



基于 CRISPR/Cas9 构建伪结核棒状杆菌 *cp40* 敲除株及其生物学特性与致病性研究

吕红[#], 李鑫灿[#], 牛禄婷, 王芝英, 周作勇^{*}

西南大学动物医学院, 重庆 402460

吕红, 李鑫灿, 牛禄婷, 王芝英, 周作勇. 基于 CRISPR/Cas9 构建伪结核棒状杆菌 *cp40* 敲除株及其生物学特性与致病性研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2453-2464.

LÜ Hong, LI Xincan, NIU Luting, WANG Zhiying, ZHOU Zuoyong. Biological characteristics and pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis cp40*-deleted strains constructed by CRISPR/Cas9[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2453-2464.

摘要:【目的】建立更高效的伪结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp)靶基因敲除方法, 敲除丝氨酸蛋白酶编码基因(*cp40*), 并评价其在 Cp 感染致病中的作用。【方法】以 pECXK99E 为载体, Cp 宣汉株(XH02) *cp40* 为靶基因, 设计含 CRISPR/Cas9 的间隔序列(spacer)、导向 RNA (guide RNA, gRNA)和 *cp40* 上下游同源臂的表达质粒(pEC-*cp40*gRNA-HDarm), 转入含 pCas9gRNA-ccdB 的 Cp 感受态细胞, 构建 CRISPR/Cas9 基因编辑系统以敲除 *cp40* 基因。通过比较 *cp40* 敲除株和野生株的菌落形态及生长曲线、体外对 J774A.1 巨噬细胞活力及白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 分泌, 以及体内感染小鼠致死率及脏器载菌水平, 研究 *cp40* 与该病原感染致病之间的关系。【结果】应用所建立的双质粒 CRISPR/Cas9 编辑系统成功获得 XH02 的 *cp40* 敲除株(XH02 Δ *cp40*)。与 XH02 相比, XH02 Δ *cp40* 在菌落形态及生长曲线上无明显差异, 但 XH02 Δ *cp40* 感染 J774A.1 巨噬细胞的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放($P=0.06$)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色比例均降低($P<0.01$), 体内感染小鼠致死率下降 50%, 并且被感染小鼠肝脏和肾脏中 Cp 含量显著降低($P<0.001$)。【结论】本研究所建立的 CRISPR/Cas9 编辑系统可较高效敲除 Cp 基因, 证实 *cp40* 是该病原感染致病相关基因, 为后续基于该基因研究 Cp 感染致病机制奠定基础。

资助项目: 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0884); 重庆市现代农业产业技术体系(CQMAITS202313); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2020B016)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0884), the Chongqing Modern Agricultural Industry Technology System (CQMAITS202313), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B016).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-46751547, E-mail: zyzhou1101@swu.edu.cn

Received: 2023-12-21; Accepted: 2024-03-20; Published online: 2024-03-27

关键词：CRISPR/Cas9；伪结核棒状杆菌；丝氨酸蛋白酶；基因敲除；致病性

Biological characteristics and pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp40-deleted strains constructed by CRISPR/Cas9

LÜ Hong[#], LI Xincan[#], NIU Luting, WANG Zhiying, ZHOU Zuoyong^{*}

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: [Objective] To establish a more efficient knockout method for the serine protease coding gene (*cp40*) of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and evaluate the role of this gene in the pathogenicity of *C. pseudotuberculosis*. **[Methods]** A vector pEC-*cp40*gRNA-HDarm, with guide RNA, upstream and downstream sequences flanking *cp40* of *C. pseudotuberculosis* Xuanhan strain (XH02), and spacer, was constructed from pECXK99E. The recombinant vector pEC-*cp40*gRNA-HDarm was transferred into *C. pseudotuberculosis* competent cells carrying pCas9gRNA-ccdB to form the CRISPR/Cas9 gene editing system for the deletion of *cp40*. The roles of *cp40* in the pathogenicity of *C. pseudotuberculosis* were evaluated by comparison of the colony morphology and growth curves between the *cp40*-deleted ($\Delta cp40$) strain and wild type (WT) strain, the viability and interleukin (IL)-1 β secretion of J774A.1 macrophages infected with $\Delta cp40$ and WT *in vitro*, and the mortality and organ bacterial loads in mice infected with $\Delta cp40$ and WT *in vivo*. **[Results]** We successfully constructed the *cp40*-deleted strain XH02 $\Delta cp40$ by using the established dual-plasmid CRISPR/Cas9 editing system. Compared with WT (XH02), XH02 $\Delta cp40$ showed no obvious difference in the colony morphology or growth curve. However, the J774A.1 cells infected with XH02 $\Delta cp40$ showed decreased lactate dehydrogenase (LDH) release ($P=0.06$) and propidium iodide (PI) staining ratio ($P<0.01$) compared with those infected with XH02. The mortality of XH02 $\Delta cp40$ -infected mice reduced by 50% and the bacterial loads in the liver and kidney of XH02 $\Delta cp40$ -infected mice significantly reduced compared with those of XH02-infected mice ($P<0.001$). **[Conclusion]** The CRISPR/Cas9 gene editing system established in this study can effectively delete *cp40* of *C. pseudotuberculosis*. The results confirm that *cp40* is a virulence-related gene, providing a foundation for subsequent research on the infection of *C. pseudotuberculosis* based on this gene. **Keywords:** CRISPR/Cas9; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; serine protease; gene deletion; pathogenicity

伪结核棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp)是重要的兼性胞内寄生

人兽共患病原菌，主要引起羊体表及内脏器官脓肿和干酪性淋巴结炎，给羊养殖业带来严重

的经济损失^[1]。同时该病原菌感染可引起人的淋巴结炎^[2-3]、嗜酸性肺炎^[4]等,对公共卫生安全构成潜在威胁。敲除毒力/假定毒力基因是研究 Cp 感染致病机理和制定防控措施的重要途径。目前,细菌基因敲除方式主要包括同源重组技术和 CRISPR/Cas9 编辑技术等^[5]。同源重组技术存在操作烦琐的不足,需要 2 轮筛选,并且需要引入抗生素抗性基因作为筛选标记等。本实验室前期利用同源重组技术部分敲除 Cp 宣汉株(XH02)磷脂酶 D 基因(*pld*),发现敲除的速度慢、效率很低^[6]。因此,深入研究能够更高效敲除 Cp 靶基因的新方法显得尤为重要。CRISPR/Cas9 是源于古细菌抵御噬菌体入侵的获得性免疫机制,能准确、高效地修改基因组中的特定位置,具有操作简单、效率高、作用靶点多等优势。通过将人工设计的引导 RNA (guide RNA, gRNA) 与 Cas9 结合,将其导向到靶向 DNA 序列上,Cas9 便会切割该 DNA 序列,产生双链断裂位点,随后,细胞的自身修复机制介入,通过不同的修复途径,实现对靶基因的编辑^[5]。目前 CRISPR/Cas9 已在大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[7]、布氏杆菌^[8]、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[9]等原核生物中成功应用。本研究构建了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,成功获得 Cp 的丝氨酸蛋白酶编码基因(*cp40*)敲除株,并对其生物学特性及致病性进行评价,为 Cp 的工程菌改造及致病机制研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

LB 肉汤、LB 营养琼脂购自北京奥博星生物技术有限责任公司;胎牛血清购自 Biological Industries 公司;小牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司;氯霉素、卡那霉素、pEASY[®]-Basic

Seamless Cloning and Assembly Kit、2×TransFast[®] Taq PCR SuperMix (+dye)和质粒小提试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司;IPTG、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;庆大霉素、碘化丙锭(propidium iodide, PI)购自北京索莱宝科技有限公司;PrimeSTAR 高保真酶、DNA Ligation Kit 和 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA 检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 试验动物及细胞

昆明系小鼠购自西南医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(渝)2019-0003],J774A.1 巨噬细胞为本实验室保存。

1.3 菌株、质粒、培养基和抗生素

Cp 宣汉株(XH02)和 *E. coli* DH5 α 均由本实验室保存,*E. coli* Trans1-T1 购自北京全式金生物技术股份有限公司。大肠杆菌-棒状杆菌穿梭质粒 pECXK99E 和 pCas9gRNA-ccdB 由中国科学院天津工业生物技术研究所孙际宾研究团队惠赠,pEC-*cp40*gRNA 和 pEC-*cp40*gRNA-HDarm 由本研究构建。

LB 平板:胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母浸粉 5.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L,琼脂 15.0 g/L,配置时加入 5%兔血。LB 肉汤(g/L):胰蛋白胨 8.0 g/L,酵母浸粉 2.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,含 10%小牛血清和 0.1%吐温 80。

抗生素:氯霉素终浓度为 20 mg/L,卡那霉素终浓度为 50 mg/L。

1.4 PCR 引物

根据 GenBank 公布的 *cp40* (OL347712.1)序列,用 SnapGene 软件设计引物(表 1),并送往北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence of primers (5'→3')	Purpose	Product length (bp)
<i>cp40gRNA-F</i>	CCGGAATTCGCAGAGTGGAAAGCCAGAAGGGTTTTAGAG CTAGAAATA	<i>cp40gRNA</i> amplification	122
<i>gRNA-R</i>	CCCGTCGACCCTGGAAAAAAGCAC		
<i>pECjd-F</i>	CACTCCCGTTCTGGATAAT	Detect whether the <i>pEC-cp40gRNA</i> plasmid was successfully constructed	471/593*
<i>pECjd-R</i>	TCACCGACAAACAACAGATAA		
<i>cp40UP-F</i>	CAGGATTGATGGGAAGGGAGAAACCTTTACAGC	Amplification of upstream	622
<i>cp40UP-R</i>	ACTACTGGTAGTGCCTGCCCTTCAAT	homologous arm in <i>cp40</i>	
<i>cp40DOWN-F</i>	GCAGGCACTACCAGTAGTTTTCTTTTC	Amplification of downstream	615
<i>cp40DOWN-R</i>	CGCTTCCGTGCTGGTTGGGCCGAAAAATAAC	homologous arm in <i>cp40</i>	
<i>pEC-cp40-F</i>	CGGCCCAACCAGCACGGAAGCGGAACACGTAAGAAAG	Ring opening of the	7 076
<i>pEC-cp40-R</i>	GTTTCTCCCTTCCCATCAATCCTGCCTATTTG	<i>pEC-cp40gRNA</i> plasmid	
<i>cp40-JD-F</i>	AGAAACGTCACTAAGCTGCA	Screening for <i>cp40</i> missing	2 540/
<i>cp40-JD-R</i>	GGTCAAAGTTCAAGTCCAGG	strains	1 400 [#]

Underline indicates the restriction sites; Wavy line indicates the spacer; * indicates that if the construction of *pEC-cp40gRNA* plasmid is success, the amplified fragment is 593 bp, and the amplified fragment of *pECXK99E* empty vector is 471 bp; [#] indicates that the amplified fragment of the *cp40*-deleted strain is 1 400 bp, and the amplified fragment of wild type strain is 2 540 bp.

1.5 *pEC-cp40gRNA* 质粒的构建

通过网站 <http://crispor.tefor.net/> 设计 *cp40* 的间隔序列(spacer), 并将间隔序列的 20 bp 序列连同 *EcoR* I 酶切位点加入引物 *cp40gRNA-F* 的 5' 端。以质粒 *pCas9gRNA-ccdB* 为模板, *cp40gRNA-F* 和 *gRNA-R* (5'端带有 *Sal* I 酶切位点)为引物, 使用 PrimeSTAR 扩增 *cp40gRNA*, 凝胶电泳鉴定并回收 PCR 产物, 以 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 *cp40gRNA* 和 *pECXK99E*, 用 DNA Ligation Kit 连接酶切后的 *cp40gRNA* 和 *pECXK99E* 质粒, 连接产物化学转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 小提质粒, 用 *pECjd-F/R* 鉴定, 将构建好的质粒命名为 *pEC-cp40gRNA* (图 1A)。

1.6 *pEC-cp40gRNA-HDarm* 质粒的构建

以 XH02 基因组为模板, *cp40UP-F/R* 和 *cp40DOWN-F/R* 为引物, 使用 PrimeSTAR 扩增 *cp40* 上、下游同源臂。以 *pEC-cp40gRNA* 为模板, *pEC-cp40-F/R* 为引物扩增片段 1, PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times PrimeSTAR Max DNA Polymerase

12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。电泳鉴定、回收产物, 用 *cp40UP-F* 和 *cp40DOWN-R* 为引物将 *cp40* 上、下游同源臂用 Overlap PCR 方法扩增连接, 作为同源修复 DNA 模板, PCR 产物经电泳鉴定、回收, 用无缝克隆试剂盒连接片段 1 和同源修复 DNA 模板。连接产物化学转化至 Trans1-T1 感受态细胞, 将构建好的质粒命名为 *pEC-cp40gRNA-HDarm* (图 1A)。

1.7 *cp40* 基因敲除及验证

参照文献 [10] 制备感受态细胞, 将 *pCas9gRNA-ccdB* 电转化至 XH02 感受态细胞, 涂布在含有氯霉素的 LB 平板上, 再制备含 *pCas9gRNA-ccdB* 的感受态细胞(培养时加入终浓度为 20 mg/L 的氯霉素)。将 *pEC-cp40gRNA-HDarm* 电转化至带有 *pCas9gRNA-ccdB* 的感受态细胞, 涂布在含有氯霉素、卡那霉素以及 0.05 mmol/L

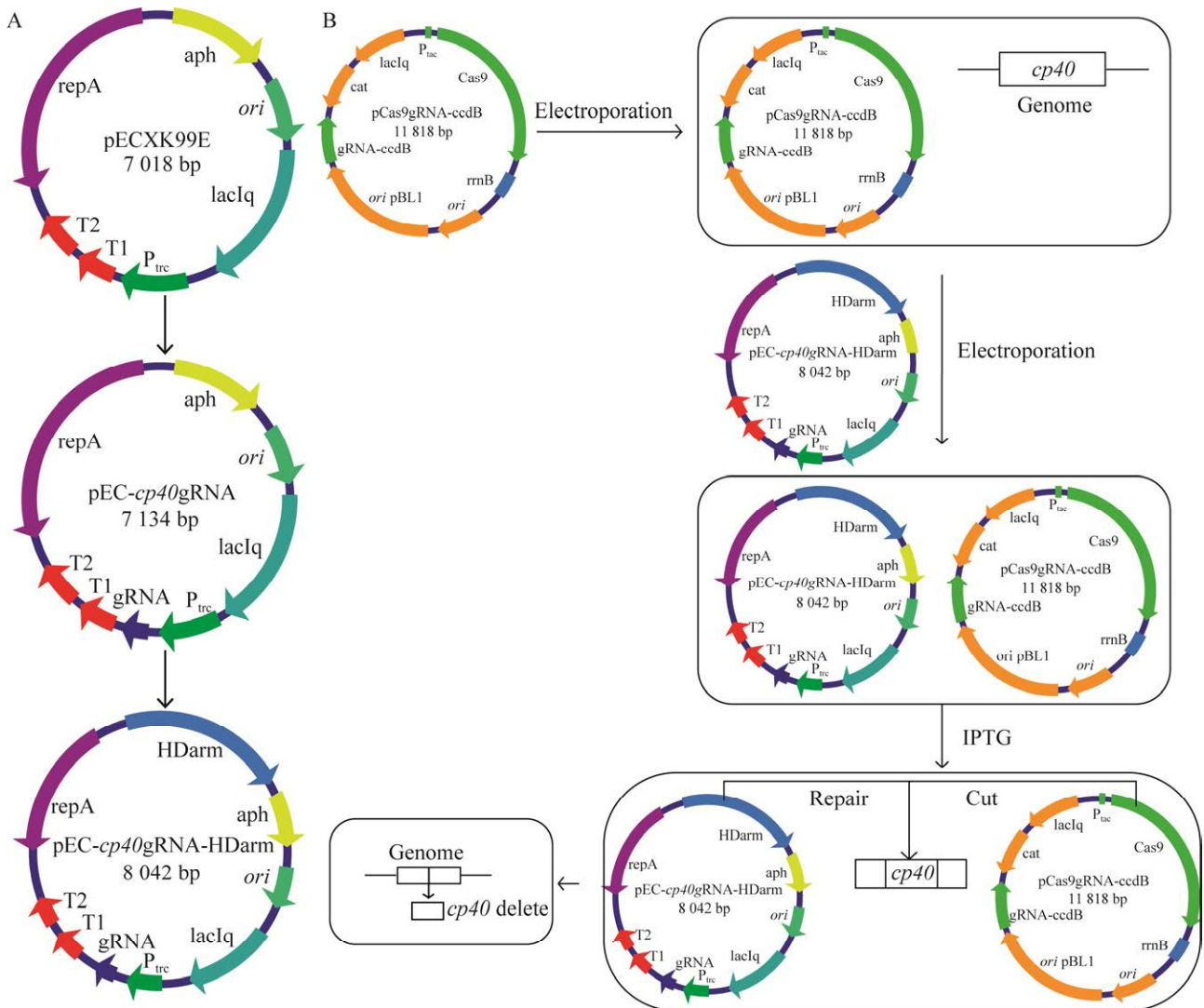


图 1 pEC-cp40gRNA-HDarm 质粒构建及 *cp40* 敲除模式图

Figure 1 Diagram of pEC-cp40gRNA-HDarm plasmid construction and *cp40* knockout pattern. A: pEC-cp40gRNA-HDarm plasmid construction. B: *cp40* knockout pattern by CRISPR/Cas9.

IPTG 的 LB 平板, 37 °C 培养 48 h。用引物 *cp40*-JD-F 和 *cp40*-JD-R 鉴定单克隆, 并将其 PCR 产物送北京擎科生物科技股份有限公司测序验证(图 1B)。

1.8 质粒的消除

将鉴定正确的 *cp40* 敲除株接种至 LB 肉汤中, 37 °C、200 r/min 摇床培养 18 h, 传代 5 d 后分别涂布含有氯霉素和卡那霉素平板上, 若在

氯霉素和卡那霉素平板上均没有菌落长出, 则证明 pCas9gRNA-ccdB 质粒和 pEC-cp40gRNA-HDarm 质粒均已被消除。

1.9 敲除 *cp40* 对 Cp 菌落形态及生长曲线的影响

将 XH02 和 XH02Δ*cp40* 接种于 LB 平板上, 37 °C 培养 24 h, 观察菌落形态。挑取单克隆至 1.5 mL LB 肉汤, 37 °C、200 r/min 培养 18 h,

调整 OD_{595} 为 0.2, 吸取 100 μL 菌液于 30 mL LB 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养, 每 6 h 测定一次 OD_{595} 值, 绘制生长曲线。

1.10 体外试验评价敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 细胞活力和 IL-1 β 分泌影响

1.10.1 Cp 感染 J774A.1 细胞 LDH 释放水平检测

取 J774A.1 接种于 48 孔板, 2.5×10^5 细胞/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。将 XH02 和 XH02 $\Delta cp40$ 以感染复数为 10 (MOI=10) 侵染 J774A.1, 1 h 后用 PBS 洗去胞外菌, 加入含庆大霉素(终浓度 100 mg/L)的 Opti-MEM 培养基, 培养 12 h。根据 LDH 检测试剂盒说明书检测 LDH 释放水平。

1.10.2 Cp 感染 J774A.1 细胞的碘化丙啶(PI)染色比例检测

将 J774A.1 接种于 12 孔细胞板, 1×10^6 细胞/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。将 XH02 和 XH02 $\Delta cp40$ 以 MOI=10 侵染 J774A.1 细胞, 1 h 后用 PBS 洗去胞外菌, 加入含庆大霉素(终浓度 100 mg/L)的 DMEM 培养液, 培养 12 h。弃上清, PBS 洗 2 次后, 加入 100 μL 稀释后的 PI 溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 min 后再以 PBS 洗 2 次, 加入 50 μL 抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)。参考文献[11]的方法, 通过荧光显微镜拍照, 每组随机选择 6 个视野, 统计细胞总数和 PI 染成红色的细胞数, 计算 PI 染色细胞百分比: PI 染色细胞百分比=PI 染成红色的细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。判断敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 细胞膜损伤影响情况。

1.10.3 Cp 感染 J774A.1 细胞 IL-1 β 分泌水平检测

将 J774A.1 接种于 12 孔细胞板, 1×10^6 细胞/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。用 XH02 和 XH02 $\Delta cp40$ 按 MOI=10 侵染 J774A.1 细胞, 1 h 后用 PBS 洗去胞外菌, 加入含庆大霉素(终浓度 100 mg/L)的 DMEM 培养液, 培养 24 h。收集细胞上清, 用 IL-1 β 检测试剂盒检测 IL-1 β 分泌水平。

1.11 体内感染试验评价敲除 *cp40* 对 Cp 感染小鼠致病性及脏器载菌水平的影响

1.11.1 生存曲线试验

将 24 只昆明系小鼠[体重(18 \pm 2) g]随机均分为 3 组(XH02 组、XH02 $\Delta cp40$ 组和 PBS 对照组), 每组 8 只。以 PBS 将菌液稀释为 8×10^7 CFU/mL, 感染组小鼠分别腹腔注射 XH02 或 XH02 $\Delta cp40$ 菌液(0.2 mL/只), 对照组小鼠腹腔注射 0.2 mL PBS。在注射后记录 14 d 内小鼠的死亡情况, 绘制生存曲线。

1.11.2 脏器载菌量试验

将 9 只昆明系小鼠[体重(25 \pm 1) g]随机均分为 XH02 组、XH02 $\Delta cp40$ 组和 PBS 对照组, 每组 3 只。以 PBS 将菌液稀释为 8×10^7 CFU/mL, 感染组小鼠分别腹腔注射 XH02 或 XH02 $\Delta cp40$ 菌液(0.2 mL/只), 对照组小鼠腹腔注射 0.2 mL PBS。参考文献[6]的方法, 于感染后 72 h 无菌摘取小鼠的肝脏、脾脏和肾脏, 加入灭菌 PBS, 用匀浆机充分匀浆, 以 PBS 稀释涂板计数。

1.12 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 作图, 以双尾非配对 *t* 检验统计分析。试验结果用平均数 \pm 标准误差($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *cp40* 敲除结果

成功构建出 pEC-*cp40*gRNA 和 pEC-*cp40*gRNA-HDarm, DNA 扩增片段证实所构建质粒正确(图 2、图 3)。挑取单个菌落进行 PCR 鉴定, XH02 野生株的 PCR 扩增条带为 2 540 bp, 而 XH02 $\Delta cp40$ 敲除株 PCR 扩增条带为 1 400 bp(图 4)。在所挑取的 33 个单菌落中, 有 4 个菌落 PCR 扩增条带符合预期, 敲除效率为 12.12% (4/33)。测序比对证实成功敲除了 XH02 的 *cp40* 全部序列。

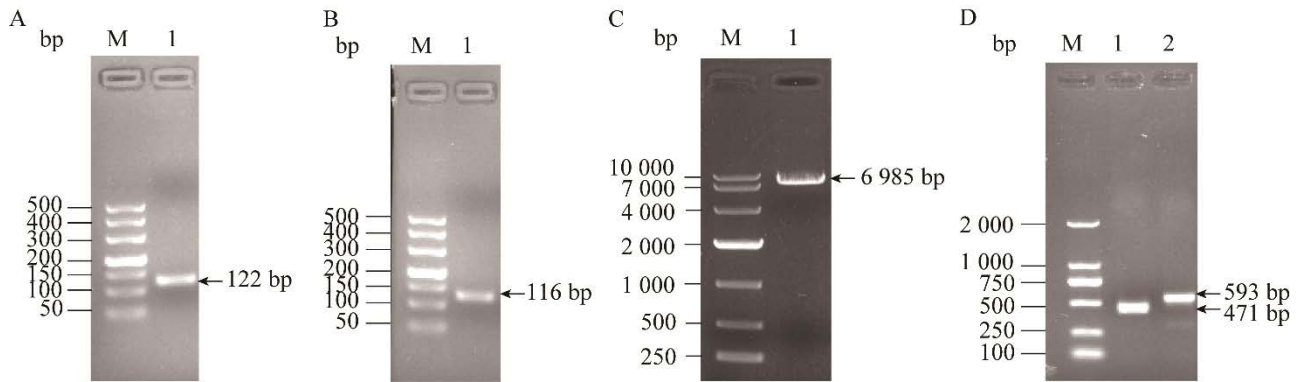


图2 pEC-*cp40gRNA* 构建结果

Figure 2 Results of the pEC-*cp40gRNA* construction. A: Amplification of *cp40gRNA*. M: 500 bp DNA marker; Lane 1: *cp40gRNA*. B: Digestion of *cp40gRNA*. M: 500 bp DNA Marker; Lane 1: Digestion of *cp40gRNA*. C: Digestion of pECXK99E. M: 10000 bp DNA marker; Lane 1: Digestion of pECXK99E. D: Identification of the pEC-*cp40gRNA* plasmid. M: 2000 bp DNA marker; Lane 1: pECXK99E empty vector; Lane 2: pEC-*cp40gRNA*.

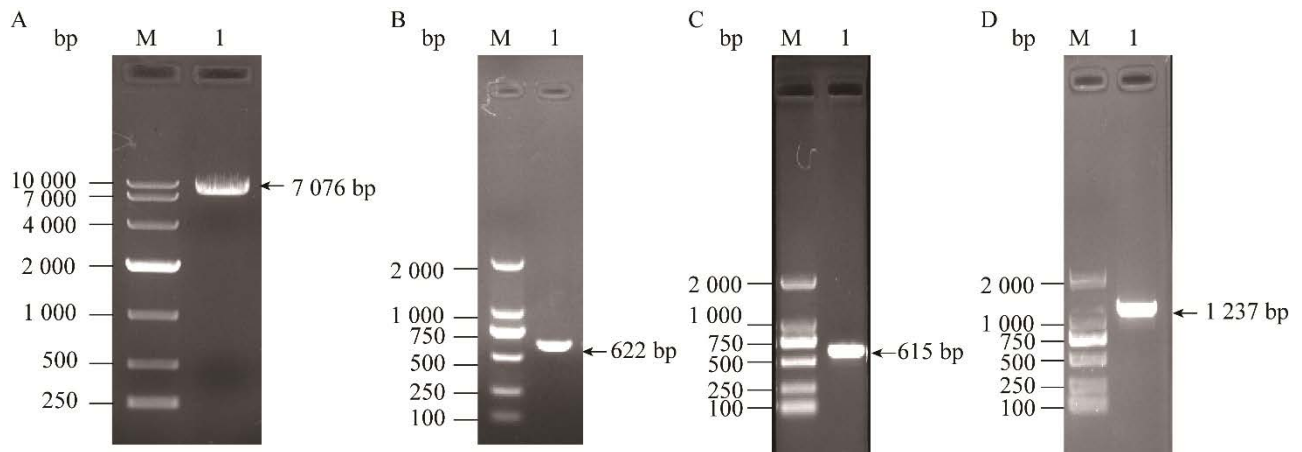


图3 pEC-*cp40gRNA*-HDarm 的构建结果

Figure 3 Results of the pEC-*cp40gRNA*-HDarm construction. A: Ring opening of the pEC-*cp40gRNA* plasmid. M: 10000 bp DNA marker; Lane 1: Amplification of pEC-*cp40gRNA*. B: Amplification of *cp40* upstream homologous arm from XH02. M: 2000 bp DNA marker; Lane 1: Upstream homologous arm. C: Amplification of *cp40* downstream homologous arm from XH02. M: 2000 bp DNA marker; Lane 1: Downstream homologous arm. D: Ligate of the upstream and downstream homologous arms. M: 2000 bp DNA marker; Lane 1: Ligate of the upstream and downstream homologous arms.

2.2 XH02、XH02Δ*cp40* 菌落形态及生长曲线的测定

在 LB 平板上, XH02 和 XH02Δ*cp40* 均为圆形、乳白色、干燥菌落, 无明显差异(图 5A、5B)。生长曲线测定显示, XH02 与 XH02Δ*cp40* 在液

体培养基中生长状态基本一致(图 5C)。

2.3 敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 细胞活力的影响

本研究检测 XH02、XH02Δ*cp40* 感染 J774A.1 的 LDH 释放情况及 PI 染色的细胞比例,

评价敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 细胞活力的影响。与 XH02 感染细胞相比, XH02 Δ *cp40* 感染 J774A.1 细胞的 LDH 释放水平下降(图 6A), PI 染色的细胞百分比显著降低(图 6B)。

2.4 敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 细胞 IL-1 β 分泌水平的影响

Cp 感染巨噬细胞后可引起促炎细胞因子 IL-1 β 的分泌水平升高,本研究评价了敲除 *cp40* 对 Cp 感染 J774A.1 分泌 IL-1 β 水平的影响。结果显示,与 XH02 感染细胞相比, XH02 Δ *cp40* 感染 J774A.1 细胞的 IL-1 β 分泌水平显著降低(图 7)。

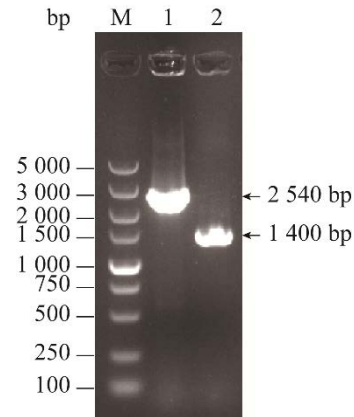


图 4 *cp40* 敲除株的鉴定结果

Figure 4 Results of *cp40*-deleted strains identification. M: 5000 bp DNA marker; Lane 1: XH02; Lane 2: XH02 Δ *cp40*.

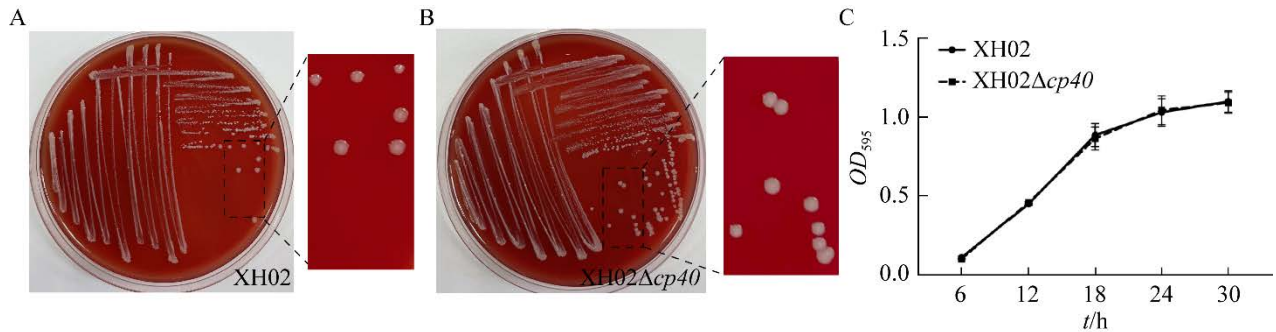


图 5 XH02 和 XH02 Δ *cp40* 的菌落形态及生长曲线

Figure 5 Colony morphology and growth curves of XH02 and XH02 Δ *cp40*. A: Colony morphology of XH02. B: Colony morphology of XH02 Δ *cp40*. C: Growth curves of XH02 and XH02 Δ *cp40*. The data on growth curve represented mean \pm SE.

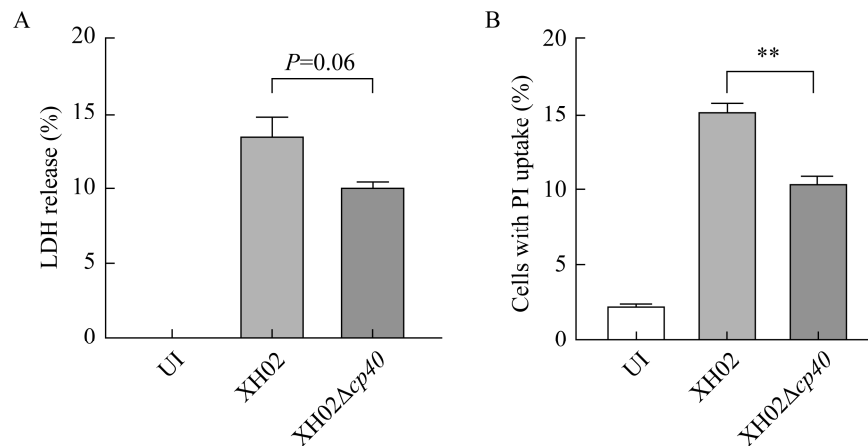


图 6 XH02 和 XH02 Δ *cp40* 感染 J774A.1 细胞的 LDH 释放水平及 PI 染色比例检测结果

Figure 6 Results of LDH release and PI stain proportion in J774A.1 infected with XH02 and XH02 Δ *cp40*. A: The level of LDH release in J774A.1 infected with XH02 or XH02 Δ *cp40*. B: Propidium iodide (PI) staining proportion of J774A.1 infected with XH02 or XH02 Δ *cp40*. UI: Uninfected J774A.1. **: $P < 0.01$.

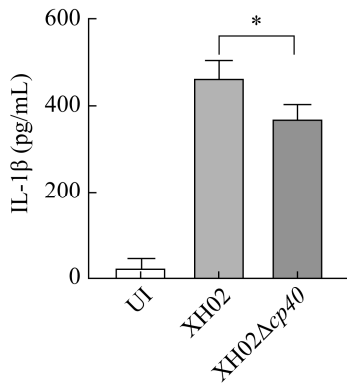


图 7 XH02 和 XH02Δcp40 感染 J774A.1 细胞 IL-1β 分泌水平检测结果

Figure 7 Results of IL-1β secretion in J774A.1 infected with XH02Δcp40. UI: Uninfected J774A.1. *: $P < 0.05$.

2.5 敲除 *cp40* 对 Cp 体内感染小鼠生存曲线和脏器载菌量的影响

致病力试验显示, XH02 感染组小鼠在注射后第 2 天出现死亡, 在 14 d 内死亡率达到 75% (6/8), 而 XH02Δcp40 组仅在感染后第 3 天和第 4 天各死亡 1 只, 死亡率为 25%, 相较于 XH02 组, XH02Δcp40 组小鼠死亡率下降 50% (图 8A)。脏器载菌量检测显示, 除了脾脏载菌量无显著差异外, XH02Δcp40 感染小鼠肝和肾的载菌量均显著低于 XH02 感染小鼠 (图 8B–8D)。

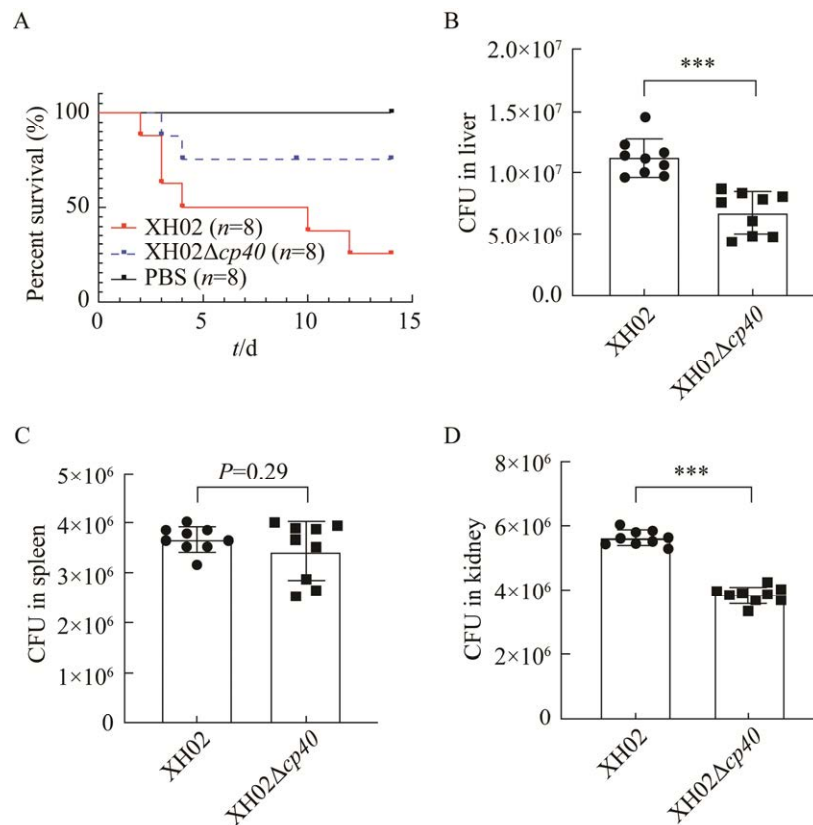


图 8 XH02 和 XH02Δcp40 感染小鼠生存曲线及脏器载菌量

Figure 8 Survival curve and bacterial load in organs of mice infected with XH02 and XH02Δcp40. A: Survival curves of KM mice infected with XH02 and XH02Δcp40. B–D: Bacterial loads in liver, spleen, and kidney of KM mice infected with XH02 and XH02Δcp40. ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

3.1 构建 Cp 靶基因敲除的 CRISPR/Cas9 编辑系统需要同源修复模板

CRISPR/Cas9 以其高效的基因编辑效率广泛应用于真核和原核生物中,在 gRNA 和 Cas9 蛋白的参与下,待编辑的 DNA 将被看作病毒或外源 DNA,进而被精确剪切。在谷氨酸棒状杆菌中,已有基于 CRISPR/Cas9、CRISPR-Cpf1、CRISPR/Cas9 和 ReCT 的耦合重组系统等,可快速、高效、无痕敲除多个基因^[9,12-14],这为同为棒状杆菌属微生物的 Cp 靶基因敲除提供了参考。与经典的同源重组技术敲除 Cp 基因需要 2 次筛选和效率低相比,CRISPR/Cas9 编辑技术只需要一次筛选,并且具有较高的敲除效率。由于谷氨酸棒状杆菌缺乏有效的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复途径,不能很好地修复因 Cas9 切割产生双链断裂(double strand breaks, DSB)^[14-15],推测在 Cp 中可能没有 NHEJ 修复途径。因此,本研究后续构建 CRISPR/Cas9 编辑系统时,采用同源重组(homology-directed repair, HR)进行修复。构建 CRISPR/Cas9 编辑系统有多种方案,可以将 Cas9、gRNA 和同源修复模板置于一个质粒或不同的质粒上,也可通过外源提供单链 DNA(single stranded DNA, ssDNA)修复模板^[9]。在试验前期,本研究尝试将 Cas9 和 gRNA 设计在同一载体上,修复模板置于另一载体上,但由于在 Cp 中 Ptac 启动子控制下的 Cas9 泄漏表达导致获得的转化子数很少,未筛选到敲除株,因此改为将 gRNA 和同源修复模板置于同一载体上。最终以 pCas9gRNA-ccdB 为表达 Cas9 的载体,以大肠杆菌-棒状杆菌穿梭质粒 pECXK99E 为载体骨架,构建 pEC-cp40gRNA-HDarm 以提供引导 Cas9 切割的 cp40gRNA 和切割后修复基因组

的上、下游同源臂 HDarm,成功建立了敲除 cp40 的 CRISPR/Cas9 双质粒编辑系统。

3.2 关于 CRISPR/Cas9 编辑系统对 Cp 靶基因敲除效率的探索

本研究前期曾探究所建立的 CRISPR/Cas9 编辑系统对 Cp 的 pld 基因敲除效率较经典同源重组技术是否有提升,发现在 0.05 mmol/L IPTG 诱导下 pld 基因的敲除效率为 3.0%,远高于实验室前期以经典同源重组敲除 pld 的效率(<0.1%,数据未展示),但低于同样以双质粒模型进行谷氨酸棒状杆菌基因敲除的效率(16.7%–83.3%)^[16],也低于用单质粒模型的敲除效率(55.1%–91.3%)^[9]。影响该系统编辑效率的因素主要考虑为 PAM 位点、gRNA 设计、IPTG 浓度以及同源臂的长度^[16]。在 cp40 敲除中我们提升了 IPTG 浓度到 0.05 mmol/L,发现诱导得到的转化子数明显减少,编辑效率得到了提高,达到 12.12%。若要对编辑效率进一步优化可以尝试增加同源臂长度、更换 gRNA 和 PAM 位点等。

3.3 cp40 在 Cp 感染致病中的作用

cp40 编码丝氨酸蛋白酶 CP40,该蛋白是 Cp 中研究最多的蛋白之一,但这些研究主要是表达获得 CP40 重组蛋白或融合蛋白制备疫苗进行免疫保护研究^[17-18],尚无明确证据直接表明该蛋白是 Cp 的毒力因子。有文献报道,丝氨酸蛋白酶在肺炎球菌的黏附、定殖和扰乱宿主细胞免疫中发挥着至关重要的作用^[19]。此外,丝氨酸蛋白酶是幽门螺杆菌重要的毒力因子,可扰乱胃上皮细胞,使幽门螺杆菌能够跨上皮迁移^[20]。Cp 为一种兼性胞内寄生菌,可引起内脏器官脓肿、干酪性淋巴结炎、嗜酸性肺炎等炎性病变^[1-4],该病原菌感染巨噬细胞的特征之一是引起促炎细胞因子 IL-1 β 分泌增加^[21]。本研究发现,敲除 cp40 基因后,Cp 感染巨噬细胞促炎因子 IL-1 β

的分泌水平显著下降,提示 *cp40* 在 Cp 感染促炎中发挥作用。Cp 感染可造成巨噬细胞死亡,其特征为 LDH 释放增加^[6]。本研究发现,敲除 *cp40* 的 Cp 感染巨噬细胞 LDH 释放水平降低,由于 LDH 释放与死亡或受损细胞数量成正比^[22],提示 *cp40* 与该病原菌感染引起巨噬细胞死亡有关。同时,本研究还通过 PI 染色观察评价敲除 *cp40* 对 Cp 感染损伤巨噬细胞的影响,PI 是一种不渗透膜的红色荧光染料,可穿透受损的细胞染色 DNA,PI 染色细胞比例常被认为是细胞膜受损的指标^[23],结果显示敲除 *cp40* 的 Cp 感染巨噬细胞后,PI 染色细胞比例显著低于野生株,进一步证实敲除 *cp40* 可降低 Cp 对被感染巨噬细胞的致病力。综上所述,本研究发现被感染巨噬细胞 LDH 释放和 PI 染色细胞比例均低于野生株,提示 CP40 与 Cp 感染损伤巨噬细胞有关。此外,本研究发现, XH02 Δ *cp40* 体内感染小鼠存活率高于 XH02 感染小鼠,被 XH02 Δ *cp40* 感染小鼠肝、肾的脏器载菌量显著减少,提示缺失敲除 *cp40* 可降低 Cp 对肝、肾的入侵,降低 Cp 对小鼠的致病力,证实 CP40 是 Cp 的毒力因子之一,但该蛋白在 Cp 感染过程如何促进其致病的详细机制有待于进一步研究。

综上,本研究基于 CRISPR/Cas9 技术在 Cp 中成功构建 *cp40* 敲除菌株,为该病原菌其他毒力基因敲除及功能研究提供了技术储备。同时,证实 *cp40* 是 Cp 致病相关基因,为深入探究 *cp40* 感染致病作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] MOUSSA IM, ALI MS, HESSAIN AM, KABLI SA, HEMEG HA, SELIM SA. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016, 23(6): 718-723.
- [2] PEEL MM, PALMER GG, STACPOOLE AM, KERR TG. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review[J]. Clinical Infectious Diseases, 1997, 24(2): 185-191.
- [3] TROST E, OTT L, SCHNEIDER J, SCHRÖDER J, JAENICKE S, GOESMANN A, HUSEMANN P, STOYE J, DORELLA FA, ROCHA FS, SOARES SD, D'AFONSECA V, MIYOSHI A, RUIZ J, SILVA A, AZEVEDO V, BURKOVSKI A, GUIISO N, JOIN-LAMBERT OF, KAYAL S, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 728.
- [4] KESLIN MH, MCCOY EL, MCCUSKER JJ, LUTCH JS. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a new cause of infectious and eosinophilic pneumonia[J]. The American Journal of Medicine, 1979, 67(2): 43.
- [5] 杨娟娟, 马晓雨, 王晓蕊, 张朝晖, 王珊, 秦慧民, 毛淑红, 路福平. 谷氨酸棒杆菌基因编辑的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(5): 820-828.
YANG JJ, MA XY, WANG XR, ZHANG U, WANG S, QIN HM, MAO SH, LU FP. Advances in gene editing of *Corynebacterium glutamate*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(5): 820-828 (in Chinese).
- [6] 赵夏薇, 李晓霞, 袁永丰, 宋艳, 杨睿, 易文毅, 谭静梅, 宋振辉, 王芝英, 周作勇. 伪结核棒状杆菌 *pld* 基因无痕缺失株构建及其生物学特性及致病性研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3387-3398.
ZHAO XW, LI XX, YUAN YF, SONG Y, YANG R, YI WY, TAN JM, SONG ZH, WANG ZY, ZHOU ZY. Traceless deletion of *pld* in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and biological characteristics and pathogenicity of the mutant[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3387-3398 (in Chinese).
- [7] 卞晓萍, 刘青, 孔庆科, 罗洪艳, 李沛. 大肠杆菌 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的建立及验证[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(1): 110-116.
BIAN XP, LIU Q, KONG QK, LUO HY, LI P. Establishment and verification of *Escherichia coli* CRISPR/Cas9 gene editing system[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(1): 110-116 (in Chinese).
- [8] 汪洋. 布鲁氏菌中 CRISPRi 与 CRISPR/Cas9 系统的构建及功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
WANG Y. Construction and functional verification of

- CRISPRi and CRISPR/Cas9 system in *Brucella melitensis*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [9] LIU J, LIU MS, SHI T, SUN GN, GAO N, ZHAO XJ, GUO X, NI XM, YUAN QQ, FENG JH, LIU ZM, GUO YM, CHEN JZ, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 891.
- [10] DORELLA F, ESTEVAM E, CARDOSO P, SAVASSI B, OLIVEIRA S, AZEVEDO V, MIYOSHI A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3/4): 298-303.
- [11] CHAI QY, YU SS, ZHONG YZ, LU Z, QIU CG, YU Y, ZHANG XW, ZHANG Y, LEI ZH, QIANG LH, LI BX, PANG Y, QIU XB, WANG J, LIU CH. A bacterial phospholipid phosphatase inhibits host pyroptosis by hijacking ubiquitin[J]. *Science*, 2022, 378(6616): eabq0132.
- [12] ZHAO NN, LI L, LUO GJ, XIE S, LIN Y, HAN SY, HUANG YY, ZHENG SP. Multiplex gene editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR/Cpf1-RecE/T system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(8): 599-608.
- [13] WANG B, HU QT, ZHANG Y, SHI RL, CHAI X, LIU Z, SHANG XL, ZHANG Y, WEN TY. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 63.
- [14] CHO JS, CHOI KR, PRABOWO CPS, SHIN JH, YANG D, JANG J, LEE SY. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 157-167.
- [15] RESENDE BC, REBELATO AB, D'AFONSECA V, SANTOS AR, STUTZMAN T, AZEVEDO VA, SANTOS LL, MIYOSHI A, LOPES DO. DNA repair in *Corynebacterium model*[J]. *Gene*, 2011, 482(1/2): 1-7.
- [16] PENG F, WANG XY, SUN Y, DONG GB, YANG YK, LIU XX, BAI ZH. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 201.
- [17] BARRAL TD, KALIL MA, MARIUTTI RB, ARNI RK, GISMENE C, SOUSA FS, COLLARES T, SEIXAS FK, BORSUK S, ESTRELA-LIMA A, AZEVEDO V, MEYER R, PORTELA RW. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(24): 8035-8051.
- [18] SILVA JW, DROPPA-ALMEIDA D, BORSUK S, AZEVEDO V, PORTELA RW, MIYOSHI A, ROCHA FS, DORELLA FA, VIVAS WL, PADILHA FF, HERNÁNDEZ-MACEDO ML, LIMA-VERDE IB. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis[J]. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10: 965.
- [19] ALI MQ, KOHLER TP, SCHULIG L, BURCHHARDT G, HAMMERSCHMIDT S. Pneumococcal extracellular serine proteases: molecular analysis and impact on colonization and disease[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 763152.
- [20] ZAWILAK-PAWLIK A, ZARZECKA U, ŻYŁA-UKLEJEWICZ D, LACH J, STRAPAGIEL D, TEGTMEYER N, BÖHM M, BACKERT S, SKORKO-GLONEK J. Establishment of serine protease htrA mutants in *Helicobacter pylori* is associated with secA mutations[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11794.
- [21] ZHOU ZY, LI HX, TIAN SQ, YI WY, ZHOU Y, YANG HY, LI X, WU B, LI XX, WU JJ, WANG ZY, HU SJ, FANG RD. Critical roles of NLRP3 inflammasome in IL-1 β secretion induced by *Corynebacterium pseudotuberculosis in vitro*[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 116: 11-17.
- [22] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 2018(6): pdb.prot095497.
- [23] NESCIERECKA A, HAMMES F, JUHNA T. A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 131: 172-180.