



研究报告

类鼻疽伯克霍尔德菌 *bopA* 基因敲除株的构建及生物学特征

卢晓雪^{Δ1} 胡治强^{Δ1} 梅国徽² 张雨¹ 胡语涵¹ 岳娟娟¹ 向阳^{*1} 毛旭虎^{*1}

1 陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室 重庆 400038

2 陆军勤务学校门诊部 重庆 401331

摘要:【背景】类鼻疽杆菌是一种能够引起人类疾病甚至死亡的胞内寄生菌, III型分泌系统在该菌入侵上皮细胞、逃避宿主免疫以及毒力因子的分泌过程中发挥重要作用, 其中 *bopA* 基因为 TTSS-3 基因编码的重要效应蛋白, 在类鼻疽杆菌的免疫逃逸中发挥重要作用。【目的】构建类鼻疽杆菌 *bopA* 基因敲除菌株, 并对其生物学特征进行初步研究。【方法】构建 pK18mobSacB- $\Delta bopA$ 自杀质粒, 通过大肠杆菌 S17-1 λ pair 以接合的方式转入类鼻疽杆菌, 利用同源重组敲除了 *bopA* 基因, 并用蔗糖平板筛选出菌株, 最后在细胞和动物水平检测敲除菌株的表型变化。【结果】构建了 *bopA* 敲除的类鼻疽菌株, 并通过细胞和动物实验证实敲除 *bopA* 基因后, 细菌的细胞侵袭和胞内存活以及体内定殖能力都显著降低。【结论】利用同源重组成功构建类鼻疽 *bopA* 基因敲除株, 为深入研究该基因的作用靶点奠定了实验基础。

关键词: 类鼻疽伯克霍尔德菌, *bopA* 基因, 基因敲除, 生物学特征

Construction and characterization of *Burkholderia pseudomallei* *bopA* gene knockout mutant

LU Xiao-Xue^{Δ1} HU Zhi-Qiang^{Δ1} MEI Guo-Hui² ZHANG Yu¹ HU Yu-Han¹
YUE Juan-Juan¹ XIANG Yang^{*1} MAO Xu-Hu^{*1}

1 Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory Sciences, Army Medical University, (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

2 Affiliated Hospital, Army Logistic University of PLA, Chongqing 401331, China

Abstract: [Background] *Burkholderia pseudomallei* is an intracellular parasitic bacterium that can cause human disease and even death. The type III secretory system plays an important role in the bacterial invasion of epithelial cells, escaping host immunity and the secretion of virulence factors. The *bopA* gene is an important effector protein encoded by the TTSS-3 gene, and it plays an important role in the immune

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81471914, 81601832)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: XIANG Yang: Tel: 86-23-68771668; E-mail: xyang_@hotmail.com

MAO Xu-Hu: Tel: 86-23-68771667; E-mail: maohx2012@hotmail.com

Received: 14-05-2018; Accepted: 26-09-2018; Published online: 14-11-2018

基金项目: 国家自然科学基金(81471914, 81601832)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: 向阳: Tel: 023-68771668; E-mail: xyang_@hotmail.com

毛旭虎: Tel: 023-68771667; E-mail: maohx2012@hotmail.com

收稿日期: 2018-05-14; 接受日期: 2018-09-26; 网络首发日期: 2018-11-14

escape of the *Burkholderia pseudomallei*. **[Objective]** To construct *Burkholderia pseudomallei bopA* gene knockout mutant strain, and evaluate the biological characteristics of the mutant strain. **[Methods]** We constructed suicide plasmid pK18mobSacB- $\Delta bopA$, and then transformed the plasmid into *B. pseudomallei* from *Escherichia coli* S17- λ pair by conjugation. *bopA* gene was knocked out by homologous recombination, and the mutant strain was selected by sucrose agar screening. The phenotypic variation of the mutant strain was finally evaluated at the cell and animal levels. **[Results]** We constructed *B. pseudomallei bopA* mutant strain successfully, and found the invasion rate, intracellular survival ability as well as the ability of colonization *in vivo* of mutant strain was significantly reduced. **[Conclusion]** We constructed *B. pseudomallei bopA* mutant strain by homologous recombination, to provide a basis for further understanding of this gene.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, *bopA* gene, Gene knockout, Biological characteristics

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, BP)是一种革兰氏阴性胞内寄生菌, 主要流行于热带和亚热带地区, 能够通过呼吸道和皮肤黏膜等方式侵入宿主, 引起机体发热、肺炎甚至败血症, 如不及时治疗, 病死率极高^[1-2]。类鼻疽杆菌的致病性主要来源于其菌体组成成分(脂多糖 LPS、荚膜多糖 CPS、鞭毛、菌毛等)以及分泌的细菌毒力因子(BPSL1549、溶血素等)^[3]。大量研究表明, III型分泌系统与类鼻疽杆菌入侵上皮细胞、逃避宿主免疫以及毒力因子的分泌有着密切的关系, III型分泌系统分泌的转运蛋白能够与真核细胞膜结合形成跨膜通道, 将毒力蛋白直接注入到宿主细胞, 从而影响宿主细胞正常生理功能^[4]。类鼻疽杆菌III型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)由 3 个基因簇组成, 包括 TTSS-1、TTSS-2 和 TTSS-3, 其中 TTSS-3 与沙门氏菌 SPI-1 毒力岛类似, 有助于细菌逃逸胞内免疫清除, 促进其在胞内的存活。

类鼻疽 *bsa* 基因座位于 TTSS-3 基因簇, 编码的 *bsa* 相关蛋白(BipB、BipC 和 BipD)与沙门氏菌 *sip* 转运蛋白类似, 能够促进细菌进入细胞并释放毒力因子, 其中 BopA 是由 *bsa* 基因簇编码的效应蛋白, 在类鼻疽杆菌的细胞免疫逃逸中具有重要的作用^[5-7]。本实验利用自杀质粒同源重组的方法构建了类鼻疽 *bopA* 基因敲除株[BP($\Delta bopA$)], 并对其一系列生物活性进行了研究, 为深入研究 *bopA* 基因促进细菌免疫逃逸的机制和作用靶点以及类鼻疽 TTSS3 分泌系统的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要菌株、质粒及细胞

类鼻疽伯克霍尔德菌野生株 BPC006、自杀性质粒 pK18mobSacB 由实验室低温保存, 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(ATCC:TIB-71)由实验室液氮保存。大肠杆菌 S17- λ pair 感受态细胞由陆军军医大学基础医学院微生物学教研室惠赠, DH5a 感受态细胞购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, OMEGA 公司; *EcoR* I、*Hind* III 限制性内切酶、In-Fusion HD Cloning Plus、Prime STAR[®] HS DNA Polymerase、DNA marker, TaKaRa 公司; 卡那霉素、庆大霉素、皂苷、动物细胞裂解液, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细胞培养用 DMEM 基础培养基、胎牛血清, Gibco 公司; Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit Antibody, Invitrogen 公司; 牛血清白蛋白、4%多聚甲醛溶液, 武汉博士德公司; Rapamycin、Triton X-100、Actin-stain[™] 488 phalloidin (绿色荧光)、DAPI 染液, Sigma 公司; 抗荧光衰减封片剂, 北京 Solarbio 公司; MAP1LC3B(CST 4108)、SQSTM1(CST 5114S)抗体, CST 公司; BP 兔多克隆抗体由本教研室制备。普通 PCR 仪、Chemidoc XRS 成像系统、小型蛋白电泳仪、小型 Trans-Blot 转印槽, Bio-Rad 公司; 酶标分析仪, TECAN 公司; 微量高

速低温离心机, Eppendorf 公司; 激光共聚焦显微镜, Carl Zeiss Jena 公司。

1.1.3 培养基

蔗糖 LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 蔗糖 100.0, 琼脂粉 15.0。

1.1.4 实验动物

健康雌性 BALB/c 小鼠(18–22 g, SPF 级, 10 只)由陆军军医大学实验动物中心提供。

1.1.5 实验地点

所有涉及到类鼻疽菌株的实验均在教研室 P2 生物安全实验室进行, 并严格按照实验室生物安全规范操作。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 中 BPC006 菌的全基因组序列中 *bopA* 基因及其两侧序列, 设计扩增同源臂的特异性引物(图 1A), 上游同源臂的扩增引物为 *bopA*-up-F 和 *bopA*-up-R, 扩增全长 1 033 bp; 下游同源臂扩增引物为 *bopA*-down-F 和 *bopA*-down-R, 扩增全长 1 028 bp。设计鉴定引物 *bopA*-ide-1、*bopA*-ide-2、*bopA*-ide-3、*bopA*-ide-4, 用于敲除株的鉴定。引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 重组自杀载体 pK18mobSacB- $\Delta bopA$ 的构建

将 BPC006 菌接种于 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜后提取基因组, 以基因组为模板分别扩增 *bopA* 的上、下游同源臂, 切胶回收扩增的目的片段。将回收的上、下游同源臂与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后的 pK18mobSacB 质粒(含卡那霉素抗性基因)用 In-Fusion HD 克隆体系于 50 °C 孵育 15 min 进行连接(图 1B)。连接产物转入 DH5a 感受态细胞, 使用卡那霉素(250 μ g/mL)抗性的 LB 平板进行筛选, 挑取 6 个单菌落进行质粒酶切鉴定, 将构建的阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序正确的重组自杀质粒命名为 pK18mobSacB- $\Delta bopA$ 。

1.2.3 $\Delta bopA$ 敲除株的构建与鉴定

将 pK18mobSacB- $\Delta bopA$ 质粒通过热激法转入 S17-1 λ pair 感受态细胞, 并涂布于含卡那霉素的 LB

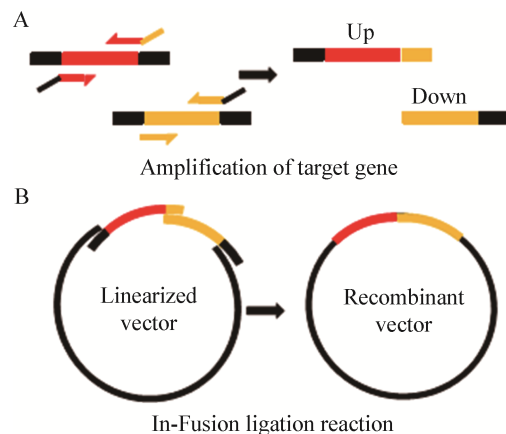


图 1 In-Fusion 克隆技术

Figure 1 In-Fusion clone technology

固体培养基进行克隆的筛选^[8]。将受体菌 BPC006 (具有庆大霉素抗性)和供体菌 S17-1 λ pair (pK18mobSacB- $\Delta bopA$)分别接种于 5 mL 庆大霉素抗性(100 μ g/mL)和 5 mL 卡那霉素抗性(250 μ g/mL)液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 按 1:100 活化, 当 OD_{600} 值达到 0.4–0.5 时, 按照 1:4 比例将受体菌和供体菌进行混合, 涂布于灭菌过的 0.45 μ m 孔径滤膜上, 置于无抗性 LB 平板中培养过夜, 收集滤膜上的细菌, 倍比稀释后涂布于双抗性 (Gm+Km) LB 固体培养基上, 使重组自杀性质粒与细菌基因组 DNA 发生第一次同源重组(图 2), 并通过抗生素筛选和 PCR 鉴定获得二倍体 BP (pK18mobSacB- $\Delta bopA$)菌株。

将获得的二倍体菌株接种于 Gm 抗性的 LB 培养基中培养过夜, 将培养物稀释数倍后涂布于 Gm 抗性的蔗糖 LB 固体培养基进行第二次同源重组(图 2C), 24 °C 培养 48 h。挑取单个菌落分别接种于 Gm 和 Km 抗性的 LB 固体平板上, 对 Gm^R、Km^S 菌株进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Prime STAR[®] GC Buffer 25 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, Prime STAR[®] HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, DMSO 2 μ L, ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应条件见表 2, 将阳性菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 最终获得测序正确的 *bopA* 基因敲除 BP 菌株, 命名为 BP($\Delta bopA$)。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

名称 Primers	序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Enzyme site	扩增长度 Size (bp)
<i>bopA</i> -up-F	acatgattacgaattCCCGGCAGCATCACGTCC	<i>EcoR</i> I	1 033
<i>bopA</i> -up-R	CGATGGGAGGAGTGGAGACAGCATGAAGAACGCA		
<i>bopA</i> -down-F	CCACTCCTCCCATCGACT		1 028
<i>bopA</i> -down-R	ggccagtccaagcttCATGCAGAACCGGTCCTT	<i>Hind</i> III	
<i>bopA</i> -ide-1	CCAGCGCATGCCCTTGAACGTA		805
<i>bopA</i> -ide-2	CGCGATGATCGCCGGATCGAG		
<i>bopA</i> -ide-3	ACCGTCTTCATCCCCAACCTC		826
<i>bopA</i> -ide-4	CTTCGCCGCGCTTGACGTGA		

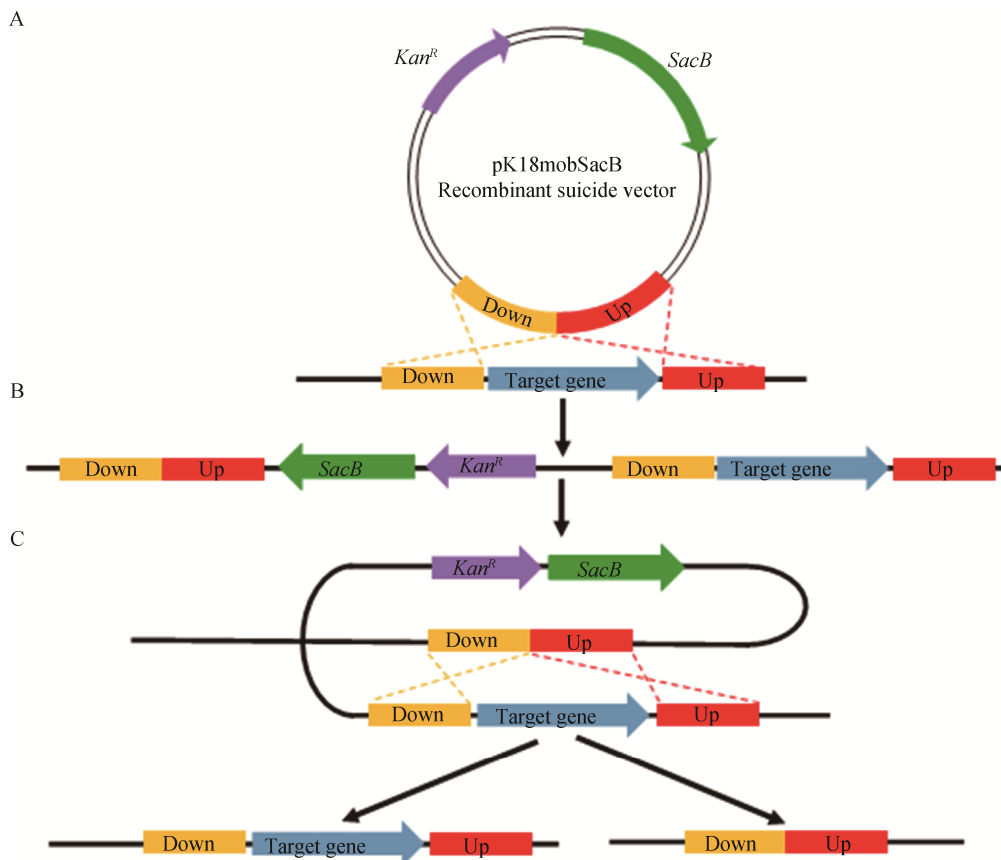


图 2 同源重组示意图

Figure 2 Homologous recombination

表 2 PCR 反应条件

Table 2 The PCR reaction condition (2-Step PCR)

Process	Temperature (°C)	Time	Cycles
1	96	10 min	
2	98	10 s	30
	68	1 min/kb	
3	72	5 min	
4	4	Hold	

1.2.4 细菌生长曲线的测定

将 BPC006 与 BP($\Delta bopA$)菌株划线接种于 LB 固体平板上, 37 °C 培养 24 h 后, 分别挑取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 每隔 2 h 进行 OD_{600} 的测定, 记录实验数据, 绘制生长曲线, 重复 3 次实验。

1.2.5 细胞黏附和侵袭实验

将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 过夜培养至 80% 后按 MOI=10:1 的比例进行感染, *bopA* 缺失株为实验组, BPC006 野毒株为对照组, 每组 3 次重复。于 CO₂ 培养箱培养 1 h 后, 吸取培养上清倍比稀释, 涂布于 LB 固体培养基上, 用以计算每孔细胞培养上清中的细菌数。细胞用 PBS 轻柔清洗 3 次, 加入新鲜的含卡那霉素的 DMEM 培养基, 继续培养 1 h 后用 PBS 洗 3 次, 再加入 1 mL 0.5% 皂苷裂解细胞, 裂解液倍比稀释(同上)后涂布于 LB 平板, 计数获得胞内细菌数。计算方式: 黏附率=(细胞表面的细菌数/接菌总量)×100%, 其中细胞表面的细菌数=接菌总量-细胞培养上清的细菌数-细胞内的细菌数; 侵袭率=(细胞内的细菌数/接菌总量)×100%。

1.2.6 细菌胞内存活实验

BPC006 野毒株和 BP($\Delta bopA$) 菌株与 Raw264.7 细胞共孵育的方法同 1.2.5, 分别在感染不同时间点(2、4、8、12 h)后进行细胞裂解, 裂解液进行稀释涂板计数, 绘制胞内存活曲线, 得到细菌胞内存殖情况。

1.2.7 肌动蛋白尾和 MNGC 的形成

将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 按 1×10^5 个/孔接种于 12 孔板中(提前加入高压灭菌的直径 20 mm 的圆形玻片), 培养过夜后进行感染。待分别感染 4 h、8 h 后进行免疫荧光染色, 具体方法为: 弃去培养上清, 用 PBS 轻柔清洗爬片 3 次后加入 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗 3 次, 加入 0.1% Triton X-100 透膜 10 min, PBS 清洗 3 次。将本室制备的兔抗 BP 多克隆抗体以 1:200 稀释于 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)溶液中, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次后加入 1:600 倍稀释(0.1% BSA 溶液)的 Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit 荧光二抗室温避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 次。加入 500 μ L 100 nmol/L Acti-stain™ 488 phalloidin (0.1% BSA 溶液配置)室温避光孵育 40 min, PBS 清洗 3 次。最后加入 1:1 000 倍稀释(0.1% BSA 溶液)的 DIPA 溶液, 室温避光孵

育 10 min, 用 PBS 清洗 3 次后用抗荧光淬灭剂进行封片, 于 4 °C 暂存。实验结果由 Zeiss LSM800 (陆军军医大学中心实验室)激光共聚焦显微镜进行观察记录。

1.2.8 野生株和缺失株小鼠载菌量测定

将 BALB/c 小鼠分为两组, 5 只/组, 将 BPC006 野毒株和 BP($\Delta bopA$) 菌株按照 5×10^4 个细菌/只小鼠 (PBS 稀释) 进行腹腔注射, 期间每隔 12 h 观察小鼠状态。感染 3 d 后将所有小鼠断颈处死, 在无菌条件下分别摘取每只小鼠的肝脏、脾脏和肾脏于无菌研磨器中, 加入 PBS 进行充分研磨, 取研磨液倍比稀释后涂布于 LB 琼脂板上, 37 °C 培养后进行细菌计数, 取平均值为其载菌量。

1.2.9 自噬相关蛋白 MAP1LC3B 与 SQSTM1 检测

用 BPC006 野毒株和 BP($\Delta bopA$) 菌株分别感染 Raw264.7 细胞, 以未感染的细胞为空白对照, Rapamycin 处理的细胞为阳性对照, 在感染 4 h 后加入细胞裂解液 100 μ L, 收集细胞裂解液, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清。BCA 法测定蛋白浓度, 调整样品浓度为 2 μ g/ μ L, 进行 WB 检测。

2 结果与分析

2.1 pK18mobSacB- $\Delta bopA$ 质粒的构建及鉴定

根据 In-Fusion HD Cloning Plus 引物设计原则设计了 2 对引物 *bopA*-up-F/R 和 *bopA*-down-F/R, 并以 NCBI BPC006 菌的全基因组序列为模板, 分别扩增出了 *bopA* 上、下游同源臂(图 3A)。随后用 In-Fusion HD 克隆体系连接到酶切后的 pK18mobSacB 载体, 转入 DH5 α 感受态细胞, 卡那霉素筛选并挑取 6 个单克隆菌落, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 其中 4 个克隆(图 3C7、10、11、12)与理论结果一致(酶切片段: 5 668、1 159、578、258、72 bp, 图 3B), 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果正确。

2.2 BP($\Delta bopA$) 菌株的筛选及鉴定

构建 S17-1 λ pair(pK18mobSacB- $\Delta bopA$) 菌株作为供体菌, 使重组自杀性质粒通过接合的方式转移到受体菌 BPC006, 并利用双抗(Km+Gm)筛选得到

二倍体菌株 BP (pK18mobSacB- Δ bopA)。最后 *sacB* 基因的蔗糖筛选压力获得丢失重组自杀质粒 pK18mobSacB- Δ bopA 的 Gm^R、Km^S 菌株, 对获得的阳性重组菌株进行菌落 PCR 鉴定(引物设计原理如图 4A 所示), 使用 *bopA*-up-F 和 *bopA*-down-R 扩增上游和下游同源臂, 在挑取 4 个菌落中只有一个

仅扩增出 *bopA* 基因上、下游同源臂片段 2 061 bp (图 4B4), 而野生株则能够扩增出上游+*bopA*+下游片段(3 599 bp) (图 4B2、3、5); 同时 BP(Δ bopA) 分别采用 *bopA*-ide-1/*bopA*-ide-2 和 *bopA*-ide-3/*bopA*-ide-4 引物对均未能扩增出相应目标片段(图 4C2、5), 证明敲除株构建成功。

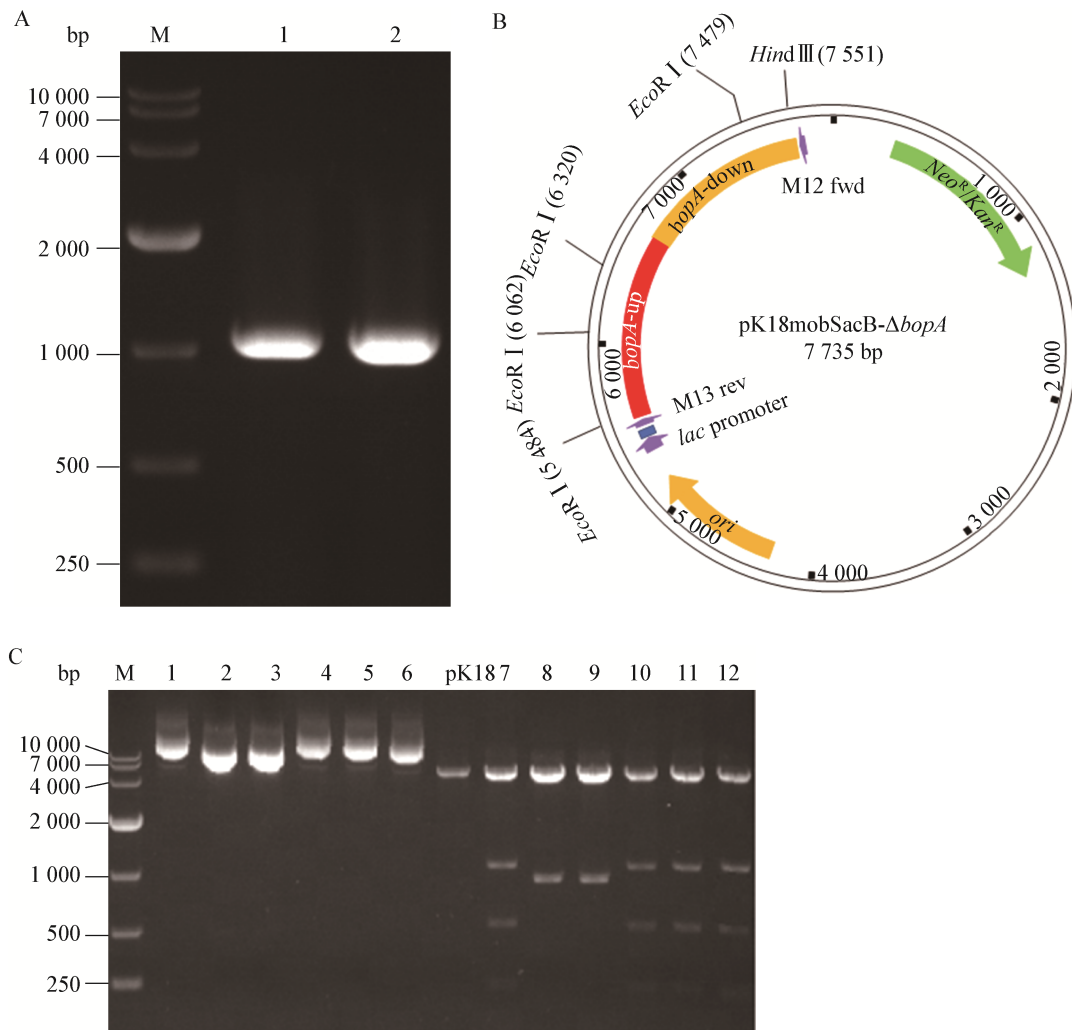


图3 pK18mobSacB- Δ bopA 质粒构建与鉴定

Figure 3 Construction and verification of pK18mobSacB- Δ bopA plasmid

注: A: *bopA* 同源臂引物扩增的上、下游片段; M: DNA marker (DL10000); 1: *bopA* 上游同源臂(1 033 bp); 2: *bopA* 下游同源臂(1 028 bp); B: pK18mobSacB- Δ bopA 质粒图谱(含 *EcoR* I/*Hind* III 酶切位点); C: pK18mobSacB- Δ bopA 质粒双酶切鉴定; M: DNA marker (DL10000); 1-6: 重组质粒; pK18: pK18mobSacB 质粒(5 674 bp); 7-12: *EcoR* I/*Hind* III 双酶切质粒。

Note: A: PCR products of the *bopA* flank segments; M: DNA marker (DL10000); 1: *bopA* up-stream sequences; 2: *bopA* down-stream sequences. B: pK18mobSacB- Δ bopA plasmid map. C: Verification of pK18mobSacB- Δ bopA by double enzyme digestion; M: DNA marker (DL10000); 1-6: Recombinant plasmid; pK18: pK18mobSacB plasmid; 7-12: Recombinant plasmid digested by *EcoR* I/*Hind* III double enzyme.

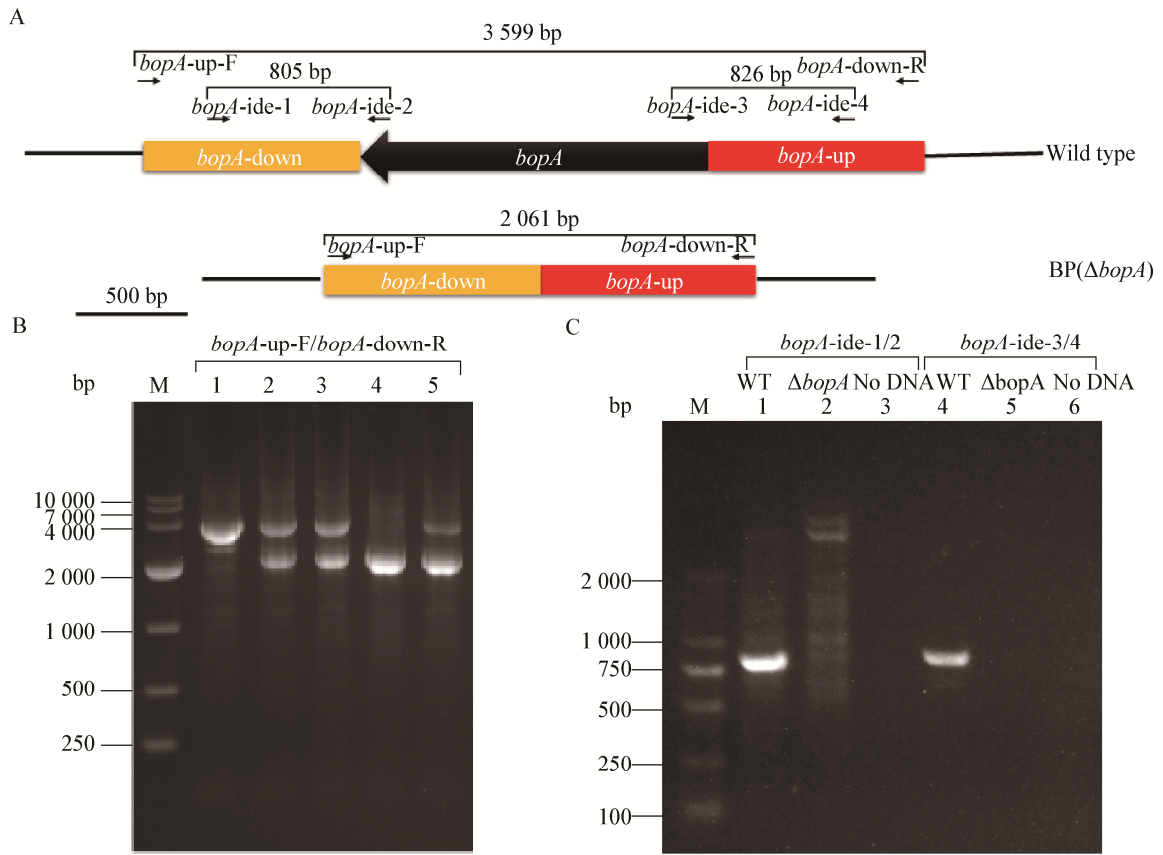


图 4 BP($\Delta bopA$) PCR 鉴定

Figure 4 PCR verification of BP($\Delta bopA$)

注: A: 鉴定引物设计原则. B: *bopA*-up-F/*bopA*-down-R 引物对 PCR 产物; M: DNA marker (DL10000); 1: BPC006; 2、3、5: 阴性菌落; 4: BP($\Delta bopA$). C: *bopA*-ide-1/*bopA*-ide-2 和 *bopA*-ide-3/*bopA*-ide-4 引物对 PCR 产物; M: DNA marker (DL2000); 1、4: BPC006; 2、5: BP($\Delta bopA$); 3、6: 空白对照.

Note: A: Design principles of primers for verification. B: PCR products by primers *bopA*-up-F/*bopA*-down-R; M: DNA marker (DL10000); 1: BPC006; 2, 3, 5: Negative strain; 4: BP($\Delta bopA$). C: PCR products by primers *bopA*-ide-1/*bopA*-ide-2 and *bopA*-ide-3/*bopA*-ide-4; M: DNA marker (DL2000); 1, 4: BPC006; 2, 5: BP($\Delta bopA$); 3, 6: Blank control.

2.3 敲除菌株与野生株生长曲线

以实验室野毒株 BPC006 为对照, 可见 BPC006 与 BP($\Delta bopA$) 菌株生长情况相似, 均在 12 h 达到对数生长期, 而 24 h 后进入生长平台期(图 5)。说明 *bopA* 基因敲除不影响 BP 细菌本身的生长活力。

2.4 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌的细胞黏附率和侵袭率的影响

作为类鼻疽杆菌 III 型分泌系统的重要分子, *bopA* 基因在细菌致病过程中发挥着重要作用。为了验证 *bopA* 基因敲除对细菌活力的影响, 利用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 进行了细菌的黏附和侵

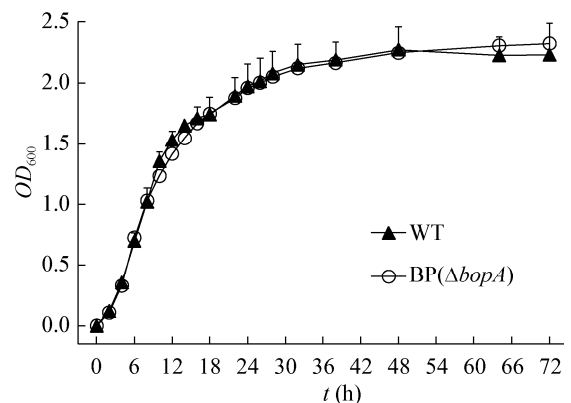


图 5 *bopA* 敲除菌与野生菌的生长曲线

Figure 5 Growth curves of *bopA* knockout strain and wild-type strain

表 3 *bopA* 敲除菌与野生菌对细胞的黏附和侵袭率Table 3 Adhesion and invasion efficiencies of *bopA* knockout strain and wild-type strain

Strains	BPC006 野毒株 Wild-type strain	<i>bopA</i> 敲除株 <i>bopA</i> knockout strain
Total bacteria	8 000 000	8 000 000
Bacteria in cultivate	6 038 542.00±153 295.00	2 305 948.00±251 354.70
Bacteria in intracellular	121 875.00±18 690.01	10 971.00±1 496.21
Bacteria in cell surface	1 839 583.00±159 681.20	5 683 081.00±252 758.10
Adhesion efficiencies	22.99%±1.953%	71.04%±3.16%
Invasion efficiencies	1.53%±0.23%	0.14%±0.02%

袭实验。表 3 是 *bopA* 敲除株和 BPC006 野毒株对 RAW264.7 细胞的黏附和侵袭能力变化情况。其中 BPC006 野毒株黏附率和侵袭率分别为 21.21% 和 1.45%，而敲除株分别为 74.45% 和 0.12%。结果表明敲除 *bopA* 基因后，BP 细菌黏附性增加，而进入细胞的能力明显降低。

2.5 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌胞内存活的影响

类鼻疽杆菌可以侵入多种吞噬和非吞噬细胞，并在细胞内进行增殖，发挥其细胞毒性，其在胞内存活情况与其抵抗细胞清除能力密切相关。通过胞内存活实验结果(图 6)可以看出 *bopA* 缺失株侵袭率明显低于 WT (结果同上)，感染初期细菌存活量减少，可能是感染早期激活了细胞自噬，4 h 后 BPC006 野生株在胞内快速增殖，而敲除株在胞内

增殖缓慢甚至无法增殖，说明 *bopA* 基因在类鼻疽杆菌的免疫逃逸中具有重要的作用。

2.6 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌感染后细胞形态影响

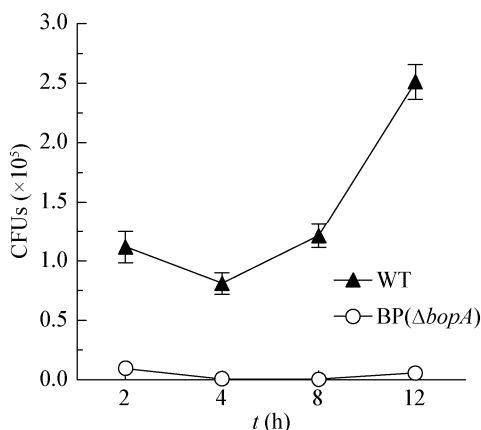
类鼻疽杆菌主要是通过抑制 LC3 介导的吞噬作用，从吞噬体逃逸到细胞胞质，一旦细菌进入胞质，就会激活 BimA 介导的肌动蛋白运动活性、大量繁殖并侵入邻近细胞形成肌动蛋白尾和多核巨细胞(Multinuclear giant cell, MNGC)。由实验结果(图 7)可以看出野生株感染 4 h 后细胞形成肌动蛋白尾，而感染 8 h 后大量细菌从细胞中逃逸出来，导致细胞肌动蛋白尾数量增多，并形成 MNGC，而 *bopA* 敲除的菌株则没有发生明显的变化，且胞内细菌数量少。

2.7 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌的小鼠肝脏、脾脏以及肺载菌量的影响

对分别腹腔注射 BPC006 和 BP($\Delta bopA$)小鼠进行观察，注射 BPC006 的小鼠在第 3 天出现毛皮蓬乱、精神萎靡现象，而感染 BP($\Delta bopA$)细菌的小鼠则未出现明显的症状。通过小鼠肝脏、脾脏以及肺载菌量变化结果图(图 8)，可以看出 BP($\Delta bopA$)组小鼠脾脏载菌量明显少于 BPC006 组小鼠($P<0.001$)，敲除株肺载菌量也少于野生株($P<0.05$)，而两者肝脏载菌量没有明显差异。

2.8 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌感染后细胞自噬相关蛋白表达的影响

Western blot 检测 MAP1LC3B 的表达和 MAP1LC3B-II 的转化(LC3-II/LC3-I)是评价细胞

图 6 *bopA* 敲除菌与野生菌胞内存活和增殖情况Figure 6 Intracellular survival and proliferation of *bopA* knockout strain and wild-type strain

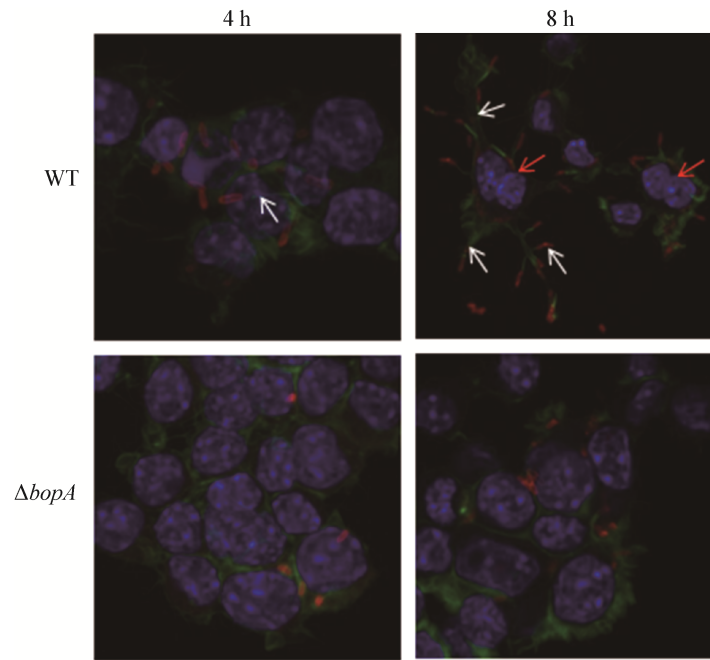


图 7 细菌感染后细胞共聚焦图片

Figure 7 Confocal micrographs with DIC images of RAW264.7 cells infected with *bopA* knockout strain and wild-type strain

注: 绿色: 细胞骨架; 蓝色: 细胞核; 红色: 类鼻疽杆菌; 白色箭头: 肌动蛋白尾; 红色箭头: MNGC.

Note: Green: F-actin; Blue: Nucleus; Red: BP; White arrow: Actin tails; Red arrow: MNGC.

自噬水平的重要标志, 而 SQSTM1 蛋白则是检测自噬流是否通畅的重要标志。一般情况下, 自噬激活, MAP1LC3B 表达量增加, 同时 LC3- II/LC3- I 升高, 自噬体与溶酶体融合, SQSTM1 随之被降解; 反之则 SQSTM1 积蓄。已有研究表明, 类鼻疽杆菌能够

影响自噬体与溶酶体融合过程^[9], 为了研究 *bopA* 基因缺失对类鼻疽杆菌感染后细胞自噬的影响, 检测了不同菌株感染后自噬相关蛋白的表达情况(图 9)。结果显示 BPC006 和 BP($\Delta bopA$)都能够激活自噬(MAP1LC3B-II 明显增加), 但不同于 BPC006 能够通过抑制自噬流逃逸宿主免疫, BP($\Delta bopA$)感染后细胞 SQSTM1 蛋白明显减少, 自噬流通畅, 与 Rapa 激活细胞自噬结果相同。

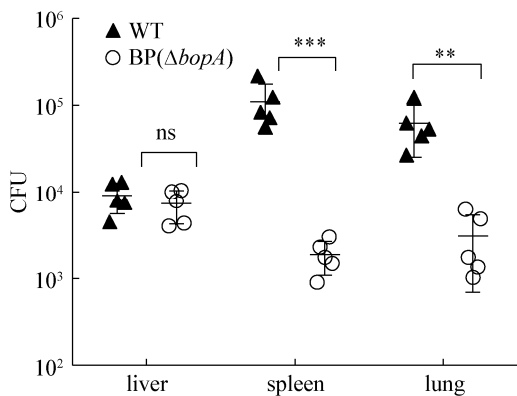


图 8 小鼠不同脏器载菌量

Figure 8 Bacterial count of *bopA* knockout strain and wild-type strain in different organs of mice

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

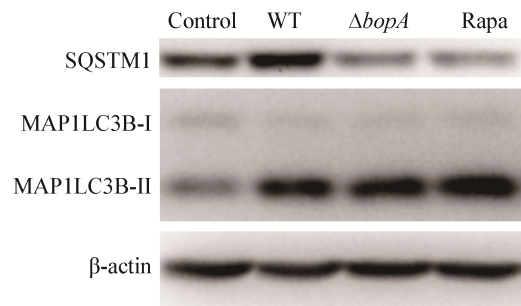


图 9 *bopA* 敲除对 BP 感染后细胞自噬相关蛋白表达的影响

Figure 9 Effect of BP *bopA* gene on autophagy related protein expression

3 讨论与结论

本研究通过科室前期建立的类鼻疽基因敲除平台^[10], 采用 pK18mobSacB 自杀质粒系统构建了类鼻疽 *bopA* 基因缺失突变株, 并在原有的技术上引入了 In-Fusion HD 克隆体系, 通过一步反应成功构建了 pK18mobSacB- Δ *bopA* 质粒, 缩短时间并减少了步骤, 提高了实验成功率。

本课题还对 *bopA* 敲除株的生物活性进行了检测, 主要包括细菌自身生长活性以及与宿主相互作用等。细菌生长曲线结果表明, 该基因的缺失对于细菌自身生长能力没有影响。本实验还进一步对缺失株的黏附能力和侵袭能力进行了检测, 结果显示缺失株对细胞的黏附能力增强, 而侵袭能力明显降低, 可能是 *bopA* 基因敲除导致细菌黏附相关蛋白和侵袭相关蛋白表达发生变化, 但是具体的机制还需进一步研究。通过胞内存活实验和激光共聚焦结果可以看出, 野生型 BPC006 细菌能够在胞内存活与大量繁殖, 并能够逃逸出细胞形成肌动蛋白尾, 或者侵入邻近细胞形成 MNGC, 而 *bopA* 基因敲除的菌株则丧失了上述功能。小鼠载菌实验进一步证明 *bopA* 缺失株在肺脏和脾脏中定殖能力弱于野生型 BPC006 株。通过对自噬相关蛋白检测, 我们分析出现上述现象的原因可能是敲除 *bopA* 基因后, 类鼻疽杆菌抑制自噬流逃逸宿主免疫的活性消失, 从而在细胞和脏器中存活定殖能力减弱。

目前 *bopA* 基因在类鼻疽免疫逃逸中的机制主要有以下几个方面: (1) *bopA* 基因编码蛋白能够直接破坏吞噬体膜结构, 从而使类鼻疽菌能够进入宿主细胞胞质中, 存活并释放毒性因子(如 BLF1)^[3]; (2) 具有蛋白水解酶或酰基转移酶活性, 抑制宿主细胞中 Rho GTPase 功能^[11]; (3) 含有胆固醇结合域, 使吞噬体膜上胆固醇聚集, 阻断溶酶体与自噬体融合^[12]; (4) 参与到 LC3 介导的吞噬作用, 减少 LC3 和 LAMP-1 的募集, 从而阻断吞噬体的成熟, 达到免疫逃逸的作用^[9]。但是目前 *bopA* 基因在细菌侵袭能力中的作用以及调控免疫逃逸具体的靶点还有待进一步的研究^[13], 构建 *bopA* 基因缺失的类鼻疽菌为进一步研究该基因功能以及 TTSS-3 分泌系统奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lazar Adler NR, Govan B, Cullinane M, et al. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease?[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(6): 1079-1099
- [2] Mao XH. Progress on melioidosis[J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(13): 1315-1317 (in Chinese)
毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317
- [3] Ren CY, Li Q. A lethal toxin from *Burkholderia pseudomallei*[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2015, 43(3): 47-50 (in Chinese)
任春艳, 李倩. 类鼻疽伯克霍尔德致死因子[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(3): 47-50
- [4] Ulrich RL, DeShazer D. Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(2): 1150-1154
- [5] Galyov EE, Brett PJ, DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis[J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64: 495-517
- [6] Stevens MP, Haque A, Atkins T, et al. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis[J]. Microbiology, 2004, 150(8): 2669-2676
- [7] Cullinane M, Gong L, Li XL, et al. Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 744-753
- [8] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. 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*[J]. Gene, 1994, 145(1): 69-73
- [9] Gong L, Cullinane M, Treerat P, et al. The *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system and *bopA* are required for evasion of LC3-associated phagocytosis[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17852
- [10] Hu ZQ, Fang Y, Zhu P, et al. Construction and identification of *Burkholderia pseudomallei* BPSL1549 gene knockout mutant strain[J]. Journal of Third Military Medical University, 2016, 38(11): 1210-1214 (in Chinese)
胡治强, 方瑶, 朱攀, 等. 类鼻疽伯克霍尔德菌 BPSL1549 基因敲除株的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(11): 1210-1214
- [11] Pei JM, Grishin NV. The Rho GTPase inactivation domain in *Vibrio cholerae* MARTX toxin has a circularly permuted papain-like thiol protease fold[J]. Proteins, 2009, 77(2): 413-419
- [12] Kayath CA, Hussey S, El Hajjami N, et al. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy requires binding to cholesterol through the type III effector, IcsB[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(12/13): 956-966
- [13] Yu D, Yin ZQ, Jin Y, et al. Evolution of *bopA* gene in *Burkholderia*: a case of convergent evolution as a mechanism for bacterial autophagy evasion[J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 6745028