



猪支气管败血波氏杆菌 *hcp* 基因缺失株构建及其生物学特性研究

常宇慧, 张洪峰, 彭忠, 李慧, 陈焕春, 吴斌*

农业微生物学国家重点实验室, 生猪健康养殖协同创新中心, 华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】构建猪支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)VI型分泌系统(T6SS)溶血素共调节蛋白 *hcp* 基因缺失株, 并对其基本生物学特性进行初步的研究。【方法】使用自杀性质粒介导同源重组的方法敲除猪支气管败血波氏杆菌 QH0814 菌株 *hcp* 基因, 并比较 *hcp* 基因缺失前后, 菌体对细胞的黏附入侵、小鼠毒力及组织载菌量上的差异。【结果】成功构建支气管败血波氏杆菌 *hcp* 基因缺失株 QH0814 Δ *hcp*, 连续传 50 代且遗传稳定; 缺失株与亲本株生长无明显差异; 缺失株的黏附能力与亲本株差异不显著, 但入侵能力显著降低($P < 0.05$); 与亲本株相比, 半数致死量提高, 同时, 缺失株对昆明鼠的感染能力也显著降低($P < 0.05$)。【结论】*hcp* 基因的缺失对支气管败血波氏杆菌增殖无影响, 但缺失后其入侵能力和定殖能力显著降低, 由此推测 *hcp* 基因与支气管败血波氏杆菌的入侵和定殖相关。

关键词: 支气管败血波氏杆菌, *hcp* 基因, 缺失

猪支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)是存在于猪呼吸道中的 1 种重要革兰氏阴性病原菌, 可引起猪肺炎和猪萎缩性鼻炎(Atrophic rhinitis, AR), 也是猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)的重要致病因子之一, 且易与其它多种病原微生物发生混合感染, 增加猪群呼吸道疾病的发病率和复杂程度, 给养猪业带来了一定的经济损失^[1-3]。

六型分泌系统(Type VI secretion systems, T6SS)是广泛存在于大多数革兰氏阴性病原菌中

的一种蛋白分泌系统, 是一个固定于胞质中且跨越内膜、周质、外膜的管状结构复合体, 结构上类似于可收缩的噬菌体尾部注射器样结构^[4]。

T6SS 的功能是转运相关的效应因子到靶细胞内或者直接释放于外环境中发挥作用。溶血素共调节蛋白(Hemolysin-coregulated protein, Hcp)是 T6SS 复合体中重要的管道结构蛋白, 也可作为效应蛋白发挥一定的生物学效应, 是功能性 T6SS 的标识^[5]。

有研究表明, *hcp* 基因与细菌的致病性有一定的关系^[6-8], 然而目前未见到 *hcp* 基因在猪支气管

基金项目: 中博合作项目(720107-107012)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-87287201; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-06-30; 修回日期: 2016-09-16; 网络出版日期: 2016-10-26

波氏杆菌中的相关性报道, 因此, 本研究通过使用自杀性质粒介导同源重组的方法结合负向筛选技术^[9], 成功构建了无任何外源基因插入的支气管败血波氏杆菌 *hcp* 基因缺失株 QH0814 Δ *hcp*, 并对其生长特性、黏附入侵能力及对小鼠的致病力进行了研究, 为 *hcp* 基因在猪支气管败血波氏杆菌致病过程中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、试剂和动物

猪支气管败血波氏杆菌 QH0814 由本实验室分离鉴定并保存。自杀性质粒 pRE112(Cm^r)及其宿主菌大肠杆菌 x7213 由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠, 本实验室保存。大肠杆菌在 LB (Luria-Bertani) 培养基、猪支气管败血波氏杆菌在 TSA (胰蛋白胨大豆琼脂培养基) 或 TSB (胰蛋白胨大豆肉汤培养基) 中加入血清 (终浓度 5%–10%) 在 37 °C 中培养。5 周龄的雌性无特定病原菌 (SPF 级) 昆明鼠购自湖北省疾病预防控制中心。DNA 聚合酶 (Ex Taq)、DNA 连接酶 (T4)、各种限制性内切酶、dNTPs 等均购自大连宝生物 (TaKaRa) 工程有限公司。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 公布全基因组序列的支气管败血波氏杆菌标准菌株 RB50 (登录号: NC_002927.3) 的 *hcp* 基因序列设计扩增引物 (表 1), 并由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.3 支气管败血波氏杆菌 *hcp* 基因缺失株的构建

使用引物 A1/A2 及 B1/B2 分别扩增 *hcp* 基因上游 (926 bp) 和下游 (876 bp) 片段, PCR 反应体系如下: dH₂O 17.5 μ L, 10 \times Ex 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs 0.5 μ L, 引物各 1 μ L, Ex Taq 酶 0.5 μ L, 模板 2 μ L。

表 1. 本研究使用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp
A1	TGCGGTACCTGACCAAGATCTTC	926
A2	ACCAATAC	
B1	CGCGGATCCATCAACAGCCACTT	876
B2	GCTTTCTC	
C1	CTGGATCATGAACTACGTCGAC	Mutant 425
C2	AGCCAGCTGGAAAAGTTGC	Parental strain 893

反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存。上、下游 PCR 产物分别使用 *Kpn* I / *Bam* H I、*Bam* H I / *Sac* I 双酶切后, 与 pBluescript II SK(+) 连接构建 pSK-*hcp* 质粒。使用 *Kpn* I / *Sac* I 酶切 pSK-*hcp* 质粒及 pRE112 自杀性质粒, 构建重组自杀性质粒 pRE-*hcp*。参考文献[10]的方法, 以含有质粒 pRE-*hcp* 的大肠杆菌 X7213 为供体, QH0814 为受体进行接合转移, 最后使用 C1/C2 引物 PCR 鉴定阳性接合子, 随后将其不断无抗性传代, 直至筛选出 Cm 敏感的克隆, 继续使用 C1/C2 引物确认。

1.4 *hcp* 基因缺失株遗传稳定性及生长曲线的测定

缺失株连续传 50 代, 每隔 5 代使用 PCR 鉴定其遗传稳定性。将菌株接种 TSB 培养到 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 以 1:1000 转接到新鲜的 TSB 培养基中继续培养, 每 2 h 取样测 OD₆₀₀ 值绘制生长曲线。

1.5 细胞黏附与入侵实验

为探究 *hcp* 基因缺失后是否影响菌株对细胞的黏附入侵能力。参考文献[11]的方法, 将缺失株和亲本株以感染复数 (multiplicity of infection,

MOI=100 分别感染 PK-15 细胞,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱作用 2 h。黏附组每孔加入 0.1%胰酶 200 μ L 室温作用 5 min,裂解细胞后平板计数法进行细菌计数;入侵组使用含有 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的无菌磷酸缓冲液 1 mL 作用 45 min 后,无菌 PBS 洗 3 次。用预冷的无菌 ddH₂O 使细胞膨胀破碎,将获得的液体稀释一定的倍数涂板计数。

1.6 小鼠半数致死量(LD₅₀)的测定

25 只 5 周龄昆明鼠随机分为 5 组,分别以 10⁸ CFU、10⁷ CFU、10⁶ CFU、10⁵ CFU 的梯度、200 μ L 剂量腹腔注射攻毒。观察 2 周,记录小鼠死亡情况,采用寇氏(Korbor)法计算半数致死量(LD₅₀)。同样的方法计算亲本株的 LD₅₀。

1.7 小鼠组织载菌量实验

10 只 5 周龄昆明鼠随机分为 2 组,每只小鼠腹腔注射 200 μ L 10⁶ CFU,48 h 后采血、取肝脏、肺脏匀浆倍比稀释涂平板计数。

1.8 统计学分析

各试验组之间的差异显著程度通过统计软件 Prism (Graph-Pad Software, Inc.) 进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著,图标中以“*”表示。用 $P < 0.01$ 为差异极显著,图标中以“**”表示。

2 结果和分析

2.1 *hcp* 基因缺失株鉴定

接合转移后使用引物 C1/C2 进行 PCR 鉴定,亲本株只能扩增得到 900 bp 条带,而阳性单交换子可以同时扩增得到 900 bp 和 500 bp 两条片段。在无抗性传代筛选后,目的缺失株只能扩增得到 500 bp 条带(图 1)。

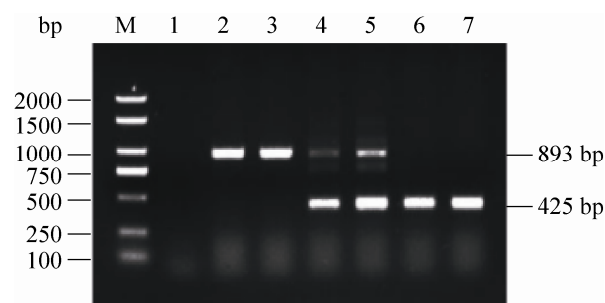


图 1. 亲本株、单交换子和缺失株 PCR 鉴定

Figure 1. PCR identification of parental strain, single of commutator, mutant. Lane 1: negative control; lane 2,3: parental strain; lane 4,5: single of commutator; lane 6,7: mutant; M: DNA maker 2000.

2.2 缺失株遗传稳定性和生长曲线的测定

连续传 50 代后都只能扩增得到 500 bp 条带,结果表明缺失株具有一定的遗传稳定性。缺失株与亲本株生长曲线无明显变化,说明体外培养条件下, *hcp* 基因对本身细菌生长代谢无影响(图 2)。

2.3 细胞黏附与入侵实验

经测定每孔中亲本株的黏附平均量和入侵平均量分别为 57333 CFU、2767 CFU;缺失株的黏附平均量和入侵平均量分别为 51667 CFU、2300 CFU。实验结果(图 3)以亲本株对 PK-15 的黏附率和入侵率为

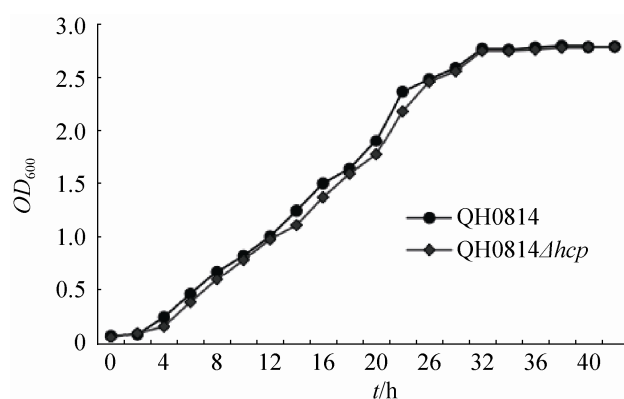


图 2. 缺失株和亲本株生长曲线

Figure 2. The growth curves of mutant and parental strain.

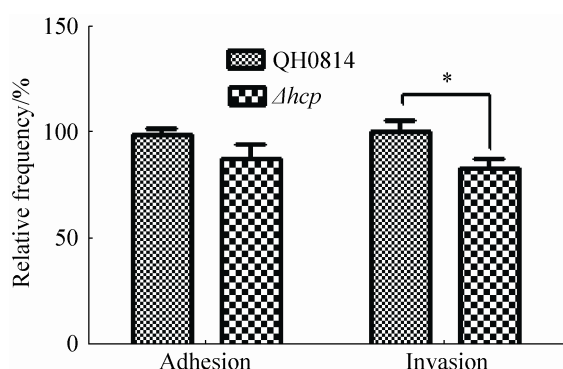


图 3. 缺失株和亲本株的黏附入侵实验

Figure 3. The adherence and invasion assays of mutant and parental strain. $P < 0.05$.

基准,即定义为 100%进行展示。缺失株的相对黏附率为 90.12%,缺失株的黏附能力并无显著降低;缺失株的相对入侵率为 83.12%,缺失株对 PK-15 的入侵能力显著降低($P < 0.05$)。

2.4 小鼠半数致死量(LD_{50})的测定

经寇氏(Korbor)法计算得到,亲本株对小鼠的 LD_{50} 为 1.6×10^7 CFU,而缺失株的 LD_{50} 为 3.1×10^7 CFU,缺失株的半数致死量较亲本株提高,毒力减弱(表 2)。

2.5 小鼠组织载菌量实验

结果以每毫升血液和每克器官中所含菌量(CFU)的对数为纵坐标进行展示。在血液中,亲本株 $\lg(\text{CFU/mL})$ 平均值为 4.53,缺失株为 3.89。在肺脏中,亲本株的 $\lg(\text{CFU/g})$ 平均值为 5.49,缺失株为 4.62。在肝脏中,亲本株的 $\lg(\text{CFU/g})$ 平均值为 3.09,缺失株为 2.55 (图 4)。可知,缺失株感染小鼠后在血液、肺脏和肝脏中的细菌量均低于亲本株($P < 0.05$),其中,缺失株在肺脏中的定殖能力极显著下降($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究使用的基因敲除方法是由自杀性质粒介导的两步同源重组,此法结合了反向筛选,即先将含有筛选标记(氯霉素抗性基因)的质粒整合到细菌基因组上,再用反向选择标记(*SacB*)筛选缺失株,最后得到的缺失株是不含有任何外源基因和筛选标记的菌株。本研究成功的敲除了 QH0814 菌株 *hcp* 基因,获得 QH0814 Δ *hcp* 缺失株并对其

表 2. 缺失株和亲本株 LD_{50} 的测定

Table 2. LD_{50} of mutant and parental strain

Group	CFU Per mouse/(1×10^6)					Mortality					$LD_{50}/(\text{CFU})$
Parental strain	370	40	7.1	2.0	0.37	5/5	4/5	3/5	1/5	0/5	1.6×10^7
Mutant	340	42	7.0	2.3	0.40	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	3.1×10^7

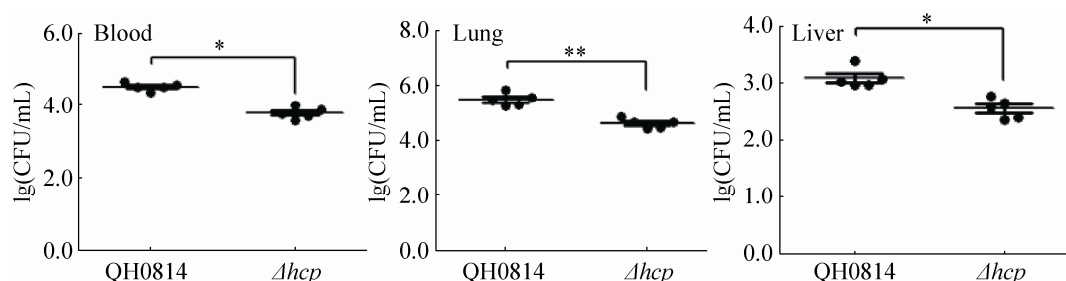


图 4. 小鼠体内组织载菌量

Figure 4. Colonization ability in different tissues of mice.

基本的生物学特性进行研究,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

目前有报道对大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞杆菌等病原菌 *hcp* 基因研究发现, *hcp* 基因参与细菌的侵袭、致病性等^[12-14]。对缺失株生长特性研究发现, *hcp* 基因缺失并不影响 QH0814 的生长,说明 *hcp* 基因不参与细菌的生长代谢。连续传 50 代,缺失株 QH0814 Δ *hcp* 仍具有良好的遗传稳定性,未发生恢复突变。缺失株对 PK-15 的黏附能力虽无明显改变,但入侵能力差异显著 ($P < 0.05$),由此表明 QH0814 Δ *hcp* 对非吞噬细胞侵袭能力减弱, *hcp* 基因可能参与黏附入侵或者导致分泌相关的黏附入侵蛋白降低^[15]。对 LD_{50} 的测定表明,基因缺失后菌株毒力有所下降。缺失株在小鼠血液、肺脏和肝脏中的定殖菌量均少于亲本株,且差异显著 ($P < 0.05$),其中在肺脏中的定殖能力下降极显著 ($P < 0.01$),说明 *hcp* 基因缺失后对小鼠组织器官的定殖能力减弱。

综上所述,本研究构建了支气管波氏杆菌 *hcp* 基因缺失株 QH0814 Δ *hcp*,对缺失株的生长特性、对细胞的侵袭性、对小鼠的毒力和对机体的定殖情况等进行研究,初步表明 *hcp* 对 Bb 的致病性发挥了一定作用,主要参与对机体的入侵定殖及感染等,由此可知细菌的 *hcp* 基因与致病性有一定的相关。

参 考 文 献

- [1] Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, 1980, 44(4): 722-738.
- [2] Hibrand-Saint Oyant L, Bourges D, Chevaleyre C, Raze D, Loch C, Salmon H. Role of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase in nasal colonization and in development of local and systemic immune responses in piglets. *Veterinary Research*, 2005, 36(1): 63-77.
- [3] García-de-la-Fuente C, Guzmán L, Cano ME, Agüero J, Sanjuán C, Rodríguez C, Aguirre A, Martínez-Martínez L. Microbiological and clinical aspects of respiratory infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2015, 82(1): 20-25.
- [4] Cascales E, Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2012, 367(1592): 1102-1111.
- [5] Ruiz FM, Santillana E, Spínola-Amilibia M, Torreira E, Culebras E, Romero A. Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the type VI secretion system. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129691.
- [6] Zhou Y, Tao J, Yu H, Ni JJ, Zeng LB, Teng QH, Kim KS, Zhao GP, Guo XK, Yao YF. Hcp family proteins secreted via the type VI secretion system coordinately regulate *Escherichia coli* K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 2012, 80(3): 1243-1251.
- [7] Wu HY, Chung PC, Shih HW, Wen SR, Lai EM. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2841-2850.
- [8] Wang SH, Dai JJ, Meng QM, Han XG, Han Y, Zhao YC, Yang DH, Ding C, Yu SQ. DotU expression is highly induced during *in vivo* infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 588.
- [9] Zhang Q, Hu RM, Hu JY, He H, Tang XB, Jin ML, Chen HC, Wu B. *aroA* deleted *Bordetella bronchiseptica* inspiring robust mucosal immune response and provide full protection against intranasal challenge. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(1): 55-61.
- [10] Edwards RA, Keller LH, Schifferli DM. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*, 1998, 207(2): 149-157.
- [11] ZhuGe XK, Wang SH, Fan HJ, Pan ZH, Ren JL, Yi L, Meng QM, Yang XQ, Lu CP, Dai JJ. Characterization and functional analysis of AatB, a novel autotransporter adhesin and virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2013, 81(7): 2437-2447.
- [12] Corcionivoschi N, Gundogdu O, Moran L, Kelly C, Scates P, Stef L, Cean A, Wren B, Dorrell N, Madden RH. Virulence characteristics of *hcp*⁺ *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail chicken. *Gut*

- Pathogens*, 2015, 7: 20.
- [13] Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(1): 9–21.
- [14] Leung KY, Siame BA, Snowball H, Mok YK. Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(1): 9–15.
- [15] Yu Y, Yang H, Li J, Zhang PP, Wu BB, Zhu BL, Zhang Y, Fang WH. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(10): 827–835.

Construction and characterization of an *hcp* mutant of swine *Bordetella bronchiseptica*

Yuhui Chang, Hongfeng Zhang, Zhong Peng, Hui Li, Huanchun Chen, Bin Wu*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, the Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Productin, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] We constructed *Bordetella bronchiseptica* QH0814 *hcp* mutant to characterize its pathogenicity. [Methods] Through the homologous recombination mediated by a suicide plasmid pRE112, we acquired the mutant QH0814 Δ *hcp* successfully. Then, we evaluated the growth condition, the ability of adhesion and invasion, the median lethal dose (LD_{50}) and the infection capacity. [Results] There was no significant variation of the growth rate between the mutant and the parental strain. Compared with the parental strain, the adherence ability of the mutant did not change remarkably. However, the invasion ability decreased significantly. Mice lethal test showed that the LD_{50} of the mutant was higher than that of the parental strain. Correspondingly, the bacterial colonization of the mutant in mice blood, lung and liver was much less than that of the parental strain. [Conclusion] The knocking-out of the *hcp* gene had no influence on bacterial growth, but it could attenuate significantly the invasion and colonization of the bacterium. Therefore, the gene may play a role in the pathogenesis of *Bordetella bronchiseptica*.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, *hcp* gene, deletion

(本文责编: 李磊)

Supported by the Zhongbo Cooperative Project (720107-107012)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87287201; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

Received: 30 June 2016; Revised: 16 September 2016; Published online: 26 October 2016