



布鲁氏菌入侵相关基因 *IalB* 缺失株的构建及生物学特性分析

陈蕾[#], 张广冻[#], 李俊玫, 秦佩佩, 李彬, 刁梓洋, 周栋, 靳亚平, 王爱华^{*}

西北农林科技大学动物医学院 农业农村部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

陈蕾, 张广冻, 李俊玫, 秦佩佩, 李彬, 刁梓洋, 周栋, 靳亚平, 王爱华. 布鲁氏菌入侵相关基因 *IalB* 缺失株的构建及生物学特性分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1254-1268.

CHEN Lei, ZHANG Guangdong, LI Junmei, QIN Peipei, LI Bin, DIAO Ziyang, ZHOU Dong, JIN Yaping, WANG Aihua. Construction and characterization of *ialB*-deleted strain of *Brucella suis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1254-1268.

摘要: 入侵相关基因(invasion-associated locus B, *ialB*)的同源基因在布鲁氏菌所属的根瘤菌目中是广泛保守的, 但其在布鲁氏菌中的功能研究几乎为空白。根据有限的报道资料, 推测 *ialB* 的功能可能与布鲁氏菌入侵细胞以及适应胞内环境胁迫有关。【目的】探究 *ialB* 在布鲁氏菌中的生物学功能, 揭示其在布鲁氏菌黏附和入侵细胞以及胞内存活中的作用。【方法】以猪种布鲁氏菌 S2 株为亲本, 运用同源重组的方法构建布鲁氏菌 *ialB* 缺失株 $\Delta ialB$, 并通过表达质粒转化的方法构建其回补株 $C\Delta ialB$, 比较 3 种菌株的生长特性、对体外应激的敏感性; 通过扫描电镜观察 *ialB* 缺失对布鲁氏菌形态的影响, 通过实时荧光定量 PCR 检测 3 种菌株极性延长相关基因的表达; 通过免疫荧光和平板计数的方法分析 *ialB* 缺失对布鲁氏菌黏附、入侵 RAW264.7 细胞以及胞内存活的影响。【结果】成功构建了菌株 $\Delta ialB$ 和 $C\Delta ialB$; $\Delta ialB$ 与布鲁氏菌 S2 株相比, 生长受限, 活力降低, 在酸应激、高渗应激、低渗应激、多黏菌素 B 应激条件下存活率降低, 在氧化应激条件下存活率上升; 而且, $\Delta ialB$ 的菌体形态发生改变, 菌体变短, 直径增加, 极性延长相关基因 mRNA 水平的表达下调; 此外, *ialB* 缺失不影响布鲁氏菌黏附、入侵 RAW264.7 细胞的能力, 但显著降低了布鲁氏菌胞内存活能力。【结论】入侵相关基因 *ialB* 在布鲁氏菌中具有调节细胞活性和菌体正常生长的功能, 对布鲁氏菌抵抗外界环境刺激和在宿主细胞内的增殖具有重要作用。

关键词: 布鲁氏菌; 入侵相关基因 *ialB*; 基因缺失; RAW264.7 细胞; 生物学特性

资助项目: 国家自然科学基金(31672584); 国家重点研发计划(2018YFD0500904)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672584) and the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500904).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: aihuawang1966@163.com

Received: 2022-08-01; Accepted: 2022-09-28; Published online: 2022-10-10

Construction and characterization of *ialB*-deleted strain of *Brucella suis*

CHEN Lei[#], ZHANG Guangdong[#], LI Junmei, QIN Peipei, LI Bin, DIAO Ziyang, ZHOU Dong, JIN Yaping, WANG Aihua^{*}

College of Veterinary Medicine, Key Laboratory of Animal Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: The homologous genes of invasion-associated locus B (*ialB*) are conserved in *Rhizobiales* including *Brucella* spp., while little is known about this gene in *Brucella*. According to the limited reports, *ialB* of *Brucella* may be associated with the invasion into host cells and the adaptation to intracellular stress. **[Objective]** To explore the role of *ialB* gene in the *Brucella* adhering to and invading host cells and the intracellular survival of *Brucella*. **[Methods]** We constructed the *ialB*-deleted strain Δ *ialB* of *Brucella suis* S2 by using homologous recombination method and the complemented strain C Δ *ialB* by transforming the expression plasmid containing the open reading frame of *ialB* into Δ *ialB*. Subsequently, we compared the growth phenotype and stress resistance of different strains and assessed the effect of *ialB* deletion on the expression of genes associated with the polar cell elongation of *Brucella*. Additionally, we determined the effect of *ialB* deletion on the invasion and proliferation of *Brucella* in RAW264.7 murine macrophages. **[Results]** Δ *ialB* and C Δ *ialB* were constructed successfully. Compared with *B. suis* S2, Δ *ialB* showed suppressed growth and decreased cell viability. The deletion of *ialB* decreased the resistance of *Brucella* to acid stress, hypertonic stress, hypotonic stress, and polymyxin-B stress and increased the resistance to oxidative stress. Furthermore, the deletion changed the cell morphology of *Brucella*, which was manifested as shortened cell length and increased cell diameter. The mRNA levels of the genes associated with the polar cell elongation of *Brucella* were down-regulated in Δ *ialB*. Compared with *B. suis* S2, deletion of *ialB* did not change the adhesion or invasion of *Brucella* and decreased the proliferation in RAW264.7 cells. **[Conclusion]** *ialB* is associated with the cell viability and polar growth of *Brucella*, playing a role in the stress resistance and proliferation of *Brucella* in host cells.

Keywords: *Brucella suis* S2; invasion-associated locus B (*ialB*); gene deletion; RAW264.7 cells; biological characteristics

布鲁氏菌(*Brucella* spp.)属于变形菌门的 α -2型分支,是革兰氏阴性兼性胞内寄生菌。布鲁氏菌病呈全球性流行,有超过170个国家有关于布鲁氏菌病的报道^[1]。我国将其列为二类疫病,可能造成较大经济损失和社会影响,布鲁氏菌病的疫情依然严峻^[1-2]。

布鲁氏菌没有经典的毒力因子,其侵入机

体后,通过多种途径突破宿主的免疫杀伤并在细胞内生存是其致病的关键^[3]。因而,布鲁氏菌入侵宿主和在细胞内存活的机制一直是该领域研究的重点。但有关布鲁氏菌入侵相关因子的研究并不充分。研究显示,入侵相关位点B (invasion-associated locus B, *ialB*)基因编码的蛋白是一种入侵相关蛋白,在巴尔通体逃避免疫、

黏附并侵袭宿主红细胞中发挥重要作用^[4]。*ialB* 在所有种属的巴尔通体中是保守的,对杆菌样巴尔通体的 *ialB* 基因进行插入突变,突变株和野生株相比,其黏附和入侵红细胞的能力下降了 47%–53%^[5]。*ialB* 与耶尔森菌中编码 Ail 蛋白的基因具有相当的序列相似性,Ail 蛋白属于外膜蛋白(outer membrane protein, OMP),与黏附和入侵宿主细胞有关^[6]。*ialB* 基因也被证明可赋予大肠杆菌入侵红细胞的表型,暗示其在细菌毒力中的作用^[7]。*ialB* 也有可能和致病菌在不同的环境中适应和生存相关,如杆菌样巴尔通体从宿主白蛉传递到人时,可以适应温度、pH、氧化应激等显著变化的生存环境^[8]。

布鲁氏菌和巴尔通体均是 α -变形杆菌,它们的系统发育关系相近,都能在真核细胞中生存。*ialB* 的同源基因在包括猪布鲁氏菌的根瘤菌目中是广泛保守的,但关于布鲁氏菌 *ialB* 基因的报道却十分有限。对马耳他布鲁氏菌进行热应激处理(37 °C转到 42 °C条件下培养),IalB 蛋白表达量下调^[9]。推测布鲁氏菌 *ialB* 的功能可能与入侵细胞以及适应吞噬细胞中遭遇的环境胁迫如低 pH、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等有关。因此,构建布鲁氏菌 *ialB* 缺失株,研究 *ialB* 在布鲁氏菌中可能的功能及其是否对布鲁氏菌入侵巨噬细胞和在巨噬细胞中存活和增殖产生影响,对于揭示布鲁氏菌感染的机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

猪种布鲁氏菌 S2 株(*Brucella suis* S2)、pUC18、pBBR1MCS-5、pET32a 和 pEGFP-N1 等载体由本实验室(农业农村部动物生物技术重点实验室)保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB)购自北京奥博星生物技术有限公司,Primer star DNA polymerase、DNA Marker、限制性核酸内切酶购自大连宝生物工程有限公司,ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司,高纯度质粒小提中量试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,多黏菌素 B (polymyxin B)购自广州赛国生物科技有限公司, HCl、H₂O₂ 和 NaCl 等购自汕头西陇科学股份有限公司, Triton X-100 购自上海索莱宝生物科技有限公司, DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司。

1.2 引物设计

根据 NCBI 网站上公布的布鲁氏菌 S2 株全基因组序列(GenBank 登录号为 NZ_CP006961.1)和 pEGFP-N1 载体的基因序列(GenBank 登录号为 U55762.1),用 DNASTAR 软件分别设计 *ialB* 上下游同源臂扩增引物、*ialB* 基因缺失鉴定引物、携带自身启动子的 *ialB* 基因扩增引物和卡那霉素抗性基因扩增引物。引物序列见表 1。

1.3 布鲁氏菌 *ialB* 缺失株及其回补株的构建

以布鲁氏菌 S2 株基因组和 pEGFP-N1 为模板,分别扩增出 *ialB* 基因的上下游同源臂和卡那霉素抗性基因。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物经纯化回收后分别与 pMD19T 载体进行连接,获得相应重组质粒。将重组质粒和 pUC18 质粒用相应的限制性内切酶进行双酶切,分别获得 *ialB* 基因的上下游同源臂、卡那霉素抗性基因和 pUC18 质粒骨架。将上述酶切回收产物用 Ligation Mix 连接试剂盒进行连接,获得基因缺失质粒 pUC18-*ialB*。将 pUC18-*ialB* 电击转化布鲁氏菌 S2 株感受态细胞,经卡那霉素筛选、普通 PCR 鉴定、荧光定量 PCR 鉴定,最终得到布鲁氏菌 *ialB* 缺失株。

表 1 用于扩增相关基因的引物

Table 1 Primers used to amplify related genes

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction enzyme site	Product size (bp)
<i>ialB</i> -U	F: GCATGCATCCATCTTCACGCCAAAT R: GTCGACGAAAACCATGAAATCTCCAG	<i>Sph</i> I <i>Sal</i> I	1 060
<i>ialB</i> -D	F: ACTAGTTTCGACGCCCTCCCCTGATT R: GGTACCGTGGCGGCGACCTGCTGG	<i>Spe</i> I <i>Kpn</i> I	1 010
KanR	F: GTCGACTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA R: ACTAGTTTGGGCGTCGCTTGGTCGGT	<i>Sal</i> I <i>Spe</i> I	1 375
<i>ialB</i> -T	F: GAACCACAGCCGACCACATCC R: TGAATTCCGCATAGCAGCCATCT		328
pBBRori	F: AGGATGACGACGATAAGTGACAATTCGTTCAAGCCGAGAT R: AAACAAATAGGGGTTCGCGCTACCGGCGCGGCAGCGTGA		2 755
AmpR	F: TCACGCTGCCGCGCCGGTAGCGCGGAACCCCTATTTGTTT R: CCGCGCGCAAAAATGCCGCATTACCAATGCTTAATCAGTG		1 006
<i>ialB</i>	F: CACTGATTAAGCATTGGTAATGCGGCATTTTTCGCGCGCGG R: TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGGGGAGGGCGTCGAAGCCTT		952
<i>CΔialB</i> -T	F: TCACGCTGCCGCGCCGGTAGCGCGGAACCCCTATTTGTTT R: TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGGGGAGGGCGTCGAAGCCTT		1 918

以布鲁氏菌 S2 株基因组、pBBR1MCS-5 和 pET32a 为模板, 分别扩增 *ialB* 基因、pBBRori、氨苄霉素基因。纯化回收的 PCR 产物用重组克隆试剂盒 ClonExpress[®] MultiS (C113-02) 进行重组连接, 获得重组质粒 pBBR-AmpR-*ialB*, 然后电击转化布鲁氏菌 *ialB* 缺失株的感受态细胞, 经 PCR 鉴定和 Western blotting 鉴定后得到回补株。

1.4 生长曲线的测定

在胰酪大豆胨琼脂 (trypticase soy agar, TSA) 平板上分别挑取布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株的单个克隆, 接种在 5 mL TSB 培养基中, 37 °C 振荡培养至 600 nm 处吸光值 (optical density, OD) 约为 0.8; 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬菌沉淀后倍比稀释, 进行平板计数, 以确定菌液的浓度; 然后分别将 1×10^7 菌落形成单位 (colony forming units, CFU) 的布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株接种在盛有 100 mL TSB 的锥形瓶中, 37 °C 振荡培养, 每 8 h 吸取一次菌液, 测定 OD_{600} ,

直至数值几乎不再变化。以培养时间为横轴, OD_{600} 为纵轴, 绘制生长曲线。

1.5 细菌活性测定

将布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株的菌液分别离心, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, PBS 洗 3 次后, 将菌体用 PBS 调到相同 OD ($OD_{600} \approx 0.4$), 按每毫升菌液加入 10 μL 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液的比例对上述 3 株菌进行染色, 混合均匀后, 室温孵育 10 min。多功能酶标仪激发光波长设置为 536 nm, 发射波长设置为 617 nm, 测定上述 3 株菌的荧光密度值。

1.6 体外应激试验

体外应激试验包括酸应激、高渗应激、低渗应激、氧化应激和多粘菌素 B 应激等试验, 分别按照如下条件进行处理。

酸应激试验是将布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株用 pH 3.9 的 TSB 37 °C 条件下处理 30 min; 高渗应激试验是将上述 3 株菌用山梨醇和 NaCl 终浓度均为 1 mol/L 的高渗

溶液 37 °C 条件下处理 30 min; 低渗应激试验将上述 3 株菌计数后重悬在无菌水中, 37 °C 条件下处理 30 min; 氧化应激试验将上述 3 株菌分别用终浓度为 1、2、4 mmol/L 的 H_2O_2 37 °C 条件下处理 1 h; 多黏菌素 B 应激试验将上述 3 株菌分别用终浓度为 1 200、900、600、300、150、75、37.5、18.75 和 9.375 IU/mL 的多粘菌素 B 在 37 °C 条件下处理 30 min。对照组均为用 TSB 替代相应的处理溶液。进行相应的处理后, 稀释涂板计数, 计算相应处理的细菌存活率。

1.7 细菌聚集度测定

挑取布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株的单个克隆接种于盛有 5 mL TSB 的试管中培养至 $OD_{600} \approx 0.8$, 取试管中上部的菌液测定 OD_{600} , 记作 0 h_ OD_{600} 。将剩下的菌液于室温中静置 24 h 后, 取试管中上部的菌液测定 OD_{600} , 记作 24 h_ OD_{600} 。细菌聚集度表示为 $(0\text{ h}_OD_{600} - 24\text{ h}_OD_{600}) / 24\text{ h}_OD_{600} \times 100$ 。

1.8 扫描电镜观察细菌形态

将布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株在 TSB 中培养至 $OD_{600} \approx 0.6$, 取 3 mL 菌液 5 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 PBS 清洗沉淀, 每次 10 min, 洗 3 次后, 加入 2.5% 戊二醛, 混匀后, 4 °C 固定过夜。依次用 10%、30%、50%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液进行脱水操作, 每次脱水时间为 15–20 min; 用 100% 的乙醇脱水 2 次, 每次 30 min。最后用 500 μ L 100% 的乙醇重悬菌沉淀。吸取菌液 10 μ L 于盖玻片上, CO_2 干燥后, 粘到导电胶上, 喷金后即可上电镜观察。

1.9 极性延长相关基因 mRNA 水平表达检测

实时荧光定量 PCR 方法检测布鲁氏菌极性延长相关基因在 mRNA 水平的表达情况。将布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株在 TSB 中培养至 $OD_{600} \approx 0.8$, 取 5 mL 菌液 5 500 r/min 离

心 10 min, 弃上清; 加入 1 mL TRIzol, 反复吹打, 室温下裂解 5 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 混匀后室温静置 15 min, 4 °C、12 000 \times g 离心 15 min; 将上部水样层转移至新的 EP 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀后室温静置 10 min, 4 °C、12 000 \times g 离心 10 min, 弃上清; 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 室温干燥 5–10 min, 加入 20 μ L DEPC 水溶解总 RNA。使用 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II (AG11711) 获得 cDNA, 然后使用 ChamQ SYBR[®] qPCR Master Mix (Q311-02/03) 进行实时荧光定量 PCR, 以 16S RNA 作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

1.10 细菌黏附试验

稀释平板计数法检测细菌黏附细胞的能力。将 RAW264.7 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种在 24 孔板中, 用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h, 进行攻菌操作。操作步骤如下: (1) 用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液稀释布鲁氏菌 S2 株、布鲁氏菌 *ialB* 缺失株、回补株, 使感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 50; (2) 弃去培养细胞的上清液, 分别加入等体积的上述 3 株菌的菌液, 400 \times g 离心 10 min; (3) 37 °C、5% CO_2 的环境中孵育 30 min; (4) 弃去细胞培养液, 用杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) 洗 5 次, 加入 500 μ L 0.25% Triton X-100 裂解细胞, 最后进行稀释涂板计数。

免疫荧光法检测细菌黏附细胞的能力。在 24 孔板中放入细胞爬片, 将 RAW264.7 细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种在 24 孔板中, 攻菌操作如上所述, 在用 DPBS 洗 5 次后, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 5 次, 每次 5 min; 加入 1:100 稀释的山羊抗布鲁氏菌阳性血清, 每孔 200 μ L, 室温孵育 2–3 h; 回收一

抗, PBS 洗 5 次, 每次 5 min; 加入 1:500 稀释的驴抗山羊荧光二抗, 室温孵育 1.5–2 h, 此步骤及后续步骤都应避光操作; 回收二抗, PBS 洗 5 次, 每次 5 min; 每孔加入 200 μ L 的 DAPI, 室温孵育 15–20 min; 回收 DAPI, PBS 洗 5 次, 每次 5 min; 载玻片上滴加 10 μ L 抗荧光淬灭剂, 将爬片从 24 孔板中取出, 边缘用吸水纸吸去多余的水分, 轻轻放在有抗荧光淬灭剂的位置, 用指甲油进行封片, 在激光共聚焦显微镜下观察。

1.11 细菌入侵试验

细胞接种和攻菌操作如黏附试验, 但 MOI 为 500。攻菌后, 弃去细胞培养液, 用 DPBS 洗 3 次, 加入等体积的含 50 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的环境中孵育 1 h。用 DPBS 洗 3 次, 再换成含 25 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液维持培养。以攻菌时在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的环境中孵育 30 min 时为 0 h, 在其后的 1、2、3 h 用 DPBS 洗 3 次, 再用 0.25% Triton X-100 裂解细胞, 进行稀释涂板计数。

1.12 胞内增殖试验

稀释平板计数法检测胞内增殖。细胞接种和攻菌操作如黏附试验, 杀胞外菌和维持培养如入侵试验, 以攻菌时在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的环境中孵育 30 min 时为 0 h, 在其后的 3、6、12、24、48 h, 用 DPBS 洗 3 次, 再用 0.25% Triton X-100 裂解细胞, 进行稀释涂板计数。

免疫荧光法检测胞内增殖。按照稀释平板计数法检测胞内增殖来进行细胞接种、攻菌、杀胞外菌和维持培养等。以攻菌时在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的环境中孵育 30 min 时为 0 h, 在其后的 12、24、48 h 用 DPBS 洗 3 次后, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 后续操作如 1.11 所述。

1.13 数据统计分析

所有数据采用平均数 \pm 标准差(means \pm SD)

表示, 用 GraphPad Prism 8 统计学软件进行数据的差异显著性分析(*t* 检验法, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$)。

2 结果与分析

2.1 布鲁氏菌 *ialB* 缺失株及其回补株的构建

用 *ialB* 鉴定引物对布鲁氏菌 S2 株和布鲁氏菌 *ialB* 缺失候选菌株进行菌液 PCR 鉴定, 结果显示布鲁氏菌 S2 株可扩增出大小为 328 bp 的条带, 而布鲁氏菌 *ialB* 缺失候选菌株则未扩增出条带(图 1A)。荧光定量 PCR 检测布鲁氏菌 S2 株和布鲁氏菌 *ialB* 缺失候选菌株 *ialB* 基因的转录, 结果显示布鲁氏菌 *ialB* 缺失候选菌株的 *ialB* 基因低于可检范围, 表明缺失菌株构建成功, 命名为 Δ *ialB* (图 1B)。对候选回补株进行菌液 PCR 鉴定, 结果显示其可扩增出 1 918 bp 的条带, 大小符合预期(图 1C); 进一步进行 Western blotting 鉴定, 在 21 kDa 的地方出现条带, 大小符合预期, 表明回补菌株构建成功, 命名为 $C\Delta$ *ialB* (图 1D)。

2.2 生长曲线

布鲁氏菌 S2 株、 Δ *ialB*、 $C\Delta$ *ialB* 前期均生长较慢, 在 24 h 时进入对数生长期, 在 48 h 时生长速度变缓; 布鲁氏菌 S2 株在 64 h 时到达平台期, 而 Δ *ialB*、 $C\Delta$ *ialB* 在 96 h 时才缓慢到达平台期; 可以看到, 进入平台期后, 布鲁氏菌 S2 株的 OD_{600} 值最大, $C\Delta$ *ialB* 次之, Δ *ialB* 的 OD_{600} 值最小, 表明 *ialB* 基因缺失抑制了布鲁氏菌的生长活性(图 2)。

2.3 细菌活性检测

对等量具有相同 OD_{600} 的 3 种菌株分别进行 PI 染色, Δ *ialB* 的荧光密度显著高于布鲁氏菌 S2 株和 $C\Delta$ *ialB*。根据 PI 不能通过细胞膜完整的细胞的染色原理, 可推测 Δ *ialB* 的活力相比于布鲁氏菌 S2 株和 $C\Delta$ *ialB* 均有所降低(图 3)。

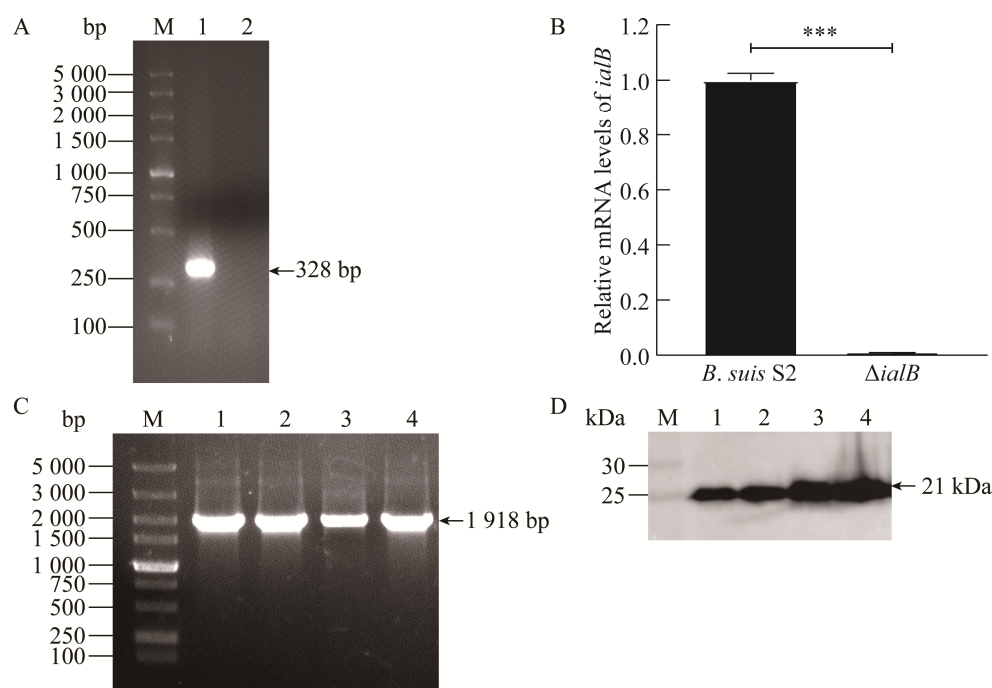


图 1 布鲁氏菌 *ialB* 缺失株及其回补株的构建

Figure 1 Construction of *Brucella suis* S2-derived *ialB* deletion strain and its complemented strain. A: Verification of *B. suis* S2-derived *ialB* deletion strain by PCR. M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: *B. suis* S2; Lane 2: Δ *ialB*. B: Verification of *B. suis* S2-derived *ialB* deletion strain by RT-qPCR. C: Verification of the complemented strains of Δ *ialB* by PCR. M: DL5000 DNA Marker; Lane 1–4: C Δ *ialB*. D: Verification of the complemented strains by Western blotting. M: Western protein Marker; Lane 1–4: C Δ *ialB*. ***: $P < 0.001$.

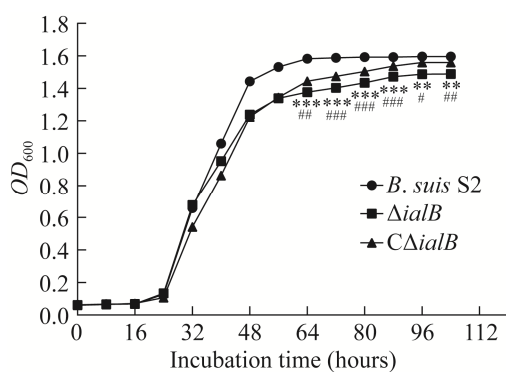


图 2 生长曲线

Figure 2 Growth curve of three strains. The three strains were inoculated at equal densities and the cultures were collected at specific times, then the OD_{600} of which was measured in a 96-well plate using a microplate reader. * represents the comparison of Δ *ialB* with *B. suis* S2, # represents the comparison of Δ *ialB* with C Δ *ialB*. #: $P < 0.05$; **/# #: $P < 0.01$; ***/###: $P < 0.001$.

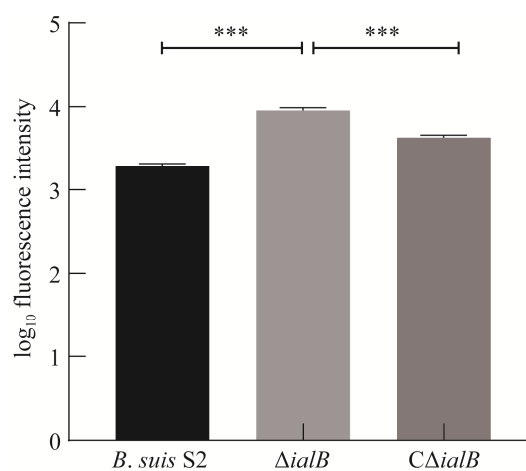


图 3 活力检测

Figure 3 Bacterial viability. The three strains were cultured to the exponential phase and adjusted to the same OD_{600} , then the samples were stained with PI and the fluorescence intensity of each sample was measured. ***: $P < 0.001$.

2.4 体外应激试验

在应对酸应激、高渗应激和低渗应激时, $\Delta ialB$ 的存活率均显著低于布鲁氏菌 S2 株和 $C\Delta ialB$ (图 4A–4C)。而在应对氧化应激时, $\Delta ialB$ 的存活率则显著高于布鲁氏菌 S2 株和 $C\Delta ialB$ (图 4D)。在用不同浓度的多黏菌素 B 对上述 3 种菌株进行处理时, 3 株菌的存活率均随着多黏菌素 B 浓度的上升而下降, 其中 $\Delta ialB$ 的存活率相较于布鲁氏菌 S2 株和 $C\Delta ialB$ 下降得更为显著。在多黏菌素 B 浓度为 1 200 IU 时, $\Delta ialB$ 的存活率几乎降为 0, 布鲁氏菌 S2 株的存活率降为 50% 左右, $C\Delta ialB$ 的存活率介于 $\Delta ialB$ 和布鲁氏菌 S2 株之间(图 4E)。该结果提示, $ialB$ 基因缺失影响了布鲁氏菌外膜的完

整性。

2.5 细菌聚集度

将培养至生长对数期的布鲁氏菌 S2 株、 $\Delta ialB$ 、 $C\Delta ialB$ 调整至相同的 OD_{600} , 此时(0 h) 3 种菌株的菌液均呈均匀浑浊状。在静置 24 h 后, 布鲁氏菌 S2 株的菌液浑浊度无显著变化, $\Delta ialB$ 上部液体相比于 0 h 较为澄清, 细菌沉降聚集在试管底部和中部, $C\Delta ialB$ 的状态介于布鲁氏菌 S2 株和 $\Delta ialB$ 之间(图 5A)。分别测量上述菌液静置前后上层的 OD_{600} , 计算 3 株菌的聚集度, 结果表明, $\Delta ialB$ 菌体的聚集度最大, 布鲁氏菌 S2 株菌体的聚集程度较小, $C\Delta ialB$ 介于二者之间(图 5B), 进一步确认了 $ialB$ 基因与布鲁氏菌外膜的完整性有关。

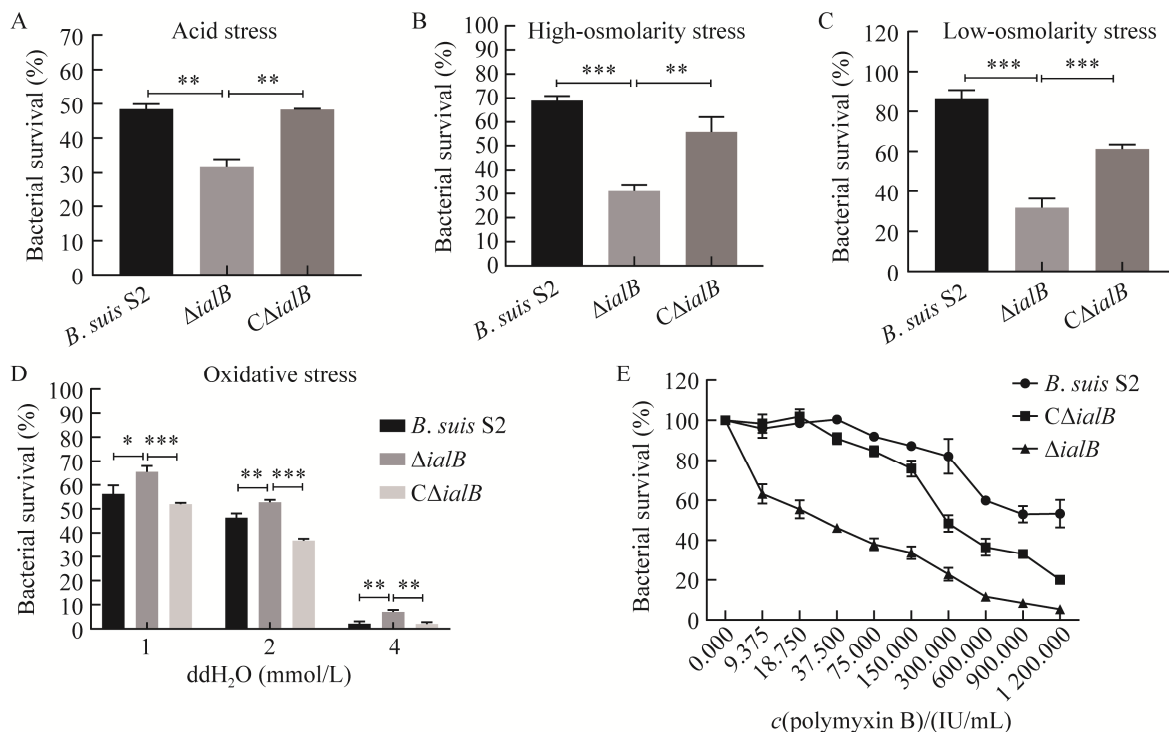


图 4 体外应激试验

Figure 4 *In vitro* stress assays. For stress assay, the bacterial samples were inoculated into TSB containing HCl (A), hypertonic water (B), and sterile ddH₂O (C) for 30 min and TSB containing H₂O₂ (D) for 1 h at 37 °C. For antibiotic resistance, bacterial samples were seeded into a 96-well microplate and treated with serially diluted polymyxin B (E) at 37 °C for 30 min. After treatment, samples were diluted 10-fold and plated onto TSA plates to determine the survival rate of each strain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

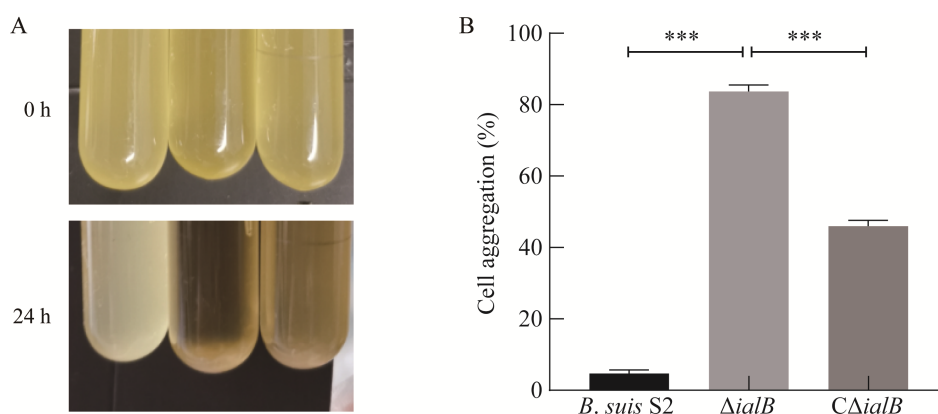


图 5 细菌聚集度测定

Figure 5 Determination of bacterial aggregation. A: The three strains were harvested at the exponential phase and left standing at room temperature for 24 h. B: The OD_{600} of 100 μ L of the culture obtained before and after standing was measured to quantify the bacterial aggregation. ***: $P < 0.001$.

2.6 扫描电镜结果

扫描电镜照片显示,布鲁氏菌 S2 株形态饱满,轮廓清晰,呈短杆状,表面分布有均匀的颗粒,折光性较好,可看到部分菌体正在进行分裂; Δ *ialB* 相较于布鲁氏菌 S2 株形态明显发生改变,表面皱缩,甚至有部分菌体已经破裂,表面颗粒物不清晰,整体变圆,亦有部分菌体大小超过布鲁氏菌 S2 株数倍,众多细菌堆积在一起,菌体轮廓不清晰,部分菌体呈针尖分裂,相当部分表面出现菜花样赘生物,折光性较差; $C\Delta$ *ialB* 菌体较布鲁氏菌 S2 株明显变得细长,相当多的菌体表面呈现针尖分裂(图 6A)。对上述 3 株菌的长度进行测量和统计分析,布鲁氏菌 S2 株的长度多集中在 0.6–0.9 μ m 范围内, Δ *ialB* 长度大部分在 0.5–0.7 μ m 范围内, $C\Delta$ *ialB* 的长度范围跨度较大,长度大小分布在 0.6–1.2 μ m 范围内(图 6B、6C)。该结果进一步表明, *IalB* 与布鲁氏菌的生长活性有关。

2.7 极性延长相关基因 mRNA 水平表达结果

实时荧光定量 PCR 检测细菌极性延长相关基因 *FtsZ*、*FtsA*、*PopZ*、*pbp-1A*、*ErfK 1*、*ErfK 4*

的 mRNA 水平表达。结果显示,布鲁氏菌 *ialB* 缺失株 *FtsA*、*PopZ* 的 mRNA 水平显著上调,*pbp-1A*、*ErfK 1*、*ErfK 4* 的 mRNA 水平显著下调,其中 *ErfK 1* 下调得最为显著(图 7)。该结果提示, *IalB* 可能与布鲁氏菌的极性生长有关。

2.8 黏附试验结果

由于 *ialB* 基因缺失影响了布鲁氏菌外膜的完整性,本文进一步检测了 3 种菌株对细胞的黏附能力。结果显示, Δ *ialB* 对 RAW264.7 细胞的黏附能力与布鲁氏菌 S2 株相比无显著变化,而 $C\Delta$ *ialB* 对 RAW264.7 细胞的黏附能力显著高于 Δ *ialB* (图 8)。

2.9 入侵试验结果

进一步的入侵试验结果显示, Δ *ialB* 入侵 RAW264.7 细胞的能力与布鲁氏菌 S2 株相比有一定程度提高,尤其在 2 h 时,二者差异显著,而 $C\Delta$ *ialB* 入侵 RAW264.7 细胞的能力相较于 Δ *ialB* 显著提升(图 9)。

2.10 胞内增殖试验结果

胞内增殖试验结果显示,在 12 h 之前布鲁氏菌 S2 株的胞内增殖能力不比 Δ *ialB* 和 $C\Delta$ *ialB* 强,甚至弱于 Δ *ialB* 和 $C\Delta$ *ialB*;但在 24 h 时,

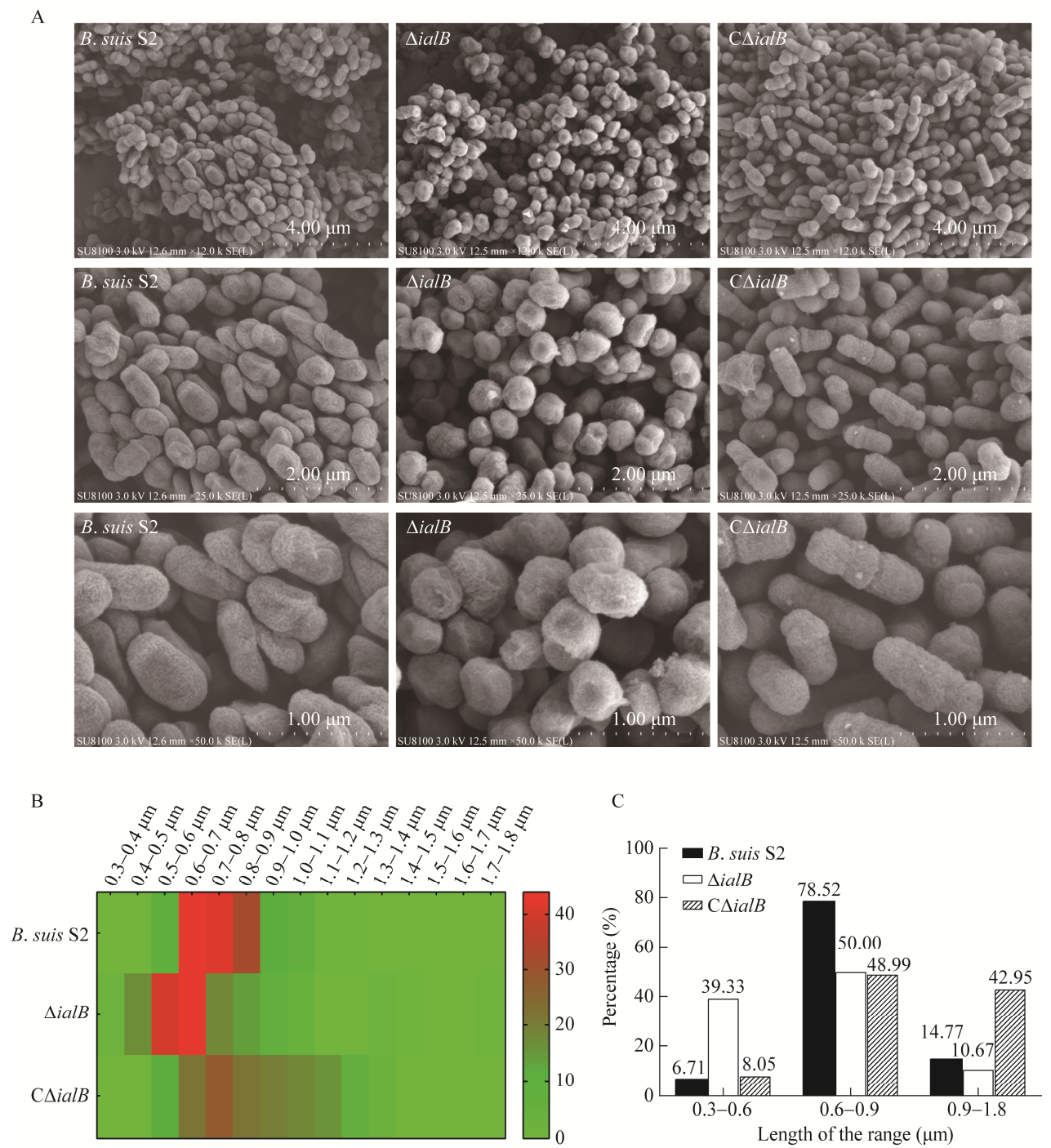


图 6 扫描电镜试验

Figure 6 Scanning electron microscopy test. A: The three *Brucella* strains were cultured to the exponential phase and fixed. After dehydrating, critical point drying, and gold coating, bacterial cells were imaged using a scanning electron microscope; Bar=4 μm in the up panel, bar=2 μm in the middle panel, bar=1 μm in the down panel. The length of bacterium from the up panel was measured and analyzed using ImageJ software, the data were displayed in heat map (B) and in histogram (C).

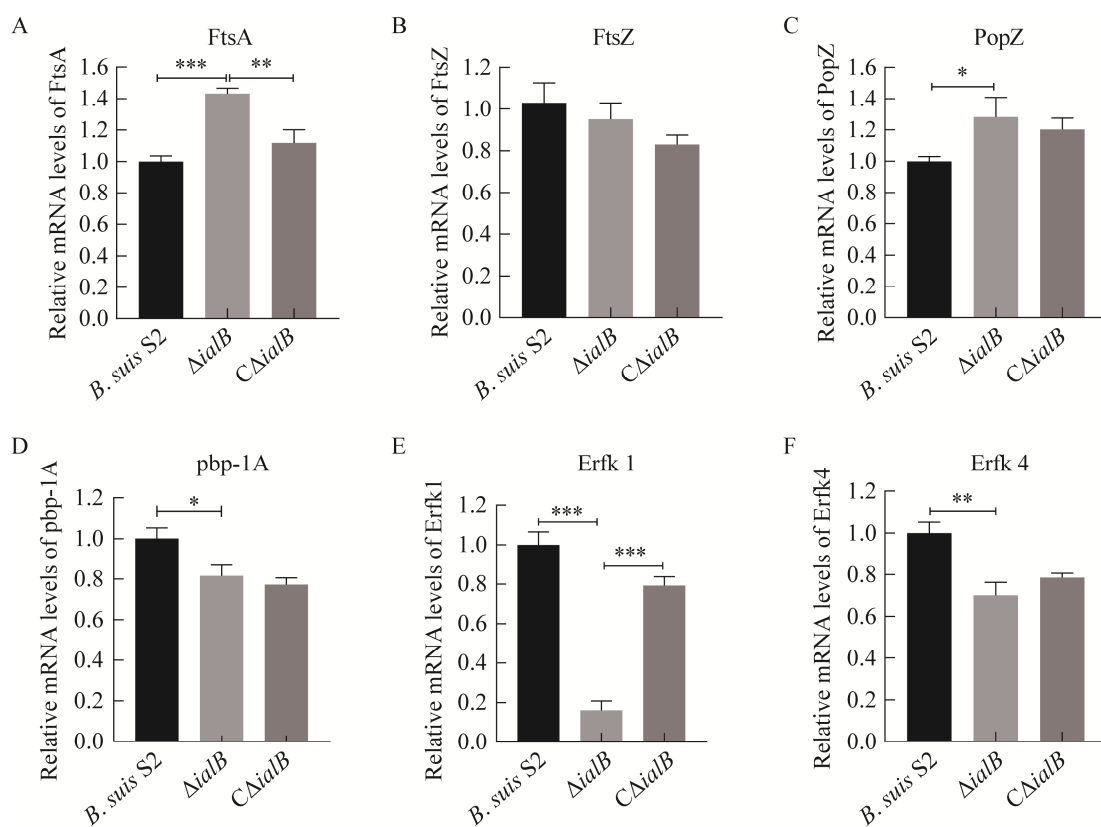


图 7 极性延长相关基因表达结果

Figure 7 mRNA levels of genes associated with bacteria polar elongation. The three *Brucella* strains were cultured to the exponential phase, then the total RNA was isolated and reverse-transcribed into cDNA and the qRT-PCR was then performed to detect the mRNA levels of *FtsA* (A), *FtsZ* (B), *PopZ* (C), *pbp-1A* (D), *Erfk 1* (E), and *Erfk 4* (F). The results for each target mRNA were normalized to 16S rRNA gene transcript levels and averaged. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

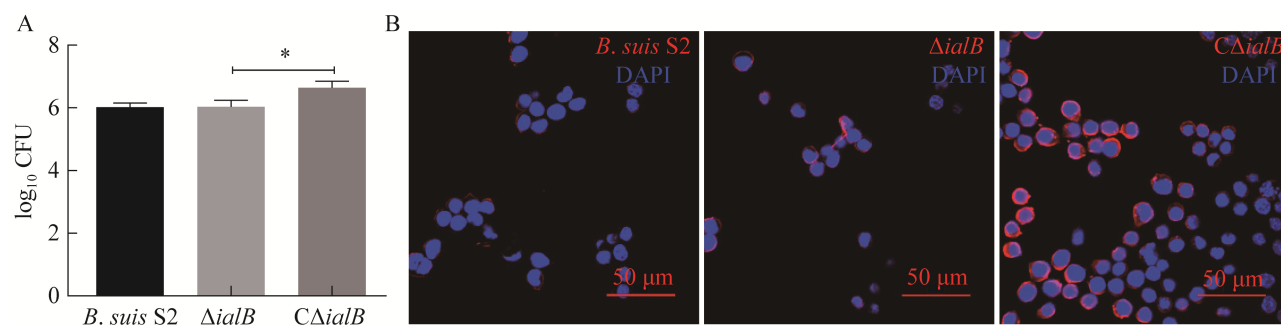


图 8 黏附试验结果

Figure 8 Bacterial adhesion assays. RAW264.7 cells were seeded into 24-well plates or on glass coverslips and infected with the three strains, respectively. A: Thirty minutes after infection, the cells were lysed, serially diluted, and plated onto TSA plates to determine the numbers of bacteria adhered to cells. B: The cells were fixed and immunofluorescence staining was performed with goat anti-*Brucella* serum, then confocal images were taken with a laser-scanning confocal microscope. *: $P < 0.05$.

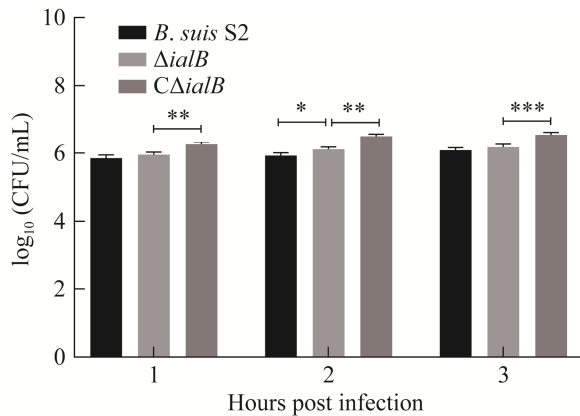


图9 入侵试验结果

Figure 9 Bacterial invasion assays. RAW264.7 cells were seeded into 24-well plates and were infected with the three strains, respectively. Thirty minutes after infection, the noninternalized bacteria were killed by 50 μ g/mL gentamycin and the cells were then incubated for specific times. At 1, 2, and 3 h post infection, the cells were lysed and serially diluted, then the lysates were plated onto TSA plates to determine the CFUs of intracellular bacteria. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

布鲁氏菌 S2 株的胞内增殖能力与 Δ *ialB* 和 *C* Δ *ialB* 相当; 48 h 时布鲁氏菌 S2 株的胞内增殖能力显著超过 Δ *ialB* 和 *C* Δ *ialB*, 而 *C* Δ *ialB* 在 48 h 时, 胞内增殖能力显著比 Δ *ialB* 强, Δ *ialB* 在 48 h 时胞内增殖突然下降(图 10A)。12、24、48 h 的免疫荧光结果与上述结果相符(图 10B)。

3 讨论

目前关于 *ialB* 基因的报道比较少, 有限的几篇研究也集中于讨论其对巴尔通体入侵红细胞的影响^[10-11]。和布鲁氏菌一样, 巴尔通体也能逃避宿主细胞的内存途径, 并在宿主细胞内建立核周生态位。*ialB* 是巴尔通体重要的致病因子, 是入侵红细胞的关键。*ialB* 与耶尔森菌编码 Ail 蛋白的基因具有相当的序列相似性, Ail 蛋白所属的 OMP 家族成员经常与黏附和入

侵宿主细胞有关^[5]。尽管 *ialB* 的同源基因在包括猪布鲁氏菌的根瘤菌目中是广泛保守的, 但其在猪布鲁氏菌中的功能尚不清楚。

布鲁氏菌是兼性胞内寄生菌, 其侵入宿主细胞后会面对酸应激、抗菌素防御、活性氧等多种胞内环境胁迫^[12]。在本研究中, Δ *ialB* 在面对酸应激和多黏菌素 B 应激时, 存活率相比于布鲁氏菌 S2 株和 *C* Δ *ialB* 显著下降, 特别是在用较低浓度的多黏菌素 B (9.375 IU/mL) 进行处理时, 布鲁氏菌 S2 株和 *C* Δ *ialB* 的存活率几乎为 100%, 而 Δ *ialB* 的存活率只有 60% 左右, 可见多黏菌素 B 对 Δ *ialB* 的影响极大。多黏菌素 B 常用来测定细菌外膜的稳定性, 因此推测 *ialB* 的缺失对布鲁氏菌 S2 株外膜的完整性产生了较大影响^[13]。而后, 又进行了高渗应激试验和低渗应激试验, 结果显示 Δ *ialB* 的存活率均显著下降, 进一步印证了其外膜的完整性被破坏, 从而无法调节细胞内外渗透压的平衡。在细菌和真菌细胞中, 胞外 H_2O_2 能够通过膜定位的水通道蛋白进入胞内, 进而使细胞遭受氧化应激^[14-17]。在本研究中, Δ *ialB* 在面对胞外 H_2O_2 刺激时的存活率显著高于布鲁氏菌 S2 株和 *C* Δ *ialB*, 其原因可能为 Δ *ialB* 外膜完整性的破坏抑制了细胞膜对胞外 H_2O_2 的通透性。

在本研究中, Δ *ialB* 形态相对于布鲁氏菌 S2 株发生了较大的改变。使用扫描电镜技术对布鲁氏菌 S2 株、 Δ *ialB* 以及 *C* Δ *ialB* 进行形态观察, 布鲁氏菌 S2 株的形态饱满, 轮廓清晰, 呈短杆状, 表面分布有均匀的颗粒, 折光性较好, Δ *ialB* 形态发生明显改变, 表面皱缩, 表面颗粒物不清晰, 整体变圆, 菌体轮廓不清晰, 部分菌体呈针尖分裂, 相当部分表面出现菜花样赘生物, 折光性较差。通过统计学分析, 相比于布鲁氏菌 S2 株, Δ *ialB* 菌体长度变短, 因此推测 Δ *ialB* 的菌体延长相关的基因表达受到了影

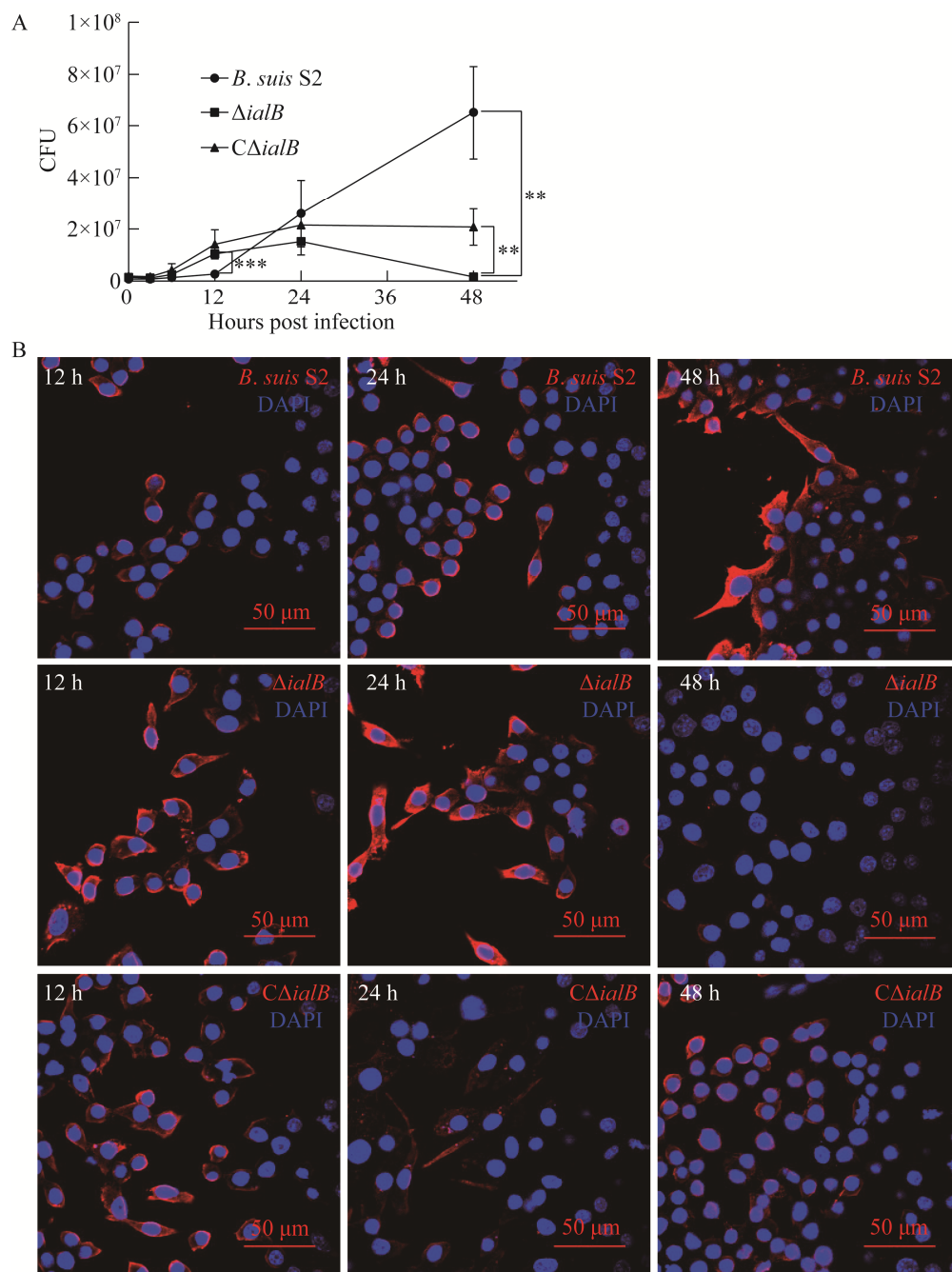


图 10 胞内增殖试验结果

Figure 10 Intracellular proliferation assays. RAW264.7 cells were seeded into 24-well plates or on glass coverslips and were infected with the three strains, respectively. Thirty minutes after infection, the noninternalized bacteria were killed by 50 μg/mL gentamycin and the cells were then incubated for specific times. A: At 12, 24, and 48 h post infection, the cells were lysed and serially diluted, then the lysates were plated onto TSA plates to determine the CFUs of intracellular bacteria. B: The cells were fixed and immunofluorescence staining was performed with goat anti-*Brucella* serum, then confocal images were taken with a laser-scanning confocal microscope. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

响。布鲁氏菌缺乏经典的延长体核心组分,其延长方式也有别于大肠杆菌等模式菌,生长延长方式为极性生长^[18-19]。现有的研究对阐明布鲁氏菌的菌体延长机制尚不清晰,因此选定了 *FtsZ*、*FtsA* 和 *pbp-1A* 等若干个菌体延长相关基因,检测其转录水平,发现大部分基因的表达有不同程度下调,其中 *ErfK 1* 表达下降最为明显。*ErfK 1* 与根瘤菌目 ATU0669 蛋白对应的基因遗传关系较近,表明 *ialB* 可能影响了布鲁氏菌的极性生长^[20]。

对比于 *ialB* 在巴尔通体中入侵细胞的能力,本研究检测了 $\Delta ialB$ 对 RAW264.7 细胞的黏附、入侵以及在 RAW264.7 细胞内的增殖能力。 $\Delta ialB$ 黏附和入侵 RAW264.7 细胞的能力并不比布鲁氏菌 S2 株弱,具体原因有待进一步试验分析。值得注意的是, $C\Delta ialB$ 黏附和入侵 RAW264.7 细胞的能力要显著强于布鲁氏菌 S2 株。 $\Delta ialB$ 和 $C\Delta ialB$ 胞内增殖能力在前期比布鲁氏菌 S2 株强,后期(48 h 时) $\Delta ialB$ 在 RAW264.7 细胞的细菌数量突然下降, $C\Delta ialB$ 维持 24 h 时的水平,布鲁氏菌 S2 株呈指数级上升。在本研究中, $C\Delta ialB$ 株 *ialB* 的转录水平比布鲁氏菌 S2 株要高,相当于 *ialB* 的过表达菌株,所以 *ialB* 的回补可能使布鲁氏菌的黏附和入侵 RAW264.7 细胞的能力都得到了增强, *ialB* 的缺失使 $\Delta ialB$ 无法在胞内持续存在。

本研究通过构建布鲁氏菌 S2 株 *ialB* 缺失株初步探讨了 $\Delta ialB$ 的生物学特性,发现 $\Delta ialB$ 活力降低,外膜完整性可能被破坏;其生长可能被抑制;在 RAW264.7 细胞内增殖能力降低。本研究为进一步揭示 *ialB* 在布鲁氏菌中的功能和对布鲁氏菌的致病作用提供了参考和方向,具有重要意义。

参考文献

- [1] de FIGUEIREDO P, FICHT TA, RICE-FICHT A, ROSSETTI CA, ADAMS LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis[J]. The American Journal of Pathology, 2015, 185(6): 1505-1517.
- [2] 刘春芳, 杨晓慧, 杨德文. 包头市重点职业人群布鲁氏菌病血清学检查结果及临床表现分析[J]. 中国职业医学, 2021, 48(1): 115-117.
LIU CF, YANG XH, YANG DW. Serological detection and clinical manifestations of brucellosis in the key occupational population in Baotou City[J]. China Occupational Medicine, 2021, 48(1): 115-117 (in Chinese).
- [3] KHURANA SK, SEHRAWAT A, TIWARI R, PRASAD M, GULATI B, SHABBIR MZ, CHHABRA R, KARTHIK K, PATEL SK, PATHAK M, et al. Bovine brucellosis-a comprehensive review[J]. The Veterinary Quarterly, 2021, 41(1): 61-88.
- [4] DENG HK, PANG QX, ZHAO BS, VAYSSIER-TAUSSAT M. Molecular mechanisms of *Bartonella* and mammalian erythrocyte interactions: a review[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 431.
- [5] COLEMAN SA, MINNICK MF. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*IalB*) protein in human erythrocyte parasitism[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(7): 4373-4381.
- [6] HARMS A, DEHIO C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp.[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2012, 25(1): 42-78.
- [7] MITCHELL SJ, MINNICK MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(4): 1552-1562.
- [8] COLEMAN SA, MINNICK MF. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues[J]. Microbial Pathogenesis, 2003, 34(4): 179-186.
- [9] TEIXEIRA-GOMES AP, CLOECKAERT A, ZYGMUNT MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(5): 2954-2961.
- [10] DENG HK, PANG QX, XIA HQ, le RHUN D, le NAOUR E, YANG CL, VAYSSIER-TAUSSAT M, ZHAO BS. Identification and functional analysis of invasion associated locus B (*IalB*) in *Bartonella* species[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 98: 171-177.
- [11] EICHER SC, DEHIO C. *Bartonella* entry mechanisms

- into mammalian host cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(8): 1166-1173.
- [12] ZAI XD, YANG QL, YIN Y, LI RH, QIAN MY, ZHAO TR, LI YH, ZHANG J, FU L, XU JJ, CHEN W. Relative quantitative proteomic analysis of *Brucella abortus* reveals metabolic adaptation to multiple environmental stresses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2347.
- [13] VERDIGUEL-FERNÁNDEZ L, OROPEZA-NAVARRO R, BASURTO-ALCÁNTARA FJ, CASTAÑEDA-RAMÍREZ A, VERDUGO-RODRÍGUEZ A. Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(7): 971-978.
- [14] HENZLER T, STEUDLE E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(353): 2053-2066.
- [15] SEEVER LC, IMLAY JA. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(24): 7182-7189.
- [16] BIENERT GP, MØLLER ALB, KRISTIANSEN KA, SCHULZ A, MØLLER IM, SCHJOERRING JK, JAHN TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 1183-1192.
- [17] LUSHCHAK VI. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 153(2): 175-190.
- [18] HOWELL M, BROWN PJ. Building the bacterial cell wall at the pole[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 34: 53-59.
- [19] ZUPAN JR, GRANGEON R, ROBALINO-ESPINOSA JS, GARNICA N, ZAMBRYSKI P. Growth pole ring protein forms a 200-nm-diameter ring structure essential for polar growth and rod shape in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(22): 10962-10967.
- [20] CAMERON TA, ANDERSON-FURGESON J, ZUPAN JR, ZIK JJ, ZAMBRYSKI PC. Peptidoglycan synthesis machinery in *Agrobacterium tumefaciens* during unipolar growth and cell division[J]. *mBio*, 2014, 5(3): e01219-e01214.