



空肠弯曲菌 *fliD* 基因突变株的构建及其生物学特性

唐虹, 张小燕, 杜雪晴, 宋召军, 焦新安, 黄金林*

扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,
江苏 扬州 225009

摘要:【目的】研究 *fliD* 基因对空肠弯曲菌生物学特性的影响, 为阐明该基因的功能和作用机制奠定基础。【方法】利用同源重组技术构建 *fliD* 基因的插入失活突变株 NCTC11168 Δ *fliD*, 并通过与野生株比较, 对 *fliD* 突变株生长速率、运动力、黏附力和侵袭力等生物学特性进行研究。【结果】与野生型 NCTC11168 相比, 突变株 NCTC11168 Δ *fliD* 的生理生化特性不变; 突变株的生长速率无明显变化; MH 半固体穿刺实验中, 突变株只能在接种处生长, 运动力明显减弱; 在 Caco-2 细胞黏附、侵袭实验中, *fliD* 突变株的黏附率和侵袭率分别为 164.00 ± 19.49 、 55.00 ± 6.09 , *fliD* 基因失活使得突变株的黏附率和侵袭率显著降低($0 < P < 0.01$)。【结论】*fliD* 基因是空肠弯曲菌运动能力重要的分子基础, 与空肠弯曲菌感染细胞的黏附侵袭作用密切相关, 即与空肠弯曲菌的致病性密切相关。

关键词: 空肠弯曲菌, *fliD* 基因, 突变株, 生物学特性

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, Cj)是一类细胞色素氧化酶阳性、微需氧、弯曲螺旋杆状的革兰阴性细菌, 可表现出活泼的运动力。自 2005 年以来, 空肠弯曲菌一直是欧盟导致人类细菌性胃肠炎的主要原因, 每年大约造成 900 万人感染, 花费成本高达 24 亿欧元^[1]。目前空肠弯曲菌的生态学、流行病学和病原学等方面的研究已取得了一定的进展, 但对其致病机理的了解甚少。鞭毛是空肠弯曲菌典型的毒力因子, 在其致病过程中

发挥重要作用。据研究报导, 鞭毛介导空肠弯曲菌运动^[2], 其相关基因失活会使空肠弯曲菌对细胞的黏附侵袭能力下降^[3-4], 并影响空肠弯曲菌定殖在宿主胃肠道^[5]。目前空肠弯曲菌鞭毛引起以上毒力表型变化的机理还不清楚, 相关基因与毒力的偶联性也没有进行分析。

fliD 基因是空肠弯曲菌鞭毛合成级联通路中的重要元件, 分析该基因的特性、功能及其与毒力的关联将会对研究空肠弯曲菌致病机理大有裨

基金项目: 国家自然科学基金(31372449); 国家支撑计划(2014BAD13B02); 江苏省自主创新项目[CX(15)1009-2]

*通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-01; 修回日期: 2017-05-29; 网络出版日期: 2017-07-10

益。本研究通过同源重组技术构建了空肠弯曲菌 *fliD* 突变株, 并对突变株的生物学特性进行了研究。该研究为深入了解 *fliD* 基因的功能, 解析空肠弯曲菌的致病机理奠定基础, 为弯曲菌的预防与控制提供新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞株: 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, 空肠弯曲菌 NCTC11168 由遵义医学院孙万邦教授惠赠。克隆载体 pMD-20T (Simple) 购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌-空肠弯曲菌穿梭质粒 pRY107 由爱荷华州大学 Qijing Zhang 教授惠赠。实验用细胞系为 Caco-2, 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I 和 *Afl* II, 普通 *Taq* 酶, 高保真酶, 高保真 dNTPs, PCR buffer, dNTPs mixture, DNA marker, T4 DNA 连接酶, 胶回收试剂盒, 购自 TaKaRa 公司; 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 弯曲杆菌选择性添加剂(SR0204), 弯曲菌哥伦比亚(CCDA)琼脂培养基购自 Oxoid 公司; Mueller Hinton (MH)液体培养基购自 BD 公司; 高糖型 DMEM 培养基, 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; 青链霉素购自 Solarbio 公司; 硫酸庆大霉素, TritonX-100 购自 Sigma 公司。其余常规试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 *fliD* 突变株的构建

1.2.1 引物设计与合成: 根据 GenBank 上已公布的空肠弯曲菌 NCTC11168 全基因组序列, 以及质粒 pRY107 图谱, 应用软件 Primer 5.0 设计引物(表 1)。引物由南京金斯瑞有限公司合成。

引物 *fliD*-F/R 用于扩增空肠弯曲菌 *fliD* 基因, 引物 *kan*^r-F/R 用于扩增质粒 pRY107 中卡那霉素抗性基因盒。

1.2.2 重组质粒的构建: 以空肠弯曲菌 NCTC11168 基因组 DNA 为模板, PCR 方法扩增 *fliD* 基因。以质粒 pRY107 为模板, PCR 方法扩增其中卡那霉素抗性基因盒(*kan*^r)。PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物 DNA 胶回收试剂盒回收纯化, 并取少量回收产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。检测正确后将 *fliD* 基因及 *kan*^r 抗性基因与 pMD-20T (Simple)载体连接, 并转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 挑取阳性菌落扩大培养, 提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。鉴定正确的阳性克隆送南京金斯瑞公司测序, 测序正确的质粒分别命名为 pMD20T-*fliD* 和 pMD20T-*kan*^r。

1.2.3 自杀载体 pMD20T-*fliD*-*kan*^r 的构建: *Afl* II 为 *fliD* 基因内部单一酶切位点, 而且在 pMD-20T (Simple)载体中无此酶切位点。通过酶切连接反应, 将 pMD20T-*kan*^r 载体中的 *kan*^r 插入 pMD20T-*fliD* 载体中 *fliD* 基因内部, 从而完成自杀载体构建。自杀载体的构建流程如图 1 所示。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. Primers used for PCR

Genes	Primers	Primer sequences(5'→3')	Amplicon size/bp	Note
<i>fliD</i>	<i>fliD</i> -F	TAGGATCCATGGCATTGTTGGTAGTC	1929	<i>Bam</i> H I
	<i>fliD</i> -R	GCGGAGCTCTTAATTATTAGAATTGTT		<i>Sac</i> I
<i>kan</i> ^r	<i>kan</i> ^r -F	GACTTAAGGATAATGCTAAGACAATCACTAAA	1021	<i>Afl</i> II
	<i>kan</i> ^r -R	AGCTTAAGCGCTTATCAATATATCTATAGAATG		<i>Afl</i> II

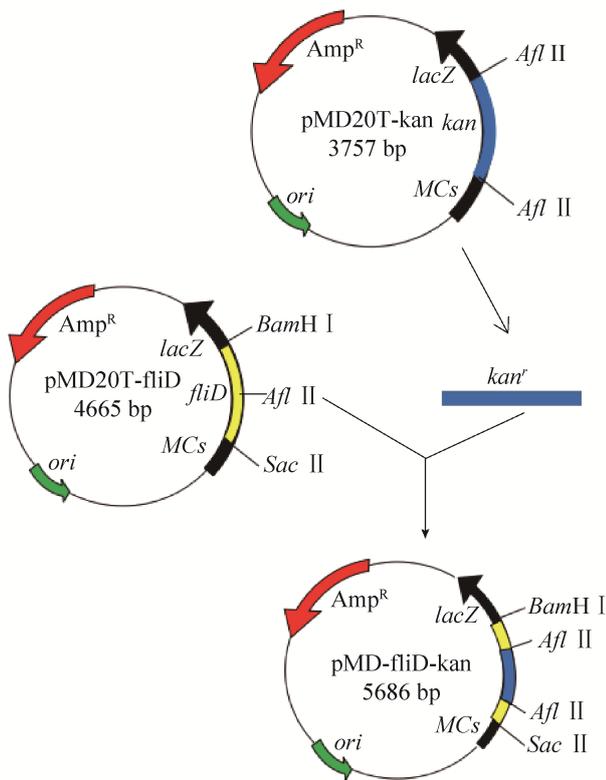


图 1. 自杀载体 pMD20T-*fliD-kan^r* 构建流程

Figure 1. The construction process of the suicide plasmid pMD20T-*fliD-kan^r*.

提取 pMD20T-*fliD* 质粒和 pMD20T-*kan^r* 质粒, 以 *Afl* II 限制性内切酶进行单酶切反应, 酶切产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳。胶回收试剂盒回收 pMD20T-*fliD* 质粒酶切后的 4.7 kb 片段和 pMD20T-*kan^r* 质粒酶切后的 1 kb 片段, 并进行连接, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 在 Kan (50 μ g/mL) 抗性 LB 平板上筛选, 挑取阳性克隆扩大培养, 然后提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定, 以验证 *kan^r* 是否插入 *fliD* 基因中。鉴定正确的质粒大小应约为 5.7 kb, 命名为 pMD20T-*fliD-kan^r*。

1.2.4 空肠弯曲菌 *fliD* 突变株的筛选: 应用插入失活的方法构建空肠弯曲菌 *fliD* 突变株。pMD20T 载体不能在空肠弯曲菌中复制, 因此以 pMD20T 作为自杀载体, 另外以 *kan^r* 作为筛选标记。将自

杀载体 pMD20T-*fliD-kan^r* 电转化进空肠弯曲菌 NCTC11168 感受态细胞, 通过同源重组使自杀载体上的 *fliD-kan^r* 片段和空肠弯曲菌 *fliD* 基因片段发生同源交换, 从而获得 *fliD* 基因失活的空肠弯曲菌 *fliD* 突变株。电击转化后的感受态细胞在带 Kan (50 μ g/mL) 抗性 CCDA 固体培养基上进行筛选。并用 *fliD*-F 和 *fliD*-R 引物对转化子进行 PCR 验证, 验证正确的菌株即为空肠弯曲菌 *fliD* 突变株 NCTC11168 Δ *fliD*。

1.3 细菌生化鉴定

复苏空肠弯曲菌, 接种于 CCDA 固体培养基, 42 $^{\circ}$ C 微需氧条件下培养 18 h 后利用 VITEK 2 型自动微生物鉴定仪, 通过 NH 鉴定卡(奈瑟菌、嗜血杆菌鉴定卡)对空肠弯曲菌野生株 NCTC11168 及突变株 NCTC11168 Δ *fliD* 进行生化鉴定。观察 *fliD* 基因失活是否对空肠弯曲菌基本生理生化特性造成影响。

1.4 细菌生长曲线测定

参照文献[6]的方法, 在 CCDA 固体培养基上复苏细菌, 于 42 $^{\circ}$ C 微需氧条件下培养 24 h 后用 MH 液体培养基收获细菌, 并调 OD_{600} 值为 0.7; 将菌悬液以 1:10 稀释(OD_{600} 值约为 0.07), 并以 1 mL 每孔分装于 24 孔板中, 每株细菌分装 10 个孔; 将 24 孔板置于厌氧罐中充气后 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下摇床振荡培养; 从转接开始, 每隔 3 h 取出 24 孔板 1 次, 每次测定 1 个孔中菌悬液 OD_{600} 值, 直至细菌达到稳定生长期; 记录每株细菌各个时间段的 OD_{600} 值并绘制生长曲线, 比较野生株和突变株的生长速度。

1.5 细菌运动力检测

参照文献[7]的方法, 复苏空肠弯曲菌, 接种于 CCDA 固体培养基, 于 42 $^{\circ}$ C 微需氧条件下培

养 18 h; 以 MH 液体培养基收获新鲜培养的细菌, 并调 OD_{600} 值为 0.8; 以无菌穿刺针蘸取少量菌悬液, 并垂直穿刺接种于含 0.4% 琼脂的 MH 半固体培养基; 平板在 42 °C 微需氧条件下倒置培养 48 h 后观察细菌从接种点向四周扩散情况, 从而比较野生和突变株的运动能力。

1.6 Caco-2 细胞黏附、侵袭实验

参照文献[8]的方法, 实验步骤为: 对饲养良好的 Caco-2 细胞进行细胞计数, 用 24 孔板每孔铺 1×10^5 个细胞; 以无抗 DMEM 培养基收获新鲜培养的细菌, 并调 OD_{600} 值为 1.0 (细菌数约为 10^9 CFU/mL), 稀释 10 倍至细菌数约为 10^8 CFU/mL; 弃去已铺满单层 Caco-2 细胞的 24 孔板中的培养基, 用无菌 PBS 洗 2 次, 每孔加入 1 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的细菌悬液; 置于 CO_2 培养箱中孵育, 使细菌能够充分黏附于细胞表面或侵袭到细胞内部。

黏附实验: 孵育 3 h 后弃去培养基, 用无菌 PBS 洗 3 次, 以洗脱未黏附的细菌; 之后加入 1 mL 0.01% Triton X-100 裂解细胞, 收获裂解液, 以无菌 PBS 进行倍比稀释, 涂布于无抗 CCDA 固体培养基, 计算黏附的细菌数。

侵袭实验: 孵育 3 h 后吸去 24 孔板内培养基, 以无菌 PBS 洗 3 次, 之后加入含 100 mg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基, 于 CO_2 培养箱中再孵育 1 h, 以杀死黏附于细胞表面的细菌; 之后加入 1 mL 0.01% Triton X-100 裂解细胞, 收获裂解液, 以无菌 PBS 进行倍比稀释, 涂布于无抗 CCDA 固体培养基, 计算侵袭的细菌数。

2 结果和分析

2.1 突变株的构建

2.1.1 重组质粒的构建与鉴定: 以空肠弯曲菌

NCTC11168 基因组 DNA 为模板, 用引物 *fliD*-F/R 扩增大小为 1929 bp 的 *fliD* 基因, 以质粒 pRY107 为模板, 用引物 *kan*^r-F/R 扩增大小为 1021 bp 的 *kan*^r 基因, 电泳结果与预期大小相符(图 2); *fliD* 基因和 *kan*^r 基因与克隆载体 pMD-20T 相连后, 以 *Bam*H I 和 *Sac* I 对重组质粒 pMD20T-*fliD* 进行酶切, 得到 1.9 kb 和 2.7 kb 大小的片段; 以 *Afl* II 对重组质粒 pMD20T-*kan*^r 进行酶切, 得到 1 kb 和 2.7 kb 大小的片段, 结果与预期相符(图 3), 测序结果也与 GenBank 中公布的序列相一致, 证实重组质粒构建成功。

2.1.2 自杀载体 pMD20T-*fliD*-*kan*^r 的构建: 自杀载体 pMD20T-*fliD*-*kan*^r 经 *Afl* II 单酶切后, 电泳出现 4.7 kb 和 1.0 kb 大小的 2 个片段。结果均与预期相符(图 4), 说明 *kan*^r 已顺利插入到重组质粒 pMD20T-*fliD* 中 *fliD* 片段内部 *Afl* II 酶切位点之间, 得以成功构建自杀载体 pMD20T-*fliD*-*kan*^r。

2.1.3 空肠弯曲菌 *fliD* 突变株的筛选与鉴定: 将自杀质粒 pMD20T-*fliD*-*kan*^r 电转化空肠弯曲菌感受态细胞后, 自杀载体上的 *fliD*-*kan*^r 片段和空肠弯曲菌 *fliD* 基因片段发生同源交换。这会使空肠弯曲菌 *fliD* 基因失活, 同时也使空肠弯曲菌拥有

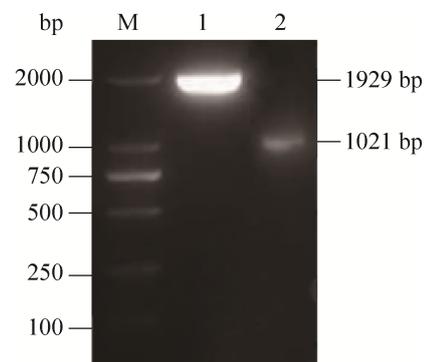


图 2. *fliD* 和 *kan*^r 基因的 PCR 扩增

Figure 2. PCR amplification of *fliD* and *kan*^r gene. M: DL2000 DNA marker; lane 1: The PCR product of *fliD*.

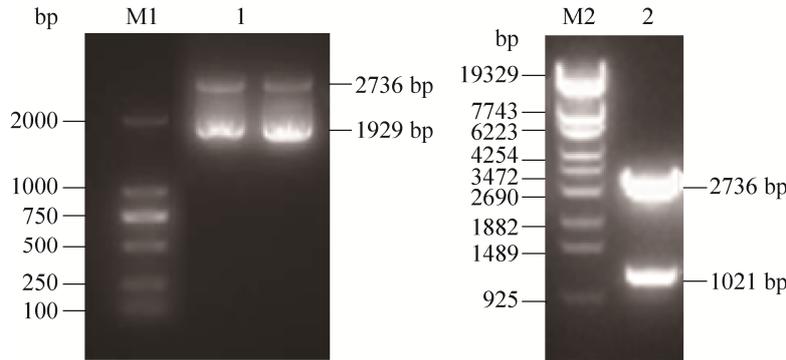


图 3. 重组质粒的酶切鉴定

Figure 3. Analysis of recombinant plasmid with restriction enzyme. M1: DL2000 DNA marker; M2: λ -EcoT 14 I digest marker; lane 1: pMD20T-*fliD*/BamH I +Sac I ; 2: pMD20T-*kan^r*/Afl II .

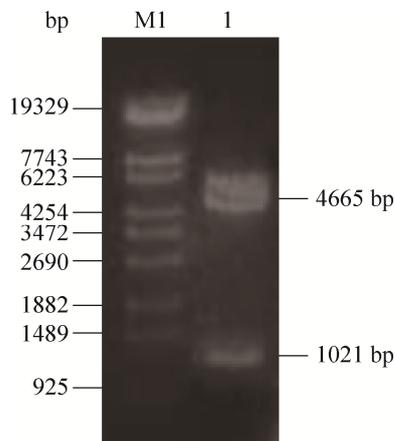


图 4. 自杀载体 pMD20T-*fliD*-*kan^r* 的酶切鉴定

Figure 4. Analysis of suicide plasmid pMD20T-*fliD*-*kan^r* with restriction enzyme. M1: λ -EcoT 14 I digest marker; lane 1: pMD20T-*fliD*-*kan^r*/Afl II .

卡那霉素抗性。空肠弯曲菌野生株可以扩增出 1.9 kb 的条带；而 *fliD* 突变株则扩增出 2.95 kb 的条带(图 5)，这与 *fliD*-*kan^r* 片段预期大小相符，说明 *kan^r* 已成功插入空肠弯曲菌 *fliD* 基因内部。

2.2 细菌生化鉴定

利用自动微生物生化鉴定仪 VITEK2，通过 NH 鉴定卡(奈瑟菌、嗜血杆菌鉴定卡)对空肠弯曲菌野生株以及 *fliD* 突变株进行了生化鉴定。生化鉴定结果如表 2 所示，*fliD* 突变株的生化指标均与

空肠弯曲菌野生株相同，即 *fliD* 基因失活并未对空肠弯曲菌的正常生理生化代谢造成影响。

2.3 细菌生长曲线测定

测定空肠弯曲菌野生株以及 *fliD* 突变株每个时间段菌悬液 OD_{600} 值，绘制生长曲线并比较菌株间的生长速度。结果如图 6 所示，可以看出 *fliD* 突变株的生长速度与野生株 NCTC11168 相比无明显差异，表明 *fliD* 基因失活并不会对空肠弯曲菌的正常生长造成明显影响。

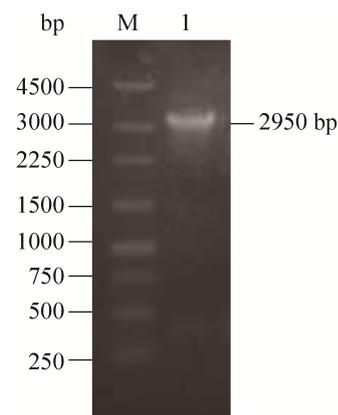


图 5. *fliD* 突变株的 PCR 鉴定

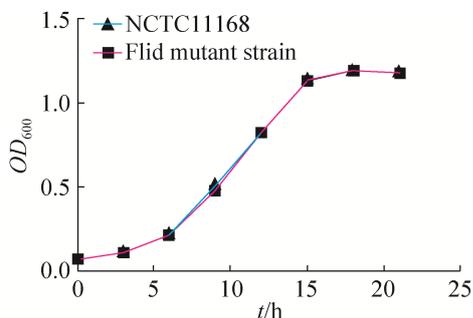
Figure 5. PCR identification of *fliD* mutant strain. M: 250 bp DNA ladder marker; lane 1: PCR identification of *fliD* mutant strain with *fliD*-F/R.

表 2. 空肠弯曲菌的生化特性鉴定

Table 2. Biochemical characteristics of *Campylobacter jejuni*

Biological characteristics	NCTC11168	<i>fliD</i> mutant strain
ArgA	-	-
GGT	-	-
LysA	-	-
DGAL	-	-
LeuA	+	+
ELLM	-	-
PheA	-	-
ProA	-	-
PyrA	+	+
TyrA	-	-
APPA	-	-
dGLU	-	-
GLYG	-	-
dMNE	-	-
dMAL	-	-
SAC	-	-
NAG	-	-
URE	-	-
BGALi	-	-
ODC	+	+
AARA	-	-
PVATE	+	+
PHC	-	-
dMLT	+	+
MTE	-	-
IGLM	+	+
PHOS	-	-
DRIB2	-	-
OPS	+	+
dXLY	-	-

+: Positive; -: Negative.

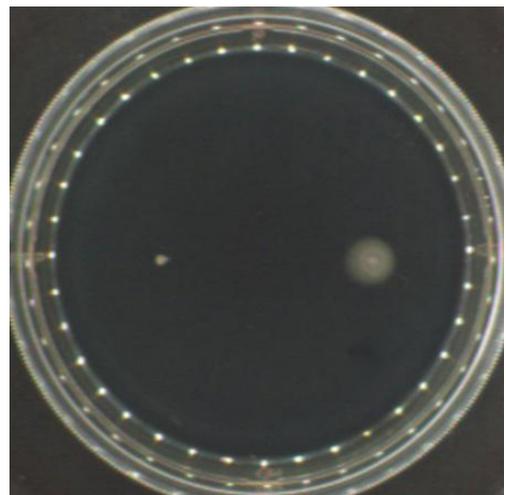
图 6. NCTC11168, *fliD* 突变株以及野生株的生长曲线
Figure 6. Growth curves of NCTC11168 and *fliD* mutant strain.

2.4 细菌运动力检测

将空肠弯曲菌野生株以及 *fliD* 突变株穿刺接种 MH 半固体培养基后, 将平板在 42 °C 微需氧条件下倒置培养以检测细菌运动力。培养 48 h 后, 取出平板观察, 结果如图 7 所示, NCTC11168 野生株可从接种处向四周扩散生长, 且形成明显的圆形菌斑; *fliD* 突变株只能在接种处生长, 未见扩散运动, 运动力明显减弱。

2.5 Caco-2 细胞黏附、侵袭实验

当 Caco-2 细胞形成单层后, 以 100 MOI 的量接种空肠弯曲菌野生株和 *fliD* 突变株以检测细菌黏附和侵袭细胞能力, 黏附作用 3 h, 侵袭作用 3 h, 结果如图 8 所示。野生株 NCTC11168 和 *fliD* 突变株的黏附分别为 295.17 ± 29.66 、 164.00 ± 19.49 , *fliD* 突变株的对细胞的黏附率显著低于野生株 NCTC11168 ($0 < P < 0.01$); 野生株 NCTC11168 和 *fliD* 突变株的侵袭率分别为 160.67 ± 8.22 、 55.00 ± 6.09 , *fliD* 突变株的对细胞的侵袭率显著低于野生株 NCTC11168 ($0 < P < 0.01$)。

图 7. NCTC11168 野生株和 *fliD* 突变株的运动力检测
Figure 7. Motility assay of NCTC11168 and *fliD* mutant strain.

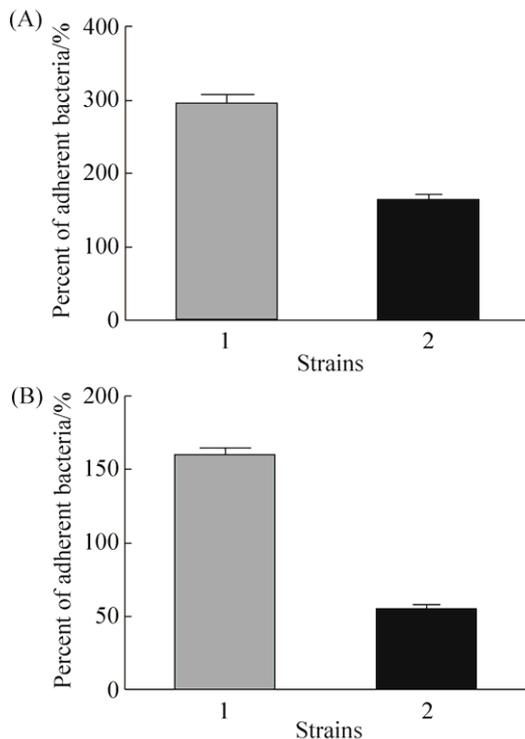


图 8. NCTC11168 和 NCTC11168 Δ *fliD* 对 Caco-2 细胞的黏附(A)和侵袭(B)

Figure 8. Adherence (A) and invasion (B) assay of NCTC11168 and NCTC11168 Δ *fliD* to Caco-2. 1: NCTC11168; 2: NCTC11168 Δ *fliD*. $P < 0.01$.

3 讨论

目前空肠弯曲菌的生态学、流行病学和病原学等方面的研究已取得了一定的进展, 但对其致病机理的了解甚少。随着 2000 年英国 Sanger 中心对空肠弯曲菌 NCTC11168 全基因组测序的完成^[9], 对于空肠弯曲菌生理及毒力相关信息有了一定的了解。在众多毒力相关因素中, 鞭毛是空肠弯曲菌典型的毒力因子, 鞭毛及其介导的运动力帮助细菌感染和定殖。*fliD* 基因是鞭毛基因调节系统的关键组分^[10], 在空肠弯曲菌中指导合成鞭毛丝最顶端的帽盖结构蛋白 FliD 蛋白, FliD 蛋白促使鞭毛亚单位聚合成完整的鞭毛, 在空肠弯曲菌鞭毛的生物合成过程中发挥重要作用。但目前我们对

于 *fliD* 基因的调节机制并不清楚。本研究通过同源重组方法成功构建了空肠弯曲菌 *fliD* 突变株, 并通过一系列实验对 *fliD* 突变株的生物学特性进行了研究, 以帮助了解 *fliD* 基因的作用机制。

通过插入失活的方法构建基因突变株是目前研究基因功能简单而有效的方法, 这种方法也同样适用于空肠弯曲菌。插入失活通常是通过 1 次双交换重组而完成的^[11], 这个过程利用自杀载体上所携带的报告基因, 例如蔗糖敏感基因作为选择标记^[12-13]。本研究挑选 *kan^r* 抗性基因盒为筛选标记, 插入 *fliD* 基因内部使其失活, 也因此在学习中需要考虑该菌株的生物安全性。

fliD 基因在不同细菌中的研究多有报道, Tasteyre 等^[14]采用 Dot blot 和放射性标记方法, Dingle 等^[15]采用诱导突变株方法获得 FliD 黏附功能的证据, 同时还认为 FliD 在不同艰难梭菌菌株中的黏附能力不等, 使细菌的毒力发生了变化。Koji Yonekura 等^[16]用电子显微镜和单粒图像分析技术研究了帽子蛋白-鞭毛丝复合体的结构, 阐述了鞭毛帽子蛋白质 FliD 的旋转为奇异变形杆菌鞭毛自体组装提供动力。张小燕等通过构建重组质粒, 在大肠杆菌中表达 FliD 蛋白, 证明在空肠弯曲菌 FliD 蛋白中具有良好抗原性^[17]。本研究中对 *fliD* 基因生物学特性探索过程中, 可以看出其对于空肠弯曲菌的运动能力有重要作用。半固体穿刺实验结果表明 *fliD* 基因失活会明显降低空肠弯曲菌运动力; *fliD* 突变株对 Caco-2 细胞的黏附侵袭力的明显下降也揭示了 *fliD* 基因失活降低了空肠弯曲菌运动能力, 提示 *fliD* 基因的作用机制可能是通过介导鞭毛的活力来影响细菌的运动力。弯曲菌在动物组织上的黏附和定殖是感染建立的重要步骤。许多先前的研究得出结论, 早期粘膜损伤是空肠弯曲菌黏附并入侵上皮细胞的结果^[18-19]。所

以在黏附侵袭实验中,我们选择 Caco-2 细胞模型,一种人克隆结肠腺癌细胞,结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞,用以模拟弯曲菌真实感染过程,从而探究 *fliD* 突变株的黏附侵袭能力。*fliD* 突变株黏附侵袭力的明显下降,不仅揭示了 *fliD* 基因失活降低了空肠弯曲菌的运动能力,还为 FliD 蛋白可能是弯曲菌感染细胞过程中的早期黏附因子提供了参考依据^[20]。与大多弯曲菌鞭毛基因突变体一样,*fliD* 突变体运动能力明显减弱,对细胞的黏附侵袭力显著降低。例如,惠星星等对空肠弯曲菌 *flhA* 突变株的研究表明,*flhA* 是空肠弯曲菌鞭毛生成和运动能力重要的分子基础,与空肠弯曲菌致病性密切相关^[6]。Murat 等发现空肠弯曲菌 *flhF* 突变株不能形成鞭毛,从而对细菌运动性产生影响,进一步影响细菌定殖、感染^[21]。Wassenaar 等发现,*flaB* 基因的突变体仍然具有运动性,而 *flaA* 基因的突变株无运动性,且不能黏附和侵袭宿主肠道细胞^[22]。最新研究证明空肠弯曲菌鞭毛丝帽盖蛋白 FliD 不仅介导细菌的运动力,还扮演着早期黏附因子的角色^[20],这一结论也与本研究的结果相符合。

本研究对 *fliD* 突变株生物学特性探究,为研究空肠弯曲菌中 *fliD* 基因的功能奠定了基础,但 *fliD* 基因具体的功能和作用机制还需要进一步研究证明。如 *fliD* 是如何参与空肠弯曲菌鞭毛在细菌运动力上的功能作用? FliD 蛋白作为弯曲菌感染细胞过程中的早期黏附因子的表达调节机制? *fliD* 基因型和表型差异是否细菌肠道定殖部位及生态小境?

参考文献

- [1] Meunier M, Guyard-Nicodème M, Dory D, Chemaly M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(5): 1139–1173.
- [2] Zeng XP. Research progress on flagellar system. *Journal of*

- Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(27): 13215–13217, 13222. (in Chinese)
- 曾县平. 细菌鞭毛系统的研究进展. *安徽农业科学*, 2012, 40(27): 13215–13217, 13222.
- [3] Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, Weerasekera R, Al Rashid S, Ward LA, Der SD, Chan VL. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 541–553.
- [4] Grant CC, Konkel ME, Cieplak W Jr, Tompkins LS. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infection and Immunity*, 1993, 61(5): 1764–1771.
- [5] Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(22): 6969–6976.
- [6] Hui XX, Li Y, Wang XY. Construction and characterization of *Campylobacter jejuni* *flhA* mutant strain. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(3): 458–464. (in Chinese)
- 惠星星, 李烨, 王小元. 空肠弯曲菌 *flhA* 突变株的构建及其功能研究. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(3): 458–464.
- [7] Joslin SN, Hendrixson DR. Activation of the *Campylobacter jejuni* FlgSR two-component system is linked to the flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(8): 2656–2667.
- [8] Kakuda T, DiRita VJ. Cj1496c encodes a *Campylobacter jejuni* glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 2006, 74(8): 4715–4723.
- [9] Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Groß U. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(4): 205–211.
- [10] Tang TS, Wang T, Zhu CQ, Jiang Y, Yao HC, Zhang CY, Xue F, Luan J. Development of monoclonal antibody against flagellin of *Campylobacter jejuni*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26(9): 843–846. (in Chinese)
- 唐泰山, 王婷, 祝长青, 蒋原, 姚火春, 张常印, 薛峰, 栾军. 空肠弯曲菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(9): 843–846.
- [11] Wassenaar TM, Fry BN, van der Zeijst BAM. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene*, 1993, 132(1): 131–135.
- [12] Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(6): 1447–1457.
- [13] Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(22): e97.
- [14] Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile*

- in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity*, 2001, 69(12): 7937–7940.
- [15] Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*, 2011, 79(10): 4061–4067.
- [16] Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science*, 2000, 290(5499): 2148–2152.
- [17] Zhang XY, Du XQ, Tang H, Lei TY, Huang JL, Jiao XA. Prokaryotic expression and antigenicity of recombinant *Campylobacter jejuni* FliD protein. *China Poultry*, 2016, 38(15): 21–25. (in Chinese)
张小燕, 杜雪晴, 唐虹, 雷天垚, 黄金林, 焦新安. 空肠弯曲菌 FliD 蛋白的原核表达与抗原性分析. *中国家禽*, 2016, 38(15): 21–25.
- [18] Field LH, Headley VL, Underwood JL, Payne SM, Berry LJ. The chicken embryo as a model for *campylobacter* invasion: comparative virulence of human isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infection and Immunity*, 1986, 54(1): 118–125.
- [19] Babakhani FK, Bradley GA, Joens LA. Newborn piglet model for campylobacteriosis. *Infection and Immunity*, 1993, 61(8): 3466–3475.
- [20] Freitag CM, Strijbis K, van Putten JPM. Host cell binding of the flagellar tip protein of *Campylobacter jejuni*. *Cellular Microbiology*, 2017, 19(6): e12714.
- [21] Balaban M, Joslin SN, Hendrixson DR. FlhF and its GTPase activity are required for distinct processes in flagellar gene regulation and biosynthesis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6602–6611.
- [22] Wassenaar TM, Bleumink-Pluym NM, Newel DG, Nuijten PJ, van der Zeijst BA. Differential flagellin expression in a *flaA flaB*⁺ mutant of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 1994, 62(9): 3901–3906.

Construction and characterization of a *Campylobacter jejuni* *fliD* mutant

Hong Tang, Xiaoyan Zhang, Xueqing Du, Zhaojun Song, Xin'an Jiao, Jinlin Huang*

Key Laboratory of Zoonoses of Jiangsu Province, Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infection Diseases and Zoonoses of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the biological characteristics of the *fliD* mutant strain to clarify the function and mechanism of *fliD* gene. [Methods] The *fliD* mutant was constructed through homologous recombination, and biological characteristics of the *fliD* mutant were identified in comparison with the wild type of *Campylobacter jejuni*. [Results] Mutant NCTC11168 Δ *fliD* presented the same biochemical indexes and similar growth curves of the wild type. After being inoculated into semisolid Mueller Hinton ager plate, the wild strain presented diffusion growth phenotype, but *fliD* mutant could only grow in the site inoculated, indicating that its motility was significantly reduced. The adhesion rate and invasion rate of *fliD* mutant were 164.00 ± 19.49 and 55.00 ± 6.09 respectively, which means that the mutation of *fliD* gene significantly reduced the rates of adhesion and invasion. [Conclusion] *fliD* gene was not only an important molecular basis for bacterial motility but also necessary for the adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* infection cells.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *fliD* gene, mutant, biological characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372449), by the Key Project of National Science and Technology Support Plan of China (2014BAD13B02) and by the Independent Innovation Fund Project of Agricultural Science and Technology in Jiangsu Province [CX(15)1009-2]

*Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

Received: 1 March 2017; Revised: 29 May 2017; Published online: 10 July 2017