

副溶血弧菌 *hemoD* 敲除菌株构建及致病力评估

胡少杰^{1,2}, 车金远^{1,2}, 房启童^{1,2}, 罗士炎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: 通过同源重组技术, 构建了 *hemoD* 基因缺失的副溶血弧菌敲除菌株 $\Delta hemoD$, 对 $\Delta hemoD$ 菌株的毒力和感染四膜虫及凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 的能力进行了评估。相比野生型菌株, $\Delta hemoD$ 菌株溶血活性下降了 45.7%, 生物膜形成能力下降了 36.2%, 生长无明显变化。相比野生型菌株, $\Delta hemoD$ 菌株对四膜虫的毒力降低, 四膜虫对 $\Delta hemoD$ 菌株具有更强的摄食能力, 增殖能力也更强。针对凡纳滨对虾的攻毒实验, 发现 $\Delta hemoD$ 菌株半数致死量为 1.3×10^8 cfu/mL, 相较于野生型菌株提高了 5.06 倍, $\Delta hemoD$ 菌株定植凡纳滨对虾肠道能力明显下降。病理切片结果显示, $\Delta hemoD$ 菌株对胰腺的损伤能力相较于野生菌株也有所下降, 胰腺细胞溶解及空泡化现象较轻微。这些研究结果表明, $\Delta hemoD$ 菌株的毒性明显减弱, 对四膜虫和凡纳滨对虾的致病力明显减弱, 是一株减毒的副溶血弧菌菌株, 为后续进一步开发副溶血弧菌减毒疫苗奠定基础。

关键词: 副溶血弧菌; *hemoD* 基因; 四膜虫; 凡纳滨对虾; 致病力

中图分类号: S 917

文献标志码: A

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 一种革兰氏阴性杆状细菌, 具有鞭毛, 广泛分布于河口与海洋中, 是水产养殖主要病原菌之一^[1]。凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 是我国当前最普遍的对虾养殖种类^[2], 但近年来副溶血弧菌对凡纳滨对虾的养殖造成了很大的困扰^[3], 副溶血弧菌主要毒力因子包括溶血毒素、黏附因子、脂多糖、蛋白酶和外膜蛋白等, 其中溶血毒素是副溶血弧菌最为重要的毒力因子之一, 是一种可以溶解红细胞的外毒素^[4]。凡纳滨对虾养殖中极易发生副溶血弧菌的感染, 导致对虾发生急性肝胰腺坏死而死亡^[5]。

目前对虾急性肝胰腺坏死还没有很好的应对措施, 开发针对副溶血弧菌的疫苗是一个重要的方向^[6]。虽然以往观点认为无脊椎动物没有获得性免疫, 近 20 年来, 已有很多研究^[7-9]表明甲壳动物确实存在简单的免疫记忆, 早在 20 世纪 80 年代就已有针对对虾疾病疫苗的尝试^[10], 目前的疫苗方式仍然主要采用各种灭活疫苗, 取得了不

同程度的效果^[11-13]。有实际应用前景的免疫方式是活体浸泡或通过混入饵料进行口服, 需要开发毒力显著降低和对水产动物无明显毒害作用的减毒弧菌, 提高疫苗的安全性^[14-16]。本研究利用基因工程手段构建减毒的副溶血弧菌, 拟开发抗副溶血弧菌疫苗。*hemoD* 基因是溶血素 A 分泌过程中的关键基因^[17], 将其在副溶血弧菌中敲除, 有望降低副溶血弧菌的毒力。

1 材料与方法

1.1 实验动物与菌株

副溶血弧菌野生菌株具氨苄青霉素抗性; 大肠杆菌 cc118 感受态细胞含接合辅助质粒的大肠杆菌 pHelper, 具有氯霉素抗性; 自杀质粒 pSR47s 具有卡那霉素抗性基因及 *sacB* 蔗糖敏感基因。嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 来自中国海洋大学高珊教授实验室馈赠, 凡纳滨对虾来自江苏南通如福水产苗业养殖公司。

收稿日期: 2024-05-27

修回日期: 2024-06-28

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2400100); 福建省促进海洋与渔业产业高质量发展专项资金项目(FJHYF-L-2023-16)

作者简介: 胡少杰(2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物遗传。E-mail: 15233813696@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>

1.2 缺失菌株构建

以副溶血弧菌基因组 DNA 为模板,利用表 1 中的引物 *hemoD*-P1/ *hemoD*-P2 和 *hemoD*-P3/*hemoD*-P4 扩增 *hemoD* 基因的上下游同源臂片段,再通过融合 PCR 进行片段融合。利用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Bam*H I 对自杀质粒及上下游融合片段进行双酶切,经 T4 DNA 连接酶 4 ℃过夜连接构建重组质粒,热激转化至大肠杆菌 cc118 感受态细胞,利用引物 pSR47s-M13 和 pSR47s-VECR 进行 PCR 验证,重组质粒命名为 pSR47s-*hemoD*。副溶血弧菌野生菌株(受体菌)、携带重组质粒的大肠杆菌(供体菌)和携带接合质粒的

大肠杆菌(辅助菌)按 1:1:5 比例混合置于 LB 固体培养基,刮取培养基上全部菌体于 LB 液体培养基,稀释后涂布于氨苄青霉素和卡那霉素的固体培养基,挑取单菌落进行 PCR 验证,挑选双条带菌落稀释涂布于 15% 蔗糖培养基,挑取单菌落,利用表 1 中引物 *hemoD*-T1/ *hemoD*-T2 进行 PCR 验证,筛选出仅有短片段的菌株进行 16S rDNA 鉴定,得到 *hemoD* 基因缺失的副溶血弧菌菌株。利用表 1 中引物 *hemoD*-HB-F/*hemoD*-HB-R 克隆副溶血弧菌 DNA 片段,构建 *hemoD* 基因回补质粒,重复上述细菌同源重组过程,得到 *hemoD*⁺菌株。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度 Tm/℃	产物大小 Fragment/bp	酶切位点 Enzyme cutting site
<i>hemoD</i> -P1	<u>CGAGCTCCGTTAAATACGTCTGGCTCG</u>	55	602	<i>Sac</i> I
<i>hemoD</i> -P2	CAGTCTGAGAGCGGTATGAGATTGAAGGTGTAGAAGTCG	56		
<i>hemoD</i> -P3	CGACTTCTACACCTTCAATCCTCATACCGCTCTCAGACTG	56	985	
<i>hemoD</i> -P4	<u>CGGGATCCCATACAGGTGTCCGTAATCG</u>	55		<i>Bam</i> H I
<i>hemoD</i> -T1	CCCATCGGTAGATTCACTCT	55		
<i>hemoD</i> -T2	CAAGTATGGCACCTTGGTG	56		
<i>hemoD</i> -HB-F	<u>CGAGCTCCA</u> ACTCTCGCAAGTGCTAT	55		<i>Sac</i> I
<i>hemoD</i> -HB-R	CGGGATCCC <u>GATTAC</u> GGACACCTGTATG	56		<i>Bam</i> H I
pSR47s-M13	CAGGAAACAGCTATGAC	54	353	
pSR47s-VECR	GATTTGCAGACTACGGGCCTA	54		
16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54		1442
16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT	54		

注:下划线表示酶切位点。
Notes: Enzyme cutting site underline.

1.3 生长曲线绘制

挑取副溶血弧菌野生菌株和敲除菌株 $\Delta hemoD$ 平板上的单菌落,接种于 1 mL LB 液体培养基的无菌离心管中,置入 30 ℃摇床中培养,将各菌液 OD₆₀₀ 均调整至 0.5 后,取 100 μL 菌液接种于含 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中,放入 30 ℃摇床,150 r/min 振荡培养,对锥形瓶中的菌液进行间隔取样,每隔 1 h 取上述各锥形瓶中的菌液测定其在 600 nm 下的 OD 值并记录。以培养时间为横坐标,各菌液 OD₆₀₀ 为纵坐标绘制生长曲线。

1.4 溶血活性测定

挑取平板上的单菌落于 LB 液体培养基中吹打混匀,放入摇床中培养至菌液浑浊。取浑浊的菌液 10 μL 接种于 10 mL 的 LB 液体培养基中,放入摇床中 30 ℃培养 1 d,取培养浑浊的菌液测定其 OD₆₀₀ 并将各菌液 OD 值均调整为 0.5。取调整

后菌液 5 μL,垂直悬空缓慢滴加在我妻氏血琼脂平板上,各组设置 3 个平行,待菌液渗入固体培养基后,移至 30 ℃培养箱,正置培养,定时观察各菌落溶血圈的变化,并拍照记录,利用 Image J 软件测定溶血圈面积与菌落面积^[18]。

1.5 生物膜形成能力测定

活化后的菌液以千分之一的比例接种于 LB 液体培养基,30 ℃过夜培养,在 96 孔培养板中每孔加入 100 μL LB 液体培养基,再取上述过夜培养的菌液 10 μL 接种于 96 孔培养板各组对应孔中,每组设置 3 个平行,30 ℃静止培养 36 h。用无菌 PBS 溶液冲洗 3 次,每孔加入 100 μL 甲醇固定 15 min,风干后加入 100 μL 1% 结晶紫溶液染色 5 min,自来水冲洗干净晾干,加入 100 μL 33% 的冰乙酸,37 ℃溶解 30 min,最后用酶标仪测定其 OD₅₉₀^[19]。

1.6 嗜热四膜虫的吞噬作用

取保存于 -80°C 冰箱的四膜虫接种于灭菌的SPP培养基中,室温静置培养36 h,取两管50 mL虫液在 4°C 下3 000 r/min离心10 min,弃上清,加入无抗生素的SPP培养基10 mL重悬虫液,用细胞计数板在显微镜下对四膜虫进行计数,计算出浓缩虫液浓度,重复3次,取平均值,用SPP培养基将虫液浓度调整为 2×10^5 cfu/mL备用。副溶血弧菌各敲除菌株及野生菌从 -80°C 冰箱取出,接种于LB固体培养基活化过夜,挑取单菌落于LB液体培养基中吹打混匀,放入摇床中培养至菌液浑浊,取浑浊的菌液接种于10 mL LB液体培养基中,置于 30°C 摇床中培养至 OD_{600} 为0.5,离心后用SPP培养基重悬菌体后,将菌液调整至 OD_{600} 为0.5。虫液与菌液准备好后,在96孔培养板各孔中加入100 μL 虫液,每组3个重复孔,再向各组虫液中分别加入准备好的菌液100 μL ,设置菌液对照组(不加虫液)和虫液对照组(不加菌液)。混匀后放在 30°C 培养箱中静止培养,总培养时间为12 h,每隔2 h用酶标仪测定其 OD_{450} ^[20]。四膜虫吞噬作用计算公式为菌液对照组 OD_{450} 减去实验组 OD_{450} 减去虫液对照组 OD_{450} 。

1.7 共培养对嗜热四膜虫的增殖影响

选取虫液浓度为 2×10^5 cfu/mL、菌液浓度为 $\text{OD}_{600}=0.5$ 进行共培养,测定四膜虫在不同菌株作用下的生长繁殖能力。取1 mL虫液和1 mL菌液混合后置于 30°C 培养箱中静置,每隔1 h取出一管共培养液,吸出100 μL 培养液加入50 μL 多聚甲醛-戊二醛溶液进行固定,实验时间为6 h。培养结束后,对固定好的各组四膜虫用细胞计数板进行计数统计,观察四膜虫的形态变化并拍照记录^[20]。

1.8 半数致死量测定

以体长2~4 cm的凡纳滨对虾作为实验动物测定各菌株对其的半数致死量。将副溶血弧菌 ΔhemoD 和WT菌株浓度分别稀释为 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 cfu/mL,梯度浓度浸泡感染凡纳滨对虾,每组设置50尾对虾,对照组两组共100尾。攻毒实验期间不需要进行投喂,每天换水,各组重新加入稀释好的菌液,维持水体中菌液浓度的相对稳定,每天早晚统计对虾死亡情况,并将死亡的对虾收集起来进行灭菌处理。攻毒周期为72 h,攻毒结束后统计各组对虾总体死

亡情况,利用改良寇氏法计算各菌株对凡纳滨对虾的半数致死量^[21]。实验结束后将实验用具进行灭菌处理,以防实验菌株进入自然环境,对生态环境造成影响。

1.9 凡纳滨对虾病理组织切片

取对照组、野生菌株感染组和敲除菌株 ΔhemoD 感染组24、48、72 h的凡纳滨对虾,解剖取肝胰腺组织,用4%PFA(多聚甲醛)固定,利用乙醇进行脱水,石蜡包埋切片,对组织进行H.E染色,中性树脂封片,光学显微镜观察拍照。

1.10 肠道定殖能力测定

浸泡感染12、24、48、72、96 h时取样,每个时间点取样3尾虾,解剖后取肠道组织,弃去粪便等,然后将肠道组织进行研磨,用无菌PBS清洗肠道,并进行适当倍数的稀释,然后将稀释好的肠道组织涂布于TCBS培养基上,第2天进行计数,记录野生菌和缺失菌株的数量,挑取菌株进行16S rDNA验证是否为副溶血弧菌。

1.11 数据分析

实验结果均采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,用GraphPad Prism8软件进行数据统计分析,数据进行T检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 副溶血弧菌敲除菌株 ΔhemoD 构建

重组质粒在副溶血弧菌内进行2次同源重组,融合片段通过同源重组替换细菌基因组上目的片段,从15%蔗糖培养基挑选敲除菌株,以野生菌株作为阴性对照进行PCR验证。如图1所示,1号为野生菌株条带,大小为1 202 bp,2号为缺失菌株条带,大小为164 bp,3号为回补菌株条带,大小为1 202 bp,敲除片段大小为1 038 bp。结果表明,在副溶血弧菌中成功敲除 hemoD 基因。

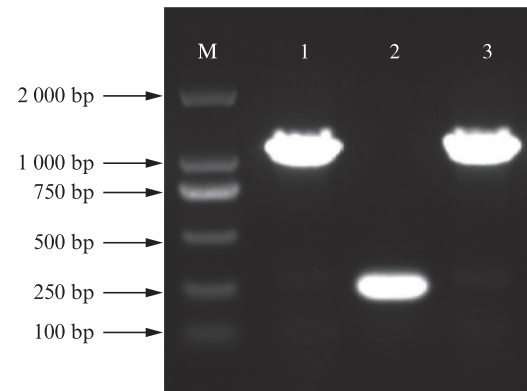
2.2 ΔhemoD 菌株溶血活性和生物膜形成能力评估

测定敲除菌株与野生菌株的生物学特征,发现 hemoD 缺失导致副溶血弧菌生物膜形成能力及溶血活性发生下降,生长能力无明显变化。 ΔhemoD 敲除菌株与野生菌株在我妻氏血平板上培养48 h,野生菌株溶血圈面积与菌株面积平均比值为3.24, ΔhemoD 敲除菌株溶血圈面积与菌

株面积平均比值为 1.76。与野生菌株相比, $\Delta hemoD$ 敲除菌株溶血活性下降了 45.7%。如图 2 所示, *hemoD* 基因敲除后, 副溶血弧菌溶血能力显著下降 ($P < 0.05$)。后续构建 *hemoD*⁺ 菌株, 经我妻氏血平板培养后发现, 其溶血能力与野生菌株无显著差异, 相较于 $\Delta hemoD$ 敲除菌株溶血能力有显著增强, 验证 $\Delta hemoD$ 敲除菌株溶血能力下降是 *hemoD* 基因敲除的结果。

如图 2d 所示, 利用结晶紫染色法测定 OD 值, 测定 $\Delta hemoD$ 敲除菌株 OD 值相较于野生菌株下降了 36.2%, $\Delta hemoD$ 敲除菌株生成的生物膜要显著低于野生菌株 ($P < 0.05$)。研究结果表明 *hemoD* 基因敲除影响副溶血弧菌生物膜形成能力。

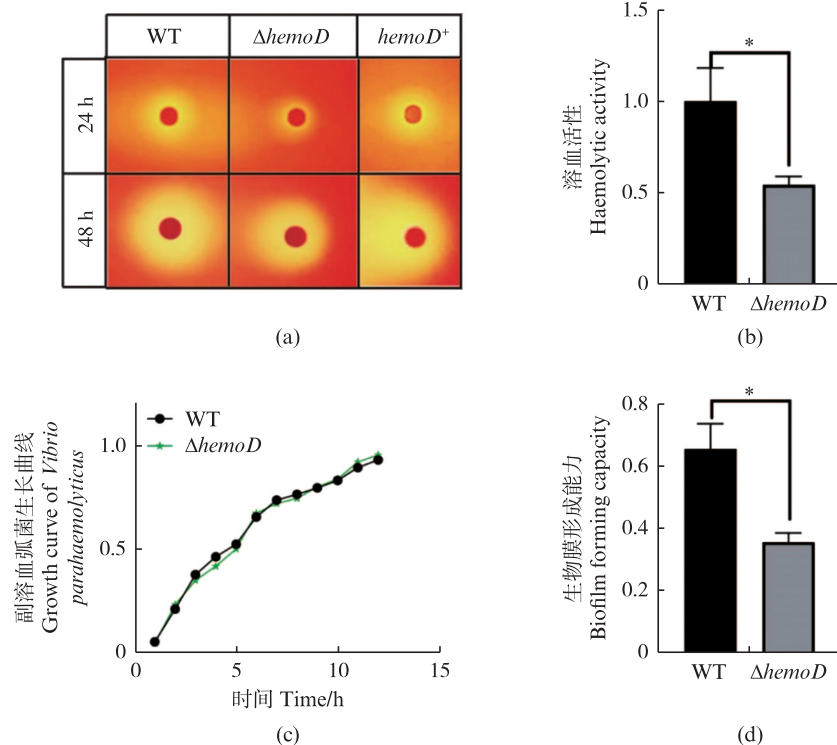
hemoD 基因敲除不影响副溶血弧菌的生长。如图 2c 所示, 测定 $\Delta hemoD$ 敲除菌株与野生菌株的生长曲线, 两株菌株生长趋势基本一致, 表明 *hemoD* 基因敲除后细菌在 30 °C 下生长繁殖能力并无差异。



M 为 2 000 marker; 1. 野生菌株以 *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 引物 PCR 产物条带; 2. $\Delta hemoD$ 菌株以 *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 引物 PCR 产物条带; 3. $\Delta hemoD$ ⁺ 菌株以 *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 引物 PCR 产物条带。

M is 2 000 markers; 1. Wild type strain with *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 primer PCR product strips; 2. $\Delta hemoD$ strain with *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 primer PCR product strips; 3. $\Delta hemoD$ ⁺ strain with *hemoD*-T1- *hemoD*-T2 primer PCR product strips.

图 1 副溶血弧菌 *hemoD* 基因野生片段与敲除片段
Fig. 1 Wild type and knockout fragments of *Vibrio parahaemolyticus hemoD* gene



(a) 副溶血弧菌野生菌株、敲除菌株 $\Delta hemoD$ 和回补菌株 *hemoD*⁺ 在我妻氏血琼脂平板的溶血情况; (b) 两种菌株溶血能力差异统计分析; (c) 两种菌株生长曲线; (d) 两种菌株生物膜形成能力差异统计分析。

(a) Haemolysis of *Vibrio parahaemolyticus* wild strain and knockout strain $\Delta hemoD$ on my wife's blood agar plates; (b) Statistical analysis of difference in haemolysis capacity of the two strains; (c) Growth curves of the two strains; (d) Statistical analysis of difference in biofilm formation capacity of the two strains.

图 2 副溶血弧菌 $\Delta hemoD$ 敲除菌株与野生菌株生物学特征对比

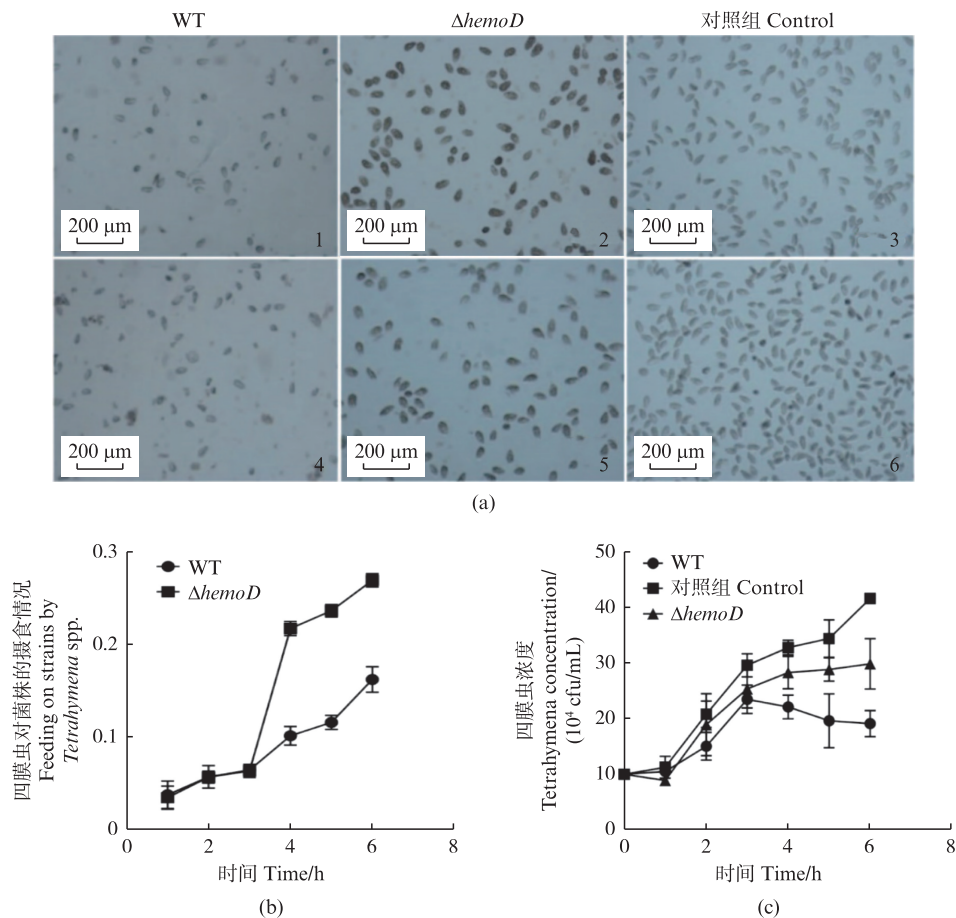
Fig. 2 Biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus hemoD* knockout strain compared with wild type strain

2.3 $\Delta hemoD$ 菌株对四膜虫致病性的评估

利用四膜虫评估敲除菌株毒力。图 3(a) 为共培养 6 h 后的四膜虫, 对照组 (Control) 四膜虫细胞呈椭圆长梨状, 细胞数目多, 活动速度快。在副溶血细菌共培养作用下, 四膜虫形态发生改变, 细胞皱缩变圆, 胞质内空泡明显。其中, 野生菌株 WT 共培养作用下四膜虫数量最少, 虫体活力最差, 且出现大量死亡细胞。而在敲除菌株 $\Delta hemoD$ 组共培养作用下四膜虫细胞出现皱缩变圆, 胞质内空泡明显, 但存活率明显提高。

四膜虫对细菌具有吞噬作用, 图 3(b) 所示共培养 0~3 h 四膜虫对敲除菌株 $\Delta hemoD$ 与野生菌

株 WT 吞噬能力无差异, 3 h 后四膜虫对 $\Delta hemoD$ 菌株吞噬能力增强。4 h 时四膜虫吞噬 $\Delta hemoD$ 菌株为 $\Delta OD_{450}=0.225$, 吞噬野生菌株为 $\Delta OD_{450}=0.111$, 四膜虫对 $hemoD$ 基因敲除后的副溶血弧菌吞噬能力增强 2.03 倍。菌虫共培养阶段, WT 组四膜虫数量趋势为先升高, 在 3 h 时开始下降; $\Delta hemoD$ 组四膜虫数量稳步增长, 在 4 h 后逐渐趋于稳定。如图 3c 所示, WT 组四膜虫数量在 3 h 时达到峰值, 为 23.5×10^4 cfu/mL, 3~6 h 呈逐步下降趋势, $\Delta hemoD$ 组四膜虫数量在 3 h 时为 25.375×10^4 cfu/mL, 3~6 h 呈逐步上升趋势。



(a) 四膜虫与菌株共培养 6 h 后固定拍照; (b) 四膜虫对野生菌株与 $\Delta hemoD$ 菌株吞噬作用; (c) 野生菌株与 $\Delta hemoD$ 菌株对四膜虫数量变化的影响。

(a) Photographs taken after fixation of *Tetrahymena thermophila* co-cultured with *Vibrio parahaemolyticus* for 6h; (b) Phagocytosis of *T. thermophila* on the wild strain and the $\Delta hemoD$ strain; (c) Effect of the wild strain and the $\Delta hemoD$ strain on the number of *T. thermophila*.

图 3 副溶血弧菌与四膜虫共培养情况

Fig. 3 Co-culture of *Vibrio parahaemolyticus* with *Tetrahymena thermophila*

2.4 $\Delta hemoD$ 菌株对凡纳滨对虾半数致死量

副溶血弧菌感染凡纳滨对虾的半数致死量如表 2 所示, $\Delta hemoD$ 菌株半数致死量为 $1.30 \times$

10^8 cfu/mL, WT 菌株半数致死量为 2.57×10^7 cfu/mL, $hemoD$ 基因敲除导致副溶血弧菌半数致死量提高了 5.06 倍。 $\Delta hemoD$ 菌株处理组在梯度感染

浓度下凡纳滨对虾死亡率均低于野生菌株感染组,在 4×10^9 cfu/mL 感染浓度下降程度最明显,下降 31.82%。

表 2 副溶血弧菌和敲除菌株对凡纳滨对虾的半数致死量

Tab. 2 LD₅₀ of *Vibrio parahaemolyticus* and $\Delta hemoD$ on *Penaeus vannamei*

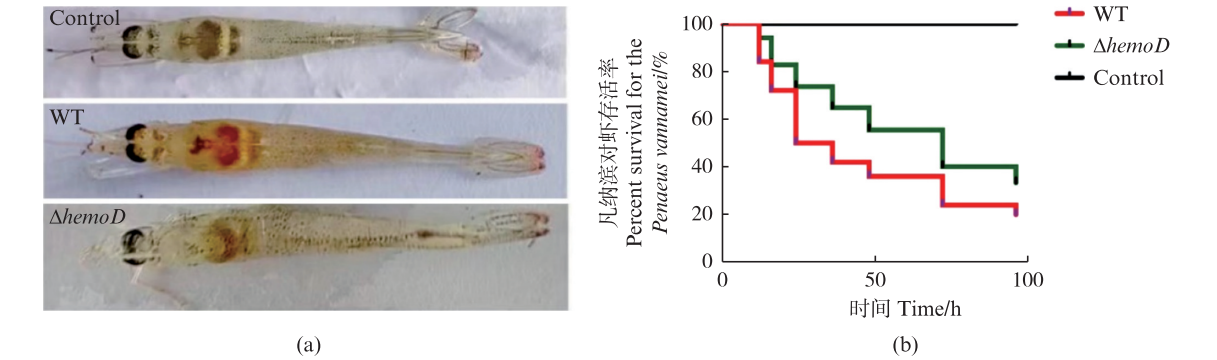
攻毒剂量 Dose of challenge /cfu	死亡数量/总数 Number of death/Total		死亡率 Mortality/%	
	WT	$\Delta hemoD$	WT	$\Delta hemoD$
4×10^9	33/50	22/50	66	44
4×10^8	29/50	20/50	58	40
4×10^7	23/50	19/50	46	38
4×10^6	19/50	12/50	38	24
LD ₅₀	2.57×10^7		1.30×10^8	
上升倍数			5.06	

2.5 *hemoD* 基因敲除影响副溶血弧菌在凡纳滨对虾肠道定殖能力

$\Delta hemoD$ 菌株在凡纳滨对虾肠道中的定殖能力弱于野生菌株。在取样的 5 个时间点中,野生菌株在凡纳滨对虾肠道中定殖的数量为升高后趋于稳定, $\Delta hemoD$ 菌株则是先升高再下降,且 $\Delta hemoD$ 菌株感染组的对虾肠道定殖的数量均低于野生菌株感染组(图 5)。结果表明 *hemoD* 基因敲除后细菌感染宿主后的定殖能力下降。

2.6 感染副溶血弧菌后对虾肝胰腺组织观察

凡纳滨对虾感染期间,分别在 24、48 和 72 h 对各组对虾肝胰腺进行解剖取样。如图版所示,对照组中肝胰腺细胞排列整齐,肝小管组织结构完整,呈星状结构,可以清晰观察到小管中的几种功能细胞(B 细胞、R 细胞和 F 细胞)。B 细胞为泡状细胞,占据细胞大部分体积,主要功能是从肝胰腺小管的官腔中吸收营养物质;R 细胞是吸收细胞,消化吸收营养物质并以脂滴的形式储存在细胞内;F 细胞是纤维细胞,主要参与消化酶的合成及分泌过程^[22]。攻毒实验 24 h,野生菌株感染组症状比较突出,B 细胞结构不明显,肝小管细胞出现轻微萎缩; $\Delta hemoD$ 菌株组症状较轻,对虾肝小管细胞出现轻微萎缩,个别细胞发生破裂但各功能细胞结构仍可清晰观察到。攻毒实验 48 h,野生菌株感染组大部分小管细胞出现了溶解,发生严重萎缩, $\Delta hemoD$ 感染组主要是细胞质收缩,胞内空腔变小,但胞内物质溶解程度不如野生菌株组严重。攻毒实验 72 h,野生菌株组的肝胰腺组织溶解程度非常严重,几乎观察不到正常细胞结构,血细胞大量流至胞外。 $\Delta hemoD$ 组比 48 h 时溶解程度加重,胞内物质呈现为不规则圆形,空泡化现象严重,胞内物质重叠在一起,不能区分各功能细胞。



(a) 凡纳滨对虾感染 72 h 时拍照记录; (b) 凡纳滨对虾存活曲线。
(a) Vanabin shrimp photographic records at 72 h of infection; (b) Survival curves of *Penaeus vannamei*.

图 4 WT 和 $\Delta hemoD$ 感染凡纳滨对虾存活曲线和照片

Fig. 4 Survival curves and photographs of WT and $\Delta hemoD$ -infected *Penaeus vannamei*

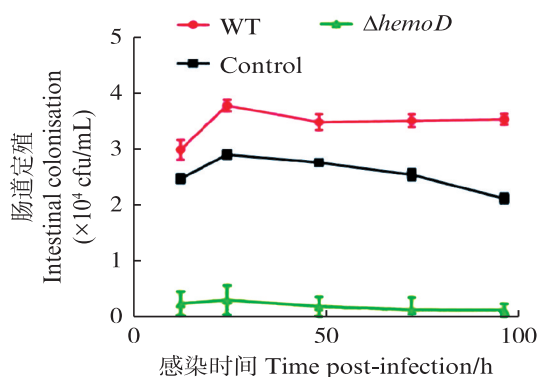


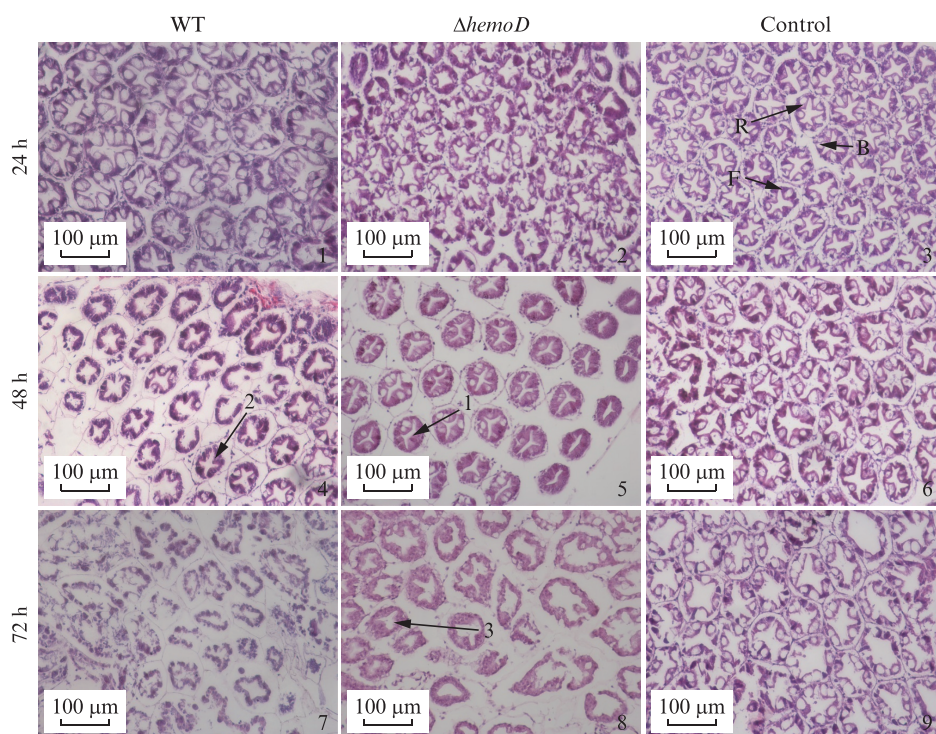
图5 WT和 $\Delta hemoD$ 感染凡纳滨对虾肠道定殖能力差异

Fig. 5 Intestinal colonisation of *Vibrio parahaemolyticus* infected *Penaeus vannamei*

3 讨论

本研究利用同源重组技术实现对 *hemoD* 基因的定向敲除,首次构建了副溶血弧菌敲除突变株 $\Delta hemoD$ 。 $\Delta hemoD$ 菌株在溶血能力、生物膜形成能力、致病力方面显著下降。*hemoD* 基因在

大肠杆菌分泌溶血素 A 的过程中起重要作用,属于膜转运蛋白^[17],水解 ATP 消耗能量进行跨膜转运。大肠杆菌溶血素 A 分泌需要 3 种膜蛋白——内膜转运蛋白 HlyB、衔接蛋白 HlyD 和外膜孔蛋白 TolC, HlyB 和 HlyD 组成内膜复合物来发挥作用^[17]。有研究^[23]表明,用基因编辑技术将大肠杆菌中 HlyB 突变后,终止了其水解 ATP 导致溶血素 A 的分泌失败。PIMENTA 等^[24]将 HlyD 在大肠杆菌中敲除,发现其分泌的 HlyA 溶血活性大大降低,表明 HlyD 对 HlyA 分泌及最终折叠活性形成至关重要。本研究也发现了 *hemoD* 敲除后副溶血弧菌溶血活性下降,推测 *hemoD* 可能是通过影响溶血素 A 正常分泌从而影响了副溶血弧菌溶血功能。此外,相较于野生菌株, $\Delta hemoD$ 菌株生物膜形成能力发生下降,说明 *hemoD* 基因直接或间接参与细菌生物膜形成过程,具体分子机制尚不清晰。



凡纳滨对虾感染 24(1,2,3)、48(4,5,6)、72(7,8,9) h 时,肝胰腺组织病理切片,B 为泡状细胞,R 为吸收细胞,F 为纤维细胞;1 为轻微萎缩细胞,2 为严重萎缩细胞,3 为胞内物质溶解较严重细胞。

Histopathological sections of the hepatopancreas at 24(1,2,3), 48(4,5,6) and 72(7,8,9) h of infection in *Penaeus vannamei*, B is vesicular cells, R is resorptive cells and F is fibroblasts; 1 for slightly atrophied cells, 2 for severely atrophied cells, 3 for cells with more severe lysis of intracellular material.

图版 副溶血弧菌感染凡纳滨对虾肝胰腺组织

Plate Hepatopancreatic tissue of the *Penaeus vannamei* with the infection of *Vibrio parahaemolyticus*

四膜虫作为一种简单的模式生物,可对菌株毒力进行初步测试^[25-26]。四膜虫在受体与次级信使受体方面与高等动物类群有相似性^[27],在毒性实验中可以代替一些生物^[28],并且其可以在不同的培养基中生长,易于实验操作^[29]。在四膜虫与副溶血弧菌共培养中发现,四膜虫对 $\Delta hemoD$ 菌株的吞噬作用更强,野生菌株在共培养 3 h 后表现出强烈细胞毒性,导致四膜虫大量死亡,说明 $\Delta hemoD$ 菌株相较于野生菌株毒性有明显下降。四膜虫与细菌共培养中可以评估不同菌株间毒力大小,但是很难量化毒力下降程度,所以后续对凡纳滨对虾进行感染实验,测定敲除菌株与野生菌株对凡纳滨对虾的半数致死量,量化其毒力下降程度^[30]。

本文首次研究 *hemoD* 基因对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾的影响,相较于野生菌株, $\Delta hemoD$ 菌株对凡纳滨对虾的致死率有所下降,半数致死量提高了 5 倍,说明 *hemoD* 基因敲除导致副溶血弧菌毒力明显减弱。副溶血弧菌是凡纳滨对虾养殖减产的主要原因之一^[31],凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后,会引起肝胰腺发生病变,导致对虾死亡^[32-33]。副溶血弧菌野生菌株感染对虾,严重破坏了肝胰腺细胞,肝小管细胞发生萎缩,细胞内容物大量脱落,细胞形状极不规则,出现空泡化现象^[34-36]。 $\Delta hemoD$ 菌株对凡纳滨对虾肝胰腺的损伤较轻,细胞内出现部分溶解现象,但还有模糊的细胞轮廓,可能是 $\Delta hemoD$ 菌株溶血能力下降,导致其对肝胰腺细胞毒性下降,也有可能是由于 $\Delta hemoD$ 菌株相较于野生菌株在凡纳滨对虾体内的定殖能力下降有关。 $\Delta hemoD$ 菌株对肝胰腺损伤程度较轻,解释了 *hemoD* 组凡纳滨对虾死亡率低的原因。

总之,本研究构建了 *hemoD* 基因敲除的副溶血弧菌突变株 $\Delta hemoD$,分析其溶血、生物膜形成能力等方面与野生菌株的差异,并感染四膜虫和凡纳滨对虾,对其致病能力及毒性进行评估。 $\Delta hemoD$ 菌株对凡纳滨对虾的致病能力有所下降,后续在此菌株的基础上,利用基因工程技术敲除其他毒力因子,构建毒力更弱的菌株,为副溶血弧菌减毒活疫苗的制备奠定基础。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] ECHAZARRETA M A, KLOSE K E. *Vibrio* flagellar synthesis [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 131.
- [2] GUSTILATOV M, WIDANARNI, EKASARI J, et al. Protective effects of the biofloc system in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture against pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 124: 66-73.
- [3] 龚斌,潘育胜,张艳秋,等. 凡纳滨对虾细菌性病原的分离鉴定和耐药性研究[J]. *微生物学杂志*, 2014, 34(5): 70-74.
- [4] GONG B, PAN Y S, ZHANG Y Q, et al. Isolation, identification and drug-sensitivity test of bacterial pathogen from Vanname Prawn (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 34(5): 70-74.
- [4] 赵永刚. 副溶血弧菌 *tdh*, *trh* 和 *tlh* 基因的克隆,表达及基因敲除对其溶血活性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [5] ZHAO Y G. Cloning, expression of *tdh*, *trh* and *tlh* genes and analyzing of hemolysis of these gene deleted mutants of *vibrio parahaemolyticus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [5] 于永翔,王印庚,蔡欣欣,等. 环境、病原、免疫因子三要素与池塘养殖对虾 AHPND 发生的关联性[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(1): 1-10.
- [6] YU Y X, WANG Y G, CAI X X, et al. The occurrence of AHPND in pond cultured *Litopenaeus vannamei* and its influence on environment, pathogen and immune factors [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(1): 1-10.
- [6] HARPENI E, ISNANSETYO A, ISTIQOMAH I, et al. Bacterial biocontrol of vibriosis in shrimp: a review [J/OL]. *Aquaculture International*, 2024. [2024-04-20]. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01445-z>.
- [7] ARMITAGE S A O, PEUB R, KURTZ J. Dscam and pancrustacean immune memory - a review of the evidence [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 48(2): 315-323.
- [8] CHANG Y H, KUMAR R, NG T H, et al. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 53-66.
- [9] NG T H, KURTZ J. Dscam in immunity: a question of diversity in insects and crustaceans[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 105: 103539.
- [10] ITAMI T, TAKAHASHI Y, NAKAMURA Y. efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1989, 1(3): 238-242.
- [11] POWELL A, POPE E C, EDDY F E, et al. Enhanced

- immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 107(2): 95-99.
- [12] RAY A K, GOPAL C, SOLANKI H G, et al. Effect of orally administered vibrio bacterin on immunity, survival and growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) grow-out culture ponds [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(6): 475-481.
- [13] LIN Y C, CHEN J C, MORN W Z W, et al. Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus* [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69722.
- [14] AMATUL-SAMAH A, WAN OMAR W H H, MOHD IKHSAN N F, et al. Vaccination trials against vibriosis in shrimp: a review [J]. Aquaculture Reports, 2020, 18: 100471.
- [15] ZENG Q, SUN Y, LAI P, et al. Advancements in *Vibrio* vaccines for aquaculture [J]. Aquaculture International, 2024, 32(3): 3331-3356.
- [16] XIE H S, HUANG Y J, WANG S M, et al. Deletion of *speA* and *aroC* genes impacts the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* in spotted sea bass [J]. Microbial Pathogenesis, 2024, 189: 106597.
- [17] ZHAO H T, LEE J, CHEN J. The hemolysin A secretion system is a multi-engine pump containing three ABC transporters [J]. Cell, 2022, 185(18): 3329-3340. e13.
- [18] 李小艳, 李泽琦, 汪玉倩, 等. 嗜水气单胞菌 *acrA* 缺失菌株的构建及其生理功能的测定 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 63-69.
- LI X Y, LI Z Q, WANG Y Q, et al. Construction of *Aeromonas hydrophila* *acrA* deficient strain and determination of its physiological function [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 63-69.
- [19] 闫文慧, 李红斌, 王硕, 等. 临床分离金黄色葡萄球菌药物敏感性及其生物膜形成能力的研究 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2023, 35(7): 826-829.
- YAN W H, LI H B, WANG S, et al. Drug sensitivity and biofilm forming ability of clinical isolated *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(7): 826-829.
- [20] 张晓露. 适于四膜虫的嗜水气单胞菌外膜蛋白表达载体的构建及虫菌共培养的体外试验 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- ZHANG X L. Construction of expressing vector with outer membrane protein from *Aeromonas hydrophila* suitable to *Tetrahymena thermophila* and *in vitro* co-culture of *T. thermophila* and *A. hydrophila* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.
- [21] 阿拉帕特·阿布都古力, 李嘉琪, 谢惠芳. 亚硫酸钠对大鼠急性毒性作用和半数致死量的影响 [J]. 职业与健康, 2022, 38(23): 3193-3196, 3201.
- ALAPATE·ABUDUGULI, LI J Q, XIE H F. Effects of acute toxicity and median lethal dose of sodium arsenite in rats [J]. Occupation and Health, 2022, 38(23): 3193-3196, 3201.
- [22] 吴玉娇. 虾肝肠胞虫感染对虾肝胰腺的特征分析及对宿主脂肪酸代谢的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- WU Y J. Study on the Characteristics of *Ecytonucleospora hepatopenaei* infection in shrimp hepatopancreas and its effect on host fatty acids metabolism [D]. Chongqing: Southwest University, 2023.
- [23] KORONAKIS E, HUGHES C, MILISAV I, et al. Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC - domain mutants of HlyB [J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(1): 87-96.
- [24] PIMENTA A L, RACHER K, JAMIESON L, et al. Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(21): 7471-7480.
- [25] RUEHLE M D, ORIAS E, PEARSON C G. *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: genetic and genomic tools [J]. Genetics, 2016, 203(2): 649-665.
- [26] 潘厚军, 邓美玲, 古欣婷, 等. 双氢青蒿素对嗜热四膜虫的毒性效应 [J]. 水生生物学报, 2022, 46(7): 1038-1044.
- PAN H J, DANG M L, GU X T, et al. Toxic effects of dihydroartemisinin on *Tetrahymena thermophila* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(7): 1038-1044.
- [27] CSABA G. The hormonal system of the unicellular *Tetrahymena*: a review with evolutionary aspects [J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2012, 59(2): 131-156.
- [28] PAULI W, JAX K, BERGER S. Protozoa in wastewater treatment: function and importance [M]//BEEK B. Biodegradation and Persistence. Berlin: Springer, 2005: 203-252.
- [29] PUSHKAREVA V I, PODLIPAEVA J I, GOODKOV A V, et al. Experimental *Listeria - Tetrahymena - Amoeba* food chain functioning depends on bacterial virulence traits [J]. BMC Ecology, 2019, 19(1): 47.
- [30] 李诗怡, 杨靖亚, 马燕, 等. 副溶血弧菌耐热直接溶血毒素的急性毒性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(3): 386-390.
- LI S Y, YANG J Y, MA Y, et al. Study on acute toxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(3): 386-390.
- [31] HAN J E, TANG K F J, TRAN L H, et al. *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp [J].

- Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 113(1): 33-40.
- [32] KUMAR V, NGUYEN D V, BARUAH K, et al. Probing the mechanism of VP_{AHPND} extracellular proteins toxicity purified from *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain in germ-free *Artemia* test system[J]. Aquaculture, 2019, 504: 414-419.
- [33] 陈红菊, 张轩, 许高朋, 等. 副溶血弧菌高效消毒剂的筛选及 PHMG 防治对虾 AHPNS 的应用研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 252-260.
- CHEN H J, ZHANG X, XU G P, et al. Screen of disinfectant against *Vibrio parahaemolyticus* and the applicable evaluation of PHMG in preventing *Litopenaeus vannamei* AHPNS [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(2): 252-260.
- [34] 杨惠婕, 张玉蕾, 刘碧洪, 等. 太平洋亚历山大藻对凡纳滨对虾的急性毒性效应[J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(3): 124-132.
- YANG H J, ZHANG Y L, LIU B H, et al. Acute toxic effects of *Alexandrium pacificum* on *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2023, 43(3): 124-132.
- [35] 孟璐, 车金远, 黄旭雄, 等. 溶藻弧菌 *RseB* 基因缺失对凡纳滨对虾致病性的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(4): 681-689.
- MENG L, CHE J Y, HUANG X X, et al. Deletion of *RseB* gene attenuates the pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* in *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(4): 681-689.
- [36] 胡存洁, 车金远, 黄旭雄, 等. 鳃弧菌 *vah1* 缺失菌株构建及致病性评估[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3): 481-490.
- HU C J, CHE J Y, HUANG X X, et al. Construction and pathogenicity evaluation of *Vibrio anguillarum* strain with *vah1* deletion [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(3): 481-490.

Vibrio parahaemolyticus hemoD knocked out and pathogenicity evaluation

HU Shaojie^{1,2}, CHE Jinyuan^{1,2}, FANG Qitong^{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; 3. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a Gram-negative rod-shaped bacterium with flagella, widely distributed in estuaries and oceans, and is one of the major pathogenic bacteria in aquaculture. For future development of attenuated vaccine of *V. parahaemolyticus*, in this study we knocked out *hemoD* gene in *V. parahaemolyticus* using homologous recombination. Compared with wild type of *V. parahaemolyticus*, $\Delta hemoD$ strain showed a decrease in hemolytic activity by 45.7%, a decrease in the ability of biofilm formation by 36.2%, and no significant change in growth rate. When co-cultured with *Tetrahymena thermophila*, the injury of *Tetrahymena* by $\Delta hemoD$ strain was less with more *Tetrahymena* survived, and hence engulfed more cells of $\Delta hemoD$ strain than the wild strain of *V. parahaemolyticus*. The whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* was further used for pathogenicity evaluation. The *P. vannamei* were challenged with strain $\Delta hemoD$ and wild type strain of *V. anguillarum* through administration, respectively, the LD₅₀ of $\Delta hemoD$ strain was 5.06 times higher than that of the wild type strain. Compared with wild type of *V. parahaemolyticus*, the colonization ability of $\Delta hemoD$ strain in the intestinal tract of *P. vannamei* was obviously weakened, and the damage ability to hepatopancreas was reduced, and the phenomena of hepatopancreatic cytolysis and vacuolisation were less serious. These results indicate that the $\Delta hemoD$ strain has a reduced pathogenicity to *P. vannamei*. On the whole, we constructed an attenuated strain of *V. parahaemolyticus*, which will be developed as a potential attenuated vaccine.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *hemoD* gene; *Tetrahymena thermophila*; *Penaeus vannamei*; pathogenicity