

# 嗜水气单胞菌若干毒力因子同时缺失的突变株的构建及特性分析

刘永杰 陆承平\*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

**摘 要** 以携带质粒 pAM120( $Tc^r$ /Tn916)的大肠杆菌 CG120 株为供体菌,采用滤膜接合法与受体菌嗜水气单胞菌 J-1 株( $cfz^r$ )进行接合转移,在含  $Tc$  和  $cfz$  选择平板上进行筛选。共获接合转移菌落 3800 个,其接合频率为  $3 \times 10^{-5}$  (按供体细胞计算)。任取 38 个接合子,提取基因组 DNA,以嗜水气单胞菌特异性 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,所有接合子均阳性。为证明 Tn916 确实插入基因组,以四环素基因( $tet$ )引物进行 PCR 扩增,结果所有抗性接合子均扩增出一条特异条带。与亲本 J-1 株相比,所有接合子的主要毒力因子如蛋白酶、溶血素、DNA 酶和淀粉酶等均不表达,对小鼠失去致病力,其  $LD_{50}$  大于  $10^9$  CFU。接合子连传 10 次后,四环素抗性消失,但毒力未恢复,说明通过转座子 Tn916 的插入可获得稳定的无毒嗜水气单胞菌突变株。Tn916 引起嗜水气单胞菌毒力性状改变的机制有待研究,推测可能与该菌染色体上存在 Tn916 的热点或毒力岛有关。

**关键词** 嗜水气单胞菌, Tn916, 毒力因子

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)02-0191-04

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)引起多种动物发病,在公共卫生上占有重要地位。该菌的致病性与其能产生毒素、S 层、胞外酶、菌毛等多种毒力因子有关<sup>[1]</sup>。凌红丽等<sup>[2]</sup>研究表明,胞外蛋白酶和溶血素是嗜水气单胞菌的主要致病因子。陈怀青和储卫华等<sup>[3,4]</sup>相继构建了嗜水气单胞菌 S 层和胞外蛋白酶缺失突变株,证实了此两种毒力因子在细菌致病过程中发挥重要作用。单个毒力因子缺失突变株的构建国内外报道较多,而多个毒力因子同时缺失的突变株尚未见报道。

Tn916 是来源于革兰氏阳性细菌粪肠球菌的接合转座子,编码四环素抗性基因,可以在多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌之间发生接合转移,具有广泛的宿主范围,可通过一种不依赖重组的切除——插入机制,插入到目的复制子的一个或多个位点<sup>[5]</sup>。本试验用 Tn916 对 Ah 进行接合诱变,以期构建若干毒力因子同时缺失的突变株,为嗜水气单胞菌病的防治奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 供体菌为携带质粒 pAM120 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)CG120,携带 Tn916,具有四环素

抗性( $Tc^r$ )标记,由加拿大 Clewell 博士惠赠;受体菌为 Ah J-1 株,具有头孢唑啉抗性( $cfz^r$ )标记,由本实验室分离鉴定并保存;Ah 4332 由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠,天然无毒株;Ah TM<sub>6</sub> 为陈怀青等<sup>[3]</sup>构建的 Ah J-1 株的 S 层缺失株;Ah W-1 由本实验室保存,天然无菌毛。

**1.1.2 细菌培养** 大肠杆菌和嗜水气单胞菌分别置 LB 培养基中 37℃ 和 28℃ 培养<sup>[4]</sup>。所用抗生素的终浓度分别为:头孢唑啉( $cfz$ ) 100 μg/mL,四环素( $Tc$ ) 10 μg/mL。

**1.1.3 实验动物** 昆明种小鼠,体重约 30g/只,购自南京医科大学实验动物中心。接种前,无菌采集血清经菌体凝集试验测得 Ah 凝集抗体滴度为 0。

### 1.2 细菌的接合

供体菌大肠杆菌 CG120 接种于 LB 培养基中,37℃ 摇床培养过夜。受体菌 Ah J-1 接种于 LB 培养基中,28℃ 培养至对数生长期后备用。分别取供体菌和受体菌菌液按 1:2(V/V)混合,总菌数约为  $10^8$  CFU,轻轻摇匀后,4000r/min 离心 5min,收集菌体,用生理盐水洗涤 1~2 次,菌体溶于原混合液等体积的生理盐水中,取 100 μL 滴于孔径为 0.45 μm 的灭菌微孔滤膜上,滤膜置不含抗生素 LB 平板表面,37℃ 培养 24h 后,将滤膜置于装有 2mL 灭菌生理盐水的三

基金项目 江苏省自然科学基金创新人才项目(BK2003417),南京农业大学科技创新人才基金(2003Y09)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396517;E-mail liucp@njau.edu.cn

作者简介 刘永杰(1972-),女,吉林省长春人,副教授,博士,主要从事病原微生物学与免疫学等方面的研究。E-mail liuyongjie72@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-04-27,修回日期 2004-12-03

角烧瓶中,轻摇,洗下菌体,将菌液连续 10 倍稀释,取不同稀释度的菌液 100 $\mu$ L 涂布在含有 Tc 和 cfz 的 LB 平板上,另取等量的菌液涂布在不含 Tc 和 cfz 的 LB 平板上,以计算接合频率。

1.3 Tn916 的稳定性

将菌株在不含 Tc 的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 18h 后,再以 1% 接种量接种于新鲜的 LB 培养基中继续培养,如此连传 10 次。取 100 $\mu$ L 菌液 10 倍梯度稀释,分别涂布于含 Tc 和不含 Tc 的 LB 平板上。用含 Tc 平板上的菌落数与不含 Tc 平板上的菌落数之比乘以 100% 表示转移接合子的稳定性。

1.4 嗜水气单胞菌 16S rDNA 特异性检测

16S rDNA 特异性引物为上游引物 P1:5'-GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA-3'(451~473);下游引物 P2:5'-CGTGCTGGCAACAAAGGACAG-3'(1115~1135)。引物由 TaKaRa 有限公司协助完成。PCR 反应体系(25 $\mu$ L):10 $\times$  Buffer 2.5 $\mu$ L,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 $\mu$ L,10mmol/L dNTP 2.5 $\mu$ L,引物(25pmol/ $\mu$ L)各 0.5 $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L)0.3 $\mu$ L,模板 1 $\mu$ L,灭菌超纯水 15.2 $\mu$ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 1min,60 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.5 Tn916 插入基因组的鉴定

Tn916 携带四环素基因(*tet*),根据已发表的 *tet* 序列,用 Primer5 软件设计一对引物,其序列为:上游引物(P1):5'-ATGGGATACGTAATAGAGG-3'(12644~12663);下游引物(P2):5'-CGTGGGAGATGATGTTTGTT-3'(13148~13167)。引物由 TaKaRa 有限公司协助完成。PCR 反应体系同 1.4 节。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,62 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 45s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.6 主要毒力因子检测

采用平板法(Plate assay)。将待检细菌分别涂布在含 1.5% 脱脂乳、0.1% DNA(Worthington 公司产品,由大肠杆菌中提取)外加 0.5% 甲基绿、0.2% 淀粉(菌落形成后,平板上滴加革兰氏碘液,必须以铺满菌落周围为宜,然后观察)和 5% 兔鲜血的 4 种 LB 平板上,培养 24h 后,观察菌落周围是否出现无色透明圈,以确定菌体是否产生胞外蛋白酶、DNA 酶、淀粉酶和溶血素。

1.7 LD<sub>50</sub> 的测定

将 J-1 株、抗性接合子和连传 10 次失去 Tc<sup>r</sup> 的接合子的 37 $^{\circ}$ C 培养物分别进行 4 $^{\circ}$ C 6000r/min 离心 30min,弃上清,用灭菌生理盐水悬浮至原体积,作 10 倍稀释至 10<sup>9</sup>,每个稀释度 0.2mL,分别腹腔注射健

康小鼠,每组 10 只,观察记录 7d 内死亡数。将死亡小鼠剖检,作细菌学检查,并根据 Reed-Muench 法计算出 LD<sub>50</sub><sup>[6]</sup>。

2 结果

2.1 Tn916 接合转移诱变 Ah

用微孔滤膜接合法接合诱变,以含 Tc、cfz 的 LB 平板筛选突变株,获得 cfz<sup>r</sup>、Tc<sup>r</sup> 抗性接合子 3800 个,其接合频率约为 3 $\times$ 10<sup>-5</sup>(按供体细胞计算)。接合子的稳定性表明,在无选择压力下(不含 Tc 的 LB 培养基)连传 10 次,带有 Tc<sup>r</sup> 的细菌达 15%~25%。

2.2 16S rDNA 特异性检测

任取 38 个接合子 MJ-1~38,提取基因组 DNA,以亲本 AhJ-1 株作阳性对照、大肠杆菌 CG120 作阴性对照,进行 16S rDNA 扩增,发现所有接合子均能扩增出 685bp 长度的目的片段,说明这些接合子均属嗜水气单胞菌(图 1)。

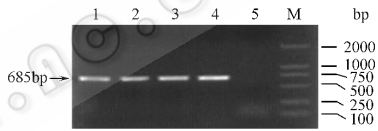


图 1 嗜水气单胞菌 16S rDNA 的 PCR 检测

Fig.1 PCR detection of *A. hydrophila* 16S rDNA  
1~3. Conjugants with Tc<sup>r</sup>; 4. Positive control (*A. hydrophila* J-1); 5. Negative control (*E. coli* CG120); M. Marker.

2.3 Tn916 插入基因组的鉴定

提取 Ah J-1、大肠杆菌 CG120 和抗性接合子的质粒,并以其为模板进行 *tet* 扩增,发现除大肠杆菌 CG120 的质粒能扩增出一条 524bp 长度的目的片段外,其余未扩出该片段(图 2)。以亲本 Ah J-1 株基因组为模板作阴性对照、大肠杆菌 CG120 质粒为模板作阳性对照,将抗性接合子的基因组进行 *tet* 扩

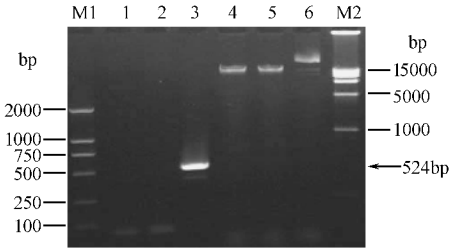


图 2 质粒为模板的 *tet* PCR 检测

Fig.2 PCR detection of *tet* in the plasmids  
M1. Marker(2000bp); 1~3. PCR products amplified respectively from the plasmids of a conjugant with Tc<sup>r</sup>, *A. hydrophila* J-1 and *E. coli* CG120; M2. Marker(15000bp); 4~6. Plasmids respectively from a conjugant with Tc<sup>r</sup>, *A. hydrophila* J-1 and *E. coli* CG120.

增,发现所有抗性接合子均能扩出 524bp 长度的目的片段(图 3)。以上结果说明 Tn916 插入到抗性接合子的基因组中。38 个抗性接合子连传 10 次后,有 7 个失去 Tc<sup>r</sup>,相应地将其分别取名为 M'J-1、M'J-4、M'J-7、M'J-11、M'J-17、M'J-19、M'J-23。提取基因组 DNA,进行 *tet* 扩增,结果不能扩增出该片段。

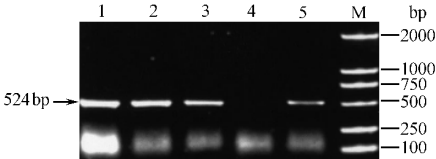


图 3 抗性接合子基因组为模板的 *tet* PCR 检测

Fig.3 PCR detection of *tet* in the genomes of conjugants with Tc<sup>r</sup>

1~3. Conjugants with Tc<sup>r</sup>; 4. Negative control ( *A. hydrophila* J-1 );

5. Positive control ( *E. coli* CG120 ); M. Marker.

2.4 毒力因子检测

分别检测亲本 J-1 株、38 个抗性接合子、7 个失去 Tc<sup>r</sup>的接合子、天然无毒株 Ah 4332、天然无菌毛株 Ah W-1、S 层缺失株 Ah TM<sub>6</sub>的胞外蛋白酶、DNA 酶、淀粉酶和溶血素的产生情况,结果发现除 J-1 株外,其余菌株均不产生胞外蛋白酶、DNA 酶、淀粉酶和溶血素。

2.5 LD<sub>50</sub>测定

分别检测亲本 J-1 株、抗性接合子( MJ-7 )和连传 10 次后失去 Tc<sup>r</sup>的接合子( M'J-7 )对小鼠的 LD<sub>50</sub>(表 1)。亲本 J-1 株对小鼠的 LD<sub>50</sub>为 6.0 × 10<sup>5</sup> CFU,所有死亡的小鼠均在 3d 内发生;而分别接种 MJ-7 和 M'J-7 甚至达到 1.0 × 10<sup>9</sup> CFU,在 7d 内也未见小鼠死亡,说明 MJ-7 和 M'J-7 对小鼠的 LD<sub>50</sub>均大于 10<sup>9</sup> CFU,可认为是无毒力菌株<sup>[7]</sup>。

表 1 Ah J-1、MJ-7 和 M'J-7 对小鼠 LD<sub>50</sub> 的计算

Number of bacteria ( CFU/0.2mL )	Number of mice that died		
	Ah J-1	MJ-7	M'J-7
10 <sup>9</sup>	10	0	0
10 <sup>8</sup>	10	0	0
10 <sup>7</sup>	8	0	0
10 <sup>6</sup>	6	0	0
10 <sup>5</sup>	3	0	0
10 <sup>4</sup>	0	0	0
10 <sup>3</sup>	0	0	0
LD <sub>50</sub>	6.0 × 10 <sup>5</sup>	> 10 <sup>9</sup>	> 10 <sup>9</sup>

3 讨论

本试验将 Tn916 插入 Ah 染色体,致使 Ah 的多个毒力因子如胞外蛋白酶、溶血素、淀粉酶和 DNA 酶的基因同时不表达,获得 Ah 无毒突变株,对小鼠的致病性大大降低。Tn916 的插入引起 Ah 致病性改变的机制有待研究,推测有几种可能原因:

第一,转座子 Tn916 在插入染色体中,并不是完全随机的,可能会形成一些“热点”。有研究发现,在某些细菌中,Tn916 存在插入热点,它们是一些富含 A-T 碱基对的序列,同 Tn916 的右侧末端存在同源性<sup>[8]</sup>;第二,Ah 的上述毒力因子基因可能由一个操纵子控制,当 Tn916 插入到操纵子的上游基因时,有可能因为该操纵子转录过程的提前中止而影响该操纵子中下游基因的表达;第三,Ah 染色体可能有毒力岛存在。本试验检测的天然无毒力株 4332、S 层缺失株 TM<sub>6</sub>、菌毛缺失株 W-1 和作者构建的毒力突变株同时缺失的毒力因子均为分泌性蛋白,恰好符合毒力岛的一个特点,即毒力岛编码的基因产物多为分泌性蛋白和细胞表面蛋白。Zhang 等<sup>[9]</sup>研究了 Ah 毒力菌株和非毒力菌株之间基因差异,并指出该菌可能存在毒力岛。如想证实是否存在毒力岛,还需利用分子生物学手段得到这段相关基因,分析是否具有已知毒力岛的特点。

本试验将抗性接合子连传多次后,尽管四环素抗性丢失,但曾经丢失的毒力因子均未恢复,且对小鼠也无致病力,说明突变株毒力性状相当稳定,可能与 Tn916 在切离时改变插入位点附近的序列有关。Shimoji<sup>[10]</sup>在研究猪丹毒丝菌无荚膜突变株基因组序列时发现,当 Tn916 切离时 6 个新核苷酸取代了其插入位点附近的核苷酸序列。

参 考 文 献

[ 1 ] Pemberton J M, Kield S P, Schmidt R. Secreted enzyme of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 15 :1 - 10.

[ 2 ] 凌红丽, 陆承平, 陈怀青, 等. 6 株嗜水气单胞菌的毒力因子及其对小白鼠的致死性. *中国兽医学报*, 1999, 19 ( 3 ) :255 - 257.

[ 3 ] 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌 S 层缺失株的构建. *南京农业大学学报*, 1996, 19 ( 2 ) :64 - 68.

[ 4 ] 储卫华, 陆承平. 筛选用转座子 Tn916 诱变的具有免疫原性的嗜水气单胞菌蛋白酶缺失株. *水产学报*, 2001, 25 ( 3 ) :244 - 248.

[ 5 ] Senghas E, Jones J M, Yamamoto M, et al. Genetic organization of the bacterial conjugative transposon Tn916. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170 :245 - 249

- [ 6 ] Moral C H , Castillo E F D , Fierro P L , *et al.* Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* *aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infection and Immunity* ,1998 **66** :1813 – 1821.
- [ 7 ] Ysabel S , Alicia E T , Juan L , *et al.* Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity* , 1998 , **56** 3258 – 3293.
- [ 8 ] Jaworski D D , Clewell D B. Evidence that coupling sequences play a frequency-determining role in conjugative transposition of Tn916 in *Enterococcus faecalis* . *Journal of Bacteriology* ,1994 ,**176** : 3328 – 3335.
- [ 9 ] Zhang Y L , Ong C T , Leung K Y. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* , 2000 ,**146** : 999 – 1009.
- [ 10 ] Shimoji Y , Mori Y , Sekizaki T. Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipelothrix rhusiopathiae* :use of excision of Tn916 to inactivate a target gene. *Infect Immun* ,1998 **66** 3250 – 3254.

## Construction and characterization of some virulence determinants-deficient strain in *Aeromonas hydrophila*

LIU Yong-jie   LU Cheng-ping<sup>\*</sup>

( Key Lab of Animal Disease Diagnostic & Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing210095 , China )

**Abstract :** Cell conjugation was carried out between the donor *E. coli* CG120 with pAM120 ( Tc<sup>r</sup>/Tn916 ) and the recipient *Aeromonas hydrophila* J-1 by filter mating. 3800 positive clones were gained according to the ability of growth on LB medium with 10 g/mL tetracycline ( Tc ) and 100 g/mL cephalosporin ( cfz ). Conjugation efficiency was  $3 \times 10^{-5}$  per donor. When 16S rDNA PCR amplification was performed with special primers , positive results were gained in all the 38 conjugants. To demonstrate the insertion of Tn916 into the genomes of conjugants , tetracycline gene ( *tet* ) PCR amplification was performed. A special band could be gained in the conjugants with Tc<sup>r</sup> . Compared with the parent J-1 strain , some genes of main virulence determinants , such as proteases , hemolysins , DNase and amylases , could not be expressed in the conjugants. The pathogenicity capability of conjugants was greatly decreased and the 50% lethal dose for mice was more than  $10^9$  CFU. By serially passaged for 10 times , the above virulent characters had not been regained despite the disappearance of Tc<sup>r</sup> . The results showed that by the insertion of Tn916 , stable and avirulent *A. hydrophila* mutants could be gained. The mechanisms , by which Tn916 induced the changes of virulence characters in *A. hydrophila* , are not definite. It is suspected that there might exist hot spots of Tn916 or pathogenicity island on the chromosome of *A. hydrophila* .

**Key words :** *Aeromonas hydrophila* ,Tn916 ,Virulence determinants

Foundation item :Nature Science Foundation of Jiangsu Province ( BK2003417 ); Foundation of Nanjing Agricultural University ( 2003Y09 )

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-25-84396517 ; E-mail [tlucp@njau.edu.cn](mailto:tlucp@njau.edu.cn)

Received date 10-27-2004

## 广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	上海保兴生物设备工程有限公司	文前Ⅱ
GE Healthcare Bio-sciences( 原名 Amersham Biosciences )	封二	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后Ⅰ
岛津( 香港 )有限公司	封三	北京陆桥技术有限责任公司	文后Ⅱ
尼康仪器( 上海 )有限公司	文前Ⅰ	上海国强生化工程装备有限公司	文后Ⅲ/Ⅳ