

• 动物及兽医生物技术 •

大肠杆菌-鸭疫里默氏杆菌高效穿梭质粒 pFY02 的构建和应用

冯言^{1,2,3}, 程安春^{1,2,3}, 刘马峰^{1,2,3}

1 四川农业大学动物医学院 预防兽医研究所, 四川 成都 611130

2 四川农业大学动物医学院 禽病防治中心, 四川 成都 611130

3 四川省动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

冯言, 程安春, 刘马峰. 大肠杆菌-鸭疫里默氏杆菌高效穿梭质粒 pFY02 的构建和应用. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1596–1605.
Feng Y, Cheng AC, Liu MF. Construction and application of *Escherichia Coli-Riemerella anatipestifer* efficient shuttle plasmid pFY02. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1596–1605.

摘要: 鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是引起鸭、鹅、火鸡等家禽传染性败血症及浆膜炎的主要病原。目前主要通过基因缺失及基因回补的方法对鸭疫里默氏杆菌的基因功能进行研究。然而, 目前使用的穿梭质粒 pLMF03 存在结合转移效率低、酶切位点少等缺陷, 不能用于所有鸭疫里默氏杆菌基因的回补。为解决这一问题, 文中将结合转移位点 *oriT*、鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726 ori*、高表达启动子基因及多种酶切位点逐一克隆至质粒 pPM5, 构建了新的穿梭质粒 pFY02。结果表明, 该质粒能够稳定存在于鸭疫里默氏杆菌, 且具有较高的结合转移效率。通过回补鸭疫里默氏杆菌 *tonB2* 基因缺失株表明, 该质粒可用于鸭疫里默氏杆菌基因的回补。总之, 文中构建的穿梭质粒 pFY02 更加完善了用于鸭疫里默氏杆菌基因回补的材料。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌, 基因回补, 穿梭质粒

Construction and application of *Escherichia Coli-Riemerella anatipestifer* efficient shuttle plasmid pFY02

Yan Feng^{1,2,3}, Anchun Cheng^{1,2,3}, and Mafeng Liu^{1,2,3}

1 Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: *Riemerella anatipestifer* is a pathogen that mainly infects ducks, geese, turkeys and other birds, causing

Received: January 12, 2018; **Accepted:** March 9, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31772772), International S&T Cooperation Program of Sichuan Province (No. 16GH0030).

Corresponding authors: Mafeng Liu. Tel: +86-835-2885836; Fax: +86-835-2885774; E-mail: liumafengra@163.com
Anchun Cheng. E-mail: chenganchun@vip.163.com

国家自然科学基金 (No. 31772772), 四川省国际科技合作与交流研究计划 (No. 16GH0030) 资助。

网络出版时间: 2018-03-23

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180323.1645.004.html>

septicemia and serositis. At present, the function of *R. anatipestifer* genes are studied by gene deletion and complementation. However, the shuttle plasmid pLMF03 used at present is inefficient for conjugation. Moreover, less restriction enzyme site can be used for cloning. It is not able to use for all the genes complementation. To solve this disadvantage, the conjugative transfer site, *R. anatipestifer* replication initiation gene, high expression promoter and a number of enzyme cutting sites were cloned into the plasmid pPM5, to generate the new shuttle plasmid pFY02. The shuttle plasmid pFY02 was stable in *R. anatipestifer* and had a high conjugative transfer efficiency. The *R. anatipestifer tonB2* mutant strain could be complemented by shuttle plasmid pFY02 expressing *tonB2*, indicating that the shuttle plasmid can be used to the complementation of *R. anatipestifer*. Taken together, the new shuttle plasmid pFY02 constructed in this study replenishes the genetic tool for complementation.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, complementation gene, shuttle plasmid

鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是属于黄杆菌科的革兰氏阴性菌, 常引起鸭、鹅、火鸡等家禽传染性的败血症及浆膜炎, 由于该病的高发病率与高死亡率, 已成为危害各国养鸭业的主要细菌性传染病之一^[1-3]。鸭疫里默氏杆菌血清型众多, 目前已经鉴定的至少有 21 种血清型, 且各血清型之间无交叉保护作用^[4-6], 这就为疫苗防控该病增加了极大困难。且随着耐药菌株的逐年增加, 使用抗生素防治该病也难以奏效^[7-8]。

欲有效防控该病, 首先要鉴定该菌的致病因子, 进而深入了解该病的发病机制。目前鉴定的参与鸭疫里默氏杆菌致病的毒力因子有 CAMP^[9-10]、sip^[11-12]、TbdR1^[13]、B739_1208^[14] 等。以上毒力基因的鉴定的方法基于基因缺失, 而基因缺失后需要将缺失基因克隆至穿梭质粒进行功能回补验证。在我们之前的研究中, 构建了能够用于鸭疫里默氏杆菌基因回补的穿梭质粒 pLMF03^[15], 然而该质粒所包含酶切位点较少, 接合转移效率低下, 不能满足所有鸭疫里默氏杆菌基因的回补。为解决这一缺陷, 本研究构建了结合转移效率高, 能稳定存在于鸭疫里默氏杆菌中且能用于鸭疫里默氏杆菌基因回补的穿梭质粒 pFY02。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

质粒 pPM5 由比利时那慕尔大学 Guy R.

Cornelis 教授惠赠^[16]。质粒 pEX18GM 由中国农业大学张立群教授惠赠^[17]。质粒 pLMF03 由本实验室保存; 菌株 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* S17.1、RA ATCC、RA CH-1、RA ATCC Δ tonB2 由本实验室保存; DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; PCR 试剂盒、限制性内切酶购自 New England Biolabs (NEB) 公司; DNA 连接试剂盒购自 Thermo 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 胰蛋白胨、酵母粉、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 购自 OXOID 公司; 琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司; 脱纤维羊血购自郑州益康生物有限公司; 氨苄西林、卡那霉素、头孢西丁购自上海生物工程有限公司; CaCl₂、NaCl、MgSO₄ 均来自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 公布的转移位点 *oriT* 序列 (GenBank Accession No. AAC27024.1)、鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726 ori* 序列 (GenBank Accession No. KU997673.1)^[18]、高表达启动子 *High EXP* 序列 (GenBank Accession No. CP003787.1) 和鸭疫里默氏杆菌 *tonB2* 基因序列 (GenBank Accession No. RA0C_1209) 分别设计扩增引物 *oriT* P1/P2、*pRA0726 ori* P1/P2、*High EXP* P1/P2 和 *tonB2* P1/P2, 其中在 *High EXP* P2 中加入酶切位点 *Sac* II、*Nhe* I、*Stu* I、*Bss* II 的序列; 分别设计鸭疫里默

氏杆菌单拷贝基因 *recA* (GenBank Accession No. RA0C_RS04870) 和穿梭质粒 pFY02 单拷贝基因 *cfx* (GenBank Accession No. KU997671.1) 的荧光定量 PCR 引物 *recA* P1/P2 和 *cfx* P1/P2 (表 1), 所有引物由华大基因有限公司合成。

1.3 基因的克隆及回收纯化

结合转移位点 *oriT* 的序列是以质粒 pEX18GM 为模板, *oriT* P1/P2 为引物进行 PCR 扩增得到; 鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726 ori* 的序列是以质粒 pLMF03 为模板, *pRA0726 ori* P1/P2 为引物进行 PCR 扩增得到; 高表达启动子 *High EXP* 的序列是以 RA CH-1 菌株基因组为模板, *High EXP* P1/P2 为引物进行 PCR 扩增得到; 鸭疫里默氏杆菌 *tonB2* 基因的序列是以 RA ATCC 菌株基因组为模板, *tonB2* P1/P2 为引物进行 PCR 扩增得到。扩增程序为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 x s (*oriT*、*pRA0726 ori*、*High EXP* 和 *tonB2* 基因的延伸时间 x 分别为 30 s, 1 min, 15 s 和 30 s),

30 个循环; 72 °C 延伸 7 min; 22 °C 保存。经 PCR 扩增后的产物, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 确定基因片段扩增正确后, 按照北京天根生化科技有限公司 DNA 纯化回收试剂盒操作说明进行 PCR 产物回收, -20 °C 保存。

1.4 穿梭质粒 pFY02 的构建方法

将纯化回收的转移位点 *oriT* 序列和待改造质粒 pPM5 进行 *Sph* I 和 *Hind* III 双酶切, 用 DNA 纯化回收试剂盒回收长片段酶切产物。用 DNA 连接试剂盒连接载体片段 pPM5 与基因片段 *oriT*, 将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用加有 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 固体培养基培养细菌, 37 °C 培养 24 h, 分离长出的单菌落, 用 PCR 的方法鉴定出阳性克隆 (鉴定 *oriT* 片段, 约 800 bp)。用 LB 液体培养基扩大培养阳性克隆菌株, 用质粒小提试剂盒提取质粒, 将质粒送往华大基因有限公司测序, 测序无误后, 将新构建质粒命名为 pPM5::*oriT*。

用限制性内切酶 *Sph* I 和 *Pst* I 双酶切质粒

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
<i>oriT</i> P1	CCCAAGCTTCGCCTGATGCGGTATTTCTCC	<i>Hind</i> III
<i>oriT</i> P2	ACATGCATGCCTAGAGTCGATCTTCGCCAGC	<i>Sph</i> I
<i>pRA0726 ori</i> P1	ACATGCATGCCTATTTAGGCATTAGCCCTC	<i>Sph</i> I
<i>pRA0726 ori</i> P2	AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAACAGATCTCGTATAGAGCTCG	<i>Pst</i> I
<i>High EXP</i> P1	ACGCGTCGACGTCGGCCATATTTCAAAAATTTAACTTAAACC	<i>Sal</i> I
<i>High EXP</i> P2	TGCTCTAGAGCAGCGCGCAGGCCTGCTAGCCCGCGGAATTTTAAATAATTTTTTAAATTTG	<i>Xba</i> I
<i>tonB2</i> P1	AAGGCCTTATGTCAGATGAAAATTTAGG	<i>Stu</i> I
<i>tonB2</i> P2	GCTCTAGAGCTTAATACTCAAAAATTCATTGCCAC	<i>Xba</i> I
<i>recA</i> P1	TGAAACTAGGTGATGGTACG	
<i>recA</i> P2	GTAGGTGGTTATCCTAAG	
<i>cfx</i> P1	AGAGTGACAACAATGCAAGC	
<i>cfx</i> P2	CGATTCATCAACATTGCAGC	

The single underlined sequences indicate restriction enzyme site.

pPM5::oriT 和鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726 ori* 片段,用上述方法将质粒 pPM5::oriT 和 *pRA0726 ori* 基因片段连接,转化及 PCR 鉴定(鉴定 *pRA0726 ori* 片段,约 2 000 bp)。质粒测序无误后,将新构建质粒命名为 pFY01。

用限制性内切酶 *Sal I* 和 *Xba I* 酶切质粒 pFY01 和高表达启动子 *High EXP* 片段,用上述方法将质粒 pFY01 和 *High EXP* 基因片段连接,转化及 PCR 鉴定(鉴定 *High EXP* 片段,约 250 bp)。质粒测序无误后,将新构建质粒命名为 pFY02。

1.5 穿梭质粒 pFY02 在鸭疫里默氏杆菌中的拷贝数检测

用 TSB 培养细菌 RA ATCC pFY02 至对数生长期,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取其总 DNA,测其 DNA 浓度后用去离子水稀释为 2 ng/ μ L 备用。用鸭疫里默氏杆菌单拷贝基因 *recA* 和穿梭质粒 pFY02 上单拷贝基因 *cfx* 进行荧光定量 PCR 对 DNA 模板量化分析,*cfx* 基因拷贝数比上 *recA* 基因拷贝数的比值即是穿梭质粒 pFY02 的拷贝数,具体操作方法参考 Lee 等^[19]。实验进行 3 次重复,取平均值。

1.6 穿梭质粒 pFY02 转化效率及稳定性检测

首先将构建的穿梭质粒 pFY02 转化至 *E. coli* S17.1 感受态细胞中,用加有 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 固体培养基培养细菌,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,分离长出的单菌落,用 PCR 的方法鉴定出阳性克隆(鉴定 *oriT* 与 *pRA0726 ori* 总片段,约 2 800 bp)。

本研究使用大肠杆菌(供体菌)-鸭疫里默氏杆菌(受体菌)结合转移的方法,将质粒 pFY02 导入鸭疫里默氏杆菌中,即将 *E. coli* S17.1 pFY02 和鸭疫里默氏杆菌 RA ATCC11845 分别用 LB 和 TSB 培养至对数生长期,7 000 r/min 离心 10 min,去掉上清,用 10 mmol/L 的无菌 $MgSO_4$ 分别清洗并重悬菌体,然后按 1 OD (约 2×10^9 CFU) 鸭疫里默氏杆菌和 5 OD (约 2×10^8 CFU) 大肠杆菌的

比例混合两种菌,用孔径为 0.22 μ m 的灭菌滤膜过滤混合的细菌,将滤膜贴于血平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 10–12 h 后取出滤膜,用 10 mL 浓度为 10 mmol/L 的 $MgSO_4$ 洗下滤膜上的菌,取 100 μ L 菌液涂于加有 50 μ g/mL 卡那霉素和 1 μ g/mL 头孢西丁的血平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。分离长出的单菌落,用 PCR 的方法鉴定阳性菌落(鉴定 *oriT* 与 *pRA0726 ori* 总片段,约 2 800 bp)。将鉴定为阳性的单菌落用血平板传 10 代,用 PCR 的方法鉴定质粒的稳定性。

用上述的结合转移方法将普通的穿梭质粒 pLMF03 和新构建的穿梭质粒 pFY02 分别导入鸭疫里默氏杆菌 RA ATCC11845。进行结合转移时,两组实验结合转移过程中使用的大肠杆菌和鸭疫里默氏杆菌数保持一致,对比两组实验结合转移后长出来的菌落数并分别数出平板上的菌落数,计算出两种穿梭质粒的结合转移效率(计算公式:结合转移后长出来的鸭疫里默氏杆菌数/结合转移前加入的鸭疫里默氏杆菌数)。实验进行 3 次重复,取平均值。

1.7 穿梭质粒 pFY02 在鸭疫里默氏杆菌回补基因能力的检测

用限制性内切酶 *Stu I* 和 *Xba I* 酶切质粒 pFY02 和 *tonB2* 片段,按照步骤 1.4 的方法将 *tonB2* 片段克隆到穿梭质粒 pFY02 上,用 PCR 的方法鉴定阳性克隆(鉴定 *tonB2* 片段,约 850 bp)。用 LB 液体培养基扩大培养阳性克隆菌株并用质粒小提试剂盒提取质粒 pFY02::*tonB2*。用结合转移的方法将重组质粒 pFY02::*tonB2* 导入 RA ATCC Δ *tonB2* 菌株中,分离长出的单菌落,用 PCR 的方法鉴定回补菌株(鉴定 *tonB2* 片段,约 850 bp)。

通过检测生长曲线初步鉴定穿梭质粒 pFY02 的回补能力。在 3 个均加有 20 mL TSB 的离心管中分别加入过夜培养的 RA ATCC pFY02、RA

ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 及 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2* 菌株,并控制初始 OD_{600} 为 0.1, 37 °C 摇床培养,每隔 2 h 测一次 OD_{600} 值,根据测量不同菌株的 OD_{600} 值制图。实验进行 3 次重复,取平均值。

1.8 穿梭质粒 pFY02 回补基因表达量的检测

用 Western blotting 的方法检测穿梭质粒 pFY02 回补基因的表达量。用 TSB 分别培养 RA ATCC pFY02、RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2* 至 OD_{600} 为 1, 分别取 1 mL 上述菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 去掉上清后分别用 100 μ L 的蛋白上样缓冲液重悬, 样品经沸水浴 10 min 后分别取 10 μ L 进行 SDS-PAGE。电泳完的 PAGE 胶经过转膜、蛋白封闭、孵育抗体、显色后观察各个菌的 TonB2 蛋白是否表达。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌-鸭疫里默氏杆菌穿梭质粒 pFY02 的构建

本研究构建的穿梭质粒是在质粒 pPM5 的基础上进行改造的,为了提高其结合转移效率,我们需要将转移位点 *oriT* 序列克隆到此质粒中。用限制性内切酶 *Sph* I 和 *Hind* III 双酶切 *oriT* 片段和质粒 pPM5,用 DNA 连接试剂盒连接载体片段和目的片段,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后用加有 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 固体培养基培养细菌,分离长出的单菌落,用 PCR 的方法鉴定出阳性克隆(鉴定 *oriT* 片段,约 800 bp),结果见图 1。提取阳性克隆菌株中的质粒,将质粒送往华大基因有限公司测序,测序无误,重组质粒构建成功,将其命名为 pPM5::*oriT*。

由于此质粒中无鸭疫里默氏杆菌的复制起始位点,为了使其能够在鸭疫里默氏杆菌中复制,本研究将鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726*

ori 克隆到此质粒中。限制性内切酶用 *Sph* I 和 *Pst* I, 构建方法同上。用 PCR 鉴定阳性克隆时,鉴定 *pRA0726 ori* 片段,约 2 000 bp,结果见图 2。质粒测序无误,重组质粒构建成功,将其命名为 pFY01。

为了方便基因片段插入穿梭质粒上且提高基因的表达量,我们将在质粒 pFY01 上克隆一段带有多个内切酶位点的高表达启动子序列 *High EXP*。

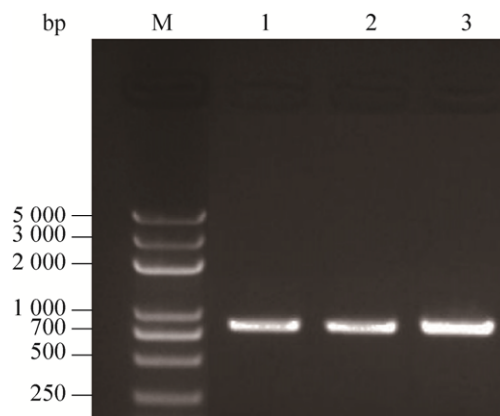


图 1 菌落 PCR 鉴定 *E. coli* DH5 α pPM5::*oriT*

Fig. 1 Identification of the *E. coli* DH5 α pPM5::*oriT* strains by PCR. M: DM5000 DNA marker; 1: *oriT* gene (about 800 bp) was amplified from the plasmid pEX18GM; 2-3: *oriT* gene was amplified from the individual bacterial colonies of *E. coli* DH5 α pPM5::*oriT*.

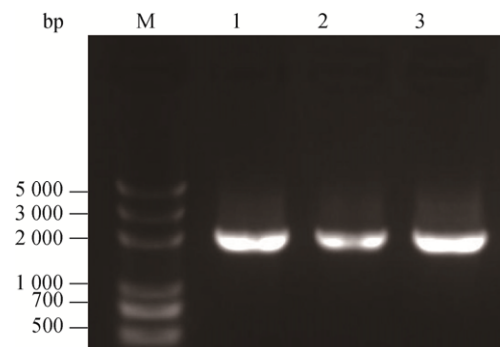


图 2 *E. coli* DH5 α pFY01 的菌落 PCR 鉴定图

Fig. 2 Identification of the *E. coli* DH5 α pFY01 strains by PCR. M: DM5000 DNA marker; 1: *pRA0726 ori* gene (about 2 000 bp) was amplified from the plasmid pLMF03; 2-3: *pRA0726 ori* gene was amplified from the individual bacterial colonies of *E. coli* DH5 α pFY01.

限制性内切酶用 *Sal* I 和 *Xba* I, 构建方法同上。用 PCR 鉴定克隆中是否含有 *High EXP* 片段, 约 250 bp, 结果见图 3。从阳性克隆中抽提质粒经测序鉴定, 确认无误后将其命名为 pFY02。穿梭质粒 pFY02 构建过程示意图见图 4。

2.2 穿梭质粒 pFY02 在鸭疫里默氏杆菌中的拷贝数测定

使用 Lee 等^[19]的方法, 通过荧光定量 PCR 检测穿梭质粒 pFY02 在鸭疫里默氏杆菌的质粒拷贝数, 实验进行 3 次重复, 取平均值, 结果见图 5。结果显示 *cfx* 基因的拷贝数比上 *recA* 基因的拷贝数的比值约为 26, 即穿梭质粒 pFY02 的拷贝数为 26。

2.3 穿梭质粒 pFY02 结合转移效率提高且能在鸭疫里默氏杆菌中稳定存在

将穿梭质粒 pFY02 转化至 *E. coli* S17.1 中, 用 PCR 的方法鉴定出阳性克隆 *E. coli* S17.1 pFY02 (鉴定 *oriT* 与 *pRA0726 ori* 总片段, 约 2 800 bp); 通过大肠杆菌 (供体菌) -鸭疫里默氏杆菌(受体菌) 结合转移的方法, 将质粒 pFY02 导入鸭疫里默氏

杆菌中, 用 PCR 的方法鉴定阳性克隆 RA ATCC pFY02 (鉴定 *oriT* 与 *pRA0726 ori* 总片段, 约 2 800 bp); 将鉴定为阳性的 RA ATCC pFY02 传 10 代, 用 PCR 的方法鉴定质粒的稳定性 (鉴定 *oriT* 与 *pRA0726 ori* 总片段, 约 2 800 bp), 结果见图 6。可以看出质粒能稳定存在于鸭疫里默氏杆菌中。进行 3 次重复实验, 取平均值, 计算出普通穿梭质粒 pLMF03 与穿梭质粒 pFY02 结合转移长出的菌落数分别约为 120 个和 2 500 个(图 7A)。计算出普通穿梭质粒 pLMF03 与穿梭质粒 pFY02 的结合转移效率分别为 6×10^{-6} 和 1.25×10^{-4} (图 7B), 即穿梭质粒 pFY02 的结合转移效率较普通穿梭质粒 pLMF03 高, 结合转移效率提高约 21 倍。

2.4 穿梭质粒 pFY02 可用于鸭疫里默氏杆菌基因缺失株的回补

本研究选择鸭疫里默氏杆菌 *tonB2* 基因缺失株来验证穿梭质粒 pFY02 的基因回补能力。将鸭疫里默氏杆菌的 *tonB2* 基因克隆到穿梭质粒 pFY02 中, 构建重组质粒 pFY02::*tonB2*。通过结合转移将质粒 pFY02::*tonB2* 导入 RA ATCC $\Delta tonB2$ 菌株, 分离长出的单菌落, 用 PCR 的方法鉴定 (鉴定 *tonB2* 片段, 约 850 bp), 结果见图 8, 即回补菌株 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2* 构建成功。

在 3 个均加有 20 mL TSB 的离心管中分别加入过夜培养的 RA ATCC pFY02、RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2*, 并控制初始 OD_{600} 为 0.1, 37 °C 摇床培养, 每隔 2 h 测一次 OD_{600} , 根据测量不同菌株的 OD_{600} 值制图。实验进行 3 次重复, 取平均值, 结果如图 9 所示。结果显示, 与 RA ATCC 野生株相比, *tonB2* 基因缺失株生长明显受损, 然而 *tonB2* 基因回补株生长状态明显好于缺失株, 说明穿梭质粒 pFY02 具有回补鸭疫里默氏杆菌基因的功能。

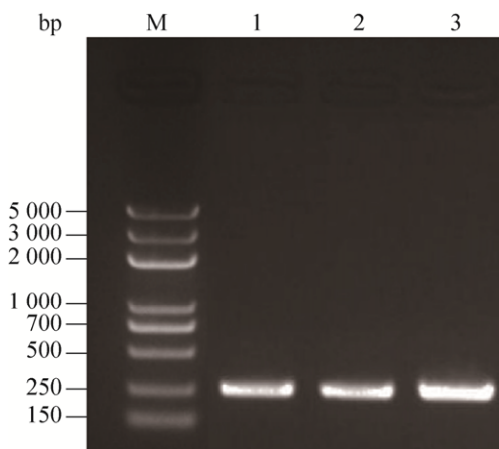


图 3 *E. coli* DH5 α pFY02 的菌落 PCR 鉴定图

Fig. 3 Identification of the *E. coli* DH5 α pFY02 strains by PCR. M: DM5000 DNA marker; 1: *High EXP* gene (about 250 bp) was amplified from the genome of RA CH-1; 2-3: *High EXP* gene was amplified from the individual bacterial colonies of *E. coli* DH5 α pFY02.

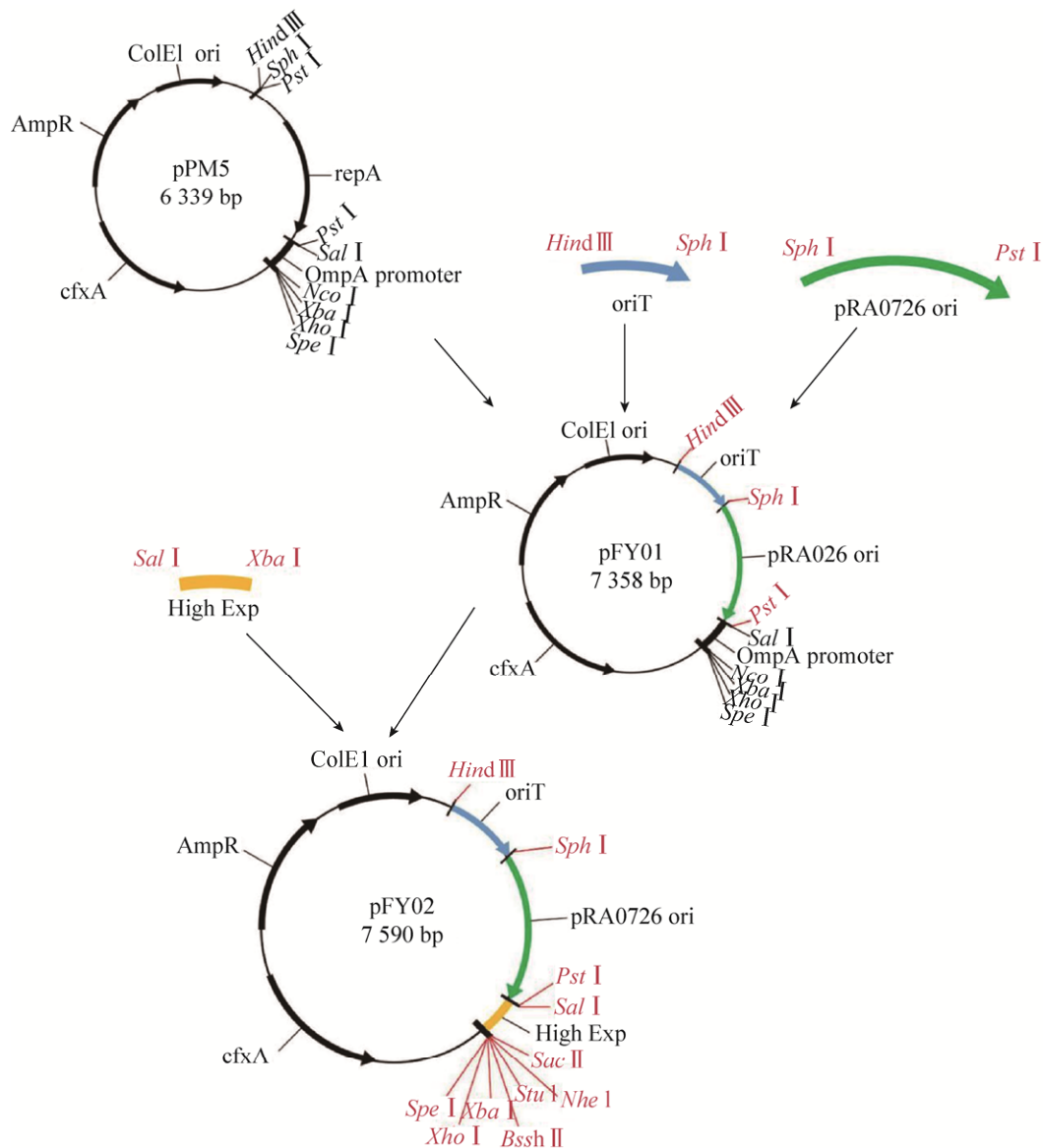


图4 穿梭质粒 pFY02 的构建过程示意图

Fig. 4 Schematic of the establishment process about shuttle plasmid pFY02.

2.5 穿梭质粒 pFY02 回补鸭疫里默氏杆菌的基因能稳定表达

为了检测插入穿梭质粒 pFY02 的基因片段在鸭疫里默氏杆菌中的表达能力, 使用 Western blotting 的方法来检测 RA ATCC pFY02、RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2* 中的 TonB2 蛋白水平, TonB2 蛋白约 42 kDa。结

果见图 10, RA ATCC pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::*tonB2* 中 TonB2 蛋白的水平相似, 而 *tonB2* 基因缺失株中没有 TonB2 蛋白, 说明插入穿梭质粒 pFY02 的基因能够在鸭疫里默氏杆菌中稳定表达。

3 讨论

随着对鸭疫里默氏杆菌研究的深入, 基因缺

失技术得到广泛应用, 使缺失基因的功能得到回补成为研究基因功能的必经之路。然而目前能用于鸭疫里默氏杆菌基因回补的质粒数量有限, 且酶切位点较少, 接合转移效率低下, 成为鸭疫里默氏杆菌基因功能研究的瓶颈。

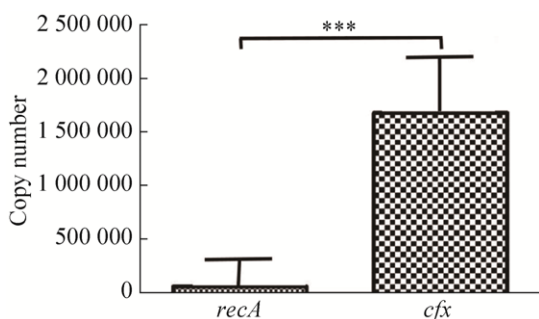


图 5 荧光定量 PCR 检测 *recA* 基因和 *cfx* 基因的拷贝数

Fig. 5 Identification of the copy number of *recA* and *cfx* by real-time qPCR. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments ($n=3$).

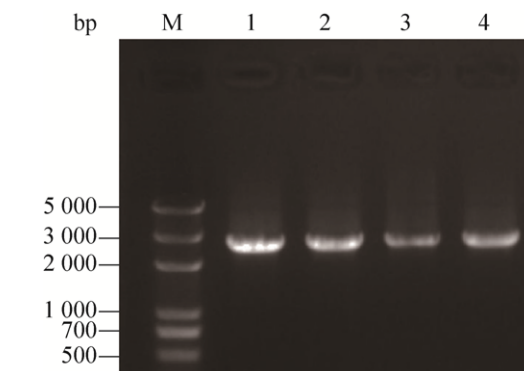
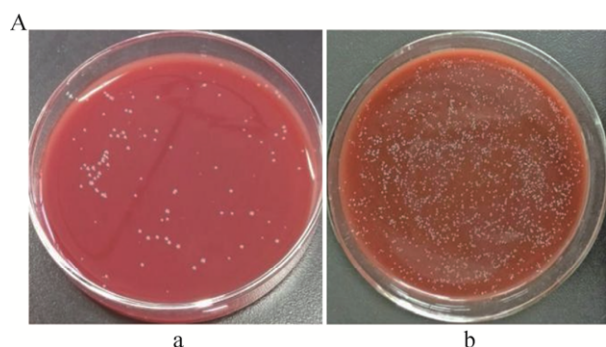


图 6 *E. coli* S17.1 pFY02、RA ATCC pFY02 和 RA ATCC pFY02 传 10 代菌落 PCR 鉴定图

Fig. 6 Identification of the *E. coli* S17.1 pFY02, RA ATCC pFY02 and identification after 10 generations of the RA ATCC pFY02 strains by PCR. M: DM5000 DNA marker; 1: *oriT* and *pRA0726 ori* gene (about 2 800 bp) was amplified from the plasmid pFY02; 2: *oriT* and *pRA0726 ori* gene was amplified from the individual bacterial colonies of *E. coli* S17.1 pFY02; 3: *oriT* and *pRA0726 ori* gene was amplified from the individual bacterial colonies of RA ATCC pFY02; 4: *oriT* and *pRA0726 ori* gene was amplified from the individual bacterial colonies after 10 generations of RA ATCC pFY02.

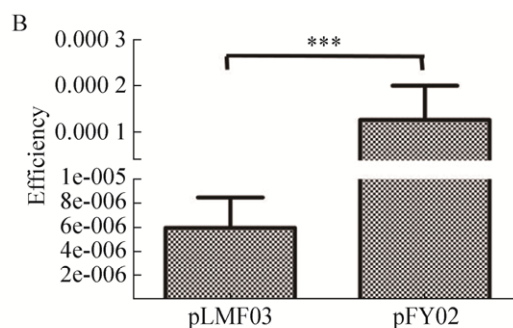


图 7 穿梭质粒 pFY02 结合转移效率提高 (A: 结合转移后长出的菌落; B: 结合转移效率)

Fig. 7 The shuttle plasmid pFY02 increased efficiency of conjugal transfer. (A) Growth of the bacterial colony after conjugative transfer. a: growth of the bacterial colony after using common shuttle plasmid pLMF03 to conjugative transfer; b: growth of the bacterial colony after using efficient shuttle plasmid pFY02 to conjugative transfer. (B) Conjugative transfer efficiency).

由于鸭疫里默氏杆菌的特性, 普通质粒无法通过电转或者钙转入鸭疫里默氏杆菌中, 因此需要以大肠杆菌为媒介, 通过大肠杆菌-鸭疫里默氏杆菌结合转移的方法将穿梭质粒导入鸭疫里默氏杆菌中。本研究构建的穿梭质粒 pFY02 是在质

粒 pPM5 的基础上进行改造的。为了提高其结合转移效率, 我们将转移位点 *oriT* 序列克隆到此质粒中; 为了使其能够在鸭疫里默氏杆菌中稳定存在, 将鸭疫里默氏杆菌复制起始基因 *pRA0726 ori* 克隆到此质粒中; 为了方便基因片段插入穿梭

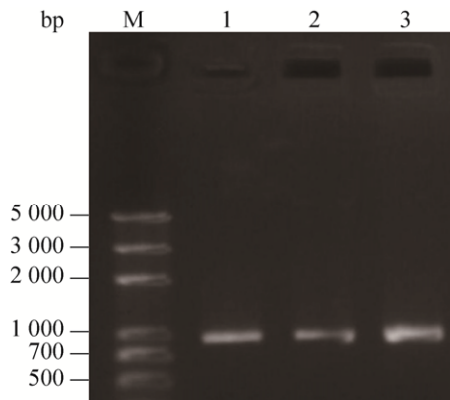


图8 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 的菌落 PCR 鉴定图

Fig. 8 Identification of the RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 strains by PCR. M: DM5000 DNA marker; 1: *tonB2* gene (about 850 bp) was amplified from the genome of RA ATCC11845; 2–3: *tonB2* gene was amplified from the individual bacterial colonies of RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2.

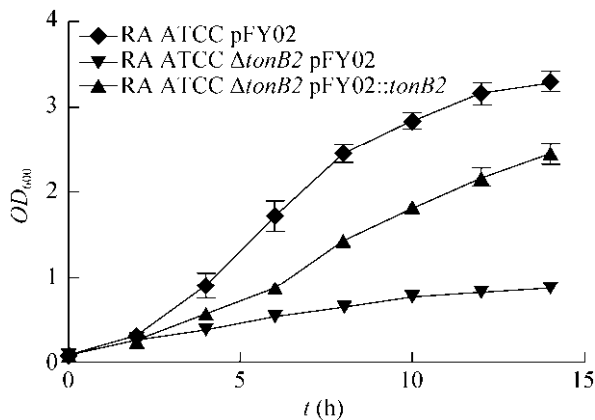


图9 RA ATCC pFY02、RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 在 TSB 中的生长曲线
Fig. 9 Growth curves for RA ATCC pFY02, RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 and RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 strains in TSB.

质粒上且提高基因的表达量，在穿梭质粒上克隆一段带有多个内切酶位点的高表达启动子序列 *High EXP*。最终使该质粒能高效地进行结合转移并稳定存在于鸭疫里默氏杆菌中；此外该质粒还能稳定地表达回补基因，且其带有的多个酶切位点更有利于回补基因的克隆。

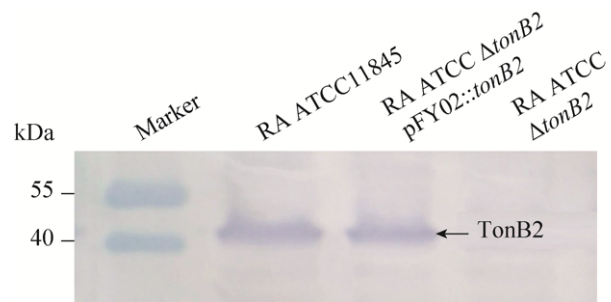


图10 Western blotting 检测 RA ATCC pFY02、RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 和 RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 中的 TonB2 蛋白

Fig. 10 The whole-cell extracts from RA ATCC pFY02, RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02 and RA ATCC $\Delta tonB2$ pFY02::tonB2 strains were subjected to Western blotting using an antibody against TonB2.

以前使用的鸭疫里默氏杆菌的穿梭质粒 pLMF03，其多克隆位点仅有 *Nco* I、*Xba* I、*Xho* I 和 *Spe* I 四个酶切位点，满足不了鸭疫里默氏杆菌基因的回补，且酶切位点 *Nco* I 的序列是 CCATGG，其中存在的起始密码子 ATG 可能会引起回补基因的移码突变，导致回补基因的功能无法正常实现。为了防止回补基因的移码突变及改善酶切位点少的问题，我们用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xba* I 将酶切位点 *Nco* I 切除，且在酶切位点 *Xba* I 前引进 *Sac* II、*Nhe* I、*Stu* I 和 *Bss* II 四个酶切位点，使穿梭质粒 pFY02 的使用更安全和方便。

REFERENCES

- [1] Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, et al. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the Flavobacterium-Cytophaga rRNA homology group. *Int J Systemat Bacteriol*, 1993, 43(4): 768–776.
- [2] Liao HB, Cheng XJ, Zhu DK, et al. TonB energy transduction systems of *Riemerella anatipestifer* are required for iron and hemin utilization. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0127506.
- [3] Hess C, Enichlmayr H, Jandreski-Cvetkovic D, et al.

- Riemerella anatipestifer* outbreaks in commercial goose flocks and identification of isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Avian Pathol*, 2013, 42(2): 151–156.
- [4] Pathanasophon P, Phuectes P, Tanticharoenyos T, et al. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathol*, 2002, 31(3): 267–270.
- [5] Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathol*, 1995, 24(1): 195–199.
- [6] Wang XJ, Liu WB, Zhu DK, et al. Comparative genomics of *Riemerella anatipestifer* reveals genetic diversity. *BMC Genom*, 2014, 15: 479.
- [7] Liu HW, Wang XL, Ding C, et al. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer*-inactivated vaccine. *Clin Vacc Immunol*, 2013, 20(5): 691–697.
- [8] Chu CY, Liu CH, Liou JJ, et al. Development of a subunit vaccine containing recombinant *Riemerella anatipestifer* outer membrane protein A and CpG ODN adjuvant. *Vaccine*, 2015, 33(1): 92–99.
- [9] Rubbenstroth D, Ryll M, Hotzel H, et al. Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2013, 63(1): 280–287.
- [10] Crasta KC, Chua KL, Subramaniam S, et al. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *J Bacteriol*, 2002, 184(7): 1932–1939.
- [11] Tu J, Lu FY, Miao S, et al. The siderophore-interacting protein is involved in iron acquisition and virulence of *Riemerella anatipestifer* strain CH3. *Vet Microbiol*, 2014, 168(234): 395–402.
- [12] Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(3): 413–451.
- [13] Lu FY, Miao S, Tu J, et al. The role of TonB-dependent receptor TbdR1 in *Riemerella anatipestifer* in iron acquisition and virulence. *Vet Microbiol*, 2013, 167(3/4): 713–718.
- [14] Wang MY, Zhang PY, Zhu DK, et al. Identification of the ferric iron utilization gene B739_1208 and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1. *Vet Microbiol*, 2017, 201: 162–169.
- [15] Liu MF, Wang MY, Zhu DK, et al. Investigation of TbfA in *Riemerella anatipestifer* using plasmid-based methods for gene over-expression and knockdown. *Sci Rep*, 2016, 6: 37159.
- [16] De Paula JA, Silva MDOR, Costa MP, et al. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (myrtaceae). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 420715.
- [17] Ni B, Du Z, Guo Z, et al. Curing of four different plasmids in *Yersinia pestis* using plasmid incompatibility. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(4): 235–240.
- [18] Hu QH, Miao S, Ni XT, et al. Construction of a shuttle vector for use in *Riemerella anatipestifer*. *J Microbiol Methods*, 2013, 95(2): 262–267.
- [19] Lee C, Kim J, Shin SG, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 273–280.

(本文责编 郝丽芳)