

胸膜肺炎放线杆菌血清 10 型 $apxIC^-/P36^+$ 弱毒株的构建与鉴定

邹浩勇^{1,2}, 陈杨^{1,2}, 刘新军^{1,2}, 何启盖^{1,2*}, 陈品^{1,2}, 周锐^{1,2}, 马丰英^{1,2}, 汪洋^{1,2}

(¹ 华中农业大学动物医学院; ² 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 【目的】构建血清 10 型胸膜肺炎放线杆菌弱毒菌株, 为胸膜肺炎放线杆菌减毒活疫苗研究奠定基础。【方法】通过细菌接合转移和 *SacB* 负向筛选标记完成突变株的构建与筛选, 用 PCR、Western blot、重组位点序列对突变株进行鉴定分析。首先构建含肺炎支原体 P36 基因的 pEICALDH 重组转移质粒, 并转化供体大肠杆菌 (*E. coli* X7213) 将转化的阳性克隆子与野生型 APP 血清 10 型亲本菌混合培养 6 h; 然后涂至含氯霉素抗性和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 的 TSA 培养基培养, 挑取阳性克隆, 接种至无抗性的含 NAD 的 TSB 液体培养基, 培养 6~8 h 后涂至含 10% 的蔗糖及 NAD 的 TSA 培养基, 培养 24 h 后挑取蔗糖抗性的克隆, 即得到目的突变株。【结果】小鼠毒力试验结果表明突变株比亲本株的毒力显著降低; 生长特性分析结果显示突变株与亲本株的增殖能力无显著差异; 同时免疫试验结果表明突变株与安全剂量的亲本株均可诱导小鼠产生较好的免疫反应, 证明 *apxIC* 基因缺失并不影响 APP 的免疫活性。【结论】成功构建了含猪肺炎支原体 P36 基因的胸膜肺炎放线杆菌血清 10 型突变株, 所获得的突变株有望成为猪传染性胸膜肺炎弱毒疫苗株。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; *apxIC* 基因; 猪肺炎支原体; P36 基因; 接合转移; 负向筛选

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1209-08

猪传染性胸膜肺炎 (porcine contagious pleuropneumonia, PCP), 又称坏死性胸膜肺炎, 是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起的一种猪高度传染性呼吸道疾病^[1], 以急性纤维素性胸膜肺炎或慢性局灶性坏死性肺炎为特征, 急性型死亡率高, 慢性型生长不良, 常能耐过。目前已鉴定胸膜肺炎放线杆菌有 15 种血清型^[2], 其致病因子较多, 包括 4 种 Apx 毒素、脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、荚膜多糖 (Capsular Polysaccharide, CP)、外膜蛋白 (Outer Membrane Protein, OMP)、脲酶 (Urease) 以及黏附因子 (Adhesion factors) 等^[3-4]。其分泌性毒素 Apx 是主要毒力因子, 同时也是一种重要的免疫原性

蛋白, 属于 RTX 毒素家族 (Repeat in Toxin), 胸膜肺炎放线杆菌的 Apx 毒素, 可分为 Apx I、Apx II、Apx III 和 Apx IV^[4-5] 4 种。Apx IV 毒素存在于 APP 的所有血清型^[2]。大量研究表明, Apx 为溶血性外毒素, 当这些毒素基因缺失或失活后, 致病力将显著降低^[6-7]。

目前, 用于预防猪传染性胸膜肺炎的商品化疫苗大多是使用本地流行菌株制备的灭活疫苗。灭活疫苗只能降低由于 APP 感染所引起的死亡率, 不能降低发病率和慢性感染。然而自然感染后的康复猪可以抵抗所有血清型的感染^[8], 说明病原在体内而不是体外产生一些保护性抗原或免疫原复合物, 这同时也表明弱毒菌株能刺激机体产生针对所有 APP

基金项目: 国家“863 计划”——畜禽重要细菌病基因工程疫苗的研究和创新 (2006AA10A206)

* 通信作者。Tel: +86-2787286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: heqigai@yahoo.com

作者简介: 邹浩勇 (1982-), 女, 湖北天门人, 博士研究生, 主要从事动物病原与分子流行病学及基因工程疫苗研究。E-mail: zouhaoyong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-07-02

血清型攻击后的交叉保护。近几年来,大量弱毒活疫苗的研究,为控制和减少该病的发生和流行提供新的可能^[8-11]。由于血清 10 型胸膜肺炎放线杆菌分泌 Apx I 和 Apx IV 毒素,而产生和分泌具有生物活性的 Apx 毒素,需 4 个基因 CABD 组成的操纵子调控,其中 A 基因编码毒素结构蛋白,C 基因编码毒素激活蛋白,负责对毒素进行酰基化激活,B 基因和 D 基因的翻译后蛋白产物形成跨膜通道,负责毒素由细胞内到细胞外的分泌^[3]。有研究表明缺失了 C 基因的菌株仍能分泌结构蛋白 A,且具有良好的免疫原性^[12]。因此,本研究以 APP 血清 10 型菌株和猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, MHP)为材料,将 MHP 主要免疫原性蛋白——乳酸脱氢酶(P36)基因插入 APP 血清 10 型(APP-10) *apxIC* 基因,构建能分泌无毒力的毒素 Apx I 重组胸膜肺炎放线杆菌突变菌株,旨在获得 APP 弱毒活疫苗菌株,为研制新型安全、高效的 APP 多价或多联基因工程疫苗,也为猪用呼吸道疾病的基因工程疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自湖北省预防医学科学院实验动物中心。

1.1.2 主要药品及试剂:二氨基庚二酸(Diaminopimelic acid, DAP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD)、氯霉素(Chloromycetin, cm)、蔗糖购自美国 Sigma 公司。各种限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、DNA Marker、pMD-18T 载体购自大连宝生物工程(大连)有限公司。DNA 回收试剂盒为 Fermentas(MBI)公司产品。胰蛋白大豆琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA)、胰蛋白大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)购自美国 Difco 公司。新生牛血清(NCS)购自杭州四季青材料有限公司。抗 APP *apxI* 单克隆抗体由本室自行制备。CHEKIT-APP-ApxIV ELISA 试剂盒购自 IDEXX 公司。

1.1.3 菌株和质粒 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清 10 型(APP-10)由澳大利亚 Dr. Pat Blackall 博士惠赠。含 P36 基因的重组质粒由本实验室自行构建保存^[17]。大肠杆菌 DH5 α 、X7213 均由本室保存,自杀性质粒 pEMOC2 由德国汉诺威兽医大学 GERALDF. GERLACH 教授惠赠。

1.1.4 引物:引物设计见表 1。

表 1 实验中所用引物及说明

Table 1 The primer sets for PCR in this study

Gene	Primer	Sequence(5'→3')	Length/bp	Cleavage site
apxICA	P1	TTTGGGCCCATCTCTCACA CATCACAT	1500	<i>Apa</i> I
	P2	TTTGGGCCCGCAGCTAATTC CGAACCACT		<i>Not</i> I
P36	P3	CCCATATGATGAAAACCTAT TAAAATAGC	948	<i>Nde</i> I
	P4	CCCATATGTGCATCCTGAT AAATTTT		<i>Nde</i> I
P36	P5	CCGTTGAAGCCTTGCTGTAT	287	
	P6	CGGTAGTGTCTCCCGTTATG		
apxIV	P7	GCTCACCAACGTTTGCTCAT	377	
	P8	GGGACGTAACCTCGTGATT		

1.2 重组质粒 pEICALDH 的构建

构建技术路线见图 1。用 *Apa* I 和 *Not* I 分别对 *apxICA* 基因的 PCR 扩增回收产物和载体 pEMOC2 进行双酶切,并回收连接,构建成中间载体 pEICA。用 PCR 从含 P36 重组质粒中扩增 P36 基因并回收,再用 *Nde* I 分别对 P36 基因和载体 pEICA 进行酶切,并回收连接,最终构建含胸膜肺炎放线杆菌 *apxICA* 基因和肺炎支原体 P36 基因的重组质粒 pEICALDH。

1.3 重组转移质粒转化大肠杆菌 X7213

按常规 CaCl₂ 转化方法制备大肠杆菌 X7213 感受态细胞,热激法转化均按常规方法^[13]进行。以 PCR 及 DAP 依赖性表型鉴定获取阳性转化的大肠杆菌克隆。

1.4 突变株的筛选

将 1.3 中处于对数生长期的阳性克隆与亲本菌(APP-10)以 1:3 的体积比例在含 NAD 的 TSB 培养基中混合培养 6 h,用 TSB 洗涤两次后重悬均匀涂于含 NAD、小牛血清和氯霉素的 TSA 平皿培养 24 h,挑取克隆子,并用引物对 P1/P2 进行 PCR 检测,扩增结果阳性的克隆即可判断为单交换子。将单交换子接种不含氯霉素抗性的 TSB 培养基,培养 6~8 h 后,连续 10 倍稀释,涂布含蔗糖的 TSA 平皿,挑取蔗糖抗性克隆子,用 P1/P2、P5/P6 和 P7/P8 三对引物验证重组子。三组引物扩增条带大小均正确,即为目的突变株。

1.5 突变株的分析检测

1.5.1 溶血性试验:挑取突变株和亲本株(re-APP 和 APP-10 型),分别接种于含有脱脂绵羊血的琼脂平皿,37℃ 培养过夜,观察溶血情况。按文献^[14]描述方法提取亲本菌和突变菌株天然 Apx I 毒素,以

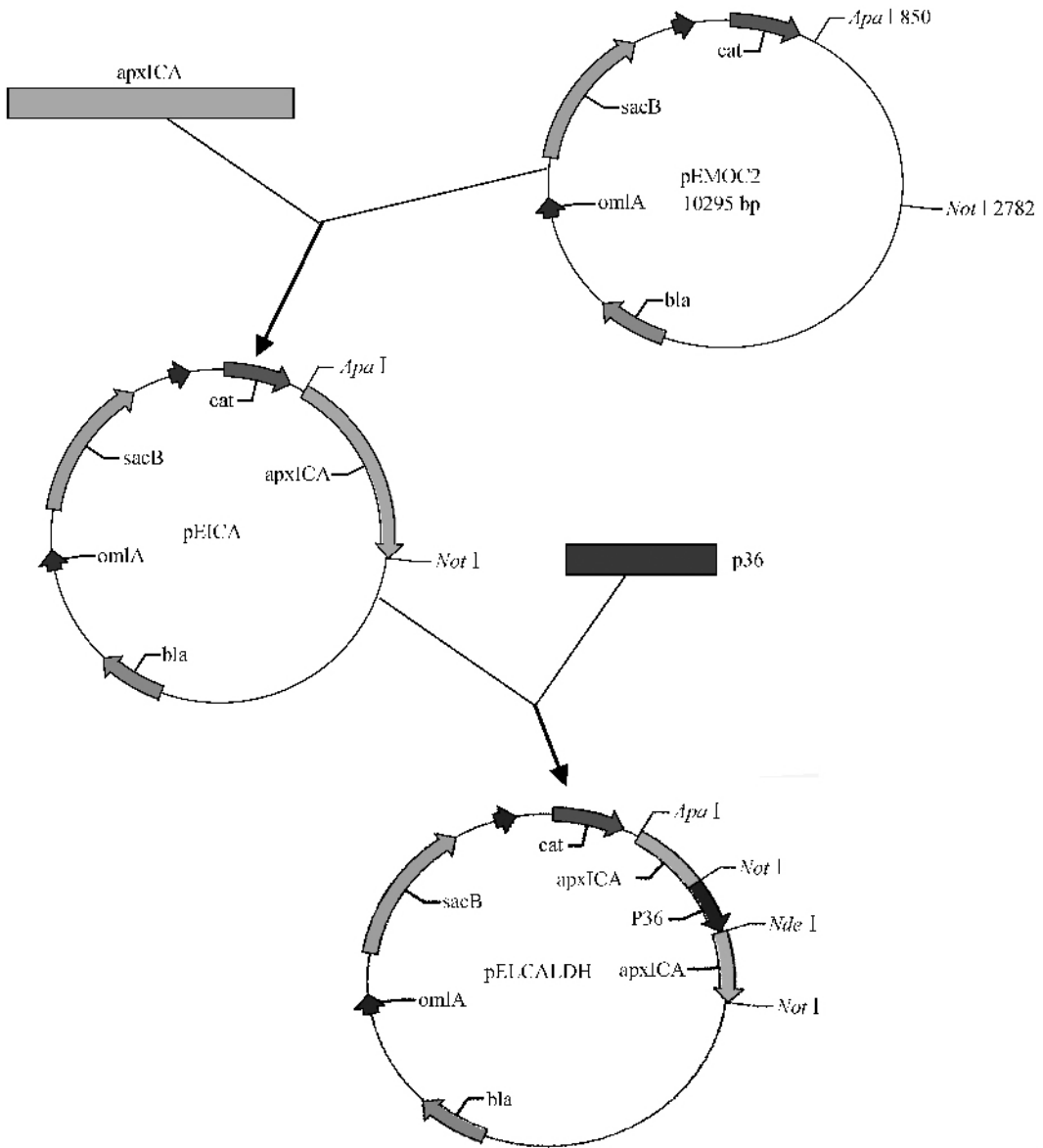


图 1 重组转移质粒 pEICALDH 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant transfer plasmid pEICALDH.

本实验室制备的抗 Apx I 的单克隆抗体为一抗, 进行 Western blot 检测^[15]。

1.5.2 间接荧光抗体试验(IFA):将 100 μ L 培养的菌液涂抹在洁净的玻片, 直径约 1 ~ 1.5 cm, 自然干燥后, 滴加 1:20, 1:40 等不同稀释度的抗 P36 血清(一抗)100 μ L, 置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 用 PBS 冲洗, 室温干燥, 加 1:100, 1:500, 1:1000 三个不同稀释度的 FITC 标记羊抗兔 IgG(二抗)100 μ L, 于湿盒中 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后, 滴加甘油, 覆盖盖玻片, 作为待检样品于荧光显微镜下观察。

1.5.3 生长特性分析:挑取突变株和亲本株单菌落分别接种 5 mL TSB(含 NAD)培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养(180 r/min), 每隔 1 h 取 100 μ L 菌液测定菌液的

*OD*₆₃₀(BioTeK)值, 绘制生长曲线图, 比较突变株和亲本株增殖能力的差异性。

1.5.4 遗传稳定性分析:将获得的突变株在 TSB 培养基上连续传代 20 代, 每隔一代取样一次, 利用 PCR 检测 P36 基因在突变株基因组中的遗传稳定性, 同时检测了 *apxIV* 基因。

1.5.5 重组位点序列分析:用引物对 P1、P2 建立的 PCR 方法, 从突变株中扩增的片段连接到 pMD-18T, 送大连宝生物工程(大连)有限公司测序(双脱氧末端终止法)。

1.5.6 小鼠毒力测定:取 2×10^8 CFU/mL、 4×10^7 CFU/mL、 2×10^7 CFU/mL、 4×10^6 CFU/mL、 2×10^6 CFU/mL 的突变株和亲本菌分别腹腔接种

8只6~8周龄雌性 BALB/c 小鼠,观察并记录死亡数。

1.5.7 免疫效力测定:将24只6~8周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成三组,每组8只,用200 μ L的突变株(1×10^7 CFU/mL)和亲本株(1×10^6 CFU/mL)分别接种小鼠腹腔,空白对照组用同样体积的 TSB 培养基。2周后加强免疫,在免疫前后采血。用 IDEXX 公司的检测 APP-ApxIV 抗体的 ELISA 试剂盒进行检测。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

用 PCR 从 APP-10 型基因组中克隆到约1500 bp 的 *apxICA* 基因片段和从本实验室构建的含有 P36 基因质粒中扩增出948 bp 的 P36 基因片段,大小与预期的相吻合。用 *Apa* I 单酶切重组质粒 pEICALDH 可以得到大小约10815 bp 片段,用 *Apa* I / *Not* I 双酶切从质粒 pEICALDH 中可以获得大小约为2448 bp 片段和8367 bp 片段,说明重组转移质粒构建正确(如图2)。对重组质粒 pEICALDH 中插入序列(*apxICA* + P36)进行序列分析,结果表明,所测序列与 MHP 乳酸脱氢酶(P36)核苷酸序列(序列号: X67286)同源率为99%(图略)。

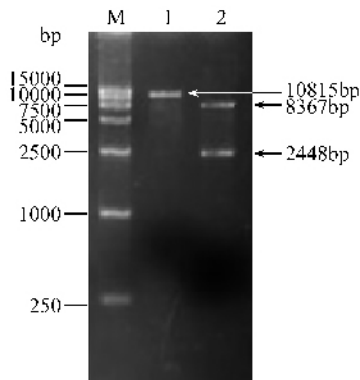


图2 重组转移质粒 pEICALDH 的酶切鉴定
Fig.2 Identification of the recombinant transfer plasmid pEICALDH by digestion. M. DL15000 DNA marker; 1. pEICALDH digested by *Apa* I; 2. pEICALDH digested by *Apa* I + *Not* I.

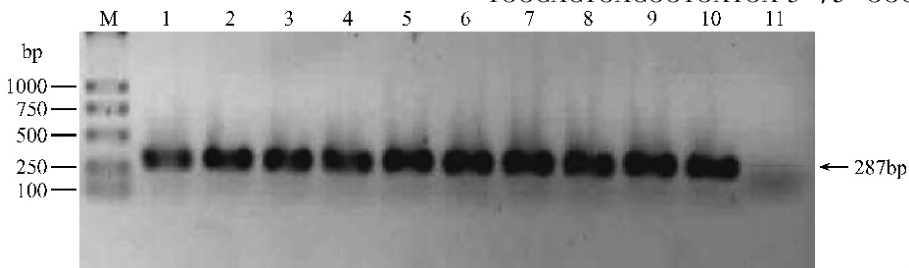


图4 不同代次突变株中 P36 基因的 PCR 检测

Fig.4 Detection of MHP P36 gene from the generation of APP mutant strains by PCR. M. DL2000 DNA marker Lane; 1-10. P36 gene amplified from genomic DNA of every interal generation of 20 passages of APP mutant strains; Lane 11. Parental strain of APP serovar 10.

2.2 突变株的筛选与分析

将引物 P3/P4 扩增阳性的而对蔗糖不敏感的阳性克隆子,分别用引物对 P1/P2、P5/P6 和 P7/P8 进行 PCR 扩增,分别扩增出2448 bp 的 *apxICA* + P36 片段、287 bp 的 P36 片段和377 bp 的 *apxIV* 片段(如图3)。将突变株连续传代20次,用 P5/ P6、P7/P8 引物进行 PCR 扩增,在每一代突变株中均可检测出 *apxIV* 和 P36 基因(如图4、5),说明该突变株插入片段遗传稳定。在含有脱脂绵羊血和 NAD 的 TSA 琼脂平皿,构建的突变株完全失去了溶血活性,但亲本株具有溶血性(如图6)。

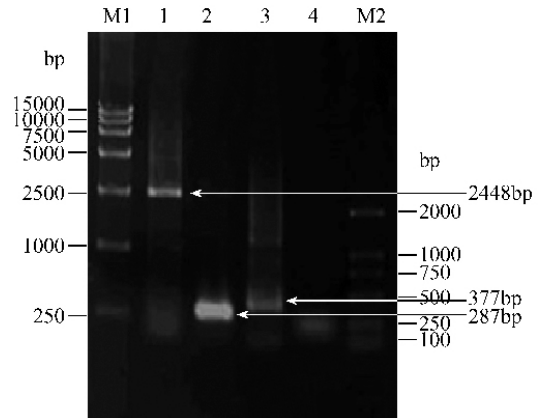


图3 突变株的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of the genetic engineering mutant strain by PCR. M1. DL15000 DNA marker; 1-3. Amplified the *apxICA* + P36, P36, *apxIV* fragment from the mutant strain; 4. H₂O control; M2. DL2000 DNA marker; M2.2000 DNA marker.

2.3 P36 基因与毒素 I 的表达

提取分泌性外毒素,用抗 Apx I 单克隆抗体进行 Western blot 检测时,结果 Apx I 为阳性(如图7),而间接荧光抗体试验和 Western blot 检测 P36 蛋白均未出现明显的预期信号(结果未显示),由此可见 P36 基因的插入并没有影响 Apx I 的分泌及生物学活性。突变株不能分泌 P36,但通过 RT-PCR 检测结果表明,用引物对 P3/P4 和 *apxIV* 特异引物(5'-TGGCACTGACGCGTGATGA-3', 5'-GGCCATCGACTCAA

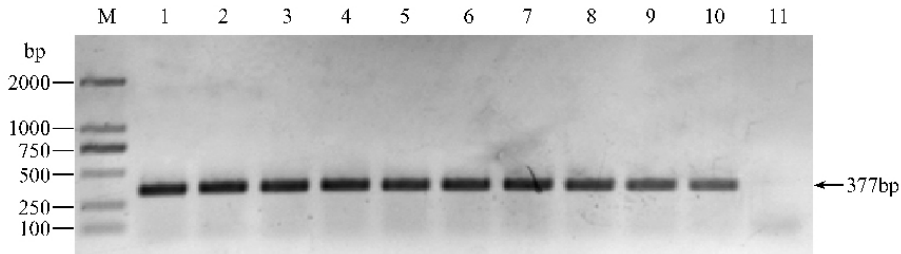
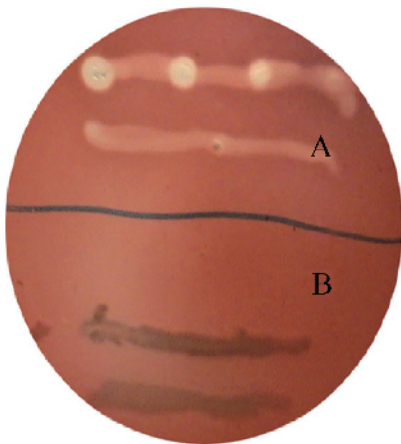


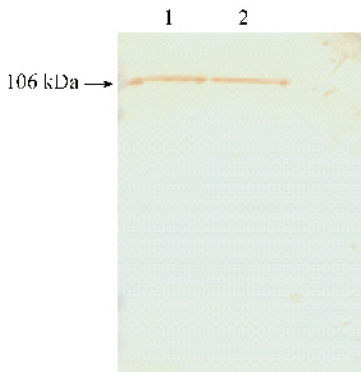
图 5 不同代次突变株中 *apxIV* 基因的检测

Fig.5 Detection of *apxIV* gene in different generation of APP mutant strains by PCR. M. DL2000 DNA maerker ; 1-9. *apxIV* gene amplified from genomic DNA of every interal generation of 20 passages of APP mutant strains ; 10. H₂O control



6 突变株和亲本株溶血性比较

Fig.6 Hemolysis test of the mutant strain and the parental strain. A. Parental strain ; B. The mutant.

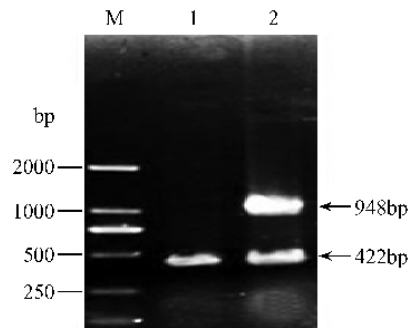


7 Western blot 检测突变株中 *ApxI* 表达
Fig.7 Western blot detection of expressed *ApxI* in the mutant strain. 1. mutant strain ; 2. Parental strain.

CCAT-3')来分析 *P36* 基因和 *apxIV* 在 APP 突变株中的转录水平(如图 8)。

2.4 生长特性

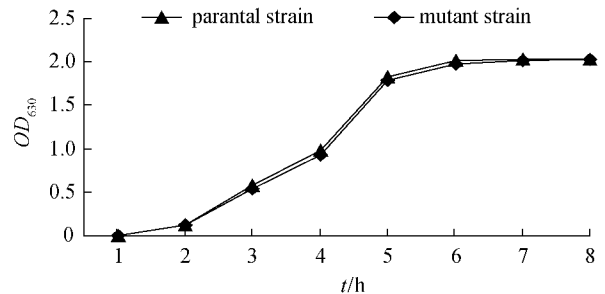
通过在一定时间测定细菌培养液的 *OD*₆₃₀ 值得变化来绘制细菌的生长曲线,结果表明突变株和亲本株的增殖能力无差异。说明插入外源基因致 *apxIC* 基因缺失对细菌的增殖能力没有影响,是非



8 RT-PCR 鉴定突变株

Fig.8 Identification of the mutant strain by RT-PCR. 1. parental strain ; 2. mutant strain.

致死性的细菌突变(如图 9)。



9 突变株与亲本株的生长曲线的比较

Fig.9 Growth curves of the mutant strain and the parental strain.

2.5 突变株对小鼠的毒力下降

连续观察 7 天后发现,每组 8 只小鼠中,在接种 2×10^8 CFU/mL 和 4×10^7 CFU/mL 剂量时分别死亡 6 只和 3 只,其余剂量组没有造成小鼠的死亡;而亲本菌在接种 2×10^8 CFU/mL、 4×10^7 CFU/mL 和 2×10^7 CFU/mL 剂量时,小鼠全部死亡, 4×10^6 CFU/mL 剂量组死亡 3 只小鼠, 2×10^6 CFU/mL 剂量组毒力没有差异(见表 2);TSB 接种组小鼠全部存活,说明突变株对小鼠的毒力明显下降。

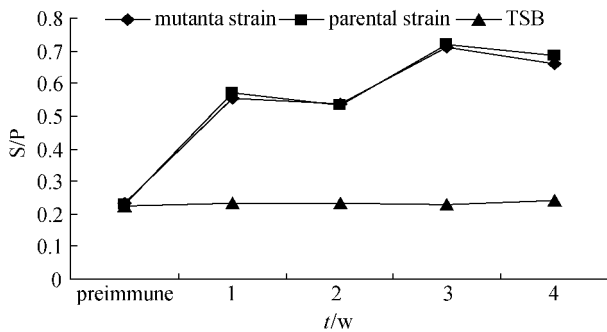
表 2 突变株和亲本株对小鼠的毒力

Table 2 Virulence of the mutant and parent to mice

strain	No. of mice survived after challenge with the given dose (CFU per mouse)				
	2×10^8	4×10^7	2×10^7	4×10^6	2×10^6
Mutant	2	5	8	8	8
Parent	0	0	0	5	8

2.6 免疫与检测

免疫后第 4 周, TSB 对照组、亲本株对照组与突变株试验组分别用 APP 血清 10 型菌(活菌含量 1×10^8 CFU/mL)对免疫小鼠进行攻毒。TSB 对照组 12 h 内小鼠全部死亡,死亡小鼠肺部有出血,从心血和肺脏能分离攻毒用的 APP。而 1×10^6 CFU/mL 亲本株和 1×10^7 CFU/ml 突变株接种鼠,均获得 100% 的保护力。按照 APP-ApxIV ELISA 试剂盒说明书对获得的血清进行检测,结果如图 10 所示。

图 10 免疫小鼠后 *apxIV* 抗体检测结果Fig. 10 Antibody against *apxIV* in mice after vaccinations.

3 讨论

由胸膜肺炎放线杆菌和猪肺炎支原体单独感染或混合感染是引起目前呼吸道综合症的主要原因之一,给养猪业造成严重的危害。而针对临床中这两种病原同时感染或继发感染的现状,分别接种单独的疫苗会造成猪只的应激和养殖成本增加,以致弱的胸膜肺炎放线杆菌表达 MHP 主要抗原蛋白的突变株,并研制有效的基因工程疫苗,是预防这两种呼吸道传染病的策略。

在感染过程中产生的抗荚膜和抗脂多糖抗体作用在于血清分型,但传染性胸膜肺炎免疫防治过程中,产生抗毒素抗体是最重要的。本实验室构建的

血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌突变株,其产生的针对异种血清的免疫保护力只能达到 75%^[16],原因之一就是它不能产生抗毒素 I 的抗体。而血清 10 型菌能产生 Apx I,同时不产生 Apx II 和 Apx III,因此在构建疫苗的过程中无需失活其他的毒素,操作简单。高毒力的胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的过程中,都会产生毒素 I,本实验构建的血清 10 型突变株,失活了毒素 I 的毒力基因,但保留了它的免疫原性基因,故在强毒感染过程中,能起到保护作用。在能够产生 Apx I、Apx II、Apx III 和 Apx IV 四种毒素,其中毒素 Apx I 溶血活性最强。APP 有 15 个血清型,其中血清型 1、5、9、10 和 11 型菌株能产生 Apx I,但 1、5、9、11 型菌株还分别产生 Apx II 和 Apx IV,而血清 10 型菌株在体外只分泌 Apx I,便于标记。因此,本研究采用 APP-10 型菌作为亲本株来成功构建的突变株,基本具备了作为弱毒疫苗菌株的条件。

本研究所用的方法与刘金林等^[18]所用的方法类似,使用了自杀性重组质粒 pEMOC2,构建含抗生素标记和负向筛选标记的中间转移载体 pEICALDH。将 pEICALDH 转化大肠杆菌 X7213 感受态细胞,再与 APP-10 型标准株进行接合转移试验,通过同源重组,利用 *sacB* 负向筛选法,获得 P36 基因插入 *apxIC* 基因的 APP 突变株,该突变株不含抗生素抗性基因,对突变株进行 western blot 和间接荧光抗体试验检测,发现培养上清浓缩蛋白能与毒素 I 单抗反应,表明外源基因 P36 的插入并不影响 ApxI 毒素的正常表达与分泌,但未检测到肺炎支原体 P36 基因表达产物。根据 2007 年首都师范大学周宏专硕士论文研究报道,在缺失 *apxIC* 基因的基础上成功的表达 PRRS 病毒的 ORF5 基因,同时也证明在 C 基因中插入外源基因比在 A 基因中插入外源基因的表达水平要低。因此,检测不到 P36 基因表达产物可能是突变株中 P36 基因表达水平过低所致。除此之外,本研究还对突变株和亲本株感染后 *apxIV* 抗体评估,结果表明突变株和亲本株之间无显著差异。免疫攻毒试验表明,构建的突变株也能提供很好的保护,证明 *apxIC* 基因缺失并不影响 APP 的免疫活性。

总之,通过 PCR、序列分析、稳定性分析、溶血活性分析、生长特性分析,小鼠毒力测定及保护试验,表明成功构建了胸膜肺炎放线杆菌弱毒菌株,并为突变菌株改造成多价疫苗载体进行了初步探索,为以后研究 PCP 弱毒疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1994, 204(9): 1334 - 1340.
- [2] Blackall PJ, Klaasenn HL, VanDen BH, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15. *vet Microbiol*, 2002, 84(1 - 2): 47 - 52.
- [3] Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol*, 1995, 3(7): 257 - 261.
- [4] Bosse JT, Janson H, Sheehan BJ, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect*, 2002, 4(2): 225 - 235.
- [5] Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, et al. Characterization of apx I VA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, 145(8): 2105 - 2116.
- [6] Tascon RI, Vazquez-Boland JA, Gutierrez-Martin C B, et al. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol*, 1994, 14(2): 207 - 216.
- [7] Boekema BK, Kamp EM, Smits MA, et al. Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet Microbiol*, 2004, 100(122): 17 - 23.
- [8] Fuller TE, Thacker BJ, Duran CO, Mulks MH. A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine*, 2000, 18(25): 2867 - 2877.
- [9] Liwen L, Weicheng B, Yonggang S, et al. Construction and immunogenicity of a Δ apxIC/ Δ apxIIC double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1. *Micobiological Societies*. 2007, 274(1): 55 - 62.
- [10] Jinlin L, Xia C, Liwen L, et al. Potential use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* double mutant strain apxIIC apxIVA as live vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 2007, 25(44): 7696 - 7705.
- [11] Tonpitak W, Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach G F. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70(12): 7120 - 7125.
- [12] Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J, et al. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site 2 specific mutagenesis of the Apx II operon. *Infection and Immunity*, 1999, 67(4): 1962 - 1966.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 1: 33.
- [14] Huang HL, Zhou R, Fan HY, et al. Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of Apx I VA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Immunology*, 2006, 43(13): 2130 - 2134.
- [15] Nielsen R, vanden Bosch JF, Plambeck T, et al. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 2000, 71(1 - 2): 81 - 87.
- [16] Bei W, He Q, Yan L, et al. Construction and characterisation of a live attenuated apx III CA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(1): 21 - 27.
- [17] 姚睿玉, 何启盖, 周锐, 陈焕春. 猪肺炎支原体乳酸脱氢酶基因的克隆、表达、纯化及其间接 ELISA 检测方法的建立. *中国兽医学报* (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2007, 27(4): 511 - 515.
- [18] 刘金林, 贝为成. 血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌 apx II C - /apx I A + 基因缺失重组菌株的构建与鉴定. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(6): 973 - 977.

Construction and characterization of an attenuate strain $\text{apxIC}^-/\text{P36}^+$ of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 10

Haoyong Zou^{1,2}, Yang Chen^{1,2}, Xinjun Liu^{1,2}, Qigai He^{1,2*}, Pin Chen^{1,2}, Rui Zhou^{1,2}, Fengying Ma^{1,2}, Yang Wang^{1,2}

(¹ College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract [Objective] To construct an attenuate *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 10 strain $\text{apxIC}^-/\text{P36}^+$ for new vaccine development. [Methods] The mutant was constructed by transconjugation and counter-selection and then verified by PCR, western blot and sequence analysis. A transconjugation plasmid pEICALDH was constructed and transformed into donor strain *Escherichia coli* X7213. After mixing the donor cells with *A. pleuropneumoniae* acceptor cells, we cultivated the mixture for 6 hours and plated on solid medium containing chloromycetin. Then the Cm^R positive clones were picked and inoculated into liquid medium without any antibiotic. Cultures were pelleted, plated on sucrose plates and incubated overnight. Finally, Sucrose-resistant colonies (SucB^R) were selected and considered as mutant. [Results] Compared with parental strain, the mutant have the same growth rate *in vitro* and reduced virulence in mice; additionally, the animal experiment indicated that the mutant strain can successfully induce as good immune response as the parental strain, despite of deletion of *apxIC* gene. [Conclusion] In conclusion, we successfully constructed the attenuate strain $\text{apxIC}^-/\text{P36}^+$ of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 10, and this mutation system will facilitate development of live attenuated vaccines.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *apxIC* gene; *Mycoplasma hyopneumoniae*; P36; transconjugation; counterselection

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China(2006AA10A206)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: heqigai@yahoo.com

Received: 2 March 2009/Revised: 2 July 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:我们的承诺是争取在2个月之内给予答复,5~7个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审的2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出e-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的),作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问:如我的投稿没有被贵刊录用,是否告知退稿原因?对退稿有异议怎么办?

答:本着对每一篇投稿负责的原则,本刊一贯遵循三审制的制度,即:编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿,都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿,我们都会详细写明退稿原因,为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议,可以给我们写信表明看法,本刊将请专家予以复审。

问:我可否指定审稿人,或言明请某审稿人回避?

答:您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单,或请予回避的审稿人名单,供编辑部参考,但编辑部是否采纳将视具体情况而定。