

doi: 10.12131/20180127

溶藻弧菌 ZJ-T 小 RNA *srvg17985* 缺失突变株的构建及 该小 RNA 功能的初步分析

邓益琴¹, 陈 偿², 苏友禄¹, 程长洪¹, 马红玲¹, 郭志勋¹, 冯 娟¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300;
2. 中国科学院南海海洋研究所, 西沙、南沙深海海洋环境观测研究站, 广东广州 510301)

摘要: 利用同源重组技术构建了溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) ZJ-T 小 RNA *srvg17985* 的缺失突变株, 并比较研究了野生株和 *srvg17985* 突变株在 LBS 中的生长特性、运动性、胞外蛋白酶分泌、对铁的吸收利用、对抗生素的抗性以及生长代谢等生物学特性。结果表明, 小 RNA *srvg17985* 缺失后不影响溶藻弧菌在 LBS 中的生长、运动性、胞外蛋白酶分泌、对铁的吸收利用、对抗生素的抗性以及对测定的多数碳源、氮源的代谢; 但 *srvg17985* 突变株对昆布多糖 (laminarin)、果胶 (pectin) 以及二羟基丙酮 (dihydroxyacetone) 的利用增强, 并转变为可利用丙氨酸-天冬氨酸 (Ala-Asp) 作为单一氮源。

关键词: 溶藻弧菌; 小 RNA *srvg17985*; 缺失突变株; 功能分析

中图分类号: Q 933

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2019)01-0042-12

Construction of knock-out mutant of sRNA *srvg17985* in *Vibrio alginolyticus* ZJ-T and its preliminary function analysis

DENG Yiqin¹, CHEN Chang², SU Youlu¹, CEHNG Changhong¹, MA Hongling¹, GUO Zhixun¹, FENG Juan¹

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Xisha and Nansha Ocean Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: We constructed the sRNA *srvg17985* knock-out mutant in *Vibrio alginolyticus* ZJ-T by using homologous recombination, so as to compare the biological characteristics of growth in LBS medium, motility, extracellular protease secretion, iron utilization, antibiotic resistance and metabolism between the wild type and the mutant strains. The results show that the absence of sRNA *srvg17985* did not affect the growth in LBS medium, motility, extracellular protease secretion, iron utilization, antibiotic resistance and most of the tested carbon and nitrogen sources metabolism in *V. alginolyticus*. However, the mutant showed better utilization of laminarin, pectin and dihydroxyacetone, and gained the ability to utilize alanine-aspartic acid (Ala-Asp) as the sole nitrogen source.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; sRNA *srvg17985*; knock-out mutant; function analysis

收稿日期: 2018-06-12; 修回日期: 2018-08-02

资助项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2017YB27, 2017YB01); 联合资助开放课题基金 (2018011004); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金 (2017HY-ZD1007); 广东省“扬帆计划”引进创新团队 (2016YT03H038); 国家自然科学基金项目 (31502210)

作者简介: 邓益琴 (1990—), 女, 博士, 助理研究员, 从事鱼类细菌病及防治技术研究。E-mail: yiqindd@126.com

通信作者: 冯 娟 (1973—), 女, 博士, 研究员, 从事鱼类细菌病及防治技术研究。E-mail: jannyfeng@163.com

在细菌中, 反式编码小 RNAs (trans-encoded sRNAs, sRNAs, 以下称为小 RNA) 来自 2 个编码基因的基因间区, 通常是一类大小为 50~500 nt 的非编码 RNA 分子^[1]。小 RNA 主要通过与其靶标 mRNA 不完全配对, 影响 mRNA 的稳定性, 从而激活或者抑制靶标 mRNA 的翻译, 并且同一小 RNA 通常调控多个靶标基因, 从而形成响应环境的调节活性网络^[1]。小 RNA 还可通过模拟靶蛋白底物, 修饰或抑制靶蛋白的生物学活性, 例如 RsmZ 通过隔离的方式调节蛋白活性^[2]。此外, 也有少数小 RNA 与转录因子等蛋白相互作用, 从而抑制相关蛋白活性^[3]。研究发现小 RNA 对细菌的生长、繁殖具有重要的调节作用, 它们可感应环境变化, 调控细胞代谢途径、生长方式并使之与环境相适应。各种调控功能的小 RNA 在弧菌 (*Vibrio*) 中也有相应发现和研究, 尤其是霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 和哈维弧菌 (*V. harveyi*)^[4], 而溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 中关于小 RNA 的研究仅 Huang 等^[5]发现了 3 个与黏附、趋化及运动相关的小 RNA, 以及笔者前期发现的 1 个与代谢相关的小 RNA *srvg23535*^[6], 更多的从小 RNA 角度揭示溶藻弧菌环境适应及致病性等的研究尚未见报道。

溶藻弧菌广泛分布在河口与海洋, 是一种常见的水产养殖病原菌, 可感染包括南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、文蛤 (*Meretrix meretrix*)、花鮨 (*Lateolabrax japonicus*)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆 (*Psetta maxima*) 等在内的多种水产动物, 对中国南方水产养殖业造成极大威胁。此外, 溶藻弧菌常常引起人体严重腹泻、发热及脱水, 严重感染甚至可引发中耳炎和外耳炎等, 是人类重要的致病菌^[7-8]。细菌入侵宿主并在宿主中生存的过程中, 为了适应快速变化的环境, 进化出包括菌落相变、群感效应在内的多种机制^[9-10], 而这些机制都处于严格精准的基因表达调控体系中。转录、转录后、翻译及翻译后等过程都可作为基因表达的调控节点^[11-12], 绝大多数基因的表达都在其中一个或多个节点接收环境信号的控制, 从而组成复杂的调控网络以应对不断变化的环境条件。因此, 研究小 RNA 对溶藻弧菌环境适应及致病性等的功能调控, 将有利于进一步揭示其对溶藻弧菌的基因调控机制。

笔者前期鉴定得到溶藻弧菌小 RNA *srvg17985*, 并发现其仅存在于弧菌中, 且序列上相对保守。本研究利用同源重组技术构建 *srvg17985* 缺失突变株, 并对突变株的生物学特性进行分析, 为进一步鉴定 *srvg17985* 调控靶标基因, 进而阐明其基因调控机制奠定了基础; 研究成果将丰富溶藻弧菌小 RNA 的调控功能, 初步揭示小 RNA 在溶藻弧菌乃至海洋病原弧菌环境适应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物 本研究所用菌株和质粒见表 1, 引物见表 2。

1.1.2 主要试剂 高保真酶 PrimeSTAR® Max DNA polymerase、限制性内切酶 *Dpn*I 购自 Takara 公司, 用于营养缺陷型大肠杆菌 *Π3813* 生长的 2'-Deoxythymidine (Thy) 以及用于限铁环境生长测试的 2-2'-联吡啶 (2,2'-Dipyridyl, DIP) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 营养缺陷型大肠杆菌 *GEB883* 生长所需的 2,6-Diaminopimelic acid (DAP) 购自 Sigma 公司, 等温组装的试剂盒 ClonExpressMultiS One Step Cloning Kit 购自 Vazyme 公司, 抗生素纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司, PM (Phenotype MicroArray) 板购自华粤行仪器有限公司。

1.1.3 主要培养基 LB (luria-bertani) 培养基、TSB (tryptic soy broth) 培养基购自 BD 公司。1 L LB 含 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g 氯化钠 (NaCl)。1 L TSB 含 17 g 胰酪蛋白胨, 3 g 大豆蛋白胨, 2.5 g D-葡萄糖, 5.0 g NaCl, 2.5 g 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)。1 L 固体培养基含琼脂 15 g。在 LB 培养基基础上将 NaCl 质量浓度提高至 30 g·L⁻¹ 即配制得到 LBS (luria-bertani-salt) 培养基。

1.2 方法

1.2.1 *srvg17985* 缺失株的构建 参考 Deng 等^[17]的方法并进行一定修改, 构建 *srvg17985* 缺失突变株, *srvg17985* 的序列信息见图 1, 使用 pSW7848-F/R 引物对线性化扩增自杀质粒 pSW7848, 使用引物对 *srvg17985-UP-F/R* 和 *srvg17985-DOWN-F/R* 扩增上下游同源臂片段, 并将线性化质粒片段与上下游同源臂片段进行等温组装, 使用引物对 Del-check-pSW7848-F/R 对重组自杀质粒进行 PCR 及

表1 本研究所用菌株和质粒

Tab.1 Strains and plasmids used in this study

菌株、质粒 strain, plasmid	相关特征 relevant characteristics	来源 source
菌株 strains		
<i>V. alginolyticus</i> ZJ-T	氨苄青霉素抗性, 野生菌株ZJ-51的半透明/平滑变体; 从中国南部沿海的患病石斑鱼中分离	参考文献[13]
ZJ-T- Δ srvg17985	氨苄青霉素抗性; ZJ-T中缺失srvg17985	本研究
<i>Escherichia coli</i> PI3813	lacI _Q , thi ₁ , supE44, endA1, recA1, hsdR17, gyrA462, zei298::Tn10[Tc], Δ thyA::erm-pir116; 自杀质粒pSW7848的中间宿主	参考文献[14]
<i>E. coli</i> GEB883	大肠杆菌野生株K12 Δ dapA::erm _R RP4-2 Δ recAgyrA462, zei298::Tn10; 接合作用供体菌	参考文献[15]
质粒 plasmids		
pSW7848	氯霉素抗性; 自杀质粒, R6K起点, 复制需要P _{ir} 蛋白, 具有 _{ccdB} 毒性基因	参考文献[16]
pSW7848- Δ srvg17985	氯霉素抗性; pSW7848含有待缺失srvg17985的上下游同源臂	本研究

表2 本研究所用引物

Tab.2 Primers used in this study

引物 primer	序列 (5'-3') sequence
pSW7848-F	GTCTGATTGTTACCAATTATGACAAC
pSW7848-R	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC
srvg17985-UP-F	aagcttgcattatcgaaatccGCCAAACACGCCAAACAA
srvg17985-UP-R	acctcggtTTTAAAGCATGGTTCACTTCTCAAAAAAC
srvg17985-DOWN-F	tgcgttaatAACGAGGTAGAGGCGCAG
srvg17985-DOWN-R	ttggtaacgaatcagacGCAAATCAAATTGCAATGCGC
Del-check-pSW7848-F	TCACTGTCCCTTATTGCGACCC
Del-check-pSW7848-R	CTGCTTTGAGCACTACCCG
Δ srvg17985-check-F	CAATTCTCTCGCGTTGGTC
Δ srvg17985-check-R	CATTGCTGACAACGTGTCTTG

TTATTGAAGATCACGCCAAACACGCCAAACA.....952 bp.....GTTTTTTGAGAAAAATGAACCATGCTTTAAAT
GTAAAGCAACATGACTGCTTCAGAAGGAGGGATGTGAGGTTTACACACAATTGGATGGATTCAAACCCCTA
CGGTAAGTCCTCGTTTATGTCGGATGCATCAATAGACATGCCGATTGCACACTCACGATTGAGTAAACG
AGGTAGAGGCGCACGAACATGTGCGCCTCTAA.....942 bp.....GCGCATTGCAATTGATTGCTTGGT

图1 srvg17985的序列信息

下划线部分为 srvg17985 的序列, 深灰色背景部分依次为上下游同源臂扩增的引物对

Fig.1 Sequence information of srvg17985

The underlined is the sequence of srvg17985 and the dark gray background indicates the primer pairs for the amplification of two flanking fragments.

测序检测, 鉴定正确的质粒大小约为 5.5 kb, 命名为 pSW7848- Δ srvg17985。接着通过接合作用, 将重组自杀质粒 pSW7848- Δ srvg17985 从供体菌大肠杆菌 GEB883-pSW7848- Δ srvg17985 送入到受体菌

溶藻弧菌野生株 ZJ-T。根据自杀质粒 pSW7848 不能在溶藻弧菌中复制, 具有氯霉素抗性, 并在受阿拉伯糖诱导后毒性基因 _{ccdB} 表达的特点, 利用氯霉素和阿拉伯糖进行先后两次筛选, 重组自杀质粒

上的 *srvg17985* 上下游同源臂片段与溶藻弧菌基因组的 *srvg17985* 上下游同源臂片段先后发生两次同源重组, 从而获得溶藻弧菌 *srvg17985* 缺失株, 命名为 ZJ-T- Δ *srvg17985*。重组自杀质粒构建及同源重组筛选突变株流程见图 2。

1.2.2 菌株生长测试 将单个克隆的溶藻弧菌野生株 ZJ-T 及小 RNA 缺失突变株 ZJ-T- Δ *srvg17985* 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30 °C、200 r·min⁻¹ 振摇培养 16 h 过夜, 过夜菌液用新鲜 LBS 培养基稀释 1 000 倍于灭菌锥形瓶中, 30 °C、200 r·min⁻¹

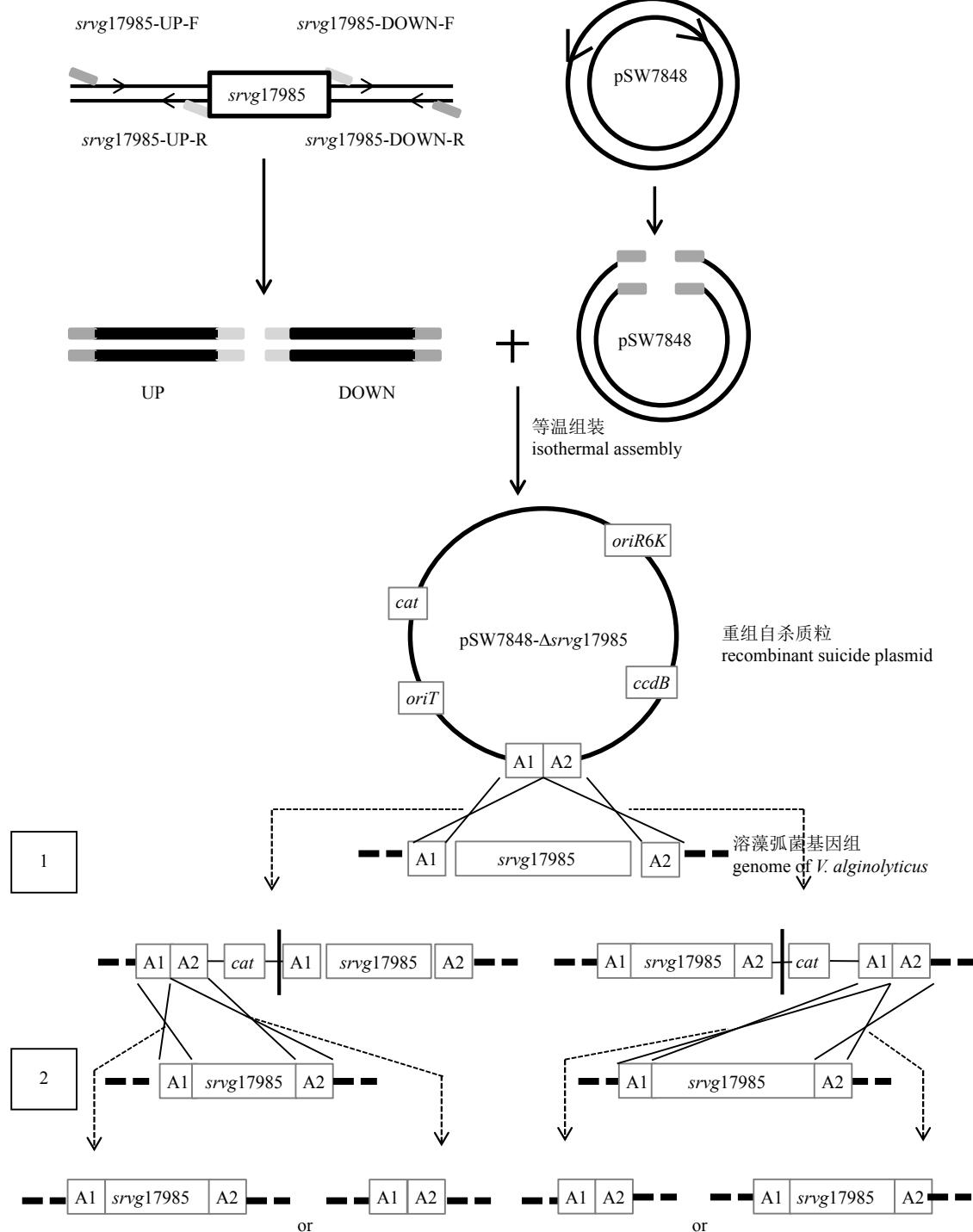


图2 重组自杀质粒构建和突变株筛选

A1. 上游; A2. 下游

Fig.2 Construction of recombinant suicide vector and screening of mutant strain

A1. up stream; A2. down stream

振摇培养, 不同时间利用分光光度计 (BIO-RAD Smart-Spec™ Plus) 测定 OD_{600} , 绘制生长曲线。重复实验 3 次, 使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素协方差分析 (ANCOVA) (以野生株和突变株为固定因子, 以时间为协变量, 以 OD_{600} 值为因变量)。

1.2.3 游动性和涌动性测试 同 1.2.2 过夜菌液, 调整培养液浓度至相同吸光度 ($OD_{600}=1.0$), 取 5 μ L 平行 3 次点样到 0.3% 琼脂半固体 LBS 平板上测试其游动性, 同时取 5 μ L 平行 3 次点样到 1.5% 琼脂固体 LBS 平板上测试其涌动性, 分别于 30 ℃ 静置培养 16 h 和 24 h, 测量菌斑直径。实验至少重复 3 次。使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 作为统计学显著性阈值。

1.2.4 胞外蛋白酶分泌测试 同 1.2.2 过夜菌液, 调整培养液浓度至相同吸光度 ($OD_{600}=5.0$), 取 5 μ L 平行 3 次点样到 LBS 添加 1% 脱脂奶粉平板上, 30 ℃ 静置培养 24 h, 测量蛋白分解圈直径及克隆直径。实验至少重复 3 次。“蛋白分解圈直径/克隆直径”值表示蛋白酶分泌能力。使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 作为统计学显著性阈值。

1.2.5 限铁环境下的生长测试 同 1.2.2 过夜菌液, 调整培养液浓度至相同吸光度 ($OD_{600}=5.0$), 同时 10 倍倍比稀释各菌株菌液至最高稀释倍数为 10^6 , 然后将倍比稀释菌液依次取 5 μ L 平行 3 次点样到 LBS 平板, 以及 LBS 添加 120 μ mol·L⁻¹ DIP 的平板上, 30 ℃ 静置培养 24 h, 观察细菌所能生长的最大稀释倍数。实验至少重复 3 次。

1.2.6 LBS 平板上对不同抗生素的敏感性测试

同 1.2.2 过夜菌液, 将 200 μ L 过夜菌涂布到 TSB 平板 (12 cm, 正方形) 后, 将各抗生素纸片置于平板上, 30 ℃ 静置培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径, 取 3 个位置测定经过抗生素纸片中心的抑菌圈直径, 重复测定 3 次, 取平均值。重复实验 3 次, 使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 作为统计学显著性阈值。

1.2.7 PM 板测试细菌代谢 参考 Bochner 等^[18]的方法, 利用 PM02 和 PM08 板分别测试细菌对 95 种碳源以及 95 种多肽氮源 (表 3、表 4) 的利用。在 LBS 固体平板上划线复活细菌, 30 ℃ 静置培养过夜。1) 510 μ L 的染料 A (100×) 与 7 990 μ L 含 14% NaCl 的水溶液一起加入到 42.5 mL 接种液

(inoculating fluid, IF) 1.2×IF-0 中, 得到 51 mL 的 1.0×IF-0; 2) 对于每个菌株, 用灭菌棉签刮取固体平板上的克隆, 重悬在 25 mL 的 1.0×IF-0 中, 利用浊度仪测定浊度, 得到浊度为 85% 的孵育液; 3) 对于 PM02 板, 每孔吸取浊度为 85% 的孵育液 100 μ L; 对于 PM08 板, 向浊度为 85% 的孵育液中加入适当体积的 2 mol·L⁻¹ 的琥珀酸钠, 使得最终浓度为 20 mmol·L⁻¹, 并每孔吸取 100 μ L 孵育液; 4) 将准备好的孵育板于 30 ℃ 静置培养 5 d, 并在不同的时间点利用 MultiDisk Ascent 读板仪 (Thermo Fisher Scientific) 测定 OD_{590} , 并将各孔 OD_{590} 减去空白孔 OD_{590} , 指示细菌的代谢活性。重复实验 3 次, 使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素协方差分析 (ANCOVA) (以野生株和突变株为固定因子, 以时间为协变量, 以 OD_{590} 值为因变量), 并对有显著性差异的因子各时间点进行 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 作为统计学显著性阈值。

2 结果

2.1 成功构建 *srvg17985* 缺失突变株

扩增得到大小约 3.3 kb 的线性化质粒片段以及大小均约为 1 kb 的上下游同源臂片段 (图 3-A、图 3-B), 和预期大小一致, 将上下游同源臂片段与质粒线性化片段等温组装后, PCR 扩增检测得到大小约为 2.3 kb 的片段 (图 3-C), 与预期大小一致, 成功构建重组自杀质粒 pSW7848- Δ *srvg17985*。通过接合作用, 重组自杀质粒上的 *srvg17985* 上下游同源臂片段与野生株 ZJ-T 的 *srvg17985* 上下游同源臂片段发生两次同源交换, 这可能使得染色体上的 *srvg17985* 缺失, 用 Δ *srvg17985*-check-F/R 引物对进行 PCR 检测, 野生株可扩增出大小为 631 bp 的片段, 而 *srvg17985* 缺失株则扩增出大小为 490 bp 的片段 (图 3-D), 测序鉴定, 从而成功缺失 *srvg17985* 的第 1 个到第 141 个碱基 (图 1), 获得 *srvg17985* 缺失突变株。

2.2 *srvg17985* 对溶藻弧菌在 LBS 培养基中生长的影响

srvg17985 缺失后, 在 LBS 培养基中, 突变株的生长相对野生型无显著差异 ($P>0.05$), 说明 *srvg17985* 不参与调控溶藻弧菌在 LBS 中的生长 (图 4)。

2.3 *srvg17985* 对溶藻弧菌运动性的调控

srvg17985 缺失后, 在 0.3% 琼脂 LBS 平板上的游动性及 1.5% 琼脂 LBS 平板上的涌动性相对野

表3 PM02板测试组分

Tab.3 Test components of PM02 plate

孔 well (PM02)	A	B	C	D	E	F	G	H
1	空白	N-乙酰基-D-半乳糖胺	龙胆	D-棉子糖	癸酸	D-乳酸甲酯	乙酰胺	L-鸟氨酸
2	硫酸软骨素C	N-乙酰-神经氨酸	L-葡萄糖	水杨甙	己酸	丙二酸	L-丙氨酸	L-苯丙氨酸
3	α -环糊精	β -D-阿拉伯糖	D-乳糖醇	景天庚酮糖酐	柠康酸	6-O-(α -D-吡喃半乳糖基)-D-焦谷氨酸	N-乙酰-L-谷氨酸	L-焦谷氨酸
4	β -环糊精	苦杏仁甙	D-松三糖	L-山梨糖	D,L-柠檬酸	D-精氨酸	L-缬氨酸	D,L-肉碱
5	γ -环糊精	D-阿拉伯糖	麦芽糖醇	水苏糖	D-氨基葡萄糖	草酸	D-组氨酸	仲丁胺
6	糊精	D-阿拉伯糖醇	α -甲基-D-葡萄糖苷	D-塔格糖	2-羟基苯甲酸	草酰苹果酸	甘氨酸	D,L-草鱼胺
7	明胶	L-阿拉伯糖醇	β -甲基-D-半乳糖苷	松二糖	4-羟基苯甲酸	奎尼酸	L-高丝氨酸	仲丁胺
8	糖原	熊果苷	3-甲基葡萄糖	木糖醇	β -羟基丁酸	癸二酸	羟基-L-脯氨酸	腐胺
9	菊粉	2-脱氧-D-核糖	β -甲基-D-葡萄糖醛酸	N-乙酰基-D-葡萄糖胺醇	γ -羟基丁酸	山梨酸	L-异亮氨酸	二羟基丙酮
10	昆布多糖	1-赤藓糖醇	α -甲基-D-甘露糖苷	γ -氨基-N-丁酸	α -酮基戊酸	琥珀酸	L-亮氨酸	2,3-丁二醇
11	甘露聚糖	D-岩藻糖	β -甲基-D-木糖苷	δ -氨基戊酸	衣康酸	D-酒石酸	L-赖氨酸	2,3-丁酮
12	果胶	3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-阿拉伯糖	帕拉金糖	丁酸	5-酮基-D-葡萄糖酸	L-酒石酸	L-蛋氨酸	3-羟基-2-丁酮

表4 PM08板测试组分

Tab.4 The test components of PM08 plate

孔 well (PM08)	A	B	C	D	E	F	G	H
1	空白	甘氨酸-天冬氨酸	赖氨酸-甘氨酸	脯氨酸-谷氨酸	苏氨酸-苯丙氨酸	缬氨酸-丝氨酸	γ -谷氨酰胺	甘氨酸-甘氨酸-丙氨酸
2	L-谷氨酰胺	甘氨酸-异亮氨酸	赖氨酸-甲硫氨酸	脯氨酸-异亮氨酸	苏氨酸-丝氨酸	丙氨酸-缬氨酸	γ -D-谷氨酰胺	甘氨酸-甘氨酸-D-亮氨酸
3	丙氨酸-天冬氨酸	组氨酸-丙氨酸	甲硫氨酸-酪氨酸	脯氨酸-赖氨酸	色氨酸-缬氨酸	丙氨酸-丙氨酸	甘氨酸-D-丙氨酸	甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸
4	丙氨酸-谷氨酰胺	组氨酸-谷氨酸	甲硫氨酸-酪氨酸	脯氨酸-丝氨酸	酪氨酸-异亮氨酸	甲硫氨酸-丙氨酸	甘氨酸-D-天冬氨酸	甘氨酸-甘氨酸-异亮氨酸
5	丙氨酸-异亮氨酸	组氨酸-组氨酸	苯丙氨酸-天冬氨酸	脯氨酸-色氨酸	酪氨酸-缬氨酸	丙氨酸-苯丙氨酸	甘氨酸-D-丝氨酸	甘氨酸-甘氨酸-亮氨酸
6	丙氨酸-甲硫氨酸	异亮氨酸-天冬酰胺	苯丙氨酸-谷氨酸	脯氨酸-缬氨酸	缬氨酸-丙氨酸	丙氨酸-苯丙氨酸	甘氨酸-D-苏氨酸	甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸
7	丙氨酸-缬氨酸	异亮氨酸-亮氨酸	谷氨酰胺-谷氨酸	丝氨酸-天冬酰胺	缬氨酸-谷氨酰胺	丙氨酸-D-丙氨酸	缬氨酸- β -丙氨酸	缬氨酸-酪氨酸
8	天冬氨酸-丙氨酸	亮氨酸-天冬酰胺	苯丙氨酸-甲硫氨酸	丝氨酸-天冬氨酸	缬氨酸-谷氨酰胺	丙氨酸-甘氨酸	亮氨酸- β -丙氨酸	甘氨酸-苯丙氨酸
9	天冬氨酸-谷氨酰胺	亮氨酸-组氨酸	苯丙氨酸-酪氨酸	丝氨酸-谷氨酰胺	缬氨酸-赖氨酸	丙氨酸-亮氨酸	亮氨酸-D-亮氨酸	亮氨酸-甘氨酸
10	天冬氨酸-甘氨酸	亮氨酸-脯氨酸	苯丙氨酸-精氨酸	丝氨酸-谷氨酸	缬氨酸-甲硫氨酸	丙氨酸- β -丙氨酸	苯丙氨酸-丙氨酸	亮氨酸-亮氨酸-亮氨酸
11	谷氨酸-丙氨酸	亮氨酸-酪氨酸	脯氨酸-天冬氨酸	苏氨酸-天冬氨酸	缬氨酸-苯丙氨酸	丙氨酸-丙氨酸	丙氨酸-丙氨酸	丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸
12	甘氨酸-天冬酰胺	赖氨酸-天冬氨酸	脯氨酸-天冬酰胺	苏氨酸-谷氨酰胺	缬氨酸-脯氨酸	D-亮氨酸-酷氨酸	D-丙氨酸-酷氨酸	酷氨酸-甘氨酸-甘氨酸

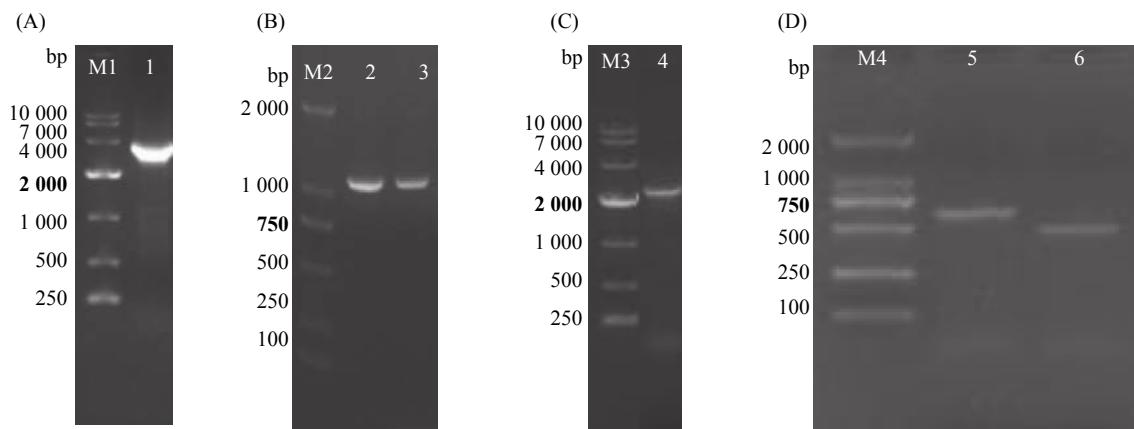


图3 pSW7848 PCR线性化片段 (A)、*srvg17985*上下游同源臂片段 (B)、重组自杀质粒的PCR鉴定扩增片段 (C) 以及 *srvg17985*缺失株的PCR鉴定 (D)

泳道 M1. DNA Marker DL10 000; 泳道 1. pSW7848 线性化片段; 泳道 M2. DNA Marker DL2 000; 泳道 2/3. *srvg17985* 上/下游片段; 泳道 M3. DNA Marker DL10 000; 泳道 4. 重组子 pSW7848-*srvg17985* 检测片段; 泳道 M4. DNA Marker DL2 000; 泳道 5. 野生株 ZJ-T; 泳道 6. *srvg17985* 候选突变株

Fig.3 Linearized segment of pSW7848 (A), upstream and downstream homologous segments of *srvg17985* (B), segment of identification of recombinant suicide vector by PCR (C) and identification of *srvg17985* deletion mutant by PCR (D)
Lane M1. DNA Marker DL10 000; Lane 1. linearized segment of pSW7848; Lane M2. DNA Marker DL2 000; Lane 2/3. UP/DOWN segments of *srvg17985*; Lane M3. DNA Marker DL10 000; Lane 4. segment of identification of the recombinant suicide vector by PCR; Lane M4. DNA Marker DL2 000; Lane 5. wild type ZJ-T; Lane 6. *srvg17985* deletion candidate

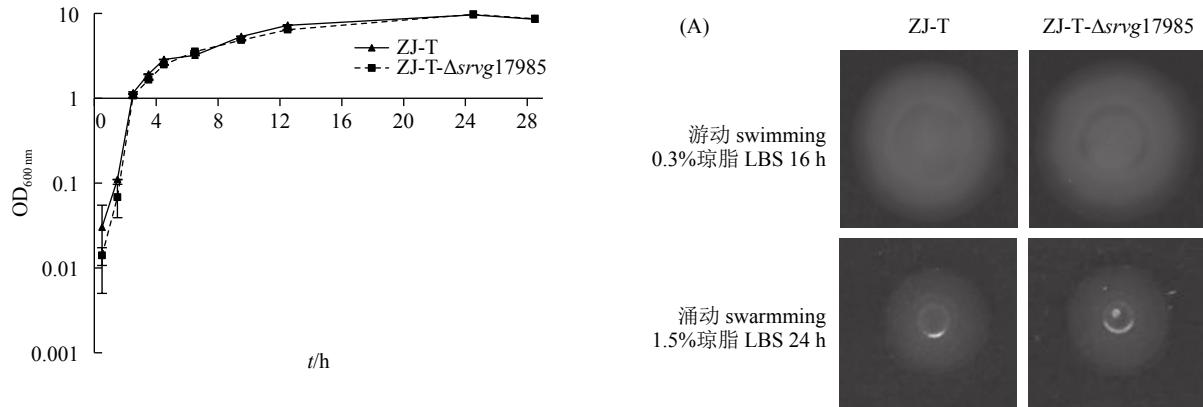


图4 溶藻弧菌ZJ-T和ZJ-T-*Δsrvg17985*在LBS培养基中的生长曲线

误差线对应于标准偏差

Fig.4 Growth curves of ZJ-T and ZJ-T-*Δsrvg17985* in LBS medium

Error bars correspond with standard deviations.

生株无显著变化 ($P>0.05$)，这说明 *srvg17985* 不参与调控溶藻弧菌的运动性 (图 5-A、图 5-B)。

2.4 *srvg17985* 对溶藻弧菌胞外蛋白酶分泌的影响

srvg17985 缺失后，在 1% 脱脂奶粉 LBS 平板上，菌株胞外蛋白酶的分泌相对野生株无显著差异 ($P>0.05$)，这表明 *srvg17985* 不参与调控溶藻弧菌胞外蛋白酶的分泌 (图 6-A、图 6-B)。

2.5 *srvg17985* 对溶藻弧菌铁离子代谢的影响

srvg17985 缺失后，突变株相对野生株在 LBS

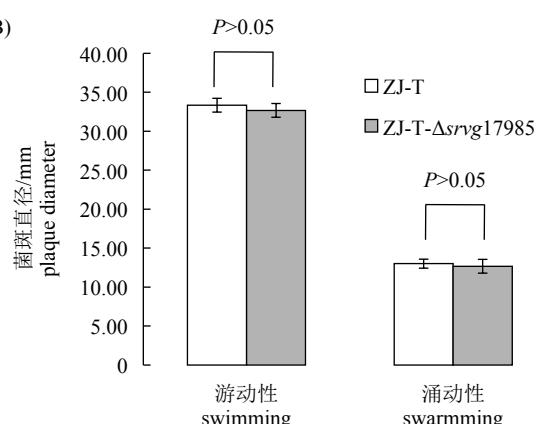


图5 溶藻弧菌ZJ-T和ZJ-T-*Δsrvg17985*在0.3%和1.5%琼脂LBS平板上的运动性 (A) 和统计分析 (B)

Fig.5 Motility of ZJ-T and ZJ-T-*Δsrvg17985* on 0.3% and 1.5% LBS agar plates (A) and statistical analysis (B)

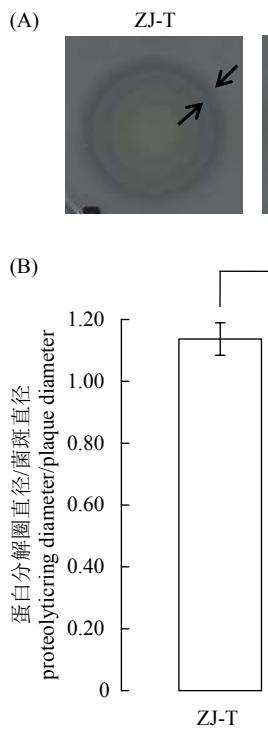


图6 溶藻弧菌ZJ-T和ZJ-T-*Δsrvg17985*在LBS+1%脱脂奶粉平板上胞外蛋白酶的分泌(A)和统计分析(B)

图A 内箭头指向菌斑边缘, 外箭头指向蛋白酶分泌圈边缘

Fig.6 Extracellular protease activities of ZJ-T and ZJ-T-*Δsrvg17985* mutant on LBS agar plates containing 1% skimmed milk (A) and statistical analysis (B)

The inner arrow points to the edge of the plaque, and the outer arrow points to the edge of the proteolytic ring in Fig. A.

添加铁离子螯合剂 DIP 平板上的生长无显著差异, 这说明 *srvg17985* 不参与调控溶藻弧菌对铁离子的吸收代谢(图 7)。

2.6 *srvg17985* 对溶藻弧菌抗生素敏感性的影响

野生株和 *srvg17985* 突变株均对包括林可霉素、万古霉素、克林霉素在内的 18 种抗生素具有抗性; 野生株对红霉素表现抗性, 缺失株对红霉素表现中介敏感, 但两者的抑菌圈直径差异不显著($P>0.05$); 两菌株对其他的 11 种抗生素表现出不同程度的敏感, 但均无显著性差异($P>0.05$, 表 5)。

2.7 *srvg17985* 对溶藻弧菌代谢的调控

1) PM02 测试了细菌对 95 种不同碳源的利用(表 3), 发现 *srvg17985* 缺失后, 细菌以昆布多糖、果胶以及二羟基丙酮为碳源时, 在稳定期相对野生株生长量更大(One-Way ANCOVA: F 值分别为 35.482、18.853、33.292; P 值均小于 0.001; Student's t 检验: 19.5 h 之后各时间点 $P<0.05$, 图 8), 说明 *srvg17985* 负调控溶藻弧菌对昆布多糖、果胶

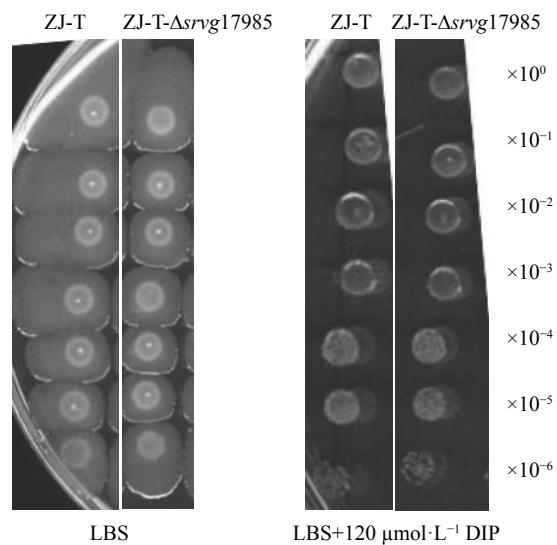


图7 溶藻弧菌ZJ-T和ZJ-T-*Δsrvg17985*在LBS以及LBS添加 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DIP平板上的生长情况

Fig.7 Growth ability of ZJ-T and ZJ-T-*Δsrvg17985* on LBS plate and LBS plate supplemented with $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DIP

以及二羟基丙酮的代谢。此外, 二羟基丙酮孔吸光度在约 70 h 处下降, 其后在约 100 h 处又上升(图 8)。

2) PM08 测试了细菌对 95 种不同多肽的利用(表 4), 其中 A03 孔由于测定误差, 舍去 102 h 时间点的数据进行分析, 发现 *srvg17985* 缺失后, 可利用丙氨酸-天冬氨酸为氮源, 而野生株却不能(One-Way ANCOVA: $F=89.639$, $P<0.001$; Student's t 检验: 0.0 h 之后各时间点 $P<0.05$, 图 8), 说明 *srvg17985* 负调控溶藻弧菌对丙氨酸-天冬氨酸的代谢。

3 讨论

越来越多的研究表明小 RNA 对细菌遗传变异、生长繁殖、致病机制等具有重要的调控作用^[3,19]。本研究发现溶藻弧菌中小 RNA *srvg17985* 缺失后不影响其在 LBS 中的生长、运动性、胞外蛋白酶分泌、对铁的吸收代谢、对所测试的 30 种抗生素抗性以及对所测试的大多数单一碳源、单一氮源的利用, 但对昆布多糖、果胶以及二羟基丙酮的利用增强, 表现为稳定期生长量更大, 并变得可利用丙氨酸-天冬氨酸作为氮源。

细菌感染宿主的第一步是黏附, 而运动性可促进细菌对宿主的黏附, 进而影响细菌的定殖, 因此与细菌致病性密切相关^[20]。摄铁系统和胞外蛋白酶也被报道是溶藻弧菌 2 个重要的致病因子^[21-22]。目

表5 溶藻弧菌ZJ-T和ZJ-T- Δ srvg17985对各抗生素抗性Tab.5 Antibiotics resistance of ZJ-T and ZJ-T- Δ srvg17985

抗生素 antibiotic	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$ concentration	抑菌圈直径/mm size of inhibition zone	
		ZJ-T	ZJ-T- Δ srvg17985
林可霉素 lincomycin	2	0.00/R	0.00/R
万古霉素 vancomycin	30	0.00/R	0.00/R
克林霉素 clindamycin	2	0.00/R	0.00/R
氯霉素 chloramphenicol	300	21.00±1.41/S	20.00±0.00/S
氨苄青霉素 ampicillin	10	0.00/R	0.00/R
苯唑西林 oxacillin	1	0.00/R	0.00/R
哌拉西林 piperacillin	100	0.00/R	0.00/R
卡那霉素 kanamycin	30	0.00/R	0.00/R
青霉素-G penicillin-G	10	0.00/R	0.00/R
头孢唑啉 cefazolin	30	11.00±1.41/R	11.00±1.41/R
妥布霉素 tobramycin	10	12.50±0.71/I	12.67±2.31/I
新霉素 neomycin	30	13.67±2.52/I	15.00±2.65/I
新生霉素 novobiocin	30	21.00±5.66/S	20.50±4.95/S
四环素 tetracycline	30	15.67±6.03/I	16.33±3.06/I
红霉素 erythromycin	15	12.00±2.65/R	14.00±1.41/I
麦迪霉素 medemycin	30	11.50±0.71/R	12.50±3.54/R
多粘菌素B polymyxin B	300	12.33±2.31/S	14.00±2.83/S
多西环素 doxycycline	30	19.50±3.54/S	20.00±2.83/S
乙酰螺旋霉素 acetylspiramycin	30	0.00/R	0.00/R
大观霉素 spectinomycin	100	10.33±1.53/R	11.00±1.41/R
米诺霉素 minocycline	30	24.00±5.66/S	25.50±4.95/S
头孢克肟 cefixime	5	10.67±1.53/R	12.00±4.24/R
阿莫西林 amoxicillin	10	0.00/R	0.00/R
阿奇霉素 azithromycin	15	0.00/R	0.00/R
克拉霉素 clarithromycin	15	12.33±0.58/R	11.00±1.73/R
罗红霉素 roxithromycin	15	11.00±1.41/R	10.67±0.58/R
替考拉宁 teicoplanin	30	0.00/R	0.00/R
磷霉素 fosfomycin	200	17.33±2.31/S	18.00±1.41/S
链霉素 streptomycin	300	11.33±1.53/S	11.00±1.41/S
庆大霉素 gentamicin	120	18.00±4.36/S	17.00±1.73/S

注: S. 敏感; I. 中介; R. 耐药

Note: S. susceptible; I. intermediate; R. resistance to drug

前,已有小RNA被报道参与调控细菌的运动性和铁代谢等,进而影响细菌致病性。如Ryan等^[23]发现小RNA Dsra的缺失导致肠道沙门氏菌(*Sal-*

monella enterica)运动性减弱,同时毒力降低;Wagner和Romby^[2]发现小RNA RyhB感受到环境中铁离子浓度下降时,通过下调相关基因的表达,

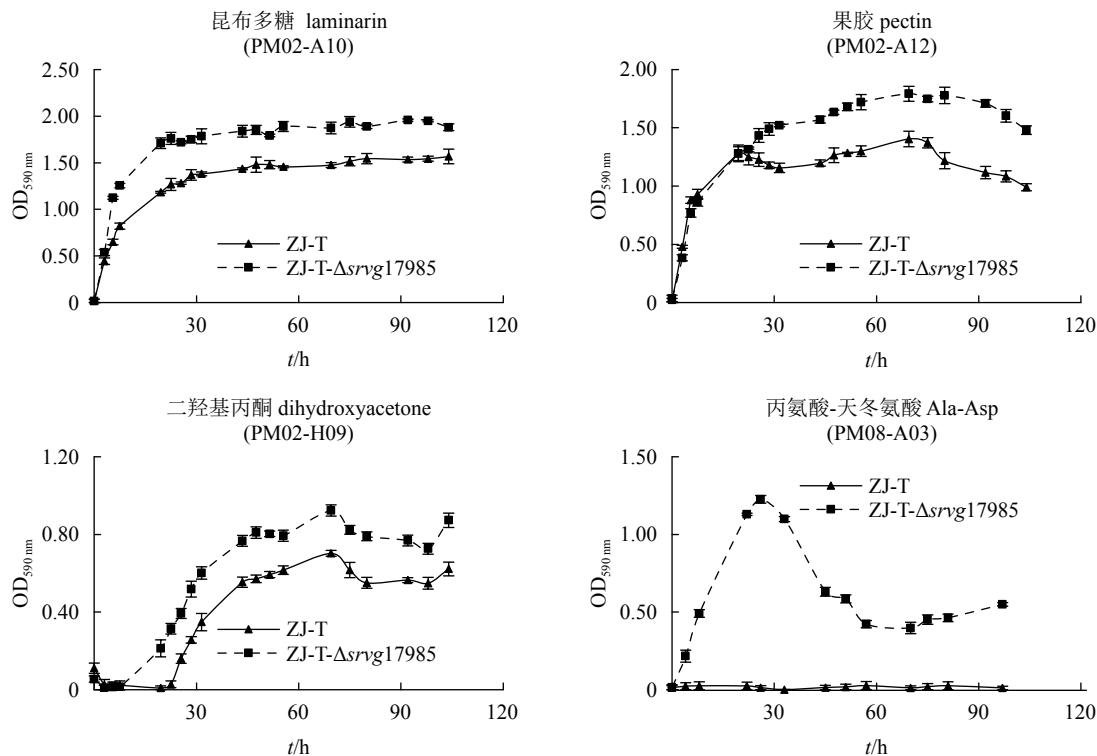


图8 *srvg17985*缺失对昆布多糖、果胶、二羟基丙酮以及丙氨酸-天冬氨酸代谢的影响
误差线对应于标准偏差

Fig.8 Effect of *srvg17985* deletion on metabolism of laminarin, pectin, dihydroxyacetone or Ala-Asp
Error bars correspond with standard deviations.

从而调控细菌的摄铁系统,进而影响其致病性。而本研究发现小 RNA *srvg17985* 缺失后不影响溶藻弧菌的运动性、胞外蛋白酶分泌以及对铁的吸收代谢,因此, *srvg17985* 很可能不通过类似小 RNA *DsrA* 和 *RyhB*等方式调控溶藻弧菌的致病性,但其对溶藻弧菌致病性是否具有调控作用,仍需进一步通过细胞感染实验以及宿主攻毒实验等进行验证。

抗生素的滥用导致细菌耐药性增加,细菌耐药性是细菌对抗菌药物的自然反应,是对环境的一种适应。小 RNA 作为细菌广泛存在的调节元件,调节细菌对抗生素的适应性而介导细菌耐药。Guo 等^[24]发现,在大肠杆菌中,小 RNA *ralR* 及其靶基因 *ralA* 双缺失后,对磷霉素的敏感性显著增强; Moon 等^[25]发现,小 RNA *mgrR* 负调控耐药相关基因 *eptB*,从而影响对两性霉素 B 的耐药性。本研究发现,溶藻弧菌野生株和小 RNA *srvg17985* 缺失株对测定的多种抗生素均具有抗性,且两者对测定的 30 种抗生素具有相似的抗菌谱,因此 *srvg17985* 并不通过调控溶藻弧菌对这些抗生素的耐药性,影响其对环境的适应。

代谢调控是细菌适应环境变化的另一策略,而小 RNA 也被报道参与细菌代谢调控。如 Spot 42 调控细菌对葡萄糖、L-果糖、D-木糖、D-丹麦醇、N-乙酰神经氨酸和 L-乳酸等的吸收和代谢^[4,26]; GcvB 与细菌甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸以及某些二肽和寡肽的转运和代谢密切相关^[27-28]。本研究发现,小 RNA *srvg17985* 缺失后,溶藻弧菌对昆布多糖、果胶以及二羟基丙酮的利用增强,并且变得可利用丙氨酸-天冬氨酸作为氮源。

昆布多糖是吡喃葡萄糖以 1, 3-糖苷键结合而成的多糖,是最丰富的碳源之一,大约 13% 的原核生物能够以昆布多糖作为单一碳源生长^[29],因此,昆布多糖的代谢对海洋细菌的生长至关重要。果胶是一类以 D-半乳糖醛酸为主,并由少量 D-半乳糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、L-岩藻糖等多达 12 种的单糖组成的杂多糖^[30]。而二羟基丙酮为单糖中非还原性丙糖中的一种,是最简单的酮糖。目前为止,未见小 RNA 对昆布多糖、果胶及二羟基丙酮代谢调控的报道。本研究首次发现,小 RNA

srvg17985 缺失后对三者的利用增强,因此,其可能负调控三者的转运、多糖分解为单糖、以及分解为单糖后的降解代谢等过程。分析溶藻弧菌ZJ-T基因组序列发现,其基因组上存在100多个碳转运和降解相关的基因,参与果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢和柠檬酸循环等过程^[31]。*srvg17985*很可能与其中某些基因的mRNA作用,影响其表达,从而调控溶藻弧菌碳转运和降解,具体调控机制还需进一步研究。此外,溶藻弧菌对二羟基丙酮利用的吸光度在约70 h处出现下降,其后在大约100 h处又出现上升的趋势。吸光度的大小与培养液中悬浮物,如活菌、死菌、裂解细菌以及微生物分泌物等的量有关^[32]。因此,此消彼长的状态很可能是培养后期,细菌的繁殖、死亡、裂解以及分泌物数量交替变化较大,导致吸光度测定此起彼伏,但是其具体的代谢特性可结合活菌计数等进一步研究^[32]。

氨基酸作为蛋白质的基本骨架、酶的主要成分,参与能量供给、酶催化、碳氮代谢等几乎所有生命活动,其精细调控对细菌生命活动具有重要意义。本研究发现,溶藻弧菌野生株ZJ-T不能利用丙氨酸-天冬氨酸二肽,但*srvg17985*缺失后可利用丙氨酸-天冬氨酸作为氮源生长。笔者前期研究发现,溶藻弧菌野生株ZJ-T可利用丙氨酸和天冬氨酸单一氨基酸作为单一碳氮源生长^[17]。因此,*srvg17985*很可能通过调控丙氨酸-天冬氨酸二肽的转运以及分解成单一氨基酸的过程,从而影响细菌生长,而不参与调控二肽分解为单一氨基酸后的降解代谢。基因组序列分析发现,溶藻弧菌ZJ-T基因组上存在多个寡肽转运蛋白,如BAU10_05965、BAU10_05980和BAU10_15980^[31],但*srvg17985*具体调控的靶标基因及其调控机制需进一步深入研究。

本研究首次对溶藻弧菌小RNA*srvg17985*的环境适应调控功能进行分析,实验结果丰富了溶藻弧菌小RNA的调控研究。结果表明*srvg17985*参与调控溶藻弧菌对昆布多糖、果胶、二羟基丙酮以及丙氨酸-天冬氨酸的代谢,但其调控机制未知。因此,下一步笔者将利用IntaRNA和TargetRNA2等软件进行靶标预测,并结合转录组差异表达谱分析,挖掘*srvg17985*调控的可能靶标基因,进一步通过凝胶迁移结合(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验、双质粒荧光报告基因相互作用

检测系统等鉴定*srvg17985*与靶标基因的相互作用机制,从而阐明*srvg17985*对溶藻弧菌碳氮代谢的基因调控作用,从小RNA角度揭示溶藻弧菌的环境适应性。

参考文献:

- 1] STORZ G, VOGEL J, WASSARMAN K M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J]. Mol Cell, 2011, 43(6): 880-891.
- [2] WAGNER E G, ROMBY P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it[J]. Adv Genet, 2015, 90: 133-208.
- [3] LIU J M, CAMILLI A. A broadening world of bacterial small RNAs[J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(1): 18-23.
- [4] NGUYEN A N, JACQ A. Small RNAs in the Vibrionaceae: an ocean still to be explored[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014, 5(3): 381-392.
- [5] HUANG L, HU J, SU Y, et al. Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs related to the adhesion process in *Vibrio alginolyticus* using high-throughput sequencing[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 619.
- [6] DENG Y, SU Y, LIU S, et al. Identification of a novel small RNA *srvg23535* in *Vibrio alginolyticus* ZJ-T and its characterization with phenotype microarray technology[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1-13.
- [7] MUKHERJI A, SCHROEDER S, DEYLING C, et al. An unusual source of *Vibrio alginolyticus*-associated otitis: prolonged colonization or freshwater exposure[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 126(6): 790-791.
- [8] JACOBS SLIFKA K M, NEWTON A E, MAHON B E. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988-2012[J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(7): 1491-1499.
- [9] CHANG C, JIN X, CHAOQUN H. Phenotypic and genetic differences between opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus*[J]. Biofouling, 2009, 25(6): 525-531.
- [10] SOLANO C, ECHEVERZ M, LASA I. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 18(4): 96-104.
- [11] ALONSO C R. Post-transcriptional gene regulation via RNA control[J]. Brief Funct Genomics, 2013, 12(1): 1-2.
- [12] WANG Z, SUN X, ZHAO Y, et al. Evolution of gene regulation during transcription and translation[J]. Genome Biol Evol, 2015, 7(4): 1155-1167.
- [13] HUANG X, CHEN C, REN C, et al. Identification and characterization of a locus putatively involved in colanic acid biosynthesis in *Vibrio alginolyticus* ZJ-51[J]. Biofouling, 2018, 34(1): 1-14.
- [14] LE R F, BINESSE J, SAULNIER D, et al. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(3): 777-784.

- [15] NGUYEN A N, DISCONZI E, CHARRIÈRE G M, et al. *csrB* gene duplication drives the evolution of redundant regulatory pathways controlling expression of the major toxic secreted metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32[J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00582-18.
- [16] VAL M E, SKOVGAARD O, DUCOS-GALAND M, et al. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues[J]. *PLoS genetics*, 2012, 8(1): e1002472.
- [17] DENG Y Q, CHEN C, ZHAO Z, et al. The RNA chaperone Hfq is involved in colony morphology, nutrient utilization and oxidative and envelope stress response in *Vibrio alginolyticus*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163689.
- [18] BOCHNER B R, GADZINSKI P, PANOMITROS E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function[J]. *Genome Res*, 2001, 11(7): 1246-1255.
- [19] GRIPENLAND J, NETTERLING S, LOH E, et al. RNAs: regulators of bacterial virulence[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(12): 857-866.
- [20] HAIKO J, WESTERLUND-WIKSTRÖM B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence[J]. *Biology (Basel)*, 2013, 2(4): 1242-1267.
- [21] PAJUELO D, LEE C T, ROIG F J, et al. Novel host-specific iron acquisition system in the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*[J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17(6): 2076-2089.
- [22] CHANG S C, LEE C Y. OpaR and RpoS are positive regulators of a virulence factor PrtA in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology*, 2018, 164(2): 221-231.
- [23] RYAN D, OJHA U K, JAISWAL S, et al. The small RNA DsrA influences the acid tolerance response and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 599.
- [24] GUO Y, QUIROGA C, CHEN Q, et al. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10): 6448-6462.
- [25] MOON K, SIX D A, LEE H J, et al. Complex transcriptional and post-transcriptional regulation of an enzyme for lipopolysaccharide modification[J]. *Mol Microbiol*, 2013, 89(1): 52-64.
- [26] BEISEL C L, STORZ G. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*[J]. *Mol Cell*, 2011, 41(3): 286-297.
- [27] URBANOWSKI M L, STAUFFER L T, STAUFFER G V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(4): 856-868.
- [28] PULVERMACHER S C, STAUFFER L T, STAUFFER G V. Role of the *Escherichia coli* Hfq protein in GcvB regulation of *oppA* and *dppA* mRNAs[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 1): 115-123.
- [29] ALDERKAMP A C, van RIJSSEL M, BOLHUIS H. Characterization of marine bacteria and the activity of their enzyme systems involved in degradation of the algal storage glucan laminarin[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 59(1): 108-117.
- [30] MOHNEN D. Pectin structure and biosynthesis[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(3): 266-277.
- [31] DENG Y, CHEN C, ZHAO Z, et al. Complete genome sequence of *Vibrio alginolyticus* ZJ-T[J]. *Genome Announc*, 2016, 4(5): e00912-e00916.
- [32] 杜青平, 王倩, 曹立创, 等. 悬浮物变化引起细菌 JS17 生长曲线的波动规律[J]. 广东工业大学学报, 2012, 29(3): 77-80.