）、JNJ-64619178（PrMT5 的抑制剂）和 SGC8158（PrMT7 的抑制剂）。这些科学家在 CamA 抑制剂方面迈出实质性的第一步，在短期内作为化学探针来研究 CamA 控制孢子形成和定植的细胞机制，并最终作为治疗艰难拟梭菌感染的治疗性抗毒力药物。近年来，艰难拟梭菌感染的流行性与致死率逐年上升，因此寻找有效的 CamA 抑制剂对艰难拟梭菌致病机制的研究具有重要的意义。

目前，在艰难拟梭菌中新发现的 CamA 蛋白（*Clostridioides difficile* adenine methyltransferase A, CamA）也属于孤儿甲基转移酶^[4]。通过 REBASE 技术证实了甲基化酶 CamA 仅存在极少数其他梭状芽孢杆菌目和梭状杆菌目，但却广泛存在于艰难拟梭菌^[18]。所以，可以认为甲基化酶 CamA 是艰难拟梭菌高度保守的甲基转移酶，并依据艰难拟梭菌腺嘌呤甲基转移酶 A 相应英文字母进行命名^[17]。甲基化酶 CamA 的靶序列是一个不对称 6-bp 序列，即 CAAAAA 序列，该序列甲基化的位点富集在艰难拟梭菌发挥功能相关的基因上，如产孢、膜转运、转录调控和细胞壁编码蛋白基因^[2]。研究发现，甲基化酶 CamA 指导的 DNA 甲基化事件可能直接和（或）间接影响艰难拟梭菌体内定植和生物膜形成多个相关基因的表达。比较基因组分析发现 6mA 中的一段 CAAAAA（下划线为突出目标基因 A）基因序列普遍存在于艰难拟梭菌基因组中，CamA 蛋白介导了 CAAAAA 基因序列的甲基化修饰，该生物学过程与艰难拟梭菌芽孢发芽、生物膜形成以及在肠道定植等密切相关，推测 CamA 可能在艰难拟梭菌抵御外界压力和致病传播方面起到关键作用，CamA 甲基化似乎对高效产孢很重要，特别是对于超越不对称分裂的进展。CamA 甲基化似乎影响了 σ F 的激活以及随后 *spoIIQ* 和 *spoIV A* 在孢子形成转录级联中的表达，但其具体的调控机制尚不清楚^[18]。此外，CamA 突变细胞显示出细胞壁重塑酶的过表达和生物膜生成的增加。Cam

A 的转录起始位点在涉及产孢、运动性和膜转运的基因上游的调控区域中过多,并且与已知转录因子的结合位点显著重叠,这表明对这些位点的竞争产生了调控 ON/OFF 开关。

总结与展望

CamA 是艰难拟梭菌中一种专属的 DNA 甲基转移酶,其通过特异性识别 CAAAAA 序列位点,从而介导了艰难拟梭菌芽孢产生、生物膜形成和肠道定植。课题组通过原核表达并纯化得到 CamA 蛋白,在体外利用 MTase-Glo luminescence assay 分析技术验证其甲基化酶活性,旨在为进一步研究艰难拟梭菌感染在分子层面的发生、发展及治疗中的作用奠定基础。此外,课题组还利用 CRISPR-Cas9^[19-25]、cas14^[26-30]、cas12^[31-36]等基因编辑技术,构建含有 *camA* 基因靶向 RNA (sgRNA) 以及用于同源修复的 Donor 序列的质粒,分析其对艰难拟梭菌 *camA* 基因的敲除效率,并筛选出 *camA* 基因缺失菌株,为深入分析致病菌 *camA* 基因功能及其作用机制奠定了理论基础和研究依据。在先前对大肠杆菌的研究中,甲基化酶 Dam 被认为是一种典型的 6mA MTase^[10, 37, 38],由于 Dam 存在于很多肠道菌群的缘故,所以无法成为大肠杆菌致病的治疗靶点^[39, 40]。但甲基化酶 CamA 存在于所有艰难拟梭菌的基因组且只存在于极少数其他梭状芽孢杆菌,通过抑制 CamA 的功能活性降低由肠道菌群失调所致的艰难拟梭菌感染率^[28];另外,再加上 CamA 的活性变化似乎不改变艰难拟梭菌的适应性,并大大降低其产生耐药性的几率^[29]。最近发现的艰难拟梭菌腺嘌呤甲基转移酶 A 为艰难拟梭菌感染的表观遗传学靶向治疗提供了一种潜在途径,发现 CamA 抑制剂将补充正在进行的针对艰难拟梭菌的其他抗毒药物的研究,并提供调查工具来描述 CamA 控制孢子生成和生物膜生成的目前未知机制。虽然抑制孢子生成可以清除艰难拟梭菌感染,且复发率低,但针对孢子形成的抑制剂的发现导向研究有限。这种抑制剂可以与靶向营养细胞的抗生素高度协同,此外,可以大大减少病原体在医院环境中的传播。经过 Zhou J, Horton JR, Yu D 等科学家^[16, 17]探索了 SAM 类似物是否也能在体外抑制 CamA 酶活性,其中一些已经作为人类表观遗传酶的抑制剂在临床实验中。这将为产生有效和选择性的 CamA 抑制剂奠定基础, CamA 抑制剂将作为有用的化学探针,用于研究 CamA 在控制孢

子形成和定植方面的细胞机制，最终可能作为治疗性抗毒剂用于治疗艰难拟梭菌感染。

综上，DNA 甲基化是一种表观遗传信号，大多数发生在 DNA 复制后，由 DNA 甲基转移酶催化，将甲基从 SAM 转移到 DNA 聚合物中的特定碱基位置，能够在不改变 DNA 序列本身的情况下改变对遗传信息的解释。长期的研究表明，DNA 甲基转移酶介导的基因表达调控机制种类繁多，形成多样的 DNA 甲基化修饰，促使细菌快速适应机体动态变化的内环境，如缺氧、高或低离子强度、酶消化作用过强、缺乏匹配的营养物质等环境条件的变化，同时细菌自身也进化出一套专用的 DNA 甲基化修饰来调控基因转录或参与基因转录后调控，增加其免疫逃逸机制，从而成功定植在机体组织细胞。所以，DNA 甲基化成为细菌重要的表观调控方式，发挥着多种多样的生物学功能，例如指导 DNA 的复制与修复、增加细菌毒力、降低细菌抗生素敏感性以及增加细菌抗氧化能力等。研究发现，大肠杆菌的孤儿甲基化酶 Dam 不仅控制着 DNA 复制，还可以直接甲基化修饰腺嘌呤碱基来指导错配修复。在沙门菌中，Dam 介导的甲基化间接调控其毒力因子的表达，如 Wion 等的研究表明，敲除 Dam 导致的 GATC 甲基化缺失，引起相关分泌蛋白的变化导致毒力减弱。而 Cohen 等的研究表明，敲除 Dam 使大肠杆菌对抗生素更加敏感。Yallaly 等^[39,41]也发现，Dam 蛋白活力缺失的大肠杆菌对 H₂O₂ 会更加敏感，导致其存活率降低；而过表达 Dam 并没有增强野生型大肠杆菌对 H₂O₂ 抵抗力，反而更加降低了其存活率，他们推测，合适量的 Dam 能增加细菌抗氧化能力^[18, 40]。所以，DNA 甲基化修饰不影响沃森-克里克碱基配对，而是突出到主要槽，在那里它们影响蛋白质的相互作用，如转录因子和复制和修复酶与 DNA 双螺旋。甲基可以消极地影响蛋白质相互作用，通常通过空间位阻，或积极地，通过招募专门的蛋白质进化来识别和结合甲基化碱基。DNA 甲基化对生物体的影响来源于三个特性：甲基化转移酶的酶产物、甲基化的空间模式和甲基化的时间模式。大多数 DNA 甲基化转移酶只在特定的 DNA 序列背景下发生，即靶位点（TS）、识别位点或靶基序时，才会将给定的碱基甲基化。关键的是，TS 指定了整个 DNA 分子甲基化的空间模式。TSs 是短的（通常是 2 到 10 个指定的碱基），可能是回文的或非回文的，并且可能包含未指定的或退化的位置。TS 序列由一个或多个目标识别域（TRD）决定，TRD

通常是 MT 酶本身的一部分，但有时出现在与 MT 酶直接相互作用的单独的特定蛋白上。TRD 通常表现出远低于 MT 酶的催化和 SAM 结合区域的序列守恒。在真核生物中，DNA 甲基化是普遍存在的；在哺乳动物中，它由一个广泛保守的器官赋予，并在癌症中发挥作用；在遗传多样性更强的细菌和古菌中，DNA 甲基化系统是由不同的分类学群体独立获得和发展的，包含 N⁶-甲基腺嘌呤、N⁴-甲基胞嘧啶以及少量的 C⁵-甲基胞嘧啶，并在 DNA 复制后，由识别特定靶序列的 DNA 甲基转移酶催化碱基甲基化上述阐明了 DNA 甲基化修饰功能涉及范围广，扮演重要角色。DNA 甲基化的所有已知作用都涉及控制 DNA 结合蛋白及其同源位点之间的相互作用，包括保护免受 DNA 限制、错配修复过程中的链区分、细胞周期控制和转录调节。由于 DNA 甲基化通常会影响细菌病原体与其宿主的相互作用，从而增加了对感染性疾病进行表观遗传学治疗的可能性。正如 CamA 甲基转移酶基因的失活对芽孢形成产生负面影响，所以，抑制 CamA 活性才有望成为一种新的治疗艰难拟梭菌感染靶点。

参考文献

- [1] Anton BP, Roberts RJ. Beyond Restriction Modification: Epigenomic Roles of DNA Methylation in Prokaryotes [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2021, 75:129-49.
- [2] Gao Q, Lu S, Wang Y, *et al.* Bacterial DNA methyltransferase: A key to the epigenetic world with lessons learned from proteobacteria [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1129437.
- [3] Semashko TA, Arzamasov AA, Evsyutina DV, *et al.* Role of DNA modifications in *Mycoplasma gallisepticum* [J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0277819.
- [4] Pollak AJ, Reich NO. DNA adenine methyltransferase facilitated diffusion is enhanced by protein-DNA "roadblock" complexes that induce DNA looping [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(13): 2181-92.
- [5] Zhao J, Zhang M, Hui W, *et al.* Roles of adenine methylation in the physiology of *Lactocaseibacillus paracasei* [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2635.
- [6] Xiao CL, Zhu S, He M, *et al.* N⁶-Methyladenine DNA Modification in the

- Human Genome [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(2): 306-18e7.
- [7] Horton JR, Woodcock CB, Opat SB, *et al.* The cell cycle-regulated DNA adenine methyltransferase CcrM opens a bubble at its DNA recognition site [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4600.
- [8] Sanchez MA, Olivenza DR, Gutierrez G, *et al.* Contribution of DNA adenine methylation to gene expression heterogeneity in *Salmonella enterica* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(21): 11857-67.
- [9] Oliveira PH, Ribis JW, Garrett EM, *et al.* Epigenomic characterization of *Clostridioides difficile* finds a conserved DNA methyltransferase that mediates sporulation and pathogenesis [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(1): 166-80.
- [10] Liu P, Wang D, Zhou Y, *et al.* DNA methyltransferase detection based on digestion triggering the combination of poly adenine DNA with gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 74-8.
- [11] Shell SS, Prestwich EG, Baek SH, *et al.* DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7): e1003419.
- [12] Wilbanks EG, Dore H, Ashby MH, *et al.* Metagenomic methylation patterns resolve bacterial genomes of unusual size and structural complexity [J]. *ISME J*, 2022, 16(8): 1921-31.
- [13] Murray IA, Morgan RD, Luyten Y, *et al.* The non-specific adenine DNA methyltransferase M.EcoGII [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(2): 840-8.
- [14] Yan B, Wang D, Vaisvila R, *et al.* Methyl-SNP-seq reveals dual readouts of methylome and variome at molecule resolution while enabling target enrichment [J]. *Genome Res*, 2022, 32(11-12): 2079-91.
- [15] Yang Y, Xu G, Liang J, *et al.* DNA Backbone Sulfur-Modification Expands Microbial Growth Range under Multiple Stresses by its anti-oxidation function [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3516.
- [16] Zhou J, Horton JR, Blumenthal RM, *et al.* *Clostridioides difficile* specific DNA adenine methyltransferase CamA squeezes and flips adenine out of DNA helix

- [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3436.
- [17] Zhou J, Horton JR, Yu D, *et al.* Repurposing epigenetic inhibitors to target the *Clostridioides difficile*-specific DNA adenine methyltransferase and sporulation regulator CamA [J]. *Epigenetics*, 2022, 17(9): 970-81.
- [18] Hu T, Ma C, Yan Y, *et al.* Detection of DNA Methyltransferase Activity via Fluorescence Resonance Energy Transfer and Exonuclease-Mediated Target Recycling [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(6).
- [19] Abbasi BA, Dharan A, Mishra A, *et al.* In Silico Characterization of Uncharacterized Proteins From Multiple Strains of *Clostridium difficile* [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 878012.
- [20] Canadas IC, Groothuis D, Zygouropoulou M, *et al.* RiboCas: A Universal CRISPR-Based Editing Tool for *Clostridium* [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(6): 1379-90.
- [21] Ingle P, Groothuis D, Rowe P, *et al.* Generation of a fully erythromycin-sensitive strain of *Clostridioides difficile* using a novel CRISPR-Cas9 genome editing system [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8123.
- [22] Kuehne SA, Rood JI, Lyras D. Clostridial Genetics: Genetic Manipulation of the Pathogenic Clostridia [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(3).
- [23] Luo J, Yang Q, Zhang X, *et al.* TFPI is a colonic crypt receptor for TcdB from hypervirulent clade 2 *C. difficile* [J]. *Cell*, 2022, 185(6): 980-94 e15.
- [24] Mcallister KN, Martinez AA, Sorg JA. The Selenophosphate Synthetase Gene, *selD*, Is Important for *Clostridioides difficile* Physiology [J]. *J Bacteriol*, 2021, 203(12): e0000821.
- [25] Wang S, Hong W, Dong S, *et al.* Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018,24(10):1095-9.
- [26] Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Biosensing Technologies [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(6): 1226-33.
- [27] Aquino G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic [J]. *Nanomedicine*, 2019, 18: 428-31.

- [28] Granados JT, Aquino G. CRISPR/Cas13-Based Approaches for ultrasensitive and Specific Detection of microRNAs [J]. *Cells*, 2021, 10(7).
- [29] Hu J, Zhou J, Liu R, *et al.* Element probe based CRISPR/Cas14 bioassay for non-nucleic-acid targets [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57(80): 10423-6.
- [30] Karvelis T, Bigelyte G, Young JK, *et al.* PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): 5016-23.
- [31] Kim DY, Lee JM, Moon SB, *et al.* Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(1): 94-102.
- [32] Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, *et al.* CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases [J]. *Methods*, 2022, 203: 431-46.
- [33] Takeda SN, Nakagawa R, Okazaki S, *et al.* Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(3): 558-70 e3.
- [34] Wu Y, Battalapalli D, Hakeem MJ, *et al.* Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 401.
- [35] Xiao R, Li Z, Wang S, *et al.* Structural basis for substrate recognition and cleavage by the dimerization-dependent CRISPR-Cas12f nuclease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(7): 4120-8.
- [36] Xu X, Chemparathy A, Zeng L, *et al.* Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(20): 4333-45 e4.
- [37] Omeershoffudin NM, Kumar S. Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*: identification of bacterial DNA adenine methyltransferase as a novel drug target from hypothetical proteins using subtractive genomics [J]. *Genomics Inform*, 2022, 20(4): e47.
- [38] Yu D, Horton JR, Yang J, *et al.* Human MettL3-MettL14 RNA adenine methyltransferase complex is active on double-stranded DNA containing

- lesions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(20): 11629-42.
- [39] Bogaer TE, Garde A, Gautier T, *et al.* SRSF1 haploinsufficiency is responsible for a syndromic developmental disorder associated with intellectual disability [J]. *Am J Hum Genet*, 2023, 110(5): 790-808.
- [40] Nishimura M, Tanaka T, Murata S, *et al.* Extension of bacterial rDNA sequencing for simultaneous methylation detection and its application in microflora analysis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 5731.
- [41] Xiong J, Wang P, Shao WX, *et al.* Genome-wide mapping of N⁴-methylcytosine at single-base resolution by APOBEC3A-mediated deamination sequencing [J]. *Chem Sci*, 2022, 13(34): 9960-72.

附件 2 文章中所用引物序列

表 4-1 文章中所用引物序列

Table 4-1 Primer sequences used in this paper

引物名称	引物序列 5'—3'
CAMUU	TTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCGCGTTAACCTTTCACATGATTTAAACG
CAMUD	CAAAGAAAAGCTTTTCTCTACCCCATTACTCTTTAGACAGTAGAAAATTATCTTGAG
CAMDU	CTCAAGATAATTTTCTACTGTCTAAAGAGTAATGGGGTAGAGAAAAGCTTTTCTTTG
CAMDD	CTGCGATCGCGCATGTCTGCAGGCCTCGAGCACCTACTATATCAAAAACGTTTCTG
<i>camA</i> -F	TGATATTTCTGTGGGTGTGGA
<i>camA</i> -R	AGCTTTTCTCTACCCCATTGAAG
2761F	ATCAATCTTAAGGGGATACCACTAG
2761R	GTTCTCCACCTTCTAAAATAATC
<i>catP</i> -F	ATGGTATTTGAAAAAATTGATAAAAATAG
<i>catP</i> -R	TTAACTATTTATCAATTCCTGCAATTCTG
巢式-F	ATAGGTCACCTATATTGGAT
巢式-R	CTAATCCTTTCATATTATCA
<i>tcdB</i> -F	TTACATTTTGTTTGGATTGGAGGTC
<i>tcdB</i> -R	AGCAGCTAAATTCCACCTTTCTACC
Cas12-500F	TACTTGGACAGAAAATCCCGTGTGA
Cas12-500R	ACCGGCATCAAGCTGGAG