



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

赵夏薇^{1#}, 李晓霞^{1#}, 袁永丰¹, 宋艳¹, 杨睿², 易文毅¹, 谭静梅¹, 宋振辉^{1,3,4},
王芝英^{1,3,4}, 周作勇^{1,3,4*}

- 1 西南大学动物医学院, 重庆 402460
- 2 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460
- 3 重庆市兽医科学工程研究中心, 重庆 402460
- 4 西南大学医学院免疫研究中心, 重庆 402460

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. 微生物学报, 2022, 62(9): 3387–3398.

Zhao Xiawei, Li Xiaoxia, Yuan Yongfeng, Song Yan, Yang Rui, Yi Wenyi, Tan Jingmei, Song Zhenhui, Wang Zhiying, Zhou Zuoyong. Traceless deletion of *pld* in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and biological characteristics and pathogenicity of the mutant. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3387–3398.

摘要: 伪结核棒状杆菌是一种可以感染多种动物和人的兼性胞内寄生病原, 主要引起被感染动物慢性化脓性炎症反应。【目的】为进一步评价磷脂酶 D 基因(*pld*)在伪结核棒状杆菌感染致病中的作用。【方法】本研究采用同源重组技术, 在不引入外源基因情况下, 构建伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株。通过比较 *pld* 缺失株和野生株的菌落形态及生长曲线、体外对巨噬细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放及其在胞内的繁殖情况以及体内感染小鼠致死率及促炎细胞因子分泌水平, 研究 *pld* 与该病原感染致病之间的关系。【结果】无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌的菌落形态及生长无明显影响。与野生株 ATCC 19410 和 XH02 相比, ATCC 19410 Δ *pld* 和 XH02 Δ *pld* 失去了与马红球菌 ATCC 6939 的协同溶血功能, 所感染巨噬细胞的 LDH 释放水平显著下降, 胞内细菌数量显著降

基金项目: 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0884); 中央高校基本科研业务费专项基金(XDJK2020B016, XDJK2020RC001); 重庆市技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-msybX0216)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0884), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B016, XDJK2020RC001) and by the Chongqing Technology Innovation and Application Demonstration Project (cstc2018jscx-msybX0216)

[#]Those authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-46751547; E-mail: zzyxny@163.com

Received: 29 December 2021; Revised: 1 March 2022; Published online: 17 March 2022

低; 体内试验发现 ATCC 19410 Δ *pld* 对小鼠的致死率、肝脏和脾脏载菌量以及腹水及脏器促炎细胞因子水平均低于 ATCC 19410。【结论】成功构建了伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株。证实 *pld* 在该病原体外感染引发巨噬细胞死亡以及体内感染小鼠致病中具有重要作用。

关键词: 伪结核棒状杆菌; *pld* 无痕缺失; 巨噬细胞; 小鼠; 致病性; 炎症因子

Traceless deletion of *pld* in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and biological characteristics and pathogenicity of the mutant

ZHAO Xiawei^{1#}, LI Xiaoxia^{1#}, YUAN Yongfeng¹, SONG Yan¹, YANG Rui², YI Wenyi¹, TAN Jingmei¹, SONG Zhenhui^{1,3,4}, WANG Zhiying^{1,3,4}, ZHOU Zuoyong^{1,3,4*}

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

2 Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

3 Veterinary Science Engineering Research Center of Chongqing, Chongqing 402460, China

4 Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: [Objective] *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a facultative intracellular pathogen, infects a variety of animals and human, causing chronic suppurative inflammation. This paper aims to further evaluate the role of phospholipase D gene (*pld*) in *C. pseudotuberculosis* infection. [Methods] We employed homologous recombination to construct the traceless *pld* deletion strains (Δ *pld*) of *C. pseudotuberculosis* without introducing foreign genes. Then, we compared the colony morphology and growth curves of deletion strains and wild-type strains, observed the influence of *pld* deletion on lactate dehydrogenase (LDH) release of *C. pseudotuberculosis*-infected macrophages and the proliferation of the pathogen in macrophages, and determined the death rates of and levels of pro-inflammatory cytokines in mice infected with the wild type and the deletion strain, thereby dissecting the relationship between *pld* and pathogenicity of the bacterial species. [Results] Traceless deletion of *pld* had no obvious effects on colony morphology and growth of *C. pseudotuberculosis*. Compared with ATCC 19410 and XH02, ATCC 19410 Δ *pld* and XH02 Δ *pld* showed no synergistic hemolysis with *Rhodococcus equi* ATCC6939. The LDH release of the macrophages infected with ATCC 19410 Δ *pld* and XH02 Δ *pld* was significantly less than that of the macrophages infected with the wild strains, and *pld* deletion decreased the intracellular bacteria in macrophages. The death rate, bacterial load in the liver and spleen, and the levels of pro-inflammatory cytokines in ascites and organs of mice infected with ATCC 19410 Δ *pld* were lower than those of mice infected with ATCC 19410. [Conclusion] The traceless *pld* deletion strains of *C. pseudotuberculosis* were developed. We confirmed that *pld* played an important role in death of *C. pseudotuberculosis*-infected macrophages and pathogenesis of *C. pseudotuberculosis* in mice.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; traceless *pld* deletion; macrophages; mice; pathogenicity; inflammatory cytokines

伪结核棒状杆菌是一种重要的兼性胞内寄生菌, 该病原可以感染包括羊、牛、马、猪等

多种动物和人, 引起皮下淋巴结及内脏器官的化脓性炎症和以干酪样淋巴结炎为主要特征的

慢性传染病^[1]。近年来,我国四川、重庆和福建等众多省市关于山羊受伪结核棒状杆菌感染的报道日益增多^[2-5],给养羊业造成的潜在危害不容忽视,阐明其感染致病的机制具有重要意义。伪结核棒状杆菌感染致病与其毒力因子如磷脂酶 D (PLD)、 σ 因子、分枝菌酸和寡肽透过酶等有关,其中 PLD 是该病原最重要的毒力因子之一,与该病原的存活及传播密切相关^[6]。为进一步明确 *pld* 在该病原培养适应性及体内感染致病中的作用,本研究在不引入外源基因的情况下,构建了伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株,评价 *pld* 无痕缺失对该病原在巨噬细胞内繁殖及引发细胞死亡,以及对体内感染小鼠致病性的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

伪结核棒状杆菌(ATCC 19410 购自广东微生物菌种保藏中心;宣汉株 XH02 由本实验室分离鉴定保存);马红球菌 ATCC 6939 购自广东环凯微生物科技有限公司;LB 营养肉汤和 LB 营养琼脂购自北京奥博星生物技术有限公司;巯基乙酸盐肉汤购自 Eiken 公司;pK18mobsacB 质粒由本实验室保存;DL 2000 DNA Marker、Premix Taq、Pyrobest DNA Polymerase、细菌裂解液、限制性核酸内切酶 BamH I 和 Hind III 购

自 TaKaRa 公司;庆大霉素、蔗糖、异烟肼、甘氨酸购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、马血清和 RPMI 1640 购自 BI (Biological Industries) 公司;Opti-MEM 购自 Gibco 公司;Triton X-100、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;卡那霉素和胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自 OMEGA;IL-1 β 、TNF α ELISA 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 试验动物及细胞

C57BL/6 小鼠购自重庆市中药研究院,昆明系小鼠购自重庆莱彼特生物科技有限公司。

1.3 伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株构建

参照伪结核棒状杆菌 ATCC 19410 全基因组序列(GenBank 登录号:CP021251.1)设计伪结核棒状杆菌 *pld* 上、下游同源臂的引物(表 1),送北京擎科生物科技有限公司合成。

分别以 N-F/N-R 和 C-F/C-R 扩增 *pld* 的上、下游同源臂,1%琼脂糖凝胶电泳检测,以基因组纯化试剂盒回收扩增片段。参考文献[7],以 N-F/C-R 引物对回收的上、下游同源臂进行融合 PCR 扩增,以 1%琼脂糖凝胶电泳检测融合片段大小,以基因组纯化试剂盒回收上下游融合片段。将融合片段克隆入 ZTOPO-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,以 M13 引物进行菌液

表 1 本研究所用检测引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence of primers (5'→3')	Purpose	Product length/bp
N-F	CGC <u>GGATCC</u> TCCCATTCGTAATCGTCT	Upstream homology arms amplification	1 326
N-R	GCAACTGCGTCATCCAC		
C-F	GTGGATGACGCAGTTGCCAACTCCGTAAGTCCAGC	Downstream homology arms amplification	970
C-R	CCC <u>AAGCTT</u> TGTGCCCGTATTCTTGC		
<i>pld</i> -F	ATGAGGGAGAAAAGTTGTTTTA	Screening and identification of <i>pld</i> traceless deletion strains	924/426 [#]
<i>pld</i> -R	TCACCACGGGTTATCCGC		

The underline is the restriction site; [#] indicates that the amplified fragment of the *pld* traceless deletion strain is 426 bp.

PCR 鉴定筛选阳性克隆(ZTOPO-T- Δpld)。用 BamH I 和 Hind III 分别双酶切 ZTOPO-T- Δpld 和 pK18mobsacB 质粒,回收 *pld* 上、下游同源臂融合片段与 pK18mobsacB 质粒片段连接,转化 JM110 感受态细胞,涂布于含卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB 抗性琼脂平板,以同源臂引物进行鉴定所构建的 *pld* 基因缺失自杀质粒,命名为 pK18mobsacB Δpld 。

参考文献报道的方法^[8-9],制备 ATCC 19410 感受态细胞,将 pK18mobsacB Δpld 电转化入所制备的 ATCC 19410 感受态细胞中,涂布于含卡那霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5%兔血的琼脂平板培养,直至长出单个菌落。参考文献报道方法^[10]并适当调整,以 *pld*-F/*pld*-R 筛选出 *pld* 基因缺失单交换的菌株,将所筛选菌株在含 20%蔗糖的血琼脂平板上传代培养,PCR 筛选鉴定直至获得仅出现 426 bp 片段的双交换菌株(ATCC 19410 Δpld)。将 *pld*-F/*pld*-R 扩增 ATCC 19410 Δpld 的片段送生物公司测序验证。利用伪结核棒状杆菌 PLD 与马红球菌协同溶血的特性,进一步将 ATCC 19410 Δpld 与马红球菌 ATCC 6939 在 5%兔血琼脂平板上互相垂直而不相交划线接种,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 观察 ATCC 19410 Δpld 与马红球菌的协同溶血情况。同时以同样的方法构建 XH02 的 *pld* 无痕缺失株(XH02 Δpld)。

1.4 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌菌落形态及生长曲线的影响

将 ATCC 19410、ATCC 19410 Δpld 、XH02 和 XH02 Δpld 接种在含 5%兔血琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察菌落形态特点是否有差异。进一步挑取上述菌株单个菌落接种于 1 mL 含 10%马血清的 LB 肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h,用一次性 96 孔板在 595 nm 处测吸光值,调整各菌 OD_{595} 值至相同水平,按

1:50 比例将菌液接种于含 10%马血清的 LB 肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养。每隔 8 h 测一次 OD_{595} 值,比较其生长曲线。

1.5 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放的影响

参考文献报道的方法^[1,11],对 C57BL/6 小鼠腹腔注射 4%的灭菌巯基乙酸盐肉汤,4 d 后收集腹腔巨噬细胞,在 48 孔板(2.5×10^5 细胞/孔)过夜培养,以 ATCC 19410、ATCC 19410 Δpld 、XH02 和 XH02 Δpld 按 MOI=10 分别侵染巨噬细胞 1 h (ATCC 19410)或 2 h (XH02),洗去未感染的细菌,加入含庆大霉素的 Opti 培养液培养。在第 2、4、6、8、16 和 24 h (包含侵染时间),按照乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书测定 LDH 释放水平(公式 1)。

LDH 释放(%)=(感染组样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-样品对照孔吸光度) $\times 100$

公式(1)

1.6 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞胞内菌繁殖的影响

参考文献报道的方法^[1,11]收集腹腔巨噬细胞,在 12 孔板(1×10^6 细胞/孔)培养过夜,以 ATCC 19410 和 ATCC 19410 Δpld 按 MOI=10 分别侵染巨噬细胞 1 h,洗去未感染的细菌,加入含庆大霉素的 RPMI1640 培养液。在第 4 和 6 h (包含侵染时间),以 0.5% Triton X-100 裂解细胞稀释后在血琼脂平板上涂板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,计数细胞内伪结核棒状杆菌的数量。

1.7 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌体内感染小鼠致死率的影响

将 21 只昆明系小鼠随机分为 ATCC 19410 Δpld 、ATCC 19410 感染组和对照组,每组 7 只。以灭菌 PBS 液将 ATCC 19410 Δpld 和 ATCC 19410 稀释至 3×10^6 CFU/mL,分别腹腔

接种对应组小鼠(0.2 mL/只)。对照组小鼠每只接种 0.2 mL 灭菌 PBS 液, 攻毒后连续观察 2 周, 记录小鼠的死亡及病变情况。

1.8 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌体内感染小鼠脏器载菌量的影响

将 9 只 C57BL/6 小鼠随机分为 ATCC 19410 Δpld 、ATCC 19410 感染组和对照组, 每组 3 只。将 ATCC 19410 Δpld 、ATCC 19410 菌液以灭菌 PBS 稀释至 5×10^5 CFU/mL, 分别腹腔接种对应组小鼠(0.2 mL/只)。对照组小鼠每只接种 0.2 mL 灭菌 PBS 液。攻毒后 72 h 无菌摘取小鼠的肝脏和脾脏于 4 mL 离心管中, 分别加入 1 mL 生理盐水用匀浆机进行充分匀浆, 进而以灭菌生理盐水稀释涂板计数细菌数量。

1.9 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌体内感染小鼠促炎细胞因子水平的影响

将 9 只昆明系小鼠随机分为 ATCC19410 Δpld 、ATCC19410 攻毒组和对照组, 每组 3 只。3 组小鼠分别对应接种 ATCC 19410 Δpld 菌液(6×10^5 CFU/0.2 mL/只)、ATCC 19410 (6×10^5 CFU/0.2 mL/只)和 PBS 液(0.2 mL/只)。攻毒后 12 h 处死小鼠, 打开腹腔皮肤, 向每只小鼠腹腔注射 5 mL 灭菌 PBS 灌洗后收集腹水, 之后无菌摘取小鼠肝脏、脾脏、肺脏和肾脏于 4 mL 离心管中, 分别加入 2 mL PBS 液(肝脏)和 1 mL 生理盐水(脾脏、肺脏和肾脏), 用匀浆机进行充分匀浆, 离心取上清。参照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF α 和 IL-1 β 水平。

1.10 数据分析

采用 Graph Pad Prism 8.0.1 作图, 并以双尾非配对 *t* 检验进行统计分析, 其中生存曲线以 log-rank 检验分析。试验结果用平均数 \pm 标准误 ($\bar{X} \pm SE$)表示。 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株构建结果

以 N-F/N-R 和 C-F/C-R 扩增获得长度为 1 326

和 970 bp 左右的 *pld* 上、下游同源臂(图 1A)。以 N-F/C-R 引物扩增 pK18mobsacB Δpld , 获得长度约 2 296 bp 的上、下游同源臂融合片段(图 1B)。将 pK18mobsacB Δpld 电转入伪结核棒状杆菌, 在含卡那霉素抗性平板上培养, 以 *pld*-F/*pld*-R 筛选出 *pld* 缺失单交换菌株(图 1C), 进一步在蔗糖板上培养筛选出仅能扩增出 426 bp 片段的双交换菌株(图 1D、1E), 进一步测序证实成功构建了伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株。协同溶血试验发现, 与 ATCC 19410 和 XH02 相比, ATCC 19410 Δpld 和 XH02 Δpld 失去了与马红球菌 ATCC 6939 的协同溶血功能(图 2)。

2.2 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌菌落形态及生长曲线的影响结果

在鲜血琼脂平板上培养 ATCC 19410、ATCC 19410 Δpld 、XH02 和 XH02 Δpld , 均表现为针尖大小的乳白色菌落, 质地干燥, 易推动, 两者之间无明显差异(图 3A)。在液体培养基中 ATCC 19410 Δpld 与 ATCC 19410、XH02 与 XH02 Δpld 的生长状态亦无显著差异(图 3)。

2.3 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞 LDH 释放及其在细胞内繁殖影响结果

为评价 *pld* 缺失对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞致病力的影响, 本文检测了 *pld* 缺失株及其同源野生株感染巨噬细胞 LDH 的释放水平。结果发现, 与 ATCC 19410 和 XH02 感染巨噬细胞相比, ATCC 19410 Δpld 和 XH02 Δpld 感染巨噬细胞的 LDH 释放水平均显著或极显著降低(图 4A-C)。同时巨噬细胞内伪结核棒状杆菌数量计数结果显示, 与 ATCC 19410 感染组相比, 无痕缺失 *pld* 基因后, 在巨噬细胞内繁殖存活的 ATCC 19410 Δpld 极显著降低(图 4D)。

2.4 无痕缺失 *pld* 对伪结核棒状杆菌体内感染小鼠致死率、体内载菌量和细胞因子含量影响结果

致病力试验显示, ATCC 19410 组小鼠在接种后第 2 天开始死亡, 在试验观察期内, 其致死率为 85.7% (6/7), 而 ATCC 19410 Δ *pld* 组小鼠仅在接种后第 5 天死亡 1 只, 致死率仅为 14.3% (1/7), 比 ATCC 19410 野生株对小鼠的致死率下降 71.4% (图 5A)。脏器载菌量检测显示, ATCC 19410 Δ *pld* 感染小鼠肝脏和脾脏中的伪

结核棒状杆菌载菌量均低于 ATCC 19410, 其中以脾脏最显著, 其载菌量下降 84%, 差异极显著 ($P < 0.01\%$) (图 5B)。细胞因子检测发现, 与 ATCC 19410 感染小鼠相比, ATCC 19410 Δ *pld* 感染小鼠肝脏和肾脏中 IL-1 β 含量, 以及肺脏和腹水中 TNF α 含量均显著下降。此外, ATCC 19410 Δ *pld* 感染小鼠脾脏、肺脏和腹水中的 IL-1 β 含量, 以及肝脏、脾脏和肾脏中的 TNF α 含量也低于 ATCC 19410 感染小鼠, 差异不显著 (图 6)。

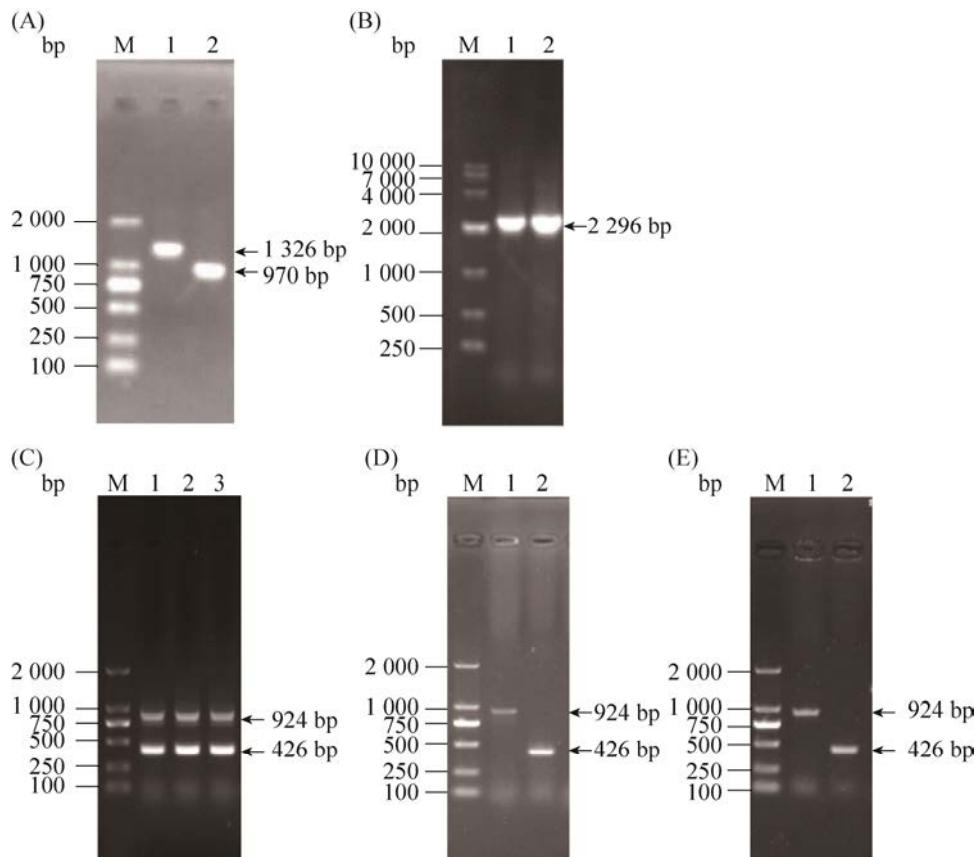


图 1 伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株构建结果

Figure 1 Results of traceless deletion of *pld* in *C. pseudotuberculosis*. A: amplification of *pld* upstream and downstream homologous arms from ATCC 19410. M: 2 000 bp DNA marker; lane 1: upstream homologous arm; lane 2: downstream homologous arm; B: identification of recombinant plasmids pK18mobsacB/ Δ *pld*. M: 10 000 bp DNA marker; lane 1–2: pK18mobsacB/ Δ *pld*; C: results of homologous arms single exchange of ATCC 19410. M: 2 000 bp DNA marker; lane 1–3: single exchange strains; D: results of homologous arms double exchange of ATCC 19410. Lane 1: ATCC 19410; lane 2: ATCC19410 Δ *pld*; E: results of homologous arms double exchange of XH02. Lane 1: XH02; lane 2: XH02 Δ *pld*.

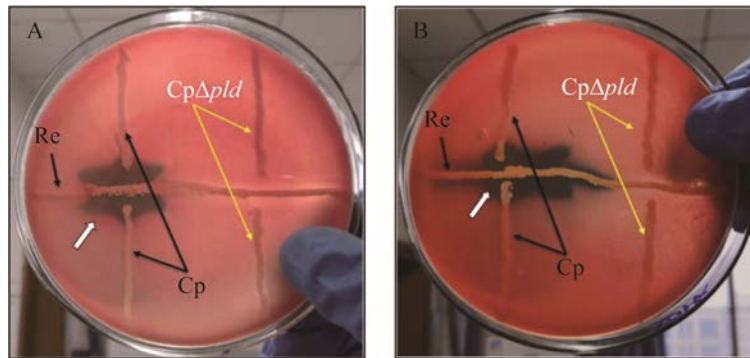


图2 ATCC 19410、ATCC 19410 Δpld 、XH02及XH02 Δpld 与马红球菌协同溶血结果

Figure 2 Hemolytic results of ATCC 19410, ATCC 19410 Δpld , XH02 and XH02 Δpld with *Rhodococcus equi*. A: ATCC 19410 and ATCC 19410 Δpld synergistically lysed with *Rhodococcus equi* (Re). ATCC 19410 and Re showed significant synergistic hemolysis (\rightleftharpoons), ATCC 19410 Δpld completely lost synergistic hemolysis. Re is *R. equinus* ATCC 6939; Cp is ATCC 19410; Cp Δpld is ATCC 19410 Δpld . B: XH02 and XH02 Δpld synergistically lysed with *Rhodococcus equi* (Re). XH02 and Re showed significant synergistic hemolysis (\rightleftharpoons), and XH02 Δpld completely lost synergistic hemolysis. Re is *R. equinus* ATCC 6939; Cp is XH02; Cp Δpld is XH02 Δpld .

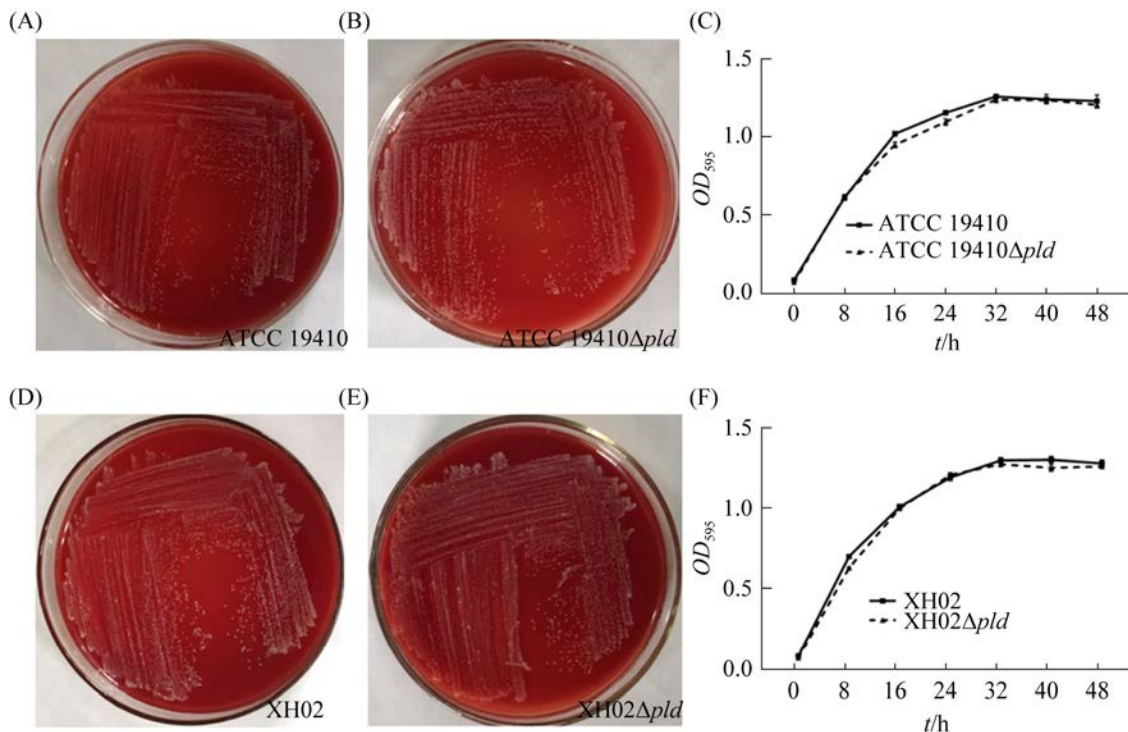


图3 ATCC 19410、ATCC 19410 Δpld 、XH02及XH02 Δpld 菌落形态及生长曲线

Figure 3 Colony morphology and growth curve of ATCC 19410, ATCC 19410 Δpld , XH02 and XH02 Δpld . A: colony morphology of ATCC 19410; B: colony morphology of ATCC 19410 Δpld ; C: growth curve of ATCC 19410 and ATCC 19410 Δpld ; D: colony morphology of XH02; E: colony morphology of XH02 Δpld ; F: growth curve of XH02 and XH02 Δpld . The data on growth curve represented mean \pm standard error.

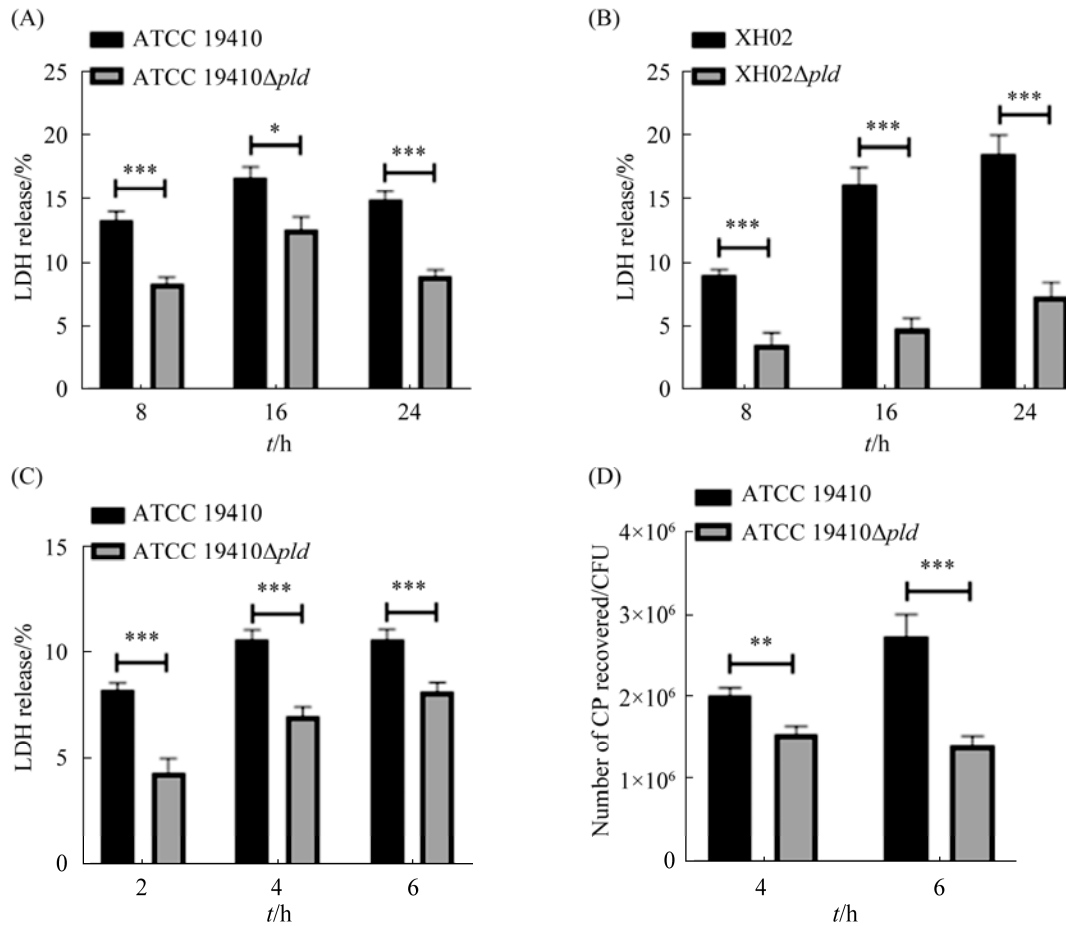


图 4 缺失 *pld* 基因对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞 LDH 释放及胞内菌繁殖的影响

Figure 4 Effect of *pld* mutant on LDH release and bacterial replication in *C. pseudotuberculosis* infected macrophages. A–C: the level of LDH release in macrophages infected with ATCC 19410, ATCC 19410Δ*pld*, XH02 or XH02Δ*pld* at indicated time post infection; D: the number of bacteria recovered from macrophages at 4 and 6 h post infection. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

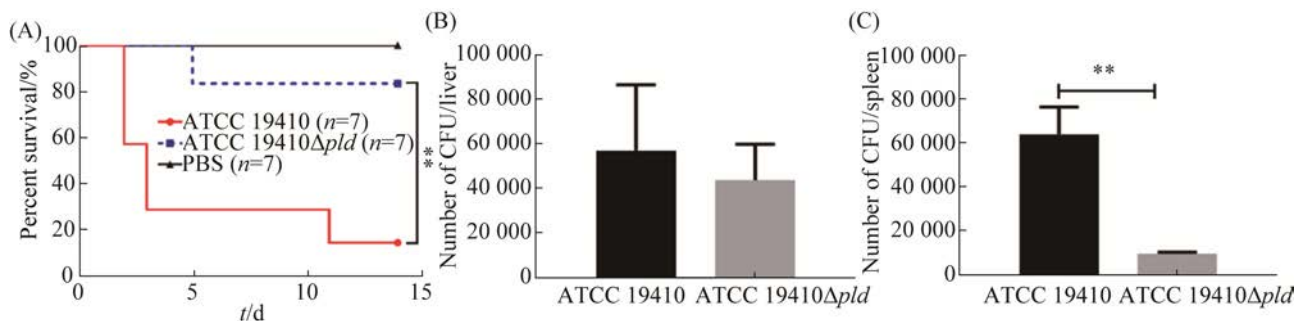


图 5 ATCC 19410 和 ATCC 19410Δ*pld* 感染小鼠生存曲线及脏器载菌量

Figure 5 Survival curve and bacterial load in organs of mice infected with ATCC 19410 and ATCC 19410Δ*pld*. A: survival curve of KM mice infected with ATCC 19410 and ATCC 19410Δ*pld*; B–C: bacterial load in liver and spleen of C57BL/6 mice infected with ATCC 19410 and ATCC 19410Δ*pld*. **: $P < 0.01$.

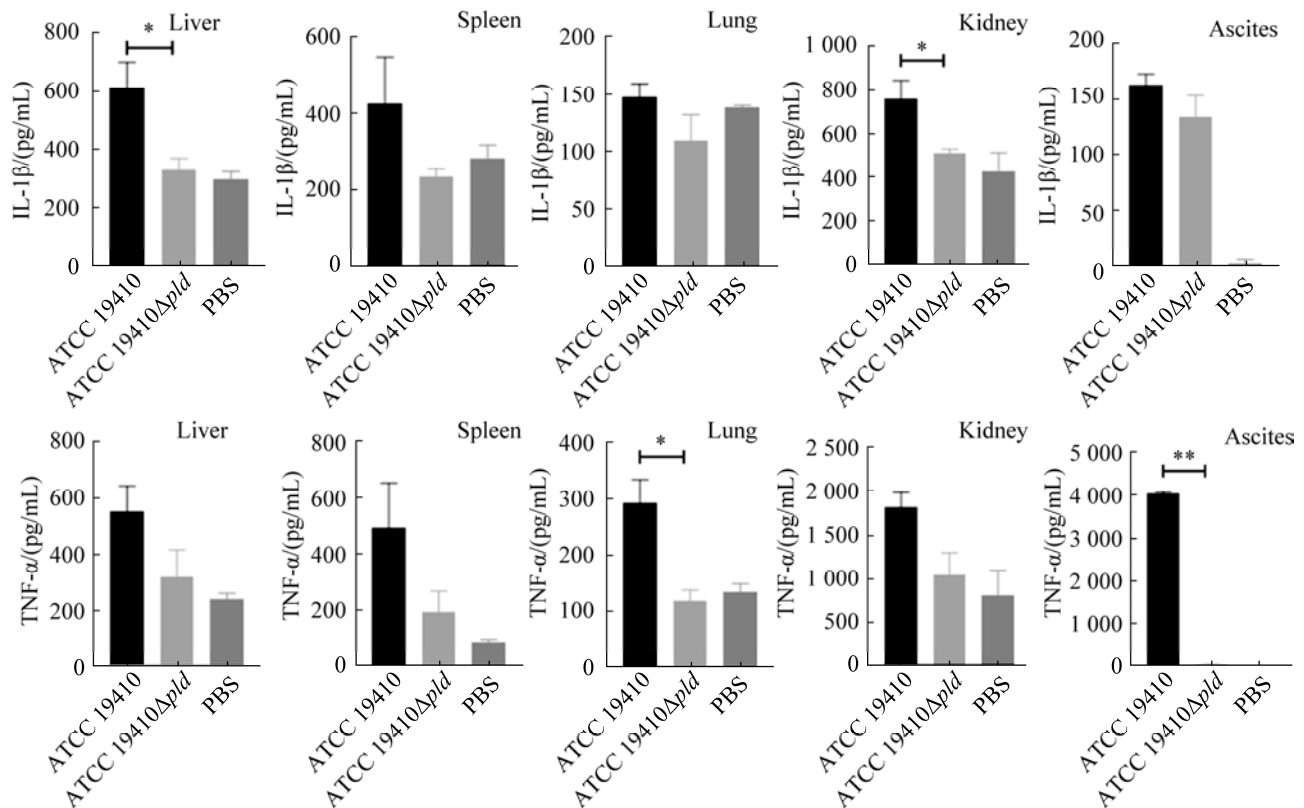


图 6 ATCC 19410 和 ATCC 19410 Δpld 感染小鼠脏器及腹水细胞因子水平

Figure 6 Cytokines in organs and ascites of mice infected with ATCC 19410 and ATCC 19410 Δpld . *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

伪结核棒状杆菌感染致病与其具有的多种毒力因子有关, 因此通过基因缺失手段评价相关毒力因子在该病原感染中的作用具有重要价值。基于同源重组技术, Hodgson 等最早构建了该病原的 *pld* 缺失株^[12], 之后陆续有关于缺失 *aro Q*^[13]、*Fag B*^[14]、*Opp D*^[15]和 *pho P*^[16]的报道, 然而这些研究大多采用了以耐药基因替换目的基因的方式构建缺失株。引入外源耐药基因存在以下不足: 其一, 外源基因可能影响所构建缺失株的生物学特性; 其二, 耐药基因的存在限制了缺失株在生产中的应用; 其三, 以耐药基因替换目的基因的方法不利于构建连

续缺失多个基因的菌株。而基于 *sacB* 基因反向筛选成为原核生物基因无痕缺失株构建的重要方案, *sacB* 编码分泌型果聚糖蔗糖酶, 可水解蔗糖形成果糖被细菌摄入, 大量的高分子果聚糖积聚于胞内影响细胞代谢活动而造成细菌死亡^[17]。已有基于此方法成功构建了肺炎克雷伯菌 *crp* 基因和鸭疫里默氏杆菌 *RIA_1117* 基因无痕缺失株的报道^[17-18]。本研究将 *pld* 上、下游同源臂融合后, 克隆进大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭质粒 pK18mobsacB, 利用卡那霉素平板上筛选第一次同源重组的单交换菌株, 利用 pK18mobsacB 中含 *sacB* 蔗糖致死基因特性^[19], 在含蔗糖板上筛选出第二次同源重组的双交换菌株, 因本研究未在伪结核棒状杆菌的基因组

中引入抗性基因, 从研究减毒疫苗及其他临床应用角度而言, 其安全性更高。同时, 本研究发现, *pld* 缺失株与野生株在固体培养基上的菌落形态和液体培养基中的生长状态均无明显差异, 其结果与肺炎链球菌(*K. pneumoniae*) *pld1* 基因突变后对其在 LB 肉汤中的生长无显著影响相似^[20], 提示 PLD 与伪结核棒状杆菌的菌落形态维持及体外生长繁殖不相关。

磷脂酶是多种病原的重要毒力基因。Stead 等研究发现, 缺失 *pldA* 的贝纳柯克斯体(*Coxiella Burnetii*) 在巨噬细胞内的繁殖速率降低, 认为缺失 *pldA* 后该病原对溶酶体的抵抗能力减弱^[21]。Jacobs 等研究表明, 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) *pld* 缺失后, 该菌对细胞侵袭能力及对小鼠致病力均有所下降^[22]。Driskell 等研究显示, 普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*) *pld* 突变后对豚鼠的毒力下降^[23]。Lery 等发现, *pld1* 突变的肺炎链球菌(*K. pneumoniae*) 在急性肺炎小鼠模型中似乎无毒, 而感染野生型菌株和回复突变的小鼠在不到一周的时间内均死亡^[20]。虽然 PLD 已被证实是伪结核棒状杆菌最重要的毒力因子之一, 然而 *pld* 缺失对该病原在被感染巨噬细胞内的繁殖情况、对巨噬细胞的致死水平, 以及对被感染小鼠致炎作用的影响等均不清楚。本研究发现, 缺失 *pld* 后, 伪结核棒状杆菌引起被感染巨噬细胞 LDH 释放水平显著减少, 而且巨噬细胞内存活的伪结核棒状杆菌数量也极显著下降, 表明 *pld* 缺失对该病原引起巨噬细胞死亡及其在巨噬细胞内存活密切相关。体内试验证实, 缺失 *pld* 的伪结核棒状杆菌对小鼠致病力下降, 被感染小鼠肝脏、脾脏载菌量降低, 提示缺失 *pld* 降低了该病原入侵上述脏器, 这可能与伪结核棒状杆菌 PLD 可水解细胞膜鞘磷脂中的酯键, 有助于该病原从感染部位扩散有关^[24]。伪

结核棒状杆菌感染的主要特征是引起化脓性肉芽肿(pyogranulomas), 以肉芽肿中 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平升高为特征^[25], IL-1 β 和 TNF α 均为重要的促炎细胞因子, 在应答该病原感染致病中起着重要作用^[26]。本研究发现无痕缺失 *pld* 后, 该病原感染小鼠肝脏和肾脏中 IL-1 β , 以及肺脏和腹水中 TNF α 含量均显著低于野生菌株, 表明 *pld* 无痕缺失可减轻伪结核棒状杆菌感染小鼠的致炎作用。

综上, 本研究在国内率先构建了伪结核棒状杆菌 *pld* 无痕缺失株, 发现 PLD 与该病原在巨噬细胞内生长繁殖及引发巨噬细胞死亡密切相关。同时证实 PLD 在该病原感染致病中发挥重要作用。在伪结核棒状杆菌感染过程中 PLD 引发巨噬细胞死亡以及影响该病原致病性的详细机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Shi JG, Wang ZY, Wu B, Li X, Li XX, Tian SQ, Wu JJ, Zhou ZY. Cofilin-1, peroxiredoxin-1, and galectin-3: major proteins released by macrophages infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 2019, 239: 108461.
- [2] Li HX, Yang HY, Zhou ZY, Li XX, Yi WY, Xu YY, Wang ZY, Hu SJ. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 2018, 168: 69–75.
- [3] 李子娟, 马欣, 李超, 郭佳成, 王兴龙, 杨增岐. 羊伪结核病流行现状及防控技术研究进展. *中国兽医学报*, 2018, 38(11): 2219–2226.
Li ZJ, Ma X, Li C, Guo JC, Wang XL, Yang ZQ. Research progress on epidemiology and control technology of caseous lymphadenitis. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(11): 2219–2226. (in Chinese)
- [4] 王锐鸿, 林昶, 池雪林, 陈仕龙, 曾显成. 山羊伪结

- 核棒状杆菌 LY20 株分离鉴定及病理组织学观察. 中国兽医学报, 2021, 41(12): 2411–2420.
- Wang RH, Lin C, Chi XL, Chen SL, Zeng XC. Isolation and identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats and histopathological observation of infected mice. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(12): 2411–2420. (in Chinese)
- [5] 刘招平. 山羊伪结核棒状杆菌的分离鉴定与防治措施. 中国草食动物科学, 2020, 40(4): 88–90.
- [6] 周作勇, 李和贤, 杨浩钺, 王芝英. 伪结核棒状杆菌毒力因子的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(12): 1115–1119.
- Zhou ZY, Li HX, Yang HY, Wang ZY. Research advances on the virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2017, 33(12): 1115–1119. (in Chinese)
- [7] 李红欢. 单增李斯特菌 Imo2193 基因缺失株的构建及其部分生物学特性研究. 石河子大学硕士学位论文, 2019.
- [8] Dorella FA, Estevam EM, Cardoso PG, Savassi BM, Oliveira SC, Azevedo V, Miyoshi A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3/4): 298–303.
- [9] Van Der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(4): 541–545.
- [10] 刘学胜. 产丁二酸谷氨酸棒状杆菌代谢工程育种. 江南大学硕士学位论文, 2013.
- [11] Tan JM, Yi WY, Wang ZY, Ye C, Tian SQ, Li XX, Zou AL, Zhao XW, Yuan YF, Wang XH, Hu SJ, Zhou ZY. TRIM21 negatively regulates *Corynebacterium pseudotuberculosis*-induced inflammation and is critical for the survival of *C. pseudotuberculosis* infected C57BL6 mice. *Veterinary Microbiology*, 2021, 261: 109209.
- [12] Hodgson AL, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infection and Immunity*, 1992, 60(7): 2900–2905.
- [13] Simmons CP, Hodgson AL, Strugnell RA. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 1997, 65(8): 3048–3056.
- [14] Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 208(1): 41–45.
- [15] Moraes PMRO, Seyffert N, Silva WM, Castro TLP, Silva RF, Lima DD, Hirata R, Silva A, Miyoshi A, Azevedo V. Characterization of the opp peptide transporter of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in virulence and pathogenicity. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 489782.
- [16] Tiwari S, Da Costa MP, Almeida S, Hassan SS, Jamal SB, Oliveira A, Folador EL, Rocha F, De Abreu VA, Dorella F, Hirata R, De Oliveira DM, Da Silva Teixeira MF, Silva A, Barh D, Azevedo V. *C. pseudotuberculosis* Phop confers virulence and may be targeted by natural compounds. *Integrative Biology*, 2014, 6(11): 1088–1099.
- [17] 王燕萍. 鸭疫里默氏杆菌 RaeE-RaeF-RopN 外排泵的鉴定及无痕敲除技术的建立. 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
- [18] 高钰双, 冯甜, 邱景富, 杨瑞馥, 周冬生, 李迎丽. 肺炎克雷伯菌基因无痕敲除方法的建立. 军事医学, 2013, 37(6): 431–434.
- Gao YS, Feng T, Qiu JF, Yang RF, Zhou DS, Li YL. A method for constructing unmarked deletion mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Military Medical Sciences*, 2013, 37(6): 431–434. (in Chinese)
- [19] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69–73.
- [20] Lery LMS, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, Barbe V, Bengoechea JA, Sansonetti P, Brisse S, Tournèze R. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence

- factor. *BMC Biology*, 2014, 12: 41.
- [21] Stead CM, Cockrell DC, Beare PA, Miller HE, Heinzen RA. A *Coxiella burnetii* phospholipase A homolog *pldA* is required for optimal growth in macrophages and developmental form lipid remodeling. *BMC Microbiology*, 2018, 18: 33.
- [22] Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 1952–1962.
- [23] Driskell LO, Yu XJ, Zhang LH, Liu Y, Popov VL, Walker DH, Tucker AM, Wood DO. Directed mutagenesis of the *Rickettsia prowazekii* *pld* gene encoding phospholipase D. *Infection and Immunity*, 2009, 77(8): 3244–3248.
- [24] Dorella FA, Pacheco LG, Seyffert N, Portela RW, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 8(2): 205–213.
- [25] Pépin M, Seow HF, Corner L, Rothel JS, Hodgson AL, Wood PR. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary Research*, 1997, 28(2): 149–163.
- [26] Lan DT, Makino S, Shirahata T, Yamada M, Nakane A. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1999, 61(11): 1203–1208.

(本文责编 张晓丽)