

# 胸膜肺炎放线杆菌 *apxIC* 基因插入失活突变株构建及免疫原性分析

徐福洲 史爱华 陈小玲 杨 兵 王金洛

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所 北京 100097)

**摘 要** 胸膜肺炎放线杆菌是引起猪传染性胸膜肺炎 (APP) 的呼吸道病原菌,其分泌的 Apx 毒素是最重要的毒力因子之一。为构建 APP 突变弱毒菌株,在 *apxIC* 基因下游 *XhoI* 酶切位点处插入氯霉素抗性基因 (Chl<sup>r</sup>) 制备转移载体,通过电转化导入 APP 血清 10 型参考菌株 (D13039) 进行同源重组,筛选获得 *apxIC* 基因插入突变菌株 D13039C<sup>Chl<sup>r</sup></sup>。该突变菌株特性鉴定结果表明其溶血活性完全丧失,可正常增殖和分泌 ApxI 毒素,连续 10 次传代后基因组中插入的 Chl<sup>r</sup> 基因可稳定遗传。利用 5 个剂量 ( $2 \times 10^8$  CFU ~  $2 \times 10^6$  CFU) 对每组 3 只小鼠腹腔攻毒结果显示突变菌株毒力较母源菌株降低至少 100 倍以上,将突变菌株作为弱毒活疫苗经滴鼻途径免疫仔猪后利用 APP 血清 1 型 (4074) 和血清 10 型 (D13039) 菌株攻毒进行免疫原性鉴定,结果显示血清 1 型攻毒后非免疫组 4 头仔猪全部死亡而免疫组 4 头中死亡 2 头,非免疫组肺损伤指数 (34.4) 显著高于免疫组 (17.5),血清 10 型攻毒后非免疫组肺损伤指数 (17.5) 也高于免疫组 (10.5),同时鼻拭子和肺组织样品的细菌重分离数及 PCR 检测阳性数非免疫组也明显高于免疫组,表明突变菌株作为弱毒活疫苗对仔猪具有一定的交叉免疫保护力。该突变菌株的构建为鉴定 ApxI 毒素活性及研制具有交叉保护活性的 APP 弱毒活疫苗奠定了基础。

**关键词** 胸膜肺炎放线杆菌; *apxIC* 基因; 突变

中图分类号 S852.61 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2007)05-0923-05

胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 为巴氏杆菌科的一种革兰氏阴性短杆菌,可引起以出血性、纤维素性和坏死性肺炎为特征的猪传染性胸膜肺炎,各种年龄猪对该菌均易感,尤其是 25 ~ 45 日龄仔猪感染后表现出较高的发病率和死亡率,给养猪业造成较大的经济损失<sup>[1,2]</sup>。由于 APP 至少有 15 个血清型<sup>[3]</sup>,目前使用的灭活疫苗对不同血清型的交叉保护较差,因而研究对不同血清型具有交叉保护活性的活疫苗对预防该病将具有重要意义<sup>[4]</sup>。

APP 感染动物后的毒力与多种因子有关,其中 Apx 毒素是最重要的毒力因子之一<sup>[5]</sup>。Apx 毒素为 RTX (Repeats in the structural toxin) 毒素家族的重要成员,根据溶血性和细胞毒性差异分为 4 种类型,即 Apx I、Apx II、Apx III 和 Apx IV,其中 Apx I 溶血性和细胞毒性最强,因而分泌 Apx I 毒素的血清型如 1、5、9、10、11 也是 APP 中毒力最强的血清型<sup>[5,6]</sup>。Apx 毒素操纵子具有 RTX 毒素的共同特征,即由 C、A、B、D 四个基因组成,其中 C 基因编码毒素激活蛋白, A 基因编码毒素结构蛋白, B 和 D 基因编码毒素分泌相关的蛋白<sup>[5]</sup>。研究发现 C 基因编码产物参与毒素蛋白的酰基化,是毒素发挥活性不可缺少的修饰过程<sup>[7]</sup>,因而将 C 基因失活可构建减毒突变菌株<sup>[8,9]</sup>。

由于 APP 血清 10 型仅分泌 ApxI 毒素<sup>[5]</sup>,利用 *apxC* 基因失活可致菌株毒力降低的原理,构建 APP 血清 10 型 *apxIC* 基因插入失活突变菌株,进而鉴定该突变菌株的生物学特性特别是对仔猪的免疫原性,为筛选具有交叉保护活性的 APP

基因工程减毒活疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细菌及培养条件** :APP 血清 10 型参考菌株 (D13039) 和血清 1 型参考菌株 (4074),由澳大利亚 Pat J Blackall 博士惠赠;胰酶大豆琼脂 (TSA) 和胰酶大豆肉汤 (TSB) 购自 BD Difco 公司,配制后添加 50 mg/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 用于培养 APP。

**1.1.2 质粒载体** :包含完整氯霉素抗性基因 (Chl<sup>r</sup>) 的质粒 pACYC184 由澳大利亚 PJ Blackall 博士惠赠; pGEM-T Easy Vector Kit 购自 Promega 公司, pUC19 由本实验室保存。

**1.1.3 抗体** :抗 ApxIA 表达蛋白单克隆抗体,由华中农业大学陈焕春教授惠赠; HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。

**1.1.4 实验动物** :Balb/C 小鼠,清洁级,购自军事医学科学院实验动物中心; APP 抗体检测阴性的 6 周龄断奶仔猪,购自京郊某养猪场。

### 1.2 转移载体的构建

参照 *apxI* 基因序列 (U05042) 设计 1 对引物自 APP 血清 10 型基因组 DNA 中扩增长度为 2.8 kb 的 *apxIC* 基因片段; 同时根据质粒 pACYC184 基因序列 (X06403) 设计 1 对引物用于扩增长度为 0.9 kb 的 Chl<sup>r</sup> 基因片段。以同样的转录方向将 Chl<sup>r</sup> 基因片段插入 *apxIC* 基因下游的 *XhoI* 酶切位点,克隆入 pUC19 载体中作为转移载体 (图 1)。

基金项目 北京市科技新星项目 (2004B23); 北京市自然科学基金项目 (5032007)

作者简介 徐福洲 (1973 - ) 男,山东单县人,副研究员,博士,研究方向为动物病原细菌学与免疫学。E-mail: fuzhoux@163.com

收稿日期 2007-02-12 接受日期 2007-04-25 修回日期 2007-6-25

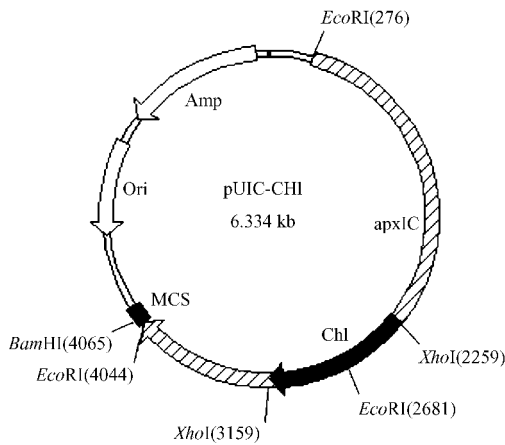


图1 构建的转移载体 pUIC-Chl

Fig.1 Schematic representation of the transfer plasmid pUIC-Chl.

### 1.3 突变菌株的筛选和鉴定

转移载体的质粒 DNA 经酶切线性化后利用电转化导入 APP 血清 10 型参考菌株 (D13039) 中发生同源重组, 在含氯霉素的 TSA 培养板上筛选获得具有氯霉素抗性的突变菌株, 进而利用 PCR 和 Southern blot 对突变菌株进行鉴定。

### 1.4 溶血活性

突变菌株和母源菌株分别于血琼脂平板上划线培养, 同时在接种物上面用表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 垂直划一条线, 37°C 培养后观察菌落的溶血性差异和生长的卫星现象。

### 1.5 生长曲线

挑取突变菌株和母源菌株单菌落分别接种 TSB 培养基, 37°C 振荡培养, 每隔 1h 测定菌液的  $OD_{600}$  吸光值, 绘制细菌生长曲线, 比较两者生长的差异。

### 1.6 Western blot

挑取突变菌株和母源菌株单菌落分别接种 TSB 培养基, 取 37°C 振荡过夜的培养物按 1:50 比例接种于新鲜 TSB 中, 继续振荡培养至  $OD_{600}$  达到 0.8, 培养菌液离心后收集上清液装入透析袋中进行吸水浓缩, 将浓缩液透析后作为提纯的 Apx I 毒素蛋白溶液。将提纯的毒素蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印至 PVDF 膜 (Millipore 产品) 上, 以抗 Apx I 毒素单克隆抗体为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗进行 Western blot 检测突变菌株 Apx I 毒素蛋白分泌情况。

### 1.7 遗传稳定性

将突变菌株培养物在 TSB 培养基中连续传至 10 代, 分别提取各代次的基因组 DNA, 利用 PCR 检测 *Chl*<sup>r</sup> 基因在细菌基因组中的遗传稳定性。

### 1.8 对小鼠的毒力

取 33 只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 随机分为 11 组, 每组 3 只。突变和母源菌株经 37°C 振荡过夜后取培养物按 1:50 接种于新鲜 TSB 中并振荡培养至  $OD_{600}$  达到 0.8, 此时活菌浓度约为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL。按照突变和母源菌株各 5 个剂量进行攻毒, 空白对照组注射 TSB 培养基, 每只腹腔注射 200  $\mu$ L, 观察各组小鼠死亡情况。

## 1.9 对仔猪的免疫保护力

将 20 头 6 周龄断奶仔猪随机平均分为 2 组 (免疫组和非免疫组), 分别饲养于封闭的实验动物舍中。取  $OD_{600}$  为 0.8 的突变菌株培养液 1 mL 经鼻腔接种免疫组中每头猪, 非免疫组以同样方法接种 1 mL TSB 培养基, 2 周后进行二免, 剂量增至 2 mL, 再过 2 周进行攻毒试验。APP 血清 1 型和血清 10 型参考菌株采用同样方法培养至  $OD_{600}$  为 0.8 作为攻毒用菌液。在免疫组和非免疫组中, 血清 1 型攻毒 4 头猪, 血清 10 型攻毒 4 头猪, 剩余 2 头猪作为不攻毒对照。攻毒后观察各组中每头猪的临床症状和死亡情况, 攻毒后 1 周麻醉处死存活猪, 对所有猪只剖检采样并计算肺损伤指数<sup>[10]</sup>, 对鼻腔拭子和肺组织样品进行 APP 重分离及 PCR 检测<sup>[11]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 突变菌株的鉴定

将转移载体 pUIC-Chl<sup>r</sup> 经电转化导入 APP 感受态细胞后, 于含氯霉素的 TSA 平板上培养筛选, 共获得 48 株具有氯霉素抗性的突变菌株, 进而在血琼脂平板上培养获得 2 株丧失溶血性的突变株, 进而利用 PCR 和 Southern blot 鉴定证实突变菌株基因组 DNA 中插入了 *Chl*<sup>r</sup> 基因。

### 2.2 溶血性

母源菌株和突变菌株在血琼脂平板上培养后生长均呈现典型的卫星现象, 即菌落仅在靠近表皮葡萄球菌划线处生长, 且越靠近葡萄球菌生长线处菌落越大, 溶血性比较显示母源菌株呈现强溶血的特性, 而突变菌株溶血活性已丧失 (图 2)。

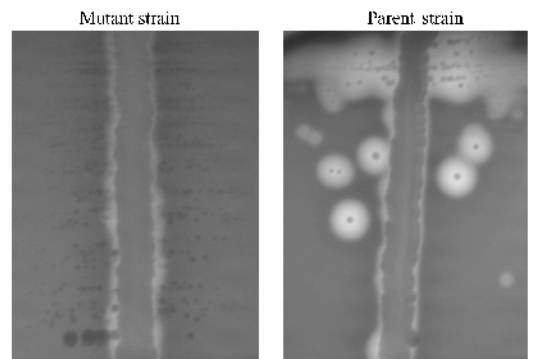


图2 突变菌株和母源菌株溶血性比较(中间垂直线为表皮葡萄球菌生长线)

Fig.2 Haemolysis of the mutant strain and the parent strain. *S. epidermidis* was vertically streaked as a line with *A. pleuropneumoniae* colonies growing on both sides of the line.

### 2.3 生长曲线

通过对突变菌株和母源菌株在测定时间内绘制的生长曲线显示两者在增殖能力方面没有显著差异 (图 3), 提示 *apxIC* 基因的插入突变不影响 APP 细菌的正常增殖。

### 2.4 Western blot

结果显示突变菌株和母源菌株培养上清液浓缩后进行蛋白电泳, 转印至 PVDF 膜上与 Apx I 单抗反应均出现约

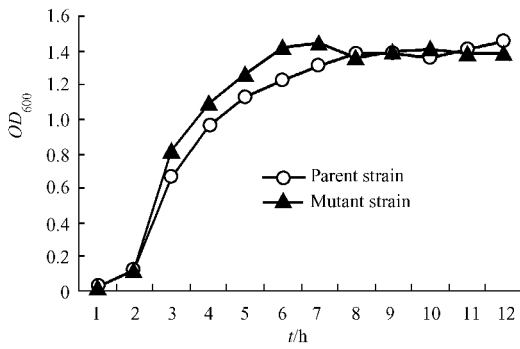


图3 突变菌株和母源菌株生长曲线的比较

Fig.3 Growth curves of the mutant strain and the parent strain.

110kDa的阳性条带,突变菌株条带较母源菌株条带稍弱(图4)提示 *apx I C* 基因插入突变不影响 *Apx I* 毒素的分泌,可能对毒素蛋白的表达水平有所影响。

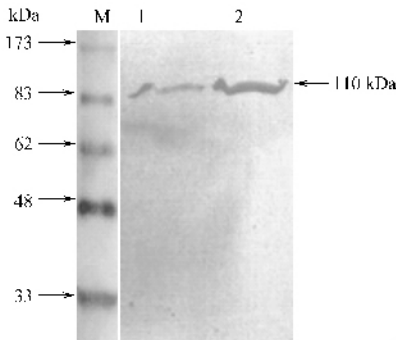


图4 突变菌株与母源菌株培养上清中 *ApxI* 毒素蛋白的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis on *ApxI* protein secreted by the mutant strain and the parent strain. M, prestained protein marker, broad range (NEB); lane 1, culture supernatant of the mutant strain; lane 2, culture supernatant of the parent strain.

## 2.5 遗传稳定性

PCR结果显示突变菌株连续传至10代,*ChI'*基因扩增结果均为阳性(图略),提示 *ChI'*基因在突变株基因组中可稳

定遗传。

## 2.6 对小鼠的毒力

结果显示突变菌株仅  $2 \times 10^8$  CFU 剂量组1只小鼠死亡,其余小鼠在攻毒后的短时间内出现不同程度的精神沉郁,几小时后均恢复正常;母源菌株仅  $2 \times 10^6$  CFU 剂量组存活1只小鼠,其余小鼠于攻毒后2 h内全部死亡(表1)。提示突变菌株毒力较母源菌株降低至少100倍以上。

表1 不同剂量突变菌株和母源菌株攻毒后小鼠存活数比较

Strain	No. of surviving mice given the indicated challenge dose (CFU)						
	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
Mutant	2 <sup>a</sup>	3	3	3	3	ND <sup>b</sup>	ND
Parent	ND	ND	0	0	0	0	1

<sup>a</sup> All treatment groups consisted of 3 mice; <sup>b</sup> Not done.

## 2.7 对仔猪的免疫保护力

在APP血清1型攻毒猪中,4头非免疫猪均出现严重的呼吸困难等症状,并在攻毒后24~96 h内相继死亡,早期死亡猪以胸腔和肺脏的急性出血为特征,而96 h前后死亡猪纤维素性渗出比较严重,肺脏与胸腔大面积粘连;4头免疫猪中有2头在攻毒后约96 h死亡,同样出现较严重的纤维素性渗出和粘连现象,另2头猪出现短时间的呼吸急促症状,耐过后表现正常,剖检可见个别局灶性坏死。在APP血清10型攻毒猪中,免疫猪及非免疫猪均未出现死亡,可能与菌株毒力及攻毒剂量等相关,但非免疫猪攻毒后的临床症状、病理变化较免疫猪明显严重。免疫和非免疫的对照猪在整个试验过程中表现正常,未出现临床可见的症状,剖检后也未见肺脏的病理损伤。细菌重分离和PCR检测结果显示非免疫猪较免疫猪的检出阳性数稍高,但由于试验猪只较少,尚不具有统计学意义(表2)。结果提示突变菌株作为弱毒活疫苗免疫仔猪后对不同血清型攻毒可提供一定的交叉保护效果。

表2 突变菌株免疫仔猪后对APP不同血清型菌株攻毒的保护效果

Table 2 Results of homologous and heterologous challenge of pigs previously vaccinated with a mutant strain of *A. pleuropneumoniae*

Challenge serovar	Treatment	No. of pigs	No. of dead	Mean lung lesion score <sup>a</sup>	No. positive of isolation		No. positive by PCR	
					Nasal swab	Lung sample	Nasal swab	Lung sample
1	Vaccinated	4	2	17.5 ± 5.8	2	2	2	4
	Unvaccinated	4	4	34.4 ± 1.3	4	4	4	4
10	Vaccinated	4	0	10.5 ± 3.2	0	1	0	3
	Unvaccinated	4	0	17.5 ± 7.9	0	2	1	4
Control	Vaccinated	2	0	0	0	0	0	0
	Unvaccinated	2	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Mean lung lesion score was determined as described by Hannan et al (1982).

## 3 讨论

APP灭活疫苗在临床实践中证实可有效预防APP感染,但研究发现灭活疫苗对同种血清型具有较好的保护力,而对

不同血清型的交叉保护活性较差<sup>[1,2]</sup>,使其广泛应用受到了限制。野外临床发现猪感染APP任何一种血清型后可产生抵抗不同血清型菌株感染的能力<sup>[8]</sup>,为研制具有交叉保护活性的APP活疫苗提供了重要依据。目前国内外均已开展了基因工程减毒突变菌株的研究<sup>[8,9,12-16]</sup>,构建的突变菌株毒

力大大降低,同时具有一定的交叉保护活性,为研制 APP 基因工程减毒活疫苗奠定了坚实的基础。

目前鉴定的几种 Apx 毒素中, Apx I 具有最强的溶血活性和细胞毒性,是 APP 最主要的毒力因子<sup>[5]</sup>,因而 Apx I 毒素失活后将会大大降低 APP 的毒力。研究发现在编码 Apx 毒素的基因中, *apxA* 毒素结构蛋白基因编码后必须经 *apxC* 基因产物的酰基化作用才能发挥毒素活性<sup>[7]</sup>,因而 *apxC* 基因产物在 Apx 毒素激活过程中具有重要作用。通过基因工程手段使 *apxC* 基因失活将会降低 Apx 的毒力同时不影响 ApxA 毒素蛋白的表达和分泌,保留其较强的免疫原性,此研究思路已在 Apx II 毒素失活研究中被证实切实可行<sup>[8,9]</sup>。鉴于 Apx I 毒素的溶血活性、细胞毒性和免疫原性等生物学活性均强于 Apx II 毒素,研究还发现中和 Apx I 毒素的抗血清同时可中和 Apx II 毒素,反之却不成<sup>[17]</sup>,因而构建 *apx I C* 基因插入失活突变株有可能获得更好的免疫原性和交叉保护力。

利用氯霉素抗性基因等抗生素抗性基因作为筛选突变菌株的标记基因具有操作简单、易于筛选等优点,成为构建突变菌株进而鉴定靶基因生物学活性的首选基因,但此类标记基因具有明显的生物安全风险,在生产中被严禁使用,因此目前在一些研究中已采用无抗性标记基因如营养缺陷型基因<sup>[9]</sup>等作为标记基因,通过与反向插入的抗生素抗性基因联合构建双向筛选系统来筛选突变菌株,为研制可用于生产的细菌减毒活疫苗奠定了基础。

本试验利用仅分泌 Apx I 毒素的 APP 血清 10 型菌株作为突变的目标菌株,通过在 *apxIC* 基因下游插入氯霉素抗性基因构建基因失活突变菌株,生物学特性显示突变菌株溶血活性丧失,毒力大大降低,免疫仔猪后显示出一定的交叉保护活性,但由于本试验所用仔猪数目较少,获得的数据多数无法进行统计学分析,而且某些评价指标尚未标准化或得到国际普遍认可,这也为突变菌株免疫原性的鉴定和评价带来困难,尽管如此,本试验构建的突变菌株仍为研制具有交叉保护活性的基因工程减毒活疫苗奠定了基础。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Nicolet J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman AD, Straw B, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ (Eds). Diseases of swine. Ames, Iowa State University Press, 1992, pp. 401-408.

[ 2 ] Bosse J, Janson H, Sheehan B, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 2002, **4**: 225-235.

[ 3 ] Blackall PJ, Klaasen HL, Bosch H, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*, 2002, **84**(1-2): 47-52.

[ 4 ] Haesebrouck F, Van de Kerkhof A, Dom P, et al. Cross-protection

between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. *Vet Microbiol*, 1996, **52**(3-4): 277-284.

- [ 5 ] Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol*, 1995, **3**(7): 257-261.
- [ 6 ] Schallera A, Djordjevic SP, Eamensb GJ, et al. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet Microbiol*, 2001, **79**: 47-62.
- [ 7 ] Lally ET, Hill RB, Kieba IR, et al. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, 1999, **7**: 356-361.
- [ 8 ] Prideaux C, Lenghaus C, Krywult J, et al. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect Immun*, 1999, **67**(4): 1962-1966.
- [ 9 ] Bei W, He Q, Yan L, et al. Construction and characterization of a live, attenuated apxIIA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **243**: 21-27.
- [ 10 ] Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP, et al. Tylosin tartrate and tiamulin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res Vet Sci*, 1982, **33**: 76-88.
- [ 11 ] Chiers K, Overbeke IV, Donne E, et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. *Vet Microbiol*, 2001, **83**: 147-159.
- [ 12 ] Fuzhou X, Xiaoling C, Aihua S, et al. Characterisation and immunogenicity of an *apxA* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*, 2006, **118**(3-4): 230-239.
- [ 13 ] Tonpitak W, Baltés N, Hennig-Pauka I, et al. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**: 7120-7125.
- [ 14 ] Garside L, Collins M, Langford P, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined *aroA* mutation is fully avirulent in the pig. *Res Vet Sci*, 2002, **72**: 163-167.
- [ 15 ] Ingham A, Zhang Y, Prideaux C. Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of *aroQ*. *Vet Microbiol*, 2002, **84**: 263-273.
- [ 16 ] Fuller T, Thacker B, Duran C, et al. A genetically defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine*, 2000, **18**: 2867-2877.
- [ 17 ] Prideaux C, Pierce L, Krywult J, et al. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol*, 1998, **37**: 324-332.

## Construction and immunogenicity of an attenuated mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by insertional inactivation of *apxIC*

XU Fu-zhou<sup>\*</sup>, SHI Ai-hua, CHEN Xiao-ling, YANG Bing, WANG Jin-luo

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract** : *Actinobacillus pleuropneumoniae* is the aetiological agent of porcine pleuropneumonia. Apx toxin, an exotoxin secreted by *A. pleuropneumoniae*, is one of the most important virulence factors. To construct an avirulent mutant strain by inactivation of ApxI toxin, the *apxIC* gene of *A. pleuropneumoniae* serovar 10 was inactivated by inserting a chloramphenicol resistance gene cassette into the downstream *Xho*I site of the *apxIC* gene for constructing the transfer plasmid. The transfer plasmid was introduced into the electrocompetent *A. pleuropneumoniae* serovar 10 for homologous recombination by electroporation. The mutant strain was obtained and identified by PCR and Southern blotting. The mutant strain was phenotypically identical to the parent strain except that it showed no haemolytic activity. The mutant strain was also able to secrete the same ApxI toxin as the parent strain. In the intra-peritoneal mouse model, the virulence of the mutant strain decreased at least 100 fold compared with the parent strain. The mutant was evaluated as a potential vaccine using a vaccination-challenge trial in which pigs were given two intra-nasal doses of the mutant with 14 days' interval and then challenged 14 days after the last vaccination with *A. pleuropneumoniae* serovar 1 and serovar 10 reference strains respectively. The death number and lung lesion score in the vaccinated pigs given the serovar 1 challenge were obviously lower than those in the unvaccinated pigs. And the lower lung lesion score was also observed in the vaccinated pigs challenged with serovar 10. And the positive numbers of *A. pleuropneumoniae* re-isolation and PCR detection showed the same consistency. The vaccination-challenge trial suggested that the mutant strain could offer partial cross-protection as a live attenuated vaccine against *A. pleuropneumoniae* infection.

**Keywords** : *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *apxIC* gene; mutant

Foundation item : Beijing Nova of Science and Technology (2004B23); Natural Science Foundation of Beijing (5032007)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel : 86-10-51503364; Fax : 86-10-51503361; E-mail : fuzhouxu@163.com

Received : 12 February 2007/Accepted : 25 April 2007/Revised : 25 June 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>