

# 副猪嗜血杆菌 *lgtF* 基因缺失株的构建及其部分生物学特性

曾 泽, 何 欢, 岳 华, 汤 承, 张 斌\*

(西南民族大学 生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘 要:** *lgtF* 基因编码的葡萄糖基转移酶在脂寡糖(LOS)的合成过程中负责增加一个葡萄糖合成庚糖 I, 在部分革兰阴性菌中是重要的毒力相关基因, 但 *lgtF* 基因在副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)中的作用还不清楚。本研究利用遗传操作方法构建 HPS SC096 的 *lgtF* 基因缺失株( $\Delta lgtF$ )。通过热酚法分别提取缺失株与野生株的 LOS, 将提取的 LOS 进行 SDS-PAGE 和银染。比较缺失株与野生株的生长曲线、抗血清中补体杀菌能力以及对宿主细胞——猪血管内皮细胞(PUVEC)和猪肾上皮细胞(PK-15)的黏附和入侵能力。结果表明与野生株相比,  $\Delta lgtF$  的 LOS 糖链结构变短, 生长速度稍微减慢, 另外,  $\Delta lgtF$  在兔和猪血清中抗补体杀菌能力明显降低( $P < 0.05$ ), 对 PUVEC 和 PK-15 细胞的黏附入侵能力明显降低( $P < 0.05$ )。以上结果表明 *lgtF* 基因是 HPS 的一个毒力相关基因。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; *lgtF* 基因; 缺失株; 毒力相关基因

中图分类号: S852.613

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)11-2056-07

## Construction and Characterization of a *Haemophilus parasuis* SC096 $\Delta lgtF$ Mutant Strain

ZENG Ze, HE Huan, YUE Hua, TANG Cheng, ZHANG Bin\*

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The *lgtF* encodes a glucosyltransferase responsible for adding a glucose to get heptose I in the synthesis of Lipooligosaccharide (LOS). The *lgtF* gene is an important virulence-associated gene in some Gram-negative bacteria. However, the function of *lgtF* gene in *Haemophilus parasuis* was still unknown. We constructed an  $\Delta lgtF$  mutant ( $\Delta lgtF$ ) of *H. parasuis* SC096 using a natural transformation system. The LOS of *H. parasuis* SC096 strain,  $\Delta lgtF$  mutant was extracted by the hot phenol-water method. The LOS was addressed by SDS-PAGE and silver stain. The growth curve, Serum resistance activity, adhesion and invasion ability in porcine kidney epithelial cells (PK-15) and porcine umbilical vein endothelial cells (PUVEC) of wild type SC096 and  $\Delta lgtF$  mutant were measured. Compared to the wild-type SC096 strain, the  $\Delta lgtF$  mutant exhibited obvious truncation of LOS structure and slight growth defect. Furthermore, the mutant had a greater sensitivity to the bactericidal action of porcine and rabbit serum ( $P < 0.05$ ), and displayed a significantly reduced ability to adhere to and invade PK-15 and PUVEC ( $P < 0.05$ ). The above findings suggested that the *lgtF* gene is a virulence-associated gene of the *H. parasuis* SC096 strain.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; *lgtF* gene; mutant; virulence-associated gene

收稿日期: 2015-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(31302119); 四川省教育厅项目(14ZB046); 公益性行业(农业)科研专项(201303034-1); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(2014NZYQN42)

作者简介: 曾 泽(1991-), 女, 贵州毕节人, 硕士生, 主要从事动物病原分子生物学, E-mail: 839017291@qq.com

\* 通信作者: 张 斌, 副研究员, E-mail: binovy@sina.com

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 属于巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*) 嗜血杆菌属 (*Haemophilus*), 能引起猪的多发性浆膜炎、关节炎以及脑膜炎为主要特征的猪革拉泽病 (Gläser's disease)<sup>[1-2]</sup>。HPS 感染猪群会引起较高的发病率和死亡率, 对养猪业造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。HPS 分为 15 个血清型, 而且不同血清型间毒力有明显差异<sup>[1,3]</sup>。研究发现 LOS 参与 HPS 对宿主细胞的黏附作用, 并能促进炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达<sup>[4-5]</sup>, 证实 LOS 参与了 HPS 致病过程, 是一个重要的毒力因子。

LOS 是革兰阴性菌外膜的主要成分, 在发病机制中起着重要的作用<sup>[6-9]</sup>。LOS 由脂质 A、2-酮-3-脱氧辛酸、庚糖和其他糖基组成<sup>[10]</sup>。单糖分析显示 HPS 的 LOS 含有葡萄糖、半乳糖、半乳糖-N 等多种成分, 其中葡萄糖是主要组成成分<sup>[11]</sup>, 这为 LOS 功能的研究奠定了基础。*lgtF* 基因编码的葡萄糖基转移酶负责增加一个葡萄糖合成庚糖 I, 并参与 LOS 的合成<sup>[12-15]</sup>。研究表明在多数革兰阴性菌中 *lgtF* 基因是重要的毒力基因<sup>[13-16]</sup>。但是, *lgtF* 基因在 HPS 致病过程中的作用还不清楚。本试验通过构建 HPS SC096 的  $\Delta lgtF$  缺失株, 并对其 LOS 结构、生长特性、抗血清杀菌能力以及对细胞的黏附和入侵能力进行研究, 以确定 *lgtF* 基因在 HPS 致病过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒、细胞

副猪嗜血杆菌 SC096 分离株、质粒 pK18mobsacB 和 pHV1249 由华南农业大学廖明教

授馈赠。质粒 pMD-19T 购自 TaKaRa 公司。PUVEC 和 PK-15 细胞由本实验室保存。

### 1.2 主要仪器和试剂

恒温金属浴购自博日公司; CO<sub>2</sub> 培养箱购自 Thermoforma 公司; 高速离心机 5804 购自 Eppendorf 公司; 普通 PCR 仪、核酸蛋白电泳仪 powerpac universalTM、凝胶成像系统 VersaDoc2000 购自 Bio-Rad 公司。TSA(胰蛋白胨大豆琼脂)、TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)购自青岛海博试剂有限公司; 新生牛血清购自郑州佰安生物工程有限公司; NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)购自北京博奥拓达科技有限公司, DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司, 卡那霉素、氨苄霉素、红霉素均购自上海生工公司, pMD-19T 载体、感受态 DH5 $\alpha$ , Ex Taq、T4 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; Gel extraction kit 试剂盒, Cycle-pure kit 试剂盒和 Plasmid Mini kit 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.3 引物设计

根据 NCBI(GenBank; CP001321. 1) 已发布的 HPS SH0165 中 *lgtF* 的序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计所用引物(表 1), 各引物均由上海生物工程公司合成。引物中下划线部分为酶切位点。

### 1.4 缺失株的构建

用引物 P1/P2 从 HPS SC096 菌株的基因组中扩增 *lgtF* 基因的上臂片段(481 bp), 用引物 P3/P4 从 SC096 菌株的基因组中扩增 *lgtF* 基因的下臂片段(484 bp)。以上下臂片段为模板用引物 P1/P4 进行重叠序列延伸 PCR, 将 *lgtF* 基因上下臂连接起来, 纯化回收, 克隆转化到 pMD19-T 载体获得质粒 pZZ001。用 *Hin* d III 和 *Eco* R I 对质粒 pZZ001

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	长度/ bp Length
P1( <i>lgtF</i> -up- <i>Hin</i> d III -F)	CCCAAGCTTACCGCTTGTGGTAATGAAGAACAGATTAC	481
P2( <i>lgtF</i> -up- <i>Bam</i> H I - <i>Sal</i> I -R)	GTCGACATGCTCGGATCCTCAACTGAAGGATTCTAC	
P3( <i>lgtF</i> -down- <i>Bam</i> H I - <i>Sal</i> I -F)	GGATCCGAGCATGTCGACAGGTTATCCTTTTTGAAATTA	484
P4( <i>lgtF</i> -down- <i>Eco</i> R I -F)	CGGAATTCACAAGCGGTCCCTATGAATATATCACTG	
P5(Em <sup>R</sup> <i>Bam</i> H I -F)	CGCGGATCCTTTAGTATTTTTGTAAATCAG	863
P6(Em <sup>R</sup> <i>Sal</i> I -R)	ACGTGTCGACTTACTTATTAATAATTTATA	
P7( <i>lgtF</i> - <i>Bam</i> H I -F)	CGCGGATCCGCGCTTGATGCGGAGCATT	1 009
P8( <i>lgtF</i> -R)	CAACCTTACAGCCAACGATTAGCGTC	

下划线部分为酶切位点

Restriction sites are underlined

进行双酶切,纯化回收,克隆转化到 pK18mobsacB 并获得质粒 pZZ002,将 863 bp 的红霉素抗性片段转入到质粒 pZZ002 获得质粒 pZZ003,用已优化过的自然转化方法<sup>[17]</sup>将质粒 pZZ003 转入 HPS SC096 株获得 *lgtF* 基因缺失株。

### 1.5 LOS 提取与 SDS-PAGE

采用热酚法<sup>[18]</sup>分别提取 HPS SC096 株与  $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS,将提取的 LOS 进行 SDS-PAGE(5%浓缩胶,18%分离胶)并银染<sup>[19]</sup>分析。

### 1.6 生长曲线的测定

将 HPS SC096 株与  $\Delta lgtF$  缺失株接种于 TSB 液体培养基,37 °C 培养 12 h 左右作为种子液。再将上述种子液按培养基总体积的 1% 接种于事先预热到 37 °C 的 TSB 液体培养基,于 37 °C,180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养,每个样本设置 3 个平行。其间每隔 1 h 取样进行平板菌落计数,用分光光度计测定培养基的 OD<sub>600 nm</sub> 值,并将结果绘制成曲线。

### 1.7 抗血清中补体杀菌试验

根据已描述的抗血清杀菌实验方法<sup>[15]</sup>,取 100  $\mu$ L 新鲜的猪血清和兔血清或 56 °C 灭活 30 min 的猪血清和兔血清,分别与 100  $\mu$ L 细菌( $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>)混合;取 180  $\mu$ L 新鲜的猪血清和兔血清或 56 °C 灭活 30 min 的猪血清和兔血清分别与 20  $\mu$ L 细菌( $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>)混合,37 °C,150 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 1 h,10 倍稀释后涂布在 TSA 平板(含 NAD 和血清)上,每个样本设置 3 个平行。细菌存活率即为在新鲜血清中存活的细菌除以在灭活血清中的存活率。

### 1.8 细胞黏附入侵试验

为了确定细菌对细胞的黏附效果,参考文献[20]方法将猪血管内皮细胞(PUVEC)和猪肾上皮细胞(PK-15)接到 24 孔细胞培养板,加入含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养 24 h。用 10<sup>7</sup> CFU 的菌液感染细胞,37 °C 培养 2 h,用 PBS 清洗细胞 3 次,用 0.1 mL 0.25% 胰酶 37 °C 消化细胞 10 min,再加入 0.9 mL TSB 将细胞取出,10 倍稀释后涂布在 TSA 平板(含 NAD 和血清)上,每个样本设置 3 个平行。

为了确定细菌对细胞的入侵效果,参考文献[20]将猪血管内皮细胞(PUVEC)和猪肾上皮细胞(PK-15)接到 24 孔细胞培养板,加入含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养 24 h。用 10<sup>7</sup> CFU 的菌液感染细胞,37 °C 培养 2 h,用 PBS

清洗细胞 3 次,加入含 20  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的庆大霉素的 DMEM 37 °C 培养 2 h,用 PBS 清洗细胞 3 次,用 0.1 mL 0.25% 胰酶 37 °C 消化细胞 10 min,再加入 0.9 mL TSB 将细胞取出,10 倍稀释后涂布在 TSA 平板(含 NAD 和血清)上,每个样本设置 3 个平行。

### 1.9 数据统计

数据通过 SPSS Statistics 软件进行独立样本 *t* 检验分析差异显著性, $P < 0.05$  表明差异显著。

## 2 结果

### 2.1 缺失株 $\Delta lgtF$ 的构建与验证

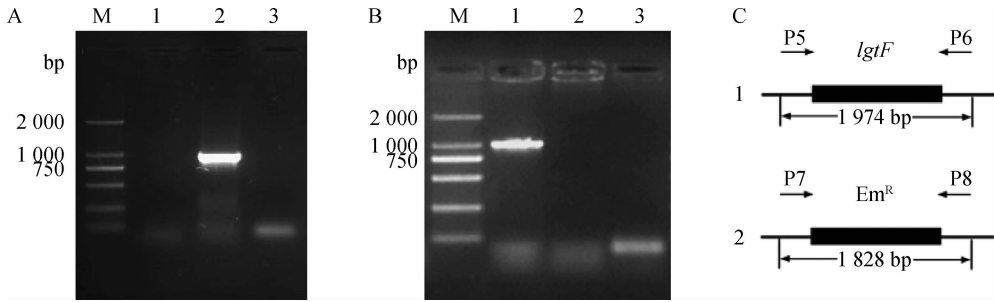
用质粒 pZZ003 与 HPS SC096 株进行自然转化,用含 Em 的 TSA 平板(含血清和 NAD)进行筛选,获得 Em 抗性的接合子。用引物 P5/P6 和 P7/P8 检测  $\Delta lgtF$  缺失株(图 1A、1B)。当用引物 P5/P6 分别对野生型 SC096 株和  $\Delta lgtF$  缺失株基因组进行扩增时,电泳图 1A 显示  $\Delta lgtF$  缺失株能被扩增出一条 750 到 1 000 bp 之间条带,与预期的 863 bp 的红霉素抗性片段一致。当用引物 P7/P8 分别对野生型 SC096 株和  $\Delta lgtF$  缺失株基因组进行扩增时,电泳图 1B 显示野生型 SC096 株能被扩增出一条大约 1 000 bp 条带,与预期的 1 009 bp 的 *lgtF* 基因片段一致。从图 1C 可以看出  $\Delta lgtF$  缺失株是由红霉素抗性片段取代野生型 SC096 株中 *lgtF* 基因目的片段而成。

### 2.2 野生株与缺失株 $\Delta lgtF$ 的 LOS 结构及生长特性的比较

为了比较 HPS SC096 株与  $\Delta lgtF$  缺失株 LOS 的不同,将提取的野生株和  $\Delta lgtF$  的 LOS 经 SDS-PAGE 并银染后得到图 2A。银染图显示  $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS 泳动明显快于野生株 LOS,这表明  $\Delta lgtF$  缺失株 LOS 的相对分子质量有所减小,LOS 的糖链结构有所缩短,即表明 HPS SC096 缺失掉 *lgtF* 基因后 LOS 的糖链结构缩短。HPS SC096 株与  $\Delta lgtF$  缺失株的生长曲线图(图 2B)显示  $\Delta lgtF$  缺失株的生长速度略低于野生株的生长速度。

### 2.3 野生株与 $\Delta lgtF$ 缺失株抗血清杀菌能力比较

为了研究 HPS 的 *lgtF* 基因是否参与了抗血清杀菌的作用,对野生型 SC096 株和  $\Delta lgtF$  缺失株的抗血清杀菌能力进行了比较。结果表明在 50% 和 90% 的血清中,野生型 SC096 株具有高水平的抵抗血清杀菌能力(图 3)。在 50% 和 90% 血清中,与野生型 SC096 株相比  $\Delta lgtF$  缺失株细菌存活率大约

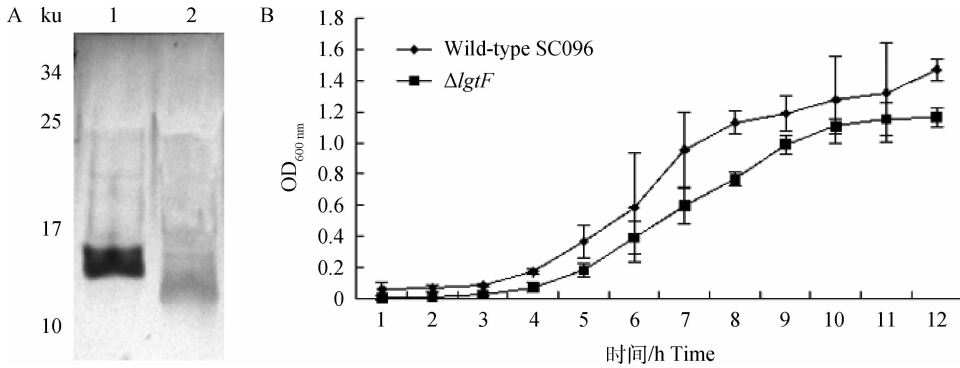


A. 引物 P5/P6 鉴定; B. 引物 P7/P8 鉴定; C.  $\Delta lgtF$  缺失株和野生型 SC096 株模式图; M. DNA 相对分子质量标准; 1. 野生型 SC096 株; 2.  $\Delta lgtF$  缺失株; 3. 阴性对照

A. Identification by primer P5 and P6; B. Identification by primer P7 and P8; C. Characterization and construction of  $\Delta lgtF$  mutant and wild-type SC096; M. DL2000 DNA marker; 1. Wild-type SC096; 2.  $\Delta lgtF$  mutant; 3. Negative control

图 1  $\Delta lgtF$  缺失株的鉴定

Fig. 1 Identification of  $\Delta lgtF$  mutant strain

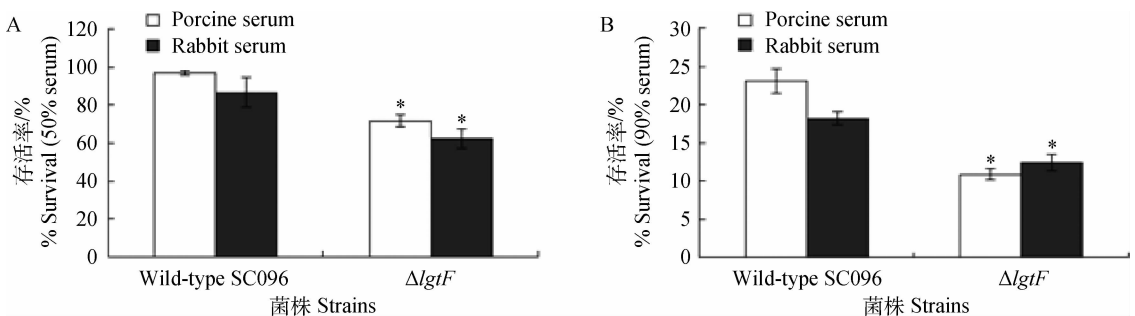


A. LOS 的银染图; 1. 野生型 SC096; 2.  $\Delta lgtF$  缺失株; B. 生长曲线, 误差线代表三次重复试验之间的标准误

A. LOS profiles; 1. Wild-type SC096 strain; 2.  $\Delta lgtF$  mutant; B. Growth curve, error bars represent the standard deviation from three independent experiments

图 2 野生株与  $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS SDS-PAGE 银染图及生长曲线

Fig. 2 LOS profiles and growth curve of wild-type SC096 strain and  $\Delta lgtF$  mutant



A. 50%猪和兔血清; B. 90%猪和兔血清; \* . 与野生型 SC096 株相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 误差线代表三次重复试验之间的标准误

A. 50% porcine and rabbit sera; B. 90% porcine and rabbit sera; \* . Significant difference ( $P < 0.05$ ) between strains. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments

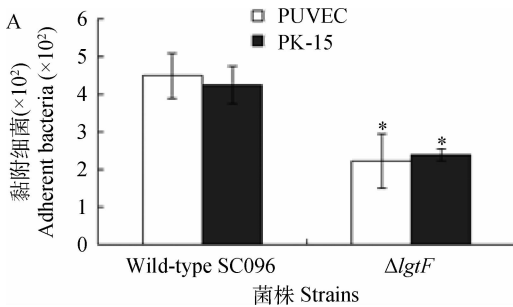
图 3 野生型 SC096 株和  $\Delta lgtF$  缺失株在猪和兔血清中抗血清杀菌作用

Fig. 3 Survival of wild-type SC096 strain and the  $\Delta lgtF$  mutant in porcine and rabbit sera

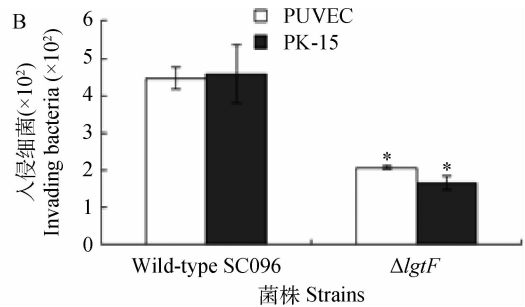
降低了 1.5 和 2 倍 ( $P < 0.05$ )。这表明 HPS SC096 缺失掉 *lgtF* 基因后抗血清杀菌能力明显降低。

## 2.4 野生株与 $\Delta lgtF$ 缺失株对细胞黏附入侵能力比较

为了研究 *lgtF* 基因在 HPS 对细胞黏附入侵中发挥的作用,对  $\Delta lgtF$  缺失株和野生型 SC096 株的黏附、入侵水平进行了比较(图 4)。发现  $\Delta lgtF$  缺失株对 PK-15 和 PUVEC 细胞的黏附水平明显的



降低 ( $P < 0.05$ ),相对于野生型 SC096 株,  $\Delta lgtF$  缺失株的黏附量降低 2 倍。而且,  $\Delta lgtF$  缺失株对 PK-15 和 PUVEC 细胞的入侵量也表现出明显的降低 ( $P < 0.05$ ),相对于野生型 SC096 株,  $\Delta lgtF$  缺失株的入侵水平大约降低 2 倍。这表明 HPS SC096 缺失掉 *lgtF* 基因后对细胞的黏附入侵能力明显降低。



\*. 与野生型 SC096 株相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 误差线代表三次重复试验之间的标准误差

\*. Significant difference ( $P < 0.05$ ) between strains. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments

图 4 野生型 SC096 株和  $\Delta lgtF$  缺失株对 PK-15 和 PUVEC 细胞的黏附和入侵

Fig. 4 Adherence(A) and invasion(B) of *H. parasuis* wild-type SC096 and  $\Delta lgtF$  mutant in PK-15 and PUVEC cells

## 3 讨论

LOS 除了可以保持外膜的稳定和 保护细胞免受外界环境的压力之外,通常作为内毒素、黏附因子、宿主防御因子等参与多数革兰阴性菌的致病机制<sup>[21-23]</sup>。在 HPS 中,LOS 已经被证实为重要的毒力因子<sup>[4+5,11,24]</sup>。为了进一步研究 LOS 成分与 HPS 发病机制之间的关系,本研究从 HPS SC096 基因组中敲除 *lgtF* 基因获得  $\Delta lgtF$  缺失株。而且该  $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS 糖链结构明显变短,这表明在 HPS 中 *lgtF* 基因参与 LOS 的合成,这与之前的相关研究结果一致<sup>[13-15,25]</sup>。在 HPS 中,庚糖 I 已被证实参与 LOS 的合成<sup>[24]</sup>。推测由于缺失掉 *lgtF* 基因之后,菌体内缺乏葡萄糖基转移酶从而影响了庚糖 I 的合成,最终导致 LOS 糖链结构的变短。 $\Delta lgtF$  缺失株的生长速度略低于野生株的生长速度,这表明 *lgtF* 基因参与 HPS SC096 的生长代谢,这可能是由于 HPS SC096 敲除掉 *lgtF* 基因后外膜不稳定而影响了菌株的生长代谢。

抗血清杀菌作用是病原菌一种重要的毒力机制<sup>[26]</sup>。引起全身性感染的 HPS 具有抵抗补体介导的血清杀菌作用,这个特性有助于细菌突破机体的

防御系统而在血液中存活。在 HPS 中,缺失掉 *rfaE*、*CDT*、*rfaF* 和 *opsX* 基因后都会使菌株的抗血清杀菌能力明显地降低,表明 *rfaE*、*CDT*、*rfaF* 和 *opsX* 基因参与 HPS 的抗血清杀菌作用<sup>[20,24,27]</sup>。在流感嗜血杆菌和空肠弯曲杆菌中,缺失 *lgtF* 基因都会使菌株的抗血清杀菌能力明显降低<sup>[13,15]</sup>。在本研究中, $\Delta lgtF$  缺失株的抗血清杀菌能力与野生株相比明显降低,推测可能是由于 LOS 结构的不完整性影响了菌株抵抗补体介导的血清杀菌作用。这表明在 HPS SC096 的抗血清杀菌作用中 *lgtF* 基因起着重要的作用,因此可以推测 *lgtF* 基因在 HPS SC096 的毒力中扮演着重要的角色,可能是一个毒力相关基因。

对宿主细胞的黏附和入侵是病原体发病机制中的关键步骤。在 HPS 中,缺失掉 *rfaE*、*CDT*、*rfaD*、*rfaF* 和 *opsX* 基因后都会显著降低菌株对细胞的黏附能力,这表明在 HPS 中 *rfaE*、*CDT*、*rfaD*、*rfaF* 和 *opsX* 都是重要的黏附因子<sup>[20,24,27-28]</sup>。在流感嗜血杆菌和空肠弯曲杆菌中, $\Delta lgtF$  缺失株在体内的定植能力和增殖能力都明显下降<sup>[13,29]</sup>。在本研究中,缺失 *lgtF* 基因之后菌株对 PK-15 和 PUVEC 细胞的黏附和入侵能力都明显降低,这可能是由于  $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS 结构不

完整导致菌株的外膜结构不稳定引起的。这表明 *lgtF* 基因在 HPS SC096 对 PK-15 和 PUVeC 细胞的黏附和入侵过程中起重要作用,因此可以推测 *lgtF* 基因可能是 HPS 的黏附因子,但也可能是导致了其他黏附因子功能的下降或丧失。

#### 4 结 论

成功构建 HPS SC096 的  $\Delta lgtF$  缺失株。 $\Delta lgtF$  缺失株的 LOS 糖链结构明显变短,生长速度稍微减慢; $\Delta lgtF$  缺失株的抗血清杀菌能力以及对宿主细胞的黏附和入侵能力都明显降低。以上结果表明在 HPS SC096 致病过程中 *lgtF* 基因可能是一个重要的毒力相关基因。

#### 参考文献 (References):

- [1] CAI X, CHEN H, BLACKALL P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 111 (3-4): 231-236.
- [2] OLIVEIRA S, PIJOAN C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 1-12.
- [3] KIELSTEIN P, RAPP-GABRIELSON V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts[J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(4): 862-865.
- [4] BOUCHET B, VANIER G, JACQUES M, et al. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Vet Res*, 2008, 39(5): 42.
- [5] BOUCHET B, VANIER G, JACQUES M, et al. Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells; limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release[J]. *Microb Pathog*, 2009, 46(2): 108-113.
- [6] SWORDS W E, BUSCHER B A, VER STEEG II K, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(1): 13-27.
- [7] KANIPES M I, HOLDER L C, CORCORAN A T, et al. A deep-rough mutant of *Campylobacter jejuni* 81-176 is noninvasive for intestinal epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(4): 2452-2455.
- [8] ERWIN A L, ALLEN S, HO D K, et al. Role of IgtC in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(11): 6226-6235.
- [9] HO D K, RAM S, NELSON K L, et al. IgtC expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* [J]. *J Immunol*, 2007, 178(2): 1002-1012.
- [10] GOLEC M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14(1): 1-4.
- [11] PERRY M B, MACLEAN L L, GOTTSCHALK M, et al. Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5) [J]. *Carbohydr Res*, 2013, 378: 91-97.
- [12] HOOD D W, COX A D, WAKARCHUK W W, et al. Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from *H. influenzae* strain Rd(RM118) [J]. *Glycobiology*, 2001, 11(11): 957-967.
- [13] HOOD D W, DEADMAN M E, COX A D, et al. Three genes, *lgtF*, *lic2C* and *lpsA*, have a primary role in determining the pattern of oligosaccharide extension from the inner core of *Haemophilus influenzae* LPS [J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt7): 2089-2097.
- [14] FILIATRAULT M J, GIBSON B W, SCHILLING B, et al. Construction and characterization of *Haemophilus ducreyi* lipooligosaccharide (LOS) mutants defective in expression of heptosyltransferase III and  $\beta$ -1,4-glucosyltransferase; identification of LOS glycoforms containing lactosamine repeats [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3352-3361.
- [15] NAITO M, FRIRDICH E, FIELDS J A, et al. Effect of sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide core truncations on biofilm formation, stress survival, and pathogenesis [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(8): 2182-2192.
- [16] KANIPES M I, TAN X, AKELAITIS A, et al. Genetic analysis of lipooligosaccharide core biosynthesis in *Campylobacter jejuni* 81-176 [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(5): 1568-1574.
- [17] ZHANG B, FENG S, XU C, et al. Serum resistance in *Haemophilus parasuis* SC096 strain requires outer membrane protein P2 expression [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 326(2): 109-115.
- [18] HITCHCOCK P J, BROWN T M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide che-

- motypes in silver-stained polyacrylamide gels[J]. *J Bacteriol*, 1983, 154(1):269-277.
- [19] TSAI C M, FRASCH C E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1982, 119(1):115-119.
- [20] ZHANG B, HE Y, XU C, et al. Cytolethal distending toxin (CDT) of the *Haemophilus parasuis* SC096 strain contributes to serum resistance and adherence to and invasion of PK-15 and PUVEC cells[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157(1-2):237-242.
- [21] FRIRDICH E, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae[J]. *J Endotoxin Res*, 2005, 11(3):133-144.
- [22] PLANT L, SUNDQVIST J, ZUGHAIER S, et al. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis* [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(2):1360-1367.
- [23] ZARANTONELLI M L, HUERRE M, TAHA M K, et al. Differential role of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* in virulence and inflammatory response during respiratory infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(10):5506-5512.
- [24] XU C, ZHANG L, ZHANG B, et al. Involvement of lipooligosaccharide heptose residues of *Haemophilus parasuis* SC096 strain in serum resistance, adhesion and invasion[J]. *Vet J*, 2013, 195(2):200-204.
- [25] KAHLER C M, CARLSON R W, RAHMAN M M, et al. Two glycosyltransferase genes, *lgtF* and *rfaK*, constitute the lipooligosaccharide ice (inner core extension) biosynthesis operon of *Neisseria meningitidis* [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(23):6677-6684.
- [26] CERDÀ-CUÉLLAR M, ARAGON V. Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine[J]. *Vet J*, 2008, 175(3):384-389.
- [27] ZHANG B, YU Y, ZENG Z, et al. Deletion of the *rfaE* gene in *Haemophilus parasuis* SC096 strain attenuates serum resistance, adhesion and invasion[J]. *Microb Pathog*, 2014, 74:33-37.
- [28] ZHANG B, XU C, ZHANG L, et al. Enhanced adherence to and invasion of PUVEC and PK-15 cells due to the overexpression of RfaD, ThyA and Mip in the  $\Delta$ ompP2 mutant of *Haemophilus parasuis* SC096 strain[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2-4):713-723.
- [29] MOREY P, VIADAS C, EUBA B, et al. Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypable *Haemophilus influenzae* pathogenesis[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(11):4100-4111.

(编辑 白永平)