

文章编号: 1000-0615(2017)12-1858-09

DOI: 10.11964/jfc.20170310731

鲁氏耶尔森菌*invF*基因无痕缺失突变株的构建及生物学特性

闵洁¹, 汪开毓^{1,2*}, 刘韬¹, 贺扬¹, 胡伟¹, 罗梦笛¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川成都 611130;

2. 四川农业大学动物疾病与人类健康四川省重点实验室, 四川成都 611130)

摘要: 鲁氏耶尔森菌是一种具有广泛致病性的条件致病肠杆菌。三型分泌系统(T3SS)是该菌的重要毒力系统, 其中*invF*基因是T3SS功能表达的重要调控因子。为探讨*invF*和T3SS对*Y. ruckeri*致病作用的影响, 本研究构建了*Y. ruckeri* SC09株*invF*基因的无痕缺失株, 并对其生物学特性进行研究。通过融合PCR方法, 将*invF*基因的上、下游片段A、C融合, 构建同源臂AC; 将获得的同源臂AC连接入自杀质粒pLP12, 构建pLP12-*invF*同源重组载体; pLP12-*invF*电转化进入供体菌株大肠杆菌β2163, 并利用接合转移方法转入受体菌株*Y. ruckeri* SC09, 利用抗生素正向筛选和*vmt*反向筛选分别对插入突变株和缺失突变株进行筛选, 并利用PCR技术和序列测定对*Y. ruckeri invF*缺失株进行鉴定; 对突变株和野生株进行菌体菌落形态观察、生化特性鉴定和生长曲线测定。结果显示, 融合PCR、AC片段经氯霉素抗性正向筛选和*vmt*反向筛选, PCR鉴定和测序鉴定后, 成功获得了*Y. ruckeri* SC09 *invF*基因的无痕缺失突变株, 突变株和野生株菌体菌落形态和生化特性基本一致, 突变株菌落较野生株小, 各个时期突变株的生长浓度较野生株低。研究表明, 采用自杀质粒pLP12和大肠杆菌β2163接合转移系统, 利用抗生素正向筛选和*vmt*反向筛选技术, 在对其基本生物学特性无显著影响的情况下, 可简捷高效地获得*invF*基因的无痕缺失突变株。

关键词: 鲁氏耶尔森菌; 三型分泌系统; *invF*基因; 无痕突变; 生物学特性

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)耶尔森菌属(*Yersinia*), 是无荚膜、无芽孢、两端纯圆的革兰氏阴性短杆菌^[1]。它是一种危害世界水产养殖业的条件致病菌, 广泛分布于北美、南非、澳大利亚以及欧洲^[2]。该菌可引起多种水生动物疾病的暴发, 易感动物由鲑鳟类扩大至鲟科(Ictaluridae)、鲤科(Cyprinidae)以及对虾等^[3-5]。该菌常引起鲑鳟发生肠炎红嘴病(enteric redmouth, ERM), 其主要症状为肠道急性炎症反应、体表出血, 后期全身性败血症、背部皮肤发黑、口部严重溃疡及出血等^[6]; 患病斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)则主

要以体表充、出血为特征, 尤其是在眼眶、嘴、腹部、体表两侧有大量针尖状出血点^[3-4]; 患病对虾体色加深, 甲壳及肌肉柔软, 血淋巴在体外呈淡蓝色, 绝大多数不凝固^[5]。

鲁氏耶尔森菌的主要毒力因子包括细胞外毒素、铁载体系统^[7]、三型分泌系统(T3SS)^[8]、四型分泌系统^[9]等。其中, T3SS是由20种以上的蛋白质构成的高度保守的复杂分泌装置, 普遍存在于革兰氏阴性菌中, 是细菌重要的毒力系统, 在细菌感染宿主细胞时能向宿主细胞内靶向转运效应蛋白, 并抑制和调控宿主的天然免疫反应以利于细菌胞内感染和寄生^[10]。编码T3SS的基因片段较大, 常常以毒力岛(pathogen-

收稿日期: 2017-03-02 修回日期: 2017-05-22

资助项目: 四川农业大学创新性实验计划(1510626059)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywangsicau@126.com

icity island)的形式成簇存在于细菌的染色体或质粒上。*Inv* 是 T3SS 中编码侵袭蛋白(INV)的基因簇, 包含 *invA*、*invB*、*invC*、*invE*、*invF*、*invG*、*invI*、*invJ* 等多种基因, 其中 *invF* 基因(*invasion protein F*)是 *inv* 基因簇中的第一个基因, 属于转录激活子 AraC 家族^[8, 11-12]。*invF* 基因是沙门氏菌中 T3SS 的核心调控基因, 所表达的蛋白参与了沙门氏菌对宿主的入侵^[13]。Liu 等^[8]研究表明鲁氏耶尔森菌毒力岛编码的 T3SS 与沙门氏菌的毒力岛(SPI1)编码的 T3SS 具有广泛的序列相似性, 且鲁氏耶尔森菌的 T3SS 和沙门氏菌的 SPI1-T3SS 属于系统发育树的相同分支, 同时推测鲁氏耶尔森菌的 *invF* 基因在该菌中也是 T3SS 的核心调控基因; 陈俊等^[14]研究表明敲除沙门氏菌 T3SS 编码基因 *SP11*, 可使该菌的侵袭能力降低 100 倍; 目前, 鲁氏耶尔森菌致病机制的研究较少, 关于其 T3SS 和 *invF* 的研究尚处于空白。因此, 本实验探索了 *invF* 基因缺失株的构建方法, 利用同源重组原理、融合 PCR 方法和结合转移技术成功构建了鲁氏耶尔森菌无痕 *invF* 缺失株, 并对野生株与缺失株的生物学特性进行了基础研究, 旨在为进一步研究 *invF* 基因在鲁氏耶尔森菌致病过程中的作用奠定基础, 并为鲁氏耶尔森菌减毒疫苗的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株/载体 pLP12 和大肠杆菌 β 2163 购于

广州迈博生物科技有限公司; 鲁氏耶尔森菌野毒株(*Y. ruckeri* SC09 株)由四川农业大学鱼病研究中心分离、鉴定和保存; DH 5 α λ pir 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

主要试剂 2 \times PrimSTAT Max Premix、琼脂糖胶回收试剂盒和 DNA Marker 均购于 TaKaRa 公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购于英国 OXOID 公司; L-阿拉伯糖、2,6-二氨基庚二酸(DAP)购于 SIGMA 公司; 氯霉素、质粒 DNA 小量提取试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 \times Taq Master Mix、Goldview、细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖均购于天根生化科技(北京)有限公司; T₄-DNA 连接酶购于德国 Thermo 公司; PCR 产物纯化试剂盒购于宁波市重鼎生物技术有限公司; 细菌生化微量鉴定管购于杭州生物科技有限公司。

1.2 实验方法

引物设计 根据 GenBank 中鲁氏耶尔森菌(登录号: JRWX000000000) *invF* 基因序列, 设计 *invF* 的上、下游同源臂的引物 *invF*-MF1/MR1(上游, A)和 *invF*-MF2/MR2(下游, C), 并根据 *invF* 上、下游基因设计 *invF*-TF/TR 用于缺失检测, 同时设计质粒引物 pLP-UF/UR 用于构建重组载体检测(表 1)。

鲁氏耶尔森菌的培养及基因组 DNA 提取按照无菌操作要求, 将低温保存的鲁氏耶尔森菌划线接种于 LB 固体培养基, 28 °C 恒温培养。

表 1 本研究所用引物及序列

Tab. 1 All the primers involved in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence	产物/bp product size
<i>invF</i> -MF1	CTACGACGATCTGGCAGAAG	463
<i>invF</i> -MR1	CGAGCAGTACCCACAGCTCAGTAGCGTTGGAAGATACTCTTCA	
<i>invF</i> -MF2	TGAAGAGTATCTTCCAACGCTACTGAGCTGTGGGTACTGCTCG	432
<i>invF</i> -MR2	ACCAGACTAATGCGGTACGA	
<i>invF</i> -TF	GTACTCACCTTCATCAGTCGG	1002/1623
<i>invF</i> -TR	CGAGTGCTGATTAGCTGGTTC	
pLP-UF	CGACACAGTTGTAAGTGGTCC	1327
pLP-UR	CAGGAACACTTAACGGCTGAC	

注: *invF*-MF1/MR1 扩增上游同源臂 A; *invF*-MF2/MR2 扩增下游同源臂 C; *invF*-TF/TR 用于缺失检测, 缺失突变株为 1002 bp, 野生株为 1623 bp; pLP-UF/UR 用于构建重组载体检测

Notes: primer *invF*-MF1/MR1 amplify the upstream homologous arm A; primer *invF*-MF2/MR2 amplify downstream homologous arm C; PCRs using primer *invF*-TF/TR to test deletion mutants (1002 bp) and wild type (1623 bp); primer pLP-UF/UR use to test recombination plasmid

24 h后, 挑取单个菌落接种于LB液体培养基, 28 °C静置培养24 h。菌液经革兰氏染色验纯后, 取1 mL培养菌液按照天根细菌DNA提取试剂盒提取基因组DNA。

融合PCR构建同源臂 分别以*invF*-MF1/*invF*-MR1和*invF*-MF2/*invF*-MR2为引物, 以鲁氏耶尔森菌DNA为模板进行PCR扩增。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 利用胶回收试剂盒对PCR产物进行回收纯化, 获得*invF*上游和下游同源臂(A、C片段)。将A、C片段按体积比1:1混合后作为模板, 以*invF*-MF1/*invF*-MR2为引物, 进行融合PCR扩增。产物经琼脂糖凝胶, 利用胶回收试剂盒进行纯化获得AC融合片段。以AC片段为模板, *invF*-MF1/*invF*-MR2为引物, 用Taq酶进行PCR扩增, 电泳后, 用胶回收试剂盒对PCR产物进行纯化, 获得用于T克隆的AC片段。

pLP12-*invF*自杀载体构建、转化及鉴定 利用T₄ DNA连接酶将AC片段与自杀T载体pLP12连接, 连接产物转入DH 5 α λ pir感受态细胞, 转化后的细胞涂布于Cm-LB平板(氯霉素, chloramphenicol, Cm=20 μ g/mL), 培养至清晰的单菌落。挑取单个菌落, 以pLP-UF/pLP-UR为引物, 进行菌落PCR验证, 获得阳性克隆株pLP12-*invF*-DH 5 α λ pir。将鉴定正确的克隆pLP12-*invF*-DH 5 α λ pir扩大培养, 并用质粒微量提取试剂盒提取质粒pLP12-*invF*, -20 °C保存备用。

大肠杆菌 β 2163感受态的制备 将大肠杆菌 β 2163接种于0.3% DAP-LB平板(二氨基庚二酸, diaminopimelic acid, DAP), 37 °C过夜培养后挑取单菌落接种到0.3% DAP-LB液体培养基中振荡培养至OD₆₀₀=0.5; 将菌液置于冰上冷却10 min后, 取1 mL菌液, 7000 r/min, 4 °C离心5 min, 弃上清液, 加入1 mL 15%灭菌甘油洗涤3次, 并用0.6 mL相同溶液重悬菌体。

pLP12-*invF*- β 2163的构建 利用电转化法将pLP12-*invF*电转化入上述制备的 β 2163感受态细胞。将pLP12-*invF*和 β 2163感受态细胞分别冰浴10 min后, 取2 μ L pLP12-*invF*, 加入100 μ L大肠杆菌 β 2163感受态细胞中, 混匀, 于冰上继续放置10 min, 同时将直径2 mm的电转杯冰上预冷; 将所有液体转入电转杯中进行电转化(电转化条件: 1.8 kV/cm, 200 Ω , 25 μ F), 电转完成后迅速加入1 mL 37 °C预热的DAP-LB培养液, 37 °C复苏培养1 h; 取复苏菌液100 μ L均匀涂布在含有20 μ g/mL Cm的DAP-LB平板上, 37 °C过夜培

养。经抗生素压力筛选, 获得阳性菌株, 命名为pLP12-*invF*- β 2163。

插入突变株构建及鉴定 将pLP12-*invF*- β 2163与鲁氏耶尔森菌野生株分别过夜培养后, 各取100 μ L菌液混合, 离心弃上清液, 收集菌体经LB洗涤1次后加入10 μ L新鲜LB重悬, 并立即涂布DAP-LB平板, 置于30 °C培养8 h。用1 mL LB洗板, 取100 μ L涂布于新的Cm-LB平板。挑取平板上的单个菌株, 以*invF*-MF1/*invF*-MR2为引物进行菌落PCR鉴定。将阳性菌株命名为pLP12-*invF*-SC09。

缺失突变株构建及鉴定 将pLP12-*invF*-SC09接种于LB液体培养基振荡培养2 h, 取100 μ L菌液涂布于含有0.02% L-阿拉伯糖的LB平板, 37 °C过夜培养; 挑取平板上长出的单个菌株, 扩大培养后提取基因组DNA, 以*invF*-TF/*invF*-TR为引物进行PCR鉴定, 并将PCR产物送至上海立菲生物技术有限公司测序。将鉴定正确的无痕突变株保种于LB肉汤+30%甘油, 并置于-20 °C冰箱中。

菌体菌落形态观察 挑取pLP12-*invF*-SC09与鲁氏耶尔森菌SC09单菌落接种于LB液体培养基, 37 °C静置培养至OD₆₀₀=0.6; 对突变株和野生株进行革兰氏染色, 并在油镜下观察比较菌体形态; 将OD₆₀₀=0.6突变株和野生株接种于LB平板上, 28 °C培养24 h, 观察比较菌落形态。

pLP12-*invF*-SC09生化特性鉴定 挑取pLP12-*invF*-SC09与鲁氏耶尔森菌SC09单菌落转接于阿拉伯糖、硫化氢、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、蜜二糖、蔗糖、葡萄糖、半乳糖、甘露醇、肌醇等生化鉴定管, 37 °C过夜, 观察生化鉴定结果。

pLP12-*invF*-SC09生长曲线的测定 将37 °C静置培养至OD₆₀₀=0.8的pLP12-*invF*-SC09与鲁氏耶尔森菌SC09菌液, 分别按1:1000接种于LB液体培养基, 每隔4 h取培养物150 μ L加入96孔板中, 测其OD₆₀₀值, 重复8次, 并绘制其生长曲线。

2 结果

2.1 基因敲除同源臂的构建

以鲁氏耶尔森菌野生型(SC09)基因组DNA为模板, 以*invF*-MF1/MR1和*invF*-MF2/MR2为引物, 扩增获得了*invF*上游同源臂A片段、下游同

源臂C片段,产物大小均为400 bp左右(图1-a)。以A、C片段为模板,*invF*-MF1/*invF*-MR2为引物,进行两步融合PCR扩增得到片段大小为约800 bp的AC融合条带(图1-b),获得了基因敲除同源臂。

2.2 敲除载体pLP12-*invF*-DH 5 α λ pir的构建与鉴定

AC融合产物经琼脂糖凝胶电泳回收后,与自杀T载体pLP12连接,后转化入大肠杆菌DH

5 α λ pir感受态细胞,经Cm-LB选择培养获得Cm抗性菌株。以该菌株为模板,pLP-UF/pLP-UR为引物进行PCR鉴定,得到约1300 bp的PCR产物(图1-c),表明pLP12-*invF*质粒成功转化入大肠杆菌DH 5 α λ pir中。鉴定正确的阳性菌株命名为pLP12-*invF*-DH 5 α λ pir。

将pLP12-*invF*电转化入大肠杆菌 β 2163后,抗性平板初筛得到抗Cm的阳性菌株。分别以Cm阳性菌株和野生菌株为模板,*invF*-MF1/*invF*-MR2为引物进行PCR鉴定,结果显示,野生株仅

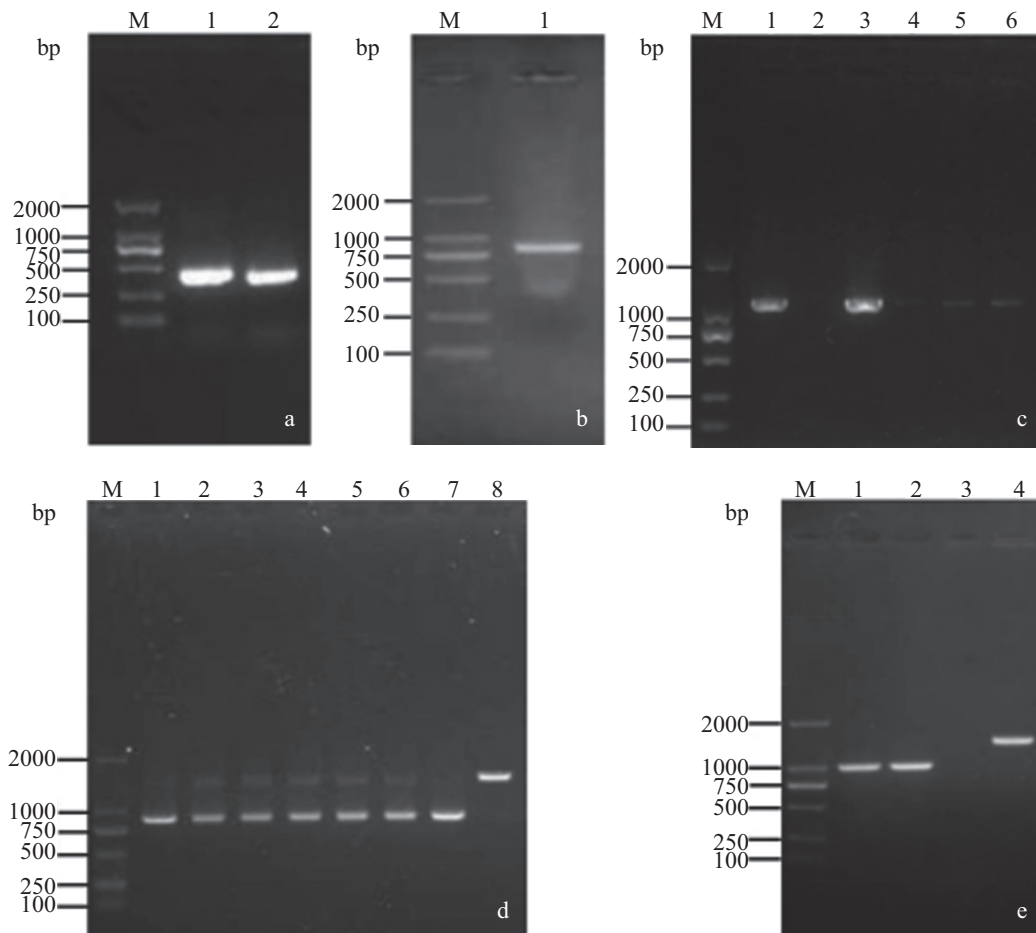


图1 构建鲁氏耶尔森菌*invF*基因无痕缺失突变株的相关电泳图

a.扩增的上下游同源臂A、C,泳道1.上游同源臂A,泳道2.下游同源臂B, M.标准物质2000; b.融合PCR合成的基因敲除目的片段AC,泳道1.同源臂AC, M.标准物质2000; c. pLP12-*invF*质粒构建鉴定结果,泳道1~6.以pLP-UF/UR为引物进行pLP12-*invF*的PCR检测,1、3为阳性, M.标准物质2000; d.以引物*invF*-MF1/*invF*-MR2进行的PCR插入突变检测结果,泳道1~7.插入突变型,泳道8.野生型(对照), M.标准物质2000; e.以引物*invF*-TF/*invF*-TR进行的PCR缺失突变检测结果,泳道1、2.缺失突变株,泳道3.阴性对照,泳道4.野生株, M.标准物质2000

Fig. 1 Electrophoretic profile of construction of *invF* gene deleted *Y. ruckeri*

a. upstream and downstream homologous arms, line 1. upstream homologous arm A, line 2. downstream homologous arm C, M. marker 2000; b gene knock-out target fragment synthesized by fusion PCR, line 1. homologous arm AC, M. marker 2000; c. result of recombination plasmid pLP12-*invF* construction by PCR amplification, line 1-6. PCR's using primers pLP-UF/UR to test pLP12-*invF*, the results of line 1 and 3 were positive, M: marker 2000; d. PCR's using primers *invF*-MF1/*invF*-MR2 to test insertional mutants and wild type, line 1-7. insertion mutants, line 8. wild type; M. marker 2000; e. PCR's using primers *invF*-TF/*invF*-TR to test deletion mutants and wild type, line 1, 2. deletion mutants, line 3. negative control, line 4. wild type, M. marker 2000

扩增得到一条大小约为1500 bp的目的条带，而 Cm阳性菌株得到2条特异性扩增条带，大小分别为1500和800 bp，表明pLP12-*invF*成功插入了 *Y. ruckeri* SC09中(图1-d)。将鉴定正确的插入突变株扩大培养后，涂布在含0.02%的L-阿拉伯糖的LB培养基上，筛选缺失突变株。以长出的单菌落为模板，*invF*-TF/*invF*-TR为引物进行PCR检测，结果显示，缺失突变株PCR产物大小约为1000 bp，而野生型菌株PCR产物大小约为1600 bp(图1-e)。将缺失克隆株的PCR产物测序鉴定发现，检测的序列与原始序列相比100%相似，与预期结果一致(图2)，表明突变株确实够建成功。

2.3 菌体菌落形态观察

将对数生长期的细菌固定于载玻片上，进行革兰氏染色后，通过光学显微镜油镜对菌体

形态进行观察。野生株(图3-a)和突变株(图3-b)都呈短杆状或卵圆形，革兰氏阴性。突变株和野生株在LB平板上28℃培养24 h，二者都生长良好，均长出边缘整齐、表面光滑、稍微隆起，有光泽的圆形乳白色菌落，但野生株(图4-a)长出的菌落稍大于突变株(图4-b)。

2.4 pLP12-*invF*-SC09 生化特性

突变株与野生株表现出的生化特性无异：糖发酵实验中，发酵葡萄糖、半乳糖、甘露醇；不发酵阿拉伯糖、鼠李糖、蜜二糖、蔗糖、肌醇；硫化氢实验阴性；鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶实验阳性(表2)。

2.5 pLP12-*invF*-SC09 生长曲线

突变株和野生株都符合细菌生长规律。突



图2 以*invF*-TF/*invF*-TR为引物的PCR产物的测序结果比对

实线.上游同源臂A; 虚线.下游同源臂C; 蓝色.引物; 红色.测序的片段

Fig. 2 Comparison of PCR products of the *invF*-TF/*invF*-TR sequence with expected sequence

Solid line. the upstream homologous arm A; dotted line. the downstream homologous arm C; blue. primers; red. detection sequence

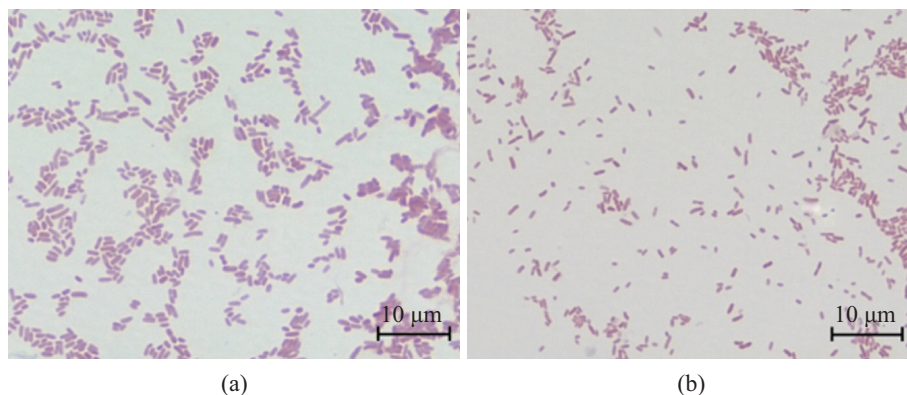


图3 鲁氏耶尔森菌野生株(a)与缺失突变株(b)的革兰氏染色照片(1000×)
Fig. 3 Gram stain of wild type *Y. ruckeri* (a) and deletion mutants (b) (1000×)

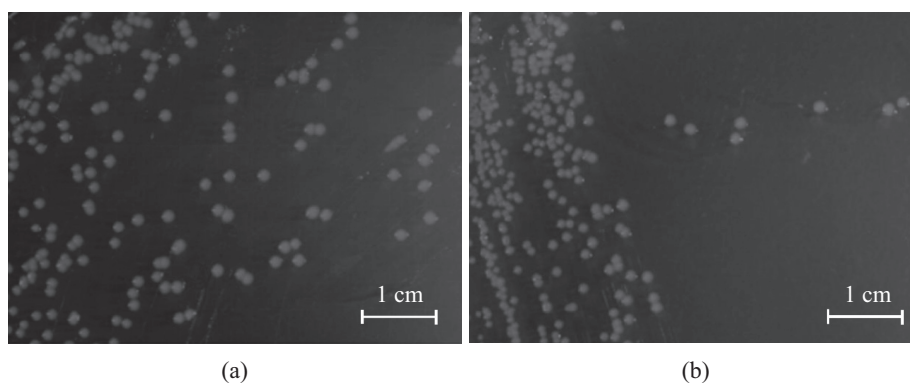


图4 鲁氏耶尔森菌野生株(a)与缺失突变株(b)在LB平板上生长的菌落
Fig. 4 Colonies of wild type *Y. ruckeri* (a) and deletion mutants (b) grown at LB plate

变株的迟缓期持续时间较野生株长,对数期持续时间较野生株短,各个时期的菌液浓度均低于野生株,说明突变株的生长速率较野生株迟缓(图5)。

3 讨论

构建基因缺失株是研究基因功能的最有效手段。基因敲除的方法有多种,其中CRISPR-Cas9是一种全新的基因敲除手段,具有操作简单、成本低、作用高效等优点^[15],但由于大多数原核细胞缺乏非同源末端连接修复系统,且人工进行同源重组时常有质粒残留^[16-17],限制了此技术在原核生物上的广泛运用。同源重组技术是原核生物主要的敲除技术。Red同源重组系统是目前常用的敲除技术,该方法需要3种质粒协同提供外源Red重组所需要的3个蛋白,同时对敲除菌株的种类具有一定的局限性。利用自杀质粒进行同源重组的敲除技术是基因敲除中普

遍适用的敲除方法,其中无痕敲除技术不仅可快速敲除目的基因,而且可不引入任何外源片段,避免了外源基因对缺失株的影响。

pLP12自杀质粒可利用细菌体自身广泛存在的RecBCD系统对外源进入的DNA进行同源重组,从而实现目标基因的等位替换,只需要一段同源区就可以定位,使得载体构建更为便利。大肠杆菌β2163具有高效的供体菌接合系统,接合转移率高,且适用范围广。Luo等^[18]采用该方法,敲除率为60%左右。本实验通过融合PCR方法将*invF*基因的上、下游同源臂融合并转入到自杀质粒pLP12,构建了同源重组质粒pLP12-*invF*;通过电转化将pLP12-*invF*质粒转入大肠杆菌β2163获得受体菌株β2163-pLP12-*invF*;受体菌株与供体菌株鲁氏耶尔森菌进行接合培养,便捷且高效地获得了鲁氏耶尔森菌*invF*插入缺失株,表明自杀质粒pLP12和大肠杆菌β2163可协同高效介导鲁氏耶尔森菌的基因敲除。

表2 *invF*基因缺失株生化鉴定结果

鉴定项目 identified items	缺失突变菌株 deletion mutants	野生菌株 wild type
阿拉伯糖 arabinose	-	-
鼠李糖 rhamnose	-	-
硫化氢 hydrogen sulfide	-	-
蜜二糖 melibiose	-	-
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	+
葡萄糖 glucose	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+
肌醇 inositol	-	-
半乳糖 galactose	+	+
甘露醇 mannitol	+	+
蔗糖 sucrose	-	-

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应

Notes: “+” indicates a positive reaction, “-” indicates a negative reaction

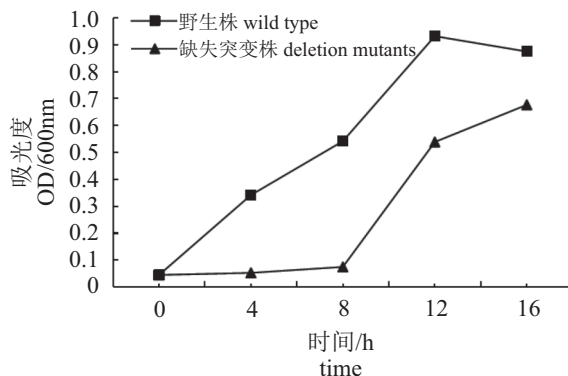


图5 缺失突变株与野生型的生长曲线

Fig. 5 Grow rate curve of the deletion mutants and wild type *Y. ruckeri*

细菌基因敲除的筛选方法常采用的是正、反向的筛选技术。正向的筛选主要是利用质粒上的抗性基因作标记，反向的筛选主要是利用 *sacB* 基因介导重组，从而起到反向筛选的目的。Zeng等^[19]利用同源重组的方法，用氯霉素抗性基因替换海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)的 *cpsJ* 基因，正向筛选得到了突变株 $\Delta cpsJ$ 。潘文等^[20]利用反向筛选基因的 *sacB* 基因，筛选出成功缺失 *bp26* 基因的布鲁氏菌弱毒疫苗 S19 株、S2 株、

M5 株。然而单纯的正向筛选会残留抗性基因，从而限制了突变株作为疫苗在生产上的应用；而利用 *sacB* 基因进行反向筛选时，在第一次同源重组当中，*sacB* 基因多发生突变失活，从而导致第一次同源重组的效率降低^[21]。*vmt* 基因常替换 *sacB* 基因用于反向筛选，由于 *vmt* 基因具有极大的细胞毒性，在 L-阿拉伯糖诱导条件下 *vmt* 表达，使得二次重组失败的菌体死亡，大大减少第二次重组后缺失突变克隆筛选工作。Luo等^[18]利用接合转移同源重组的方法，通过 *vmt* 基因进行反向筛选，成功构建了 4 种弧菌的基因突变株。本研究构建鲁氏耶尔森菌 *invF* 基因缺失株时结合了正、反向筛选技术。第一轮使用抗生素 Cm 正向筛选：将 pLP12-*invF* 质粒接合输入到靶细菌后，由于自杀载体不能在绝大部分细菌中复制，在抗生素选择压力下，只有细菌基因组靶位点整合有自杀载体的插入突变株才可以存活。在第二轮采用反向筛选基因 *vmt*，将插入突变的克隆 LB 液体培养后涂布于含有 L 0.02% 阿拉伯糖的 LB 平板，使得第二次重组失败的含有 *vmt* 基因的菌体死亡，而二次重组成功 *vmt* 基因丢失的菌株存活。二次重组后存活菌株通过进一步的 PCR 和序列测定验证，成功筛选得到了鲁氏耶尔森菌的 *invF* 基因无痕缺失突变株。

本实验菌体菌落形态和生化特性结果初步表明，*invF* 的缺失对鲁氏耶尔森菌的菌体形态和生化特性无明显影响，野生株在 LB 平板上的菌落较突变株大，野生株和突变株在 37 °C 培养均无动力，较大的菌落意味着更多的菌体，所以突变株生长活性较低；生长曲线结果说明突变株的生长速率较野生株迟缓，进一步表明突变株生长活性较低，*invF* 的缺失对鲁氏耶尔森菌的生长特性有轻微影响。

本研究以同源重组的方法，利用自杀质粒 pLP12 和 $\beta 2163$ 高效接合系统首次在鲁氏耶尔森菌上敲除了 T3SS 的核心调控基因 *invF*，通过正、反向筛选技术，在对其基本生物学特性无显著影响的情况下，获得了无抗生素标记的鲁氏耶尔森菌的 *invF* 基因无痕缺失突变株，为后续该菌致病性和 *invF* 功能的研究奠定了基础，为开发预防鲁氏耶尔森菌的潜在弱毒疫苗提供了新的途径。

参考文献：

- [1] Ross A J, Rucker R R, Ewing W H. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow

- trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1966, 12(4): 763-770.
- [2] 连海. 鲁氏耶尔森氏菌*pI*基因的克隆、分子特性分析及原核表达[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
Lian H. Cloning, molecular characteristics analysis and prokaryotic expression of the *pI* gene of *Yersinia ruckeri*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [3] 范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲴(*Ictalunes punctatus*)源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 862-868.
Fan F L, Wang K Y, Geng Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalunes punctatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 862-868(in Chinese).
- [4] 徐伯亥, 殷战, 陈燕葵, 等. 鲢、鳙鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*, 一种新的鲢、鳙鱼病原菌[J]. 科学通报, 1991, 36(21): 1825-1828.
Xu B H, Yin Z, Chen Y S, et al. An outbreak of a new epizootic in silver carp and bighead carp——*Yersinia ruckeri*, a new pathogen of silver carp and bighead carp[J]. Chinese Science Bulletin, 1991, 36(21): 1825-1828.
- [5] 蔡雪峰, 俞开康, 孟庆显. 对虾耶尔森氏菌病原及血淋巴生理指标研究[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(5): 458-461.
Cai X F, Yu K K, Meng Q X. Studies on a pathogen (*Yersinia rucher*) and it's effects on hemolymph of *penaeus orientalis*[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1997, 19(5): 458-461(in Chinese).
- [6] Furones M D, Rodgers C J, Munn C B. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1993, 3: 105-125.
- [7] Fernández L, Prieto M, Guijarro J A. The iron-and temperature-regulated haemolysin Yh1A is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*[J]. Microbiology, 2007, 153(2): 483-489.
- [8] Liu T, Wang K Y, Wang J, et al. Genome sequence of the fish pathogen *Yersinia ruckeri* SC09 provides insights into niche adaptation and pathogenic mechanism[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(4): 557.
- [9] Méndez J, Fernández L, Menéndez A, et al. A chromosomally located *traHIJKLMN* operon encoding a putative type IV secretion system is involved in the virulence of *Yersinia ruckeri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 937-945.
- [10] 李正花. III型分泌系统的研究进展[J]. 医学信息, 2008, 21(11): 2119-2122.
Li Z H. The research progress of type III secretion system (T3SS)[J]. Medical Information, 2008, 21(11): 2119-2122(in Chinese).
- [11] 黄冠军, 刘天强, 杨晓玲, 等. 沙门氏菌入侵基因研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(11): 65-67.
Huang G J, Liu T Q, Yang X L, et al. Advances of research on invasive genes in Salmonella[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2013, 9(11): 65-67(in Chinese).
- [12] Darwin K H, Miller V L. *Invf* is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(16): 4949-4954.
- [13] Main-Hester K L, Colpitts K M, Thomas G A, et al. Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(3): 1024-1035.
- [14] 陈俊, 蒋文灿, 谭天, 等. 沙门氏菌毒力岛及III型分泌系统研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4): 371-376.
Chen J, Jiang W C, Tan T, et al. *Salmonella* pathogenicity island and type III secretion system[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(4): 371-376(in Chinese).
- [15] 陶果, 信吉阁, 肖晶, 等. 基因敲除技术最新研究进展及其应用[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(29): 11605-11608, 11644.
Tao G, Xin J G, Xiao J, et al. Research advance of gene knockout technology and its application[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(29): 11605-11608, 11644(in Chinese).
- [16] Jiang W Y, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233-239.
- [17] 余深翼, 赵金荣, 郑玲红, 等. 利用CRISPR/Cas9技术构建大肠杆菌*aroA*基因的敲除系统及其初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4): 762-770.
Yu S Y, Zhao J R, Zheng L H, et al. The application of CRISPR/Cas 9 technology for *aroA* gene knockout in *Escherichia coli*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2016, 47(4): 762-770(in Chinese).
- [18] Luo P, He X Y, Liu Q T, et al. Developing universal

- genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in vibrio Species based on suicide T-Vectors carrying a novel counterselectable marker, *vmi480*[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144465.
- [19] Zeng Y, He Y, Wang K Y, *et al.* *cpsJ* gene of *Streptococcus iniae* is involved in capsular polysaccharide synthesis and virulence[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2016, 109(11): 1483-1492.
- [20] 潘文, 王佳莹, 赵明秋, 等. 布鲁氏菌*bp26*基因缺失株的构建[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(3): 280-286.
- Pan W, Wang J Y, Zhao M Q, *et al.* Construction of unmarked *bp26* gene-deleted strains of *Brucella* spp.[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(3): 280-286(in Chinese).
- [21] 张雪, 温廷益. Red重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 89-93.
- Zhang X, Wen T Y. Advances of Red recombination system in *Escherichia coli* gene modification[J]. China Biotechnology, 2008, 28(12): 89-93(in Chinese).

Construction and identification of *invF* gene deleted *Yersinia ruckeri* and its biological characteristics

MIN Jie¹, WANG Kaiyu^{1,2*}, LIU Tao¹, HE Yang¹, HU Wei¹, LUO Mengdi¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: *Yersinia ruckeri* is a conditional pathogenic bacterium which has widespread pathogenicity. The most important virulence regulatory system of *Y. ruckeri* is its type III secretion system (T3SS), while *invF* gene is an important regulatory factor of the T3SS. In this study, we constructed an unmarked deletion mutant with *invF* gene missing of a *Y. ruckeri* SC09, a highly virulent strain isolated from *Ictalurus punctatus*, and studied its biological characteristics. In order to investigate the effects of *invF* and T3SS on the pathogenicity of *Y. ruckeri*, construction of homologous arm AC, upstream fragment A and downstream fragment C of *invF* gene, was combined in overlap extension PCR. Then the homologous arm AC was ligated with the pLP12 suicide vector to generate the plasmid pLP12-*invF*. The plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α λ pir cells and it was amplified. The pLP12-*invF* was extracted and transformed into *E. coli* β 2163 by electroporation, designated pLP12-*invF*- β 2163. Then the pLP12-*invF* was transferred into *Y. ruckeri* SC09 strain through conjugation. Using the chloramphenicol for screening of insertional mutants and the *vmt* gene with L-arabinose for counter selection of deletion mutants. The deletion mutants were confirmed by PCR and subsequent sequencing. Then we observed morphology of bacteria and colonies, identified biochemical characterization and measured growth curve of the deletion mutants and wild type. In this study, the *Y. ruckeri* SC09 strain *invF* gene has been successfully knocked out. The morphology of bacteria and colonies, biochemical characteristics of deletion mutants and wild type were similar, but the colony size of deletion mutants was smaller than wild type and the growth of deletion mutants was slower than that of wild type. The method of pLP12 suicide vector, a highly efficient conjugation system from *E. coli* β 2163 and screening by the antibiotic coupled with counter selecting by *vmt* gene, can be a simple and efficient gene editing operation to deal with *Y. ruckeri*, in the absence of a significant effect on its basic biological characteristics. In conclusion, this research obtained the unmarked mutant genes with the missing *invF* successfully, which laid a foundation for the studies of the pathogenicity of *Y. Ruckeri* in the future.

Key words: *Yersinia ruckeri*; T3SS; *invF* gene; unmarked deletion; biological characteristic

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywangsicau@126.com

Funding projects: Innovative Experiment Project of Sichuan Agricultural University (1510626059)