

## 研究报告

鲍曼不动杆菌无痕基因敲除及 *hcp* 基因相关功能

董俊芳 王萍 刘存伟 邹清华\*

北京大学医学部基础医学院病原生物学系 北京 100191

**摘要:**【背景】鲍曼不动杆菌耐药严重, 基因敲除是研究细菌毒力与耐药的重要方式。但现有的大部分细菌基因敲除方法基于抗生素抗性筛选, 导致不适用于多重耐药菌株的基因敲除。【目的】旨在建立一种非依赖于抗生素抗性筛选的方法, 用于敲除多重耐药鲍曼不动杆菌基因。【方法】运用同源重组和自杀载体 pMo130-TelR 对亚碲酸钾的抗性, 使用两步筛选法, 构建鲍曼不动杆菌 VI 型分泌系统溶血素共调节蛋白(Hemolysin-Coregulated Protein, Hcp)基因敲除突变体, 并对缺失株的生长能力、细菌竞争能力以及血清抵抗能力进行测试。【结果】通过构建含同源片段的重组 pMo130-TelR 载体, 成功敲除了鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 17978 中的 *hcp* 基因, 获得了 ATCC 17978 *hcp* 基因缺失突变体。突变体生长能力没有显著改变, 但细菌竞争能力显著下降, 血清抵抗能力显著升高。【结论】pMo130-TelR 可成功用于鲍曼不动杆菌无痕基因敲除, 对于研究鲍曼不动杆菌的耐药机制等相关问题具有深远意义。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌, 多重耐药, 无痕基因敲除

## Marker-less gene deletion and the function of *hcp* gene in *Acinetobacter baumannii*

DONG Junfang WANG Ping LIU Cunwei ZOU Qinghua\*

Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

**Abstract:** [Background] *Acinetobacter baumannii* is highly resistant to antibiotics. Gene knockout is an important way to study the virulence and antibiotic resistance of *A. baumannii*. Currently, most gene knockout methods rely on the use of an antibiotic selection marker and are not suited for multidrug resistant strains. [Objective] This study aims to establish a marker-less gene deletion method to knock out the genes of multidrug resistant *A. baumannii* for subsequent experiments. [Methods] We used a two-step screening method using homologous recombination and the resistance of pMo130-TelR to potassium tellurite to construct the type VI secretion system *hcp* gene deletion mutant of *A. baumannii*. Then we tested the growth ability, bacterial competition ability and serum resistance of the mutant strain. [Results] By constructing a tellurite-resistant suicide vector inserted with recombinant fragment, pMo130-TelR-(*hcp* up-down), we successfully knocked out the *hcp* gene in *A. baumannii*. There were no significant changes

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81572041)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

Received: 22-04-2020; Accepted: 13-06-2020; Published online: 23-10-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81572041)

\*通信作者: Tel: 010-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-22; 接受日期: 2020-06-13; 网络首发日期: 2020-10-23

in the growth ability of mutants, in contrast, the bacterial competitive ability decreased and the serum resistance increased significantly. **[Conclusion]** The marker-less gene deletion method using pMo130-TelR is applicable for creating gene deletion mutants in *A. baumannii*. It will be very useful in multidrug resistant *A. baumannii* gene deletion and will have profound significance for *A. baumannii* research such as the antibiotic-resistance mechanism.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, marker-less gene deletion

鲍曼不动杆菌是一种非发酵革兰氏阴性细菌，是引起医源性血流感染的常见病原菌，也是 ICU 最常见的细菌<sup>[1]</sup>。近年来，多重耐药特别是耐喹诺酮类、氨基糖苷类和碳青霉烯类药物的鲍曼不动杆菌逐年增加，不仅严重限制了临床病人用药的选择，而且对感染的预防控制提出了巨大的挑战<sup>[2]</sup>。

基因敲除是目前生物学领域解决问题常用的方法，是研究鲍曼不动杆菌毒力及耐药性的重要方式。本实验室已经建立了利用 Red 重组系统敲除细菌相关基因的方法<sup>[3-4]</sup>，但该方法基于一系列抗生素抗性筛选获得基因突变株，若目标菌株为多重耐药菌株，则该方法并不适用。有研究利用无抗性标记方法进行假伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌的多个基因敲除<sup>[5]</sup>，但该方法在鲍曼不动杆菌中的应用尚未建立。

VI 型分泌系统(Type VI Secretion System, T6SS)是革兰氏阴性细菌中广泛存在的毒力系统，在细菌竞争中发挥了重要作用。有 T6SS 的细菌可

通过直接接触将效应因子注入临近细菌导致其死亡，实现自我保护，研究 T6SS 对阐述鲍曼不动杆菌的毒力和耐药性至关重要。T6SS 核心组分 *hcp* 基因编码的 Hcp 蛋白被认为是 T6SS 活性的标志<sup>[6]</sup>。本研究以鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 17978 为研究对象，利用 pMo130-TelR 质粒来完成鲍曼不动杆菌 T6SS 中 *hcp* 基因的敲除，为后续鲍曼不动杆菌致病性及耐药机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 17978 由中国人民解放军疾病预防控制中心陈勇老师惠赠，质粒 pMo130-TelR 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司，大肠杆菌 DH5α 和质粒 pRK2013 由本实验室保存，质粒 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)和鲍曼不动杆菌 ATCC 17978  $\Delta$ *hcp* 为本研究构建，如表 1 所示。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Bacteria strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strain/Plasmid	特征 Characteristic	来源 Source
ATCC 17978	鲍曼不动杆菌标准株, CHL 抗性 <i>A. baumannii</i> type strain, CHL <sup>R</sup>	由中国人民解放军疾病预防控制中心陈勇老师惠赠 Presented by Mr. Chen Yong, Disease Control and Prevention center of the Chinese People's Liberation Army
DH5α	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	本实验室保存 Lab collection
ATCC 17978 $\Delta$ <i>hcp</i>	<i>hcp</i> 基因敲除的 ATCC 17978 17978 <i>hcp</i> gene knock out mutant	本实验构建 This study
pMo130-TelR	Km 抗性, Tel 抗性 Km <sup>R</sup> , Tel <sup>R</sup>	购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司 Purchased from Beijing Zoman Biotechnology Company Limited
pMo130-TelR-( <i>hcp</i> up-down)	带有 <i>hcp</i> 上下游各 500 bp 同源片段的 pMo130-TelR PMo130-TelR containing 500 bp homologous fragments upstream and downstream of <i>hcp</i>	本实验构建 This study
pRK2013	Km 抗性 Km <sup>R</sup>	本实验室保存 Lab collection

1.2 主要试剂和仪器及培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒, Axygen 生物公司; 限制性内切酶、*Pfu* Buffer Mix、10×K Buffer、10×T4 DNA Ligase Buffer, 宝生物工程(大连)有限公司; 氯霉素(Chloramphenicol, CHL)和亚碲酸钾(Potassium Tellurite, Tel), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 热循环仪, Eppendorf 公司; 稳压稳流电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪和 iMark 酶标仪, Bio-Rad 公司; 台式低温高速离心机, Heraeus 公司; 恒温水浴箱, 北京市医疗设备总厂; NanoDrop 2000 超微量紫外/可见分光光度计, Thermo 公司。

YT 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 无标记敲除 *hcp* 基因

1.3.1 引物

根据 NCBI 公布的鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 的全基因组序列(ATCC 17978-mff NZ\_CP012004.1), 查找所需敲除靶基因的位置, 选取了其上、下游各 500 bp 设计 Hcp Up/Down 引物, 并分别在引物 Hcp Up F 和 Hcp Down R 的 5'端加上 *Not* I

和 *Bam*H I 酶切位点。鉴定引物选取 *hcp* 基因内部 307 bp 序列及 pMo130-TelR 上、下游片段插入位点两侧特异引物, 引物序列如表 2 所示。

1.3.2 扩增 *hcp* 基因上、下游片段

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 ATCC 17978 基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 以 Hcp Up (*Not* I ) F/Hcp Up R 或 Hcp Down F/Hcp Down (*Bam*H I ) R 引物对为引物, 用 *Pfu* Buffer Mix 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 模板 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2×*Pfu* Buffer Mix 10 μL, 去离子水 7 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。

1.3.3 *hcp* 上、下游片段搭桥

以上述 *hcp* 上、下游各 500 bp 的 PCR 产物为模板, 以 Hcp Up (*Not* I ) F/Hcp Down (*Bam*H I ) R 引物对为引物, 用高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和 PCR 反应条件同 1.3.2。并用胶回收试剂盒对目的片段进行回收。

1.3.4 质粒及搭桥片段的连接和转化

利用质粒提取试剂盒提取 pMo130-TelR 质粒, 用 *Not* I 和 *Bam*H I 对质粒和 1.3.3 产物进行双酶切, 两者酶切产物纯化后利用 T4 连接酶连接。

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列	产物大小
Primers name	Sequence (5'→3')	Size
Hcp Up ( <i>Not</i> I ) F	ATAAGAATGCGGCCGCATCTAGGTTTCATTCCGTTAGT	500 bp
Hcp Up R	ACTTAAATAATTAGAACTTTCCTATTTTTA	
Hcp Down F	AAAGTTCTAATTATTTAAGTGAATATTTGG	
Hcp Down ( <i>Bam</i> H I ) R	GCGGATCCAATACAACAGGTTTCATATAA	
Hcp jdF	ACAGCAGCATATTTCAAACC	Wild type: 307 bp, Δ <i>hcp</i> mutant: 0 bp
Hcp jdR	CTCATAACATCCGTCAACCT	
pMo130-Tel F	TTTACCACGACCGCATTCTC	插入后 1 216 bp, 未插入时 216 bp PCR product is 216 bp before and 1 216 bp after insert <i>hcp</i> up-down fragment
pMo130-Tel R	AAATAGGCGTATCACGAGGC	

注: 划线片段为酶切位点, 加粗部分为搭桥部

Note: The underlined fragment is the restriction site and the bold part is the bypass fragment

将上述连接产物加入 100  $\mu\text{L}$  的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞中并吹打混匀,冰上放置 30 min; 42  $^{\circ}\text{C}$  热激 1 min, 然后快速将离心管转移至冰上冷却 2 min; 加入 900  $\mu\text{L}$  LB 肉汤混匀后 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 1 h; 培养物浓缩至 100  $\mu\text{L}$  后涂布含有 10  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素和 6  $\mu\text{g/mL}$  亚碲酸钾的 YT 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。

### 1.3.5 三亲本接合转化

将受体菌(ATCC 17978)、供体菌[pMo130-TelR-(*hcp* up-down)]和辅助菌(pRK2013)分别在 LB 肉汤中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 然后按 1:50 转接到 LB 液体培养基中, 180 r/min 振荡培养 3–4 h 后, 调整 3 种菌麦氏浊度单位(McFarland, MCF)为 0.5。各吸取 100  $\mu\text{L}$  混合后点在已准备好的 YT 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜。用 1 mL PBS 冲洗平板上长出的菌, 取 100  $\mu\text{L}$  涂于含有 30  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素和 30  $\mu\text{g/mL}$  亚碲酸钾的 YT 平板上, 筛选转化子。

### 1.3.6 筛选同源重组菌株

利用 pMo130-TelR 上的 *sacB* 基因使得含有该质粒的鲍曼不动杆菌在含 10% 蔗糖的 YT 培养基中不能生长, 从而筛选出没有 pMo130-TelR 质粒的基因缺失株。将鲍曼不动杆菌于 10% 的蔗糖 YT 培养基中连续传代培养(培养 24 h 后按 1:50 转接, 一般传 2–3 代), 梯度稀释后培养获得单菌落, 挑取单菌落分别涂到含 30  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素的 YT 平板、含 30  $\mu\text{g/mL}$  亚碲酸钾的 YT 平板及不含抗生素的 YT 平板上, 选取对亚碲酸钾敏感的菌落进行下一步实验。

### 1.3.7 基因敲除菌株验证

上述消除掉亚碲酸钾抗性的菌株可能为基因敲除株也可能恢复为野生株, 因此利用鉴定引物 PCR 扩增进行菌落鉴定。PCR 反应体系: 模板 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Pfu Buffer Mix 10  $\mu\text{L}$ , 去离子水 7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

### 1.3.8 生长曲线

挑取待测菌株(鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株和上述 1.3.7 验证得到的鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 *hcp* 基因敲除株)用 LB 培养基于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜后, 以 1:60 的接种量转接后培养 4–5 h, 用 LB 稀释到 MCF 为 0.5。96 孔板每孔 200  $\mu\text{L}$  菌液, 每组 3 个复孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养。每 1 h 取出 96 孔板, 测量  $OD_{630}$ , 直到 12 h 实验结束。每个菌株设置 3 个重复。以  $OD_{630}$  为纵坐标、培养时间为横坐标, 统计目标菌株随时间延长而增加的  $OD_{630}$  值, 绘制鲍曼不动杆菌在 LB 中的生长曲线。

### 1.3.9 细菌竞争

挑取鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株和 *hcp* 基因敲除株以及大肠杆菌 DH5 $\alpha$ /pK18mob 单菌落, 接入 LB 肉汤培养基中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 按 10% 的比例转接约 4 h 后调整各菌浊度至 0.5 MCF。按鲍曼不动杆菌:大肠杆菌=10:1 比例混匀 2 种菌, 再取 20  $\mu\text{L}$  混匀的菌液滴到加了 2 mL LB 琼脂的 EP 管中。在 12–16 h 后, 加入 1 mL 生理盐水吹洗琼脂。从 1 mL 清洗液中取 100  $\mu\text{L}$  加入到 900  $\mu\text{L}$  PBS 中进行 10 倍比稀释。取 100  $\mu\text{L}$  稀释液涂板, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。计数 Amp 平板(鲍曼不动杆菌)和 Km 平板(大肠杆菌)菌落数。使用 SPSS 20.0 及 GraphPad Prism 8 对数据进行统计学分析和作图。

### 1.3.10 血清抵抗

挑取鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株和 *hcp* 基因敲除株单菌落于 3 mL LB 肉汤, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 按 1:50 转接后培养 4 h, 调整浊度至 1.5 MCF。取 1 mL 菌液于 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 加入 1 mL PBS 重悬。取 50  $\mu\text{L}$  菌液与 150  $\mu\text{L}$  NHS 混合均匀, 作为血清组; 另取 50  $\mu\text{L}$  菌液与 150  $\mu\text{L}$  PBS 混合均匀, 作为对照组。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 h。取 4 排 EP 管, 每排 6 个, 各加 900  $\mu\text{L}$  PBS, 取 2 组样本(加血清组和对照组)各 100  $\mu\text{L}$ , 10 倍均匀稀释并涂板, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱培

养过夜。次日数单菌落, 计算加血清组和对照组比值。使用 SPSS 20.0 及 GraphPad Prism 8 对数据进行统计学分析和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建含有同源重组片段的 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)及其验证

为了构建含有同源重组片段的 pMo130-TelR 质粒, 首先扩增鲍曼不动杆菌 *hcp* 基因上、下游同源片段, 以鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 基因组 DNA 为模板, 使用引物对 Hcp Up (*Not* I) F/Hcp Up R 及 Hcp Down F/Hcp Down (*Bam*H I) R 扩增 *hcp* 基因上、下游片段, 如图 1A 所示, 1 号孔为 *hcp* 上游 500 bp 片段, 2 号孔为 *hcp* 下游 500 bp 的片段。

然后通过搭桥 PCR 和切胶回收获得 *hcp* up-down 片段。以上述 *hcp* 上、下游 PCR 扩增产物各 1  $\mu$ L 为模板, 使用引物对 Hcp Up (*Not* I) F 和 Hcp Down (*Bam*H I) R 进行 PCR 扩增, 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 1B 所示, 获得大小为 1 000 bp 的同源片段(*hcp* up-down), 对该目的片段切胶回收。

最后将上述获得的 *hcp* up-down 片段以及 pMo130-TelR 质粒用 *Not* I 和 *Bam*H I 酶切后使用 T4 连接酶连接, 所得产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞。挑取其中 4 个转化子提质粒后进行 PCR 验证。pMo130-Tel F/pMo130-Tel R 引物对验证结果如图 1C 所示, 质粒 pMo130-TelR 扩增产物为 216 bp, 而 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)产物为 1 216 bp; Hcp Up (*Not* I) F 和 Hcp Down (*Bam*H I) R 引物对验证结果如图 1D 所示, pMo130 TelR 无 PCR 产物而 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)产物为 1 000 bp。结果显示 4 个转化子里面只有 4 号转化子(图 4 的 1 号菌)成功导入了重组质粒 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)。

### 2.2 接合转化至鲍曼不动杆菌结果验证

为了将 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)质粒转入鲍曼不动杆菌, 通过接合转化的方式将重组载体导

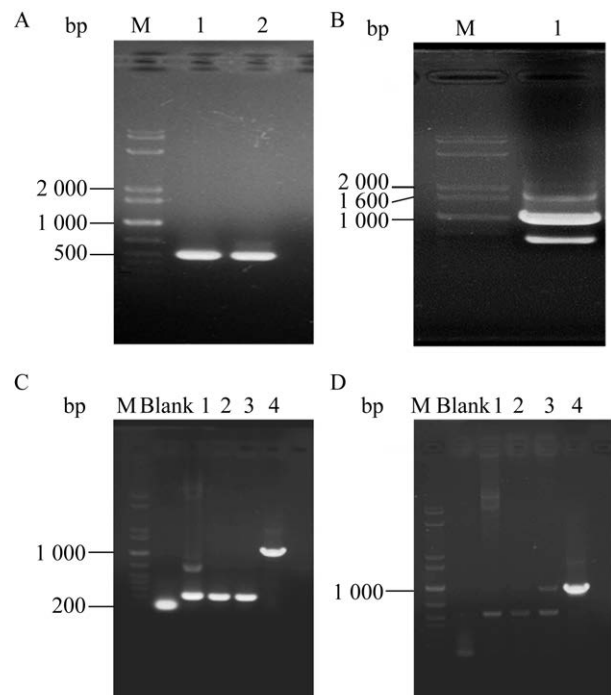


图 1 含有同源重组片段的 pMo130 质粒的构建

Figure 1 Construction of pMo130 plasmid containing homologous recombinant fragment

注: A: PCR 扩增 *hcp* 基因上游及下游片段; B: PCR 获得 *hcp* up-down 片段; C: 重组质粒的验证, 以 pMo130-Tel F 和 pMo130-Tel R 为引物; D: 重组质粒的验证, 以 Hcp Up (*Not* I) F 和 Hcp Down (*Bam*H I) R 为引物

Note: A: PCR amplification of upstream and downstream fragments of *hcp* gene; B: PCR amplification of *hcp* up-down fragments; C: The recombinant plasmids were identified with pMo130Tel F and pMo130Tel R as primers; D: The recombinant plasmids were identified with Hcp Up (*Not* I) F and Hcp Down (*Bam*H I) R as primers

入鲍曼不动杆菌。对在氯霉素-亚碲酸钾 YT 平板上长出的单菌落进行 PCR 验证, 结果如图 2 所示: 第 2、3、4 泳道模板为含 pMo130-TelR-(*hcp* up-down) 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 第 5、6、7 泳道模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株, 第 8、9、10 孔模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 接合转化后转化子。第 2、5、8 泳道引物为 Hcp jdF/Hcp jdR 引物对, 野生株鲍曼不动杆菌中产物为 307 bp, 图 2 中泳道 5、8 为鲍曼不动杆菌; 3、6、9 泳道引物为 Hcp Up (*Not* I) F/Hcp Down (*Bam*H I) R, 野生株鲍曼不动杆菌产物长度为 1 507 bp, 重组载体 pMo130-TelR-

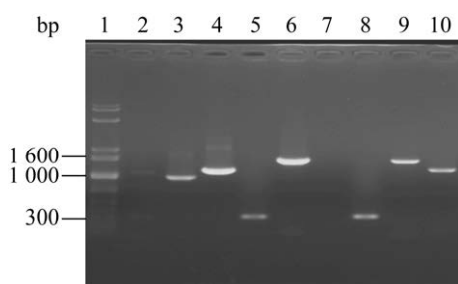


图2 重组载体接合转化进入鲍曼不动杆菌的验证

Figure 2 Verification of recombinant vector conjugative transfer into *A. baumannii* by PCR

注: 2、3、4 模板为含 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ; 5、6、7 模板为 17878 野生株; 8、9、10 模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株接合转化后转化子。2、5、8 孔引物为 Hcp jdF/Hcp jdR 引物对; 3、6、9 孔引物为 Hcp Up (*Not* I) F/Hcp Down (*Bam*H I) R 引物对; 4、7、10 孔引物为 pMo130-Tel F 和 pMo130-Tel R 引物对

Note: The templates of No. 2, 3, 4 are *E. coli* DH5 $\alpha$  containing pMo130-TelR-*hcp*-up-down; 5, 6, 7 are *A. baumannii* ATCC 17978 wild type; 8, 9, 10 are the *A. baumannii* ATCC 17978 transformants. The primers of No. 2, 5, 8 are Hcp jdF and Hcp jdR; 3, 6, 9 are Hcp Up (*Not* I) F and Hcp Down (*Bam*H I) R; 4, 7, 10 are pMo130-Tel F and pMo130-Tel R

(*hcp* up-down)质粒上产物长度为 1 kb; 4、7、10 泳道引物为 pMo130-Tel F/pMo130-Tel R 引物对, 没有转入质粒的鲍曼不动杆菌野生株无条带, 成功转入质粒的鲍曼不动杆菌及质粒产物长度 1 216 bp。综上实验结果可得出转化子成功导入重组载体。

### 2.3 基因敲除菌株验证

上述导入重组载体的鲍曼不动杆菌在含 10% 蔗糖的 YT 肉汤培养 3 代后, 对梯度稀释涂板获得的无抗性 YT 平板上生长而在亚碲酸钾平板上不生长的 19 号和 21 号单菌落进行基因敲除和质粒消除的验证, 结果如图 3 所示: 2、3、4 模板为含 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ; 5、6、7 模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株; 8、9、10 模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 基因敲除 19 号单菌落; 2、5、8 泳道引物为 Hcp Up (*Not* I) F/Hcp Down (*Bam*H I) R, 野生型中产物为 1 507 bp, 而在重组载体及基因敲除株中为 1 000 bp; 3、6、9 泳道引物为 Hcp jdF/Hcp jdR 引物对, *hcp* 未敲除

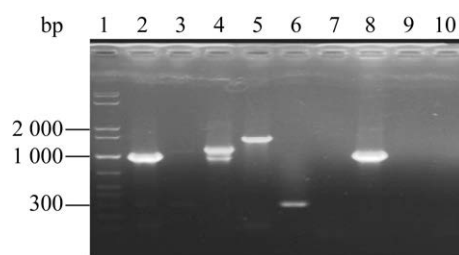


图3 鲍曼不动杆菌 *hcp* 基因敲除及质粒消除的验证

Figure 3 Verification of *hcp* gene deletion by PCR of genomic DNA

注: 2、3、4 模板为含 pMo130-TelR-(*hcp* up-down)的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ; 5、6、7 模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17878 野生株; 8、9、10 模板为鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株基因敲除 5 号菌。2、5、8 孔引物为 Hcp Up (*Not* I) F 和 Hcp Down (*Bam*H I) R 引物对; 3、6、9 孔引物为 Hcp jdF/Hcp jdR 引物对; 4、7、10 孔引物为 pMo130-Tel F/pMo130-Tel R 引物对

Note: The templates of 2, 3, 4 are pMo130-TelR-(*hcp* up-down); 5, 6, 7 are *A. baumannii* ATCC 17978 wild type; 8, 9, 10 are the No.5 of *A. baumannii* ATCC 17978 gene knock out mutants. The primers of 2, 5, 8 are Hcp Up (*Not* I) F and Hcp Down (*Bam*H I) R; 3, 6, 9 are Hcp jdF and Hcp jdR; 4, 7, 10 are pMo130-Tel F and pMo130-Tel R

菌株产物长度为 307 bp, 重组载体及基因敲除株无 PCR 产物条带; 4、7、10 泳道引物为 pMo130-Tel F/pMo130-Tel R 引物对, 没有转入质粒的野生株无条带, 成功转入重组载体的鲍曼不动杆菌及重组载体上产物长度 1 216 bp。综上实验结果可得出鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 菌株的 19 号单菌落 *hcp* 基因已敲除且其重组质粒也已消除。

### 2.4 *hcp* 敲除对鲍曼不动杆菌生长曲线的影响

为了研究 *hcp* 缺失后对 *A. baumannii* 生长的影响, 分别检测鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 和  $\Delta$ *hcp* 在 LB 中的生长曲线。按照培养条件培养细菌, 并每隔 1 h 测定  $OD_{630}$ 。实验结果发现,  $\Delta$ *hcp* 和鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 在 LB 培养基中的生长基本一致(图 4), 说明 *hcp* 的缺失不影响 *A. baumannii* 在 LB 中的生长。

### 2.5 *hcp* 敲除对鲍曼不动杆菌细菌竞争能力的影响

T6SS 的一个重要功能就是能介导细菌之间的竞争。为了探究 *hcp* 与 *A. baumannii* 在细菌竞争中

是否发挥作用,研究了鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 和  $\Delta hcp$  对 DH5 $\alpha$ /pK18mob 的杀伤能力。分别检测鲍曼不动杆菌 ATCC 17978、 $\Delta hcp$  和对照组 PBS 对 DH5 $\alpha$ /pK18mob 的杀伤作用。结果如图 5 所示:野生型鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 作用后剩余的大肠杆菌显著减少,  $\Delta hcp$  与野生型鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 相比杀伤能力明显减弱,但与对照组 PBS 相比仍有部分杀伤能力。以上实验结果表明, *hcp* 参与鲍曼不动杆菌的细菌竞争能力。

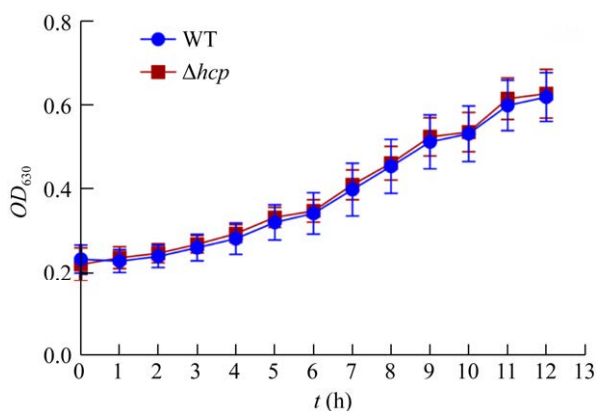


图 4 鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株与 *hcp* 缺失株生长曲线

Figure 4 Growth curve of *A. baumannii* ATCC 17978 WT and  $\Delta hcp$

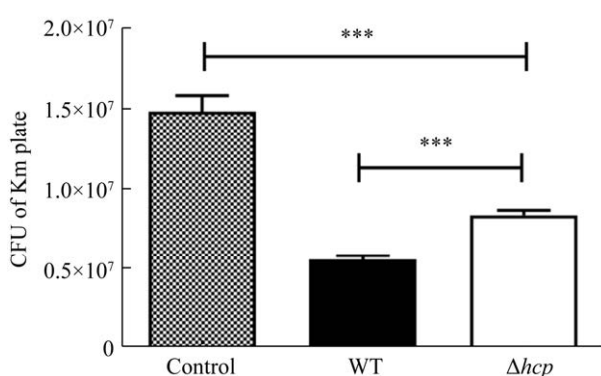


图 5 鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株与 17978 *hcp* 缺失株的细菌竞争结果

Figure 5 Bacterial competition of *A. baumannii* ATCC 17978 WT and 17978  $\Delta hcp$

Note: \*\*\*:  $P < 0.001$

## 2.6 *hcp* 敲除对鲍曼不动杆菌血清抵抗能力的影响

以往研究提示 T6SS 能够增强细菌的血清抵抗能力。为了研究 *hcp* 缺失是否影响血清抵抗能力,对鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 和  $\Delta hcp$  在正常人血清中的存活能力进行了测试。结果显示:  $\Delta hcp$  与野生型鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 相比血清抵抗能力增强,野生株和缺失株在人血清中的存活率存在显著差异(图 6)。这一发现提示 *hcp* 可能在鲍曼不动杆菌的血清抗性中发挥一定作用。

## 3 讨论与结论

鲍曼不动杆菌作为医院常见的机会致病菌,耐药问题已经成为了全球性问题。世界七大洲只有南极洲没有分离到多重耐药的鲍曼不动杆菌,耐碳青霉烯类药物的鲍曼不动杆菌(CRABA)位列世界卫生组织新型抗生素研发重点病原体清单中第一位<sup>[7]</sup>。鲍曼不动杆菌耐药机制复杂,通常同时具有多种耐药机制,包括产生多种  $\beta$ -内酰胺酶、细胞膜通透性降低和外排泵表达增高等<sup>[8]</sup>。关于其毒力因子以及耐药机制目前尚未被完全阐明。研究临床多重耐药菌株对揭示其致病机制及耐药规律至关重要。基因敲除技术是一种重要的研究手

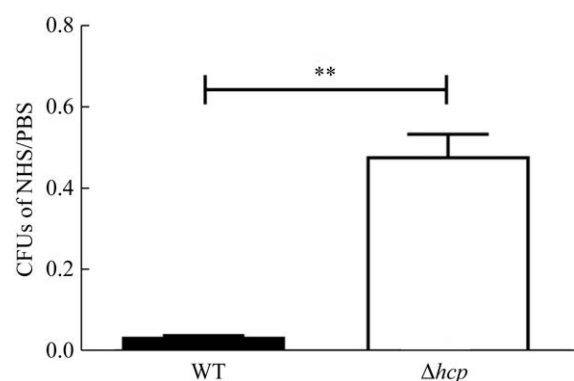


图 6 鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 野生株与 17978 *hcp* 缺失株血清抵抗结果

Figure 6 Serum resistance of *A. baumannii* ATCC 17978 WT and 17978  $\Delta hcp$

Note: \*\*:  $P < 0.01$

段,但由于鲍曼不动杆菌的多重耐药性问题,在进行基因敲除时,传统的方法往往不适用,如何对多重耐药菌株进行基因敲除获得基因缺失株从而进行深入的阐述是目前很多研究面临的问题。

近年来,基于 $\lambda$ -Red重组技术的方法已经被开发出来<sup>[9]</sup>,用于构建鲍曼不动杆菌的基因缺失突变体<sup>[10-11]</sup>。这种方法需要先将编码重组酶的质粒转入鲍曼不动杆菌,以提高同源重组和电穿孔的效率,然后将外源DNA通过电穿孔的方式转入鲍曼不动杆菌进行同源重组。不足之处是,这种方法对重组克隆的选择是依赖于2种不同的抗生素抗性进行的,同时电穿孔转化技术在临床分离株中效率很低,这就阻碍了这种方法在耐药菌株操作中的应用。此外,Red系统还必须从细菌中消除重组酶表达载体,以允许随后引入另一个表达FLP重组酶的载体,该载体必须再次消除从而最终产生无标记突变体<sup>[12]</sup>。总之,这种基于 $\lambda$ -Red重组的方法是一个耗时的过程,并且与多药耐药菌株不相容。

此外,Oh等<sup>[13]</sup>建立了一种快速简单的方法,通过重叠PCR扩增含有目的基因上、下游片段以及抗生素抗性基因的片段,然后通过平末端与自杀质粒进行连接。将重组自杀质粒导入鲍曼不动杆菌进行同源重组,从而获得突变体。此方法的优点是PCR产物通过平末端与质粒连接,不受克隆位点的限制,使用方便。但此方法对突变株的选择仍然是依赖于抗生素标记,因此不适于多重耐药菌株。

Wang等<sup>[14]</sup>利用CRISPR-Cas9/RecA系统对多重耐药鲍曼不动杆菌的基因组进行编辑,并研究了OxyR的氧化应激传感机制,认为CRISPR-Cas9/RecA系统对于寻找鲍曼不动杆菌新的治疗位点也将有推动作用。本研究利用pMo130-TelR自杀质粒的亚碲酸钾抗性以及在10%蔗糖中不能复制的特点,避开了传统方法必须用抗生素筛选的缺陷,成功构建了*hcp*基因缺失菌株。这种方法对于多重耐药菌株的基因突变以及功能研究具有重要意义。本方法敲除基因需要注意的关键点有:

(1) 融合PCR获取1 kb同源片段时必须对产物切胶回收单一的目的片段后才能进行下一步;(2) 亚碲酸钾的浓度以30  $\mu\text{g/mL}$ 为宜;(3) 10%蔗糖筛选基因突变株为本实验的限速步骤,需多次传代才可获得基因缺失株。

革兰氏阴性菌可以通过T6SS杀伤其他细菌参与细菌竞争,从而更好地适应周围的环境。有研究表明,具有*hcp*表达和分泌的鲍曼不动杆菌可以利用T6SS进行细菌竞争,而竞争大肠杆菌是以依赖T6SS的方式。为了探索鲍曼不动杆菌ATCC 17978 *hcp*参与的细菌竞争能力,我们按照细菌竞争的方法,探究鲍曼不动杆菌ATCC 17978和 $\Delta hcp$ 对DH5 $\alpha$ /pK18mob的杀伤作用。结果表明,野生型鲍曼不动杆菌ATCC 17978杀伤后剩余的大肠杆菌显著减少, $\Delta hcp$ 与野生型鲍曼不动杆菌ATCC 17978相比杀伤能力减弱,但与对照组PBS相比仍有部分杀伤能力。以上实验结果表明,*hcp*影响鲍曼不动杆菌ATCC 17978的细菌竞争能力。

血清补体在机体清除病原菌中发挥了重要作用。补体系统被激活后,可在靶细胞表面形成攻膜复合体,从而导致靶细胞溶解,这种补体介导的细胞溶解是机体抵抗微生物感染的重要防御机制。此外,血清调理素与细菌及其他颗粒物质结合,可促进吞噬细胞的吞噬作用。然而,病原菌在长期进化过程中进化出了有效的机制来减轻或逃避补体的攻击。抗血清补体介导的杀灭能力被认为是许多革兰氏阴性菌致病性的一个重要决定因素。本研究观察到鲍曼不动杆菌ATCC 17978对人血清的抗性与*hcp*相关。这些发现指出了T6SS在促进侵袭和血液定殖中的潜在作用,表明其是鲍曼不动杆菌的关键毒力因子。血清抵抗因子的发现对于疫苗和药物的开发具有重要意义。

综上所述,本研究利用非抗生素抗性筛选方法敲除了鲍曼不动杆菌*hcp*基因,该基因敲除方法突破了抗生素筛选的限制,可以用于多重耐药菌株基因敲除,因此在对耐药菌的相关研究上具有



重要意义。此外, 鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 *hcp* 参与细菌竞争, 并且与血清抵抗相关。这些结果为进一步阐明鲍曼不动杆菌 T6SS 的作用具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Xie XY, Yu YS, Zhang R. 2017 Yearbook of Bacterial Resistance Testing in Zhejiang Provincial Hospital[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2018: 3 (in Chinese)  
谢鑫友, 俞云松, 张嵘. 2017 浙江省医院细菌耐药检测年鉴[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2018: 3
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017[R]. Stockholm: ECDC, 2018: 41-42
- [3] Wang P, Dong JF, Zou QH. Knockout of *hcp* genes in *Salmonella typhimurium* by Red recombination system[J]. Microbiology China, 2018, 45(11): 2529-2536 (in Chinese)  
王萍, 董俊芳, 邹清华. 利用 Red 重组系统敲除鼠伤寒沙门氏菌 VI 型分泌系统相关基因[J]. 微生物学通报, 2018, 45(11): 2529-2536
- [4] Li L, Wang YN, Zou QH. Deletion of *asaA* gene in *Acinetobacter baumannii* by Red recombination system[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2019, 47(1): 14-18 (in Chinese)  
李磊, 王一诺, 邹清华. 利用 Red 重组系统敲除鲍曼不动杆菌 *asaA* 基因[J]. 微生物学免疫学进展, 2019, 47(1): 14-18
- [5] Hamad MA, Zajdowicz SL, Holmes RK, Voskuil MI. An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. Gene, 2009, 430(1/2): 123-131
- [6] Weber BS, Miyata ST, Iwashiki JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S, Feldman MF. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55142
- [7] WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed[R]. Geneva: World Health Organization, 2017
- [8] Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 55
- [9] Murphy KC.  $\lambda$  recombination and recombineering[J]. EcoSal Plus, 2016, 7(1): 1-70
- [10] Tucker AT, Nowicki EM, Boll JM, Knauf GA, Burdis NC, Trent MS, Davies BW. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation[J]. mBio, 2014, 5(4): e01313-14
- [11] Li L, Wang YN, Jia HB, Wang P, Dong JF, Deng J, Lu FM, Zou QH. The type VI secretion system protein *AsaA* in *Acinetobacter baumannii* is a periplasmic protein physically interacting with TssM and required for T6SS assembly[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 9438
- [12] Doublet B, Douard G, Targant H, Meunier D, Madec JY, Cloeckaert A. Antibiotic marker modifications of  $\lambda$  Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(2): 359-361
- [13] Oh MH, Lee JC, Kim J, Choi CH, Hana K. Simple method for markerless gene deletion in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(10): 3357-3368
- [14] Wang Y, Wang ZP, Chen Y, Hua XT, Yu YS, Ji QJ. A highly efficient CRISPR-Cas9-based genome engineering platform in *Acinetobacter baumannii* to understand the  $H_2O_2$ -sensing mechanism of OxyR[J]. Cell Chemical Biology, 2019, 26(12): 1732-1742