

文章编号: 1674-5566(2023)04-0681-09

DOI:10.12024/jsou.20220303771

溶藻弧菌 *RseB* 基因缺失对凡纳滨对虾致病性的影响

孟璐^{1,2}, 车金远^{1,2}, 黄旭雄^{1,2}, 罗土炎³, 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; 3. 福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是海水养殖过程中一种常见的致病菌。当温度为 25~35 °C 时, 容易暴发流行性的弧菌病。利用 OverlapPCR 和同源基因重组技术, 成功构建溶藻弧菌 *RseB* 基因敲除缺失株。结果显示: 与野生溶藻弧菌相比, 在生长速度上, *RseB* 基因显示出与生长具有相关性, *RseB* 基因缺失提高了溶藻弧菌的生长速度; *RseB* 基因缺失造成溶藻弧菌溶血性下降 37.5%。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 致病性试验结果显示, *RseB* 基因缺失菌株感染后凡纳滨对虾开始死亡时间推迟 4 h, LT₅₀ 推迟 20 h。攻毒后的第 24 小时, *RseB* 基因缺失菌株在对虾中的定殖能力下降 53.4%。受溶藻弧菌感染的凡纳滨对虾肝胰腺严重受到侵袭, 肝小管的排列顺序紊乱, 并且间隙变大、边界线也逐渐模糊, 肝胰腺小管的管腔消失; 肝细胞的排列开始不规则, 有些肝细胞形状很明显地肿大, 甚至整个细胞开始变性, 被伊红染深, 细胞核开始消失。相同时间点的病理切片显示, *RseB* 基因敲除菌株感染的凡纳滨对虾肝胰腺受损情况相对较轻。

关键词: 溶藻弧菌; *RseB*; 基因敲除; 致病性; 凡纳滨对虾

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 属于弧菌科 (Vibrionaceae) 弧菌属 (*Vibrio*), 为一种条件致病菌, 在水环境中分布广泛, 对虾类、贝类和鱼类是常见的易受其侵染的水生动物^[1-3]。溶藻弧菌长度和宽度都很短, 分别为 1.2~1.4 μm 和 0.5~0.8 μm, 因此它可以通过宿主的伤口表面侵入体内。溶藻弧菌作为一种条件性的致病菌, 若只是弧菌数量大规模增加可能并不足以使生物受到感染而发病, 但是当生物体自己的免疫能力下降和其所在的养殖环境恶化二者同步发生时, 弧菌病则一触即发。研究^[3-4]表明, 溶藻弧菌的致病性是多种毒力基因共同发挥作用的结果, 胞外产物、脂多糖、黏附素、铁载体是绝大多数致病弧菌主要的毒力因子, 不过, 迄今为止, 还未能明确指出与毒力相关的所有基因以及其致病机理。

大肠杆菌包膜应激反应由 Sigma E 操纵子调控, 在大肠杆菌中, Sigma E 操纵子包含 Sigma E 因子 (*RpoE*) 的基因以及由 *RpoE* 基因上游的启动

子共同转录的调节元件 *RseA*、*RseB* 和 *RseC*。*RseA* 和 *RseB* 是跨膜和周质负调节蛋白, 而 *RseC* 是正调节蛋白。*RseB* 是包膜应激反应的一个重要负调节因子, 本质上是一种周质负调节蛋白, 通过其与 *RseA* 的结合来增强活性^[3]。有研究^[5-6]表明, 在 *RseB* 活性丧失后, *RpoE* 活性增强会触发周围细胞质的应激反应, 通过改变与溶血活性相关的蛋白内稳态, 导致毒性降低。在虾致病性哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 菌株中, *RseB* 基因的 *RpoE* 操纵子的破坏导致溶血活性、对虾定殖能力和毒力的降低。但是, *RseB* 基因在溶藻弧菌中是否同样有此功能未见报道。

为了解 *RseB* 基因在溶藻弧菌发挥毒力中的作用, 采用 pSR47s 自杀载体同源重组的方法^[7-10]对溶藻弧菌 *RseB* 基因进行敲除, 并研究突变株的生长、毒力、溶血、定殖特性, 为深入了解 *RseB* 基因功能、解析溶藻弧菌毒力机制奠定基础, 为由溶藻弧菌引起的疾病的预防和控制提供新靶点。

收稿日期: 2022-03-17 修回日期: 2022-05-17

基金项目: 福建省区域发展项目 (2021N3016); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2020R1022009)

作者简介: 孟璐 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: 13331509065@163.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>

1 材料与方法

1.1 材料

溶藻弧菌为黄海水产研究所馈赠,该菌株从受病原菌感染的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中分离得到,pSR47s自杀质粒(Cmr)由本实验室保存,感受态细胞*E. coli* CC118由本实验室制作。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)苗(对虾为1月龄左右,体长为4~6 cm,体质量为1.2~2.3 g)来自上海滨海基地,用于本研究感染实验。

1.2 溶藻弧菌 *RseB* 基因缺失株的构建

以NCBI数据库中溶藻弧菌(ATCC17749)基因组序列为参考,以*RseB*基因及其上下游核苷酸序列为DNA模板设计和合成引物(表1)。用*RseB*-up-F/*RseB*-up-R和*RseB*-down-F/*RseB*-down-R两对引物分别扩增*RseB*基因上下游同源臂碱基片段。PCR程序:95℃ 5 min; 95℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 1 min 40 s,循环数为35,72℃ 5 min。凝胶电泳检测PCR产物,回收纯化。回收产物等比混合后作模板,*RseB*-up-F和*RseB*-down-R为上下游引物进行融合PCR扩增并用凝胶电泳检测^[1-3]。限制性内切酶*Not* I和*Bam* H I进行双酶切,回收后与回收的pSR47s自杀质粒连接。转化入*E. coli* CC118感受态细胞中,用100 μg/mL的抗生素Kan LB筛选阳性克隆pSR47s-Δ*RseB*,以引物pSR47s-F/pSR47s-R和16S-F/16S-R进行PCR扩增并测序鉴定。接合

实验将自杀质粒pSR47s-Δ*RseB*从供体菌*E. coli* CC118导入溶藻弧菌菌体中。在含100 μg/mL Kan和Amp的LB上挑选阳性克隆,以*RseB*-up-F和*RseB*-down-R为上下游引物进行PCR检测。PCR产物电泳条带大小为1500 bp左右的单克隆菌株接种在含10%蔗糖的LB上进行最后筛选,37℃培养,挑选可以在含10%蔗糖的液体LB中生长同时PCR产物电泳单条带约为1259 bp的单克隆菌株,以引物对*RseB*-up-F和*RseB*-down-R及16S-F、16S-R进行PCR检测和测序鉴定*RseB*基因缺失菌株^[3-4](图1)。

1.3 菌株生长测试

将溶藻弧菌和*RseB*基因缺失菌株Δ*RseB*的单克隆分别按1%的比例接种到LB中培养,摇床37℃、150 r/min培养,每隔1.5 h取1次样,利用分光光度计(BIO-RAD Smart-Spec™ Plus)测定在不同时间下细菌生长的吸光度OD值(波长600 nm),以培养时间为横坐标,以吸光度OD值为纵坐标,绘制生长曲线^[11-12]。

1.4 溶血能力测定

将溶藻弧菌和缺失突变株Δ*RseB*单克隆分别接种于液体LB中,过夜培养,设置实验组和对照组,每组3个平行,取相同体积菌液注入打孔的羊血琼脂平板中(购于海门中泰实验器材厂,规格为90 mm/个,羊血质量为5%;打孔的孔径大小为0.3 cm),37℃培养,在12、24、36、48 h共4个时间点测定溶血圈直径大小^[3]。

表1 菌株、质粒和引物列表

Tab. 1 Strains, plasmids and primers

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	表型及相关特征 Phenotypes and correlative characters	来源 Source
菌株 Strains		
溶藻弧菌	Amp ⁺	馈赠
大肠杆菌 CC 118	无抗性	本实验室保存
质粒 Plasmids		
大肠杆菌 CC 118-pHelper	辅助质粒、Cm	本实验室保存
大肠杆菌 CC 118-pSR47s	基因敲除质粒、Km	本实验室保存
引物 Primers		
<i>RseB</i> -up-F	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGACGGCATTTCATCAAGT (引入 <i>Not</i> I酶切位点)	公司合成
<i>RseB</i> -up-R	TGCATCTCAACAAGATGCATAACAATGATGACCGCGT	公司合成
<i>RseB</i> -down-F	ACGCGGTATCATCTGTTATGCATCTTGTGAGATGCA	公司合成
<i>RseB</i> -down-R	CGGGATCCGCTCTCATGGATGGAGAAT (引入 <i>Bam</i> H I酶切位点)	公司合成
pSR47s-F	CAGGAAACAGCTATGAC	公司合成
pSR47s-R	GATTTCGAGACTACGGGCCTA	公司合成
16S-F	ATCCTGGCTCAGAACGAACG	公司合成
16S-R	GAACAACGCTAGCTCCCTCC	公司合成

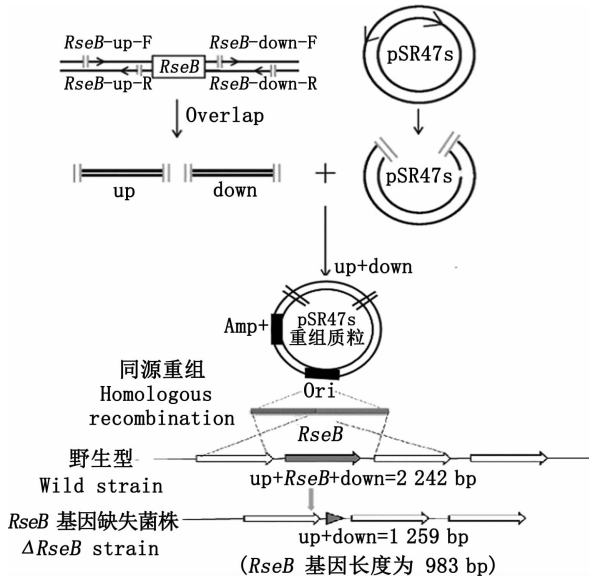


图 1 溶藻弧菌 *RseB* 基因敲除流程图

Fig. 1 *RseB* gene knockout in *Vibrio alginolyticus*

1.5 溶藻弧菌人工感染凡纳滨对虾

根据预试验结果,共设立 3 个处理组,进行正式的人工感染实验。按照 1% 的比例分别进行野生与 $\Delta RseB$ 溶藻弧菌接种,37 °C 过夜培养,根据溶藻弧菌的生长曲线,按照相对应的吸光度 OD 值所对应的菌体数量(当 OD 值为 1.3 左右时,对应菌体数量级 10^9),根据摩尔定律稀释所投入水体的供试菌液,每缸水体的体积为 5 L,保持水体的菌体群落总数为 1.0×10^7 CFU/mL。每缸对虾数量为 50 尾,每个处理组设 3 个平行,设等体积的生理盐水作对照,每天换水,为保持水体内溶藻弧菌的密度与活性,在换水后重新添加新鲜的菌体,保持水体的菌体群落总数为 1.0×10^7 CFU/mL。感染期间观察对虾的发病情况,试验持续 4 d^[11-13]。随机选取被感染的对虾,用无菌镊子解剖濒临死亡的病虾,取虾的肠道部位置于灭菌的研钵中,充分研磨后,加入 500 μ L 的 PBS 缓冲液悬浮,取上清涂布在添加了质量浓度为 100 mg/mL 氨苄霉素的 TCBS 培养基上,37 °C 过夜培养,随后进行单菌落分离计数。随机挑选 300 个

单菌落,以 *RseB*-up-F 和 *RseB*-down-R 为上下游引物进行 PCR 鉴定,分析野生溶藻弧菌与 $\Delta RseB$ 菌株的竞争系数(曼-惠特尼 U 检验),竞争指数 = 从肝胰腺分离的 $\Delta RseB$ 溶藻弧菌数量/野生型溶藻弧菌数量,分离数量进行统计学分析^[13-15]。

1.6 凡纳滨对虾组织病理学观察

人工感染后,在对虾感染的第 8、16、32 和 64 小时分别随机挑取濒死的凡纳滨对虾进行解剖,获取肝胰腺。经固定、梯度脱水、透明和切片制作成病理切片,观察肝胰腺的感染情况^[16-21]。

2 结果

2.1 *RseB* 缺失菌株的构建

在野生溶藻弧菌上敲除 *RseB* 基因时,在含 10% 蔗糖和氨苄霉素的 LB 平板上筛选得到长度为 1 259 bp 的双交换阳性克隆。经测序表明与野生溶藻弧菌相比,碱基缺失 983 bp,所得结果与同源臂碱基序列一致。这表明 *RseB* 基因缺失菌株 $\Delta RseB$ 构建成功。

2.2 *RseB* 基因敲除对溶藻弧菌生长的影响

1.5 h 测定 $\Delta RseB$ 菌株和野生溶藻弧菌的生长曲线如图 2 所示,随着培养时间的推移,当培养时间为 6 h 后, $\Delta RseB$ 菌株与野生溶藻弧菌生长速率差别较大,缺失菌株生长 OD 峰值提前出现。当培养时间为 9 h 时, $\Delta RseB$ 菌株出现生长峰值,OD 值为 1.36,当培养时间为 12 h 时,野生溶藻弧菌出现生长峰值,OD 值为 1.33。

2.3 *RseB* 基因缺失菌株与野生溶藻弧菌溶血性比较

12、24、36、48 h 4 个时间点野生溶藻弧菌和 $\Delta RseB$ 溶藻弧菌的溶血圈直径大小如图 3 所示,当培养时间为 12、36、48 h 时,野生溶藻弧菌和 *RseB* 基因缺失溶藻弧菌的溶血圈直径大小具有统计学差异(图 3),分别为差异极显著($P < 0.001$)、差异较显著($P < 0.01$)、差异显著($P < 0.05$),48 h 时溶血性下降了 37.5%。

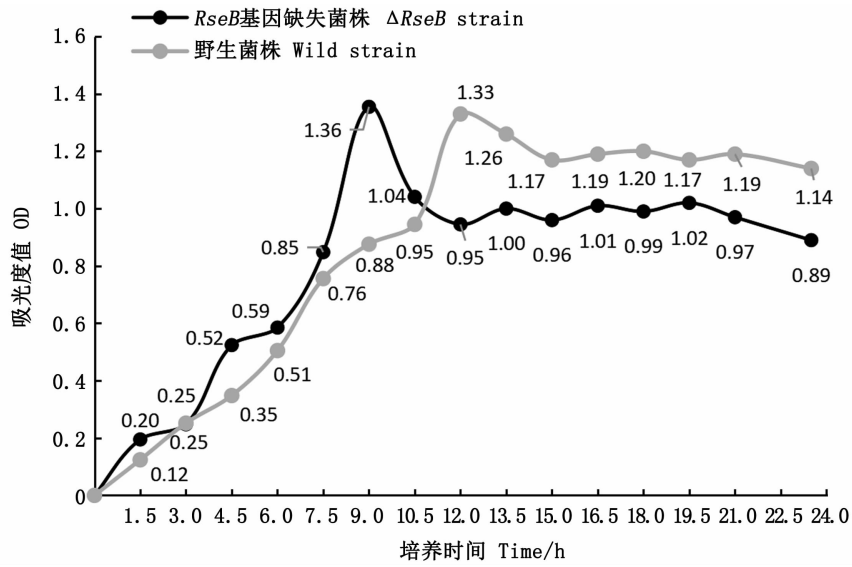
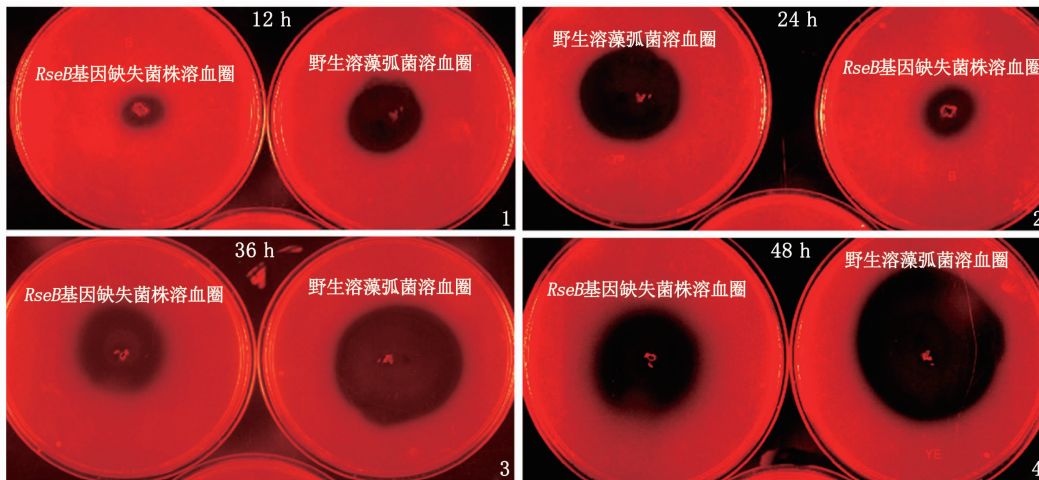
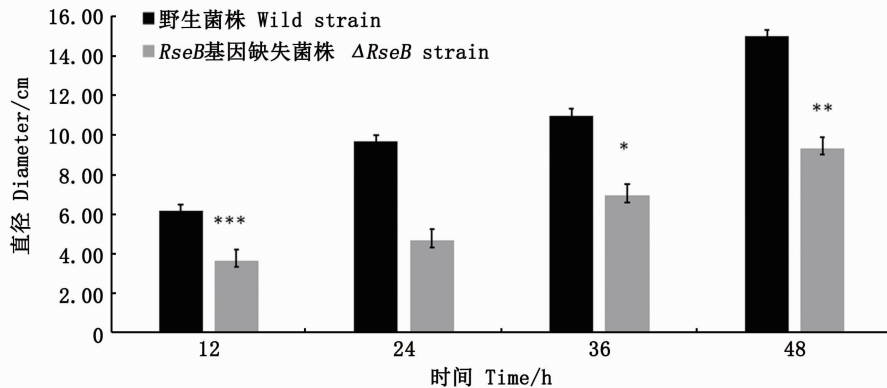


图2 $\Delta RseB$ 菌株与野生溶藻弧菌生长曲线图
Fig. 2 Growth curve of $\Delta RseB$ strain and wild *Vibrio alginolyticus*



(a) 溶藻弧菌血平板溶血圈 Wild strain and $\Delta RseB$ strain on blood agar plate



(b) 溶血圈大小比较 Change of hemolysis area at different time point

柱状图上方含“***”代表差异极显著($P < 0.001$), 柱状图上方含“**”代表差异较显著($P < 0.01$), 含“*”代表差异显著($P < 0.05$)。

“***” at the top of the bar chart indicate extremely significant difference ($P < 0.001$), “**” at the top of the bar chart indicate significant difference ($P < 0.01$), “*” at the top of the bar chart indicate significant difference ($P < 0.05$).

图3 *RseB* 基因缺失菌株与野生溶藻弧菌溶血性

Fig. 3 Hemolysis between *RseB* gene deletion strain and wild *Vibrio alginolyticus*

2.4 *RseB* 影响溶藻弧菌在凡纳滨对虾肠道内定殖能力及致死力

与野生菌株相比,凡纳滨对虾在 $\Delta RseB$ 菌株感染时间为 8 h 时出现死亡,开始死亡时间推迟约为 4 h,LT₅₀ 时间推迟 20 h,感染期间内死亡率明显低于野生菌株,浸泡感染达 96 h 时,累计死亡率为 98%(图 4)。感染溶藻弧菌野生菌株后,凡纳滨对虾活动不频繁,濒临死亡时,身体发红,出现空肠,肝胰腺发炎红肿、中空等现象。野生菌株感染的对虾在 $\Delta RseB$ 菌株感染前期(感染时间 24 h 左右)发病现象不明显,未出现空肠与肝胰腺发红。随着感染时间的增加,感染 $\Delta RseB$ 菌株对虾肠道开始变得模糊,肝胰腺开始微微发

红,部分对虾的活动能力下降。感染时间大于 60 h 时,野生菌株感染的对虾发生大规模死亡现象,大部分肠道变为中空,肝胰腺红肿明显,甚至出现对虾的肝胰腺中空现象,而 $\Delta RseB$ 菌株感染的对虾,发病的数量与程度都较低,总体感染症状相对较轻。在感染的对虾肠道中分离得到的溶藻弧菌经过 PCR 扩增,分别得到片段大小为 1 259 bp 的 $\Delta RseB$ 菌株和 2 242 bp 的野生溶藻弧菌(图 5a)。 $\Delta RseB$ 菌株与野生溶藻弧菌的检出数量分别为 60 个和 129 个,下降了 53.4%, $\Delta RseB$ 菌株与野生溶藻弧菌两个样本的均值呈现极显著差异($P<0.001$),见图 5b)。

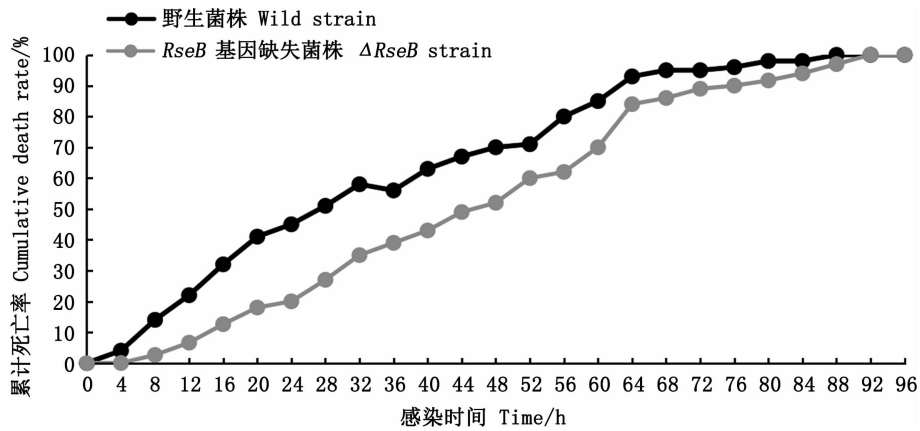
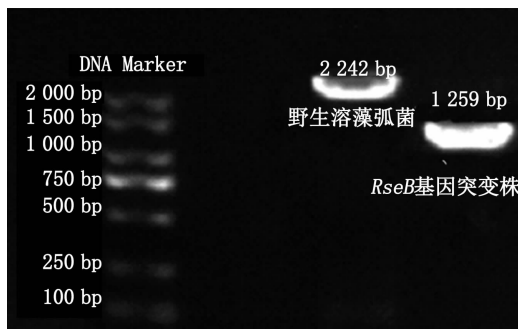
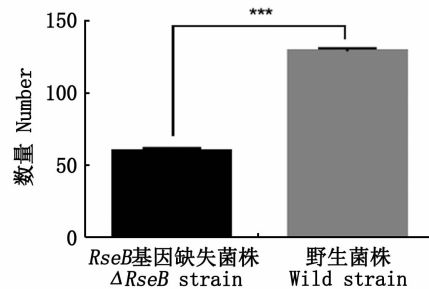


图 4 *RseB* 基因溶藻弧菌缺失菌株与野生菌株处理组累计死亡率
Fig. 4 Cumulative mortality of $\Delta RseB$ strain and wild *Vibrio alginolyticus* strain treatment groups



(a) 肠道两株溶藻弧菌标记基因大小电泳鉴定
Identification of two strains by PCR



(b) 肠道溶藻弧菌存活数量
Viable quantity of *Vibrio alginolyticus* from intestine

柱状图上方含“***”代表差异极显著($P<0.001$)。

*** at the top of the bar chart indicate extremely significant difference ($P<0.001$).

图 5 凡纳滨对虾肠道内 *RseB* 基因缺失菌株与野生溶藻弧菌数量对比图
Fig. 5 Number comparison of $\Delta RseB$ and wild strains from the intestine of *Litopenaeus vannamei*

2.5 凡纳滨对虾肝胰腺组织病理变化

如图版所示,凡纳滨对虾肝胰脏受感染后显微结构发生了明显的变化。肝胰腺是对虾最大的免疫器官,被单层的扁平细胞围绕的肝小管是肝胰腺结构组成和发挥功能的最基本的单位。健康对虾的肝胰腺结构致密,细胞核清晰可见,肝胰腺小管结构完整,边界清晰。通过对病虾肝胰腺进行切片制作观察到:凡纳滨对虾受溶藻弧菌感染后,肝胰腺受到损伤,肝小管的排列顺序紊乱,并且间隙变大、边界开始逐渐模糊,管腔慢慢消失;上皮细胞质内出现空泡,细胞核甚至开始消失。通过观察 8、16、32、64 h 等 4 个时间点的病理切片可知,随感染时间延长,肝胰腺损伤程度不断加重且更加明显,*RseB* 基因缺失菌株感染的凡纳滨对虾肝胰腺受损情况相对较轻。

3 讨论

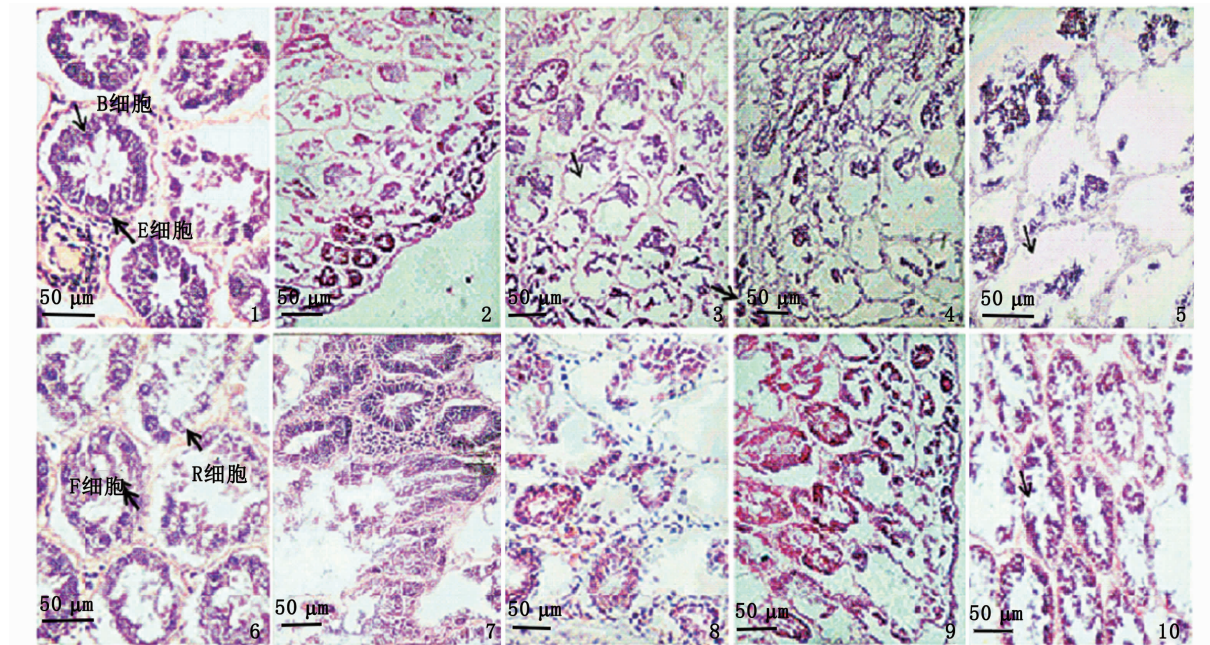
本研究在溶藻弧菌中以 pSR47s 敲除质粒为载体,通过 Overlap PCR 和同源重组筛选技术,成功构建 *RseB* 基因缺失菌株。与野生型溶藻弧菌相比,*RseB* 基因的缺失与溶藻弧菌生长速度呈现正相关性,当培养时间为 6 h 时,*RseB* 基因缺失菌株与野生溶藻弧菌生长速率差别较大,缺失菌株生长 OD 峰值提前出现。同时,*RseB* 基因缺失造成溶藻弧菌溶血性下降 37.5%。能够在千变万化的环境中生存和繁殖,是病原细菌侵染宿主、产生疾病的重要原因。食源性致病菌需要及时有效地调节某些基因的表达和蛋白的活性来适应新的环境,其基因表达首先是从聚合酶进行的转录开始的,原核生物中仅含 1 种聚合酶,全酶含有 5 个亚基, σ 亚基是唯一可变成分,仅在转录起始阶段起识别启动子,启动基因表达的作用。大部分 σ 因子属于 σ^{70} 家族,主要调控生长阶段大部分基因的转录,超过三分之一在细胞质外发挥功能的 σ 因子都是被反 σ 因子调控的。 σ^E 的主要功能是调控细胞膜的应激反应,其活性由其跨膜抗 σ 因子 *RseA* 的降解速率决定。在大肠杆菌中,*Sigma E* Regulators 由 $\sigma(E)$ 因子 (*RpoE*) 的基因和 *RpoE* 基因上游的启动子共转录的调节元件 *RseA*、*RseB* 和 *RseC* 组成^[6]。*Sigma E* 是大肠杆菌高温热休克反应诱导所必需的,在细菌的生长增殖以及保证内环境的稳定过程中起到至关重要的作用^[22-24]。*RseA* 作为一种抗 σ 因子,在通过

DegS、*RseP* 和细胞质蛋白酶依次消化后,才能释放 σ^E 来应对外膜生物发生功能障碍。*RseB* 将作为 *sigma E* 一种负调控元件,是包膜应激反应的第二个负调节因子,以纳摩尔亲和力与 *RseA* 的结构域结合来增强 *RseA* 的活性,从而确保只有相应蛋白酶被应激信号激活时蛋白质水解才会启动,最终 σ^E 正确释放^[23-25]。在哈维弧菌中的研究首次表明,*RseB* 基因与弧菌溶血活性和毒力相关,*RseB* 基因缺失菌株在凡纳滨对虾中表现出毒力减弱^[8],*RseB* 基因缺失菌株在羊血琼脂实验中表现出较低的溶血活性,但在 *RseB* 基因邻域中没有包含被注释为溶血素的基因,这可能是在 *RseB* 基因活性丧失后,*RpoE* 活性随之增强,引发周围的细胞质发生应激反应,通过改变控制溶血活性相关的功能蛋白的空间稳态,导致毒性降低^[6-8]。因此,本研究是继哈维弧菌后又一个在溶藻弧菌中将溶血活性与致病性弧菌中的 *Sigma E* 调节因子联系起来报告,这种与溶血毒性相关表型的表达可能受溶藻弧菌内多种调节途径的控制。

凡纳滨对虾侵染致病性试验结果显示,凡纳滨对虾感染 *RseB* 基因缺失菌株开始死亡时间推迟 4 h,LT₅₀ 推迟 20 h。攻毒后的第 24 小时,*RseB* 基因缺失菌株在对虾中的定殖能力下降 53.4%。竞争指数分析,*RseB* 基因缺失菌株在这个器官的存活能力显著低于野生株 ($0.01 < P < 0.05$)。细菌在感染宿主过程中,当其所处的外部环境(环境温度、渗透压以及金属离子水平等)发生很大变化时,为了适应外部不断变化的环境,细菌本身的基因和代谢调节网络要作出相应的反馈,此时某些基因的表达合成由与之相关的调控因子和蛋白来完成适应,同时保证宿主致病过程的发生^[19-20]。对虾的肝胰腺可以分泌多种消化酶,是营养消化、吸收和储存的最重要的器官之一,通常观察对虾的肝胰腺作为判断健康状况的标志。肝小管是肝胰腺结构组成和发挥功能的最基本的单位,其管壁由单层细胞构成,根据其形态和功能的不同,可把这些细胞分成 4 类:泡状细胞(B 细胞)、胚细胞(E 细胞)、吸收细胞(R 细胞)和纤维细胞(F 细胞)。肝胰腺中 B 细胞被认为对肝小管内营养物质的代谢吸收有促进作用,数量最多;R 细胞是储存营养物质的主要场所;F 细胞细胞质中含许多酶原颗粒^[26]。受溶藻弧菌感

染后的凡纳滨对虾肝胰腺严重受到侵袭,*RseB* 基因敲除菌株感染的凡纳滨对虾肝胰腺受损情况相对较轻。溶藻弧菌被认为是急性肝胰腺坏死综合征 AHPNS 的致病病原菌之一^[1,12,17]。*RseB* 基因作为一种毒力基因在溶藻弧菌侵染对虾引

起 AHPNS 的过程中也发挥了一定的作用。菌群密度感应、生物膜形成及由噬菌体可介导的毒力基因转移都与毒力的大小具有相关性^[4-6]。因此,深入研究并且掌握致病弧菌的发病机制对水产病害防治有重要意义。



1~5 表示被野生溶藻弧菌感染的凡纳滨对虾肝胰腺在 0、8、16、32、64 h 共 5 个时间点下的感染切片; 6~10 表示被 *RseB* 基因敲除溶藻菌株感染的凡纳滨对虾肝胰腺在 0、8、16、32、64 h 共 5 个时间点下的感染切片; 箭头所指处表示随着感染时间的增加, 免疫细胞 (B 细胞、E 细胞、F 细胞与 R 细胞) 的数量减少, 细胞形态逐渐不规则, 细胞内的细胞核不断破碎化。

The numbers 1-5 represent the infected slices of the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* infected by *Vibrio alginolyticus* at 5 time points: 0, 8, 16, 32 and 64 h; The numbers 6-10 represent the infected slices of the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* infected by the albolytic strain with *RseB* gene knockout at 5 time points: 0, 8, 16, 32 and 64 h; The arrow indicates that the number of immune cells (B cells, E cells, F cells and R cells) decreases with the increase of infection time, and the cell morphology is gradually irregular, and the cell nucleus is constantly fragmented.

图版 凡纳滨对虾肝胰腺组织病理变化
Plate Pathological changes of hepatopancreas in *Litopenaeus vannamei*

参考文献:

- [1] 杨桂梅, 鲍宝龙, 李会荣, 等. 暗纹东方鲀几种组织中可培养细菌的组成分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(1): 12-21.
YANG G M, BAO B L, LI H R, et al. Analysis on the composition of culturable bacterial communities in several tissues of puffer fish *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(1): 12-21.
- [2] 戴佳傲, 韦芬, 鲍宝龙, 等. 杀鲑气单胞菌杀藻作用的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(3): 439-446.
DAI J A, WEI F, BAO B L, et al. Preliminary study on algacide function of chitinase from *Aeromonas salmonicida* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(3): 439-446.
- [3] 苏婷, 罗鹏, 陈偿, 等. 溶藻弧菌溶血活性检测及溶血素基因、启动子区功能[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1138-1144.
SU T, LUO P, CHEN C, et al. Hemolytic activities of *Vibrio alginolyticus* and functional analysis of a hemolysin gene and its promoter [J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1138-1144.
- [4] 邓益琴, 陈偿, 苏友禄, 等. 溶藻弧菌 ZJ-T 小 RNA srgv17985 缺失突变株的构建及该小 RNA 功能的初步分析[J]. 南方水产科学, 2019, 15(1): 42-53.
DENG Y Q, CHEN C, SU Y L, et al. Construction of knock-out mutant of sRNA srgv17985 in *Vibrio alginolyticus* ZJ-T and its preliminary function analysis [J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(1): 42-53.
- [5] KIM D, Y, KWON E, CHOI J K, et al. Structural basis for the negative regulation of bacterial stress response by *RseB* [J]. Protein Science, 2010, 19(6): 1258-1263.
- [6] KULP A, KUEHN M J. Recognition of β -strand motifs by

- RseB* is required for σ^E Activity in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(22): 6179-6186.
- [7] 陈红娜, 王长军, 潘秀珍, 等. 猪链球菌2型 *srtF* 基因敲除突变株的构建及其毒力[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(12): 1786-1792.
- CHEN H N, WANG C J, PAN X Z, et al. Construction and virulence assays of the sortase F Gene knock-out mutant of *Streptococcus suis* 2 [J]. *Microbiology China*, 2010, 37(12): 1786-1792.
- [8] 李宏. 溶藻弧菌毒力菌株基因缺失突变株的构建及表型初步分析[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- LI H. Construction of gene knockout strains and phenotypic analysis of *Vibrio alginolyticus* virulence strain[D]. Haikou: Hainan University, 2013.
- [9] 姚俊敏, 张韶芮, 金鑫, 等. 苏云金芽胞杆菌 XL6-候选生物被膜调控基因 00940 序列分析及基因敲除突变体构建[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(8): 1401-1409.
- YAO J M, ZHANG S R, JIN X, et al. Sequence analysis of a putative biofilm gene 00940 from *Bacillus thuringiensis* XL6- and construction of its gene knockout mutant [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(8): 1401-1409.
- [10] 张亚秋, 邓益琴, 冯娟, 等. 哈维弧菌 *vhh* 基因缺失株的构建及其相关生物学特性研究[J]. *南方水产科学*, 2020, 16(2): 43-53.
- ZHANG Y Q, DENG Y Q, FENG J, et al. Construction of knock-out mutant of *vhh* in *Vibrio harveyi* and its related biological characteristics analysis [J]. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(2): 43-53.
- [11] 葛岭玉. 溶藻弧菌 *rpoN*(σ^{54})的敲除及其功能研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.
- GE L Y. Study on function of *Vibrio alginolyticus* *rpoN*(σ^{54}) [D]. Haikou: Hainan University, 2018.
- [12] 程海燕. 溶藻弧菌毒力相关基因 *toxR*、*acfA* 的功能研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- CHENG H Y. Function study of the virulence genes *acfA* and *toxR* in *Vibrio alginolyticus* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014.
- [13] 庞欢瑛, 陈立明, 黄郁葱, 等. 溶藻弧菌 *ddlh* 基因突变株的构建及其生物学功能研究[J]. *生物技术通报*, 2014(10): 161-167.
- PANG H Y, CHEN L M, HUANG Y C, et al. Construction and characterization of a mutant of *Vibrio alginolyticus* ZJ03 $\Delta ddlh$ strain [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(10): 161-167.
- [14] 陈妍妍. 溶藻弧菌定植因子 *AcfA* 的功能及其对 SOD、Flg 和 Dct 的调控[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- CHEN Y Y. Study on the function and regulation of accessory colonization factor *AcfA* of *Vibrio alginolyticus* to SOD, Flg and Dct [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.
- [15] 庞欢瑛, 周泽军, 丁燊, 等. 溶藻弧菌 *uscO* 基因在不同环境下的表达差异[J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(4): 59-63.
- PANG H Y, ZHOU Z J, DING Y, et al. Different expressions of *uscO* gene from *Vibrio alginolyticus* in different environments [J]. *Journal of Jishou University (Natural Science Edition)*, 2014, 35(4): 59-63.
- [16] 蒋葛, 沈辉, 万夕和, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征研究进展[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(4): 87-91.
- JIANG G, SHEN H, WAN X H, et al. Progress on acute hepatopancreas necrosis syndrome in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(4): 87-91.
- [17] 侯巧利, 王庚申, 谢建军, 等. 引起舟山地区凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病原的分离与鉴定[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 40(1): 42-51.
- HOU Q L, WANG G S, XIE J J, et al. Isolation and identification of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreas necrosis diseased in *Litopenaeus vannamei* in Zhoushan [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2021, 40(1): 42-51.
- [18] 卢芷程, 许鑫佳, 卢文字, 等. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾血细胞毒性及细胞凋亡和免疫相关基因的影响[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(12): 2559-2565.
- LU Z C, XU L J, LU W Y, et al. Effects of *Vibrio alginolyticus* on hemocytes toxicity, apoptosis and immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(12): 2559-2565.
- [19] 樊英, 许拉, 王晓璐, 等. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾不同攻毒方式的响应[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2018, 47(3): 342-346.
- FAN Y, XU L, WANG X L, et al. Response of *Litopenaeus vannamei* to different infection methods of *Vibrio harveyi* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2018, 47(3): 342-346.
- [20] 陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌 (*VpAHPND*) 的定量分析[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100.
- CHEN M M, DONG X, QIU L, et al. Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (*VpAHPND*) in infected *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100.
- [21] 庞欢瑛, 周泽军, 丁燊, 等. 溶藻弧菌减毒活疫苗的构建及其免疫保护性[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 769-776.
- PANG H Y, ZHOU Z J, DING Y, et al. Construction of live attenuated *Vibrio alginolyticus* vaccine and its immunogenic and protective effects [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 769-776.
- [22] AHUJA N, KORKIN D, CHABA R, et al. Analyzing the interaction of *RseA* and *RseB*, the two negative regulators of the σ^E envelope stress response, using a combined

- bioinformatic and experimental strategy [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(8): 5403-5413.
- [23] MISSIAKAS D, MAYER M P, LEMAIRE M, et al. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the *RseA*, *RseB* and *RseC* proteins[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(2): 355-371.
- [24] DE LAS PEÑAS A, CONNOLLY L, GROSS C A. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by *RseA* and *RseB*, two negative regulators of σ^E [J]. Molecular Microbiology, 1997, 24 (2): 373-385.
- [25] RATTANAMA P, THOMPSON J R, KONGKERD N, et al. Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e32523.
- [26] 周凯, 来琦芳. 中国明对虾弧菌病的组织病理学研究[J]. 海洋渔业, 2005, 27(1): 49-54.
- ZHOU K, LAI Q F. Histopathological research of *Penaeus chinensis* infected by bacteria *Vibrio alginolyticus*[J]. Marine Fisheries, 2005, 27(1): 49-54.

Deletion of *RseB* gene attenuates the pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* in *Litopenaeus vannamei*

MENG Lu^{1,2}, CHE Jinyuan^{1,2}, HUANG Xuxiong^{1,2}, LUO Tuyan³, 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; 3. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: *Vibrio alginolyticus*, a Gram-negative bacterium, is a dominant bacterium in the marine environment. At the same time, it is also a common pathogenic bacterium in daily life. When the temperature is between 25 °C and 35 °C, the epidemic vibriosis is particularly easy to break out, which has a significant impact on the mariculture industry. *RseB* gene was successfully deleted with Overlap PCR and homologous gene recombination. The results showed that the *RseB* gene was correlated with the growth rate of *V. alginolyticus*, and the deletion strain increased the growth rate of *Vibrio alginolyticus*. *RseB* gene deletion resulted in a 37.5% decrease in hemolysis of *V. alginolyticus*. The pathogenicity test results showed that the death time of the *RseB* gene deleted strain in the experimental group was delayed by 4 h, and the LT_{50} was delayed by 20 h. At 24 h after challenge, the colonization ability of *RseB* gene deletion strain in *L. vannamei* decreased by 53.4%. The hepatopancreas of *L. vannamei* infected by *Vibrio phagolysii* were seriously infected, the order of hepatic tubules was out of order, the space became larger, the boundary began to blur gradually, and the lumen of hepatopancreas tubules disappeared. The arrangement of liver cells began to be irregular, and some liver cells were obviously enlarged or even the whole cell began to degenerate, dyed dark with eosin, and the nucleus began to disappear. The results of pathological sections at 8, 16, 32 and 64 h showed that the hepatopancreas damage of *RseB* gene knockout strain was relatively mild.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; *RseB*; gene knockout; *Litopenaeus vannamei*; pathogenicity