



## 鸭源鸡杆菌 *ompW*、*gtxA* 双基因缺失株的构建及其相关特性分析

夏银河<sup>#</sup>, 王坤芄<sup>#</sup>, 刘盼盼, 王新卫, 常洪涛, 彭志锋, 刘红英, 陈陆, 杨霞\*, 王川庆

河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002

**摘要:** 鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*, *G. anatis*)是家禽中常见的条件性致病菌, 主要引起蛋鸡生殖道疾病, 造成产蛋量下降。【目的】为探究 RTX 样毒素 *GtxA* 及外膜蛋白(*OmpW*)对鸭源鸡杆菌生物学特性和致病力的影响。【方法】本研究采用自然转化法对突变株 *RZΔompW* 进一步缺失 *gtxA* 构建突变株 *RZΔompWΔgtxA*, 通过分析其生长特性、黏附能力、引起细胞凋亡程度及对小鼠致病性等, 探究其与生物学特性及致病性可能的关系。【结果】结果显示, *RZΔompWΔgtxA* 能稳定遗传 *gtxA* 的缺失; 单双基因突变株溶血活性均消失、与 *RZ* 株相比菌落形态及生长速率并未出现显著改变; 相比 *RZ*、*RZΔompW* 和 *RZΔgtxA*, 双基因缺失株 *RZΔompWΔgtxA* 在不同时段对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附能力显著降低 ( $P<0.05$ ), 诱导鸡输卵管上皮原代细胞发生凋亡的能力明显减弱, 对小鼠的致病力显著降低。【结论】*GtxA* 毒素和外膜蛋白 *OmpW* 在鸭源鸡杆菌毒力、黏附宿主细胞及诱导其细胞凋亡中起重要作用, 且可能存在明显的协同关系。本研究为鸭源鸡杆菌感染机制的阐明奠定基础。

**关键词:** 鸭源鸡杆菌, *RZΔompWΔgtxA* 缺失株, 生物学特性, 致病性

鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*, *G. anatis*)是巴氏杆菌科的一种条件性致病细菌, 该菌主要感染鸡、鸭、鹅、火鸡等<sup>[1]</sup>, 是一种革兰氏阴性菌。鸭源鸡杆菌主要定殖于上呼吸道及下生殖道, 输卵管是其重要靶器官, 感染后造成输卵管膨大部

和子宫部的黏膜充血、水肿, 引起输卵管炎、输卵管囊肿和腹膜炎, 导致蛋鸡产蛋高峰延迟、产蛋率下降, 死亡率增加<sup>[2-6]</sup>。目前, 关于鸭源鸡杆菌的致鸡输卵管炎、输卵管囊肿等的机制和毒力因子的探究成为科学研究的热点<sup>[7]</sup>, 已报道的鸭源鸡杆菌毒力相关因子包括 *GtxA* 毒素 (*Gallibacterium toxin*, *GtxA*)、外膜蛋白(*Outer*

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(172102110046); 河南省自然科学基金(162300410153)

<sup>#</sup>共同第一作者。

\*通信作者。E-mail: yangxia66@163.com

收稿日期: 2019-12-20; 修回日期: 2020-03-18; 网络出版日期: 2020-04-15

membrane proteins, Omps)、菌毛(Fimbrial)、外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs)及金属蛋白酶(Metalloproteases)等<sup>[8]</sup>。OmpW 是普遍存在于革兰阴性菌中的一类特殊的孔蛋白,与疏水性分子的跨膜转运功能密切相关<sup>[9-11]</sup>。据报道 OmpW 有许多重要的性能,包括免疫原性、抗环境压力、抗药性、抗补体杀伤作用等,且与细菌毒力的增加及感染疾病的产生相关<sup>[12-15]</sup>。RTX 毒素是一种通过 I 型分泌系统分泌到细胞外的成孔蛋白,可直接袭击宿主细胞,支配病原菌对宿主细胞的作用<sup>[16-18]</sup>。鸭源鸡杆菌 RTX 样毒素 GtxA 对多种宿主的红细胞具有溶血活性,且对鸡巨噬细胞株 HD<sub>11</sub> 具有白细胞毒活性<sup>[19-20]</sup>。GtxA 与 OmpW 都是鸭源鸡杆菌重要的毒力因子,明确两者对鸭源鸡杆菌的影响及其相互关系对探究鸭源鸡杆菌的致病机理具有重要意义。

鉴于此,本研究以中国分离株鸭源鸡杆菌 PDS-RZ-1-SLG (RZ)为研究对象,在缺失株 RZ $\Delta$ ompW 的基础上进一步构建突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA,分析突变株生物学特性变化,同时利用实验室前期成熟的鸡原代输卵管上皮细胞感染模型<sup>[21-22]</sup>及小鼠感染模型<sup>[23]</sup>,探究 OmpW 及 GtxA 毒素在鸭源鸡杆菌感染中的作用及二者的互作关系,为更深一步研究鸭源鸡杆菌的致病机理提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

鸭源鸡杆菌 Yu-PDS-RZ-1-SLG(RZ)株由本实验室分离鉴定并保存<sup>[24]</sup>;鸭源鸡杆菌缺失株 RZ $\Delta$ ompW 及 RZ $\Delta$ gtxA 由本实验室构建保存<sup>[12,25]</sup>;pBC-Tn903 质粒(哈尔滨兽医研究所,郭东春副教

授惠赠);pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 试剂和培养基

Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合液、DNA Marker、限制性内切酶(大连宝生物工程有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(天津三箭生物股份有限公司),兔抗重组蛋白 rGtxA 多抗(实验室制备保存)<sup>[25]</sup>,超灵敏 ECL 化学发光即用型底物(AR1173)购自博士德生物工程公司;L-天冬氨酸, L-谷氨酸, 富马酸(反丁烯二酸), NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 吐温 80, L-胱氨酸, L-酪氨酸, L-瓜氨酸, L-苯丙氨酸, L-丝氨酸, L-丙氨酸, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, 无维生素酪蛋白氨基酸和 BHI 培养基(北京索莱宝科技有限公司);血琼脂平板(郑州贝瑞特有限公司),酵母浸膏、蛋白胨(大连宝生物工程有限公司)。

### 1.3 引物的设计与合成

参照文献 [25] 从 NCBI(GenBank 登录号 NC015460.1)获得 gtxA 基因序列,设计上游同源臂引物 gtxA-U-F/gtxA-U-R、下游同源臂引物 gtxA-D-F/gtxA-D-R、转化片段引物 PSKX-F/PSKX-R 及突变菌株鉴定引物 gtxA-T-F/gtxA-T-R。同时根据质粒 pBC-Tn903 的序列信息,设计卡那霉素的引物 Kan-F/Kan-R。本研究所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

### 1.4 同源重组质粒 pMD18T-U-K-D 的构建

以鸭源鸡杆菌基因组为模板,利用引物 gtxA-U-F/gtxA-U-R 与 gtxA-D-F/gtxA-D-R 扩增获得 gtxA 基因上下游同源臂。同时以 pBC-Tn903 质粒为模板 PCR 扩增获得卡那霉素筛选标记。用 Xma I 和 BamH I 对回收纯化上游同源臂双酶切构建 pMD18T-U 质粒。回收纯化的下游同源臂和

表 1. 构建突变株  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  所需引物  
Table 1. Primer used in establishing  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  mutant strain

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size/bp
gtxA-U-F	<u>TCCCCCGGGCCAAAATGGAGTAGTGAT</u>	1507
gtxA-U-R	<u>CGCGGATCCCTGTTGCAGATTGACAAC</u>	
gtxA-D-F	<u>CGCGGATCCAAGCAAGAAAACAGCCA</u>	1498
gtxA-D-R	<u>AACTGCAGCTCGGTGAAATGGTTAA</u>	
Kan-F	<u>CGCGGATCCACATAAACAGTAATACAA</u>	966
Kan-R	<u>CGCGGATCCTTGTCGGGAAGATGCG</u>	
gtxA-T-F	ACCTTATGTATGCTCCTATG	Wild: 2677
gtxA-T-R	AAAAATCGGGCAGGAAATCT	Mutant: 1396
PSKX-F	CTCCAAAATGGAGTAGTGAT	4001
PSKX-R	GCTCGGTGAAATGGTTAAT	

Underlined are protective bases and restriction sites.

pMD18T-U 质粒经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切构建 pMD18T-U-D, 然后将该质粒和抗性标记片段经 *Bam* H I 单酶切、碱性磷酸酶处理后进行连接构建 pMD18T-U-K-D, 将其转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选转化菌落, PCR、酶切鉴定为阳性的转化子进一步序列测定, 序列鉴定正确后, 保存备用。

### 1.5 $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$ 基因突变株的构建及筛选

以重组质粒 pMD18T-U-K-D 为模板, 用引物 *gtxA*-T-F/*gtxA*-T-R 进行 PCR 扩增 U-K-D 片段。依据 Poje 等<sup>[10]</sup>报道的方法制备鸭源鸡杆菌  $RZ \Delta ompW$  株感受态细胞, 加 1  $\mu$ g 转化片段 U-K-D 到 1 mL 感受态细胞中, 37 °C、100 r/min 培养 25 min; 加 2 mL 含 5% 犊牛血清的 BHI, 37 °C、100 r/min 培养 100 min 后涂于卡那霉素抗性平板, 37 °C、48 h 后挑选转化子。对挑选到的能够稳定表达 *Kan*<sup>+</sup> 的菌株提取基因组, 用 *gtxA*-T-F/*gtxA*-T-R 引物进行 PCR 鉴定。鉴定阳性的转化子扩增物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.6 Western blotting 鉴定

将鸭源鸡杆菌 RZ 株和  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  单一

菌落接种至不含 *Kan*<sup>+</sup> 抗性的 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 当其 *OD*<sub>600</sub>=1.0 时, 收集菌体先进行 SDS-PAGE, 然后以兔抗重组蛋白 rGtxA 多抗为一抗, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体为二抗, 进行 Western blotting 分析。

### 1.7 突变株 $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$ 生物学特性分析

采用分区划线法分别将鸭源鸡杆菌 RZ 株、 $RZ \Delta ompW$ 、 $RZ \Delta gtxA$  和  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  接种于绵羊血琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 观察各菌株的溶血活性、菌落特征。另外, 在相同培养条件下, 取上述各菌株分别同步接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 间隔 1 h 测定 *OD*<sub>600</sub>, 每个测定均重复 3 次, 绘制每株细菌的生长曲线。

### 1.8 突变株的遗传稳定性分析

**1.8.1 突变株的体外遗传稳定性检测:** 取  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  单菌落划线于 BHI 固体培养基中连续盲传 10 代, 从不同代次中随机挑取单菌落于 5 mL 含 *Kan*<sup>+</sup> 抗性的 BHI 液体培养基中培养, 用 *gtxA*-T-F/*gtxA*-T-R 引物 PCR 扩增鉴定  $RZ \Delta ompW \Delta gtxA$  中 *gtxA* 基因缺失的遗传稳定性。

**1.8.2 突变株的小鼠体内遗传稳定性检测:** 挑取

RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 株单菌落于 5 mL 的 BHI 液体培养基中, 培养至菌体量为  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL 后重悬菌体, 每只小鼠(购自河南省实验动物中心, 体型大小一致的 8 周龄清洁级昆明小鼠)腹腔注射 500  $\mu$ L RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 株, 给对照组小鼠腹腔注射等剂量 PBS 作为对照, 7 d 后剖检存活小鼠并取各组织器官进行细菌分离, PCR 进行鉴定。采用分区划线法将鉴定正确的鸭源鸡杆菌菌株继续培养并对小鼠进行腹腔注射, 检测观察 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 株中 *gtxA* 基因缺失株在小鼠体内的遗传 5 代的稳定性。

### 1.9 突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 对原代输卵管上皮细胞的黏附的测定

鸡原代输卵管上皮细胞的制备与黏附试验参照文献[11,21–22,26–27]提供的方法并稍加改动。长满单层的细胞更换新培养液并以感染复数(MOI=100)加入待测细菌, 置 37 °C、5%的 CO<sub>2</sub> 培养 30–120 min, 期间每间隔 30 min 取样, 弃培养基, 经 PBS 洗涤及胰酶-EDTA 消化, 离心收集细胞, 用 1%的 Triton X-100 溶解细胞, 并用 PBS 混匀制成悬液做 10 倍倍比稀释, 各稀释度取 100  $\mu$ L 进行活菌计数, 计算每孔溶解液中的细菌数量。每个样品均设置 4 个重复, 试验重复 3 次, 取每孔黏附细菌的数量的对数值作为结果。

### 1.10 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 感染鸡原代输卵管上皮细胞后细胞凋亡检测

鸡原代输卵管上皮细胞制备方法同 1.9。根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行试验操作; 设 RZ、RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA、RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 和对照组, 共 5 个试验组, 将感染 2、4、6 h 后的细胞分别用胰酶(无 EDTA)消化后收集, PBS 洗涤 2 次(2000 r/min, 5 min); 依次加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 于洗涤后的细胞中, 混

匀, 然后分别加入 5  $\mu$ L Propidium iodide 混合均匀; 室温避光作用 10 min 后置荧光显微镜下观察凋亡情况。Annexin V 与凋亡早期细胞膜结合后荧光显微镜下呈绿色荧光; Propidium iodide 结合中晚期凋亡和死细胞后, 细胞核呈红色荧光, 由此来判断 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 致鸡原代输卵管上皮细胞凋亡程度的检测。

### 1.11 半数致死量(LD<sub>50</sub>)的测定

对鸭源鸡杆菌 RZ 株、RZ $\Delta$ ompW 株、RZ $\Delta$ gtxA 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 株分别进行 LD<sub>50</sub> 测定, 具体操作如下: 在 BHI 培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值约为 0.8, 收集菌体, 用 PBS 洗涤 2 次, 并用 PBS 将菌液浓度调整为  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL, 以 5 倍倍比法稀释成 4 个稀释度; 取 60 只体型大小一致的 8 周龄清洁级昆明小鼠(购自河南省实验动物中心), 随机分为 5 组(12 只/组), 其中 1–4 组分别腹腔注射倍比稀释的菌液 0.4 mL; 第 5 组为对照组, 注射 0.4 mL PBS, 连续 7 d 观察小鼠的死亡情况, 按改良寇氏法分别计算 RZ 株、RZ $\Delta$ ompW 株、RZ $\Delta$ gtxA 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 的 LD<sub>50</sub>。

### 1.12 统计分析

对试验结构采用 Graphpad Prism 7 作图表示, IBM SPSS Statistics26 软件进行数据分析, 同时采用方差分析 *T* 检验进行统计学处理, 以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组质粒 pMD18T-U-K-D 构建与鉴定

以鸭源鸡杆菌基因组为模板, 经 PCR 扩增分别得到与预期大小一致的 *gtxA* 基因 1508 bp 左右

上游同源臂、966 bp 左右下游同源臂; 以 pBC-Tn903 质粒为模板 PCR 扩增获得大小为 1484 bp 左右的卡那抗性片段。对构建的重组质粒 pMD18T-U-K-D 分别采用 PCR、*Bam*H I 单酶切和用 *Xma* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定, 酶切片段与预期片段大小一致(图 1), 经测序结果正确, 表明重组质粒 pMD18T-U-K-D 正确构建。

## 2.2 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 的鉴定

用引物 *gtxA*-T-F/*gtxA*-T-R 对具有稳定 *Kan*<sup>+</sup> 的鸭源鸡杆菌菌液进行 PCR 鉴定。突变株 *RZΔompWΔgtxA* 和重组质粒约在 1396 bp 处出现目的条带, 鸭源鸡杆菌 RZ 株在约 2677 bp 处出现

目的条带(图 2), 通过进一步对目标序列测序分析, 证实了突变株 *RZΔompWΔgtxA* 的扩增片段为靶片段 U-K-D, 证明 *gtxA* 基因缺失成功, 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 构建正确。

## 2.3 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 的 Western blotting 鉴定

对突变株 *RZΔompWΔgtxA* 及 RZ 株进行 Western blotting 验证, 结果显示, 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 在相应大小的位置没有蛋白条带, 而亲本株 RZ 在大约 220 kDa 处出现条带(图 3), 表明突变株 *RZΔompWΔgtxA* 不表达 *GtxA*, 从而在蛋白水平证明突变株 *RZΔompWΔgtxA* 构建成功。

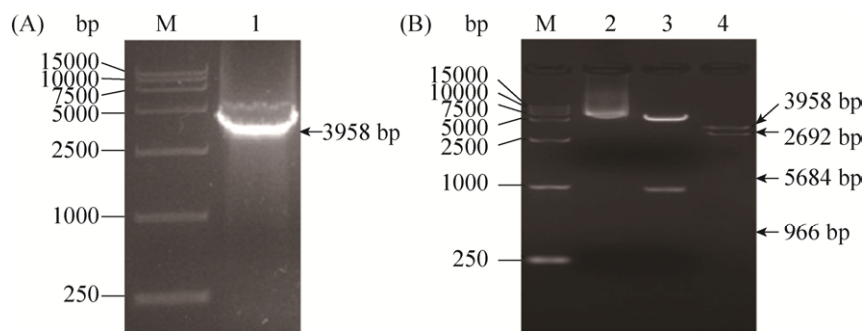


图 1. 质粒 pMD18T-U-K-D PCR 及酶切鉴定

Figure 1. Plasmid pMD18T-U-K-D PCR and digestion identification. M: DL15000 DNA marker; lane 1: Plasmid pMD18T-U-K-D PCR product; lane 2: Plasmid pMD18T-U-K-D; lane 3: *Bam*H I single digestion; lane 4: *Xma* I and *Pst* I double digestion.

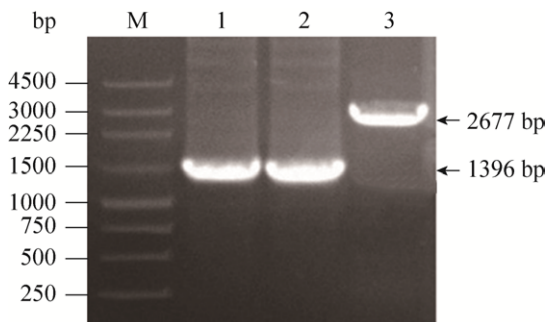


图 2. *G.anatis* *RZΔompWΔgtxA* 突变株 PCR 鉴定

Figure 2. PCR analysis of *G. anatis* strain *RZΔompWΔgtxA*. M: 250 bp ladder DNA marker; lane 1: *RZΔompW ΔgtxA*; lane 2: Plasmid pMD18T-U-K-D; lane 3: Wild type strain RZ.

## 2.4 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 的生物学特性分析

鸭源鸡杆菌 RZ 株和突变株 *RZΔompW*、*RZΔgtxA*、*RZΔompWΔgtxA* 经 37 °C 培养 24 h 后, 均长出半透明、灰白色、有完整边缘、直径 1–2 mm 的圆形菌落; 3 株缺失突变株菌落大小形态与原始亲本株 RZ 无显著变化, 但 *RZΔgtxA*、*RZΔompWΔgtxA* 溶血环均消失而 *RZΔompW* 溶血环无明显变化, 表明 *gtxA* 的缺失改变了鸭源鸡杆菌溶血活性, *ompW* 和 *gtxA* 单独或者同时缺失菌落形态及大小没有显著影响。

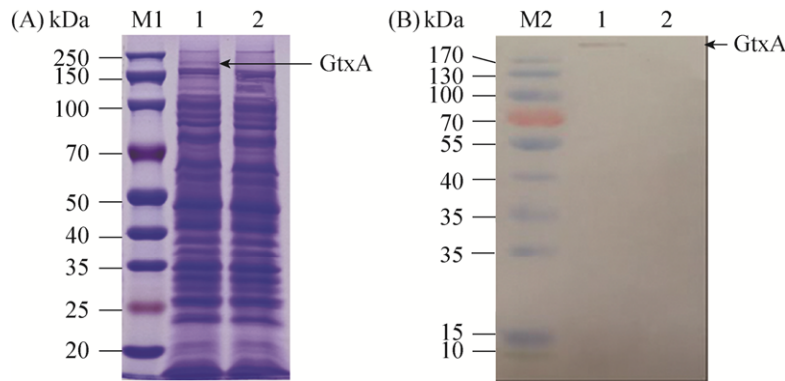


图 3. SDS-PAGE (A)及 Western blotting (B)分析鸭源鸡杆菌 RZ 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA

Figure 3. Analysis of RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA and RZ by SDS-PAGE and Western blotting. M1: Prestained protein ladder 10–250 kDa; M2: Prestained protein ladder 10–170 kDa. lane 1: RZ; lane 2: RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA.

在相同培养条件下培养鸭源鸡杆菌 RZ、RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA，每隔 1 h 测定菌液  $OD_{600}$  值并绘制细菌生长曲线(图 4)。结果显示，4 株菌生长速率和生长状态相仿，虽生长曲线显示 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 与其他 3 株相比生长速度稍缓慢，但无统计学差异( $P$  值均大于 0.05，差异不显著)。

## 2.5 突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 遗传稳定性分析

将突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 接种 BHI 培养基中持续盲传至 10 代，依次挑取 1 至 10 代单菌落，

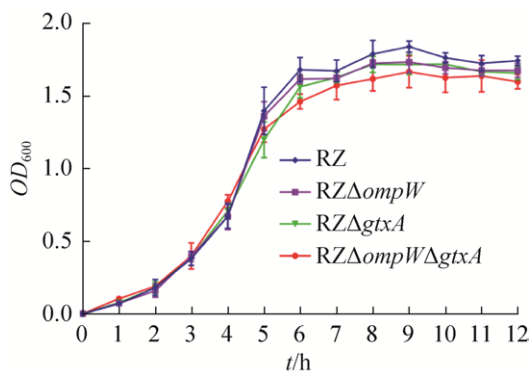


图 4. 鸭源鸡杆菌生长曲线

Figure 4. The growth curve of *G. anatis*. The values shown are the means of at least three biological replicates, with the error bars representing standard deviations of the mean. Statistical significance was determined by *T* test.

用引物 *gtxA*-T-F/*gtxA*-T-R 进行 PCR 鉴定，结果显示，各代次突变株均扩增出 1396 bp 左右目的条带(图 5-A)。同时用 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 在小鼠体内连续传递 5 代，分离各组织中细菌，分别使用鸭源鸡杆菌特异性鉴定引物和突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 特异性鉴定引物进行 PCR 鉴定，结果显示各代次均能使用鸭源鸡杆菌特异性鉴定引物扩增出 3 条目的条带，鉴定正确(图 5-B)；突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 特异性鉴定引物均能扩增出各代次长度约为 1396 bp 的目的条带(图 5-C)，由此表明在突变株 RZ $\Delta$ ompW 基础上构建的突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 在普通培养基和小鼠体内均能稳定遗传 *gtxA* 基因片段的缺失。

## 2.6 突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附能力

4 株鸭源鸡杆菌均能黏附在鸡原代输卵管上皮细胞，由图 6 可知，60 min 至 120 min 4 组鸭源鸡杆菌的黏附能力随时间延长每个孔中黏附细菌数量也逐渐增加，在 90 min 时达到最大值；但突变株 RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附能力始终低于鸭源鸡杆菌亲本株 RZ，在 3 个时段组间亲本株 RZ 与

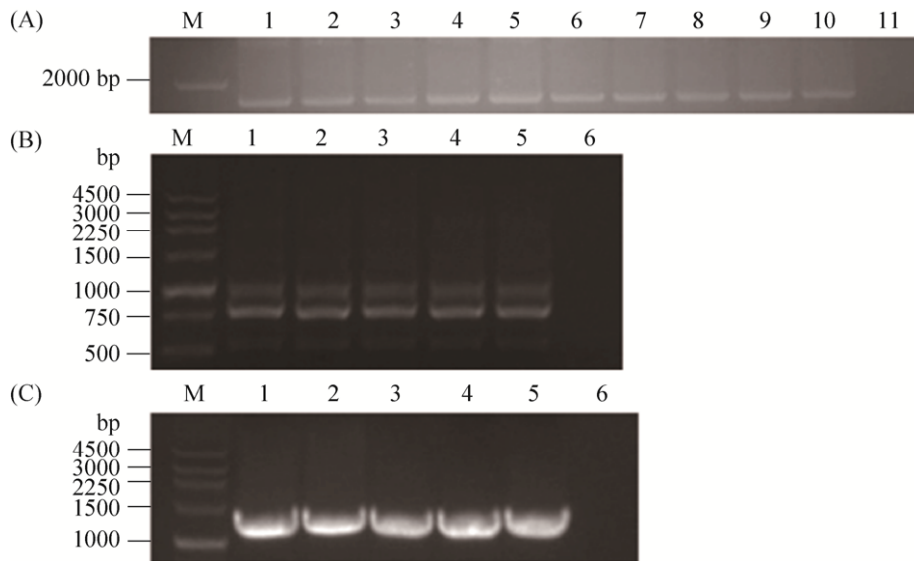


图 5. 突变株小鼠体内、体外遗传稳定性分析鉴定

Figure 5. Identification of mutants by genetic stability analysis in mice *in vitro*. A: Analysis of the heredity stability *in vitro*. M: DNA marker DL2000; lane 1–10: *RZΔompWΔgtxA*; lane 11: Negative control. B: *G. anatis* specific PCR identification. C: Identification of mutants by genetic stability analysis in mice. M: 250 bp ladder DNA marker; lane 1–5: *RZΔompWΔgtxA*; lane 6: Negative control.

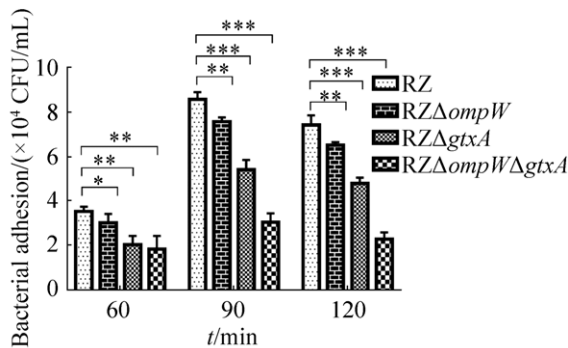


图 6. 鸭源鸡杆菌亲本株 *RZ*、*RZΔompW*、*RZΔgtxA* 和 *RZΔompWΔgtxA* 对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附  
Figure 6. Kinetics of adherence of *G. anatis* Yu-PDS-RZ-1-SLG, *RZΔompW*, *RZΔgtxA* and *RZΔompWΔgtxA* strains to COECs primary chicken oviduct epithelial cells. The values shown are the means of at least three biological replicates, with the error bars representing standard deviations of the mean. Statistical significance was determined by *T* test; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

*RZΔompW*、*RZΔgtxA* 和 *RZΔompWΔgtxA* 对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附能力相比差异均显著 ( $P < 0.05$ )。*RZΔompWΔgtxA* 在不同时段对鸡原代输卵管上皮细胞的黏附能力明显低于其他 3 组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.7 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 的细胞凋亡试验

用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测各受试菌株感染鸡原代输卵管上皮细胞后不同时间点对细胞凋亡的影响。荧光染色显微镜观察结果显示(图 7), 与鸭源鸡杆菌 *RZ*、突变株 *RZΔompW* 及 *RZΔgtxA* 相比, 突变株 *RZΔompWΔgtxA* 感染鸡输卵管上皮原代细胞后诱导其发生凋亡的能力和程度明显减弱。

### 2.8 半数致死量( $LD_{50}$ )的测定

对小鼠注射鸭源鸡杆菌 *RZ*、突变株 *RZΔgtxA*、突变株 *RZΔompW* 及突变株 *RZΔompWΔgtxA* 不同

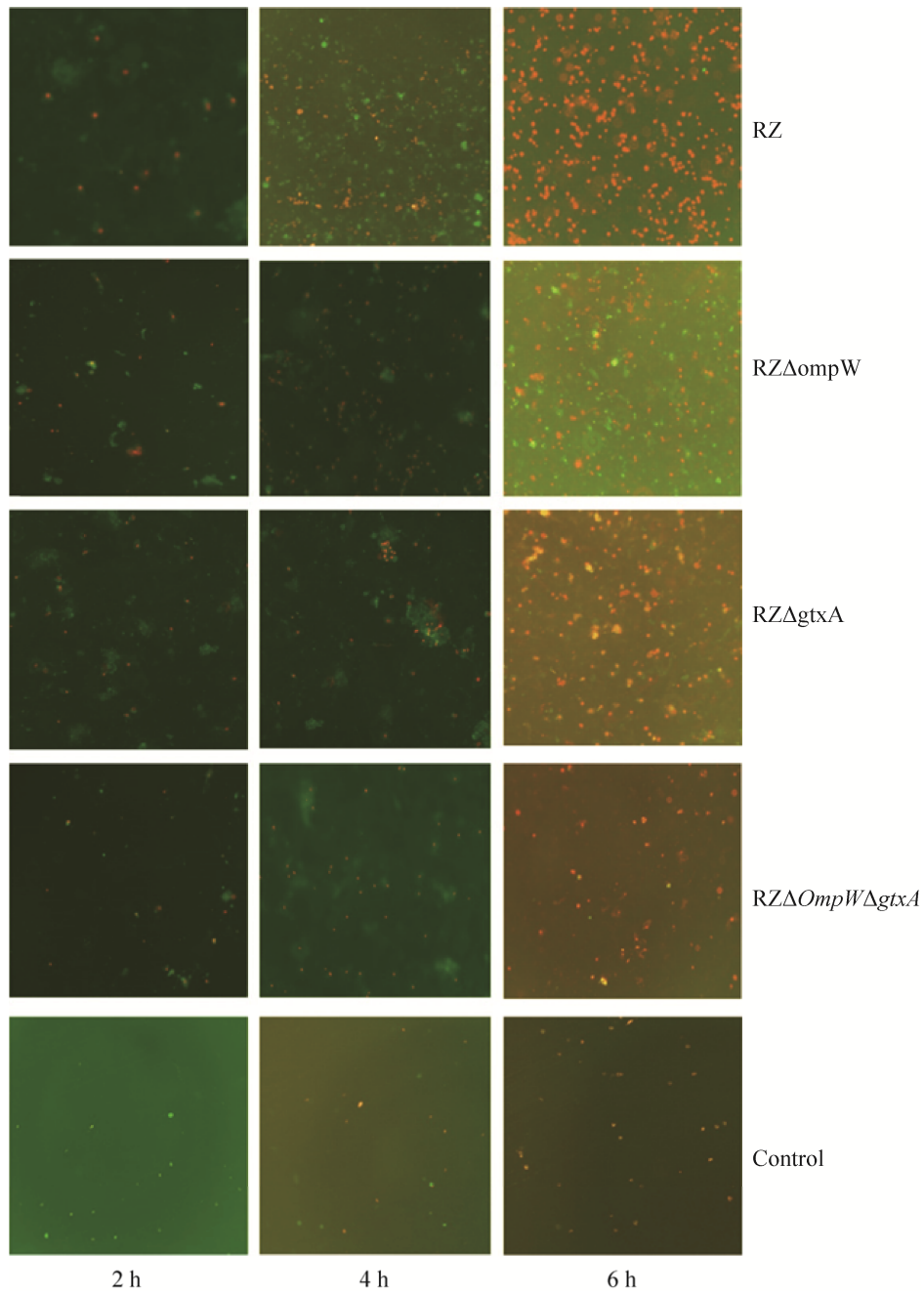


图 7. 鸭源鸡杆菌感染输卵管上皮细胞后对细胞发生凋亡的影响

Figure 7. The effect on COECs cell primary chicken oviduct epithelial cells apoptosis after infection with *G. anatis*.

稀释度的各菌液，并观察记录死亡数据，依据寇氏法得出亲本株 RZ、RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 及 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 的  $LD_{50}$  分别为  $2.73 \times 10^8$  CFU、 $4.08 \times 10^8$  CFU、 $4.32 \times 10^8$  CFU、 $8.61 \times 10^8$  CFU(图 8)。

### 3 讨论

鸭源鸡杆菌作为鸡杆菌属近期得以确认的条件性致病菌之一，已有大量研究表明其在临床



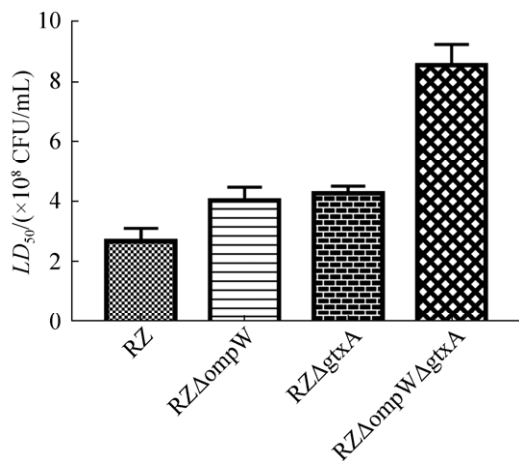


图 8. 小鼠半数致死量( $LD_{50}$ )的测定

Figure 8. Determination of the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) in mice.

致病和动物福利方面的重要影响, 有关鸭源鸡杆菌的生物学特性分析、致病基因鉴定、毒力因子间的相互关系的探究已经成为国内外的研究热点<sup>[24,28-33]</sup>。RTX 毒素是革兰阴性菌中普遍存在的成孔蛋白, 鸭源鸡杆菌分泌型毒素 GtxA 是当前研究最多的毒力因子, 是溶血型鸭源鸡杆菌具有溶血活性的基础, 有研究表明其还可能与细菌的免疫逃避有关<sup>[34-36]</sup>。OmpW 属于外膜蛋白家族成员之一, 在鸭源鸡杆菌中普遍存在, 基因保守性较高, 含有多个抗原表位, 与抗环境应激能力、免疫原性、耐药性和细菌毒力相关<sup>[13-15]</sup>。

自然条件下有些细菌为适应环境变化而拥有自然转化能力, 并由此获得外源 DNA、得到稳定遗传的新性状。Kristensen 等<sup>[11]</sup>在 2012 年发现鸭源鸡杆菌有自然感受性的特点, 且发现通过电转化方式不能有效地对染色体整合, 环形质粒转化效率远远低于线性 DNA 片段, 而自然转化的效率明显高于电转化<sup>[20]</sup>。因此, 本研究利用该菌的自然感受性特点, 通过自然转化法将靶基因片段以线性化形式转化进入 RZ $\Delta$ OmpW 单基因缺失株

中, 成功构建了 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 双基因缺失株, 并进行相关特性分析。相比 RZ 株, 突变株 RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 与 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 菌落形态、生长特性无显著变化, 但后两者溶血活性消失; 且突变株 RZ $\Delta$ OmpW/ $\Delta$ gtxA 能够稳定遗传 gtxA 基因的缺失; 表明 ompW、gtxA 基因的缺失并未影响鸭源鸡杆菌正常的生长代谢, 两个基因可能不是鸭源鸡杆菌正常生长过程中的必需基因, 与实验室前期研究成果一致<sup>[12-14,25,36]</sup>; 研究表明, 鸭源鸡杆菌分泌型毒素 GtxA 是鸭源鸡杆菌具有溶血活性的基础<sup>[34-36]</sup>, 本研究中突变株 RZ $\Delta$ ompW 溶血活性正常而 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 溶血活性消失, 进一步验证了 gtxA 基因参与调控鸭源鸡杆菌的溶血作用。黏附力是决定细菌致病性的关键环节<sup>[37]</sup>, 本研究结果显示突变株 RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 和 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 均能黏附鸡原代输卵管上皮细胞, 且随着时间的增加而上升, 90 min 时达到最大值, 但黏附力在各时段均低于 RZ 株, 尤其是双基因缺失突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 的黏附力与各菌株差异更显著, 黏附力下降尤其明显, 由此表明, ompW 与 gtxA 两基因均与鸭源鸡杆菌的黏附能力有关。在细胞凋亡测定试验中, 荧光显微镜下能很清晰地显示出双缺失突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA 诱导细胞凋亡的能力明显低于单缺失株 RZ $\Delta$ ompW、RZ $\Delta$ gtxA 和原始株 RZ, 差异显著, 且突变株 RZ $\Delta$ ompW $\Delta$ gtxA、RZ $\Delta$ ompW 和 RZ $\Delta$ gtxA 诱导细胞凋亡的能力与原始分离株 RZ 相比均明显下降, 该测定结果显示了 ompW 与 gtxA 均与鸭源鸡杆菌诱导宿主细胞发生凋亡能力有关, 但 ompW 和 gtxA 基因在鸭源鸡杆菌诱导宿主细胞发生细胞凋亡的过程中发挥的作用机制仍有待进一步的研究; 此外, 我们在做荧光显微镜测定细胞

凋亡的同时进行了流式细胞术检测, 检测结果显示各菌株诱导细胞凋亡的趋势与荧光显微镜下测定是一致的, 但数据分析差异不如荧光显微镜下观察显著, 其主要原因可能由于原代细胞培养更易受化学试剂影响、试验处理难度系数高及实验操作等过程造成的影响, 导致进行流式细胞术检测结果与荧光显微镜图片相比较显著度稍微降低, 故我们仅仅展示了荧光显微镜下检测的结果。

小鼠半数致死量( $LD_{50}$ )测定结果显示亲本株 RZ 的  $LD_{50}$  最低, RZ $\Delta$ OmpW/ $\Delta$ gtxA 最高( $8.61 \times 10^8$  CFU), 对小鼠致病力也均比单基因缺失株明显降低, 基于试验结果, 我们认为两者可能具有协同作用。另外, 该菌虽然也能通过电转化或自然转化法低效率摄入一些环形质粒, 但其具有倾向于摄取自身 DNA 的特性(常用大肠杆菌载体质粒往往不行)<sup>[20]</sup>。鉴于细菌的上述特点, 本研究尽管尝试用与鸭源鸡杆菌同科的其他菌的穿梭载体进行转化, 但一直未能成功构建回补株。

本研究结果表明, 毒力因子 OmpW 和 GtxA 的缺失对鸭源鸡杆菌的生长性能和菌落形态无明显影响, 与细菌诱导细胞凋亡的能力、粘附细胞性能、毒力、致病力等密切相关, 且 ompW 和 gtxA 基因同时缺失引起其黏附力、细胞凋亡等下降尤为显著。但鉴于细菌的感染是个复杂的过程, 两基因之间呈累积作用还是协同作用, 还有待进一步研究并结合其他因子深入分析。

## 参 考 文 献

[1] Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov.

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 275–287.

- [2] Hacking WC, Pettit JR. *Pasteurella hemolytica* in pullets and laying hens. *Avian Diseases*, 1974, 18(3): 483–486.
- [3] Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathology*, 2003, 32(5): 503–510.
- [4] Paudel S, Liebhart D, Hess M, Hess C. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. Folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers. *Avian Pathology*, 2014, 43(5): 443–449.
- [5] Mushin R, Schoenbaum M. A strain of *Pasteurella multocida* associated with infections in rabbit colonies. *Laboratory Animals*, 1980, 14(4): 353–356.
- [6] Håstein T, Roald S O, Kjos-Hansen B, Staveland K. Occurrence of gaffkaemia in Lobsters in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1977, 18(1): 138–139.
- [7] Persson G, Bojesen A M. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary Research*, 2015, 46: 57, doi: 10.1186/s13567-015-0206-z
- [8] Bager RJ, Persson G, Nesta B, Soriani M, Serino L, Jeppsson M, Nielsen TK, Bojesen AM. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3/4): 565–572.
- [9] Wang C, Robles F, Ramirez S, Riber AB, Bojesen AM. Culture-independent identification and quantification of *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) by real-time quantitative PCR. *Avian Pathology*, 2016, 45(5): 538–544.
- [10] Poje G, Redfield RJ. Transformation of *Haemophilus influenzae*. *Methods in Molecular Medicine*, 2003, 71: 57–70.
- [11] Kasperczyk K, Bajek A, Joachimiak R, Walasik K, Marszałek A, Drewa T, Bednarczyk M. *In vitro* optimization of the *Gallus domesticus* oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology*, 2012, 77(9): 1834–1845.
- [12] 敬文宪. 鸭源鸡杆菌中国株外膜蛋白 W 基因鉴定及其敲除株的构建. 河南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [13] Jing WX, Peng ZF, Wang XW, Change HT, Liu HY, Wang CQ, Lu CJ, Yang X. Cloning of the outer membrane protein W gene of *Gallibacterium anatis* and analysis of its structure and function. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(1): 47–53. (in Chinese)  
敬文宪, 彭志锋, 王新卫, 常洪涛, 刘红英, 王川庆, 卢彩景, 杨霞. 鸭源鸡杆菌外膜蛋白 W 基因克隆及结构与功能分析. *中国兽医学报*, 2017, 37(1): 47–53.
- [14] Peng ZF, Cui DD, Yang X, Jing WX, Wang ZT, Wang KP, Wang CQ. Construction of ompW gene deletion strain of

- Gallibacterium anatis* and its susceptability to antibacterial agents. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(7): 1306–1313. (in Chinese)
- 彭志锋, 崔丹丹, 杨霞, 敬文宪, 王忠田, 王坤芑, 王川庆. 鸭源鸡杆菌 *ompW* 基因缺失菌株的构建及其药物敏感性分析. 畜牧兽医学报, 2017, 48(7): 1306–1313.
- [15] 邹海杰. 铁离子调节革兰氏阴性菌外膜蛋白 *OmpW* 抗宿主氧化应激作用及机制的研究. 浙江理工大学硕士学位论文, 2012.
- [16] Chen K, Xu JG. Characteristics and detection of RTX toxins. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(3): 247–250. (in Chinese)
- 陈凯, 徐建国. RTX 毒素的特征及检测. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(3): 247–250.
- [17] Fan SX, Liu H, Chen Y, Chen HC, He QG. Interaction between *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin and host-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(2): 141–146. (in Chinese)
- 范盛先, 刘辉, 陈杨, 陈焕春, 何启盖. 胸膜肺炎放射杆菌 RTX 毒素与宿主的相互作用. 微生物学报, 2009, 49(2): 141–146.
- [18] Zhu J, Xu JG. RTX toxin and its interaction with target cells. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(10): 906–908. (in Chinese)
- 朱静, 徐建国. RTX 毒素及其与靶细胞的相互作用. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(10): 906–908.
- [19] Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 116–123.
- [20] Kristensen BM, Sinha S, Boyce JD, Bojesen AM, Mell JC, Redfield RJ. Natural Transformation of *Gallibacterium anatis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(14): 4914–4922.
- [21] Zhang XP, Chen L, Liu HY, Wang CQ, Yao HX, Yang X. Primary culture and identification of chicken oviduct epithelial cells *in vitro*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(6): 999–1004. (in Chinese)
- 张秀平, 陈陆, 刘红英, 王川庆, 姚惠霞, 杨霞. 鸡原代输卵管上皮细胞体外分离培养与鉴定. 中国兽医学报, 2015, 35(6): 999–1004.
- [22] Zhang XP, Lu CJ, Chen L, Li YT, Liu HY, Peng ZF, Jing WX, Yang X, Wang CQ. Impact of *Gallibacterium anatis* on chicken oviduct epithelial cells. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(2): 228–233, 239. (in Chinese)
- 张秀平, 卢彩景, 陈陆, 李永涛, 刘红英, 彭志锋, 敬文宪, 杨霞, 王川庆. 鸭源鸡杆菌对鸡原代输卵管上皮细胞作用. 中国兽医学报, 2016, 36(2): 228–233, 239.
- [23] 付仁一, 陈陆, 杨霞, 皇甫和平, 郑鹿平, 刘慧敏, 郭伦涛, 徐雪, 王川庆. 卡氏杆菌对小鼠致病力试验研究//中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十三次学术研讨会论文集. 南宁: 中国畜牧兽医学会, 2009: 4.
- [24] Li H, Yang X, Zhao J, Wei YP, Chen L, Wang XW, Chang HT, Li YT, Liu HY, Wang CQ. Expression of *G. anatis* toxin GtxA and development of an indirect ELISA for the detection of serum antibody against GtxA in chickens. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(1): 50–56. (in Chinese)
- 李欢, 杨霞, 赵军, 魏亚鹏, 陈陆, 王新卫, 常洪涛, 李永涛, 刘红英, 王川庆. 鸭源鸡杆菌毒素蛋白 GtxA 表达和间接 ELISA 方法的建立及初步应用. 中国兽医学报, 2015, 35(1): 50–56.
- [25] Wang JY, Peng ZF, Liu PP, Wang KP, Wang CQ, Chen L, Zhao J, Yang X. Construction and characterization of gtxA gene mutant strain of *Gallibacterium anatis*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(3): 414–420. (in Chinese)
- 王继洋, 彭志锋, 刘盼盼, 王坤芑, 王川庆, 陈陆, 赵军, 杨霞. 鸭源鸡杆菌 gtxA 突变株构建及其生物特性分析. 中国兽医学报, 2019, 39(3): 414–420.
- [26] Bager RJ, Nesta B, Pors SE, Soriani M, Serino L, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM, Bliska JB. The fimbrial protein FlfA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate. *Infection and immunity*, 2013, 81(6): 1964–1973.
- [27] Zhang XP, Lu CJ, Li YT, Yang X, Wang XW, Chang HT, Liu HY, Chen L, Zhao J, Wang CQ, Chang YF. *In vitro* adherence and invasion of primary chicken oviduct epithelial cells by *Gallibacterium anatis*. *Veterinary Microbiology*, 2017, 203: 136–142.
- [28] Wang C, Pors SE, Olsen RH, Bojesen AM. Transmission and pathogenicity of *Gallibacterium anatis* and *Escherichia coli* in embryonated eggs. *Veterinary Microbiology*, 2018, 217: 76–78.
- [29] Zhang JJ, Kang TY, Kwon T, Koh H, Chandimali N, Huynh DL, Wang XZ, Kim N, Jeong DK. Specific chicken egg yolk antibody improves the protective response against *Gallibacterium anatis* infection. *Infection and Immunity*, 2019, 87(3): e00619–18.
- [30] Peng ZF, Yang X, Zheng LP, Wang CQ. Research progress of *Gallibacterium anatis* in China. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(12): 2075–2078. (in Chinese)
- 彭志锋, 杨霞, 郑鹿平, 王川庆. 我国鸭源鸡杆菌的研究进展. 中国兽医学报, 2015, 35(12): 2075–2078.
- [31] Wang JY, Wang Y, Peng ZF, Yang X. Research process on the virulence factors of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(8): 1627–1632. (in Chinese)
- 王继洋, 王艳, 彭志锋, 杨霞. 鸭源鸡杆菌相关致病因子研究进展. 中国兽医学报, 2017, 37(8): 1627–1632.
- [32] 张秀平. 鸭源鸡杆菌的生物被膜形成能力及对鸡原代输卵管上皮细胞作用的初步研究. 河南农业大学硕士学位论文, 2015.

- [33] Zhang XP, Chen L, Zhao J, Wang CQ, Li YT, Liu HY, Peng ZF, Lu CJ, Jing WX, Yang X. Adhesion and invasion characteristics of *Gallibacterium anatis* to HeLa cells. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(2): 295–302. (in Chinese)  
张秀平, 陈陆, 赵军, 王川庆, 李永涛, 刘红英, 彭志锋, 卢彩景, 敬文宪, 杨霞. 鸭源鸡杆菌对 HeLa 细胞的黏附和侵袭特性. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(2): 295–302.
- [34] Aktories K, Lang AE, Schwan C, Mannherz HG. Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *The FEBS Journal*, 2011, 278(23): 4526–4543.
- [35] 李欢. 鸭源鸡杆菌流行株毒素蛋白 GtxA 表达及其部分生物学特性的研究. 河南农业大学硕士学位论文, 2014.
- [36] 王继洋. 鸭源鸡杆菌中国株 *gtxA* 单基因、*gtxA/fffA* 双基因缺失株的构建及相关特性分析. 河南农业大学硕士学位论文, 2018.
- [37] Zhu XG, Fan HJ, Lu CP, Chen HQ. The adhesins of *Aeromonas hydrophila* J-1 and their receptors. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(2): 82–84. (in Chinese)  
朱兴国, 范红结, 陆承平, 陈怀青. 嗜水气单胞菌 J-1 株粘附素及其受体分析. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 82–84.

## Construction and characterization of *Gallibacterium anatis* $\Delta ompW\Delta gtxA$ double deletion strain

Yinhe Xia<sup>#</sup>, Kunpeng Wang<sup>#</sup>, Panpan Liu, Xinwei Wang, Hongtao Chang, Zhifeng Peng, Hongying Liu, Lu Chen, Xia Yang<sup>\*</sup>, Chuanqing Wang

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** *Gallibacterium anatis* is a conditional pathogen common in poultry production, and causes the laying hen genital tract diseases, resulting in decreased egg production. **[Objective]** To understand the biological characteristics and pathogenicity of the virulence factor RTX-like toxin GtxA and outer membrane protein W of *G. anatis*. **[Methods]** Based on the *G. anatis* *OmpW* gene deletion strain, we successfully constructed the *OmpWgtxA* double gene deletion strain by natural transformation. The differences in biological characteristics and virulence between single and double gene deletion strains and parental strain were investigated. **[Results]** The hemolytic activity of the *OmpWgtxA* double gene deletion strain was inactivated, while the deletion was stable *in vitro* and *in vivo*. Compared with *gtxA*, *ompW* single gene deletion strain and parental strain Yu-PDS-RZ-1-SLG, the growth of the double gene deletion strain was not significantly altered, while its adhesion ability and lesions of primary chicken oviduct epithelial cells were decreased to some extent; and its ability to induce apoptosis in cells of chicken oviduct epithelium was lessened; its pathogenicity was also reduced. **[Conclusion]** GtxA toxin and outer membrane protein W were suggested to play important roles in *G. anatis* virulence, adhesion to host cells and induction of apoptosis and there may be synergies. This study laid the foundation for further revealing the pathogenesis of *G. anatis*.

**Keywords:** *Gallibacterium Anatis*, RZ $\Delta ompW\Delta gtxA$  gene deletion strain, biological character, pathogenic

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Henan Science and Technology Project (172102110046) and by the Natural Science Foundation of Henan (162300410153)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: yangxia66@163.com

Received: 20 December 2019; Revised: 18 March 2020; Published online: 15 April 2020