

鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因缺失株体外生物学特性和对小鼠致病性分析

程鹏博^{1,2}, 陆灏¹, 曹超越¹, 蒋南¹, 张丽丽¹, 赵月峨¹, 鹿建春¹, 周冬生¹, 胡凌飞¹, 杨文慧¹

摘要: 目的 探索 *caf1* 基因缺失对鼠疫耶尔森菌体外生物学特性与对小鼠致病性的影响。方法 利用 CRISPR/Cas12a 介导的基因编辑技术构建鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因缺失株, 并通过 PCR 技术对 *caf1* 基因缺失验证。比较鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因缺失株和野生株 201 在生长速率、液体培养状态、聚集情况等体外生物学特性和对小鼠致病性等方面的差异。结果 PCR 扩增结果证实, *caf1* 基因缺失株构建成功。体外生物学特征分析表明, 与野生株相比, *caf1* 基因缺失株的形态学和生长速率并未发生明显变化, 自凝聚率升高。肺递送途径 LD₅₀ 分析表明, *caf1* 的缺失导致鼠疫耶尔森菌气溶胶感染小鼠半数致死剂量显著降低。结论 不同途径感染结果表明, *caf1* 基因缺失株相较于野生株, 在肺递送、滴鼻、皮下、尾静脉注射 4 种途径下对 BALB/c 小鼠的毒力均降低。*caf1* 基因的缺失导致鼠疫耶尔森菌自凝聚率升高, 对 BALB/c 小鼠致病性下降。

关键词: 鼠疫耶尔森菌; *caf1* 基因; CRISPR/Cas12a; 毒力; 自凝聚率

中图分类号: R378.61

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2020)08-0605-06

Analysis of biological characteristics and pathogenicity of *caf1* deletion mutant strain of *Yersinia pestis*

CHENG Peng-bo^{1,2}, LU Hao¹, CAO Chao-yue¹, JIANG Nan¹, ZHANG Li-li¹, ZHAO Yue-e¹, LU Jian-chun¹, ZHOU Dong-sheng¹, HU Ling-fei¹, YANG Wen-hui¹

(1. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
2. Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: To explore the effect of the *caf1* gene deletion on biological characteristics and pathogenicity of *Y. pestis*. A *caf1* deletion strain of *Y. pestis* was constructed using CRISPR/Cas12a based gene editing method, and the deletion of *caf1* was confirmed by PCR. The *in-vitro* biological characteristics (including morphology, growth rate, aggregation rate) and virulence of *caf1* deletion mutant strain were determined and compared with those of wild type strain. PCR results showed that *caf1* deletion mutant strain was successfully constructed. The morphology and growth rate of the mutant strain did not change significantly compared with those of the wild strain. Compared with the wild strain, the *caf1* deletion mutant strain can gather and deposit from the liquid medium more quickly. LD₅₀ analysis showed that the lethal dose of *caf1* deletion mutant strain to mice infected via aerosol route reduced significantly. Furthermore, the virulence of *caf1* deletion mutant strain to mice was significantly reduced compared with that of wild type strain infected via intratracheal inoculation, nasal drops, subcutaneous and tail vein injections routes. The deletion of *caf1* gene enhances the aggregation rate of *Y. pestis*, but reduce the virulence of *Y. pestis* to mice.

国家重点研发计划资助项目(No.2017YFC1200402)

通讯作者: 杨文慧, Email: fionyoung@163.com;

ORCID: 0000-0001-8836-0278

胡凌飞, Email: huling03@163.com;

ORCID: 0000-0001-7287-6800

作者单位: 1. 军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071;

2. 安徽医科大学, 合肥 230032

Keywords: *Yersinia pestis*; *caf1* gene; CRISPR/Cas12a; toxicity; coherency

Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFC1200402)

Corresponding authors: Yang Wen-hui, Email: fionyoung@163.com; Hu Ling-fei, Email: huling03@163.com

鼠疫耶尔森菌是引起烈性传染病鼠疫的病原菌,可以通过蚤类在鼠与鼠之间,鼠与人之间传播,或通过气溶胶在人与人之间传播肺鼠疫^[1]。自20世纪80年代以来,鼠疫进入了一个活跃时期,自然疫源逐渐扩大,动物间鼠疫重新活跃,人间鼠疫也经常发生^[2]。

现有研究表明,鼠疫耶尔森菌表面的荚膜蛋白抗原因子(fraction F1)是鼠疫耶尔森菌的免疫保护性抗原之一,是由pMT1质粒携带的F1抗原操纵子编码产生。F1抗原操纵子包括是`caf1M`(编码分子伴侣)、`caf1A`(锚定蛋白)和`caf1`(编码F1抗原)3个基因,此外,还有一个调控基因`caf1R`^[3]。`F1`抗原操纵子位于与编码噬菌体T3连接酶基因高度同源的ORF2、IS100和与霍乱弧菌原噬菌体整合酶高度同源的ORF12之间^[4]。表明F1抗原基因可能通过基因重组水平传递而来。其中`caf1`是F1的结构基因,编码F1抗原的亚单位,其编码的F1抗原是鼠疫耶尔森菌的毒力决定因子之一。F1抗原的主要作用是抗吞噬作用,通过掩盖作用阻断黏附素-受体相互作用,大大减少与吞噬细胞相互作用的细菌数,从而阻断吞噬细胞的吞噬作用^[5]。F1抗原的另一个作用是使被吞噬的鼠疫耶尔森菌存活并繁殖,产生致死量的细菌数,其机制可能是通过表达F1抗原产生的封闭作用完成的^[6]。

鉴于此,本研究对鼠疫耶尔森菌的`caf1`基因进行探讨,以期阐明`caf1`基因的缺失对鼠疫耶尔森菌体外生物学功能的影响,并建立小鼠动物感染模型来比较`caf1`基因缺失株对小鼠毒力的影响。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒及实验动物 鼠疫耶尔森菌201株(田鼠分离株,对人不致病菌,本室保存),质粒pAC-crRNA、pKD46-Cas12a(本室保存),SPF级6到8周龄雌性BALB/c小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006)。

1.1.2 试剂 氨苄西林(MP,美国)、氯霉素(MP,美国)、BHI培养基(BD公司,美国)、LB培养基(实验室自制)、血平板(北京陆桥技术股份有限公司)、DNA Marker DL2,000(TaKaRa BIOTECH公司,大连)、QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen公司,德国)、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen公司,德国)、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase(TaKaRa BIOTECH公司,大连)、Taq DNA polymerase(TaKaRa BIOTECH公司,大连)、T4 poly-

nucleotide kinase(NEB,美国)、10 T4 DNA ligase buffer(NEB,美国)、引物均合成自北京天一辉远生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 手持式液体气溶胶肺递送装置(北京慧荣和科技有限公司),霉菌培养箱MJP-250型(上海精宏实验设备有限公司),UV-8000A型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司),GeneAmp PCR System 9700型PCR仪(美国ABI公司),凝胶成像分析系统(北京君意东方电泳设备有限公司),电泳仪PowerPac 300(BIO RAD公司,美国)。

1.2 方 法

1.2.1 `caf1`基因缺失株的构建 通过前期建立的CRISPR/Cas12a介导的基因编辑方法构建F1抗原编码基因`caf1`的缺失株^[7]。首先合成靶向的crRNA引物`caf1 del crRNA-F`、`caf1 del crRNA-R`(表1),退火克隆到crRNA表达质粒pAC-crRNA上,同时设计并合成重组引物`caf1 del oligo`(表1)。之后将λ Red重组酶及核酸酶Cas12a表达质粒pKD46-Cas12a转入鼠疫耶尔森菌201株,诱导重组酶表达,制备其感受态细胞。向感受态细胞中转入约300 ng靶向`caf1`基因的crRNA表达质粒和500 ng重组oligo,加1 mL LB培养基复苏2 h,40 μL/400 μL梯度涂布于双抗LB平板(氨苄西林60 μg/mL,氯霉素30 μg/mL)培养2天。挑选单菌落到双抗板上划线,PCR(预变性95 °C/5 min;变性94 °C/40 s;退火50 °C/40 s;延伸72 °C/1 min;再延伸72 °C/5 min)、测序筛选重组正确克隆后,在含7%蔗糖的LB平板及42 °C培养丢掉辅助质粒,获得最终的`caf1`基因缺失株,标记为201Δ`caf1`,保藏菌株(BHI培养液含30%甘油,保存于-80 °C)。

表1 实验所用引物

Tab.1 Primers of experiment

引物名称	引物序列(5'-3')
<code>caf1 del crRNA-F</code>	TACTTTACAGATGCCGGGTGATCCGT
<code>caf1 del crRNA-R</code>	GGATCACCCGCAGCATCTGAAAGTATC
<code>caf1 del oligo</code>	TGGATTGGATTATTCGATAGAGGTA- ATATATC
JD- <code>caf1-F</code>	TAACCAATAATCCATATAGATAATAGA
JD- <code>caf1-R</code>	CAACTGCTAATGCGCAGAT TGCAAGTTACCGCCTTGG

1.2.2 `caf1`基因缺失株的鉴定 将获得的基因缺失株201Δ`caf1`和鼠疫耶尔森菌201株进行10 min的热裂解获得其DNA模板,并以表1的JD-`caf1-F`

和 JD-*caf1*-R 作为鉴定引物对 DNA 进行鉴定。通过琼脂凝胶电泳技术,验证基因缺失株 201Δ*caf1* 构建成功。

1.2.3 细菌培养 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 均转接三代培养。接种甘油菌种接种于 20 mL 的 BHI 肉汤中,26 ℃ 200 r/min 培养 36 h 至平台期($OD_{600} \geq 2.5$)后收取菌液,20 倍稀释并转接于 20 mL 的 BHI 肉汤中,26 ℃ 200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 1.0$ 时再次收菌,而后 100 倍稀释转接于 20 mL 的 BHI 肉汤中,26 ℃ 下 200 r/min 培养至对数中期($OD_{600} \approx 1.0$)后转入 37 ℃ 200 r/min 培养 3 h,获得最终培养菌液。

1.2.4 菌落形态观察 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 均通过 1.2.2 所述方法进行培养,随后采用分区划线法,将菌液接种于血平板,26 ℃ 培养 72 h,最后观察比较 2 株菌在血平板上的菌落形态。

1.2.5 生长曲线测定 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 参照 1.2.2 所述方法培养至第二代,同等比例转接第三代后在 26 ℃ 下 200 r/min 持续培养,并在培养后的第 0~36 h 内每 2 h 取 1 次 200 μL 的菌液,菌液样本使用终浓度为 5% 的甲醛固定,取样结束后用紫外分光光度计测定所有菌液样本的吸光值(600 nm),绘制生长曲线。实验共重复 3 次,取平均值。

1.2.6 菌株自凝聚率测定 将培养好的鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 菌液以 3 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,然后悬垂于生理盐水中,以生理盐水为空白对照,调节菌液使之在 600 nm 波长下 OD 值约为 1.0,记为 OD_1 。取 5 支型号一致的试管,每支试管加入 2 mL 调整好浓度的同一株菌的菌悬液,分别室温静置 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h,然后各吸取 200 μL 上层溶液测得其 OD_{600} 吸光值,重复 3 次,取平均值,记为 OD_2 。通过不同时间吸光值的差异,可分别计算出 2 株菌的自凝聚率,计算公式如下:

$$\text{菌株自凝聚率} = (OD_2 / OD_1) \times 100\%$$

1.2.7 气溶胶肺递送途径感染小鼠 LD₅₀ 测定 使用含有 0.05% 泊洛沙姆的生理盐水将菌液配制成为理论感染剂量(2 000 CFU/50 μL、500 CFU/50 μL、200 CFU/50 μL、100 CFU/50 μL、50 CFU/50 μL、25 CFU/50 μL、10 CFU/50 μL、2 CFU/50 μL)。选取 SPF 级 6 到 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 160 只,随机分成 16 组,每组 10 只小鼠。1 到 8 组分别肺

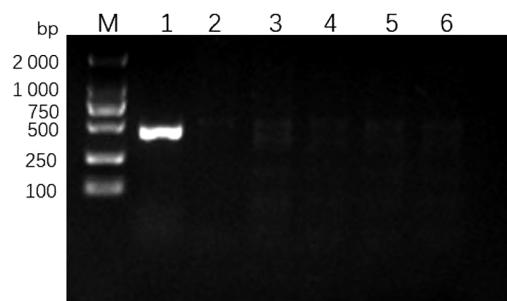
递送不同剂量的鼠疫耶尔森菌 201 株菌液 50 μL,9 到 16 组分别肺递送不同剂量的基因缺失株 201Δ*caf1* 菌液 50 μL。每天观察记录 2 次小鼠发病及死亡情况,连续观察 2 周,根据各感染剂量组小鼠死亡情况分别求出 2 株菌株气溶胶肺递送感染小鼠的半数致死剂量(LD₅₀)。

1.2.8 不同途径感染小鼠生存曲线观察 选取 SPF 级 6 到 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 80 只,随机分成 8 个组,每组 10 只小鼠。使用含有 0.05% 泊洛沙姆的生理盐水将鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 菌液配制成为理论感染剂量 2 000 CFU/50 μL,分别以气溶胶肺递送、滴鼻、腹腔注射、尾静脉注射 4 种途径感染小鼠,每天观察记录 2 次小鼠发病及死亡情况,连续观察 2 周,绘制生存曲线。

1.2.9 统计学分析 在菌株自凝聚率测定实验中,应用 SPSS16.0 软件进行统计分析,同一时间点内比较采用 multivariate 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。在不同途径感染小鼠生存曲线观察实验中,应用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析,并绘制生存曲线,组间比较采用 Log-rank (Mantel-Cox) 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 *caf1* 基因缺失株的鉴定 利用 1.2.1 设计的用于鉴定 *caf1* 基因的上下游引物 JD-*caf1*-F/R 对缺失株和野生株进行菌落 PCR 扩增,扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果显示野生株 *caf1* 基因扩增为阳性,产物长度 416 bp,所有缺失株 *caf1* 基因扩增均为阴性(图 1),表明基因缺失株 201Δ*caf1* 构建成功。



M:DNA ladder maker(M);1:鼠疫耶尔森菌 201 株;2~5:基因缺失株 201Δ*caf1* 株;6:阴性对照

图 1 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201Δ*caf1* 的 *caf1* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR of *Y. pestis* 201 and 201Δ*caf1*

2.2 菌落形态观察 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 接种血平皿培养 72 h 后, 可见二者均长出浅灰色、表面光滑的细小菌落, 菌落形态观察结果无明显差异。

2.3 菌株生长曲线分析 26 ℃ 培养条件下鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 的生长曲线基本一致(图 2)。2 株菌均经历适应期、对数期、稳定期 3 个阶段, 均经过 8 h 适应期后进入对数生长期, 培养 14 h 后进入稳定期。

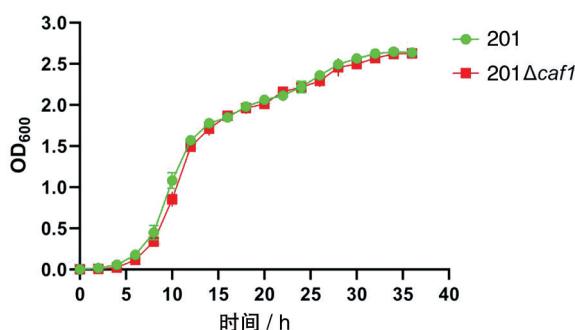


图 2 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Y. pestis* 201 and 201 Δ caf1

2.4 菌株自凝聚率比较 在静置的液体环境中鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 的自凝聚率如图 3 所示, 2 个菌株的自凝聚率呈现出上升趋势。菌液自凝聚率的上升趋势并不是一条直线, 基因缺失株 201 Δ caf1 在 0~2 h 内自凝聚率上升快于鼠疫耶尔森菌 201 株, 在 2~3 h 内自凝聚率上升较慢于鼠疫耶尔森菌 201 株。当静置 3 h 后, 野生株与缺失株的自凝聚率基本不会发生显著性的变化, 维持在 80% 左右。基因缺失株 201 Δ caf1 的自凝聚率高于鼠疫耶尔森菌 201 株, $F_{0.5h} = 89.99, P < 0.05$; $F_{1.0h} = 54.93, P < 0.05$; $F_{1.5h} = 57.60, P < 0.05$, 差异有统计学意义。在 2 h、3 h 时时间点上基因缺失株 201 Δ caf1 的自凝聚率与鼠疫耶尔森菌 201 株的自凝聚率无明显差异, 提示 *caf1* 基因缺失影响鼠疫耶尔森菌早期自凝聚率。此实验重复 3 次, 实验结果一致。

2.5 气溶胶肺递送途径感染小鼠 LD₅₀ 比较 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 通过气溶胶肺递送途径感染 BALB/c 小鼠, 根据各感染剂量组小鼠死亡情况绘制出生存曲线(图 4), 并使用 Reed-Muench 法求出两株菌气溶胶肺递送感染 BALB/c 小鼠的 LD₅₀。计算结果鼠疫耶尔森菌 201 株的 LD₅₀ 为 14 CFU/只, 基因缺失株 201 Δ caf1 的

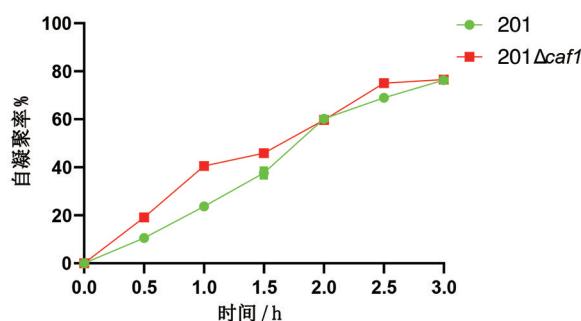


图 3 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 不同时间的自凝聚率图

Fig.3 Coherency of *Y. pestis* 201 and 201 Δ caf1

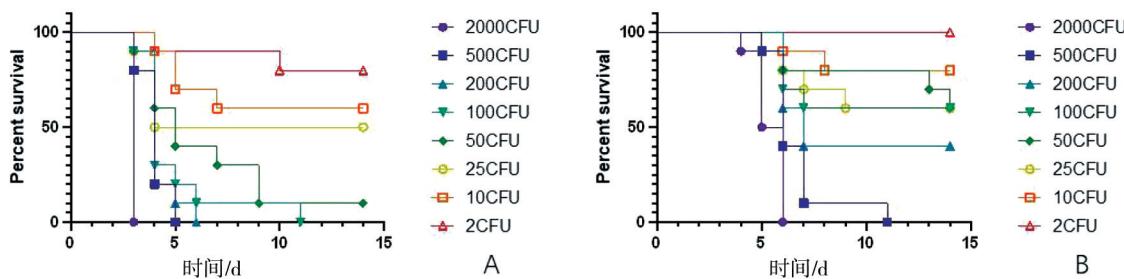
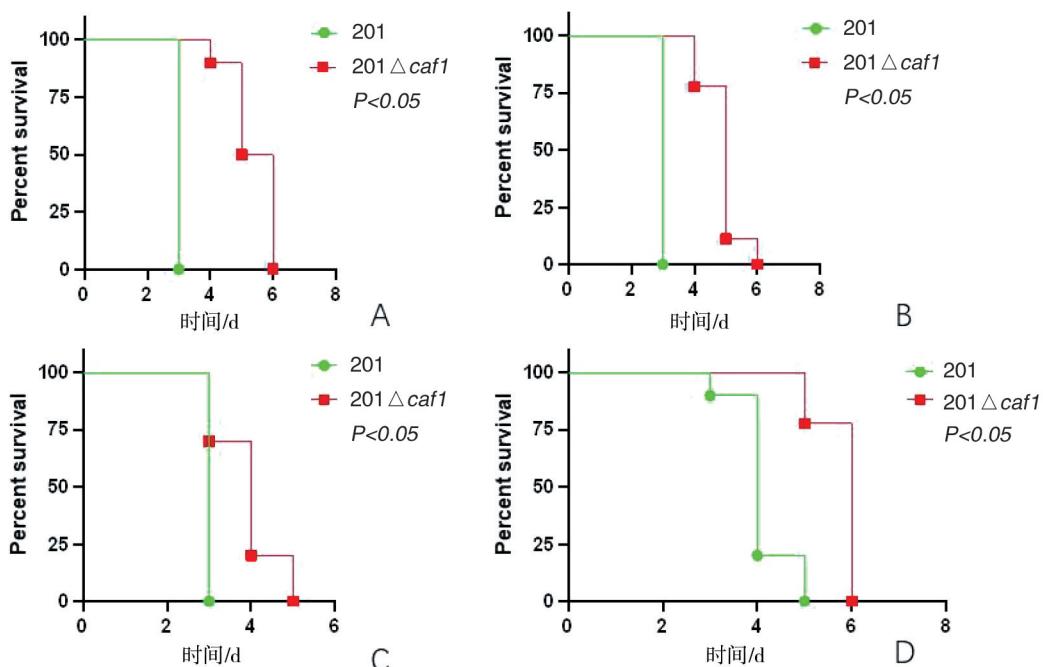
LD₅₀ 为 82 CFU/只, 缺失株 LD₅₀ 约是野生株的 6 倍。由此可见, *caf1* 基因的缺失引起了鼠疫耶尔森菌气溶胶途径感染小鼠毒力的下降。

2.6 不同途径小鼠感染试验 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 分别以气溶胶肺递送、滴鼻、皮下注射、尾静脉注射途径对 BALB/c 小鼠进行 2 000 CFU/50 μ L 剂量的感染, 由生存曲线图可知 BALB/c 小鼠全部死亡(图 5), 但每个途径缺失株的全部死亡时间均晚于鼠疫耶尔森菌 201 株。通过 4 种途径下的鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ caf1 的生存曲线比较可知, 基因缺失株死亡时间与野生株相比气溶胶肺递送途径($\chi^2 = 19.0, P < 0.05$)、滴鼻途径($\chi^2 = 18.0, P < 0.05$), 皮下注射途径($\chi^2 = 10.23, P < 0.05$), 尾静脉注射途径($\chi^2 = 15.31, P < 0.05$), 提示 *caf1* 基因缺失影响鼠疫耶尔森菌通过 4 种不同途径感染小鼠的毒力。

3 讨 论

CRISPR-Cas 系统, 即成簇的规律间隔的短回文重复序列簇 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR associated protein, Cas), 广泛存在于细菌和古生菌基因组中^[8], 作为一种获得性免疫系统来有效地抵抗噬菌体和外界各种基因原件造成的干扰。利用 CRISPR-Cas 系统, 构建靶向 crRNA 引导 Cas 核酸酶对靶点进行剪切产生双链断裂, 则可对基因组进行剪切^[9]。本研究利用 CRISPR-Cas12a 系统结合噬菌体蛋白重组系统成功构建了应用于鼠疫耶尔森菌的基因编辑体系, 用于鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因敲除。

成功获得鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因缺失株后, 本研究探讨了 *caf1* 基因的缺失对鼠疫耶尔森菌生长曲线、菌落形态、自凝聚率等生物学特性的影响。

图 4 鼠疫耶尔森菌 201 株(A)与基因缺失株 201 Δ *caf1*(B)气溶胶肺递送感染小鼠生存曲线图Fig.4 Survival curves of *Y. pestis* 201 and 201 Δ *caf1*

A:气溶胶肺递送途径;B:滴鼻途径;C:皮下注射途径;D:尾静脉注射途径

图 5 鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ *caf1* 株 4 种途径感染小鼠生存曲线图Fig.5 Four ways of survival curves of *Y. pestis* 201 and 201 Δ *caf1*

通过比较鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ *caf1* 的生长曲线和菌落形态,发现 2 株菌没有明显差异,表明 *caf1* 基因的缺失并不影响鼠疫耶尔森菌的生长曲线和菌落形态。但在 2 h 以内因缺失株 201 Δ *caf1* 的自凝聚率比鼠疫耶尔森菌 201 株的高,在 3 h 后自凝聚率趋于一致,表明 *caf1* 基因的缺失影响鼠疫耶尔森菌的自凝聚率。有研究表明微生物的聚集作用与微生物产生的胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)密切相关,对微生物聚集体结构的形成和维持起着至关重要的作用^[10]。当不同类型的 EPS 或 EPS 中的某些成分比例发生变化时,微生物之间的聚集性会出现变化^[11]。而 F1 蛋白作为 EPS 的组成成分时,在基因缺失株 201 Δ *caf1* 不能合成 F1 蛋白的情况下,

EPS 的成分和结构均发生了变化。从而影响了基因缺失株 201 Δ *caf1* 的自凝聚率的变化和聚集体的稳定。与本实验结果相符,当 *caf1* 基因缺失后自凝聚率在短期内升高,在 3 h 后缺失株与野生株的自凝聚率基本一致,推测是由于微生物聚集体在重力作用的影响下出现沉淀现象导致自凝聚率的升高。

随后本研究对 *caf1* 基因的缺失是否引起鼠疫耶尔森菌毒力的变化进行了验证。首先,使用气溶胶肺递送途径对 BALB/c 小鼠进行鼠疫耶尔森菌 201 株与基因缺失株 201 Δ *caf1* 的感染,结果表明缺失株 LD₅₀ 是野生株的约 6 倍,可见 *caf1* 基因的缺失引起了鼠疫耶尔森菌毒力在气溶胶肺递送感染小鼠模型上的下降。其次,本研究通过肺递送、滴鼻、

皮下、尾静脉注射 4 种途径中给予小鼠绝对致死量的鼠疫耶尔森菌,结果表明基因缺失株 201 Δ caf1 死亡时间均晚于鼠疫耶尔森菌 201 株。在这 4 种途径下 BALB/c 小鼠对于基因缺失株 201 Δ caf1 的敏感度降低。目前已知鼠疫耶尔森菌中由 F1 抗原和由低钙反应质粒编码的Ⅲ型分泌系统共同完成的抗吞噬作用^[12],当缺失Ⅲ型分泌系统的菌株失去 F1 抗原后,被吞噬的鼠疫耶尔森菌会增加 6 倍,当缺失 F1 抗原的菌株失去Ⅲ型分泌系统后,被吞噬的鼠疫耶尔森菌会增加 14 倍,当两者均缺失时吞噬率会增加 18 倍^[13]。虽然 F1 抗原有抗吞噬作用,但 F1 抗原不是必须的毒力因子,F1 抗原基因的缺失并不能明显降低不同动物模型的半数致死量^[14]。与本实验结果相符,BALB/c 小鼠对于基因缺失株 201 Δ caf1 的敏感性降低,LD₅₀升高 6 倍。

本实验构建了基因缺失株 201 Δ caf1,并对其从基因水平进行鉴定。通过生物学功能实验,我们发现基因缺失株 201 Δ caf1 和鼠疫耶尔森菌 201 株在相同的培养条件下菌落形态和生长速率上无明显差异,自凝聚率有所升高。而且 BALB/c 小鼠对基因缺失株 201 Δ caf1 的敏感性降低,LD₅₀也有所升高。本研究基于 CRISPR/Cas12a 方法构建了基因缺失株 201 Δ caf1,证实该基因参与细菌的自凝聚过程和致病过程。在此基础上我们将进一步通过研究 caf1 基因,以便更加深入的研究诠释 F1 蛋白的生物学功能。

利益冲突:无

引用本文格式:程鹏博,陆灏,曹超越,等.鼠疫耶尔森菌 caf1 基因缺失株体外生物学特性和小鼠致病性分析[J].中国人兽共患病学报,2020,36(8):605-610. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.102

参 考 文 献:

- [1] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague [J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 35-66. DOI:10.0000/PMID8993858
- [2] Zhou D, Han Y, Yang R. Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology[J]. Microbes Infect, 2006, 8(1): 273-284. DOI:10.1016/j.micinf.2005.06.006
- [3] Titball RW, Howells AM, Oyston PCF, et al. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an aroA mutant of *Salmonella typhimurium* induces high level protection against plague[J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1926. DOI:10.1007/BF02113615
- [4] Protsenko OA, Anisimov PI, Mozharov OT, et al. Detection and characterization of the plasmids of the plague microbe which determine the synthesis of pesticin I, fraction I antigen and "mouse" toxin exotoxin[J]. Genetika, 1983, 19(7):1081.
- [5] Zavialov AV, Batchikova NV, Korpela T, et al. Secretion of Recombinant Proteins via the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1805-1814. DOI:10.1128/AEM.67.4.1805-1814.2001
- [6] 胡源,俞东征,海荣.鼠疫菌最大质粒的研究进展[J].中国媒介生物学及控制杂志,2003,14(2): 154-157. DOI 10.3969/j.issn.1003-4692.2003.02.031
- [7] Yan MY, Yan HQ, Ren GX, et al. CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(17):e00947-17. DOI:10.1128/AEM.00947-17
- [8] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2015,13(11):722-736. DOI:10.1038/nrmicro3569
- [9] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges[J]. Hum Mol Genet, 2014,23(R1):R40-46. DOI:10.1093/hmg/ddu125
- [10] 汪霞.好氧反硝化菌 Enterobacter sp. FL 的脱氮及自聚集特性研究[D].重庆:重庆大学,2017.
- [11] Zhang P, Fang F, Chen Y P, et al. Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation[J]. Chemosphere, 2014, 117: 59-65. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.05.070
- [12] Zhou D, Yang R. Molecular Darwinian Evolution of Virulence in *Yersinia pestis*[J]. Infect Immun, 2009, 77(6):2242-2250. DOI:10.1128/IAI.01477-08
- [13] Yidong D, Roland R, Ake F. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis[J]. Infect Immun, 2002, 70(3): 1453-1460. DOI: 10.1128/IAI.01477-08
- [14] Davis KJ, Fritz DL, Pitt ML, et al. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*)[J]. Arch Pathol Lab Med, 1996, 120(2): 156-163. DOI: 10.1016/0009-8981(95)06169-X

收稿日期:2019-12-31 编辑:张智芳