

溶藻弧菌 *kdpD* 基因敲除突变株的构建及其表型特征张燕飞<sup>1,2,3</sup> 庞欢瑛<sup>1,2,3</sup> 简纪常<sup>1,2,3</sup> 鲁义善<sup>1,2,3</sup> 吴灶和<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 广东海洋大学 水产学院 广东 湛江 524088)

(2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 广东 湛江 524088)

(3. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室 广东 湛江 524088)

(4. 仲恺农业工程学院 广东 广州 510225)

**摘要:**【目的】探究 *kdpD* 基因对溶藻弧菌生物学特性的影响。【方法】采用 Overlap PCR 和同源重组技术, 结合正负向筛选, 构建 *kdpD* 基因无标记基因框内敲除突变株, 比较 *kdpD* 突变株和野生株 HY9901 在生长速率、胞外蛋白酶活性以及毒力等方面的差异。【结果】成功构建溶藻弧菌 *kdpD* 基因敲除突变株。体外实验表明, *kdpD* 的缺失对溶藻弧菌的生长曲线和胞外蛋白酶活性的影响不明显, 但是突变株的泳动能力和生物被膜形成能力出现下降。斑马鱼致病性试验结果显示, 突变株毒力下降了 8.84 倍。【结论】*kdpD* 基因参与调控溶藻弧菌的泳动能力、被膜形成和毒力, 但不影响生长速率和胞外蛋白酶活性。

**关键词:** 溶藻弧菌, *kdpD*, 基因敲除, 表型

Construction and characterization of the *kdpD* gene knock-out mutant of *Vibrio alginolyticus*ZHANG Yan-Fei<sup>1,2,3</sup> PANG Huan-Ying<sup>1,2,3</sup> JIAN Ji-Chang<sup>1,2,3</sup> LU Yi-Shan<sup>1,2,3</sup>  
WU Zao-He<sup>2,3,4\*</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(3. Guangdong Key Laboratory of Control for Disease of Aquatic Animals, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the role of *kdpD* gene in *Vibrio alginolyticus*, a *kdpD* gene deletion mutant was generated. [Methods] Combining with chloramphenicol (Cm) and sucrose screening, we constructed an in-frame deletion mutant of *kdpD* using overlap PCR and homologous recombination technology. We then investigated the effect of the mutant on its growth, ECPase activity and virulence in fish. [Results] The mutant  $\Delta kdpD$  was successfully constructed. The mutant  $\Delta kdpD$

基金项目: 广东省海洋经济创新发展区域示范专项项目(No. GD2012-B01-004); 国家科技支撑项目(No. 2012BAD17B03); 广东高校国际合作创新平台项目(No. 2013ghz0008)

\*通讯作者: Tel: 86-759-2383509; 信箱: wuzaohe@163.com

收稿日期: 2014-11-24; 接受日期: 2015-03-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

showed no differences of ECPase activity and growth from the wild-type strain. But a decrease in swarming ability and biofilm formation was found. Moreover, virulence assays with zebrafish model confirmed that virulence of the mutant declined by 8.84 times. **[Conclusion]** The *kdpD* gene could regulate swarming ability, biofilm formation and virulence, but it has no effect on growth and ECPase activity.

**Keywords:** *Vibrio alginolyticus*, *kdpD*, Gene knock-out, Biological characteristics

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为嗜盐嗜温性的革兰氏阴性菌<sup>[1-2]</sup>, 普遍存在于海洋环境和多种海洋动物中, 是鱼、虾、贝等海水养殖动物的主要致病菌之一<sup>[3]</sup>。近年来对溶藻弧菌的研究主要集中在毒力因子(溶血素基因、外膜蛋白酶基因及摄铁系统相关基因)的鉴定和表达分析<sup>[4-8]</sup>。然而, 溶藻弧菌是一种条件性致病菌, 其毒力因子的表达受环境因素的调节, 仅在某些特定的条件下才能表达。细菌致病的过程也是其不断适应宿主环境的过程, 通过对外界信号的感应, 调整不同毒力基因的表达, 从而实现其在宿主体内的生存、繁殖及对抗宿主的免疫系统<sup>[9]</sup>。

双组分调控系统(Two-component regulatory system)是广泛存在于细菌中的一种信号转导机制, 在细菌捕捉外界信号的过程中起着极其重要的作用, 它所操纵的信号转导包括病原菌对宿主的识别和侵袭, 以及进一步的致病或共生<sup>[10-11]</sup>。KdpD 作为一个感应蛋白, 是双组分信号调控系统 KdpD/KdpE 的成员之一, 能感知环境中  $K^+$  缺少或高渗透压的压力从而调控下游基因的表达来适应环境压力<sup>[12-13]</sup>。*kdpD* 基因参与多种致病菌的毒力调控过程, 其调控的方式各有不同。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中, *kdpD* 缺失株在肠道线虫和巨噬细胞的生存能力显著下降, 推测 *kdpD* 基因在抗渗透、抗氧化和抗菌等方面起重要作用<sup>[14]</sup>。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中, *kdpDE* 缺失株比野生株有更高的毒性, 感染缺失株的小鼠与感染野生株的小鼠相比有更高的致死率<sup>[15]</sup>。溶藻弧菌 HY9901 中也存在 *kdpD* 同源基因, 但其具体功能尚不清楚。为探究溶藻弧菌 *kdpD* 基

因是否也具有调控毒力因子的功能, 本研究通过同源重组技术, 构建 *kdpD* 基因缺失株, 比较其与野生株 HY9901 生物学特性的差异, 为进一步探索溶藻弧菌的致病机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:** 实验所用菌株、质粒及引物见表 1。

**1.1.2 主要试剂:** TIANamp Bacteria DNA Kit, 购自北京天根生化科技有限公司; Easy Pure™ Quick Gel Extraction Kit 和 Easy Pure™ Plasmid MiniPrep Kit, 购自北京全式金生物技术有限公司; ExTaq DNA 聚合酶、Prime STAR™ HS DNA 聚合酶、*Kpn* I、*Sac* I 和 T4 DNA 连接酶, 购自 TaKaRa 公司; 氯霉素购自 Sigma 公司。

**1.1.3 主要培养基:** LB (Luria-Bertani)培养基、TSB (Tryptic soy broth)培养基和 TSA (Tryptic soy agar)培养基的配制参照文献[19]进行。

**1.1.4 实验动物:** 实验用斑马鱼(*Danio rerio*), 购自湛江市水产市场, 每尾鱼体长 4–5 cm, 体重 0.3 g 左右, 在室内实验箱暂养 2 周后用于实验。

### 1.2 方法

**1.2.1 缺失株的构建及鉴定:** 参照文献[20]进行, 详细步骤见图 1。采用 Overlap PCR 的方法, 通过两步 PCR 得到缺失片段。第 1 步, 以溶藻弧菌 HY9901 基因组 DNA 为模板, 用特异性引物 *kdpD*-for/*KdpD*-int-rev 和 *KdpD*-int-for/*kdpD*-rev, 分别扩增 *kdpD* 基因的上、下游片段; 第 2 步, 以上、下游序列为模板, 用引物 *kdpD*-for 和 *kdpD*-rev 进行 PCR 扩增, 得到 *kdpD* 缺失片段。测序正确后,

表 1 实验所用的菌株、质粒和引物  
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	基因型 Genotypes	来源 Sources
菌株 Strains		
<i>V. alginolyticus</i> HY9901	Wild type	[6]
$\Delta kdpD$	HY9901 carrying an in-frame deletion of <i>kdpD</i> <sub>190-1212</sub>	This study
<i>E. coli</i> MC1061	lacY1galK2 ara-14xyl-5 supE44 $\lambda$ pir	[16]
<i>E. coli</i> S17-1	Tp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , $\lambda$ pir	[17]
质粒 Plasmids		
pRE112	Suicide plasmid, <i>sacB</i> , Cm <sup>r</sup>	[18]
引物 Primers		
	5'→3'	
<i>kdpD</i> -for	GGGGT <u>ACCT</u> GTGTAGCACCATAAATCGTT (划线部分为 <i>Kpn</i> I 酶切位点)	
<i>kdpD</i> -int-rev	<u>ATTGACGAAGGTA</u> AAAATGGGAACGGATTACAACCCT (划线部分表示反向互补序列)	
<i>kdpD</i> -int-for	<u>CATTTTACCTTCGTCAATCAC</u> (划线部分表示反向互补序列)	
<i>kdpD</i> -rev	<u>CGAGCTC</u> ACACTAATCCATCTTGCG (划线部分为 <i>Sac</i> I 酶切位点)	
<i>kdpD</i> -in1	TAAATGACCAGCCTTTTCCTA	
<i>kdpD</i> -in2	GCTTCTTTGCGTGCGGCGTCT	
16S rRNA1	TTGCGAGAGTGAGCGAATCC	
16S rRNA2	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG	

注：单下划线部分序列表示反向互补序列；双下划线部分序列表示酶切位点。

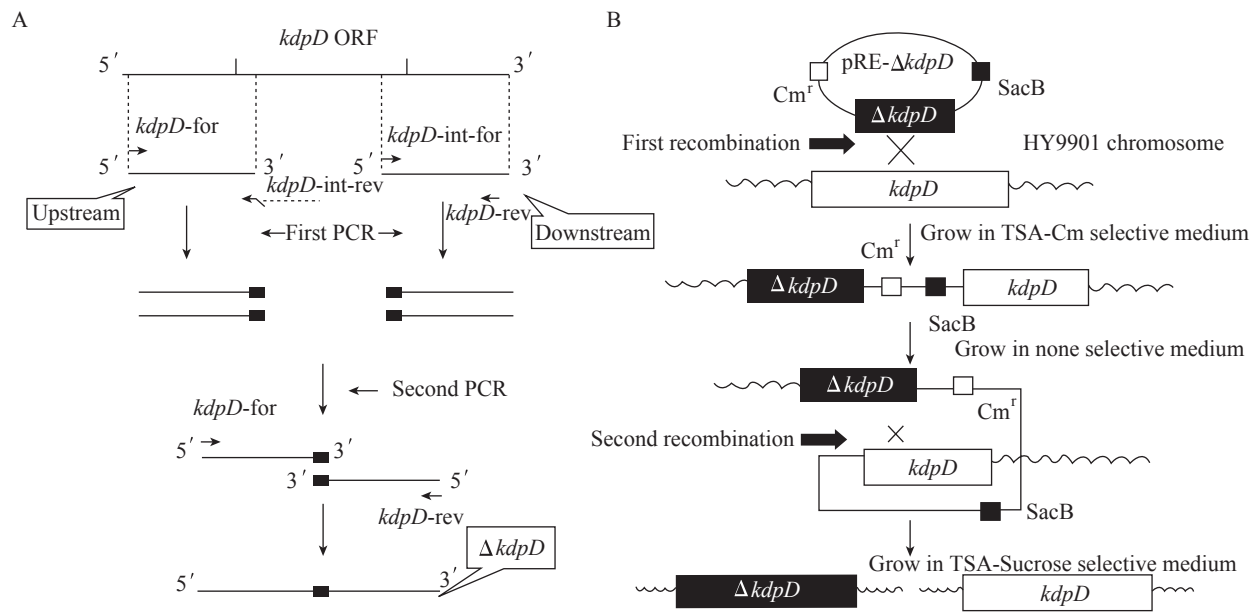
Note: Nucleotides double underlined represent restriction enzyme site; Nucleotides underlined represent 18 bp reverse complement

利用内切酶 *Kpn* I/*Sac* I 对 pRE112 自杀质粒和 *kdpD* 缺失片段分别进行双酶切,将酶切回收后的 pRE112 质粒和 *kdpD* 缺失片段按适当比例混合,在 T4 连接酶的作用下,构建重组自杀质粒 pRE- $\Delta kdpD$ 。将质粒转化入 *Escherichia coli* MC1061 感受态细胞,并涂布于 LB 平板(氯霉素终浓度为 25 mg/L),最后挑取阳性单菌落,进行 PCR 和测序检测。

提取测序正确的重组自杀质粒,转化至 *E. coli* S17-1。分别培养含有 pRE- $\Delta kdpD$  质粒的 *E. coli* S17-1 和溶藻弧菌 HY9901 至菌液  $OD_{600}$  达到 0.5,取 160  $\mu$ L *E. coli* S17-1 和 40  $\mu$ L 溶藻弧菌,4 000 r/min 离心 5 min 后,去上清,重悬菌体,并将重悬液接种于 TSA 平板上(无抗生素),28 °C 培养 24 h,此时,发生第一次同源重组。用 TSB 液体培养基冲洗平板,将菌液涂布于含氯霉素的 TSA 平板,28 °C 培养 48 h。挑取单菌落,以 *kdpD*-for 和 *kdpD*-rev 为引物

进行菌落 PCR,筛选第一次同源重组突变体。

挑取上一步得到的阳性单菌落,接种于液体培养基,28 °C、200 r/min 振荡培养 48 h 后,将菌液涂布于 TSA 平板上(含 10%蔗糖),28 °C 培养 48 h。此时,利用 pRE112 质粒的蔗糖自杀基因(*sacB*),筛选发生第二次同源重组的溶藻弧菌。挑取单菌落,划线于含有氯霉素的 TSA 平板和没有抗性的 TSA 平板,28 °C 培养 48 h。选取仅在无抗性的平板上生长、而在含氯霉素的平板不生长的单菌落,以 *kdpD*-for 和 *kdpD*-rev 为引物进行菌落 PCR 检测,并送测序验证突变位点。根据测序结果碱基序列与融合片段碱基序列的一致性来判断该菌株是否为  $\Delta kdpD$  缺失突变株。若测序结果碱基序列与野生型缺失 *kdpD* 内部 190-1 212 bp 片段后的碱基序列完全一致,可初步判断该菌株为  $\Delta kdpD$  缺失突变株。

图 1 *kdpD* 敲除突变株构建示意图Figure 1 Diagram for construction of *kdpD* in-frame deletion mutant of *V. alginolyticus*

Note: A: For the construction of  $\Delta kdpD$ , two PCR fragments were generated by using the HY9901 genomic DNA as template. The first fragment was amplified using primers *kdpD*-for and *kdpD*-int-rev, and the primers *kdpD*-int-for and *kdpD*-rev were used to amplify the second fragment. Both fragments contained an 18 bp overlapping sequence were used as templates for the subsequent PCR procedure using primers *kdpD*-for and *kdpD*-rev. B: The resulting PCR product was ligated into the suicide vector pRE112 ( $Cm^r$ ) to generate pRE- $\Delta kdpD$ . This recombinant suicide plasmid was then transformed into *E. coli* MC1061 and subsequently S17-1. Single crossover mutants were obtained by conjugal transfer of the resulting plasmid into *V. alginolyticus* HY9901. Deletion mutants were screened on 10% sucrose TSA plates, and then subsequently confirmed by PCR and sequencing using primers *kdpD*-in1 and *kdpD*-in2.

**1.2.2 细菌的生长速率比较:**取等量( $OD_{600}$ 调至 0.5)的野生株 HY9901 和 *kdpD* 缺失株菌液,以 1:100 的比例接种到 TSB 培养基中,28 °C、200 r/min 振荡培养,每隔 1 h 测定  $OD_{600}$ ,每组 3 个重复,取平均值,绘制生长曲线。

**1.2.3 生物被膜形成能力检测:**参照文献[21]略改动,将野生株 HY9901 和 *kdpD* 缺失株( $OD_{600}$ 调至 0.5)转接至 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,每个样品设 6 个重复,同时设置阴性对照为 TSB 培养基,28 °C 静置培养。在 24、48 和 72 h 取样,甲醇固定 20 min 后,结晶紫草酸铵染料染色 15 min,用水冲洗至无染液流出,晾干。最后加入 95% 的酒精,室温放置 30 min,测定溶液  $OD_{570}$ 。

**1.2.4 细菌泳动实验:**使用无菌牙签分别蘸取野生株 HY9901 和缺失株 *kdpD* ( $OD_{600}$ 调至 0.5),点接种于琼脂含量为 0.35% 的 TSA 平板上,每组设 3 个重

复,28 °C 静置培养 24 h,测定泳动圈直径。

**1.2.5 胞外蛋白酶活性检测:**参照文献[22]略改动,将野生株 HY9901 和 *kdpD* 突变株分别涂布于铺有无菌玻璃纸的 TSA 平板上,28 °C 培养 24 h 后,用液体培养基冲洗细菌,4 °C 离心 30 min,过滤上清,得到胞外产物。以煮沸 10 min 的灭活样品作为空白对照,取 100  $\mu$ L 的样品,每个样品做 3 个重复,分别与 100  $\mu$ L 偶氮酪蛋白溶液混匀,加入 300  $\mu$ L Tris-HCL 缓冲液,37 °C 温育 30 min。加入 10% (质量体积比)的三氯乙酸 400  $\mu$ L,室温静置 30 min 终止反应。离心 5 min 后,将上清转移至新的离心管,加入 800  $\mu$ L NaOH 溶液(525 mmol/L)显色,测定溶液  $OD_{442}$ 。

**1.2.6 半数致死率( $LD_{50}$ )检测:**分别接种 HY9901、 $\Delta kdpD$  的单菌落至 TSB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 振荡培养 18 h,以 1:100 比例倒转接到新

鲜的TSB培养基中,培养至 $OD_{600}$ 为0.5,4 000 r/min离心5 min,收集菌体,使用生理盐水清洗并调节梯度浓度。实验用斑马鱼共220尾,随机分组,每组20尾。实验组以肌肉注射的方式每尾注射5  $\mu$ L菌液。对照组以同样方式注射等量生理盐水。记录10 d内鱼体死亡数目直至死亡情况稳定。观察死鱼状态,并重新分离发病组织的细菌,用PCR鉴定。

利用寇氏法<sup>[23]</sup>计算半数致死量:  $\text{Log}LD_{50} = X_k - d (\Sigma P_i - 0.5)$ 。其中 $X_k$ 为最大对数剂量, $d$ 为相邻的两组对数剂量之差数, $P_i$ 为死亡率, $i$ 为组号。

**1.2.7 细菌在鱼体内的存活能力检测:**实验用斑马鱼被随机分为3组,每组30尾鱼,用加热棒将水温调整至28  $^{\circ}\text{C}$ 。取浓度为106 CFU/mL的野生株HY9901和突变株 $\Delta kdpD$ ,注射组1:每尾肌肉注射5  $\mu$ L野生株HY9901菌液;注射组2:每尾肌肉注射5  $\mu$ L  $\Delta kdpD$ 菌液;对照组:每尾肌肉注射5  $\mu$ L生理盐水。注射后第12、24和48 h取样。斑马鱼较小,以组内随机3尾鱼为1个样本,在无菌条件下取肾脏和脾脏,分别称重后充分研磨,用生理盐水倍比稀释,涂布于TCBS平板上,每组设3个重复,28  $^{\circ}\text{C}$ 静置培养24 h后进行菌落计数。通过判断菌落形态的一致性以及随机挑取板上的菌落进行PCR和DNA测序来确定板上菌是否为目的菌。

**1.2.8 统计学处理:**采用SPSS 17.0软件对所得的实验数据进行单因素方差分析,用邓肯氏进行多重比较,文中\*\*表示与同期对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ),\*表示与同期对照组相比差异显著( $0.01 < P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺失突变株的构建

以溶藻弧菌HY9901基因组DNA为模板,分别扩增 $kdpD$ 基因的上下游片段,得到415 bp的 upstream片段和505 bp的 downstream片段(图2,泳道1和2),上游片段3'和下游片段5'端包含18 bp的互补序列,并通过overlap PCR得到920 bp的融合片段(图2,泳道3)。在第一次同源重组筛选中,使用引物 $kdpD$ -for和 $kdpD$ -rev,重组菌扩增出野生型和缺失型2个片段,野生型是1 943 bp,源自HY9901,缺失型是920 bp,源自pRE112- $\Delta kdpD$ (图2,泳道5)。而野生株仅能扩增出1 943 bp单片段(图2,泳道4)。第二次同源重组筛选中,用引物 $kdpD$ -for/ $kdpD$ -rev对野生株和初筛得到的重组菌基因组进行PCR, HY9901得到1 943 bp的片段, $\Delta kdpD$ 扩增出920 bp的片段(图2,泳道6和7),进一步对扩增产物进行DNA测序,与野生株相比,证明HY9901的 $kdpD$

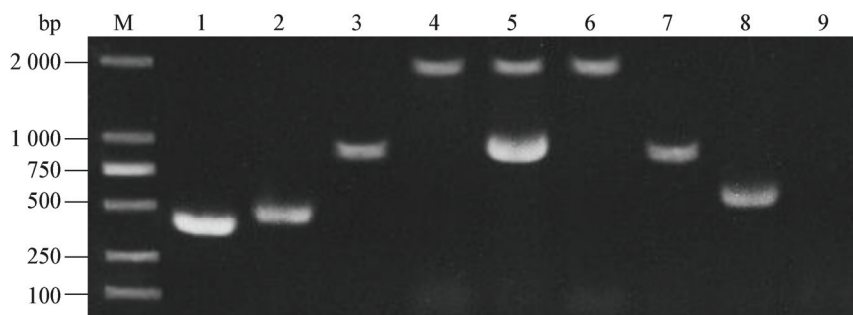


图2  $kdpD$  敲除突变株的构建及验证

Figure 2 Construction and confirmation analysis of the knockout mutant strain  $\Delta kdpD$

注: M: DL2000 marker; 1:  $kdpD$ -for/ $kdpD$ -int-rev PCR产物; 2:  $kdpD$ -int-for/ $kdpD$ -rev PCR产物; 3-7:  $kdpD$ -for/ $kdpD$ -rev PCR产物; 8, 9:  $kdpD$ -in1/ $kdpD$ -in2 PCR产物。其中1、2、4、6、8为野生株扩增条带; 3为融合片段条带; 5为一次同源重组阳性菌扩增条带; 7和9为突变株 $\Delta kdpD$ 扩增条带。

Note: M: DL2000 marker; 1: PCR products with  $kdpD$ -for/ $kdpD$ -int-rev; 2: PCR products with  $kdpD$ -int-for/ $kdpD$ -rev; 3-7: PCR products with  $kdpD$ -for/ $kdpD$ -rev; 8-9: PCR products with  $kdpD$ -in1/ $kdpD$ -in2. Genomic DNAs from the wild-type strain (lanes 1, 2, 4, 6, 8), the overlap PCR product (lane 3), single crossover mutant (lane 5) and the mutant  $\Delta kdpD$  (lane 7, 9), were used as templates.



基因缺失。使用 *kdpD* 内部引物, 野生株能扩增出 690 bp 的目的片段, 而突变株无法扩增出相应条带(图 2, 泳道 8 和 9), 再次验证突变株中 *kdpD* 基因已敲除。

## 2.2 细菌的生长速率比较

利用 *t* 检测方法比较两株菌在同一时间点的生长速率, 发现野生株 HY9901 与 *kdpD* 缺失株的生长速率接近, 无显著差异( $P>0.05$ ), 即 *kdpD* 基因的缺失对溶藻弧菌的生长没有影响, 溶藻弧菌整个生长周期较短, 生长迅速, 在 12 h 后进入平台期,  $OD_{600}$  约为 2.7 (图 3)。

## 2.3 生物被膜形成能力检测

通过检测发现, 溶藻弧菌野生株与突变株的生物被膜形成能力如图 4 所示。在第 48 h 和 72 h, 野生

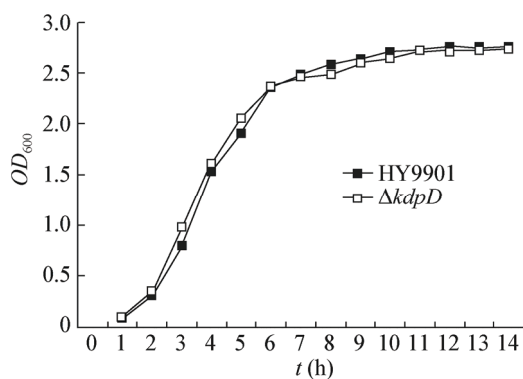


图 3 溶藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpD$  的生长曲线  
Figure 3 Growth characteristics of the *kdpD* mutant and *V. alginolyticus* HY9901

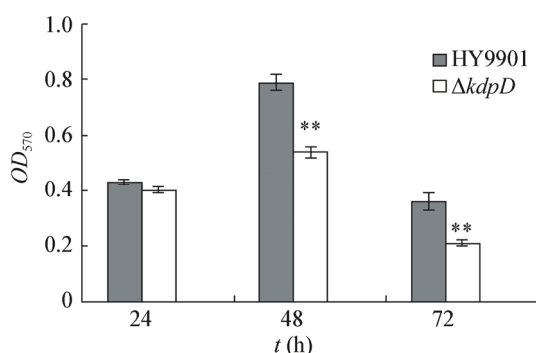


图 4 藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpD$  的生物被膜形成能力  
Figure 4 Biofilm formation of the *kdpD* mutant and *V. alginolyticus* HY9901

Note: \*\*:  $P<0.01$ .

株与突变株  $\Delta kdpD$  的生物被膜形成有显著差异( $P<0.01$ ), 说明 *kdpD* 的缺失可能会影响溶藻弧菌生物被膜的形成。

## 2.4 泳动性实验和胞外蛋白酶活性检测

将野生溶藻弧菌 HY9901 与突变株  $\Delta kdpD$  接种于泳动平板上, 其泳动结果如下: 野生株泳动圈为  $21.33\pm 0.09$  mm, 突变株为  $16.83\pm 0.07$  mm (图 5), 根据泳动圈直径统计分析可知 *kdpD* 缺失后溶藻弧菌的泳动能力显著降低( $0.01<P<0.05$ )。对两种菌的胞外蛋白酶进行检测, 结果发现, 溶藻弧菌缺失了 *kdpD* 基因后, 其胞外蛋白酶的活性没有显著差异( $P>0.05$ )。

## 2.5 半数致死量测定 $LD_{50}$

为了验证 *kdpD* 基因缺失后是否会使致病菌的毒力下降, 采用斑马鱼模型进行感染实验。由实验结果(表 2)可知, 突变株  $\Delta kdpD$  的半数致死量比野生株提高了 8.84 倍。该结果表明, *kdpD* 基因影响了溶藻弧菌的致病性。

## 2.6 细菌在鱼体内的存活能力检测

为了检测细菌在鱼体内的存活能力, 以注射方式进行攻毒, 在攻毒后第 12、24 和 48 h 分别取鱼消毒后, 研磨倍比稀释涂平板。对照组菌落数量为 0, 对实验组 TCBS 板上菌落进行观察, 发现其菌落形态一致, 呈圆形黄色、凸起和边缘光滑的单菌

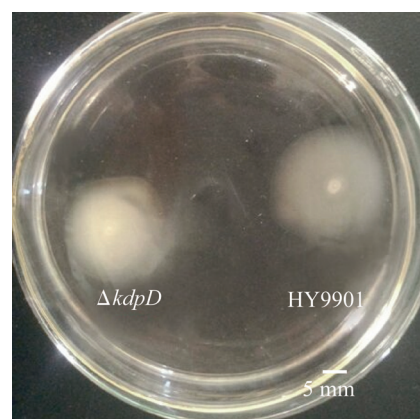


图 5 藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpD$  的泳动能力  
Figure 5 Swarming ability of the *kdpD* mutant and *V. alginolyticus* HY9901

落,从形态上可初步判断板上菌为溶藻弧菌。随机挑取板上单菌落,用引物 16S rDNA 1/16S rDNA 2 进行 PCR 扩增并测序。测序结果证实板上所长的菌为溶藻弧菌。菌落计数结果显示(图 6),在第 12 h,肾脏和脾脏中野生株和缺失株的数量接近 ( $P>0.05$ );在第 24 h 和 48 h,肾脏和脾脏中细菌数量均有上升,野生株明显多于缺失株( $0.01<P<0.05$ )。

3 讨论

细菌在感染宿主过程中,由自然环境进入宿主体内,所处的环境(温度、渗透压和金属离子水平等)

发生很大变化。因此,细菌需要一些调控蛋白密切感受和响应体内外各种微环境的变化,进而调节相关基因表达以完成其致病过程<sup>[11,24]</sup>。KdpD 是双组分信号调控系统 KdpD/KdpE 的成员之一,维持胞内的  $K^+$ 水平和渗透压<sup>[12-13]</sup>。本研究以 pRE 112 自杀质粒为载体,通过 Overlap PCR 和同源重组筛选技术,成功构建溶藻弧菌 *kdpD* 基因缺失突变株,并比较分析缺失株和野生株的致病相关表型变化。

通过生物学特性比较,发现 *kdpD* 缺失后并不影响溶藻弧菌的生长特性和胞外蛋白酶活性,但泳

表 2 溶藻弧菌 HY9901 和突变株 $\Delta kdpD$ 对斑马鱼的 $LD_{50}$ 测定					
Table 2 $LD_{50}$ determinations of the <i>kdpD</i> mutant and <i>V. alginolyticus</i> HY9901					
菌株 Bacterial strains	攻毒浓度 Concentration (CFU/mL)	累计结果 Cumulative results			半数致死量 $LD_{50}$ (CFU/fish)
		存活数 Survival number of fish	死亡数 Death number of fish	死亡率 Death rate (%)	
野生株 Wild strain	$1.08\times 10^8$	0	20	100	$2.42\times 10^4$
	$9.71\times 10^6$	6	14	70	
	$1.10\times 10^6$	8	12	60	
	$9.87\times 10^4$	14	6	30	
<i>kdpD</i> 缺失株 $\Delta kdpD$	$9.21\times 10^3$	20	0	0	$2.14\times 10^5$
	$9.92\times 10^7$	3	17	85	
	$1.07\times 10^7$	12	8	40	
	$1.13\times 10^6$	14	6	30	
	$9.56\times 10^4$	16	4	20	
	$9.33\times 10^3$	20	0	0	

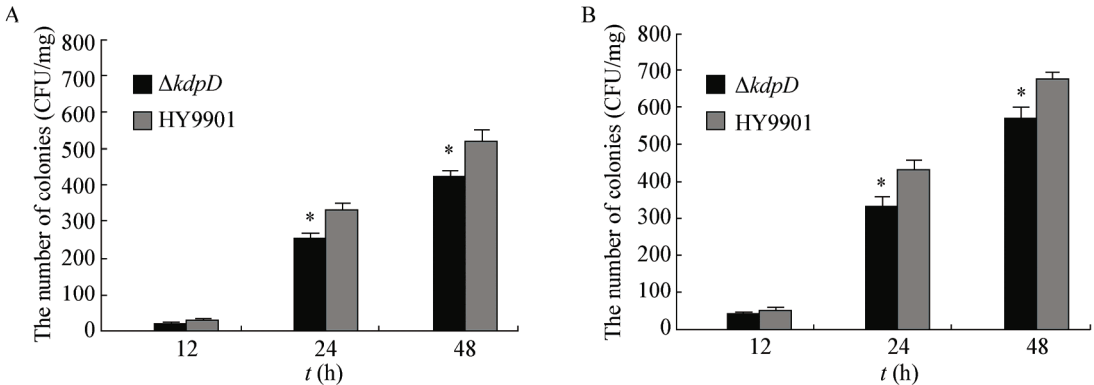


图 6 藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpD$  在鱼体内的存活能力

Figure 6 Survival ability of the *kdpD* mutant and *V. alginolyticus* HY9901 in vivo

注: A: 肾脏; B: 脾脏; \*:  $0.01<P<0.05$ .

Note: A: Kidney; B: Spleen; \*:  $0.01<P<0.05$ .

动力显著降低。近期的研究发现, 金属离子浓度影响相关基因的表达, 进而调节细菌的群体运动和蹭行运动<sup>[25]</sup>。我们推测, *kdpD* 基因缺失后影响细菌对  $K^+$  的吸收, 对泳动力也有一定影响。生物被膜的形成是细菌为适应环境而吸附到宿主细胞膜表面, 抵抗药物和宿主免疫应答的一种多细胞行为<sup>[26-27]</sup>。在本研究中, 发现 *kdpD* 缺失株的生物被膜形成能力明显下降。该结果和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) *kdpD* 缺失株生物被膜形成的实验结果一致<sup>[14]</sup>。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 AI-2 群体感应通过对双组分调控系统 KdpDE 的调控来实现对荚膜多糖合成酶基因转录的调控<sup>[28]</sup>。此外, 胞外荚膜多糖已经被确定参与弧菌生物膜的形成。弧菌生物膜形成的调控机制非常复杂, 其涉及许多转录调控程序如双组分调控系统、群体感应和 C-di-GMP 信号<sup>[29]</sup>。那么, *kdpD* 基因在溶藻弧菌生物膜形成调控过程中是担当何种角色, 有待进一步研究。

细菌的毒力包括产毒力和侵染力, 其感染与致病过程体现在与宿主细胞相互作用的复杂过程。它通过黏附、侵入、体内增殖、抵抗宿主免疫反应和产生代谢产物(毒素)等阶段最终达到侵染宿主的目的<sup>[11,24]</sup>。在细菌攻毒研究中, 发现突变株  $\Delta kdpD$  的半数致死量下降约一个数量级, 这表明 *kdpD* 基因影响溶藻弧菌的毒力。金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 在侵染过程中, 由自然环境进入到高  $K^+$  水平的宿主体内环境, KdpDE 转录水平上调, 从而引起外毒素基因表达水平上升<sup>[30]</sup>。而在本实验中, *kdpD* 的缺失可能会导致双组分调控系统 KdpDE 的信号转导过程受到阻碍, 不能完全地发挥其调控毒力因子表达的作用, 以致出现溶藻弧菌毒力减弱的结果。细菌在鱼体内的存活能力实验的结果与细菌攻毒实验的结果一致。肾脏和脾脏是溶藻弧菌感染宿主的主要器官<sup>[31-33]</sup>。攻毒后的第 24 h 和 48 h, 突变株  $\Delta kdpD$  在这两个器官的存活能力均明显低于野生株 ( $0.01 < P < 0.05$ ), 提示 *kdpD* 基因可能参与溶藻弧

菌在肾脏和脾脏的定殖及感染。

最近, Xue 等<sup>[30]</sup>发现金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 中的双组分调控系统 KdpDE 可以调控将近 100 个毒力基因。本研究中, *kdpD* 基因在一定程度上影响了溶藻弧菌的毒力。那么, 我们该深思, *kdpD* 会调控哪些毒力基因的表达呢? 因此下一步将以 *kdpD* 基因缺失的突变株为研究对象, 进行全基因组表达谱芯片实验, 通过比较野生株与突变株基因表达的差异, 找出受 *kdpD* 调控的基因, 并希望在其中发现可能的相关致病基因, 为进一步研究 *kdpD* 基因参与溶藻弧菌致病过程和发现新的致病相关基因奠定基础。

## 参考文献

- [1] Robert-Pillot A, Guenole A, Fournier JM. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 215(1): 1-6
- [2] Ramesh KP, Kalidas C, Tamilmani G, et al. Microbiological and histopathological investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage[J]. Indian Journal of Fisheries, 2014, 61(1): 124-127
- [3] Balcázar JL, Gallo-Bueno A, Planas M, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 97(2): 207-210
- [4] He H, Wang Q, Sheng L, et al. Functional characterization of *Vibrio alginolyticus* twin-Arginine translocation system: its roles in biofilm formation, extracellular protease activity, and virulence towards fish[J]. Current Microbiology, 2011, 62(4): 1193-1199
- [5] González-Escalona N, Blackstone GM, DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan Oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7925-7929
- [6] Cai SH, Wu ZH, Jian JC, et al. Cloning and expression of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus erythropterus* (Bloch)[J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(8): 493-500
- [7] Chen FR, Liu PC, Lee KK. Lethal attribute of serineprotease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2000, 55(1/2): 94-99
- [8] Wang Q, Liu Q, Cao X, et al. Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence[J]. Archives of Microbiology, 2008, 190(5): 595-603
- [9] Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(2): 117-128
- [10] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69(1): 183-215
- [11] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, et al. Molecular



- mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [12] Jung K, Veen M, Altendorf K.  $K^+$  and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(51): 40142-40147
- [13] Walderhaug MO, Polarek JW, Voelkner P, et al. KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(7): 2152-2159
- [14] Alegado RA, Chin CY, Monack DM, et al. The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(10): 1618-1637
- [15] Parish T, Smith DA, Kendall S, et al. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(3): 1134-1140
- [16] Rubires X, Saigi F, Piqué N, et al. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the rfb-50 mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(23): 7581-7586
- [17] Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria[J]. Nature Biotechnology, 1983, 1(9): 784-791
- [18] Edwards RA, Keller LH, Schifferli DM. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression[J]. Gene, 1998, 207(2): 149-157
- [19] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2008: 246-248 (in Chinese)  
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 246-248
- [20] Zhou Z, Pang H, Ding Y, et al. VscO, a putative T3SS chaperone escort of *Vibrio alginolyticus*, contributes to virulence in fish and is a target for vaccine development[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(5): 1523-1531
- [21] Di HL, Chen C, Shi L. Comparative study of biofilm formation and its associated factors in opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(11): 1177-1180
- [22] Windle HJ, Kelleher D. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(8): 3132-3137
- [23] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493-497
- [24] Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012, 2(11): a012427
- [25] Patriquin GM, Banin E, Gilmour C, et al. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(2): 662-671
- [26] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. Annual Reviews in Microbiology, 2003, 57(1): 677-701
- [27] Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(10): 496-506
- [28] Zhao L, Xue T, Shang F, et al. *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(8): 3506-3515
- [29] Yildiz FH, Visick KL. Biofilms: so much the same yet so different[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(3): 109-118
- [30] Xue T, You Y, Hong D, et al. The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular  $K^+$  sensing and Agr signaling to infection programming[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(6): 2154-2167
- [31] Sangster CR, Smolowitz RM. Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*[J]. The Biological Bulletin, 2003, 205(2): 233-234
- [32] Huang RF. *Vibrio alginolyticus* in the Grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Fisheries Science, 2005, 24(6): 1-3 (in Chinese)  
黄瑞芳. 斜带石斑鱼溶藻弧菌病的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(6): 1-3
- [33] Jin S, Cai WQ, Yu H, et al. Studied on cell pathology of *Vibrio alginolyticus* disease to large yellow croakers[J]. Marine Science, 2003, 27(2): 59-62 (in Chinese)  
金珊, 蔡完其, 於宏, 等. 大黄鱼溶藻弧菌病细胞病理变化的初步研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 59-62