

胸膜肺炎放线杆菌萘啶酸抗性菌株的选育和 信号标签突变株的构建

商霖, 李薇, 李良军, 黎璐, 张四化, 李婷婷, 李耀坤,
刘磊, 郭志伟, 周锐*, 陈焕春*

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

摘要: 胸膜肺炎放线杆菌(APP)是重要的猪呼吸道病原菌, 给世界养猪业造成严重的经济损失。信号标签突变(STM)技术是在宿主动物体内鉴定病原菌毒力因子的高通量方法。通过体外传代选育出 APP 血清 1 型和 3 型萘啶酸抗性菌株, 再以萘啶酸抗性菌株为受体菌, 以携带 mini-Tn10 的标签质粒(pLOF/TAG1-48)的 *E. coli* CC118 λ *pir* 或 S17-1 λ *pir* 为供体菌, 在或不在 *E. coli* DH5 α (pRK2073)的辅助下, 进行三亲本或两亲本接合, 通过抗性筛选、PCR 和 Southern 杂交鉴定转座突变株。结果表明: 体外萘啶酸加压传代很容易选育出萘啶酸抗性 APP 菌株, 该抗性的产生与 DNA 促旋酶 A 亚基基因 *gyrA* 的突变有关。在 APP 与 *E. coli* 接合实验中, 两亲本接合比三亲本接合操作更简单, 效率也较高; APP 不同菌株在接合和转座效率上存在很大差异, 血清 1 型菌株高于血清 3 型菌株, 3 型标准菌株高于地方分离株 JL03-R。本研究为 APP STM 突变体库的构建与毒力基因的鉴定奠定了基础。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; 萘啶酸抗性; 信号标签突变; 细菌接合

中图分类号: Q93, 852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0073-07

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)是巴斯德菌科放线杆菌属的一种猪呼吸道病原菌, 引起猪传染性胸膜肺炎, 临床上表现为纤维素性胸膜炎及出血性、纤维素性、坏死性肺炎等主要病理学特征^[1]。各日龄的猪对该病均易感。急性感染表现出极高的发病率和死亡率, 慢性感染严重影响仔猪生长。自 1957 年 Pattison 首次报道以来, 该病流行于大多数养猪国家或地区, 成为当前最严重的猪呼吸道传染病之一^[2]。20 世纪 90 年代初该病被证实在我国存在, 近十年在我国广泛流行, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。

目前在世界范围内已经鉴定的 APP 有 15 种血清型, 还有许多尚不能分型的菌株存在。根据其生长是否依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine

dinucleotide, NAD)可分为生物 I 型和生物 II 型, 其中血清 1~12 和 15 型属于生物 I 型, 生长需要 NAD, 其中血清 5 型又分为 5a 和 5b 2 个亚型; 13 和 14 型属于生物 II 型, 生长不依赖于 NAD^[4]。不同国家或地区流行的优势血清型不尽相同, 我国以 1、3、7 型为主^[5]。

APP 是一种多毒力因子的病原菌, 现已发现的毒力因子包括外毒素、荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、脲酶、蛋白酶等。研究的比较深入的是其外毒素和铁利用相关蛋白质^[1]。毒力因子的全面鉴定是病原菌致病机理研究和防治产品开发的基础。信号标签诱变(signature-tagged mutagenesis, STM)技术是由 Holden 等人于 1995 年建立的一种鉴定病原菌毒力基因的高通量方法^[6], 目前已有 30 多种细菌运用该方法找到了毒力相关基因^[7-9]。Fuller 和 Sheehan

基金项目: 国家自然科学基金(30530590; 30771599); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0740)

*通讯作者。Tel: +86-27-87281878; Fax: +86-27-87281795; E-mail: rzhou@mail.hzau.edu.cn (周锐); chenhch@mail.hzau.edu.cn (陈焕春)

作者简介: 商霖(1980-), 男, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事动物病原微生物研究。E-mail: slin@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2007-04-23; 修回日期: 2007-07-14

建立了 APP 血清 1 型的 STM 方法, 并鉴定出 50 多个毒力相关基因^[10,11]。不同血清型的 APP 菌株的致病性相差较大, 除它们分泌的外毒素种类不尽相同外, 还有哪些因素影响不同血清型菌株的毒力目前尚不清楚。血清 3 型是我国猪群中流行的优势血清型, 为鉴定血清 3 型的毒力相关基因, 本实验室拟构建 3 型菌株的 STM 突变体库, 为此, 需要选育萘啶酸抗性的 APP 菌株以便于 APP 与大肠杆菌接合 (mating) 后的筛选, 同时比较研究了 APP 血清 1 型和 3 型菌株及不同的 3 型菌株与大肠杆菌的接合与转座效率, 为 APP 血清 3 型 STM 突变体库的构建与毒力基因的鉴定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株用普通 LB 培养基; 胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 菌株先在含有 10% 犊牛血清和 0.1% NAD 的 TSA 平板上划线培养, 挑取单菌落, 然后用含有 10% 犊牛血清和 0.1% NAD 的 TSB 液体培养基培养。抗生素的工作浓度为: 氨苄青霉素 (Amp) 50 μg/L, 链霉素 (Sm) 50 μg/L, 卡那霉素 (Km) 根据需要选用 25 ~ 50 μg/L。

1.1.2 酶和试剂: DNA 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚

表 1 所用菌株和质粒的来源及特征

Table 1 Sources and characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
S17-1 λ <i>pir</i>	<i>recA thi pro hsdR^M RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7</i> lysogenized with λ <i>pir</i> phage	Biomedal, S.L., Spain
CC118 λ <i>pir</i>	<i>(ara-leu) araD lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE recA1</i> lysogenized with λ <i>pir</i> phage	Biomedal, S.L.
DH5 α (pRK2073)	<i>supE44 lacU169(Φ80lacZ M15) recA1 endA1 hsaR17 thi-1 gyrA96 relA1</i> pRK2073 (Sm ^R St ^R oriColE1 RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺)	Biomedal, S.L.
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
4074	Reference strain, serotype 1, Nal ^S Km ^S Amp ^S *	Dr. Blackall
S1421	Reference strain, serotype 3, Nal ^S Km ^S Amp ^S *	Dr. Blackall
JL-03	Field isolate, serotype 3, Nal ^S Km ^S Amp ^S *	Our lab
HB-12	Field isolate, serotype 3, Nal ^S Km ^S Amp ^S *	Our lab
YYJX	Field isolate, serotype 6/8, Nal ^R Km ^S Amp ^S *	Our lab
pLOF/TAG1-48	48 transposal plasmids containing mini-Tn10 and 48 different tag sequences, Amp ^R Km ^R	Dr. Langford ^[11]

* ^S, sensitive; ^R, resistant; Nal, nalidixic acid.

合酶和 DNA 回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。TSA 和 TSB 培养基为 Difco 公司产品。NAD、IPTG 和 MgSO₄ 为 Sigma 公司产品。基因组 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Tissue Kit) 购自 Qiagen 公司。PCR DIG Probe Synthesis Kit 和 DIG Nucleic Acid Detection Kit 购自德国 Roche 公司。

1.2 APP 萘啶酸抗性菌株的选育

将萘啶酸敏感 (Nal^S) 的 APP 菌株先在含有 10% 犊牛血清和 0.1% NAD 的 TSA 平板上划线培养 16~18h。挑取单菌落, 接种到含有 1 μg/L 萘啶酸的 TSB 液体培养基 (加有 10% 犊牛血清和 0.1% NAD) 中, 37°C, 200 r/min 培养约 12h。待 TSB 混浊后, 转接到含有较高浓度萘啶酸的 TSB 培养基中, 同法培养约 12h。如此逐步增加培养基中的萘啶酸浓度, 直到 APP 菌株能够在含 100 μg/L 萘啶酸的 TSB 培养基中生长为止, 然后冻干保存抗性菌株。萘啶酸浓度的增加按照开始慢然后快的原则进行。

1.3 *gyrA* 基因的克隆与序列分析

根据 APP 血清 1 型 4074 株的部分基因组序列 (GenBank 登录号: NZ_AACK01000003) 中 DNA 促旋酶 A 亚基基因 *gyrA* 的序列设计一对 PCR 引物 (*gyrA*1: 5'-CGTAGAGGTACCGTTATTGTCCGACG-TG-3', *gyrA*2: 5'-AGTATGGAGCTCCGCATCGC-CGTCAATCG-3'), 分别以萘啶酸敏感和抗性 APP 血清 1、3 型菌株基因组 DNA 为模板, 扩增 *gyrA* 基因中的 267bp 片段 (82-348nt)。PCR 反应条件为: 95°C 4 min; 35 个循环 (95°C 1 min, 56°C 30 sec, 72°C 1 min); 72°C 10min。PCR 产物克隆到质粒 pBluscript II SK(+) 中, 经纯化后送大连 TaKaRa 公司测序。

1.4 三亲本接合^[12]

将 pLOK/TAG 1-48 分别转化 *E. coli* CC118 λ *pir*, 涂布补加 Kan 和 Amp 的 LB 选择平板, 挑取单菌落, 接种到 3 mL 相同抗性的 LB 液体培养基中, 37°C, 200 r/min 培养过夜 (供体菌)。同时, 将萘啶酸抗性的

血清 1、3 型 APP 菌株($\text{NaI}^R \text{Km}^S \text{Amp}^S$)在含 $50 \mu\text{g/L}$ 萘啶酸(NaI)的 TSA 平板上划线培养 16~18h, 挑取单菌落, 接种到 3 mL 相同抗性的 TSB 液体培养基中, 37°C , 200r/min 培养过夜(受体菌)。将 *E. coli* DH5 α (pRK2073)在含 $50 \mu\text{g/L}$ Sm 的 LB 平板上划线菌)。用 0.01mol/L MgSO_4 将供体菌、受体菌和辅助菌分别洗 2 次后, 分别按照 1:3:1 的比例混匀, 分散点加在无菌 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔混合纤维滤膜上, 同时设供体菌、受体菌和辅助菌对照。待菌体完全附着后将滤膜置于含有 10% 犊牛血清、0.1% NAD 和 1mmol/L IPTG 的 TSA 平板上, 37°C 培养 8h。取出滤膜, 用 $500 \mu\text{L}$ 0.01mol/L MgSO_4 将细菌洗下来, 取 $200 \mu\text{L}$ 涂布于补加 NaI 和 Kan 的 TSA 选择平板(含 $20 \mu\text{g/mL}$ NaI 、 $25 \mu\text{g/mL}$ Km 、0.1% NAD 和 10% 犊牛血清)上, 37°C 培养 24h。将单菌落分别转接到含 0.1% NAD 和不含 NAD 的补加 NaI 和 Kan 的 TSA 选择平板(含 $20 \mu\text{g/mL}$ NaI 、 $25 \mu\text{g/mL}$ Km 和 10% 犊牛血清)及 Amp 抗性 TSA 选择平板(含 $50 \mu\text{g/mL}$ Amp、0.1% NAD 和 10% 犊牛血清)各 1 个, 观察各细菌克隆的 NAD 依赖性和 Amp 抗性。

1.5 二亲本接合

将 pLOK/TAG 1-48 分别转化 *E. coli* S17-1 λ *pir*, 作为供体菌。同上 1.5 的方法准备供体菌和受体菌($\text{NaI}^R \text{Km}^S \text{Amp}^S$ 的血清 1、3 型 APP 菌株), 及进行 MgSO_4 处理。将供体菌和受体菌分别按 3:1 的比例混合, 同 1.5 法进行接合和筛选, 同时设供体菌和受体菌对照。

1.6 突变株的筛选与鉴定

挑取在 NaI 和 Km 抗性选择平板上生长、但在 Amp 抗性平板上不生长的 NAD 依赖性细菌克隆为候选突变株, 做进一步的 PCR 鉴定和 Southern blot 分析。

PCR 鉴定: 以候选突变株基因组 DNA 为模板, 用引物 *apxIV*01(5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3') 和 *apxIV*02(5'-GGCCATCGACTCAACCAT-3') PCR 扩增 APP 种特异性基因 *apxIV* 的 422bp 片段^[13], 判定候选突变株是否是 APP; 以引物 *km03*(5'-CGCGATTAAATTCCAACATG-3') 和 *km04*(5'-CATCGAGCATCAAATGAA AC-3') 扩增 pLOF/TAG 1-48 中 Tn10 转座子内部的 Km 抗性基因的 767bp 片段, 判断转座的发生与否。PCR 反应条件均为: 95°C 4min; 35 个循环(95°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min); 72°C 10min。

Southern blot 分析: 用 DNeasy Tissue Kit 提取 APP 亲本菌株和候选突变株的基因组 DNA, 经 *XhoI* 酶切和 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用常规毛细管转移法将 DNA 转移到尼龙膜(Roche, Mannheim, Germany)上。以 pLOF/TAG 为模板, 用 *km03/km04*

引物及 PCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche)按上述 PCR 条件合成 767bp 的地高辛标记的 Km 抗性基因探针。按 Roche 公司推荐的方法进行 Southern 杂交和信号检测。

2 结果和分析

2.1 APP 萘啶酸抗性菌株的选育及其抗性基因的序列分析

分别以萘啶酸敏感(NaI^S)的 APP 血清 1 型 4074 株(4074-S)、血清 3 型 S1421(S1421-S)、JL-03(JL03-S) 和 HB-12 株(HB12-S)为出发菌株, 通过体外萘啶酸连续加压传代培养, 选育出可以耐受 $100 \mu\text{g/L}$ NaI 的 APP 菌株, 分别命名为 4074-R、S1421-R、JL03-R 和 HB12-R。由于革兰氏阴性菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药性主要是由细菌 DNA 促旋酶 A 亚基的突变引起的, 因此, 我们 PCR 扩增和克隆上述 8 个 APP 菌株及血清 6/8 型的天然 NaI 抗性分离株 YYJX-R 的 DNA 促旋酶 A 亚基编码基因(*gyrA*)高变区的 267bp 片段, 克隆、测序后, 对其核苷酸和氨基酸序列进行了比较分析。结果发现, 所有 4 个 NaI 敏感 APP 菌株(4074-S、S1421-S、JL03-S、HB12-S)的 *gyrA* 核苷酸序列 100% 同源, 且与已经报道的 APP *gyrA* 基因的相应序列(GenBank 登录号为 NZ_AACK01000003)完全相同, 而天然和人工诱导的 NaI 抗性菌株的 *gyrA* 核苷酸序列中均存在多个位点的突变(数据未显示), 这些点突变导致每个抗性菌株的 DNA 促旋酶 A 亚基至少 1 个氨基酸残基的改变, 如在 4074-R 和 YYJX-R 菌株中 $\text{Asp}[\text{D}]^{87} \rightarrow \text{Gly}[\text{G}]$; 在 S1421-R 菌株中 $\text{Asp}[\text{D}]^{87} \rightarrow \text{Tyr}[\text{Y}]$; 在 JL03-R 菌株中 $\text{Asn}[\text{N}]^{57} \rightarrow \text{Lys}[\text{K}]$, $\text{Asp}[\text{D}]^{115} \rightarrow \text{Asn}[\text{N}]$; 在 HB12-R 菌株中 $\text{Ala}[\text{A}]^{116} \rightarrow \text{Thr}[\text{T}]$ (图 1)。

		28	
4074-S		VIVGRALPDVDRDG	40
4074-R		*****	40
S1421-R		*****	40
JL03-R		*****	40
HB12-R		*****	40
YYJX-R		*****	40
		57	
4074-S	LKPVHRRVLF	SMDQNSNTFNRPVKSARVVG	80
4074-R	*****	N*****	80
S1421-R	*****	N*****	80
JL03-R	*****	N*****	80
HB12-R	*****	N*****	80
YYJX-R	*****	N*****	80
		87	115/6
4074-S	GDSAVYDTIVRMAQPFSLR	LYLVLDGQGNFGSIDGDA	116
4074-R	*****	*****DA	116
S1421-R	*****	*****DA	116
JL03-R	*****	*****DA	116
HB12-R	*****	*****DA	116
YYJX-R	*****	*****DA	116

图 1 萘啶酸敏感(-S)和抗性(-R)APP 菌株的 *gyrase* A 亚基的部分(28-116)氨基酸序列比较

Fig. 1 Alignment of the partial amino acid sequence of *gyrase* A subunit from nalidixic acid sensitive (-S) and resistant (-R) APP strains. The amino acid sequences of strains S1421-S, JL03-S and HB12-S are same as that of strain 4074-S, so only the sequence of strain 4074-S was shown. The changed amino acid residues were marked in black background, and their position in the *gyrase* A subunit were shown upper the changed amino acid residues.

2.2 三亲本接合与二亲本接合的比较

为了选择筛选效率更高的接合方法,我们以血清1型标准菌株4074-R为受体菌同时进行三亲本接合和两亲本接合实验,结果分别如表2和表3所示。比较两种接合方法的实验结果,我们发现,两亲本接合的效率较高,转座突变菌株的平均产出率在48.9%~78%之间,平均可达62.6%,而三亲本接合的效率极低,转座突变菌株的平均产出率在只有1.5%~16%,平均为8.7%。

2.3 不同 APP 菌株接合及转座效率的比较

我们以不同的APP菌株4074-R、S1421-R和JL03-R为受体菌,与Tag1同时进行三亲本接合和两亲本接合试验,比较不同APP菌株接合及转座效率,结果如表4、表5所示。不同APP菌株接合及转座效率的比较试验结果显示,APP不同菌株在接合和转座效率上存在很大差异,血清1型菌株(4074-R)的效率明显高于血清3型菌株(S1421-R和JL03-R),3型标准菌株(S1421-R)高于地方分离株(JL03-R);地方分离株JL03-R的接合效率则极低。

表2 以4074-R菌株为受体菌的三亲本接合实验结果
Table 2 Tri-parental mating results using the receipt strain 4074-R

Tag	No. of filter	No. of positive colonies on Nal/Km plate		No. of Amp-sensitive colonies	No. of PCR positive colonies		No. of positive colonies	Positive rate /%*
		1 st passage	2 nd passage		<i>apxIV</i>	<i>Km</i>		
1	3	108	69	23	23	7	7	10.1
2	3	88	72	50	41	1	1	1.4
3	3	124	94	81	81	8	8	8.5
4	3	72	62	55	13	10	10	16.0
5	3	30	25	25	15	2	2	8.0
6	3	70	58	54	34	4	4	6.9

* the percentage of the positive clones in the total colonies grown on the TSA plates containing Nal and Km in the 2nd passage. Tag 1 – Tag 5 are transposon plasmids with different tag sequence. The same in Table 3 and/or Table 4.

表3 以4074-R菌株为受体菌的两亲本接合实验结果
Table 3 Bi-parental mating results using the receipt strain 4074-R

Tag	No. of filter	No. of positive colonies on Nal/Km plate		No. of Amp-sensitive colonies	No. of PCR positive Colonies		No. of positive colonies	Positive rate /%
		1 st passage	2 nd passage		<i>apxIVA</i>	<i>Km</i>		
1	3	65	63	55	55	50	49	78.0
2	3	48	40	35	33	25	25	62.5
3	3	79	68	51	50	43	43	63.3
4	3	72	62	55	54	44	44	71.0
5	3	30	25	25	15	13	13	52.0
6	3	70	58	54	34	28	28	48.9

表4 以不同APP菌株为受体菌的三亲本接合实验结果(Tag1)
Table 4 Tri-parental mating results using different receipt strains of APP and Tag1

Receipt strain	No. of filter	No. of positive colonies on Nal/Km plate		No. of Amp-sensitive colonies	No. of PCR positive colonies		No. of positive colonies	Positive rate /%
		1 st passage	2 nd passage		<i>ApXIVA</i>	<i>Km</i>		
4074-R	2	>1000	40	33	27	5	5	12.5
S1421-R	2	20	15	5	1	1	1	6.7
JL03-R	2	20	20	0	0	0	0	0

表5 以不同APP菌株为受体菌的二亲本接合试验结果(Tag1)
Table 5 Bi-parental mating results using different receipt strains of APP and Tag1

Receipt strain	No. of filter	No. of positive colonies on Nal/Km plate		No. of Amp-sensitive colonies	No. of PCR positive colonies		No. of positive colonies	Positive rate/%
		1 st passage	2 nd passage		<i>apxIVA</i>	<i>Km</i>		
4074-R	2	50	43	42	42	34	34	79.0
S1421-R	2	33	32	19	19	3	3	9.3
JL03-R	2	25	18	0	0	0	0	0

2.4 突变体的筛选与鉴定

经过抗性平板初步筛选后, 我们随机抽取了 200 个候选菌株进行 PCR 鉴定和 Southern-blot 验证。首先用 PCR 扩增 APP 种特异性基因 *apxIVA* 的 422bp 片断(*apxIVA*-PCR), 以鉴定候选菌株是否为 APP, 再用 PCR 扩增转座子内部的卡那霉素抗性基因的 767bp 片断(*km*-PCR), 以鉴定候选菌株是否发生了转座。结果发现, 三亲本接合所得到的候选菌株均为 APP, 但 60% 以上的菌株为 *km*-PCR 阴性(图 2-A), 说明这部分菌株没有发生转座突变, 很可能是卡那霉素耐过菌株; 而两亲本接合所得到的候选菌株只有极少数为假阳性转座突变株(图 2-B)。

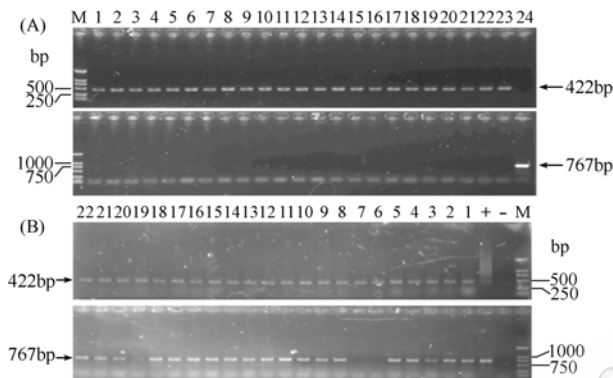


图 2 三亲本接合(A)和两亲本接合(B)的转座突变株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of transposal mutants from tri-parental mating (A) and bi-parental mating (B). In both Fig. A and B, upper panel showed the results of *apxIVA*-PCR (422bp), and the lower panel showed the results of *km*-PCR (767bp). + and - indicated positive and negative controls; M, Takara DNA Marker DL2000 (the size of the bands are 2000, 1000, 750, 500, 250 and 100 bp).

选取部分经抗性筛选和 PCR 鉴定为阳性的突变菌株, 提取基因组 DNA, 经 *XhoI* 酶切后, 以地高辛标记的 Km 抗性基因为探针进行 Southern blot 验证, 部分结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 卡那霉素

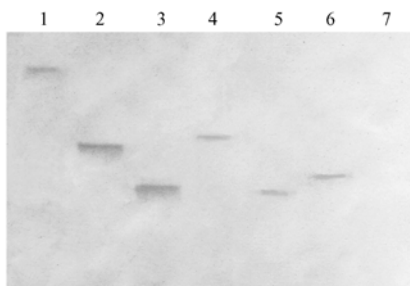


图 3 两亲本接合的转座突变株的 Southern blot 鉴定

Fig. 3 Identification of the transposal mutants from bi-parental mating by Southern blotting. Lane 1-6 showed the APP transposal mutants using Tag 1-Tag 6 respectively; Lane 7 showed the parental strain 4074-R. The genomic DNA of all APP strains was digested with *XhoI*.

抗性基因确实被插入到 APP 的基因组中, 而且多数转座子标签的插入是随机的; 图 3 中的 Tag3 和 Tag5 可能插入到 APP 基因组的同一位点。

3 讨论

信号标签诱变(STM)技术是一种在宿主体内直接筛选和鉴定病原菌毒力相关基因的高通量方法^[6], 该方法筛选到的基因是病原菌在宿主体内生存所必需的, 对病原菌致病机理的研究和弱毒突变体的筛选与利用具有重要意义。自 STM 方法创建以来, 已经在伤寒沙门氏菌、布鲁氏菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、霍乱弧菌、鼠疫耶尔森氏菌等多种病原菌进行了研究, 并找到了多种功能已知和未知的基因^[7-9]。Fuller 和 Sheehan 分别建立了胸膜肺炎放线杆菌(APP)血清 1 型 4074-R 株的 STM 方法, 并获得一些毒力相关基因^[10,11]。鉴于不同国家和地区流行的 APP 优势血清型不尽相同, 而不同血清型菌株之间的毒力和免疫学特性差异较大, 本研究拟构建我国流行的优势血清 3 型 APP 菌株的 STM 突变体库, 筛选毒力相关基因和弱毒突变体, 为我国猪传染性胸膜肺炎弱毒疫苗的研发奠定基础, 为此, 我们在选育萘啶酸抗性 APP 菌株 APP 的基础上, 比较研究了 三亲本接合和两亲本接合方法在 APP 血清 1 型菌株和不同的血清 3 型菌株中 STM 信号标签(tag)的转座效率及转座突变体的获得率。

受体菌 APP 菌株是否具有一种稳定的、有别于供体 *E. coli* 抗性表型的抗生素抗性, 是供体菌与受体菌接合后进行 APP 纯化及转座突变株筛选的前提和基础。供体菌(*E. coli*)的抗性表型是由其携带的转座子质粒所决定的, 本研究使用的转座子质粒携带 Km 抗性基因(抗性基因表达盒位于转座子内部)和 Amp 抗性基因(抗性基因表达盒位于转座子外部)。而现有的大多数 APP 菌株没有稳定的有别于 Km 和 Amp 抗性的抗性表型, 需要进行人工选育。对革兰氏阴性细菌而言, 萘啶酸(Nalidixic acid, Nal)抗性是比较容易选育的一种抗菌药物抗性。本研究通过在培养基中逐步添加 Nal 进行连续传代的方法在 5~7 天内就可以选育出可以稳定耐受 100 $\mu\text{g/L}$ Nal 的 APP 菌株。萘啶酸是喹诺酮类抗菌药物的原型, 其作用靶位是细菌的 DNA 拓扑异构酶, 通过抑制 DNA 拓扑异构酶而抑制细菌 DNA 合成; 革兰氏阳性菌中拓扑异构酶 IV 是第一靶位, 而革兰氏阴性

菌中拓扑异构酶 II(即 DNA 促旋酶, DNA gyrase)是第一靶位^[14,15]。细菌对喹诺酮类药物抗性的产生与 DNA 拓扑异构酶的突变有关。细菌 DNA 促旋酶由 A、B 两个亚基组成, 编码任一亚基的基因 *gyrA* 和 *gyrB* 发生突变均可产生 Nal 抗性, 但以 *gyrA* 的突变为主^[14]。为了进一步验证本研究选育出来的 APP 菌株 Nal 抗性产生的机理, 我们分别测定和分析了 4 个 Nal 敏感菌株(4074-S、S1421-S、JL03-S、HB12-S)及其诱导后的 Nal 抗性菌株(4074-R、S1421-R、JL03-R、HB12-R)和 1 个天然 Nal 抗性菌株(YYJX-R)的 *gyrA* 基因高变区的核苷酸(82-348nt)和氨基酸(28-116 位)序列, 结果显示, 4 个敏感菌株的 *gyrA* 基因高变区的核苷酸序列一致, 且与 GenBank 中公布的相应的野生型 *gyrA* 基因序列 100%同源; 而所有 Nal 抗性菌株的 *gyrA* 基因核苷酸序列中均存在多个位点的突变, 其中部分核苷酸的点突变导致每个抗性菌株的 DNA 促旋酶 A 亚基至少 1 个氨基酸残基的改变(如图 1 所示)。Akasaka 在分析铜绿假单胞菌的喹诺酮抗性基因时发现, *gyrA* 基因突变主要表现为 Thr⁸³→Ile, Ala 和 Asp⁸⁷→Asn, Gly, Thr(约占所有突变的 75%)^[16]。本研究中的 5 个 APP 萘啶酸抗性菌株中, 有 3 株表现为 87 位 Asp 突变(突变为 Gly 和 Thr), 另 2 株表现为 Asn⁵⁷→Lys 和 Asp¹¹⁵→Asn(JL03-R 株); Ala¹¹⁶→Thr(HB12-R 株), 没有发现 83 位 Thr 的突变。由此推断, APP 萘啶酸抗性的产生也与 *gyrA* 基因的突变有关, 其中某一个特定氨基酸残基的改变就可以导致萘啶酸抗性的改变。

鉴于国内外目前仅有 APP 血清 1 型标准菌株(4074-R)与 *E. coli* S17-1λpir 两亲本接合的报道, 本研究在选育出具有 Nal 抗性的 APP 血清 1 型和 3 型菌株后, 比较研究了三亲本接合和两亲本接合以及不同血清型、不同菌株在接合实验中的成功率。首先我们以 APP 血清 1 型标准菌株 4074-R 为受体菌, 比较了三亲本接合和两亲本接合的成功率, 结果发现两亲本接合的操作较简单, 成功率也较高, 而三亲本接合的操作较复杂, 假阳性率较高。然后, 我们比较研究了 APP 血清 1 型和 3 型菌株作为受体菌的接合与转座成功率, 结果显示, 两个血清 3 型菌株无论在两亲本接合还是在三亲本接合实验中的成功率均很低。为什么血清 3 型菌株作为受体菌的接合与转座成功率很低, 目前尚不清楚。我们正在测定血清 3 型 JL-03 株的全基因组序列, 希望能够从中找到一些解释的线索。

参 考 文 献

- [1] Bossé JT, Janson H, Langford PR, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infect*, 2002, 4 (2): 225-235.
- [2] Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, et al. 猪病学. 赵德明, 等译. 第八版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [3] 徐晓娟, 何启盖, 陈焕春. 猪传染性胸膜肺炎的诊断和疫苗研究进展. *中国预防兽医学报(Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2003, 25 (4): 3152-3157.
- [4] Blackall PJ, Bowles R, Smith BN, et al. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. *Aust Vet J*, 1999, 77(1): 39-43.
- [5] 逯忠新, 赵萍, 邵英德, 等. 猪传染性胸膜肺炎三价灭活疫苗的研究—菌种选择、疫苗制备及安全性试验. *中国兽医科技(Chinese Journal of Veterinary Science and Technology)*, 2002, 32 (3): 7-10.
- [6] Hensel M, Shea JE, Holden DW, et al. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 1995, 269(5222): 400-403.
- [7] Nicolas A, Alain C. Lesson from signature-tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29: 703-717.
- [8] Saenz HL and Dehio C. Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(5): 612-619.
- [9] Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb Pathog*, 2000, 29(1): 25-38.
- [10] Fuller TE, Martin S, Lowery DE, et al. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb Pathog*, 2000, 29(1): 39-51.
- [11] Sheehan BJ, Bossé JT, Langford PR, et al. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect Immun*, 2003, 71(7): 3960-3970.
- [12] Bigas A, Garrido ME, Llagostera M, et al. Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*, 2005, 105: 223-228.
- [13] 黄红亮, 周锐, 陈焕春, 等. 胸膜肺炎放线杆菌毒素 *apxIVA* 基因的克隆与间接 ELISA 方法的建立. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)*, 2005, 21(2): 294-299.
- [14] Drlica K, Zhao Xi-lin. DNA Gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997, 61(3): 377-392.
- [15] 谭艳, 方治平. 抗菌药物的作用机制及细菌耐药性机制的研究进展. *国外医药抗生素分册(World Notes on Antibiotics)*, 2003, 24(2): 65-69.
- [16] Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45(8): 2263-2268.

Generation of nalidixic acid-resistant strains and signature-tagged mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Lin Shang, Wei Li, Liangjun Li, Lu Li, Sihua Zhang, Tingting Li, Yaokun Li, Lei Liu, Zhiwei Guo, Rui Zhou*, Huanchun Chen*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a very important respiratory pathogen for swine and causes great economic losses in pig industry worldwide. Signature-tagged mutagenesis (STM) is an effective method to identify virulence genes in bacteria. In this study, we selected nalidixic acid-resistant strains of APP serotypes 1 and 3 by *in vitro* cultivation, and used as receipt strains for constructing transposon mutants by mating with *E. coli* CC118 λ pir or S17-1 λ pir containing mini-Tn10 tag plasmids pLOF/TAG1-48, with or without the help of *E. coli* DH5 α (pRK2073). We screened mutant strains by antibiotics selection, PCR and Southern blot identification. Our data revealed that nalidixic acid-resistance of APP strains could easily be induced *in vitro* and the resistance was due to the mutation in the DNA gyrase A subunit gene *gyrA*. In the mating experiments, the bi-parental mating was more effective and easier than tri-parental mating. Different APP strains showed a different mating and transposon efficiency in the bi-parental mating, with the strains of serotype 1 much higher than serotype 3 and the reference strain of serotype 3 higher than the field strains. These data were helpful for the construction of STM mutants and pickup of virulence genes of APP.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Nalidixic acid resistance; signature-tagged mutagenesis; mating

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30530590; 30771599) and the Program for New Century Excellent Talents in Universities (NCET-04-0740)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87281878; Fax: +86-27-87281795; E-mail: rzhou@mail.hzau.edu.cn (Rui Zhou); chenhch@mail.hzau.edu.cn (Huanchun Chen)

Received: 23 April 2007/Revised: 14 July 2007

科学出版社新书推介

根生物学：原理与应用

严小龙 编著

978-7-03-019035/Q.1857 ; ¥80.00 ; 2007年9月21日

本书是国内首部关于根生物学的专著。该书系统地介绍了植物根系的主要类型、根的结构及其功能，阐述了不同类型根系的发育过程、调控机理以及环境条件对根系发育的影响，探讨了植物根形态、根构型、根系分泌物等根系特性与养分有效性的关系及其定量分析方法，讨论了根瘤、菌根等根系共生系统的形成过程、影响因素以及它们在生态系统中的营养作用，论述了根系性状遗传改良的意义和各种方法途径。全书以作者和有关实验室多年来的根系生物学研究成果为依据，结合国内外相关研究进展编著而成，反映了根生物学的最新研究成果，对该领域的研究和应用工作有一定参考价值。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目