

文章编号: 1674-5566(2023)03-0449-11

DOI:10.12024/jsou.20220203722

aguA 基因缺失对嗜水气单胞菌致病性的影响

赵东康^{1,2}, Rachit PENGLEE^{1,2}, 车金远^{1,2}, 易欣鑫^{1,2}, 邱超达^{1,2}, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是水环境常见的病原体,具有较强致病性。在本研究中,首次敲除了嗜水气单胞菌 *aguA* 基因,通过转录组分析发现 *aguA* 基因敲除后细菌的黏附、致病、胺代谢等生物过程下降。通过 qRT-PCR 进一步验证发现 10 个黏附基因、9 个发病基因和 8 个胺代谢基因的 mRNA 表达水平明显下降;此外,转录组水平分析结合 qRT-PCR 验证发现 VI 型分泌系统基因、II 型分泌系统基因、鞭毛合成相关基因、菌毛合成相关基因、溶血基因、I 型分泌系统基因、肠毒素基因、RTX 基因等毒力基因的 RNA 表达水平也出现下调。与野生菌株(WT)相比,*aguA* 敲除株(Δ *aguA*)感染金鱼的致病力降低了 86.6%,且 *aguA* 敲除株生物膜形成能力降低了 16.6%。以上结果显示,*aguA* 基因与嗜水气单胞菌的致病性密切相关。

关键词:嗜水气单胞菌; 胍丁胺脱亚胺酶; 毒性; 致病性

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)作为一种具有传染性的鱼类病原菌,一旦在水体暴发,可在 1~2 周内杀死 80%~100% 的鱼类^[1-2]。被嗜水气单胞菌感染的鱼类通常出现出血性败血症、皮肤溃疡、尾部或鳍腐烂症状^[1,3-5]。针对嗜水气单胞菌引起的疾病,使用最多的方法是添加抗生素,但长期使用抗生素会导致大量的致病菌产生耐药性^[6-7]。目前,在水产养殖领域,防治嗜水气单胞菌比较有效的方法是各类疫苗的应用,其中减毒活疫苗比较接近自然状态下的感染,对鱼体具有更加持久的保护力^[8]。减毒活疫苗的研制需要有针对性地对细菌的致病性和致病机理进行深入了解。研究^[9]发现,细菌感染鱼类的过程中,生物膜的形成和细菌的黏附性对于细菌病原体建立感染通常至关重要。革兰氏阴性细菌形成的生物膜中许多物质被视为毒力因子^[10-11]。研究^[9]表明,在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中,腐胺的积累显著促进生物膜的形成。

腐胺由氨基酸脱羧产生,能与动物细胞膜相

互作用破坏细胞膜的稳定性,最终导致肠细胞坏死^[12-14],还可通过增强其他多胺(例如组胺)的毒性而具有间接毒性作用^[15-16]。在革兰氏阴性菌中,腐胺通过精氨酸脱羧酶(Arginine decarboxylase, ADC)代谢途径合成,其中胍丁胺脱亚胺酶作为胍丁胺的唯一底物,最终转化为氨和腐胺,在嗜水气单胞菌中,*aguA* 控制胍丁胺脱亚胺酶的合成^[17-21]。为了更好地理解腐胺与细菌毒性的关系,本研究敲除了嗜水气单胞菌 *aguA* 基因,并通过转录组测序了解其对毒性相关基因表达的影响,评估了敲除 *aguA* 基因后嗜水气单胞菌的致病性。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

嗜水气单胞菌 ATCC 7966、大肠杆菌 CC118 (*Escherichia coli* CC118)、pSR47s 质粒和 pHelper 质粒均为本实验室保存。金鱼(*Carassius auratus*)为网上购买,产地为山东潍坊。所有引物均由生物技术(上海)有限公司合成(表 1)。

收稿日期: 2022-02-18 修回日期: 2022-04-30

基金项目: 福建省科委区域重点项目(2020R1022009)

作者简介: 赵东康(1992—),女,硕士研究生,研究方向为微生物学。E-mail:896064417@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail:blbao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

表 1 基因敲除所用引物
Tab.1 Primers for gene knockout

| 引物 Primer name | 引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3') | 引物长度 Fragment length/bp | 用途 Description |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>aguA</i> -F1 | <u>CGAGCTCGTACACCAAGATGCAGTCC</u> | 386 | 上游同源臂序列含 <i>SacI</i> 酶切位点 |
| <i>aguA</i> -F2 | GTCTACACTCTTCGACCAGC <u>GTCTTGATGCTCATCGCAAG</u> | | PCR 引物重叠序列 |
| <i>aguA</i> -F3 | <u>CTTGCGATGAGCATCAAGAC</u> GCTGGTCCAAGAGTGTAGAC | 397 | PCR 引物重叠序列 |
| <i>aguA</i> -F4 | <u>CACTAGTCCCTTGACCAGATAGCTGTC</u> | | 上游同源臂序列含 <i>SpeI</i> 酶切位点 |
| pSR47s-M13 pSR47s-VECR | CAGGAAACAGCTATGAC GATTTGCAGACTACGGCCTA | 353 | 验证重组质粒的 PCR 引物 |
| 16S-F 16S-R | AGACTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT | 1 442 | 鉴定细菌种类的 PCR 引物 |

注：“ ”表示保护碱基；“ ”表示酶切位点；“ ”表示融合 PCR 中的反向互补引物；pSR47s-VECR 和 pSR47s-M13 为质粒上单克隆位点集中区的引物。

Notes: “ ” is the protective base; “ ” is the restriction site; “ ” is the reverse complementary primer in fusion PCR; pSR47s-VECR and pSR47s-M13 are primers in the single-cloning site-concentrated region on the plasmid.

1.2 嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株的构建

应用同源重组方法在嗜水气单胞菌野生型(菌株号: ATCC 7966) 染色体上敲除 *aguA*^[22]。在 *aguA* 基因序列两端各选取两段 DNA 片段作为同源臂, 将 2 个片段进行融合 PCR, 得到融合片段。将融合片段连接到自杀质粒 pSR47s 中以产生 pSR47s- Δ *aguA* 重组质粒, 转化至大肠杆菌 CC118 中, 涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 挑取阳性单菌落并进行菌落 PCR, 所用引物为质粒上的 pSR47s-M13 和 pSR47s-VECR 引物。将 PCR 所得产物进行测序验证, 将验证正确、含有 pSR47s- Δ *aguA* 质粒的大肠杆菌 CC118、含有 pHelper 质粒的大肠杆菌 CC118 和野生型嗜水气单胞菌混合后进行接合实验, 将接合后的菌落涂布于含有 Amp 和 Kan 的 LB 固体培养基上过夜培养, 挑取单菌落至含有 Amp 和 Kan 的 LB 液体培养基中进行 PCR 验证, 验证为双条带的菌株即为接合成功的菌株。将接合成功的菌株涂布于含有 15% 蔗糖的 LB 平板上筛选, 挑选蔗糖平板上的单菌落至含有 15% 蔗糖的 LB 液体培养基中培养 12 h。使用引物 *aguA*-F1 和 *aguA*-F4 进行 PCR 验证, 将验证具有单条带且和重组质粒的 PCR 条带大小相同的菌株进行测序, 根据测序碱基序列与融合片段碱基序列的一致性判断该菌株是否为 *aguA* 基因敲除株。用于 *aguA* 基因敲除的引物和菌株鉴定引物, 见表 1。

1.3 总 RNA 提取和转录组测序

将嗜水气单胞菌的 *aguA* 敲除株和野生株在 LB 固体培养基上划线, 28 $^{\circ}$ C 过夜培养。分别挑取 *aguA* 敲除株和野生株 3 个单菌落至 5 mL LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 20 h, 取 1 mL 菌液于无酶离心管中, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 向离心管中加入 200 μ L 20 mg/mL 溶菌酶溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 用 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 提取细菌总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 确认 RNA 未降解, 且无基因组污染, 用 Nanodrop 2000 测定总 RNA 质量浓度。根据 RNA 质量浓度, 将嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除菌株和野生菌株的 3 个平行样品分别混合, 一部分送至北京诺禾致源科技股份有限公司, 利用 Illumina 进行转录组测序, 另一部分用于实时定量 PCR (qRT-PCR)。

1.4 反转录和 qRT-PCR

为检测 *aguA* 敲除后对嗜水气单胞菌毒力和致病性的影响, 使用实时定量 PCR (qRT-PCR) 来验证转录组测序中毒力表达下调的相关基因, 从下调基因中选择代表性基因进行 qRT-PCR。

用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+ gDNAwiper) 合成 cDNA, 按照说明使用 Bio-Rad CFX 软件和 qPCR SYBR Green Master Mix 进行 qRT-PCR, 16S rRNA 作为内参基因, 根据所得 Cq 值, 用 SPSS 软件计算不同基因的 *P* 值, 用 Graphpad 软件比较基因表达的差异^[23]。

1.5 制作细菌生长标准曲线

利用嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株和野生型株的标准曲线计算细菌浓度。复苏嗜水气单胞菌 *aguA* 基因敲除株和野生株,在 LB 固体培养基上划线,于 28 °C 恒温培养箱中培养过夜,挑取单菌落到 1 mL LB 液体培养基中,28 °C 摇床振荡培养 12 h,取 50 μL 菌液接种于 50 mL LB 液体培养基中,28 °C 摇床 150 r/min 振荡培养。4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,用无菌生理盐水洗涤 3 次,加入 50 mL 无菌生理盐水重悬菌液,用紫外分光光度计检测细菌溶液 OD₆₀₀。用无菌生理盐水以 2 倍梯度将菌液最终稀释至 32 倍,分别吸取 100 μL 不同梯度的 *aguA* 敲除株和野生株菌液,用生理盐水稀释 106 倍,涂布于 LB 固体培养基平板上,每个梯度分别涂 3 个平行平板,28 °C 培养,直至长出单个菌落,计数后,以 OD 值为 X 轴、以细菌数为 Y 轴绘制标准曲线。

根据固体培养基平板计数和相应的 OD₆₀₀ 计算得出嗜水气单胞菌野生株标准曲线方程为 $y = 7 \times 10^8 x - 2 \times 10^7$, $R^2 = 0.947$,嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株的标准曲线方程为 $y = 3 \times 10^8 x - 540 586$, $R^2 = 0.983$ 。

1.6 金鱼半数致死浓度(LD₅₀)的测定

用于实验的金鱼,体长为 7 ~ 8 cm,身体健康,游动活跃,无外伤,在水温 28 °C 下饲养 2 周后用于实验。实验设置 13 个组,其中 6 组注射嗜水气单胞菌野生株,6 组注射嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株,1 组注射无菌生理盐水作为对照。每组 20 尾金鱼,进行腹腔注射。*aguA* 敲除菌株的注射量为 3.054×10^8 、 3.054×10^7 、 3.054×10^6 、 3.054×10^5 、 3.054×10^4 和 3.054×10^3 CFU/尾,野生型菌株的注射量为 2.25×10^8 、 2.25×10^7 、 2.25×10^6 、 2.25×10^5 、 2.25×10^4 和 2.25×10^3 CFU/尾,注射后将金鱼置于 28 °C 清水中饲养,每天换 1/2 水,连续观察 7 d,记录各组死亡率。采用改良寇氏法计算金鱼半数致死浓度(LD₅₀)。寇氏法^[24]的基本运算公式如下:

$$LD_{50} = \lg^{-1} \sum 1/2(X_i + X_{i+1})(P_{i+1} - P_i) \quad (1)$$

式中: X_i 为注射剂量的对数; P_i 为每组金鱼死亡率。

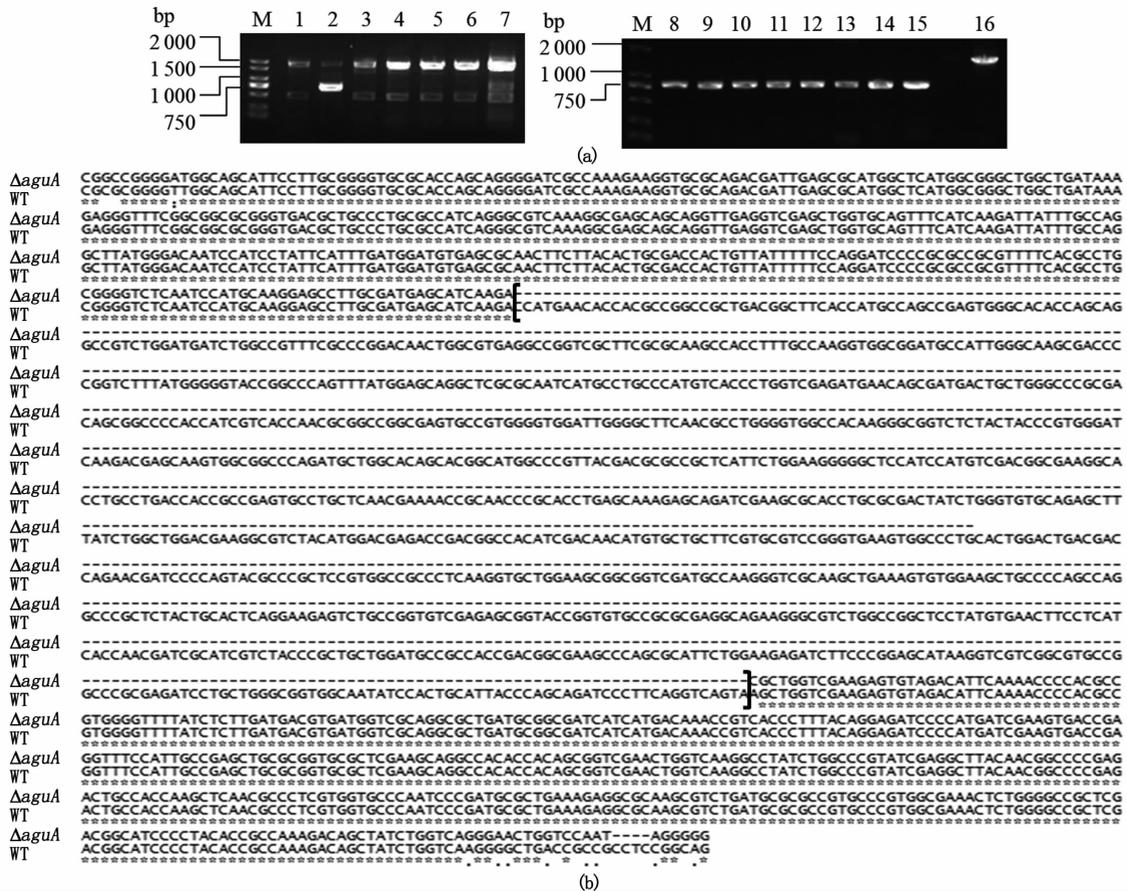
1.7 生物膜形成分析

复苏嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株和野生株在 LB 平板上划线,挑取单菌落至 LB 液体培养基中,28 °C 摇床培养(150 r/min)。当菌液生长至对数期,用 LB 液体培养基稀释菌液至 OD₆₀₀ 为 0.01,96 孔板中每孔加入 100 μL 稀释菌液,28 °C 培养 20 h。用 200 μL 无菌 PBS 溶液洗涤 2 次(用 200 μL 25% 甲醛固定 10 min,吸干液体并自然风干),每孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫染色液染色 20 min,弃去结晶紫染色液后,用无菌 PBS 冲洗多余染料,至 PBS 无色,超净台中吹干,每孔加入 200 μL 33% 冰醋酸溶液,室温摇床轻轻摇晃 15 min 以溶解结晶紫,用酶标仪测量样品孔中液体的 OD₅₉₀;每种菌株设 6 个平行组,试验数值为 6 次的平均值 ± 标准差(Mean ± SD)^[25]。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌 *aguA* 基因缺失株的构建

挑取接合实验中含有 Amp 和 Kan 的 LB 固体培养基上的单菌落,立即进行菌落 PCR,同时用嗜水气单胞菌野生株和重组质粒作为对照。结果显示,PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳中有 2 条条带,大小相差 1 000 bp 左右,且小条带大小在 750 bp 左右,与重组质粒条带大小相似,大条带大小为 1 500 ~ 2 000 bp,与嗜水气单胞菌野生株条带大小相似。用高质量浓度蔗糖培养基培养后的菌液 PCR 产物电泳图结果呈单条带,大小约为 750 bp,与融合片段长度一致。选择图 1(a)中 8 ~ 15 泳道蔗糖筛选后只有单条带的菌株进行测序,将测序结果和嗜水气单胞菌野生株的序列输入网站 EMBL-EBI(Bioinformatics tools for multiple sequence alignment)进行序列比对。结果显示,与嗜水气单胞菌野生株相比,*aguA* 基因成功缺失,缺失的片段长度为 1 084 bp[图 1(b)],表明已经成功地从嗜水气单胞菌基因组中敲除了 *aguA* 基因。



(a) 基因敲除细菌接合和筛选结果电泳图,1~7 泳道均为接合菌株;8~15 泳道为蔗糖筛选后的 *aguA* 敲除株,16 为以 WT 基因组 DNA 为模板的阴性对照;(b) 测序序列比对结果图,“[]”中为缺失片段。
 (a) The results of gene knockout bacterial conjugation experiment show that lanes 1 – 7 are conjugated strains. In the PCR results after sucrose screening, 8 – 15 are the screened *aguA*-knockouted strains, and 16 are the negative control with WT genomic DNA as the template.
 (b) In the result of sequencing sequence alignment, “[]” is the fragment knocked out.

图 1 嗜水气单胞菌 *aguA* 基因敲除 PCR 结果凝胶电泳图和测序比对结果图
 Fig. 1 Gel electrophoresis and sequencing results of *A. hydrophila aguA*-knockouted PCR results

2.2 *aguA* 敲除株与野生株的转录组比较分析

如图 2(a)所示,转录组测序结果分析中共有 1 390 个基因发生了下调,1 126 个基因发生了上调。图 2(b)为下调的差异基因 GO 富集条目,GO 富集中最显著的富集为细胞膜成分的富集,其次为磷酸烯醇丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统 (Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system)、碳水化合物运输蛋白

(Carbohydrate transport)、转运蛋白 (Transport)。重要的是,在下调的差异基因 GO 富集中还包含细胞黏附、发病和胺的代谢,这些都与细菌的致病性密切相关。在 KEGG 代谢途径中,与野生菌株相比,*aguA* 敲除株有 81 条代谢途径发生了下调。其中最显著的前 4 条是 ABC 转运蛋白系统、半乳糖代谢、双组分系统、磷酸转移酶系统,这 4 种代谢途径的 $P < 0.001$,都极其显著富集。

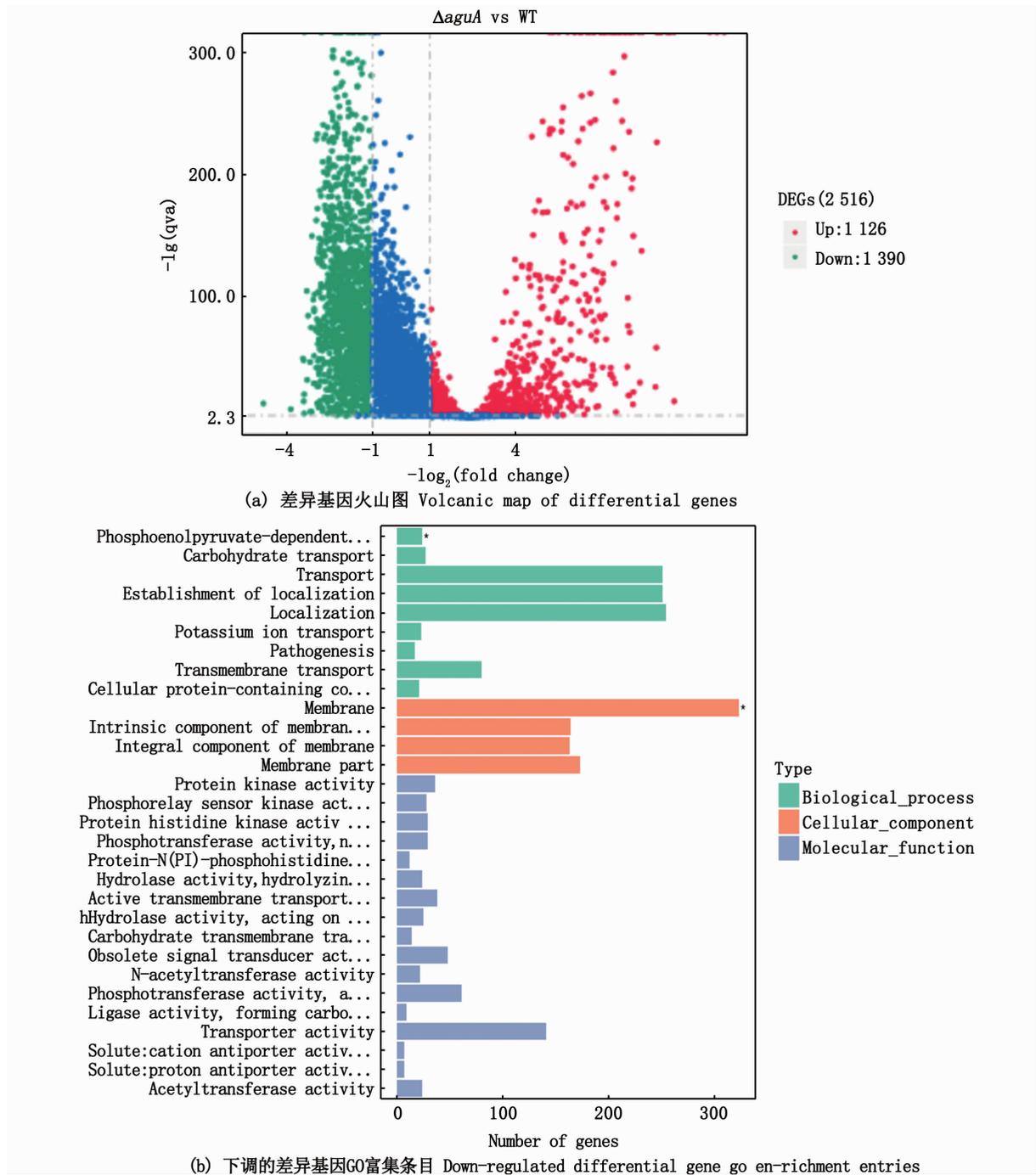


图2 嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株和野生株差异基因火山图和下调 GO 富集条目
 Fig.2 Volcano map of differential genes and down-regulated go enrichment entries between *A. hydrophila aguA*-knock-out strain and wild strain

2.3 *aguA* 缺失影响嗜水气单胞菌毒力相关基因的表达

转录组测序结果分析发现与嗜水气单胞菌野生株相比, *aguA* 敲除株很多与毒力相关基因发生了下调, 根据转录组测序分析, 下调基因 1 390 个。在这些下调基因中, 筛选出 43 个与细菌毒

性相关的基因, 这 43 个基因均属于膜组分中的基因, 包括: 13 个 VI 型分泌系统基因 (*vgrG*、*tssI*、*hcpI*、*tssF*、*tssG*、*tagH*、*tssK*、*vasF*、*clpV*、*tagO*、*tssA*、*tssM* 和 *paaR* 蛋白基因); 8 个菌毛相关蛋白基因 (*matB*、*fimA*、*cpaB*、*pilX*、*tadB*、*flpJ*、*flpL*、*pilU*); 7 个溶血基因 (*tdh*、*sunT*、*mltB2*、*yfhD1*、*yfhD2*、*ccmF-2*、

nrfE); 8 个 I 型分泌系统基因 (*pulE*、*gspH*、*gspN*、*tadC*、*gspB*、*hlyD1*、*hlyD2*、*hlyD3*); 3 个鞭毛合成相关基因 (*fliI*、*fliR*、*flhB*); 2 个肠毒素基因 (*ast*、*act*); 2 个 RTX 毒素基因 (*rtxA*、*rtxD*)。表 2 为转录组结果中下调基因的下调倍数。

对下调的差异基因 GO 富集中的细胞黏附过程、发病过程和胺代谢过程中的基因进行了 qRT-PCR 验证, 验证结果如图 3 所示: 发病过程中的基因除 *spvB* 基因外, *aguA* 敲除株的其他发病基因都发生了非常显著的下调; 除 *cheR1* 基因外, *aguA* 敲除株其他胺代谢过程中的基因都发生了非常显著的下调。qRT-PCR 验证结果与转录组结果趋势一致。

2.4 敲除 *aguA* 基因影响嗜水气单胞菌的生物膜形成

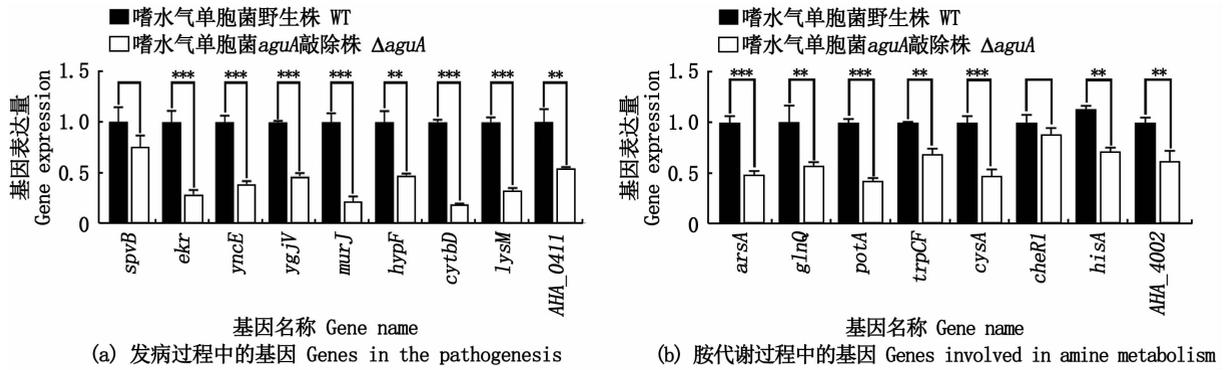
转录组分析发现膜成分相关基因的表达也受到 *aguA* 敲除的影响, 进一步的 qRT-PCR 显示, 12 个下调膜组分的毒力基因中, 除 *ccmF-2* 没有发生显著的下调, *aguA* 敲除株其他 11 个基因的表达量均发生了非常显著的下调[图 4(a)], 10 个细菌黏附过程中的基因也受到 *aguA* 敲除的影响而发生了显著下调[图 4(b)]; 生物膜分析结果显示与嗜水气单胞菌野生株相比, *aguA* 敲除株的细胞膜形成能力显著降低[图 4(c)]。

2.5 *aguA* 基因缺失株对金鱼的致病性评价

表 3 为嗜水气单胞菌野生株和 *aguA* 敲除株注射金鱼的 LD₅₀ 实验结果。注射嗜水气单胞菌野生株死亡的金鱼症状表现为腹部积血, 皮肤腐烂发白, 而注射 *aguA* 敲除株后死亡的金鱼症状表现为腹部积血, 但皮肤腐烂的症状减少。嗜水气单胞菌野生株对金鱼的 LD₅₀ 为 1.02×10^6 CFU/尾, 嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株对金鱼的 LD₅₀ 为 7.60×10^6 CFU/尾, 相比之下, *aguA* 敲除株对金鱼的 LD₅₀ 比野生株降低了 86.6%, 相比野生株, *aguA* 敲除株生物膜形成能力下降了 16.6% [图 4(c)]。

表 2 毒力基因的下调倍数
Tab. 2 Down-regulation folds of down-regulated virulence genes

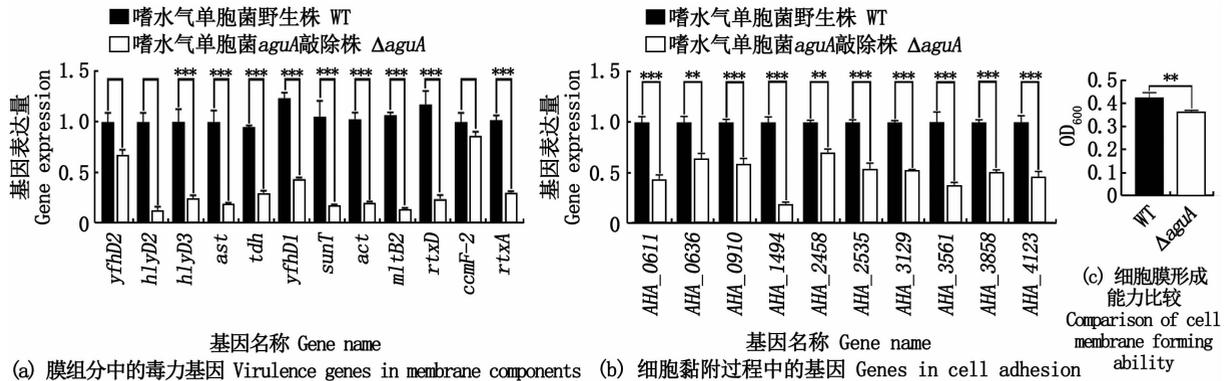
| 基因分类 Classification of genes | 基因名称 Gene name | 下调倍数 Down-regulation multiple | |
|---------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|------|
| | <i>vgrG</i> | 2.86 | |
| | <i>hcpI</i> | 4.76 | |
| | <i>tssF</i> | 5.28 | |
| | <i>tssG</i> | 3.35 | |
| | <i>tagH</i> | 3.90 | |
| VI 型分泌系统基因 Gene of type VI secretory system | <i>tssK</i> | 4.18 | |
| | <i>vasF</i> | 4.00 | |
| | <i>clpV</i> | 3.24 | |
| | <i>tagO</i> | 6.74 | |
| | <i>tssA</i> | 5.46 | |
| | <i>tssM</i> | 3.58 | |
| | <i>paaR</i> | 6.14 | |
| | <i>tssI</i> | 5.78 | |
| | | <i>matB</i> | 2.98 |
| | | <i>fimA</i> | 2.99 |
| 菌毛合成相关基因 Pili synthesis related genes | <i>cpaB</i> | 5.59 | |
| | <i>pilX</i> | 3.40 | |
| | <i>tadB</i> | 7.75 | |
| | <i>flpJ</i> | 8.38 | |
| | <i>flpL</i> | 5.86 | |
| | <i>pilU</i> | 2.48 | |
| 溶血相关基因 Hemolysis related genes | <i>tdh</i> | 4.53 | |
| | <i>sunT</i> | 7.55 | |
| | <i>mltB2</i> | 4.66 | |
| | <i>yfhD1</i> | 3.23 | |
| | <i>yfhD2</i> | 3.89 | |
| | <i>ccmF-2</i> | 4.15 | |
| | <i>nrjF</i> | 4.24 | |
| I 型分泌系统基因 Gene of type I secretory system | <i>pulE</i> | 2.24 | |
| | <i>gspH</i> | 2.07 | |
| | <i>gspN</i> | 2.43 | |
| | <i>tadC</i> | 8.29 | |
| | <i>gspB</i> | 2.11 | |
| | <i>hlyD3</i> | 2.50 | |
| | <i>hlyD2</i> | 2.89 | |
| | <i>hlyD1</i> | 3.63 | |
| 鞭毛合成相关基因 Flagellum synthesis related genes | <i>fliI</i> | 3.69 | |
| | <i>fliR</i> | 4.17 | |
| | <i>flhB</i> | 2.70 | |
| 肠毒素基因 Enterotoxin gene | <i>ast</i> | 5.09 | |
| | <i>act</i> | 7.43 | |
| RTX 毒素基因 RTX toxin gene | <i>rtxA</i> | 3.65 | |
| | <i>rtxD</i> | 5.29 | |



柱状图上方含“*”代表差异显著($P < 0.05$);柱状图上方含“**”代表差异较显著($P < 0.01$);柱状图上方含“***”代表差异极显著($P < 0.001$)。 “*” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.05$); “**” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.01$); “***” above the bar graph represents extremely significant difference ($P < 0.001$).

图3 转录组分析结果中细菌毒性相关的下调基因以及腐胺合成相关的胺代谢过程中的基因 qRT-PCR 验证

Fig. 3 Validation results of qRT-PCR for down-regulated genes related to bacterial toxicity in the results of transcriptome analysis



柱状图上方含“*”代表差异显著($P < 0.05$);柱状图上方含“**”代表差异较显著($P < 0.01$);柱状图上方含“***”代表差异极显著($P < 0.001$)。 “*” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.05$); “**” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.01$); “***” above the bar graph represents extremely significant difference ($P < 0.001$).

图4 嗜水气单胞菌野生株和 *aguA* 敲除株细胞膜的形成或黏附能力验证
Fig. 4 Comparison of cell membrane formation or adhesion ability between the wild strain of *A. hydrophila* and the *aguA*-knock-out strain

3 讨论

嗜水气单胞菌是一种常见的机会性病原体^[26]。*aguA* 基因参与革兰氏阴性菌中胍丁胺转化为氨和腐胺的过程,氨和腐胺对动物细胞都有毒性作用,许多毒力的作用因素可能会因腐胺的减少而减弱^[12-14,17-18],本研究首次在嗜水气单胞菌中敲除了腐胺形成途径中的 *aguA* 基因。研究表明,在铜绿假单胞菌、单核李斯特菌 (*Listeria*

monocytogenes) 和变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 中敲除 *aguA* 基因或通过灭活剂使胍丁氨脱氨酶失活后,3 株菌的生物膜形成受到显著影响,且细菌毒力显著下降,由于生物膜与细菌的持续感染相关,因此敲除 *aguA* 后铜绿假单胞菌的感染能力显著下降^[27],这与本研究中 *aguA* 缺失后,嗜水气单胞菌的生物膜合成下降现象一致^[28-30]。

表3 对金鱼注射不同浓度梯度的嗜水气单胞菌野生株和 *aguA* 敲除株后,金鱼的死亡率
 Tab.3 Goldfish mortality rate after injecting wild strains and *aguA*-knocked-out strain of
A. hydrophila with different concentration gradients

| 菌株 Strain | 注射量 Injection volume/ (CFU/尾) | 死亡数量 Number of deaths/尾 | 存活数量 Number of survivals/尾 | 死亡率 Mortality rate/% |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 嗜水气单胞菌野生株 Wild strain of <i>A. hydrophila</i> | 2.25×10^8 | 20 | 0 | 100 |
| | 2.25×10^7 | 17 | 3 | 85 |
| | 2.25×10^6 | 10 | 10 | 50 |
| | 2.25×10^5 | 4 | 16 | 20 |
| | 2.25×10^4 | 2 | 18 | 10 |
| | 2.25×10^3 | 1 | 19 | 5 |
| | 0 | 1 | 19 | 5 |
| 嗜水气单胞菌 <i>aguA</i> 敲除株 <i>aguA</i> ^{-/-} strain of <i>A. hydrophila</i> | 3.054×10^8 | 20 | 0 | 100 |
| | 3.054×10^7 | 12 | 8 | 60 |
| | 3.054×10^6 | 3 | 17 | 15 |
| | 3.054×10^5 | 1 | 19 | 5 |
| | 3.054×10^4 | 2 | 18 | 10 |
| | 3.054×10^3 | 1 | 19 | 5 |
| | 0 | 1 | 19 | 5 |

对 *aguA* 敲除株和野生株进行了转录组测序分析,在转录组 GO 分析结果中,*aguA* 敲除株的黏附过程 (GO: 0030155, GO: 0007155, GO: 0022610)、致病过程 (GO:0009405)、胺代谢过程 (GO:0009309, GO: 0042401, GO:0006595) 均发生了显著的下调富集。通过比较嗜水气单胞菌 *aguA* 基因敲除株和野生株的转录组,发现 43 个毒性相关基因发生了下调,包括:13 个 VI 型分泌系统 (T6SS) 基因;8 个菌毛合成相关基因;7 个溶血基因;5 个 II 型分泌系统基因;3 个 I 型分泌系统基因,3 个鞭毛合成相关基因;2 个肠毒素基因;2 个 RTX 基因。T6SS 的基因簇在几种革兰氏阴性病原体中高度保守,主要功能是介导毒力因子的细胞外输出,抑制吞噬细胞的吞噬活性并介导细胞毒性^[31]。敲除 *aguA* 后,T6SS 很多组件的表达下降;菌毛通过对介质表面的黏附和聚集,在 DNA 转移、噬菌体结合、微菌落和生物被膜形成、运动和发育等生命活动中起着关键作用^[32],*aguA* 的敲除导致嗜水气单胞菌菌毛组成蛋白的表达量显著降低,势必影响菌毛的合成,进而影响细菌的黏附能力。溶血性细胞毒素的产生被认为是气单胞菌属致病潜力的有力证据^[33],能在红细胞膜上形成直径约 2 nm 的孔径,允许水和离子穿过细胞膜流入红细胞膜内,从而导致红细胞的破裂,这也是导致病鱼腹腔血液积聚的重要原因之一^[34],敲除 *aguA* 后,溶血素基因的表达量显著下降,显然,嗜水气单胞菌中 *aguA* 与溶血素

的形成有复杂的联系,但还需进一步地研究。T2SS 介导多种毒素、脂肪酶和水解酶的细胞外传递,这些毒素、脂肪酶和水解酶可分解复杂的碳水化合物,从而为细菌在环境中的生存提供优势,另外 T2SS 分泌的一些特定蛋白质有助于生物膜的形成,维持细菌本身生物膜的结构和稳定性^[35],*aguA* 的敲除使得 T2SS 组分的表达量显著下降。 α -溶血素 (HlyA) 依靠 I 型分泌系统 (T1SS) 分泌到细菌细胞外,HlyD 是 T1SS 中的一个六聚体,组成一个通道,为 HlyA 的输出提供了连续的跨膜导管^[36],并且,HlyD 的完整性对于分泌的 HlyA 最终折叠成其活性形式至关重要^[37],*aguA* 的敲除使 HlyD 的表达显著下降,影响 HlyA 的折叠和分泌。鞭毛是细菌的一种运动性结构,在细菌黏附、生物被膜形成、信号传导、胞外多糖产生等方面具有重要作用。同时,鞭毛作为生物被膜支架有助于细菌细胞膜的稳定^[32],*aguA* 敲除后,鞭毛合成基因的表达显著下降,影响鞭毛的形成,因此影响生物膜的形成和细菌的运动等;热稳定性细胞强直肠毒素 (*ast*)、热不稳定性细胞强直肠毒素 (*alt*)、细胞毒性肠毒素 (*act*) 在气单胞菌的发病机制中起重要作用,是气单胞菌的重要毒力因子,它们的存在可以看作是毒力的指标^[38],肠毒素通过与靶细胞表面的糖蛋白结合并寡聚化,导致宿主肠细胞膜穿孔,肠细胞隐窝和绒毛退化而死亡^[39]。重复序列蛋白毒素 (RTX) 是革兰氏阴性菌分泌的一种大型异质毒

素,由保守的重复区域和一个自动加工的蛋白酶结构域组成,能够抑制嗜中性粒细胞,诱导多种细胞类型的细胞溶解(红细胞、上皮细胞、巨噬细胞)^[40],*aguA* 敲除后 *ast*、*act*、*rtxA*、*rtxD* 的表达量都显著下降。基于转录组分析结果,对相应的下调基因做了 qRT-PCR 验证,包括 12 个毒力基因、10 个黏附基因、9 个发病基因和 8 个胺代谢基因,验证结果与转录组结果基本一致,大部分的基因都发生了极显著的下调,表明这些基因表达受到了 *aguA* 的影响,大量的基因下调很有可能降低嗜水气单胞菌的毒性和致病性。

本研究通过对金鱼腹腔注射得出嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株和野生株的 LD₅₀,发现 *aguA* 敲除株 LD₅₀ 比野生株降低了 86.6%。溶血素、肠毒素、RTX 毒素能够直接破坏金鱼的细胞,从而直接对金鱼产生致病性。气单胞菌属的致病性是多因素的,涉及单独或不同基因产物的共同作用^[18]。安全性是减毒活疫苗开发的主要问题之一,嗜水气单胞菌 *aguA* 敲除株能否作为减毒活疫苗还需要进一步的实验或基因改造,但本研究为嗜水气单胞菌减毒活疫苗的研究提供了新的思路。

从实验结果来看,敲除 *aguA* 基因后,几种毒素的表达量下降了,证明敲除 *aguA* 确实影响了嗜水气单胞菌对金鱼的致病能力。3 个分泌系统主要通过影响毒素的分泌和细胞膜的形成而影响细菌的致病性和毒性,另外,细菌菌毛和鞭毛影响细菌生物膜的稳定性和黏附性,从而影响细菌在金鱼体内的定殖。并且,生物膜可以保护细菌免受恶劣环境条件的影响,抵抗宿主免疫反应攻击,提高体外存活率,促进细菌在宿主体内定殖和感染,与细菌的致病性密切相关^[41]。研究^[42]表明,携带更多毒力基因的菌株具有更高的毒性,敲除 *aguA* 确实使得嗜水气单胞菌很多毒力基因的表达下降了,且对嗜水气单胞菌生物膜形成能力产生明显影响。综上所述,在嗜水气单胞菌中敲除 *aguA* 使得细菌的毒性和致病性显著下降。

参考文献:

- [1] LIU J, GAO S S, DONG Y H, et al. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila* [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 141.
- [2] SKÓRCZEWSKI P, MUDRYK Z J, JANKOWSKA M, et al. Antibiotic resistance of neustonic and planktonic fecal coliform bacteria isolated from two water basins differing in the level of pollution [J]. Hydrobiologica, 2013, 23(3): 431-439.
- [3] HOANG A H, TRAN T T X, LE P N, et al. Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila* - an infectious agent in striped catfish [J]. Biocontrol Sci, 2019, 24(1): 23-28.
- [4] JIN L, CHEN Y, YANG W G, et al. Complete genome sequence of fish-pathogenic *Aeromonas hydrophila* HX-3 and a comparative analysis: insights into virulence factors and quorum sensing [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 15479.
- [5] JAHID I K, MIZAN F R, MYOUNG J, et al. *Aeromonas hydrophila* biofilm, exoprotease, and quorum sensing responses to co-cultivation with diverse foodborne pathogens and food spoilage bacteria on crab surfaces [J]. Bio-fouling, 2018, 34(10): 1079-1092.
- [6] 李爱. 近岸养殖区中氯霉素迁移转化规律的研究 [D]. 大连: 大连海事大学, 2006.
- [7] LI A. Transportation and transformation of chloramphenicol in coastal environment [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2006.
- [8] 叶妮. 鳃弧菌减毒活疫苗免疫斑马鱼应答的母源性免疫传递和保护作用 [D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [9] YE N. Maternal transfer and protection role in zebrafish offspring following vaccination of brood stock with a live attenuated *Vibrio anguillarum* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015.
- [10] 郭玉娟, 陈学年. 肽聚糖对鲫鱼嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫增强效果的研究 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(1): 33-36.
- [11] GUO Y J, CHEN X N. Enhancement of A3 α -peptidoglycan on immune effect of inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* [J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(1): 33-36.
- [12] LIU Z X, HOSSAIN S S, MOREIRA Z M, et al. Putrescine and its metabolic precursor arginine promote bio-film and c-di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(1): e0029721.
- [13] WANG G Y, ZHAO G, CHAO X Y, et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(17): 6278.
- [14] DEL POZO J L. Biofilm-related disease [J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2018, 16(1): 51-65.
- [15] DEL RIO B, REDRUELLO B, LINARES D M, et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 120.
- [16] MOINARD C, CYNOBER L, DE BANDT J P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases [J]. Clinical Nutrition, 2005, 24(2): 184-197.

- [14] ZHELIASKOVA A, NAYDENOVA S, PETROV A G. Interaction of phospholipid bilayers with polyamines of different length [J]. *European Biophysics Journal*, 2000, 29(2): 153-157.
- [15] ARAUJO C, MUÑOZ-ATIENZA E, POETA P, et al. Characterization of *Pediococcus acidilactici* strains iso-lated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed and larvae: safety, DNA fingerprinting, and bacteriocinogenic-ity [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(2): 129-143.
- [16] 温永柱, 范文来, 徐岩, 等. 白酒中5种生物胺的HPLC定量分析[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 305-308.
WEN Y Z, FAN W L, XU Y, et al. Quantification for 5 selected biogenic amines in Chinese liquor by HPLC [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(7): 305-308.
- [17] LANDETE J M, ARENA M E, PARDO I, et al. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(7): 882-887.
- [18] NAKADA Y, ITOH Y. Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway [J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 3): 707-714.
- [19] 徐君明, 刘芳, 王道营, 等. 食品中腐胺合成调控研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(7): 309-311, 390.
XU J M, LIU F, WANG D Y, et al. Research progress on regulation of putrescine synthesis in food [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(7): 309-311, 390.
- [20] NAKADA Y, JIANG Y, NISHIJYO T, et al. Molecular characterization and regulation of the *aguBA* operon, responsible for agmatine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6517-6524.
- [21] CUNIN R, GLANSDORFF N, PIÉRARD A, et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria [J]. *Microbiological Reviews*, 1986, 50(3): 314-352.
- [22] 刘霞, 高鹤, 杨琳, 等. 副溶血性弧菌基因敲除方法的建立及应用[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 188-192.
LIU X, GAO H, YANG L, et al. Establishment of a suicide vector-based gene knockout method in studies of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2011, 19(3): 188-192.
- [23] 彭康康, 张博, 鲍宝龙, 等. 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞和鳞片形态的比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 708-715.
PENG K K, ZHANG B, BAO B L, et al. Comparative analysis of skin melanophore and scales in different parts of melanized Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 708-715.
- [24] 谭莘. 应用 Excel 软件计算半数致死量[J]. *山西医科大学学报*, 2010, 41(10): 914-916.
TAN P. Using Excel software to calculate the lethal dose [J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2010, 40(10): 914-916.
- [25] 吴从文, 鲍宝龙. 金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶生理功能分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(3): 411-419.
WU C W, BAO B L. Phenotypic function of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(3): 411-419.
- [26] AKTER N, HASHIM R, PHAM H Q, et al. *Lactobacillus acidophilus* antimicrobial peptide is antagonistic to *Aeromonas hydrophila* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 570851.
- [27] WILLIAMS B J, DU R H, CALCUTT M W, et al. Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(1): 104-119.
- [28] CHENG C Y, CHEN J S, FANG C, et al. *Listeria monocytogenes aguA1*, but not *aguA2*, encodes a functional agmatine deiminase: biochemical characterization of its catalytic properties and roles in acid tolerance [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(37): 26606-26615.
- [29] WANG S, WANG Y, WANG Y, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate suppresses biofilm formation, acid production, and acid tolerance in *Streptococcus mutans* by targeting virulence factors [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1705.
- [30] JONES J E, CAUSEY C P, LOVELACE L, et al. Characterization and inactivation of an agmatine deiminase from *Helicobacter pylori* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2010, 38(2): 62-73.
- [31] SUAREZ G, SIERRA J C, SHA J, et al. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44(4): 344-361.
- [32] 蒋富凤, 雷涛, 吴清平, 等. 副溶血性弧菌生物被膜形成及其调控机制研究进展 [J]. *微生物学报*, 2020, 60(11): 2381-2390.
JIANG F F, LEI T, WU Q P, et al. Biofilm formation and regulation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*: progress and trends [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(11): 2381-2390.
- [33] WANG G H, CLARK C G, LIU C Y, et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(3): 1048-1054.
- [34] RAGHUNATH P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 805.
- [35] KOROTKOV K V, SANDKVIST M. Architecture, function, and substrates of the type II secretion system [J]. *EcoSal*

- Plus, 2019, 8(2): 227-244.
- [36] LEE M, JUN S Y, YOON B Y, et al. Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40460.
- [37] PIMENTA A L, RACHER K, JAMIESON L, et al. Mutations in HlyD, part of the type I translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(21): 7471-7480.
- [38] HU M, WANG N, PAN Z H, et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China [J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 224-233.
- [39] CHOPRA A K, HOUSTON C W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis [J]. Microbes and Infection, 1999, 1(13): 1129-1137.
- [40] KIM B S, GAVIN H E, SATCHELL K J. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin[J]. mBio, 2015, 6(2): e00324-15.
- [41] AWAN F, DONG Y H, WANG N N, et al. The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila* [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 116: 135-145.
- [42] LI J, NI X D, LIU Y J, et al. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 823-830.

Deletion of the *aguA* gene affects pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*

ZHAO Dongkang^{1,2}, RACHIT PENGLEE^{1,2}, CHE Jinyuan^{1,2}, YI Xinxin^{1,2}, QIU Chaoda^{1,2}, BAO Baolong^{1,2}
 (1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is a common pathogen in water environment and has strong pathogenicity. In this study, the gene *aguA* of *A. hydrophila* was knocked out for the first time. Transcriptome analysis and qRT-PCR indicated that the knockout of *aguA* down-regulated the bacterial adhesion process, pathogenic process, amine metabolism process and etc. In addition, type VI secretion system genes, type II secretion system genes, flagella synthesis-related genes, fimbriae synthesis-related genes, hemolysis genes, type I secretion system genes, enterotoxin genes, and *RTX* genes were also down-regulated at the transcriptome level. qRT-PCR showed that most of these genes were significantly down-regulated. Compared with the wild strain, the pathogenicity of *A. hydrophila aguA*-knocked-out strain infected grass goldfish was reduced by 86.6% through infection experiment *in vivo*, and it was found that the biofilm formation ability of the *aguA*-knocked-out strain was reduced by 16.6%. The above results show that *aguA* gene is closely related to the pathogenicity of *A. hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; agmatine deiminase; toxicity; pathogenicity