

研究报告

拟态弧菌金属蛋白酶基因 *PrtV* 缺失株的构建及生物学特性分析

向菲¹, 田子琦¹, 冯杨¹, 秦振阳¹, 彭焜¹, 欧阳萍¹, 陈德芳², 黄小丽², 耿毅^{*1}

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130

向菲, 田子琦, 冯杨, 秦振阳, 彭焜, 欧阳萍, 陈德芳, 黄小丽, 耿毅. 拟态弧菌金属蛋白酶基因 *PrtV* 缺失株的构建及生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2848-2859.

XIANG Fei, TIAN Ziqi, FENG Yang, QIN Zhenyang, PENG Kun, OUYANG Ping, CHEN Defang, HUANG Xiaoli, GENG Yi. Construction and biological characterization of *Vibrio mimicus*'s metalloprotease gene *PrtV*-deletion strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2848-2859.

摘要: 【背景】研究发现 *PrtV* 基因编码含多囊肾病(polycystic kidney disease)结构域的金属蛋白酶, 其在多种细菌的致病过程中具有重要作用。拟态弧菌是一种感染多种水生动物的重要病原菌, *PrtV* 基因在拟态弧菌致病中的作用尚不清楚。【目的】探究 *PrtV* 基因对拟态弧菌致病相关生物学特性的影响。【方法】采用自然转化的方法构建拟态弧菌 *PrtV* 基因缺失株(Δ *PrtV*), 同时通过基因与质粒重组后电转化导入缺失株构建回补株(Δ *PrtV*/p*PrtV*), 对突变株的生长特性、生化特征、生物被膜形成、自聚集能力、胞外产物卵磷脂酶和蛋白酶活性, 以及致病性和细胞毒性等进行分析。【结果】与野生株相比, 缺失株的生长特性、生物被膜形成、自聚集能力和卵磷脂酶活性无变化, 但分解尿素、甘氨酸、香豆酸盐、鸟氨酸和赖氨酸的理化特性改变; 胞外产物蛋白酶活性显著降低($P<0.05$), 细胞毒性显著下降($P<0.05$), 对杂交鮰的致病力下降 10 倍。【结论】*PrtV* 基因与拟态弧菌的细胞毒性及致病性等多种生物学特性有关。该结果为进一步解析拟态弧菌 *PrtV* 基因功能及其致病机制提供了依据。

关键词: 拟态弧菌; *PrtV* 基因; 自然转化; 基因缺失; 生物学特性

资助项目: 四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目(SCCXTD-15-23); 四川省应用基础项目(21YYJC2011)

This work was supported by the Sichuan Province Freshwater Fish Industry Technology System Innovation Team Construction Project (SCCXTD-15-23) and the Sichuan Province Application Fundamental Project (21YYJC2011).

*Corresponding author. E-mail: 12322@sicau.edu.cn

Received: 2022-10-02; Accepted: 2022-12-24; Published online: 2023-02-03

Construction and biological characterization of *Vibrio mimicus*'s metalloprotease gene *PrtV*-deletion strain

XIANG Fei¹, TIAN Ziqi¹, FENG Yang¹, QIN Zhenyang¹, PENG Kun¹, OUYANG Ping¹, CHEN Defang², HUANG Xiaoli², GENG Yi^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: [Background] Studies have found that *PrtV* gene encodes a metalloprotease containing polycystic kidney disease (PKD) domains, which plays an important role in the pathogenic process of various bacteria. *Vibrio mimicus* is one of the important pathogenic bacteria that infects a variety of aquatic animals, but the role of *PrtV* gene in the pathogenicity of *V. mimicus* is not clear. [Objective] To explore the effect of *PrtV* gene on the pathogenicity-related biological characteristics of *V. mimicus*. [Methods] The natural transformation method was used to construct the *PrtV* gene-deletion strain (Δ *PrtV*) of *V. mimicus*, and the complement strain (Δ *PrtV*/*pPrtV*) was constructed by electrotransformation after gene combined with plasmid. The mutant's biochemical characteristics, biofilm formation, self-aggregation ability, extracellular product protease activity, pathogenicity, and cytotoxicity were analyzed. [Results] As compared with wild stains, the growth, biofilm formation, self-aggregation ability, and lecithinase activity of the Δ *PrtV* were hardly changed, but the physicochemical properties of decomposing urea, glycine, coumarinate, ornithine, and lysine were changed. The extracellular product protease activity and cytotoxicity of Δ *PrtV* were significantly decreased ($P < 0.05$), and the pathogenicity to hybrid catfish was decreased by 10 times. [Conclusion] *PrtV* gene is related to various biological functions such as cytotoxicity and pathogenicity of *V. mimicus*. The results provide a basis for further analysis of the features of *PrtV* gene and its pathogenic mechanism in *V. mimicus*.

Keywords: *Vibrio mimicus*; *PrtV* gene; natural transformation; gene deletion; biological characteristics

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)隶属 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)弧菌目(Vibrionales)弧菌科(Vibrionaceae)弧菌属(*Vibrio*), 其理化特性与霍乱弧菌(*V. cholerae*)非常相似, 曾被称为“非典型性霍乱弧菌”, 是一种严重危害水产养殖业的病原菌, 可感染红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、大口鲶(*Silurus meridionalis* Chen)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[1-2]等多种水产养殖动物, 同时作为一种食源性病

原菌也可引起人类细菌性肠炎和食物中毒^[3]。

PrtV 基因编码含多囊肾病(polycystic kidney disease, PKD)结构域的金属蛋白酶, 存在于霍乱弧菌(*V. cholerae*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)与溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)等多种弧菌的基因组。该金属蛋白酶隶属于 M6 家族, 是一种锌离子依赖的分泌型金属蛋白酶, 与苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的免疫抑制剂 A

(immune inhibitor A, InhA)有 37%的相似性且含有 2 个 PKD 结构域,可分解胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白^[4-5]。其在霍乱弧菌中已被证明可降解上皮细胞外基质及破坏血细胞,从而诱导宿主产生炎症反应^[6]。在鳗弧菌中发现该金属蛋白酶可破坏大菱鲆肠道黏液,从而有利于细菌在肠道内的定殖,还可通过调节溶血素的活性干扰宿主红细胞组分的生成,造成红细胞破裂^[7];在副溶血弧菌中该金属蛋白酶作为一种胶原酶可引起结缔组织的裂解和细胞的脱落^[8],从而导致组织损伤与坏死,表明 *PrtV* 基因的作用在不同细菌间存在一定差异。我们前期分析鲢源拟态弧菌 SCCF01 株全基因组测序注释结果发现,其中也存在与 *PrtV* 基因相似性极高的相似基因^[9],但对于该基因在拟态弧菌中的作用尚不清楚。

本研究采用自然转化与 λ -RED 重组系统相结合的方法构建拟态弧菌(SCCF01) *PrtV* 基因缺失株与回补株,并对拟态弧菌野生株(SCCF01)、*PrtV* 基因缺失株(Δ *PrtV*)及回补株(Δ *PrtV*/p*PrtV*)的生物表型进行比较分析,解析 *PrtV* 基因在拟态弧菌中的主要功能,为进一步揭示弧菌病的致病机制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和实验动物

拟态弧菌野生株(SCCF01)、pKD4 质粒(带 *Kan^r* 基因)、pKD46 质粒(带 *Amp^r* 基因)、pCP20 质粒(带 *Amp^r* 基因)及 pBAD24 质粒(带 *Amp^r* 基因)由四川农业大学水生动物疾病研究中心保存;健康杂交鲢[(150.3 \pm 20.7) g]购于四川省成都市某养殖场。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基,青岛高科技工业园海博生物技

术有限公司。几丁质,北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;BCA 试剂盒,碧云天生物技术有限公司;PrimeSTAR Max Premix 和 Rapid Taq Master Mix,宝生物(大连)有限公司;ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PCR 扩增仪、电穿孔仪,Bio-Rad 公司;全自动微生物鉴定仪,生物梅里埃公司。

1.2 拟态弧菌 *PrtV* 基因缺失株与回补株的构建

1.2.1 引物的设计与合成

根据拟态弧菌 SCCF01 菌株的 *PrtV* 基因序列(GenBank 登录号为 CP016384.1)及质粒序列信息,用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 *PrtV* 基因上、下游同源臂、卡那霉素抗性基因、pKD46 质粒检测、重组菌鉴定、融合片段检测、pCP20 检测及回补株检测引物(表 1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 打靶片段的制备

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒小提试剂盒分别提取拟态弧菌 SCCF01 株的基因组 DNA 和 pKD4 质粒 DNA,并以此作为模板,用 Up-F/R、Down-F/R 和 *Kan^r*-F/R 这 3 对引物分别扩增出 3 个长度为 1 554、1 510 和 1 536 bp 的目的片段。采用重叠延伸 PCR (splicing-by-overlap extension PCR, SOE-PCR)将 3 个片段进行融合并测序鉴定。分两步进行,第 1 步 PCR 反应体系:PrimeSTAR Max Premix 25 μ L,上、下游同源片段(192.5 ng/ μ L、168.4 ng/ μ L)及 *Kan* 抗性基因片段(83.1 ng/ μ L)分别为 1、1.5 及 1 μ L,ddH₂O 21.5 μ L。PCR 反应条件:98 $^{\circ}$ C 10 s,66.4 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 23 s,10 个循环。第 2 步 PCR 反应体系:PrimeSTAR Max Premix 25 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,第 1 步 PCR 反应

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	产物大小
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
Up	F: ACCACACTTTTGCTCGCCAT R: GAAGCAGCTCCAGCCTACACAGCGGTAGCGAGTAGCGTTT	1 554
Down	F: GGACCATGGCTAATTCCCATTGGATGATCGTGGTGCAGTC R: CCATGCAGTTGGCGGTTGAT	1 510
<i>Kan^r</i>	F: AAACGCTACTCGCTACCGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC R: GACTGCACCACGATCATCCAATGGGAATTAGCCATGGTCC	1 536
pKD46	F: ATGACACCGGACATTATCCTG R: TTTCAGCCAGTGCCTCGTC	649
KJ	F: ACTGGGCTATCTGGACAAGGGA R: TCATAGAAGGCGGCGGTGGAA	1 128
Soe	F: CTGCCAAGGCTTGTCGTA R: TACCGAGGAGCAGTCTACC	660
pCP20	F: TGCTCCACCCACAGGATGCT R: ACACTGGCACCGCCGTTACT	474
<i>PrtV</i>	F: TTGGGCTAGCAGGAGGAATTCATGAAAACAATCAAAAAACGCTACT R: TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTCTACAGTTTACTTTGATAGTTTTAGTGGTG	2 757

产物 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 66 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 23 s, 35 个循环。

1.2.3 重组菌 SCCF01/pKD46 的制备

将 pKD46 质粒电转化入 SCCF01 感受态细胞, Amp-LB 平板(100 μ g/mL)筛选阳性转化子后进行菌落 PCR 验证获得 SCCF01/pKD46 重组株。PCR 反应体系: Rapid *Taq* Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.4 SCCF01/pKD46 的自然转化

向 OD₆₀₀ 为 0.4 的 SCCF01/pKD46 菌液中加入几丁质孵育 24 h; 小心吸取去除上清, 重新加入无葡萄糖 M9 培养液与打靶片段的混合液孵育 24 h 后, Kan-LB 平板(Kan 浓度为 100 μ g/mL, 下同)筛选阳性转化子并用引物对 KJ-F/R 进行 PCR 验证(反应体系和条件同 1.2.3)。验证后的菌株接种至 LB 平板于 42 $^{\circ}$ C 培养消除 pKD46 质

粒, 获得 SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan* 重组株。

1.2.5 SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan* 菌株 *Kan* 抗性的消除

将 pCP20 质粒电转化 SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan* 感受态细胞, Amp-LB 平板筛选阳性转化子, 用引物对 pCP20-F/R 进行菌落 PCR 验证(反应体系和条件同 1.2.3)。验证后的菌株接种至 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h 后分别采用 LB 与 Kan-LB 平板进行筛选, 获得不能在 Kan-LB 平板上生长的单菌落, 再使用引物对 Soe-F/R 进行 *Kan* 抗性基因缺失的鉴定; 最后接种至 LB 平板于 42 $^{\circ}$ C 培养消除 pCP20 质粒获得缺失株 Δ *PrtV*。

1.2.6 回补株的构建

以 SCCF01 菌株的基因组 DNA 为模板, 用引物对 *PrtV*-F/R 扩增 *PrtV* 基因, 将扩增基因片段克隆至高拷贝载体 pBAD24, 经测序验证后获得回补质粒 pBAD24-*PrtV*, 最后将回补质粒 pBAD24-*PrtV* 电转化 Δ *PrtV* 感受态细胞, 用 Amp-LB 平板筛选后进行 PCR 验证(反应体系和条件同 1.2.3 节), 获得回补株 Δ *PrtV*/p*PrtV*。

1.3 突变株生物学特性分析

1.3.1 生长特性检测

将野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 分别接种于 LB 液体培养基, 28 °C、180 r/min 培养, 每株菌 3 个重复, 在 24 h 内每隔 1 h 测定 OD_{600} 值后绘制生长曲线。

1.3.2 生理生化特性测定

使用全自动微生物鉴定仪测定野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 的生理生化特性。

1.3.3 生物被膜形成能力测定

参考 Beshiru 等^[10]的方法检测野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 的生物被膜形成能力。

1.3.4 自聚集能力测定

取 10 μ L OD_{600} 值为 1.0 的野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 新鲜菌液接入 10 mL LB 液体培养基中, 28 °C 静置培养 48 h 后吸取上清液测 OD_{600} 值。

1.3.5 胞外产物卵磷脂酶和蛋白酶活性检测

参考 Sales 等^[11]的方法制备野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 的胞外产物, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 采用平板法^[7]测定各菌株胞外产物的卵磷脂酶和蛋白酶的活性。

1.3.6 胞外产物细胞毒性试验

参考 Cai 等^[12]的方法在含 1.0×10^5 个鲤鱼上皮瘤(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)细胞/孔的微量板中分别加入浓度为 0.1 mg/mL 的野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 及回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 的胞外产物, 25 °C 培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂, 测定 OD_{450} 值并计算细胞的存活率。

1.3.7 致病性试验

将野生株 SCCF01 和缺失株 $\Delta PrtV$ 分别接种到 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 培养 18 h, 5 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体沉淀,

用 PBS 洗涤 3 次, 并调整浓度梯度为 1.00×10^7 、 1.00×10^6 、 1.00×10^5 、 1.00×10^4 、 1.00×10^3 CFU/mL, PBS 作空白对照。每组随机分配 15 尾杂交鲂, 实验组每尾腹腔注射 0.2 mL 菌液, 对照组以相同方式注射等量 PBS, 连续观察记录 14 d 内的死亡情况, 寇氏法计算半数致死量。

1.4 数据分析

使用 GraphPad Prism 9.3.1 软件作图, 使用 SPSS 软件对数据进行统计学分析, 结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 进行 *t* 检验分析。

2 结果与分析

2.1 *PrtV* 基因缺失株与回补株的构建和 PCR 鉴定

分别采用引物对 Up-F/R、Down-F/R 与 Kan^r -F/R 扩增出 1 554、1 510 和 1 536 bp 的 *PrtV* 基因上、下游同源臂及 Kan 抗性基因(图 1A); SOE-PCR 将 3 个片段融合获得 4 600 bp 的目的靶片段(图 1B), 测序验证正确; 采用引物对 pKD46-F/R 进行 pKD46 质粒电转化 SCCF01 菌株阳性转化子的菌落 PCR, 扩增获得 649 bp 的目的片段(图 1C), 成功构建 SCCF01/pKD46 重组菌; 采用引物对 KJ-F/R 进行目的靶片段与 SCCF01/pKD46 重组菌自然转化阳性转化子的菌落 PCR, 扩增出 1 128 bp 的目的片段(图 1D), 经 42 °C 培养消除 pKD46 质粒, 成功构建 SCCF01 $\Delta PrtV::Kan$ 重组株; 采用引物对 pCP20-F/R 进行 pCP20 质粒电转化 SCCF01 $\Delta PrtV::Kan$ 重组株阳性转化子的菌落 PCR, 扩增出 474 bp 的目的片段(图 1E), 成功构建 SCCF01 $\Delta PrtV::Kan/pCP20$ 重组菌; 培养 12 h 后采用引物对 Soe-F/R 进行菌落 PCR 筛选, 扩增出 660 bp 目的条带的 *PrtV* 基因缺失阳性转化子(图 1F), 最后于 42 °C 培养消除 pCP20 质粒, 成功构建拟态弧菌 SCCF01 基因缺失株 $\Delta PrtV$ 。采用引物对 *PrtV*-F/R

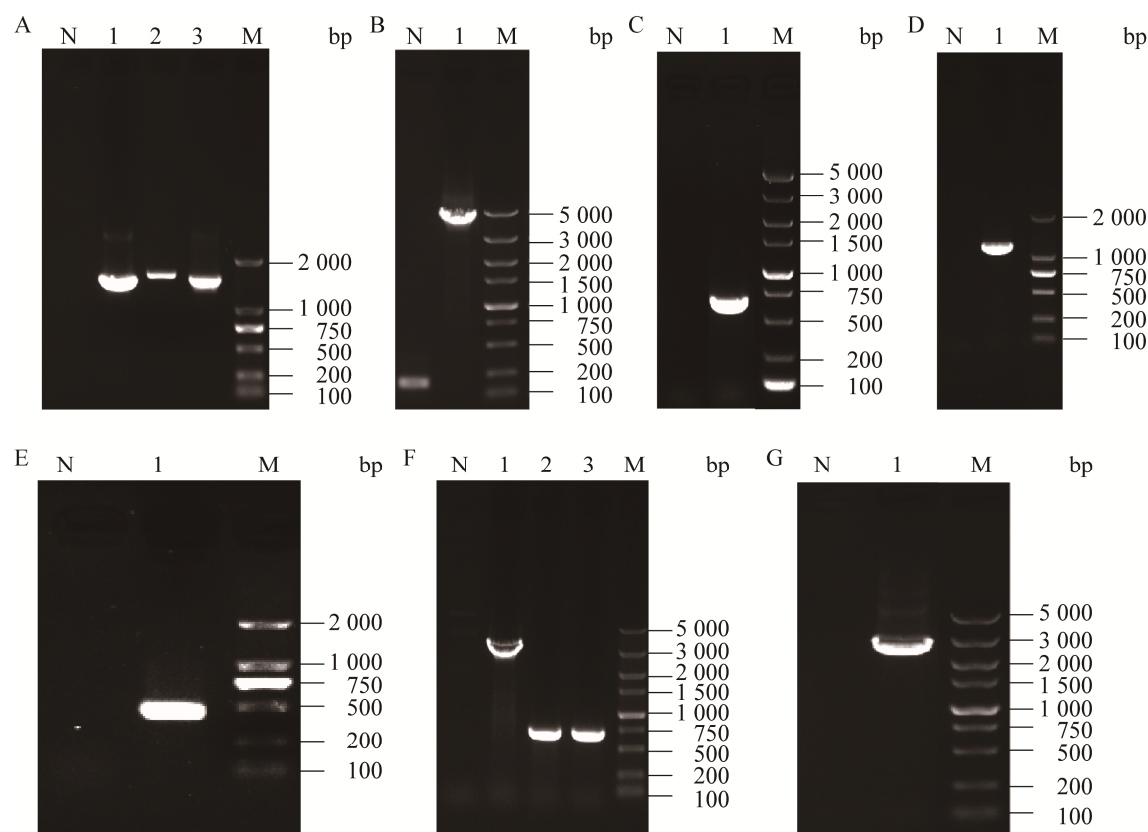


图 1 缺失株及回补株的构建验证 A: 引物对 Up-F/R、Down-F/R 及 Kan^r -F/R 扩增同源重组片段 (1: 上游同源臂; 2: Kan^r 基因片段; 3: 下游同源臂). B: 融合片段. C: 引物对 pKD46-F/R 对成功导入 pKD46 质粒菌株的鉴定. D: 引物对 KJ-F/R 对 SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan* 重组菌株的鉴定. E: 引物对 pCP20-F/R 对成功导入 pCP20 质粒 SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan* 菌株的鉴定. F: 引物对 Soe-F/R 鉴定缺失株 (1: SCCF01 株; 2、3: Δ *PrtV*). G: 引物对 *PrtV*-F/R 对回补株的鉴定. N: 阴性对照; M: DNA Marker

Figure 1 Construction and verification of the mutant and the complementation strains. A: Homologous recombination fragments amplified by primer pairs Up-F/R, Down-F/R and Kan^r -F/R, respectively (1: Upstream homology arm fragment; 2: Kan^r gene fragment; 3: Downstream homology arm fragment). B: Fusion fragment. C: Primer pair pKD46-F/R for identification of SCCF01/pKD46. D: Primer pair KJ-F/R for identification of SCCF01 Δ *PrtV*::*Kan*. E: Primer pair pCP20-F/R for identification of pCP20 plasmid. F: Primer pair Soe-F/R for identification of the mutant (1: SCCF01; 2, 3: Δ *PrtV*). G: Primer pair *PrtV*-F/R for identification of complementing strain. N: Negative control; M: DNA Marker.

进行 pBAD24-*PrtV* 回补质粒电转化缺失株 Δ *PrtV* 阳性转化子的菌落 PCR, 扩增出 2 757 bp 目的片段 (图 1G), 测序比对正确, 成功构建回补株 Δ *PrtV*/p*PrtV*。

2.2 生长和生理生化特性

拟态弧菌野生株 SCCF01、缺失株 Δ *PrtV* 和

回补株 Δ *PrtV*/p*PrtV* 在 LB 肉汤中的生长特性基本一致, 3 株菌之间无显著性差异, 它们繁殖速度均较快, 2–10 h 是其对数生长期 (图 2)。 *PrtV* 基因缺失除对拟态弧菌尿素酶、甘氨酸芳胺酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶和香豆酸盐具有影响外, 对其他测定的生理生化特性无影响 (表 2)。

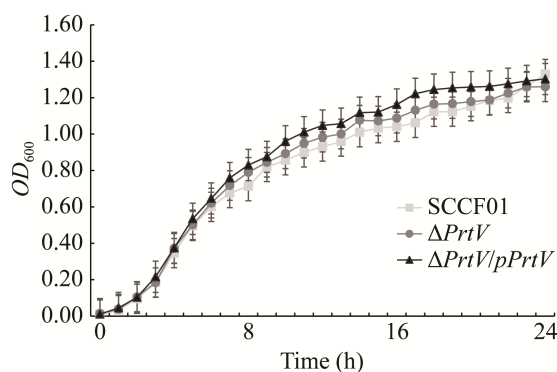


图2 细菌生长曲线

Figure 2 Bacterial growth curves.

2.3 生物被膜形成和自聚集能力

拟态弧菌野生株 SCCF01、缺失株 ΔPrtV 和回补株 $\Delta\text{PrtV}/p\text{PrtV}$ 的生物被膜形成(图 3)及自聚集能力(图 4)均无明显差异,表明 *PrtV* 基因不影响其生物被膜形成及自聚集能力。

2.4 胞外产物卵磷脂酶和蛋白酶活性

比较野生株 SCCF01、缺失株 ΔPrtV 和回补株 $\Delta\text{PrtV}/p\text{PrtV}$ 卵磷脂酶、蛋白酶水解圈的直径大小(图 5),结果表明野生株、*PrtV* 基因缺失株与回补株的胞外产物卵磷脂酶活性差异不显著,但缺失株的蛋白酶活性较野生株及回补株显著降低($P < 0.05$)。

2.5 胞外产物细胞毒性

比较野生株 SCCF01、缺失株 ΔPrtV 和回补株 $\Delta\text{PrtV}/p\text{PrtV}$ 胞外产物对细胞存活率的影响,结果表明 *PrtV* 基因缺失株的胞外产物作用于 EPC 细胞后,其存活率显著高于野生株与回补株(图 6),表明 *PrtV* 基因正向调节了拟态弧菌胞外产物的细胞毒性。

2.6 致病性

将拟态弧菌野生株 SCCF01 和缺失株 ΔPrtV 不同浓度的菌液注射杂交鲇,各分组的生存曲线如图 7 所示,野生株 1.00×10^7 和 1.00×10^6 CFU/mL 组死亡率达 100%, 1.00×10^5 、 1.00×10^4 和

1.00×10^3 CFU/mL 组死亡率分别为 80%、53.3% 和 33.3%,缺失株 1.00×10^7 、 1.00×10^6 、 1.00×10^5 、 1.00×10^4 和 1.00×10^3 CFU/mL 组死亡率分别为 100%、86.7%、46.7%、26.7% 和 13.3%,且死亡时间均集中在 2–8 d。根据 SPSS 寇氏法计算结果可知,野生株和缺失株的 14 d- LD_{50} 分别为 5.32×10^3 CFU/mL 和 5.32×10^4 CFU/mL, *PrtV* 基因缺失株与野生株相比,对杂交鲇的致病性有所下降。

3 讨论与结论

自然转化(natural transformation)作为细菌基因水平转移(horizontal gene transfer)的一种形式,可使细菌摄取外源 DNA 以更好地适应外界环境,该特性也被用作建立敲除基因的方法,以此来解析细菌基因的功能。目前常用的靶向性细菌基因敲除方法还包括自杀质粒介导的基因重组^[13]、 λ -RED 重组系统开发的基因敲除^[14]和 CRISPR-Cas9 系统介导的基因编辑^[15]等技术,尽管在拟态弧菌中采用自杀质粒介导的接合转移能实现靶向性基因敲除^[16],但其实验过程相对烦琐且重组效率极低。此前我们采用自然转化法成功构建了拟态弧菌的溶血素、II型分泌系统和 TonB 系统等基因的缺失株^[17],但仍存在转化成功率不是很高的问题,因此本研究在参考 Yu 等^[17]方法的基础上将自然转化和 λ -RED 重组系统结合,进一步提高了拟态弧菌基因缺失的成功率,结果发现此方法是一种构建拟态弧菌基因缺失较为高效的方法,为开展拟态弧菌基因功能的相关研究奠定了基础。

本研究发现 *PrtV* 基因缺失后拟态弧菌胞外蛋白酶活性显著降低,而卵磷脂酶活性未见明显变化。有报道称 95% 的拟态弧菌分泌胞外蛋白酶,这些胞外酶是致病过程中关键的毒力因

表 2 菌株生理生化特性

Table 2 The major physiological-biochemical character

项目 Item	菌株 Strain		
	SCCF01	$\Delta PrtV$	$\Delta PrtV/pPrtV$
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-arylamidase	—	—	—
谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 Glu-Gly-Arg-arylamidase	+	+	+
L-吡咯烷酮芳胺酶 L-pyrrolydonyl-arylamidase	+	+	+
谷氨酰芳胺酶 Glutamyl arylamidase pNA	—	—	—
L-组氨酸同化 L-ornithine decarboxylase	—	—	—
γ -谷氨酰转移酶 Glutamyl- γ -transferase	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase*	+	—	+
L-脯氨酸芳胺酶 L-proline arylamidase	—	—	—
L-苹果酸盐同化 L-malate assimilation	—	—	—
β -丙氨酸芳胺酶 β -alanine arylamidase	—	—	—
L-乳酸盐同化 L-lactate assimilation	—	—	—
酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase*	+	—	+
甘氨酸芳胺酶 Glycine arylamidase*	—	+	—
发酵/葡萄糖 Glucose fermentation	—	—	—
柠檬酸盐(钠) Citrate (sodium)	—	—	—
β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+	+	+
α -半乳糖苷酶 α -galactosidase	—	—	—
O/129 耐药 O/129 resistance	—	—	—
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	—	—	—
H ₂ S 生成 H ₂ S production	—	—	—
β -木糖苷酶 β -xylosidase	—	—	—
L-阿拉伯醇 L-arabitol	—	—	—
D-海藻糖 D-trehalose	+	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	—	—	—
香豆酸盐 Coumarate*	—	+	—
D-麦芽糖 D-maltose	+	+	+
D-塔格糖 D-tagatose	—	—	—
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+
D-山梨醇 D-sorbitol	—	—	—
磷酸酶 Phosphatase	+	+	+
丙二酸盐 Malonate	—	—	—
古老糖 Palatinose	—	—	—
尿素酶 Urease*	—	+	—
脂肪酶 Lipase	—	—	—
蔗糖 Sucrose	—	—	—
ELLMAN	+	+	+

+表示阳性反应; —表示阴性反应; *表示缺失株 $\Delta PrtV$ 与野生株 SCCF01、回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 存在的差异+ means positive; — means negative; * means the difference between the mutant strain $\Delta PrtV$ and the wild strain SCCF01 and the complement strain $\Delta PrtV/pPrtV$.

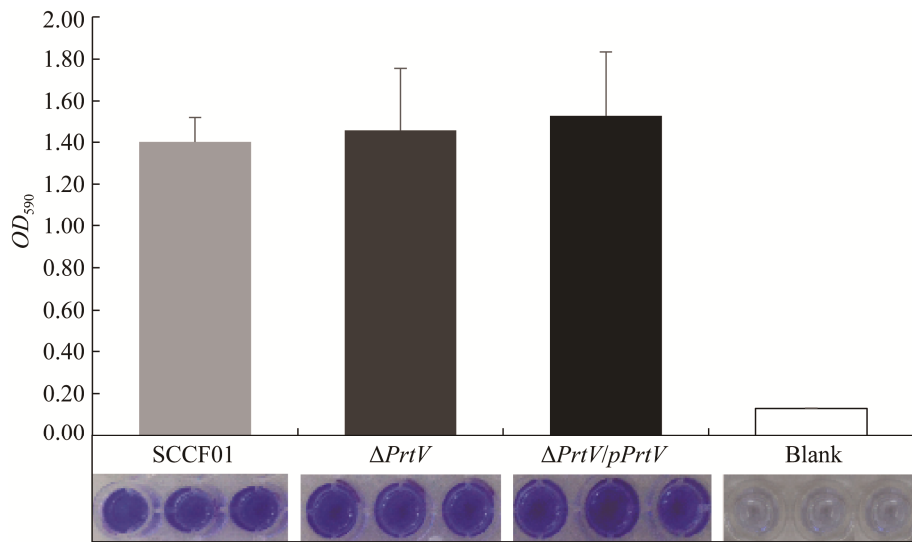


图3 细菌生物被膜形成能力

Figure 3 Bacterial biofilm forming ability.

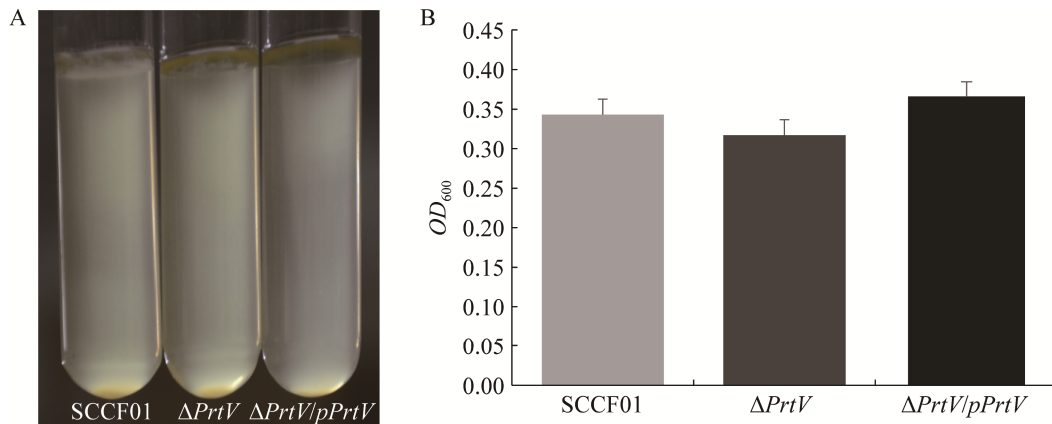


图4 细菌自聚集能力 A: 自聚集能力试验结果观察. B: 自聚集能力分析

Figure 4 Bacterial self-aggregation ability. A: Observation of self-aggregation ability test results. B: Self-aggregation capacity analysis.

子^[18], 推测 *PrtV* 基因在拟态弧菌中编码的蛋白酶在致病中的作用可能与霍乱弧菌相似^[6], 通过降解细胞间的基质, 破坏宿主细胞之间的连接^[19], 对机体产生严重的组织损伤, 在致病过程中起着至关重要的作用。本研究中拟态弧菌 *PrtV* 基因缺失株的胞外产物与野生株相比细胞毒性显著减弱, 表明 *PrtV* 基因编码的蛋白酶与细胞损伤明显相关, 进一步的感染实验显示

PrtV 基因缺失株对杂交鲢的致病性明显降低, 与 Mo 等^[7]报道的 *PrtV* 基因增强了鳗弧菌对大菱鲆的毒力的研究结果一致。上述研究结果表明 *PrtV* 基因在拟态弧菌致病作用上具有重要的贡献, 可能与霍乱弧菌、鳗弧菌及副溶血弧菌中的同源基因功能相似, 通过对细胞造成毒性和对组织造成破坏而表现出对宿主的致病性。

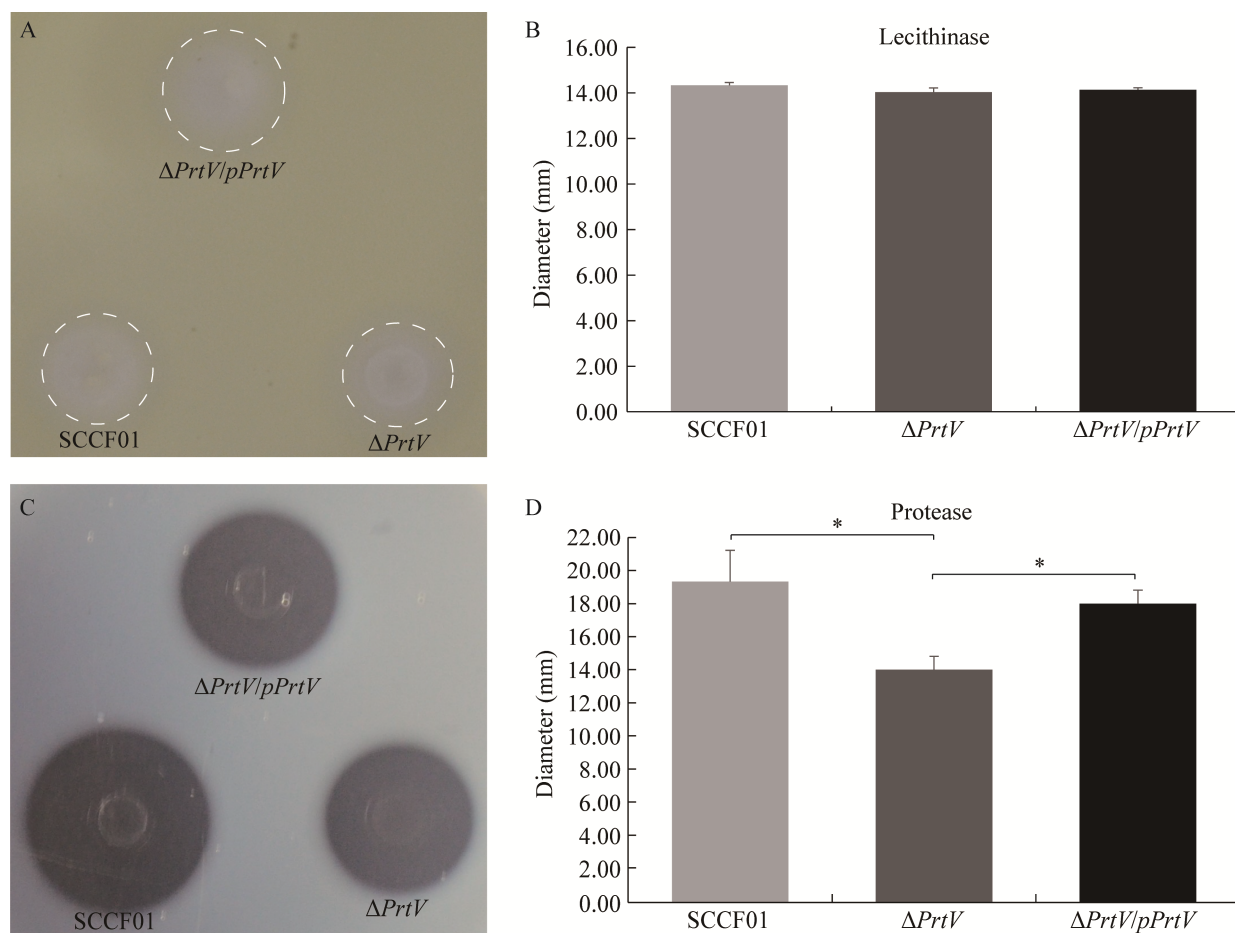


图5 胞外产物卵磷脂酶和蛋白酶活性分析 A: 卵磷脂酶活性. B: 卵磷脂酶活性分析. C: 蛋白酶活性. D: 蛋白酶活性分析. *: $P < 0.05$

Figure 5 Extracellular lecithinase and protease activity assay. A: Lecithin activity. B: Lecithin activity analysis. C: Protease activity. D: Protease activity analysis. *: $P < 0.05$.

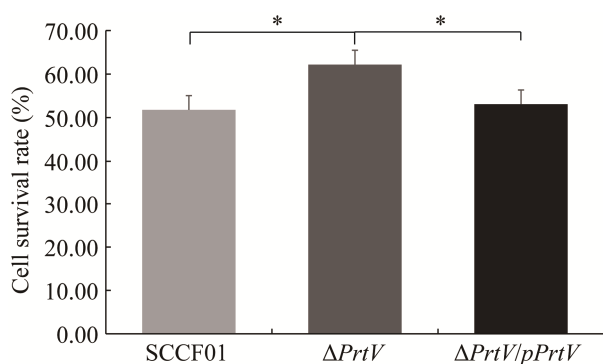


图6 细胞存活率分析

Figure 6 Cell survival rate analysis. *: $P < 0.05$.

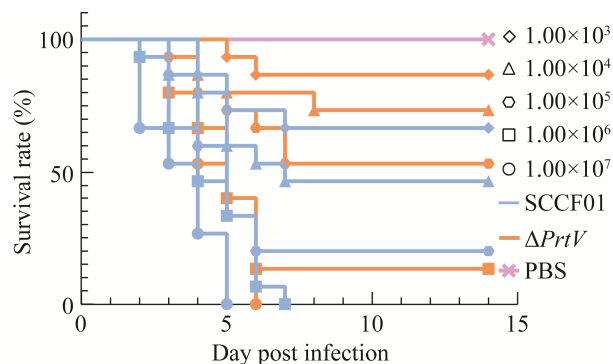


图7 杂交鲢生存曲线

Figure 7 Survival curve of hybrid catfishes.

本研究通过测定拟态弧菌野生株 SCCF01、缺失株 $\Delta PrtV$ 和回补株 $\Delta PrtV/pPrtV$ 这 3 株菌 24 h 的 OD_{600} 值观察其生长繁殖速率, 结果表明 $PrtV$ 基因不影响拟态弧菌的生长特性; 同时, 生物被膜形成及自聚集能力也未在 3 株菌间呈现出显著性差异, 表明 $PrtV$ 基因不参与拟态弧菌生物被膜的形成及自聚集过程, 这与霍乱弧菌 $PrtV$ 基因不参与其生物被膜形成的报道^[20]一致, 但与自聚集能力的研究结果^[21]存在一定差异。此外, Ou 等^[22]发现霍乱弧菌 $PrtV$ 基因具有抑制 IL-8 因子释放的功能, 可能是霍乱弧菌逃避宿主免疫的一种机制, 使其免受机体免疫系统的清除, 有利于细菌群体的存活及感染, 因此, 对于 $PrtV$ 基因是否介导拟态弧菌免疫逃避值得开展研究, 以进一步解析该基因在拟态弧菌中的生物学功能, 揭示拟态弧菌的致病机制, 为有效防控拟态弧菌感染提供依据。

REFERENCES

- [1] GENG Y, LIU D, HAN S, ZHOU Y, WANG KY, HUANG XL, CHEN DF, PENG X, LAI WM. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 82-84.
- [2] MOHAMAD N, AMAL MNA, YASIN ISM, ZAMRI SAAD M, NASRUDDIN NS, AL-SAARI N, MINO S, SAWABE T. Vibriosis in cultured marine fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734289.
- [3] ZIARATI M, ZORRIEHZAHRA MJ, HASSANTABAR F, MEHRABI Z, DHAWAN M, SHARUN K, BIN EMRAN T, DHAMA K, CHAICUMPA W, SHAMSI S. Zoonotic diseases of fish and their prevention and control[J]. *Veterinary Quarterly*, 2022, 42(1): 95-118.
- [4] LI PH, ZANG K, LI YJ, LIU CS, MA QJ. Structural basis for specific calcium binding by the polycystic-kidney-disease domain of *Vibrio anguillarum* protease Epp[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 505(2): 471-477.
- [5] WANG GL, FAN C, WANG H, JIA CY, LI XT, YANG JR, ZHANG T, GAO S, MIN X, HUANG J. Type VI secretion system-associated FHA domain protein TagH regulates the hemolytic activity and virulence of *Vibrio cholerae*[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2055440.
- [6] SAKIB SN, REDDI G, ALMAGRO-MORENO S. Environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00795-e00717.
- [7] MO ZL, GUO DS, MAO YX, YE XH, ZOU YX, XIAO P, HAO B. Identification and characterization of the *Vibrio anguillarum prtV* gene encoding a new metalloprotease[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 55-61.
- [8] OSEI-ADJEI G, HUANG XX, ZHANG YQ. The extracellular proteases produced by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(5): 68.
- [9] YU ZH, WANG EL, GENG Y, WANG KY, CHEN DF, HUANG XL, OUYANG P, ZUO ZC, HUANG C, FANG J, YIN LZ, GUO HR, ZHONG ZJ. Complete genome analysis of *Vibrio mimicus* strain SCCF01, a highly virulent isolate from the freshwater catfish[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 23-31.
- [10] BESHIRU A, IGBINOSA EO. Characterization of extracellular virulence properties and biofilm-formation capacity of *Vibrio* species recovered from ready-to-eat (RTE) shrimps[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119: 93-102.
- [11] SALES AE, DANTAS de SOUZA FAS, TEIXEIRA JA, PORTO TS, PORTO ALF. Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(7): 1676-1688.
- [12] CAI L, QIN XJ, XU ZH, SONG YY, JIANG HJ, WU Y, RUAN HJ, CHEN J. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(7): 12036-12042.
- [13] LUO P, HE XY, LIU QT, HU CQ. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144465.
- [14] LEE DJ, BINGLE LEH, HEURLIER K, PALLAN MJ, PENN CW, BUSBY SJW, HOBMAN JL. Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 252.

- [15] JIANG WY, BIKARD D, COX D, ZHANG F, MARRAFFINI LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233-239.
- [16] 王薇, 胡丹丹, 李槿年, 刘雪芹. 拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能及所介导的致病作用[J]. 水产学报, 2014(5): 38.
WANG W, HU DD, LI JN, LIU XQ. Adhesion function of OmpU protein from *Vibrio mimicus* and its role in virulence[J]. Journal of Fisheries of China, 2014(5): 38 (in Chinese).
- [17] YU ZH, WANG EL, GENG Y, WANG KY, CHEN DF, HUANG XL, OUYANG P, ZUO ZC, HE CL, TANG L, YANG ZX, LAI WM. Multiplex genome editing by natural transformation in *Vibrio mimicus* with potential application in attenuated vaccine development[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 377-383.
- [18] 李玉英, 李槿年, 余为一. 拟态弧菌毒力因子的分子生物学研究进展[J]. 水利渔业, 2003, 24(2): 67-69.
LI YY, LI JN, YU WY. Research progress in molecular biology of virulence factors of *Vibrio mimicus*[J]. Hydraulic Fisheries, 2003, 24(2): 67-69 (in Chinese).
- [19] BORKAKOTI N. Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure[J]. Biochemical Society Transactions, 2004, 32(1): 17-20.
- [20] ZHU J, MEKALANOS JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*[J]. Developmental Cell, 2003, 5(4): 647-656.
- [21] JEMIELITA M, MASHRUWALA AA, VALASTYAN JS, WINGREEN NS, BASSLER BL. Secreted proteases control the timing of aggregative community formation in *Vibrio cholerae*[J]. mBio, 2021, 12(6): e0151821.
- [22] OU GW, ROMPIKUNTAL PK, BITAR A, LINDMARK B, VAITKEVICIUS K, WAI SN, HAMMARSTRÖM ML. *Vibrio cholerae* cytolysin causes an inflammatory response in human intestinal epithelial cells that is modulated by the PrtV protease[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7806.