

哈维弧菌 *vhh* 基因缺失株的构建及其相关生物学特性研究

张亚秋^{1,2,3}, 邓益琴^{2,3}, 冯娟^{2,3}, 毛灿^{1,2,3}, 胡建美^{1,2}, 苏友禄^{2,4}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 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; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心, 海南三亚 572018; 4. 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心/仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东广州 510225)

摘要: 哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是水生动物的重要病原, 为研究哈维弧菌溶血素基因 *vhh* 缺失后对其生物学特性的影响, 该研究利用同源重组技术构建了 *V. harveyi* 345 的 *vhh* 基因缺失突变株, 并比较了野生株和突变株的生物学特性变化。结果显示, *vhh* 基因的缺失不影响菌株的生长、胞外蛋白酶分泌、过氧化氢 (H₂O₂) 和铜离子 (Cu²⁺) 的压力感应、铁的吸收利用、15 种抗生素抗性和生物膜形成等生物学特性, 但会导致菌株游动和涌动显著增强; 另发现, *vhh* 基因虽然在野生菌株内高表达, 对绵羊红细胞却未表现出溶血活性。结果表明该基因负调控着菌株的运动能力。该研究为认识哈维弧菌 *vhh* 基因功能研究提供新的资料。

关键词: 哈维弧菌; 溶血素基因 *vhh*; 基因敲除; 生物学特性; 细菌运动性

中图分类号: Q 933

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Construction of knock-out mutant of *vhh* in *Vibrio harveyi* and its related biological characteristics analysis

ZHANG Yaqui^{1,2,3}, DENG Yiqin^{2,3}, FENG Juan^{2,3}, MAO Can^{1,2,3}, HU Jianmei^{1,2}, SU Youlu^{2,4}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Development & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China; 3. Tropical Fisheries Research and Development Center, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China; 4. College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering/Guangdong Water Environment and Aquatic Product Safety Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510225, China)

Abstract: *Vibrio harveyi* is an important pathogen of aquatic animals. In order to study the biological characteristics of the strain after the absence of hemolysin gene *vhh*, the knock-out mutant of *vhh* in *V. harveyi* was constructed by homologous recombination technique. Moreover, the biological characteristics of the wild type strain and the mutant strain were compared. The results show that the deletion of *vhh* gene did not affect the growth of the strain, neither the secretion of extracellular protease, the stress response to H₂O₂ and Cu²⁺, the uptake and utilization of iron, and the 15 antibiotics resistance and biofilm formation, but it caused the strain to swim and surge significantly. In addition, although *vhh* was highly expressed in the wild type strain, the strain did not show hemolytic activity. The results indicate that *vhh* negatively regulates the bacterial motility. The study provides novel information for understanding the function of *vhh* gene in *V. harveyi*.

收稿日期: 2019-10-24; 修回日期: 2019-12-03

资助项目: 海南省自然科学基金青年基金 (319QN336); 国家自然科学基金 (31902415); 广东省自然科学基金 (2018A030310695; 2019A1515011833)

作者简介: 张亚秋 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物病原学。E-mail: 2810207431@qq.com

通信作者: 苏友禄 (1981—), 男, 博士, 副研究员, 从事水产动物免疫与防治技术研究。E-mail: suyoulu@scsfri.ac.cn

Key words: *Vibrio harveyi*; Hemolysin gene *vhh*; Gene knockout; Biological characteristics; Bacterial motility

哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 呈短杆状, 为革兰氏阴性菌, 能够感染无脊椎动物^[1]、脊椎动物以及人类^[2]。它是海水养殖动物的常见致病菌, 曾引起点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[3]、中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)^[4] 等多种鱼类大量死亡, 造成巨大经济损失^[5]。哈维弧菌黏附在宿主表面后会产生物膜, 在多种毒力因子参与下入侵到宿主体内, 引起发病^[6]。目前发现, 哈维弧菌的毒力因子包括细胞外产物、膜蛋白、生物膜、黏附素及多种分泌系统等^[7]。

溶血素 (Hemolysin) 是细菌的一种重要毒力因子, 其能溶解宿主红细胞膜, 导致红细胞内容物溢出, 引起溶血现象, 在感染过程中发挥重要作用^[8]。弧菌溶血素主要包括热稳定性直接溶血素 (Tdh)、热稳定性溶血素 (δ -Vph)、热不稳定性溶血素 (Tlh) 和 E1 Tor 溶血素 (HlyA)^[9]。哈维弧菌溶血素 (Vhh) 是 Tlh 家族的成员^[10], 它是一种单体蛋白, 分子量约为 44.3 kD^[11], 具有溶血磷脂酶活性^[12]。Vhh 的氨基酸序列与副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) Tlh 溶血素^[13]、创伤弧菌 (*V. vulnificus*) 磷脂酶 VpL (Genbank AF291424)、拟态弧菌 (*V. mimicus*) 卵磷脂酶 (pHL)^[14] 和霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 卵磷脂酶 (Lec)^[15] 的序列相似性分别为 85.6%、75.6%、65.3% 和 64.3%。

国内外学者对 Vhh 做了相关的功能研究, Bai 等^[11] 纯化了 Vhh 蛋白, 研究其对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 鳃细胞和红细胞的影响; Zhong 等^[12] 通过大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达

Vhh, 研究了不同温度和 pH 对其溶血活性、磷脂酶活性、细胞毒性及对鱼体致病性的影响。上述研究集中在体外活性检测, 仍缺乏对 *vhh* 基因在菌体内作用机制的认识。本研究通过同源重组方法构建哈维弧菌 *vhh* 基因缺失突变株, 并分析缺失株相关的生物学特性, 为进一步了解 *vhh* 的基因功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物 哈维弧菌 *V. harveyi* 345、自杀质粒 pSW7848^[16]、大肠杆菌 *E. coli* Π 3813^[17] 以及大肠杆菌 *E. coli* GEB883^[18] 保存于本实验室; 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 大肠杆菌 *E. coli* Π 3813 生长所需的 2'-Deoxythymidine (Thy) 以及用于铁离子吸收测试的 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; 反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 和荧光定量反应试剂盒 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus), 购自 TaKaRa Bio Inc (日本); 抗生素纸片, 购自杭州天和微生物试剂有限公司; PBS 缓冲液, 购自赛默飞世尔 (苏州) 仪器有限公司; 脱纤维绵羊红细胞, 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 主要培养基 LB (Luria-bertani) 培养基购自广东环凯生物科技有限公司。1 L LB 含胰蛋白胍

表1 本研究所用菌株和质粒
Table 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 Strain		
<i>V. harveyi</i> 345	分离自中国南部沿海患病石斑鱼肾脏	NCBI database CP025537.1-CP025540.1
<i>V. harveyi</i> 345- Δ <i>vhh</i>	<i>V. harveyi</i> 345缺失 <i>vhh</i> 基因	本文构建
<i>E. coli</i> Π 3813	lacIQ, <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA462</i> , <i>zei298::Tn10</i> [Tc], Δ <i>thyA::erm-pir116</i> ; 自杀质粒pSW7848的中间宿主;	文献[17]
<i>E. coli</i> GEB883	大肠杆菌野生株K12 Δ <i>dapA::ermpir</i> RP4-2 Δ <i>recA</i> gyrA462, <i>zei298::Tn10</i> ; 接合作用供体菌	文献[18]
质粒 Plasmid		
pSW7848	氯霉素抗性; 自杀质粒, R6K起点, 复制需要Pir蛋白, 具 <i>ccdB</i> 毒性基因	文献[16]
pSW7848- Δ <i>vhh</i>	氯霉素抗性; 包括 <i>vhh</i> 的上下游同源臂	本文构建

表2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	用途 Application
pSW7848-F	GTCTGATTCGTTACCAATTATGACAAC	扩增pSW7848片段
pSW7848-R	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC	
<i>vhh</i> -UP-F	aagcttgatategaattcTACCGTGAGCGTTGTTATTAC	扩增 <i>vhh</i> 上游片段
<i>vhh</i> -UP-R	ctctggatGATTCACTCTCTGTGATGATTATC	
<i>vhh</i> -DOWN-F	gagtgaatcATCCAGAGCAACACGGTTTTG	扩增 <i>vhh</i> 下游片段
<i>vhh</i> -DOWN-R	ttgtaacgaatcagacAAGATTGATGTTTTCTATTGAGACACAAAAG	
Del-check-pSW7848-F	TCACTGTCCTTATTTCGCACC	验证pSW7848重组质粒是否构建成功
Del-check-pSW7848-R	CTGCTTTTGAGCACTACCCG	
Δ <i>vhh</i> -check-F	TTGAAAGTTGAACGCGGTAC	检验 <i>vhh</i> 基因是否敲除成功
Δ <i>vhh</i> -check-R	GAGGTATGTCTTGAGAGGTCAA	
<i>gyrA</i> -354-F	AGGTGTTGCGGTATGAAGC	荧光定量管家基因 <i>gyrA</i> 扩增
<i>gyrA</i> -354-R	CGTTGGGTATTCGGCTAGTTC	
<i>uvrA</i> -354-F	ATCGTGGTGACATTCGCGTT	荧光定量管家基因 <i>uvrA</i> 扩增
<i>uvrA</i> -354-R	TCGCAAGCTCTTCACGTACC	
<i>recA</i> -354-F	TGCACGTTCTGGTGCTATTG	荧光定量管家基因 <i>recA</i> 扩增
<i>recA</i> -354-R	AGCTTACGCATCGCTTGAGA	
<i>k14645</i> -354-F	ATAACGCCTTTGATGCCTTCC	荧光定量 <i>vhh</i> 上游基因 <i>k14645</i> 扩增
<i>k14645</i> -354-R	AACGATCTGAGTGTAACCGAGT	
<i>vhh</i> -F	CACTTATGTCCGCTGCTGGTAC	荧光定量 <i>vhh</i> 基因扩增
<i>vhh</i> -R	CTTGAAAAGAAACCGAACTCCAC	
<i>na</i> -F	CAGAAATCACTAAGCGAGCGACAT	荧光定量 <i>vhh</i> 下游基因 <i>na</i> 扩增
<i>na</i> -R	GTGCGTTTAACTCATCCAACAAGG	

10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 (NaCl) 10 g。1 L 固体培养基含琼脂 15 g。在 LB 培养基基础上将 NaCl 质量浓度提高到 30 g·L⁻¹ 即配制得到 LBS (Luria-bertani-salt) 培养基。

1.2 方法

1.2.1 *vhh* 基因序列分析 将本实验室 *V. harveyi* 345 基因组测序获得的 *vhh* 基因 (CU052_24955) ORF 序列^[19] 进行 BLAST 分析, 选取其在不同细菌中的同源序列进行多序列比对, 并用 MEGA 7.0 软件采用 NJ 邻接法构建系统进化树。

1.2.2 *vhh* 缺失株的构建 构建 *vhh* 缺失株参考 Deng 等^[20] 的方法并进行了相关修改, *vhh* 的序列在 NCBI 数据库下载 (登陆号 CU052_24955), 扩增线性化自杀质粒 pSW7848 使用引物对 pSW7848-F/R, 扩增上下游同源臂片段使用引物对 *vhh*-UP-F/R 和 *vhh*-DOWN-F/R, 等温组装线性化质粒片段和上下游同源臂片段, 对重组自杀质粒进行 PCR 和测序检测使用引物对 Del-check-pSW7848-

F/R, 组装成功的质粒大小约为 5.3 kb, 将其命名为 pSW7848- Δ *vhh*。然后重组自杀质粒 pSW7848- Δ *vhh* 通过接合作用将供体菌大肠杆菌 GEB883-pSW7848- Δ *vhh* 送入到受体菌哈维弧菌野生株 *V. harveyi* 345。基于自杀质粒 pSW7848 在哈维弧菌中不能复制, 具有氯霉素抗性, 毒性基因 *ccdB* 能够在受阿拉伯糖诱导后表达的特点, 使用氯霉素筛选后, 重组质粒和哈维弧菌基因组上的 *vhh* 上下游同源臂的相同片段发生第一次同源重组; 使用阿拉伯糖进行第二次筛选, 其发生第二次同源重组, 最终获得 *vhh* 缺失株, 将其命名为 *V. harveyi* 345- Δ *vhh*。重组自杀质粒构建和同源重组筛选缺失突变株流程见图 1。

1.2.3 *vhh* 基因及其上下游基因转录水平分析 挑取野生株 *V. harveyi* 345 和突变株 *V. harveyi* 345- Δ *vhh* 于 28 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养 16 h 过夜, 稀释至 OD₆₀₀ 为 0.01, 培养至对数早期 (OD₆₀₀=0.5)。RNAiso Plus 裂解细菌, 提取总 RNA, 并将

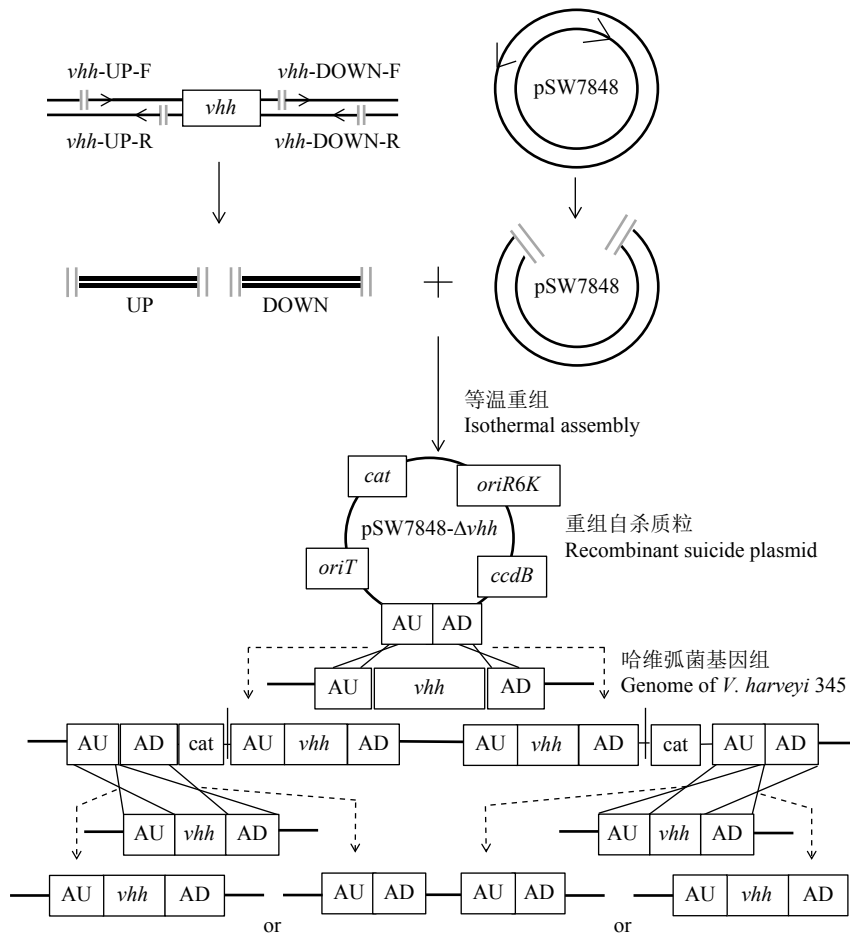


图1 重组自杀质粒构建和缺失突变株筛选流程

AU. 上游; AD. 下游

Figure 1 Recombinant suicide plasmid construction and deletion mutant screening process

AU. Up stream; AD. Down stream

其进行反转录。利用 SYBR Premix Ex TaqTM II 进行荧光定量 PCR 扩增, 特异性引物 (表 2) 分别检测 *vhh* 上游丝氨酸蛋白酶基因 *K14645*、溶血素基因 *vhh* 和 *vhh* 下游未知功能基因 *na* 的表达水平, 3 个管家基因 (*recA*、*uvrA* 和 *gyrA*) 作为内参。对每个单菌落进行 3 次技术重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[21] 分析各基因的相对表达量。

1.2.4 菌株生长测试 将 *V. harveyi* 345 和缺失突变株 *V. harveyi* 345- Δvhh 的单克隆分别接种至 LBS 液体培养基, 于 28 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养 16 h 过夜, 稀释 1 000 倍于无菌锥形瓶中, 在相同条件下培养, 利用分光光度计 (BIO-RAD Smart-SpecTM Plus) 测定不同时间点下细菌的 OD₆₀₀, 绘制生长曲线。

1.2.5 对绵羊红细胞的溶血活性测定 同 1.2.4 过夜培养菌液, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。加 PBS 洗涤, 离心后弃上清, 重复两次。用 PBS

配置成 4% 绵羊红细胞悬液。参照 Takahiro 等^[22] 方法稍作改变, 将过夜培养的 *V. harveyi* 345 和 *V. harveyi* 345- Δvhh 用 PBS 洗涤并调到吸光度 OD₆₀₀ 为 3.0。取 50 μL 菌液加入到 500 μL 4% 脱纤维绵羊红细胞中, 混匀后放置 28 °C 孵育 5 h。然后 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 取 200 μL 上清液测 OD₆₀₀, 分别加入 PBS 和 ddH₂O 作为阴性和阳性对照, 溶血活性以样品相对于阳性对照 OD₆₀₀ 比值表示。

1.2.6 游动性和涌动性测试 同 1.2.4 过夜培养菌液, 用 LBS 培养基将其调整到吸光度 OD₆₀₀ 为 3.0, 取 3 μL 点样到含 0.3% 琼脂和 1.5% 琼脂的 LBS 平板上测试其游动性及涌动性, 进行 3 次技术重复, 放置 28 °C 分别培养 16 h 和 24 h, 记录菌斑直径。

1.2.7 胞外蛋白酶分泌测试 同 1.2.4 过夜培养菌液, 同 1.2.6 调整培养液吸光度, 取 3 μL 点样到

LBS 平板 (含 1.5% 脱脂奶粉) 上, 进行 3 次技术重复, 放置 28 °C 培养 24 h, 测量菌落直径以及蛋白质透明分解圈直径, 蛋白质透明分解圈直径与菌落直径的比值表示蛋白酶的分泌能力。

1.2.8 对过氧化氢 (H_2O_2)、铜离子 (Cu^{2+}) 抗性以及对铁离子的吸收测试 参照 Deng 等^[23-24] 的方法, 稍作改变, 同 1.2.4 过夜培养菌液, 同 1.2.6 调整培养液吸光度, 用 LBS 培养基将其稀释到最高倍数 10^8 , 取 3 μ L 点样到 3 种 LBS 平板 [分别含有 0.000 2% H_2O_2 、0.2 mmol·L⁻¹ 硫酸铜 ($CuSO_4$) 和 120 μ mol·L⁻¹ DIP] 上, 不含添加剂的 LBS 平板作为对照, 放置 28 °C 培养 24 h。查看各平板上的菌株生长情况。

1.2.9 抗生素的敏感性测试 同 1.2.4 过夜培养菌液, 取 600 μ L 于 10 mL 0.9% 生理盐水中, 全部倾入平板中润湿培养基表面, 弃去菌液, 静置 10 min, 将各抗生素纸片置于晾干的平板上, 放置 28 °C 培养 24 h, 记录抑菌圈直径。

1.2.10 生物膜测试 同 1.2.4 过夜培养菌液, 同 1.2.6 调整培养液吸光度, 生物膜测试参考顾丹^[25] 的方法, 取 50 μ L 菌液接种到装有 5 mL 的 LBS 液体培养基的无菌玻璃试管中, 放置 28 °C 培养 48 h

后, 加入 200 μ L 结晶紫染色 5 min, 将菌液倒掉并用水反复冲洗几次, 加入 200 μ L 33% 冰乙酸溶解结晶紫, 充分溶解后, 吸取 200 μ L 至 96 孔板, 利用酶标仪 (SUNRISE 吸光酶标仪) 在 600 nm 处测定其吸光值。

1.2.11 数据处理与分析 利用软件 IBM SPSS Statistics 19 统计分析实验数据, 显著性差异用 $P < 0.05$ 表示。

2 结果

2.1 *vhh* 系统进化

哈维弧菌 *V. harveyi* 345 溶血素基因 *vhh* 片段大小为 1 257 bp, 编码 419 个氨基酸; 将 *vhh* 核苷酸序列与其他弧菌溶血素核苷酸序列用 MEGA7.0 构建 NJ 系统进化树 (图 2)。结果显示哈维弧菌 *V. harveyi* 345 (*vhh*) 和哈维弧菌 *V. harveyi* GDH 11388 (*vhhA*)、哈维弧菌 *V. harveyi* ATCC 35084 (*vhhB*) 同源性最高, 聚为一支, 与创伤弧菌 *V. vulnificus* (*vpl*)、溶藻弧菌 *V. alginolyticus* R4 (*tlh*) 和霍乱弧菌 *V. cholerae* (*lec*) 均有较高的同源性, 但与霍乱弧菌 *V. cholerae* (*hlyA*) 同源性较低。

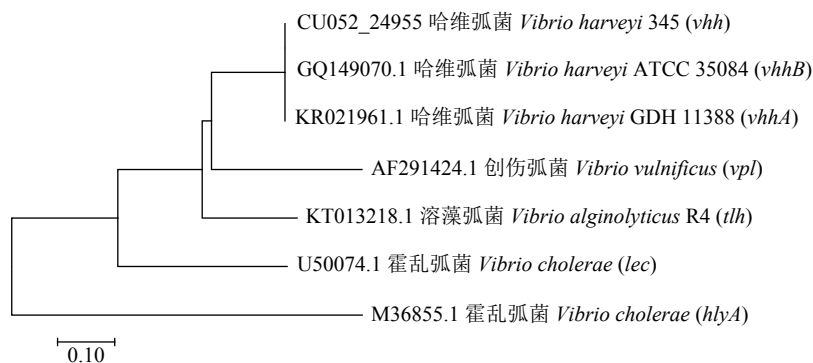


图 2 利用 MEGA 7.0 构建的 *vhh* 基因的核苷酸序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of nucleotide sequence of *vhh* gene by MEGA 7.0

2.2 构建 *vhh* 缺失突变株

扩增得到的线性化质粒片段大小约 3.3 kb, 上下游同源臂片段大小均约为 1 kb (图 3-a、图 3-b), 等温组装质粒线性化片段和上下游同源臂片段后, PCR 扩增出 2 307 bp 的片段 (图 3-c), 重组质粒 pSW7848- Δ *vhh* 构建成功。重组自杀质粒上的 *vhh* 上下游同源臂片段通过接合作用与野生株 *V. harveyi* 345 的 *vhh* 上下游同源臂片段发生两次同源交换, 这可能使染色体上的 *vhh* 缺失, 利用引物

对 Δ *vhh*-check-F/R 分别对野生株和 *vhh* 缺失株进行 PCR 检测, 电泳结果分别出现 1 658 bp 和 628 bp 两条带 (图 3-d), 测序发现 *vhh* 序列成功缺失, 获得 *vhh* 缺失突变株。

2.3 *vhh* 基因缺失对邻近基因的表达影响

为研究 *vhh* 基因的缺失对邻近基因的 mRNA 相对表达量的变化, 检测上游丝氨酸蛋白酶基因 *k14645*、溶血素基因 *vhh* 和下游未知功能基因 *na*。突变株 *V. harveyi* 345- Δ *vhh* 的 *vhh* 基因未表

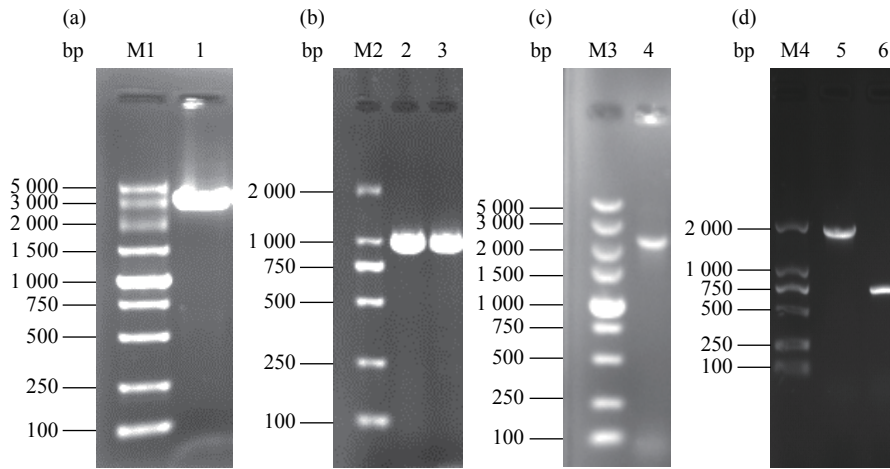


图3 pSW7848 PCR线性片段 (a)、*vhh*上下游同源臂片段 (b)、重组自杀质粒的PCR鉴定扩增片段 (c) 及*vhh*缺失株的PCR鉴定 (d)

M1. DNA Marker DL5 000; 1. pSW7848 线性片段; M2. DNA Marker DL2 000; 2/3. *vhh* 上/下游片段; M3. DNA Marker DL5 000; 4. 重组子 pSW7848- Δ *vhh* 检测片段; M4. DNA Marker DL2 000; 5. 野生株 *V. harveyi* 345; 6. *vhh* 候选突变株

Figure 3 Linearized segment of pSW7848 (a), upstream and downstream homologous segments of *vhh* (b), segment of identification of recombinant suicide vector by PCR (c) and identification of *vhh* deletion mutant by PCR (d)

M1. DNA Marker DL5 000; Lane 1. Linearized segment of pSW7848; Lane M2. DNA Marker DL2 000; Lane 2/3. Up/down segments of *vhh*; Lane M3. DNA Marker DL5 000; Lane 4. Segment of identification of the recombinant suicide vector by PCR; Lane M4. DNA Marker DL2 000; Lane 5. Wild type *V. harveyi* 345; Lane 6. Deletion candidate of *vhh*

达, 与野生株 *V. harveyi* 345 相比, 表达差异极显著 ($P < 0.01$), *k14645* 和 *na* 基因的表达与野生株相比, 差异不显著 ($P > 0.05$, 图 4)。结果显示, *vhh* 基因缺失不影响邻近基因的表达。

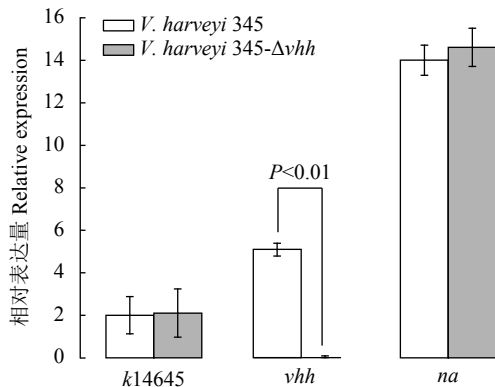


图4 *k14645*、*vhh*和*na*在哈维弧菌*V. harveyi* 345和*V. harveyi* 345- Δ *vhh*中的相对表达量

Figure 4 Relative expression of *k14645*, *vhh* and *na* in *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δ *vhh*

2.4 *vhh* 对哈维弧菌在 LBS 培养基中生长的影响

在 LBS 培养基中, *vhh* 缺失株与野生株生长曲线几乎重合, 缺失株的生长相对野生型无显著差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

2.5 *vhh* 基因缺失对哈维弧菌溶血活性的影响

阳性对照对绵羊红细胞的溶血百分比为 100%, 阴

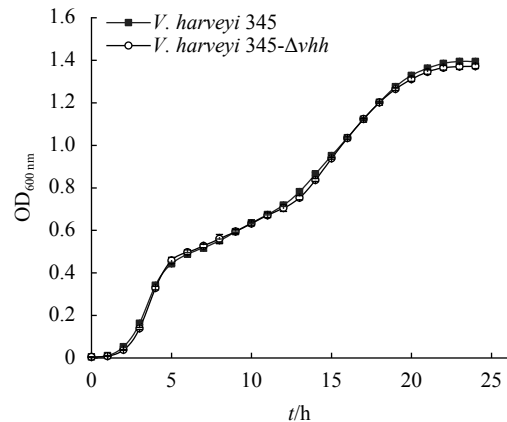


图5 哈维弧菌*V. harveyi* 345和*V. harveyi* 345- Δ *vhh*的生长曲线

Figure 5 Growth curves of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δ *vhh*

性对照几乎没有发生溶血, 均与预期结果一致。通过比较哈维弧菌菌株对绵羊红细胞的溶血百分比, 发现野生株 *V. harveyi* 345 和突变株 *V. harveyi* 345- Δ *vhh* 均无溶血活性, 并且突变株相对野生株对绵羊红细胞的溶血百分比差异不显著 ($P > 0.05$, 图 6)。

2.6 *vhh* 对哈维弧菌运动性的调控

野生株 *V. harveyi* 345 在 0.3% 琼脂 LBS 平板上没有游动, 在 1.5% 琼脂 LBS 平板上也无涌动, 但是突变株 *V. harveyi* 345- Δ *vhh* 在这两种平板上均表现出明显的游动及涌动, 其游动与涌动菌落直径明显变

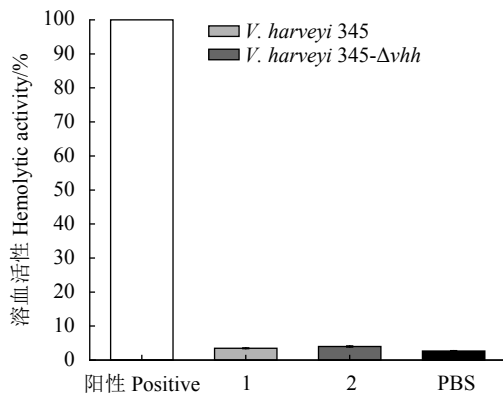


图6 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 的溶血活性测试

Figure 6 Hemolytic activity test of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh

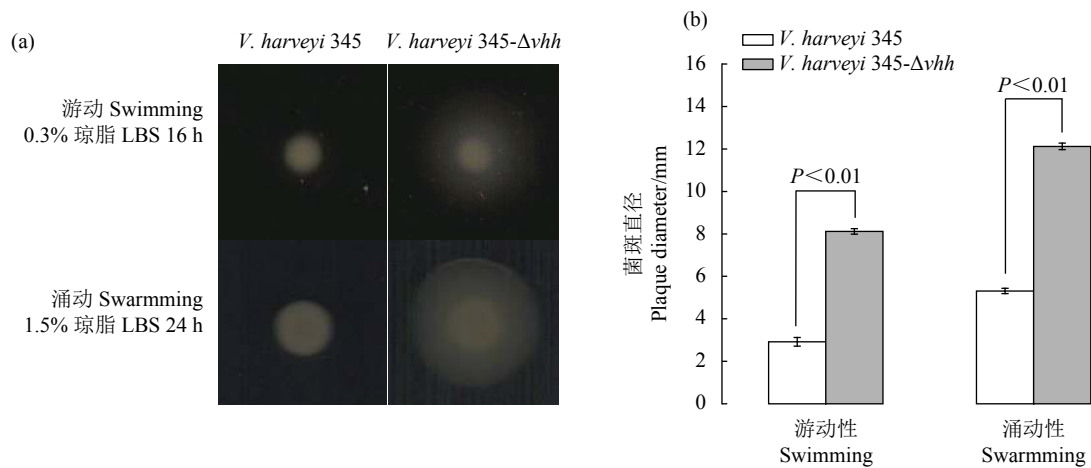


图7 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 在0.3%和1.5%琼脂LBS平板上的运动性 (a) 和统计分析 (b)

Figure 7 Motility of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh on 0.3% and 1.5% LBS agar plates (a) and statistical analysis (b)

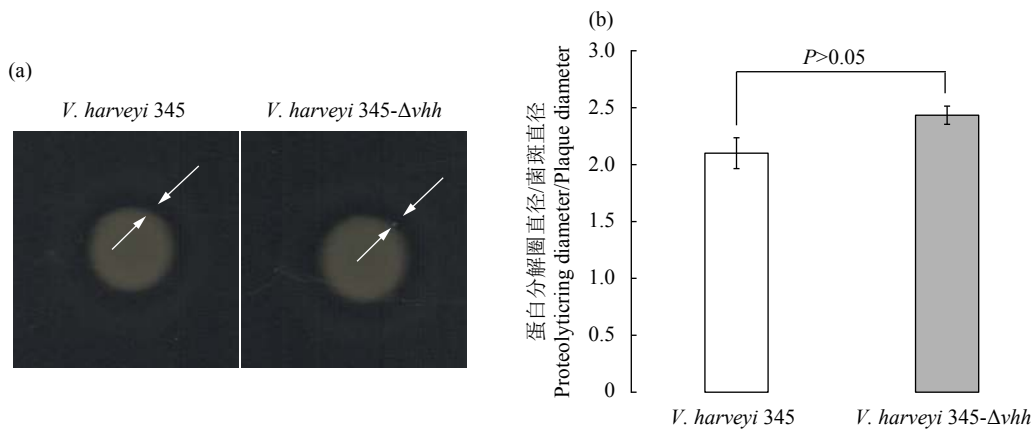


图8 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 在LBS+1.5%脱脂奶粉平板上胞外蛋白酶的分泌 (a) 和统计分析 (b)

内箭头指向菌斑边缘, 外箭头指向蛋白酶分泌圈边缘

Figure 8 Extracellular protease activities of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh mutant on LBS agar plates containing 1.5% 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.

大, 相对野生株差异极显著 ($P < 0.01$, 图 7-a、图 7-b)。

2.7 *vhh* 对哈维弧菌胞外蛋白酶分泌的影响

vhh 缺失后, 在 1.5% 脱脂奶粉 LBS 平板上, 胞外蛋白酶透明分解圈与野生株一致, 缺失株胞外蛋白酶的分泌相对野生株无显著差异 ($P > 0.05$), 说明两者具有相同的胞外蛋白酶分泌能力 (图 8-a、图 8-b)。

2.8 对 H_2O_2 、 Cu^{2+} 抗性以及对铁离子的吸收测试

在添加有 H_2O_2 、 $CuSO_4$ 以及 DIP 的 3 种 LBS 平板上, 随着稀释倍数增加, 突变株和野生株菌落数均减少, 到 10^8 稀释倍数时, 菌落数明显变少; 两者对 H_2O_2 、 $CuSO_4$ 抗性以及对铁离子的获取无显著差异 (图 9)。

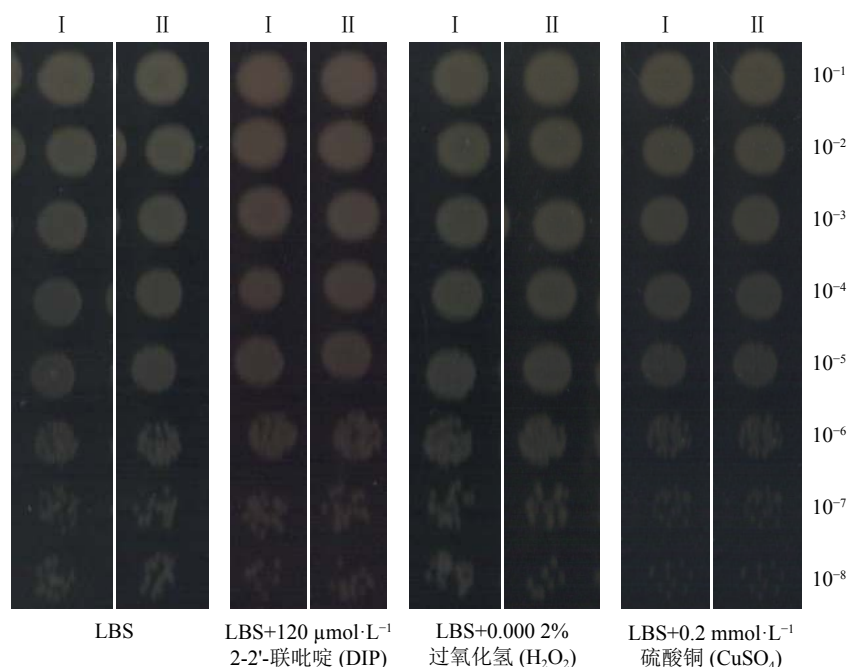


图9 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 对过氧化氢、硫酸铜以及铁离子螯合剂2-2'-联吡啶的敏感性

Figure 9 Sensitivity to H_2O_2 , $CuSO_4$ and DIP of wild type and vhh mutant on LBS plate

I. *V. harveyi* 345; II. *V. harveyi* 345- Δvhh

2.9 vhh 对哈维弧菌抗生素敏感性的影响

野生株和突变株均对利福平、多西环素、万古霉素等5种抗生素耐药，对呋喃唑酮、阿莫西林、氯霉素等6种抗生素敏感。突变株对氟苯尼考敏

感，而野生株则表现中介敏感，但两者的抑菌圈直径差异不显著 ($P>0.05$)；野生株对妥布霉素、庆大霉素和红霉素均敏感，而突变株都表现为中介敏感，两者的抑菌圈直径差异不显著 ($P>0.05$ ，表3)。

表3 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 对各抗生素抗性

Table 3 Antibiotics resistance of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh

抗生素 Antibiotic	浓度 Concentration/ $(\mu g \cdot \text{片}^{-1})$	抑菌圈直径 Size of inhibition zone/mm	
		<i>V. harveyi</i> 345	<i>V. harveyi</i> 345- Δvhh
利福平 Rifampin	5	7.89 \pm 0.60/R	7.89 \pm 0.78/R
多西环素 Doxycycline	30	7.11 \pm 0.33/R	7.00 \pm 0.00/R
万古霉素 Vancomycin	30	0.00/R	0.00/R
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	1.25	0.00/R	0.00/R
四环素 Tetracycline	30	0.00/R	0.00/R
妥布霉素 Tobramycin	10	14.67 \pm 1.32/S	13.22 \pm 0.97/I
氟苯尼考 Florfenicol	30	17.22 \pm 0.67/I	16.78 \pm 2.05/S
庆大霉素 Gentamicin	10	15.67 \pm 1.32/S	14.89 \pm 1.69/I
呋喃唑酮 Furazolidone	100	19.78 \pm 1.39/S	18.00 \pm 2.40/S
阿莫西林 Amoxicillin	20	22.56 \pm 1.67/S	21.00 \pm 1.32/S
氯霉素 Chloramphenicol	30	22.22 \pm 0.97/S	21.89 \pm 1.05/S
红霉素 Ergomycin	15	23.44 \pm 0.53/S	21.22 \pm 1.79/I
麦迪霉素 Medicamycin	30	19.11 \pm 0.33/S	19.00 \pm 1.12/S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	32.33 \pm 1.32/S	32.22 \pm 0.83/S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	28.00 \pm 1.12/S	29.33 \pm 0.50/S

注：S. 敏感；I. 中敏；R. 耐药

Note: S. Susceptible; I. Intermediate; R. Resistance

2.10 *vhh* 对哈维弧菌生物膜形成的影响

野生株 *V. harveyi* 345 和突变株 *V. harveyi* 345- Δvhh 在玻璃试管中静置培养, 发现两者管壁上都形成了少量生物膜, 并且结晶紫染色后的管壁上出

现宽度几乎一样的染色圈; 统计分析结果显示, 突变株 *V. harveyi* 345- Δvhh 的生物膜形成量略微高于野生株 *V. harveyi* 345, 但两者的生物膜形成能力并无显著差异 ($P>0.05$, 图 10-a、图 10-b)。

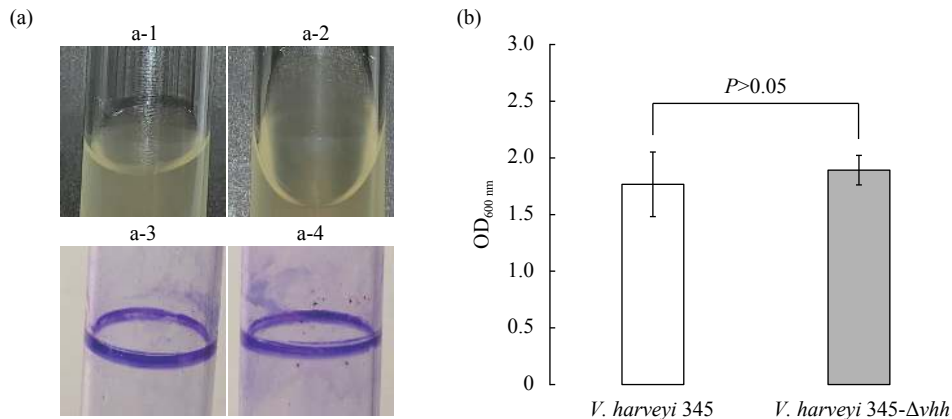


图10 哈维弧菌 *V. harveyi* 345和 *V. harveyi* 345- Δvhh 的生物膜形成能力。

a-1、a-2 分别为 *V. harveyi* 345、*V. harveyi* 345- Δvhh 培养液; a-3、a-4 分别为结晶紫染色;

b. 定量结晶紫染色后聚苯乙烯微量滴定板, OD_{600 nm} 测定生物膜形成量

Figure 10 Biofilm formation ability of *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh

a-1 and a-2 are *V. harveyi* 345 and *V. harveyi* 345- Δvhh culture, respectively; a-3 and a-4 are crystal violet stainings;

b. Quantitative crystal violet stained polystyrene microtiter plate; OD_{600 nm} determination of biofilm formation

3 讨论

多种细菌可分泌溶血素, 该物质能破坏宿主红细胞膜, 造成细胞内容物溢出, 导致溶血现象^[26]。在作用机理上, 可把溶血素分为成孔蛋白和磷脂酶^[27]。其中以 Tdh 为代表的成孔溶血素常以可溶形式分泌, 通过组装成跨膜孔发挥其催化作用; 而磷脂酶具有两亲性质, 作用类似去垢剂分子, 直接作用细胞膜, 使磷脂分子水解, 导致细胞膜损伤。Bai 等^[11]证实, 哈维弧菌溶血素 Vhh 是溶血磷脂酶, 属于脂肪酶家族。本研究发现, 哈维弧菌野生株及 *vhh* 缺失突变株对绵羊红细胞均没有溶血活性, 这与 Rattanama 等^[28]的研究类似, 其在哈维弧菌分离株中均检测到 *vhh* 基因, 但部分菌株并未表现出溶血活性。类似的, Fan 等^[29]发现部分具有完整 *hlyA* 基因的霍乱弧菌对绵羊红细胞也未表现出溶血活性, 向非溶血性霍乱弧菌中转入 *hlyA* 过表达质粒, 这些菌株则出现溶血活性, 暗示 HlyA 分泌正常。这些结果说明, 在非溶血性菌株中, *hlyA* 基因不表达或表达量太低。本研究的 *vhh* 基因转录水平较高, 但翻译水平未知, 对绵羊红细胞也不表现溶血活性, 推测可能存在 Vhh 蛋白未翻译或者翻译但分泌不正常, 具体机制仍需进

一步阐明。

胞外蛋白酶主要是金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶, 他们能催化蛋白质水解成氨基酸等多种有机物质用于病原体的生长和繁殖, 加速其扩散到宿主组织中, 在感染过程中发挥重要作用^[30]。本研究溶血素基因 *vhh* 的缺失并未导致哈维弧菌胞外蛋白酶活性的改变, 暗示 *vhh* 基因可能不影响胞外蛋白酶的分泌。

应激反应是细菌对外界环境的响应, 它能帮助细菌个体感知种群中其他细胞的状态并做出反应, 增强细菌防御不利环境的能力。氧化应激是细菌在海洋环境中可能遇到的情况, 细菌本身代谢和侵染宿主过程中会产生大量活性氧物质 (ROS), 这些 ROS 分子可能会损害病原体本身, 致病菌为了能生长繁殖和成功定植宿主, 必须要有一套有效的氧化应激系统来清除这些有害分子, 比如产生抗氧化剂过氧化氢酶, 该酶将 H₂O₂ 转化为 H₂O 和 O₂ 来对其进行解毒^[31]。Chen 等^[32]报道溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 超氧化物歧化酶 B 基因 *sodB* 缺失突变体对 H₂O₂ 更加敏感, 这说明 *sodB* 基因的缺失降低了溶藻弧菌对外界环境中氧化自由基的防御能力, 即 *sodB* 正调控抗氧化剂的分泌。本研究中

vhh 基因的缺失并没有改变哈维弧菌对 H_2O_2 的耐受力。过量的铜离子催化大量羟基自由基的形成,对细胞产生毒性,摄铁系统也是哈维弧菌重要致病因子之一^[25]。本研究发现 *vhh* 基因未改变对铜离子的耐受能力和对铁离子的吸收利用能力。细菌为适应复杂多变的环境而形成生物膜,生物膜由蛋白质、核酸、脂质和胞外多糖组成,可有效帮助细菌抵抗环境中的不利因素^[33]。当致病菌定植在宿主表面后,为使其不受宿主免疫系统和抗生素的影响而形成大量生物膜,提高病原体感染宿主的能力^[34]。鞭毛介导的运动帮助细菌附着在宿主细胞表面,促进其形成生物膜^[35]。本实验发现 *vhh* 基因的缺失提高了哈维弧菌的运动性,但没有改变其生物膜的形成能力,暗示哈维弧菌运动性可能与其生物膜的形成无关。

抗生素是抑制或杀死细菌生长繁殖的化学物质,大多数是由细菌合成的天然化学武器,可杀死周围环境中的其他微生物并保持细菌体内平衡^[36]。大多数抗生素通过抑制细胞壁合成、破坏细胞膜完整性、防止 DNA、RNA 和蛋白质合成以及阻断细胞基本代谢途径而发挥抑菌作用。滥用抗生素会导致细菌产生耐药性^[37],这是细菌对抗菌药物的自然反应,是适应环境的一种表现。Das 等^[36]发现某些 rRNA 甲基转移酶的缺乏会引起细菌产生抗生素耐药性,并且 *rulC* 基因缺失后能显著提高霍乱弧菌和其他肠道病原体对克林霉素、利奈唑胺和泰妙菌素的耐药性。本实验发现 *vhh* 基因不会显著影响哈维弧菌对所测试抗生素的耐药性,表明 *vhh* 不参与调控哈维弧菌对这些抗生素的耐药过程。

细菌能够独立响应环境,通过包括鞭毛和菌毛在内的物理附属物游动。细菌运动的机制主要取决于它的鞭毛数量及其在细胞表面的分布^[38]。哈维弧菌具有两套鞭毛系统^[39],一套主要由一根能够在液体环境中泳动的极性鞭毛组成;另一套由多根侧生鞭毛组成,使细菌能在固体表面上进行群集运动。鞭毛结构由大量严格受调控的基因编码,上游基因编码调节运动的转录激活因子,中游基因编码鞭毛输出系统和钩基体结构成分,下游基因编码鞭毛细丝、动力形成器和趋化信号转导蛋白^[40]。Yang 等^[41]证实哈维弧菌群体感应 (Quorum sensing, QS) 不仅能调节鞭毛中下游基因,还可调节鞭毛上游转录激活因子 *flaK*,说明哈维弧菌 QS 能通过控

制鞭毛转录因子的表达来调控运动。本研究 *vhh* 基因缺失株运动能力增强,暗示 *vhh* 可能通过作用于 QS 系统,降低了鞭毛合成相关基因的表达,从而负调控哈维弧菌的运动性。细菌胞外聚合物 (EPS) 由多糖、蛋白质和脂质等组成,这种基质可以帮助细胞抵抗干旱、抗生素、重金属和紫外线辐射等不利环境因素,据报道运动性与 EPS 的分泌能力呈负相关^[42]。本研究 *vhh* 基因缺失引起菌株运动性增强,暗示 *vhh* 基因可能正调控 EPS 的分泌,下一步将分析哈维弧菌野生株和 *vhh* 缺失突变株鞭毛合成及 QS 系统相关基因的表达,并量化 EPS 的分泌,以期为探究哈维弧菌溶血素基因 *vhh* 与运动性之间的联系提供新证据。

参考文献:

- [1] AUSTIN B, ZHANG X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates[J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(2): 119-124.
- [2] GIGIA-AGUIRRE L D, SÁNCHEZ-YEBRA-ROMERA W, GARCÍA-MUÑOZ S, et al. First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain[J]. New Microb New Infect, 2017, 19: 15-16.
- [3] YII K C, YANG T I, LEE K K. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*[J]. Curr Microbiol, 1997, 35(2): 109-115.
- [4] TIAN Y, WEN H, QI X, et al. Analysis of apolipoprotein multi-gene family in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their expression profiles in response to *Vibrio harveyi* infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 92: 111-118.
- [5] RØNNESETH A, CASTILLO D, D'ALVISE P, et al. Comparative assessment of *Vibrio virulence* in marine fish larvae[J]. J Fish Dis, 2017, 40(10): 1373-1385.
- [6] RUWANDEEPIKA H A D, JAYAWEEERA T S P, BHOWMICK P P, et al. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade[J]. Rev Aquacult, 2012, 4(2): 59-74.
- [7] SALINI R, SANTHAKUMARI S, RAVI A V, et al. Synergistic antibiofilm efficacy of undecanoic acid and auxins against quorum sensing mediated biofilm formation of luminescent *Vibrio harveyi*[J]. Aquaculture, 2019, 498: 162-170.
- [8] MIZUNO T, DEBNATH A, MIYOSHI S. Hemolysis of *Vibrio* species[M]. London: IntechOpen, 2019: 1-22.
- [9] ZHANG X H, AUSTIN B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(5): 1011-1019.
- [10] RATTANAMA P, THOMPSON J R, KONGKARD N, et al. Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32523.
- [11] BAI F, SUN B, WOO N Y S, et al. *Vibrio harveyi* hemolysin in-

- duces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(1): 70-75.
- [12] ZHONG Y, ZHANG X H, CHEN J, et al. Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH[J]. Infect Immun, 2006, 74(10): 6001-6005.
- [13] SHINODA S, MATSUOKA H, TSUCHIE T, et al. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(12): 2705-2711.
- [14] KANG J H, LEE J H, PARK J H, et al. Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1394(1): 85-89.
- [15] FIORE A E, MICHALSKI J M, RUSSELL R G, et al. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*[J]. Infect Immun, 1997, 65(8): 3112-3117.
- [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 Genet, 2012, 8(1): e1002472.
- [17] ROUX F L, 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.
- [18] NGUYEN A N, DISCONZI E, CHARRIERE 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.
- [19] DENG Y, XU H, SU Y, et al. Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis[J]. BMC Genom, 2019, 20(1): 761.
- [20] DENG Y, 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): e163689.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] ONO T, PARK K S, UETA M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1[J]. Infect Immun, 2006, 74(2): 1032-1042.
- [23] 邓益琴, 赵哲, 刘松林, 等. 不同碳源对溶藻弧菌黏附相关表型的影响初探及 Hfq 对其的调控 [J]. 海洋科学, 2016, 40(11): 99-107.
- [24] 邓益琴, 赵晶晶, 刘松林, 等. Hfq 对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 毒力的调控分析 [J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 604-611.
- [25] 顾丹. 溶藻弧菌中 σ^E 和群体感应系统介导的毒力调控机制 [D]. 上海: 华东理工大学, 2016: 103.
- [26] CONEJERO M J U, HEDREYDA C T. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*[J]. J Gen Appl Microbiol, 2004, 50(3): 137-142.
- [27] ROWE G E, WELCH R A. Assays of hemolytic toxins[J]. Methods Enzymol, 1994, 235: 657-667.
- [28] RATTANAMA P, SRINITHIWARAWONG K, THOMPSON J R, et al. Shrimp pathogenicity, hemolysis, and the presence of hemolysin and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand[J]. Dis Aquat Organ, 2009, 86: 113-122.
- [29] FAN Y, LI Z, LI Z, et al. Nonhemolysis of epidemic El Tor biotype strains of *Vibrio cholerae* is related to multiple functional deficiencies of hemolysin A[J]. Gut Pathogens, 2019, 11(1): 38.
- [30] OSEI-ADJEI G, HUANG X, ZHANG Y. The extracellular proteases produced by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2018, 34(5): 68.
- [31] KIM I H, KIM S Y, PARK N Y, et al. Cyclo-(L-Phe-L-Pro), a quorum-sensing signal of *Vibrio vulnificus*, induces expression of hydroperoxidase through a ToxR-LeuO-HU-RpoS signaling pathway to confer resistance against oxidative stress[J]. Infect Immun, 2018, 86(9): e00932-17.
- [32] CHEN Y, WU F, PANG H, et al. Superoxide dismutase B (sodB), an important virulence factor of *Vibrio alginolyticus*, contributes to antioxidative stress and its potential application for live attenuated vaccine[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 89: 354-360.
- [33] HALL-STOODLEY L, STOODLEY P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(1): 7-10.
- [34] KARNJANA K, SOOWANNAYAN C, WONGPRASERT K. Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 88: 91-101.
- [35] LEE J H, RHO J B, PARK K J, et al. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. Infect Immun, 2004, 72(8): 4905-4910.
- [36] DAS B, VERMA J, KUMAR P, et al. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: understanding the ecology of resistance genes and mechanisms[J/OL]. Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.031>.
- [37] MOHAMAD N, AMAL M N A, SAAD M Z, et al. Virulence-associated genes and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* spp. isolated from cultured marine fishes in Malaysia[J]. BMC Veter Res, 2019, 15(1): 176.
- [38] VACCARI L, MOLAEI M, NIEPA T H R, et al. Films of bacteria at interfaces[J]. Adv Colloid Interf Sci, 2017, 247: 561-572.
- [39] MCCARTER L L. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004, 7(1/2): 18-29.
- [40] MCCARTER L L. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(3): 445-462.
- [41] YANG Q, DEFOIRDT T. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. Environ Microbiol, 2015, 17(4): 960-968.
- [42] KRASTEVA P V, FONG J C N, SHIKUMA N J, et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP[J]. Science, 2010, 327(5967): 866-868.