

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(1):66-73; 4 January 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

禽多杀性巴氏杆菌 C48-3 株 *ompH* 基因敲除突变株的构建及其生物学功能

吾鲁木汗·那孜尔别克¹, 张宇凤¹, 龚凤娟¹, 泽田拓士², 恩特马克·布拉提白^{1*}

¹吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000

²日本兽医生命科学大学兽医学部兽医微生物学实验室, 东京 180-8602

摘要: 【目的】探讨 *ompH* 基因在禽多杀性巴氏杆菌致病过程中的作用。【方法】利用同源重组原理构建中间为四环素抗性基因, 两侧为 *ompH* 基因上下游同源序列同源的敲除载体 pWSK29 Δ *ompH*, 将敲除载体电击转入 C48-3 株感受态细胞中, 通过四环素抗性和菌落 PCR 筛选 *ompH* 基因的敲除突变株, 并通过组合 PCR、逆转录 PCR 和 DNA 测序对突变株进行验证。用生物学功能实验比较野生株、互补株和突变株在生长速率、荚膜结构、粘着能力和致病性等方面的差异。【结果】组合 PCR、逆转录 PCR 和 DNA 测序结果证实 *ompH* 基因的敲除突变株 C48-3 Δ *ompH* 构建成功, 电镜观察结果证实 *ompH* 基因的缺陷影响细菌的荚膜合成能力, 粘附实验结果显示与野生株 C48-3 和互补株 C48-3C 相比突变株 C48-3 Δ *ompH* 对 CEF 细胞的粘附能力显著降低 ($P < 0.01$), 而小鼠毒力实验结果表明突变株 C48-3 Δ *ompH* 的致病性相对减弱。【结论】本实验构建的突变株 C48-3 Δ *ompH*, 为进一步研究多杀性巴氏杆菌的致病机理奠定基础。

关键词: 禽多杀性巴氏杆菌, *ompH* 基因, 敲除突变, 粘附, 致病性

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 01-0066-08

禽霍乱是由血清型 A:1、A:3 或 A:4 多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, 以下简称巴氏杆菌) 引起的家禽和野生鸟类的一种接触性传染病, 对养禽业造成严重的经济损失^[1-2]。目前, 预防禽霍乱的主要措施是接种禽巴氏杆菌的灭活疫苗和活菌疫苗。研究表明, 用强毒株研制的灭活疫苗只对同源菌株的感染具有保护作用, 而用弱毒株研制的活菌疫苗虽对同源菌株和异源菌株的感染具有一定的交叉保护作用, 但易出现毒力返强的现象^[3-4]。

因此, 研究禽巴氏杆菌菌体表面蛋白的免疫功能及其致病机理, 为研制安全有效禽霍乱亚单位疫苗提供新的线索。

Borrathybay 等^[5-6]的研究表明, 血清型 A 禽巴氏杆菌的荚膜厚度与 39 kDa 蛋白的表达量直接相关, 而抗 39 kDa 蛋白抗体抑制了细菌对鸡胚成纤维 (chicken embryo fibroblast, CEF) 细胞的粘附。Ali 等^[7]用单克隆抗体经免疫电镜技术观察 39 kDa 蛋白在细菌细胞中的位置, 结果显示 39 kDa 蛋白的单

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972206); 湖南省研究生科研创新基金项目 (CX2011B397)

* 通信作者。Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-8565323; E-mail: etmkb@jssu.edu.cn

作者简介: 吾鲁木汗·那孜尔别克 (1961-), 女 (哈萨克族), 新疆托里县人, 教授, 博士, 从事畜禽病原细菌致病机理研究。E-mail: ulum@jssu.edu.cn

收稿日期: 2012-08-28; 修回日期: 2012-10-30

克隆抗体只能与强毒株 P-1059 细胞壁表面的荚膜层结合, 所以, 他们认为 39 kDa 蛋白是荚膜蛋白 (39 kDa capsular protein, Cp39)。Borrathybay 等^[8] 用特异性抗体从血清型 A:3 禽巴氏杆菌 P-1059 株的表达型基因组文库中克隆出编码 Cp39 蛋白的基因片段, 表达及纯化重组蛋白 rCp39, 同时对血清型 A:1 禽巴氏杆菌 X-73 的 *ompH* 基因进行表达和纯化, 并用天然 Cp39 蛋白抗体、rCp39 蛋白抗体和 rOmpH 蛋白抗体检测 Cp39 蛋白和 OmpH 蛋白的粘附作用, DNA 测序结果表明 *cp39* 基因和 *ompH* 基因片段大小均为 1062 bp, 它们核苷酸序列的同源性为 99.9%, 而天然 Cp39 蛋白抗体、rCp39 蛋白抗体和 rOmpH 蛋白抗体都能抑制了 P-1059 株和 X-73 株对 CEF 细胞的粘附。Sthitmatee 等^[9] 以 SPF 鸡为动物模型比较 rCp39 蛋白和 rOmpH 蛋白的保护作用, 结果显示 rCp39 蛋白免疫组鸡对 P-1059 株和 X-73 株攻毒的保护率分别为 100% 和 80%, 而 rOmpH 蛋白免疫组鸡对 P-1059 株和 X-73 株攻毒的保护率均为 100%。恩特马克等^[10] 通过免疫保护试验比较血清型 A:1 禽巴氏杆菌 C48-3 株 Cp39 蛋白和 rCp39 蛋白的保护作用, 结果显示 Cp39 蛋白免疫组小鼠和 rCp39 蛋白免疫组小鼠对同源菌株 C48-3 和血清型 A:3 异源菌株 C51-3 的保护率分别为 100% 和 80%。后来 Sthitmatee 等^[11] 用 RNA 干扰技术构建 P-1059 株 *cp39* 基因的沉默突变株 PBA322 并检测其对 SPF 鸡的毒力, 结果表明突变株 PBA322 的荚膜合成能力及其对 SPF 鸡的毒力基本丧失。上述研究结果证明, Cp39 蛋白是具有粘附作用和交叉保护作用的外膜蛋白 OmpH, 可以作为禽霍乱的亚单位疫苗。但是 OmpH 蛋白在禽巴氏杆菌对宿主的感染和致病过程中的作用尚未清楚。所以, 本研究以 C48-3 株为对象, 采用同源重组的方法构建了 *ompH* 基因的敲除突变株, 探讨 OmpH 蛋白的致病性及其与荚膜的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和实验动物: 血清型 A:1 禽巴氏杆菌 C48-3 株 (CVCC458) 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心; *E. coli* DH5 α , 质粒 pBR322 和

pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司; Wang 和 Kushner^[12] 构建的多功能低拷贝质粒 pWSK29 由军事医学科学院微生物流行病学研究所秦鄂德教授惠赠; Homchampa 等^[13] 构建的大肠杆菌-巴氏杆菌穿梭质粒 pPBA1101 由澳大利亚莫纳什大学微生物系 Ben Adler 教授惠赠; SPF 级 BALB/c 小鼠, 雌性, 5 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; SPF 级鸡种蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器: DNA 限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 及质粒 DNA 抽提试剂盒均为大连 TaKaRa 公司产品; RNA prep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒和 Quantscript RT 试剂盒购自北京天根生化科技公司; 蛋白裂解抽提试剂盒为上海捷瑞生物公司产品; 透明质酸酶为 Worthington 公司产品; Tryptose Broth (TB) 和 Dextrose Starch Agar (DSA) 均为 Difco 公司产品; 抗天然 Cp39 蛋白抗体^[10] 为本实验室保存。Gene Pulser XcellTM 型电穿孔仪及电转杯为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 敲除载体的构建

1.2.1 *ompH* 基因及其上下游同源序列的克隆和测序: 根据禽巴氏杆菌 Pm70 株 *ompH* 基因的上下游序列设计引物 P-1 和 P-2, 引物序列见表 1。以 C48-3 株基因组 DNA 为模板, 用引物 P-1/P-2 经 PCR 扩增出大小约为 3.2 kb 的 DNA 片段, 回收 DNA 片段并连接于 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养, 挑取阳性克隆菌落, PCR 鉴定阳性的克隆由大连 TaKaRa 公司测序。DNA 测序结果表明, 被克隆的 DNA 片段大小为 3185 bp, 含有 1062 bp 的 *ompH* 基因全序列和 1005 bp 和 1118 bp 的 *ompH* 基因上下游同源序列, 与已报道 P-1059 株 *cp39* 基因序列 (EF203903) 和 X-73 株 *ompH* 基因序列 (U50907) 的同源性分别为 100% 和 99.9%。C48-3 株 *ompH* 基因及其上下游片段核苷酸序列的 GenBank 登录号为 JX471070。

1.2.2 引物设计与合成: 根据已测的 C48-3 株 *ompH* 基因及其上下游同源序列, pBR322 序列以及 pWSK29 和 pPBA1101 的多克隆位点, 设计 5 对引物, 引物序列及克隆位置见表 1。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences used in this study

| Primer | Sequence (5' → 3') | Restriction site | Position in sequence |
|--------|------------------------------------|------------------|------------------------------|
| P-1 | AAATCCCTAATAAACGATACAG | | 456466-456487 ^a |
| P-2 | TAAATAAGTG ACCACATTTTAA | | 459632-45459610 ^a |
| L-1 | CGCTCTAGAAAATCCCTAATAAACGATACAG | <i>Xba</i> I | 1-22 ^b |
| L-2 | CGCCTGCAGAGTATCACTACTACCTTGTTTTTGG | <i>Pst</i> I | 1005-984 ^b |
| R-1 | CGCCTCGAGTTTTTGTGTAATCTGAAAAAAG | <i>Xho</i> I | 2068-2090 ^b |
| R-2 | CGCGGTACCCTAAATAAGTGACCACATTTTAA | <i>Kpn</i> I | 3185-3163 ^b |
| IN-1 | CAACAGTTTACAATCAAGACG | | 1067-1087 ^b |
| IN-2 | AGTCTTTCTCTACCCCAAG | | 2008-1988 ^b |
| OmpH-1 | CGCTCTAGAAATGAAAAAGACAATCGTAGC | <i>Xba</i> I | 1006-1025 ^b |
| OmpH-2 | CGCGAGCTCTTAGAAGTGTACGCGTAAAC | <i>Sac</i> I | 2067-2048 ^b |
| Tet-1 | CGCCTGCAGATGAAATCTAACAATGCGC | <i>Pst</i> I | 86-104 ^c |
| Tet-2 | CGCCTCGAGTCAGGTCGAGGTGGCC | <i>Xho</i> I | 1276-1261 ^c |

^a Position relative to the sequence deposited in GenBank (AE004439); ^b Position relative to the sequence deposited in GenBank (JX471070); ^c Position relative to the sequence deposited in GenBank (J01749); The underlined showed that the restriction sites.

1.2.3 敲除载体的构建:首先,以 pBR322 质粒为模板,用引物 Tet-1/Tet-2 扩增出 1191 bp 的四环素抗性(Tet^r)基因(图 1-A),将其克隆到低拷贝质粒 pWSK29 的 *Pst* I 和 *Xho* I 多克隆位点上,构建重组质粒 pWSK29-Tet^r;然后分别用引物对 L-1/L-2 和 R-1/R-2 经 PCR 从 C48-3 株基因组 DNA 中扩增 *ompH* 基因的上游同源序列 LA(约 1 kb)和下游同源序列 RA(约 1.1 kb)(图 1-A)。在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下,将片段 LA 和片段 RA 依次克隆到重组质粒 pWSK29-Tet^r的 *Xba* I、*Pst* I、*Xho* I 和 *Kpn* I 4 个多克隆位点上,构建一个 Tet^r 基因两侧具有与 *ompH* 基因上下游同源序列同源的敲除载体 pWSK29Δ*ompH*(图 1-B)。

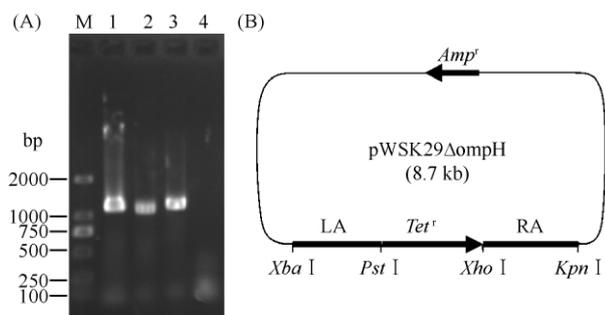


图 1 *ompH* 基因及其上下游同源序列的 PCR 扩增(A)和敲除载体 pWSK29Δ*ompH* 的构建(B)

Fig. 1 PCR amplification of the *ompH* gene and its flanking regions (A) and Construction of knock-out vector pWSK29Δ*ompH* (B). M. DL2000 DNA marker; 1. PCR product of Tet^r gene; 2. PCR product of left arm (LA) of *ompH* gene; 3. PCR product of right arm (RA) of *ompH* gene; 4. Negative control.

1.3 突变株和互补株的构建和鉴定

1.3.1 突变株的构建和初次筛选:按照 Chung 等^[14]的方法制备 C48-3 株感受态细胞。在 2.5 kV/cm、600 Ω 和 25 μF 电转参数下,将构建好的敲除载体 pWSK29Δ*ompH* 电转化 C48-3 感受态细胞,转化结束后将菌液涂布于 DSA 平板(含 5 μg/mL 四环素),37℃ 培养 48 h 后,以单菌落菌液为模板,用位于 *ompH* 基因内部的引物 IN-1/IN-2 进行 PCR 初次筛选。

1.3.2 突变株的组合 PCR 和 DNA 测序鉴定:*ompH* 基因是否被 Tet^r 基因替代而缺失,用引物对 L-1/L-2、R-1/R-2、Tet-1/Tet-2、L-1/R-2、L-1/Tet-2、Tet-1/R-2 和 IN-1/IN-2 对突变株基因组 DNA 进行 PCR 扩增。同时,将用引物 L-1/R-2 扩增的 PCR 产物克隆于 pMD18-T 载体中,经 PCR 和酶切鉴定重组质粒并进行测序鉴定。

1.3.3 互补株的构建:以 C48-3 株基因组 DNA 为模板,用引物 OmpH-1/OmpH-2 扩增 *ompH* 基因全序列,用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切 PCR 产物和质粒 pPBA1101,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pPBA1101-*ompH*,转化 *E. coli* DH5α, PCR 和酶切鉴定阳性的重组质粒 DNA 送大连 TaKaRa 公司测序。将构建好的重组质粒 pPBA1101-*ompH* 电转化突变株感受态,转化结束后将菌液涂布于 DSA 平板(含 50 μg/mL 卡那霉素),37℃ 培养 24 h 后,以挑取单菌落进行增菌培养并提取质粒 DNA 作模板,用引物 OmpH-1/OmpH-2 进行 PCR 鉴定,将 PCR 阳性菌株命名为互补株 C48-3C。

1.3.4 RT-PCR 鉴定:将野生株、突变株和互补株

接种于 TB 培养基, 37°C 培养 18 h, 离心收集菌体, 用细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 以此为模板用 Random Octamers 和 Quant Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链, 并利用 *ompH* 基因内部引物 IN-1/IN-2 对 cDNA 进行 PCR 鉴定。

1.3.5 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定: 利用蛋白裂解抽提试剂盒制备野生株、突变株和互补株的全菌蛋白。采用半干式电转仪将 SDS-PAGE 胶上的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, 加天然 Cp39 蛋白抗体 (1:200), 室温孵育 2 h, 再加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:1000), 室温孵育 1 h, 加底物邻苯二胺 (DAB) 显色。

1.4 突变株的生物学特性

1.4.1 生长速率的比较: 分别挑取野生株、突变株和互补株的单菌落接种于 TB 培养基, 37°C 过夜培养后, 按 1:100 转接到 TB 培养基中, 37°C 继续培养, 每隔 1 h 测定菌液的 OD_{600} 值, 直至细菌生长处于稳定期, 绘制生长曲线。同时, 观察细菌的菌落形态, 并对单菌落进行革兰氏染色。

1.4.2 电镜观察: 参照 Jacques 和 Graham^[15] 的方法用环氧树脂包埋菌体, 制备超薄切片, 用水化的醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 用透射电镜观察野生株、突变株和互补株的荚膜结构。

1.4.3 粘附实验: 按照 Borrathybay 等^[6] 的方法用 9 日龄鸡胚制备 1×10^6 细胞/mL 的 CEF 细胞液, 将 100 μ L 细胞液接种于 96 孔细胞培养板, 孵育培养至细胞铺满培养板。参照陈红娜等^[16] 的方法检测细菌对 CEF 细胞的粘附能力, 即将 100 μ L 野生株、突变株和互补株菌液分别接种于 96 孔培养板, 孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 加入 200 μ L 灭菌冷冻水裂解细胞, 取细胞裂解液作 10 倍连续梯度稀释, 分别涂布于 DSA 平板, 37°C 培养 24 h 后, 计数菌落数, 实验重复 3 次。

1.4.4 小鼠毒力实验: 本课题组前期研究^[10] 结果表明 C48-3 对小鼠的半数致死剂量 (LD_{50}) 为 6.7 CFU, 所以, 根据 C48-3 株的 LD_{50} 值确定本次小鼠毒力实验的攻毒剂量为 100 LD_{50} , 即将 5 周龄 BALB/c 小鼠共 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别腹腔注射野生株、互补株和突变株菌液 0.1 mL (约为 7×10^2 CFU/只), 阴性对照组小鼠腹腔注射 TB 培养基 0.1 mL。

2 结果和分析

2.1 敲除载体 pWSK29 Δ *ompH* 的鉴定

提取构建好的敲除质粒 pWSK29 Δ *ompH*, 对质粒 DNA 进行交叉酶切验证。如图 2 所示, 用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Xba*I、*Xba*I 和 *Xho*I、*Pst*I 和 *Kpn*I、*Pst*I 和 *Xho*I 双酶切敲除质粒 pWSK29 Δ *ompH* 后, 分别获得大小约为 3.3、2.2、2.3 和 1.2 kb 的 DNA 片段, 各条带大小均与理论值相符, DNA 测序结果亦显示 3 个 DNA 片段序列及连接顺序正确。

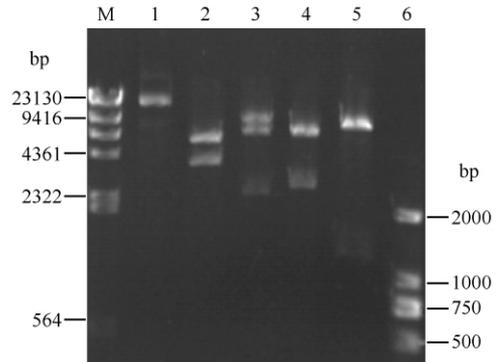


图 2 敲除载体 pWSK29 Δ *ompH* 的交叉酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digesting of the knock-out vector pWSK29 Δ *ompH*. M. λ -Hind III digest DNA marker; 1. Undigested pWSK29 Δ *ompH*; 2. Digested by *Kpn*I and *Xba*I; 3. Digested by *Xba*I and *Xho*I; 4. Digested by *Pst*I and *Kpn*I; 5. Digested by *Pst*I and *Xho*I; 6. DL2000 DNA marker.

2.2 突变株 C48-3 Δ *ompH* 的初步筛选

用引物 IN-1/IN-2 对挑取的单菌落菌液进行 PCR。由于引物 IN-1/IN-2 位于 *ompH* 基因的内部 (产物大小 942 bp), 如果基因 *ompH* 被敲除, 用引物 IN-1/IN-2 进行 PCR 扩增会得到阴性结果, 反之则说明 *ompH* 基因未被敲掉。PCR 结果显示, 在用引物 IN-1/IN-2 的一组菌落 PCR 扩增结果中第 5 泳道的菌株为阴性 (图 3), 将其命名为突变株 C48-3 Δ *ompH*。

2.3 突变株 C48-3 Δ *ompH* 的组合 PCR 和 DNA 测序鉴定

如果发生双向同源重组, *Tet^r* 基因将取代 *ompH* 基因, 以突变株 C48-3 Δ *ompH* 基因组为模板, 用引物对 L-1/L-2、R-1/R-2、Tet-1/Tet-2、L-1/R-2、L-1/Tet-2 和 Tet-1/R-2 进行 PCR 就应该扩增出大小分别为 1005、1118、1191、3314、2196 和 2309 bp 的片段, 而

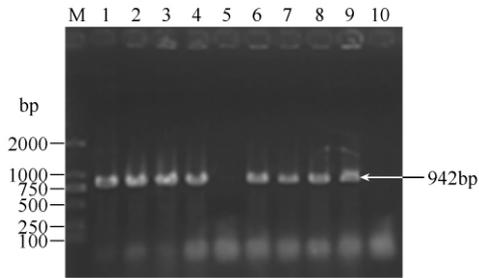


图3 突变株 C48-3 Δ ompH 的初步筛选

Fig. 3 Preliminary PCR screening of C48-3 Δ ompH mutant strains using primers IN-1 and IN-2. M. DL2000 DNA marker; 1. Positive control; 2-9. Mutants; 10. Negative control.

用引物 IN-1 /IN-2 进行 PCR 应得到阴性结果。组合 PCR 鉴定结果 (图 4) 与以上理论值完全一致。同时,对用引物 L-1 /R-2 扩增的 PCR 产物进行克隆和测序,测序结果亦证明所获得的菌株已经成功发生双向同源重组。

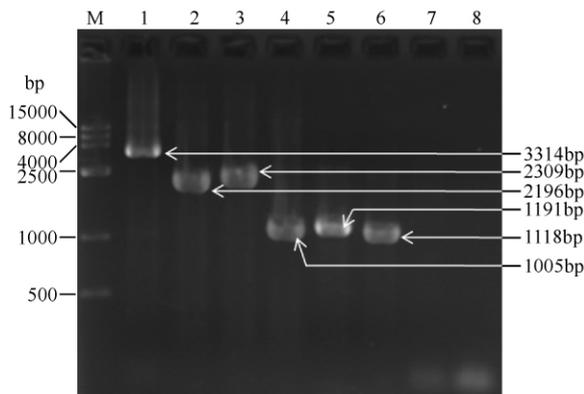


图4 突变株 C48-3 Δ ompH 的组合 PCR 鉴定

Fig. 4 Multiple-PCR analysis of genomic DNA from the C48-3 Δ ompH mutant strain. M. Wide range DNA marker; 1. PCR amplification with primers L-1 and R-2; 2. PCR amplification with primers L-1 and Tet-2; 3. PCR amplification with primers Tet-1 and R-2; 4. PCR amplification with primers L-1 and L-2; 5. PCR amplification with primers Tet-1 and Tet-2; 6. PCR amplification with primers R-1 and R-2; 7. PCR amplification with primers IN-1 and IN-2; 8. Negative control.

2.4 突变株 C48-3 Δ ompH 的 RT-PCR 鉴定

如图 5-A 所示,利用细菌 RNA 提取试剂盒提取了高纯度的野生株、互补株和突变株的总 RNA。利用引物 IN-1 /IN-2 分别对野生株、互补株和突变株反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增。结果显示,野生株和互补株中结果均为阳性,说明 *ompH* 基因正常转录,而在突变株 C48-3 Δ ompH 中为阴性,从转录水平证实 *ompH* 基因的缺失 (图 5-B)。

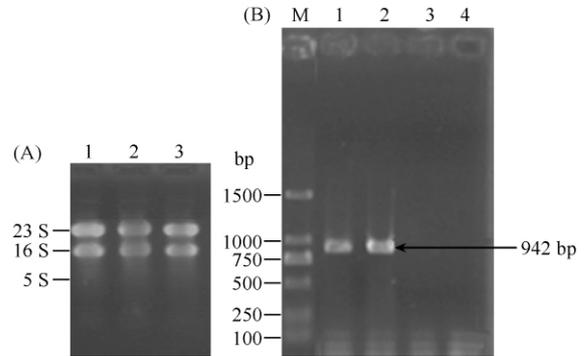


图5 突变株 C48-3 Δ ompH 的反转录 PCR 鉴定

Fig. 5 RT-PCR analysis of parent strain C48-3, complemented strain C48-3C and C48-3 Δ ompH mutant strain. A: 1. Total RNA of C48-3; 2. Total RNA of C48-3C; 3. Total RNA of C48-3 Δ ompH. B: M. DL2000 DNA marker; 1. PCR amplification using cDNA of C48-3; 2. PCR amplification using cDNA of C48-3C; 3. PCR amplification using cDNA of C48-3 Δ ompH; 4. Negative control.

2.5 突变株 C48-3 Δ ompH 的 Western blot 鉴定

如果基因 *ompH* 被敲除后,突变株不能表达 OmpH 蛋白,而该蛋白在野生株 C48-3 和互补株 C48-3C 均能正常表达。SDS-PAGE 结果显示,在野生株 C48-3 和互补株 C48-3C 的全菌蛋白中均能观察到 39 kDa 的蛋白条带,而在突变株 C48-3 Δ ompH 的全菌蛋白中没有观察到该蛋白 (图 6-A)。用抗天然 Cp39 蛋白抗体对突变株 C48-3 Δ ompH 的全菌蛋白进行 Western blot 验证,结果显示 Cp39 蛋白的抗体分别能与野生株 C48-3 和互补株 C48-3C 的 39 kDa 蛋白结合,而在突变株 C48-3 Δ ompH 中为阴性 (图 6-B)。从蛋白水平证实 *ompH* 基因的缺失。

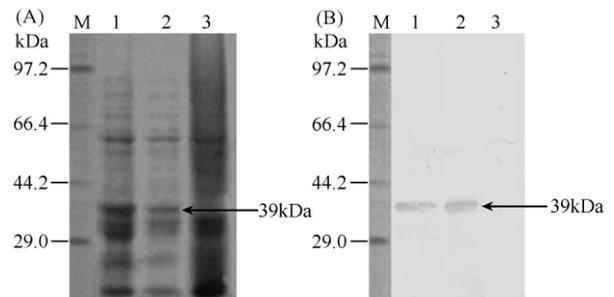


图6 突变株 C48-3 Δ ompH 的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测

Fig. 6 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of whole cell proteins of the C48-3 Δ ompH mutant strain. M. Low molecular mass standards; 1. C48-3; 2. C48-3C; 3. C48-3 Δ ompH. Arrow indicates the position of the 39 kDa protein.

2.6 突变株的生长速率

将野生株 C48-3、互补株 C48-3C 和突变株 C48-3 Δ *ompH* 接种 DSA 平板培养 24 h 后, 可见三者均长出为淡灰白色、圆形、边缘整齐、表面光滑的菌落, 而突变株的菌落直径较野生株和互补株小。革兰氏染色显示野生株、互补株和突变株均为阴性, 菌体形态为球杆状或短杆状。如图 7 所示, 突变株对数期生长速迟缓, 进入平台期的细菌密度值较野生株和互补株低 (OD_{600} 为 0.98)。

2.7 突变株的透视电镜观察

在相同培养条件下, 制备禽巴氏杆菌的电镜标本, 用电镜观察细菌细胞壁表面的荚膜层。电镜观察结果显示, 野生株 C48-3 和互补株 C48-3C 均有明显的荚膜层包绕在细菌细胞壁, 而突变株 C48-

3 Δ *ompH* 的细胞壁表面只观察到不完整且较薄的荚膜层 (图 8), 表明 *ompH* 基因的缺陷影响禽巴氏杆菌的荚膜合成。

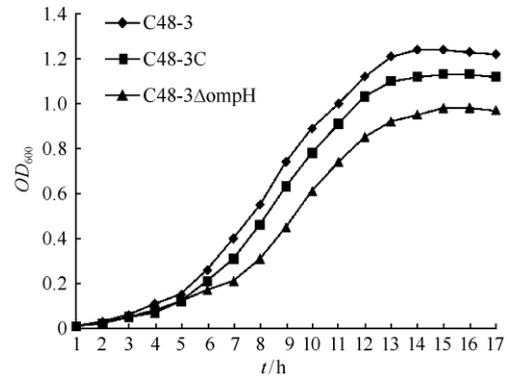


图 7 突变株 C48-3 Δ *ompH* 生长曲线图

Fig. 7 Growth curves of the C48-3 Δ *ompH* mutant strain.

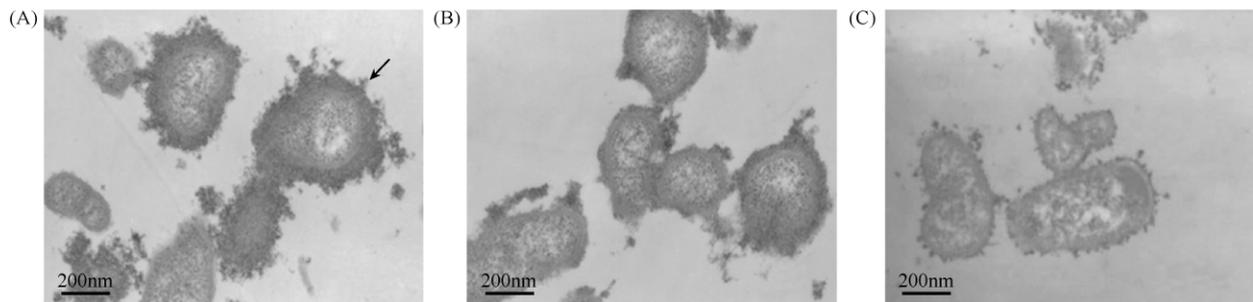


图 8 突变株 C48-3 Δ *ompH* 的电镜观察结果

Fig. 8 Electron micrographs of the parent strain C48-3 (A), complemented strain C48-3C (B) and C48-3 Δ *ompH* mutant strain (C). Arrow shows capsular material.

2.8 突变株对 CEF 细胞的粘附能力

在相同的培养条件下, 比较野生株 C48-3、互补株 C48-3C 和突变株 C48-3 Δ *ompH* 对 CEF 细胞的粘附能力。如图 9 所示, 野生株和互补株对 CEF 细胞的粘附能力的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 与野生株和互补株相比, 突变株对 CEF 细胞的附着能力显著降低 ($P < 0.01$), 说明 *OmpH* 是禽巴氏杆菌的粘附因子。

2.9 小鼠毒力实验

观察结果显示, 野生株 C48-3 注射组 10 只小鼠在感染后 24 h 开始死亡, 到 72 h 小鼠全部死亡; 互补株 C48-3C 注射组 10 只小鼠 72 h 内死亡 8 只, 存活 2 只; 突变株 C48-3 Δ *ompH* 注射组 10 只 72 h 内死亡 4 只, 存活 6 只; 阴性对照组 10 只小鼠状态均良好。本实验结果只能说明 *ompH* 基因的缺失突变可能影响 C48-3 株对小鼠的致病性, 因为未测突变株 C48-3 Δ *ompH* 对小鼠的 LD_{50} 值。

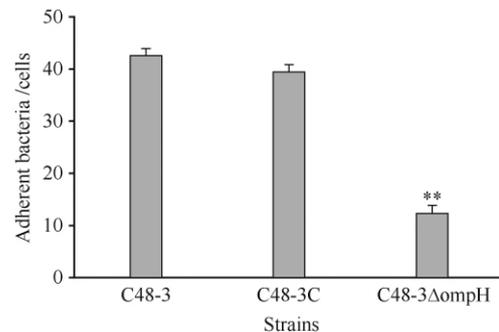


图 9 突变株 C48-3 Δ *ompH* 对 CEF 细胞的粘附能力

Fig. 9 Adhesion of the C48-3 Δ *ompH* mutant strain to CEF cells.

** Significantly different at $P < 0.01$ when compared to the parent strain C48-3 and complemented strain C48-3C.

3 讨论

Chung 等^[14] 以 pWSK29 为出发质粒, 构建一个 *Tet^r* 基因两侧具有与 *hexA* 基因上下游同源序列同源

的敲除载体 pPBA1622, 将其转化禽巴氏杆菌 X-73 株感受态细胞, 通过同源重组构建 *hexA* 基因缺失的无荚膜突变株 PBA930, 小鼠毒力实验结果显示突变株 PBA930 对小鼠的毒力降低了 10^6 倍, 同时表明这种重组技术是禽巴氏杆菌基因功能研究和突变株构建的有力工具。因此本文为探讨 OmpH 蛋白的毒力作用, 利用该技术, 通过构建一个 *Tet^r* 基因两侧具有与 *ompH* 基因上下游同源序列同源的敲除载体 pWSK29 Δ ompH, 通过敲除载体和 C48-3 株基因组 DNA 之间的双向同源重组获得了缺失 *ompH* 基因的敲除株 C48-3 Δ ompH, 并通过组合 PCR、RT-PCR 和 Western blot 对敲除株在基因、转录和蛋白水平上进行了鉴定, 结果证实敲除株构建成功。

在此基础上, 通过生物学功能实验比较野生株 C48-3、互补株 C48-3C 和突变株 C48-3 Δ ompH 在生长速率、荚膜结构、粘附能力和致病性等方面的差异。细菌生长曲线结果显示, 与野生株和互补株相比突变株对数期生长速率迟缓。菌落形态观察和革兰氏染色结果显示, 与野生株和互补株相比突变株在 DSA 平板上长出非粘性的小菌落, 而三者的菌体形态均为球杆状或短杆状。DNA 测序结果显示 C48-3 株 *ompH* 基因片段大小为 1062 bp, 与 Sthitmatee 等^[11]报道的 P-1059 株 *cp39* 基因序列完全相同。电镜观察结果显示, 野生株和互补株均具有较完整的荚膜层, 而突变株细胞壁表面只观察到不完整且较薄的荚膜层, 与 Sthitmatee 等^[11]构建的 *cp39* 基因沉默突变株 PBA332 的荚膜结构基本相似, 表明 OmpH 蛋白在禽巴氏杆菌荚膜生物合成或荚膜多糖的胞外运输过程中可能发挥一定的作用, 但其具体作用机制尚未清楚。粘附实验结果显示, 与野生株和互补株相比突变株对 CEF 细胞的附着能力降低了 3 倍, 本实验结果从基因水平上验证 OmpH 蛋白是禽巴氏杆菌的粘附因子。小鼠毒力实验结果显示, 与野生株 C48-3 相比突变株 C48-3 Δ ompH 对小鼠的毒力相对减弱, 而 Sthitmatee 等^[11]经静脉注射 SPF 鸡 3.5×10^8 CFU 的 *cp39* 基因沉默突变株时仍未导致鸡的死亡, 这暗示小鼠和鸡对禽巴氏杆菌感染的抵抗力可能有差异。鉴于鸡为禽巴氏杆菌的天然宿主, 本实验还需要通过 SPF 鸡模型对 *ompH* 基因的功能做进一步研究, 为禽巴氏杆菌致病机理的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Mukkur TK. Immunologic and physiologic responses of calves inoculated with potassium thiocyanate extract of *Pasteurella multocida* type A. *American Journal of Veterinary Research*, 1978, 39(8):1269-1273.
- [2] Rhoades KR, Rimler RB. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Diseases*, 1987, 31(4):895-898.
- [3] Myint A, Carter GR, Jones TO. Prevention of experimental haemorrhagic septicaemia with a live vaccine. *The Veterinary Record*, 1987, 120(2):500-501.
- [4] Avakian AP, Dick JW, Derieux WT. Fowl cholera immunity induced by various vaccines in broiler minibreeder chickens determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, 1994, 33(1):97-102.
- [5] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Okiyama E, Kawamoto E, Amao H. Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97(3-4):215-227.
- [6] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Ohtsu N, Takagi M, Nakamura S, Kawamoto E. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97(3-4):229-243.
- [7] Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, Ohtsuki N, Itoh O. Characterization of a 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 2004, 100(1-2):43-53.
- [8] Borrathybay E, Sthitmatee N, Suzuki K, Shinnakasu R, Shuichi T, Akuzawa R, Kataoka Y, Sawada T. Molecular characterization of an adhesive protein of *Pasteurella multocida* strain P-1059 and its variant strain P-1059B. *Bulletin of the Nippon Veterinary and Life Science University*, 2008, 57:90-99.
- [9] Sthitmatee N, Nume S, Kawamoto E, Sasaki H, Yamashita K, Takahashi N, Kataoka Y, Sawada T. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*, 2008, 26(19):2398-2407.
- [10] Borrathybay E, Peng QZ, Yan F, He C, Nazierbieke W. Cross-protective effect of the Cp39 adhesive proteins against avian *Pasteurella multocida* in mice. *Acta*

- Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (3): 360-366 (in Chinese).
- 恩特马克·布拉提白, 彭清忠, 严芳, 何翠, 吾鲁木汗·那孜尔别克. 禽多杀性巴氏杆菌粘附蛋白 Cp39 的交叉保护作用. 微生物学报, 2010, 50 (3): 360-366.
- [11] Sthitmatee N, Kataoka Y, Sawada T. Inhibition of capsular protein synthesis of *Pasteurella multocida* strain P-1059. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011, 73 (11): 1445-1451.
- [12] Wang RF, Kushner SR. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1991, 100: 195-199.
- [13] Homchampa P, Strugnell RA, Adler B. Cross protective immunity conferred by a marker-free *aroA* mutant of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*, 1997, 15 (2): 203-208.
- [14] Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M, Adler B. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (4): 2487-2492.
- [15] Jacques M, Graham L. Improved preservation of bacterial capsule for electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 1989, 11 (2): 167-169.
- [16] Chen HN, Liao H, Wang CJ, Pan XZ, Tang JQ. Construction an *in Vitro* assay of the sortase BCD geneknock-out mutant of *streptococcus suis* 2. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (3): 386-392 (in Chinese).
- 陈红娜, 廖辉, 王长军, 潘秀珍, 唐家琪. 猪链球菌 2 型分选酶 *srtBCD* 基因敲除株的构建及其生物学特性分析. 微生物学报, 2011, 51 (3): 386-392.

Construction and characterization of *ompH* gene knock-out mutant of avian *Pasteurella multocida* C48-3

Wulumuhan Nazierbieke¹, Yufeng Zhang¹, Fengjuan Gong¹, Sawada Takuo², Entomack Borrathybay^{1*}

¹College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China

²Laboratory of Veterinary Microbiology, Nippon Veterinary and Life Science University, Tokyo 180-8602, Japan

Abstract: [Objective] To study the role of the outer membrane protein H (OmpH) in pathogenicity of avian *Pasteurella multocida*. [Methods] The *ompH* knock-out mutant of avian *P. multocida* C48-3 was constructed by homologous recombination. The DNA replacement was confirmed by PCR, RT-PCR and Western blot. We compared the differences of biological characteristics such as growth rate, capsular structure, adhesion ability and virulence between the *ompH* knock-out mutant of C48-3 Δ ompH and parent strain C48-3, as well as the complemented strain C48-3C. [Results] C48-3 Δ ompH was successfully constructed. Electron microscopy examination of C48-3 Δ ompH shows the absence of capsular material compared to the parent strain C48-3 and complemented strain C48-3C. The adhesion assay shows that the number of C48-3 Δ ompH adhered to CEF cells was significantly lower than that of C48-3 and C48-3C. C48-3 Δ ompH was relatively attenuated in mice by intraperitoneal injection. [Conclusion] The construction of C48-3 Δ ompH would facilitate further study on pathogenesis of avian *Pasteurella multocida*.

Keywords: Avian *Pasteurella multocida*, *ompH* gene, knock-out mutant, adhesion, pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972206) and by the Graduate Innovation Scientific Research Foundation of Hunan Province (CX2011B397)

* Corresponding author. Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-85665323; E-mail: etmkb@jzu.edu.cn

Received: 28 August 2012/Revised: 30 October 2012