Cpx 对迟缓爱德华氏菌毒力的影响

潘海建[1,2], 郝　斌[1,2], 李　杰[1,3], 李贵阳[1,3], 肖　鹏[1], 莫照兰[1,3]

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 中国水产科学院, 黄海水产研究所 海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室 山东 青岛 266071)

摘要: 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是水产养殖动物常见病原菌。接合质粒表达系统(conjugative plasmid expression, Cpx)是 G^-菌的双组分调控系统。本研究构建了迟缓爱德华氏菌 LSE40 的 *cpx* 基因簇缺失突变株 Δ*cpx*, 检测其对蓝曼龙(*Trichogaster trichopterus*)的毒力。结果显示以浸泡感染, Δ*cpx* 的毒力有所降低。以肌肉注射途径感染, Δ*cpx* 的半数致死量为 8.6×10^5 cfu/mL 毒力下降 7.33 倍。Δ*cpx* 在鱼体内的生存力显著下降($P<0.05$)。这些结果表明 Cpx 参与了迟缓爱德华氏菌的致病作用。

关键词: 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)LSE40; Cpx; 毒力

中图分类号: Q939.94　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2013)02-0017-05

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一种革兰氏阴性菌, 属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)。由该菌引起的爱德华氏菌病(Edwardsiellosis)是鱼类养殖中最常见的传染病之一, 给水产养殖业造成重大经济损失[1]。迟缓爱德华氏菌可产生多种致病因子, 如溶血素、黏附素、三型分泌系统(T3SS)、六型分泌系统(T6SS)、密度感应系统[2-5], 它还可以利用多种因子抵御环境压力、侵入并在宿主体内存活繁殖[6]。其在环境中的生存和对宿主的毒力受到严格调控[7]。

McEwen[8]等在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中观察到染色体 *cpxA* 位点的突变导致 F-质粒接合菌毛表达量下降, 发现了接合质粒表达系统(conjugative plasmid expression, Cpx)。Cpx 是存在于革兰氏阴性菌细胞膜上的双组分调节系统, 由组氨酸蛋白激酶 CpxA、反应调节蛋白 CpxR 和抑制因子 CpxP 3 个蛋白构成。该系统能够感应外界环境变化, 参与细菌细胞膜压力调节, 维持细胞膜蛋白稳定性, 还参与调控细菌多项生理功能[9-10]。如 Cpx 参与调节病原菌致病因子表达, 影响毒力[11-16]。

迟缓爱德华氏菌 Cpx 对毒力的作用未知, 本研究通过构建迟缓爱德华氏菌 LSE40 的 *cpx* 基因簇缺失突变株 Δ*cpx*, 检测其对迟缓爱德华氏菌毒力的影响。

1　材料和方法

1.1　菌株、质粒、培养条件

本研究所用菌株和质粒见表 1。

大肠杆菌用 Luria-Bertani 液体培养基(LB)或 LB 平板培养基(LA), 37°C 静止或摇床培养(180 r/min); 迟缓爱德华氏菌用胰大豆蛋白胨肉汤(TSB)或胰大豆蛋白胨琼脂平板(TSA), 28°C 静置或摇床培养(180 r/min)。培养基中需要的抗生素终浓度: 氯霉素为 34 mg/L, 氨苄青霉素为 50 mg/L, 黏菌素为 12.5mg/L。

1.2　实验动物

蓝曼龙(*Trichogaster trichopterus*)从青岛市南山市场购买, 体长为 6～8 cm。在通气的水族箱中暂养, 水温 26℃, 每天换水和投喂饵料。实验前随机取 3 尾鱼, 取血清与迟缓爱德华氏菌 LSE40 做血清凝集实验, 同时取鱼的内脏器官匀浆涂布于 TSA 平板进行细菌分离。如果未出现凝集反应也未分离到细菌, 说明该批鱼未感染过迟缓爱德华氏菌, 也未携带细菌可以用于后续实验。实验开始前一天停止喂食, 在攻毒后每天正常换水停止喂食。

1.3　*cpx* 缺失突变株的构建

应用 Overlap-PCR 构建基因缺失片段, 利用二次重组筛选突变株[19], 具体步骤为: 根据 GenBank 上公布的 *E. tarda* FL6-60 和 EIB202 的全基因组序列

收稿日期: 2012-05-14; 修回日期: 2012-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(192832); 国家科技计划社会发展科技领域项目(2011BAD13B07); 青岛市科技发展计划项目(08-1-7-2-HY)

作者简介: 潘海建(1987-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事海洋微生物与水产动物病害防治研究, 电话: 15244293336, E-mail: ouchappy@163.com; 莫照兰, 通信作者, 电话: 0532-85810517, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

表 1　菌株和质粒
Tab. 1　Strains and plasmids

菌株或质粒	表型或基因型	来源
E.coli		
Trans1-T1	*F⁻ φ80(lacZ) ΔM15ΔlacX74hsdR(rk⁻mk⁺)ΔrecA1398endA1tonA*	全式金生物技术公司
MC1061(λpir)	*thi thr-1 leu6 proA2 his-4 arg E2 lacY1 galK2 aral4xyl5 supe44λpir*	[17]
SM10(λpir)	*Thi thr leu tonA lacY supE*	[17]
E. tarda		
LSE40	Co^r	本实验室分离保存
Δ*cpx*	Co^r, 缺失 *cpx* 基因簇	本实验构建
Plasmids		
pEASY-T1	TA 克隆, Amp^r, $Kana^r$	全式金生物技术公司
pRE112	pGp704 自杀质粒, 依赖 pir 因子, oriT, oriV, sacB, Cm^r	[18]

(GenBank: CP002154.1 和 CP001135.1), 同源克隆扩增得到了 LSE40 菌株的 *cpx* 全序列。在 *cpx* 上游和下游分别设计引物: LSE40-dele-cpxR1(5'- TAGGTACCCAACACGTCGGATTGGTAA-3')/LSE40-dele-cpx2(5'-GCGTCAGGCTTTGCCCGTTCTGCCCAGA-AGTAGTGTAC-3')和 LSE40-dele-cpx3(5'-ACGGG-CAAAGCCTGACGC-GCT-3')/LSE40-dele-cpx4(5'-GTGGTACCGCCGATGGCACCCTGATT-3'),在 LSE40-dele-cpxR2 5'端引入与 LSE40-dele-cpxR3 部分片段的重叠区(下划线), 在 LSE40-dele-cpxR1 和 LSE40-dele-cpx4 引入 *Kpn*I 酶切位点(斜体)。第一次 PCR 获得 *cpx* 上游 F1 片段(625 bp)和下游 F2 片段(585 bp), 以一次 PCR 产物为模板, 以引物 LSE40-dele-cpxR1/LSE40-dele-cpx4 进行二次 PCR 获得 F1F2 片段, 该片段缺失 *cpx* 基因簇的 16-2697 bp。将 F1F2 与 peasy-T1 载体连接进行亚克隆、序列确定, 序列正确的 F1F2 与自杀质粒 pRE112 连接, 转化接合供体菌株 SM10 感受态细胞, 与迟缓爱德华氏菌 LSE40 进行两次同源重组, 利用氯霉素抗性(Cm^r)和蔗糖自杀特性(sacB)筛选阳性缺失株, 以 PCR 鉴定缺失株。

1.4　感染实验

将对数期的迟缓爱德华氏菌野生型 LSE40 和突变株 LSE40Δ*cpx* 4 000 r/min 离心去除培养基, 以 0.85%的无菌生理盐水清洗细菌沉淀两次, 细胞重悬至 OD_{600} =0.5(约 10^8 cfu/mL), 10 倍梯度稀释菌液, 取合适稀释度涂布于含有黏菌素的 TSA 平板, 进行菌落计数。

以浸泡、肌肉注射两种途径感染鱼。用约为 10^7 cfu/mL 浓度的菌液浸泡蓝曼龙 24 h, 对照组以灭菌生理盐水浸泡, 每组 10 尾, 观察一周, 统计鱼死亡数。用约 10^7、10^6、10^5、10^4 cfu/mL 浓度的菌液肌肉注射感染鱼, 每尾鱼肌肉注射 0.1 mL 菌液, 对照组注射等量的灭菌生理盐水, 每组 8 尾。感染后每天换水、禁食, 观察两周, 记录鱼死亡数量。计算细菌对蓝曼龙的半数致死量 LD_{50}[20] 。

1.5　细菌在蓝曼龙鱼体内的存活

用半数致死量浓度(约为 10^5 cfu/mL)的 LSE40 和 Δ*cpx* 菌液, 肌肉注射感染鱼, 每尾 0.1 mL, 对照组注射等量灭菌生理盐水, 每组 20 尾鱼。在感染后的 24、48、72 h, 每组随机取 3 尾鱼, 解剖并取鱼的肝脏组织、称质量, 用灭菌的研磨器研磨匀浆, 匀浆液后用无菌生理盐水重悬、稀释, 涂布于含有黏菌素的 TSA 平板进行菌落计数。

1.6　数据分析

用双尾 T 检验的方法进行统计学差异分析, 显著性差异定义为 $P<0.05$, 在图中用“ * ”标出。

2　结果

2.1　迟缓爱德华氏菌 LSE40 Δ*cpx* 构建

E. tarda 的 *cpx* 基因簇全长 2713 bp, 编码 *cpxP, cpxR, cpxA* 3 个基因, 本实验通过 overlap PCR 构建缺失 *cpx* 的 16-2697 bp 的 DNA 缺失片段, 经过二次重组, 筛选得到 *cpx* 缺失株 LSE40Δ*cpx*。引物 LSE40-dele-cpx1/LSE40-dele-cpx4 在野生型 LSE40 中可扩增出全长约 3.9 kb 的片段, 而在 Δ*cpx* 突变株只能扩增出 1.2 kb 的 F1F2 片段(图 1)。对 PCR 产物进行测序分析, 预计的目的片段缺失正确, 说明 LSE40 Δ*cpx* 构建成功。

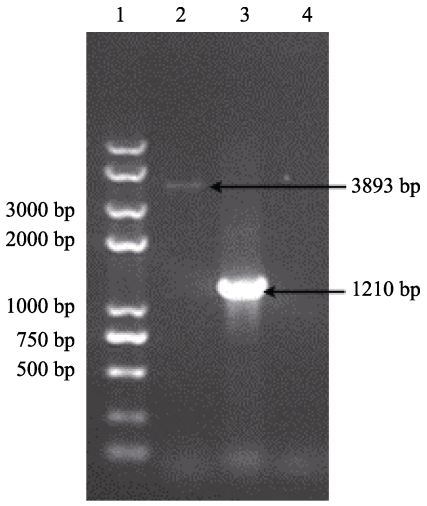

图 1　LSE40Δ*cpx* 突变株的鉴定

Fig. 1　Identification of LSE40Δ*cpx* mutant

1.Trans 2K PlusII DNA 标记; 2. 以 LSE40 基因组为模板 PCR 扩增; 3. 以 Δ*cpx* 突变株基因组为模板 PCR 扩增; 4. 阴性对照

1. Trans 2K PlusII DNA Maker; 2. PCR amplification using LSE40 genome as a template; 3. PCR amplification using Δ*cpx* genome as a template; 4. negative control

2.2　毒力检测

用迟缓爱德华氏菌浸泡感染蓝曼龙，一周后野生型和 Δ*cpx* 组的死亡率为分别 30%和 20%, Δ*cpx* 毒力有所降低。肌肉注射感染蓝曼龙，两周后的累计死亡率见表 2，野生型 LSE40 和 Δ*cpx* 的半数致死量 LD_{50} 分别是 1.18×10^5 cfu/mL 和 8.6×10^5 cfu/mL, Δ*cpx* 的 LD_{50} 比野生株提高了 7.33 倍。

表 2　肌肉注射攻毒的蓝曼龙累积死亡统计

Tab. 2　Accumulated mortality of *Trichogaster trichopterus* after intramuscular injection

菌株	攻毒浓度 (cfu/mL)	累计死亡率 (%)	LD_{50} (cfu/mL)
LSE40	1.18×10^4	12.5	1.18×10^5
	1.18×10^5	37.5	
	1.18×10^6	100	
	1.18×10^7	100	
Δ*cpx*	2.05×10^4	12.5	8.6×10^5
	2.05×10^5	12.5	
	2.05×10^6	62.5	
	2.05×10^7	100	

2.3　细菌在鱼体内的生存

以约 10^5 cfu/mL 浓度的 LSE40 和 Δ*cpx* 菌液肌肉注射感染鱼，定时检测鱼感染内的细菌数量。结果如图 2 所示，注射感染, Δ*cpx* 在蓝曼龙肝脏中的检出数量低于野生株 LSE40。

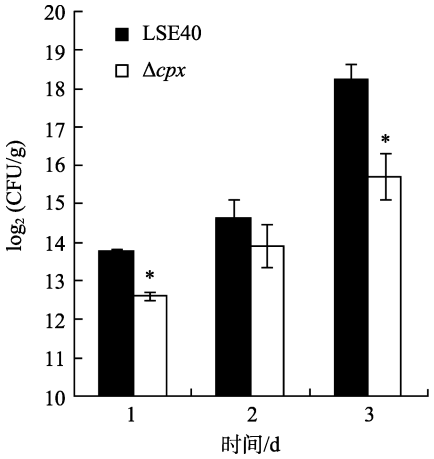

图 2　细菌在蓝曼龙肝脏内的存活

Fig. 2　Bacterial recovery in liver of blue guorai (*Trichogaster trichopter*)

*. $P<0.05$

3　讨论

革兰氏阴性细菌的 Cpx 双组分调控系统被认为参与细菌生理和毒力的调控网络中，它可以调控许多毒力相关基因的表达，进而影响致病菌的毒力[21]。例如，假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)的 Cpx 系统能够调控 T3SS 效应蛋白 Yops 向宿主真核细胞的转运，影响细菌的黏附入侵和抵抗淋巴细胞吞噬过程[11]；鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)去除 *cpxA* 信号接收结构域后对真核细胞的黏附和入侵能力下降[12]；嗜肺性军团病杆菌(*Legionellapneumophila*)的 CpxR 能够直接激活 *icm-dot* 家族相关基因的转录，帮助细菌抵抗巨噬细胞攻击和进行胞内增殖[13]；杜克嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)Cpx 的激活减弱了细菌在感染人皮肤时形成丘疹和脓疱的能力[16]等。

为了明确迟缓爱德华氏菌 Cpx 在毒力中的功能，本研究利用框内基因缺失突变技术，缺失了迟缓爱德华氏菌 LSE40 *cpx* 基因簇 16-2697 bp 的片段，构建了 *cpx* 基因簇缺失突变株 Δ*cpx*。细菌的毒力包括侵染力和产毒力，迟缓爱德华氏菌感染与致病过程体现在与宿主细胞相互作用的过程，它通过黏附、侵入、生长繁殖、抵抗宿主免疫反应、产生毒素等阶段最终达到感染宿主的目的。与野生型相比，突变株

Δ*cpx* 在浸泡攻毒和肌肉注射攻毒途径中的毒力降低，表明 Cpx 对迟缓爱德华菌的侵染力和产毒力均有影响。巨噬细胞的“呼吸爆发”是一种宿主自然免疫杀伤机制，巨噬细胞吞噬细菌后利用强氧化环境介导对细菌的免疫杀伤作用。迟缓爱德华氏菌能够在宿主的上皮细胞和巨噬细胞中存活从而躲避宿主自然免疫的杀伤[7]。突变株 Δ*cpx* 在蓝曼龙体内的生存力下降，在后续实验中观察到 Δ*cpx* 对 H_2O_2 的敏感性增强，作者推测 Cpx 对迟缓爱德华氏菌在宿主体内的存活能力有影响。*cpx* 对迟缓爱德华菌侵染和致病过程起作用，可能参与对迟缓爱德华氏菌毒力的调控。

迟缓爱德华氏菌的感染与致病过程由多种致病因子参与，例如，T3SS、T6SS、密度感应系统、双组分调控系统、多种细胞毒素和胞外酶等[2]，Cpx 可能调控这些致病因子的表达，作者下一步将在这些方面展开工作。本研究结果有助于深入了解 Cpx 双组分调控系统对迟缓爱德华氏菌毒力的调控机理，发现防控迟缓爱德华氏菌的新方法。

参考文献:

[1] Mohanty B R, Sahoo P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. J Biosci, 2007, 32(7): 1331-1344.

[2] Janda J M, Abbott S L, Kroske-Bystrom S, et al. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 1998-2001.

[3] Wang B, Mo Z L, Xiao P, et al. EseD, a putative T3SS translocon component of *Edwardsiella tarda*, contributes to virulence in fish and is a candidate for vaccine development[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12: 678-685.

[4] Tan Y P, Zheng J, Tung S L, et al. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence[J]. Microbiology, 2005, 151: 2301-2313.

[5] Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes[J]. Microbiology-Sgm, 2008, 154: 1570-1583.

[6] Mohanty B R, Sahoo P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. J Biosci, 2007, 32(7): 1331-1344.

[7] Leung K Y, Siame B A, Tenkink B J, et al. *Edwardsiella tarda*–virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen[J]. Microbes and Infection, 2011, 14 (2012): 26-34.

[8] McEwen J, Silverman P. Chromosomal mutations of *Escherichia coli* that alter expression of conjugative plasmid functions[J]. P Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 513-517.

[9] Raivio T L. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial Pathogenesis[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(5): 1119-1128.

[10] Marijuán P C, Navarro J, del Moral R. On prokaryotic intelligence: Strategies for sensing the environment[J]. Biosystems, 2010, 99 (2): 94-103.

[11] Carlsson K E, Liu J, Edqvist P J, et al. Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp.-eukaryotic cell contact[J]. Infect Immun, 2007, 75 (9): 4386-4399.

[12] Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, et al. Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella entetica* serotype typhimurium[J]. Infection and Immunity, 2004, 72 (8): 4654-4661.

[13] Altman E, Segal G. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila icm/dot* components as well as new translocated substrates[J]. J Bacteriol, 2008, 190 (6): 1985-1996.

[14] Gal-Mor O, Segal G. Identification of CpxR as a positive regulator of *icm* and *dot* virulence genes of *Legionella pneumophila*[J]. J Bacteriol, 2003, 185 (16): 4908-4919.

[15] Herbert E E, Cowles K N, Goodrich-Blair H. CpxRA regulates mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus nematophila*[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73 (24): 7826-7836.

[16] Spinola S M, Fortney K R, Baker B, et al. Activation of the CpxRA system by deletion of *cpxA* impairs the ability of *Haemophilus ducreyi* to infect humans[J]. Infect Immun, 2010, 78 (9): 3898-3904.

[17] Rubires X, Saigi F, Pique N, et al. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the rfb-50 mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives[J]. J Bacteriol, 1997, 179 (23): 7581-7586.

[18] Edwards R A, Keller L H, Schifferli D M. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression[J]. Gene, 1998, 207 (2): 149-157.

[19] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase

chain-reaction[J]. Gene, 1989, 77 (1): 51-59.
[20] 杨茂成. 兽医统计学[M]. 北京: 中国展望出版社, 1990: 232-234.
[21] Vogt S L, Raivio T L. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response[J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 326: 2-11.

Impact of Cpx on the virulence of *Edwardsiella tarda*

PAN Hai-jian[1,2], HAO Bin[1,2], LI Jie[1,3], LI Gui-yang[1,3], XIAO Peng[1], MO Zhao-lan[1,3]
(1. Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: May,14,2012
Key words: *Edwardsiella tarda*; Cpx; virulence

Abstract: *Edwardsiella tarda* is a gram-negative bacterium that can cause edwardsiellosis diseases in marine and fresh water fish, resulting in considerable economic losses in aquaculture. Function of the Cpx (conjugative plasmid expression)regulatory system in *E.tarda* is not clarified. In this study, the *cpx* cluster in-frame deletion mutant was constructed from *E. tarda* LSE40 and its virulence was determined. The blue guorami fish *Trichogaster trichopterus* was infected with wild-type or Δ*cpx* mutant by immersion or intramuscular injection (i.m.). In the immersion route, virulence of the Δ*cpx* mutant showed certain defect compared with wild-type strain; in the i.m. route, the Δ*cpx* mutant exhibited 7.33-fold decrease with a median lethal dose of 8.6×10^5 cfu/mL. Bacterial counts in the liver of fish i.m. infected with the Δ*cpx* mutant were evidently lower than the fish infected the wild-type strain. These results indicated that Cpx was involved in the virulence of *E. tarda*.

(本文编辑: 谭雪静)