

研究报告

一株鳢源鳢诺卡氏菌致病性与全基因组分析

张美超^{1,2}, 邓玉婷^{*1,3}, 赵飞¹, 谭爱萍¹, 罗愿^{1,2}, 李东铭¹, 姜兰¹, 黄志斌¹

1 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部渔用药物创制重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380

2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

3 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141

张美超, 邓玉婷, 赵飞, 谭爱萍, 罗愿, 李东铭, 姜兰, 黄志斌. 一株鳢源鳢诺卡氏菌致病性与全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2193-2211

Zhang Meichao, Deng Yuting, Zhao Fei, Tan Aiping, Luo Yuan, Li Dongming, Jiang Lan, Huang Zhibin. Pathogenicity and whole genome analysis of a *Nocardia seriolae* strain isolated from snakehead[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2193-2211

摘 要:【背景】鳢诺卡氏菌是一种典型的条件致病菌, 感染鳢、鲈等多种名优鱼类, 易造成存在机体损伤或免疫机能下降的鱼持续性感染, 给水产养殖业造成了巨大损失。【目的】了解临床分离鳢源鳢诺卡氏菌对乌斑杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)的致病性, 并从全基因组层面了解该病原菌的基因组和致病因子信息, 为鳢诺卡氏菌后续病原学及鳢诺卡氏菌病防治技术和疫苗的开发研究提供有利的数据支撑。【方法】鳢诺卡氏菌 NK201610020 通过回归感染试验和发病鱼靶器官组织病理分析, 了解鳢诺卡氏菌的毒力和病理特征。通过对试验菌进行全基因组测序和比较基因组学分析, 挖掘该菌的基因组与毒力特征。【结果】回归感染试验结果显示, 除 1.5×10^3 组外, 其余 5 个感染组致死率高达 90%, LD_{50} 为 1.079×10^3 CFU/mL, 说明试验菌毒力较强。组织病理学观察到肝、脾、肾呈现严重的病理损伤, 而且有肉芽肿结构形成。试验菌全基因组测序发现, 全基因组大小为 8 294 329 bp, GC 含量为 68.10%, 共预测到编码基因 7 812 个。比较基因组学分析发现, 不同地区不同宿主来源鳢诺卡氏菌在基因组基础特征层面无明显差异, 而且一致性在 99.9% 以上。通过毒力基因数据库比对, 预测试验菌全基因组中有 171 个编码序列可能为毒力基因, 其功能主要与细胞壁合成、营养代谢、细菌持续感染相关。【结论】鳢诺卡氏菌毒力强, 基因组序列保守, 携带多种毒力因子, 研究结果为进一步研究鳢诺卡氏菌的致病机制提供了有利的数据支撑。

关键词: 鳢诺卡氏菌; 致病性; 全基因组分析; 毒力基因

基金项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD45, 2021SJ-XT3); 广东省自然科学基金(2020A1515011584)

Supported by: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD45, 2021SJ-XT3); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515011584)

*Corresponding author: E-mail: dengyt@prfri.ac.cn

Received: 2021-10-08; Accepted: 2021-10-26; Published online: 2022-04-02

Pathogenicity and whole genome analysis of a *Nocardia seriolae* strain isolated from snakehead

ZHANG Meichao^{1,2}, DENG Yuting^{*1,3}, ZHAO Fei¹, TAN Aiping¹, LUO Yuan^{1,2},
LI Dongming¹, JIANG Lan¹, HUANG Zhibin¹

1 Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China

2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Key Laboratory of Aquatic Product Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China

Abstract: [Background] The infection of *Nocardia seriolae*, a typical opportunistic pathogen, has been documented in many kinds of fishes such as *Channa argus* and *Micropterus salmoides*, particularly wounded fishes or fishes with decreased immunity. The resulted nocardiosis lasts a long time, causing great loss to the aquaculture. [Objective] This paper aims to clarify the pathogenicity of *Nocardia seriolae* isolated from hybrid snakehead (*C. maculata*♀×*C. argus*♂), as well as the whole genome and virulence factors information of the pathogen, which is expected to lay a basis for the future research on etiology of *Nocardia seriolae*, prevention and control of this pathogen, and vaccine development. [Methods] Through challenge test and pathological analysis of target snakehead organs, the virulence and pathogenic characteristics of *Nocardia seriolae* NK201610020 were elucidated. In addition, based on whole-genome sequencing and comparative genomics analysis, the genomic features and virulence genes information of the strain were clarified. [Results] The result of challenge test showed that the death rates in the five infection groups were up to over 90% except the group of 1.5×10^3 , and the LD_{50} is 1.079×10^3 CFU/mL, which indicating the strong virulence of the strain. Histopathological results revealed serious pathological damages in liver, spleen, and kidney, as well as formation of granulomas. The whole genome of NK201610020 was 8 294 329 bp with GC content of 68.10% and 7 812 coding genes. The genomes of *Nocardia seriolae* from different hosts and different regions showed little difference (>99.9% similarity). According to the alignment with virulence gene database, 171 coding genes in the genome of NK201610020 might be virulence genes, which were involved in cell wall synthesis, nutrient metabolism, and persistent bacterial infection. [Conclusion] *Nocardia seriolae* has strong virulence, and conserved genome sequence containing diverse virulence genes. The results lay a basis for further analysis of *Nocardia seriolae* pathogenic mechanism.

Keywords: *Nocardia seriolae*; pathogenicity; whole genome analysis; virulence gene

鳗诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)为革兰氏阳性丝状杆菌,属于放线菌目(*Actinomycetales*)诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[1]。鳗诺卡氏菌是引起鱼类结节病的主要病原菌,淡水和海水鱼类中均有被其感染的报道^[2],

包括大黄鱼(*Pseudocisena crocea*)^[3]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[4]、黄条鳗(*Seriola quinqueradiata*)^[5]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[6]、乌鳢(*Channa argus*)^[5]和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[7]等。广东省是乌斑杂交鳢(*Channa*

maculata♀×*C. argus*♂)的主产区,养殖产量位居全国第一^[8],近几年随着杂交鳢高密度集约化养殖的发展,鳢诺卡氏菌引起的病害也频繁发生,对水产养殖业造成了巨大的经济损失。研究表明,当养殖鱼体在自身免疫保护力低下或是机体出现损伤时,鳢诺卡氏菌可以通过鱼体伤口^[9]或鳃感染鱼体^[10]。鳢诺卡氏菌引起的结节病患病周期相对较长,前期通常表现为应激下降、食欲减退,后期患病鱼体体表发黑或是出现溃烂出血等症状,肝、肾、脾等免疫器官产生白色结节^[11]。

鳢诺卡氏菌的致病性由多种毒力相关因子共同决定,这些毒力因子相互协调,直接或间接参与致病过程,进而引发对宿主有害的炎症反应。随着基因组学的飞速发展,通过全基因组测序开展毒力因子研究已成为揭示病原菌致病机理重要的技术手段之一^[12]。然而,关于鳢诺卡氏菌全基因组及其毒力基因的分析报道仍较少。目前在NCBI上公布的完整全基因组序列只有2个,包括日本黄条鳢分离菌 UTF1 (GenBank 登录号为 AP017900)^[13]和韩国养殖的日本鳢分离菌 EM150506 (GenBank 登录号为 CP017839.1)^[6];由大量 contig 和 scaffold 组成的基因草图序列有 5 个,包括韩国乌鳢分离菌 CK-14008 (GenBank 登录号为 NZ_MOYO00000000.1)^[6]、中国广东卵形鲳鲹分离菌 ZJ0503 (GenBank 登录号为 NZ_JNCT01000000)^[14]等。Han 等^[6]和 Yasuike 等^[13]分别对鳢诺卡氏菌全基因组序列进行了分类与注释分析,对鳢诺卡氏菌的结构与功能有了初步的了解。

本研究前期从患结节病的乌斑杂交鳢分离到一株鳢诺卡氏菌 NK201610020,通过对菌株进行回归感染试验及发病试验鱼的组织病理分析,了解该菌株的致病性;对试验菌进行全基因组序列分析,并与数据库已报道的鳢诺卡氏

菌全基因组序列进行比较分析,了解鳢诺卡氏菌的病原学特征;利用一系列数据库对试验菌的全基因组序列进行分类和注释分析,预测分析其基因功能,挖掘毒力相关基因,以期针对鳢诺卡氏菌后续病原学、致病机制及鳢诺卡氏菌病防治技术和疫苗的开发研究提供有利的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

鳢诺卡氏菌 NK201610020 由中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室分离鉴定后保存。菌株来源于 2013 年广东省佛山市,从患病杂交鳢脾中分离得到。

1.1.2 试验鱼

实验用杂交鳢购自广东省佛山市某养殖场,体重规格均为(100±5) g,在实验室暂养 1 个月[温度(25±1) °C,正常投喂],采用镜检、抽血接菌、剖检等方式检测寄生虫和诺卡氏菌等病原感染情况后用于鳢诺卡氏菌人工感染实验。

1.1.3 主要试剂和仪器

PowerSoil DNA Isolation Kit, Qiagen 公司;脑心浸出液肉汤培养基(brain heart infusion broth, BHI)、5%绵羊血平板,广东环凯微生物科技有限公司。麦式比浊仪器, bioMérieux 公司;紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;人工感染实验在室内 1.0 m×1.0 m×0.5 m 的水箱中进行,具有充氧及温控设备。

1.2 回归感染试验

取冻干保存菌株 NK201610020 进行复苏培养,接种于绵羊血平板, (25±1) °C 培养 48 h,用无菌生理盐水洗下菌落,调整菌液浓

度至 1.5×10^3 、 1.5×10^4 、 1.5×10^5 、 1.5×10^6 、 1.5×10^7 和 1.5×10^8 CFU/mL 共 6 个浓度梯度, 通过肌肉注射对杂交鳢[体重为(100 ± 5) g]进行人工感染, 每尾注射 0.2 mL, 等剂量注射 0.85% 无菌生理盐水作为空白对照组, 实验组与对照组每组分别 10 尾鱼, 养殖水温控制为(25 ± 1) °C, 实验期间正常投喂, 连续观察 14 d, 对死亡数量进行统计, 按照 Reed-Muench 法计算 LD_{50} ^[15]。

1.3 病理学观察

观察 14 d 内实验鱼的死亡情况、临床症状及剖检症状, 并挑选健康鱼组织器官和感染组出现白色结节的组织器官进行组织固定与切片, 观察不同组织的病理变化, 7 d 内送往塞维生物公司进行病理切片处理。

1.4 全基因组测序、组装

按照 PowerSoil DNA Isolation Kit 说明书上的步骤提取试验菌 NK201610020 基因组 DNA。基因组 DNA 用 NanoDrop 2000 核酸浓度检测仪检测纯度, 确保 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8–2.0 之间, 浓度大于 10 μ g。

DNA 浓度检测合格后送往广州基迪奥生物科技有限公司进行全基因组测序。细菌基因组测序采用三代 PacBio 和二代 Illumina 两种技术相结合的策略构建不同的文库, 分别使用 Qubit 3.0 和 Agilent 2100 对文库质量进行检测, 检测合格后对这些文库进行测序。测序的原始数据存在一定比例的低质量数据, 为了保证信息分析的准确可靠, 需要对 Pacbio 和 Illumina 测序的原始数据进行过滤处理, 获得有效数据。使用 Falcon 和 Pilon V1.23 对三代测序和二代测序 reads 进行拼接组装。使用 Prokka 对细菌基因组进行基因结构、开放阅读框(open reading frame, ORF)及蛋白基因的预测。通过与直系同源基因簇数据库(Cluster of

Orthologous Groups of Proteins, COG)和系统分析基因产物和化合物在细胞中的代谢途径及基因产物功能数据库京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行 BLASTp 比对, 筛选条件为 $E\text{-value} \leq 1e^{-5}$, 获取比对得分最高的条目, 完成蛋白序列功能注释。全基因组的 rRNA 和 tRNA 分别使用 RNAmmer V1.2 和 tRNAscan-SE 进行预测或扫描。通过毒力因子数据库(Virulence Factors Database, VFDB)对试验菌预测基因进行了 BLASTp 搜索, 分析该菌株的毒力基因, 设定比对期望值为 $1e^{-5}$ 。

1.5 比较基因组学分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)筛选出已上传的 8 株鱼类鲈诺卡氏菌全基因组序列。将试验菌 NK201610020 基因组序列与这 8 株近缘鲈诺卡氏菌进行比较分析, 经过序列比对后, 使用最大似然估计法(maximum likelihood estimation, MLE)以 iqtree 构建进化树, 随后对进化树进行可视化展示。筛选出 3 株不同宿主来源的鲈诺卡氏菌, 使用 MUMmer 3.23 比对进行基因组 scaffolds 的排序, 通过 BLAST 2.6.0 比对结果用 perl 脚本作图, 参数设置 identity 为 80%, $E\text{-value} \leq 1e^{-5}$ 进行共线性比较分析。

2 结果与分析

2.1 杂交鳢回归感染试验

试验菌 NK201610020 进行人工感染注射, 水温 25 °C 条件下, 在攻毒第 3 天, 1.5×10^6 、 1.5×10^7 、 1.5×10^8 CFU/mL 这 3 个感染组的实验鱼均出现反应迟缓、厌食的症状; 在感染第 6 天, 1.5×10^8 CFU/mL 高浓度感染组出现死亡; 在感染第 8–10 天, 1.5×10^5 、 1.5×10^6 和 1.5×10^7 CFU/mL 这 3 个感染组也陆续出现死亡, 并且死亡速度

加快; 1.5×10^4 CFU/mL 感染组在第 10 天出现死亡, 到感染第 14 天, 1.5×10^4 CFU/mL 与 1.5×10^5 CFU/mL 两组均剩余 1 条鱼, 其他高浓度感染组实验鱼在感染 12 d 内全部死亡(图 1)。 1.5×10^3 CFU/mL 感染组在 14 d 内未出现死亡。计算其半数致死浓度 LD_{50} 为 1.079×10^3 CFU/mL。

所有死亡鱼的体表肌注部位均发生溃烂, 解剖观察发病鱼体, 部分鱼体腹部膨大且有腹水, 肝、脾、前肾出现了明显的白色结节, 脾和肾白色结节密度较大(图 2)。 1.5×10^3 CFU/mL 感染组与对照组实验鱼无任何明显症状。

2.2 病理分析

挑选感染组发病鱼的心、肝、脾、肾与对

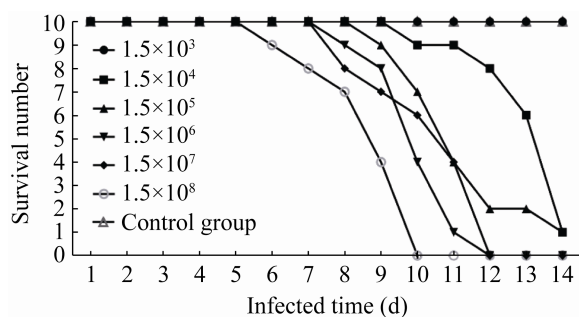


图 1 25 °C 时鳢诺卡氏菌对杂交鳢人工感染结果
Figure 1 Artificial infection results of *Nocardia seriolae* to hybrid snakehead at 25 °C.



图 2 25 °C 时鳢诺卡氏菌感染杂交鳢解剖图 箭头指向处为白色结节

Figure 2 Anatomical drawings of *Nocardia seriolae* to hybrid snakehead at 25 °C. Arrows point to white nodules.

照组健康鱼相对应的组织器官做组织切片。通过比对发现, 感染组与对照组杂交鳢的心肌纤维着色均匀, 肌丝清晰, 形态正常, 无明显的坏死或者炎症反应, 无明显差异(图 3A 和图 3B)。感染组与对照组的肾相比发现, 局部肾小管间质毛细血管淤血(图 3D 红色箭头), 间质可见大量巨噬细胞增生(图 3D 黄色箭头)。肝脏相比发现感染组有明显的肉芽肿结构, 肝细胞胞质内脂质含量减少, 可见多处肝细胞灶性坏死, 胞核固缩深染或碎裂溶解, 坏死灶周围还可见少量结缔组织(图 3F 黑色箭头)和较多肝窦淤血(图 3F 红色箭头)。感染组与对照组的脾脏相比, 发现感染组可见多处坏死灶, 坏死细胞胞核固缩深染或碎裂溶解(图 3H 黑色箭头), 红髓中大量血窦淤血(图 3H 红色箭头), 还可见较多铁血黄素沉着(图 3H 黄色箭头)。

2.3 全基因组分析

2.3.1 概况

采用第二代 BGISEQ 平台与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术, 对试验菌 NK201610020 的全基因组进行测序。试验菌 NK201610020 测序得到全基因组大小为 8 294 329 bp, 其 GC 含量为 68.10%, 共编码基因 7 812 个; 所有编码基因的总长度为 7 330 389 bp。串联重复序列

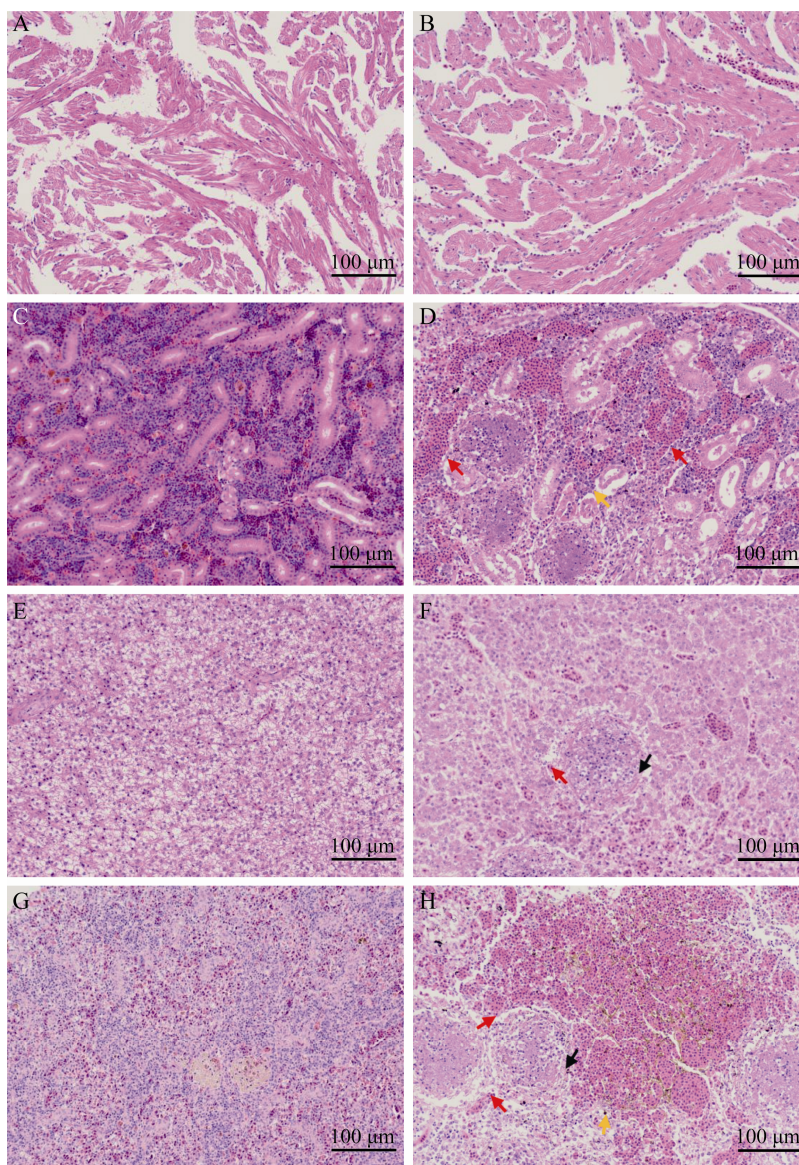


图 3 鮰诺卡氏菌 *NK201610020* 感染杂交鳢的组织病理分析 A: 对照组心脏组织; B: 感染组心脏组织; C: 对照组肾脏组织; D: 感染组肾脏组织, 肾小管间质毛细血管淤血(红色箭头), 增生巨噬细胞(黄色箭头); E: 对照组肝脏组织; F: 感染组肝脏组织, 结缔组织(黑色箭头), 肝窦淤血(红色箭头); G: 对照组脾脏组织; H: 感染组脾脏组织, 坏死细胞胞核固缩深染或碎裂溶解(黑色箭头), 血窦淤血(红色箭头), 铁血黄素沉着(黄色箭头)

Figure 3 Histopathological analysis of hybrid snakehead infected with *Nocardia seriolae* NK201610020. A: Normal heart tissue; B: Infected heart tissue; C: Normal kidney tissue; D: Infected kidney tissue, extravasated blood in tubulointerstitial capillary (red arrow), hyperplastic macrophages (yellow arrow); E: Normal liver tissue; F: Infected liver tissue, connective tissue (black arrow), extravasated blood in hepatic sinuses (red arrow); G: Normal spleen tissue; H: Infected extravasated blood in blood sinused spleen tissue, nucleus of necrosis cells solidified or cracked and dissolved (black arrow), extravasated blood in blood sinus (red arrow), depositional hemosiderin (yellow arrow).

(tandem repeat, TR) 751 个, 总长为 35 945 bp, 占全基因组总长度的 0.43%, 含有 tRNA 基因 64 个、5S rRNA 基因 4 个、16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因各 4 个、sRNA 基因 13 个。将试验菌 NK201610020 全基因组测序数据提交至 GenBank, 登录号为 NZ_CP063662.1。

为分析 NK201610020 与其他鱼源鳢诺卡氏菌全基因组特征的异同, 将试验菌 NK201610020 全基因组与其他已知鱼源鳢诺卡氏菌 8 个菌株全基因组一起进行比较基因组学分析。这 9 株菌基因组大小介于 6.78–8.37 Mb 之间, GC 含量介于 68.10%–68.30% 之间, 基因数量介于 6 787–7 812 个之间。菌株及其基因组具体相关信息见表 1。

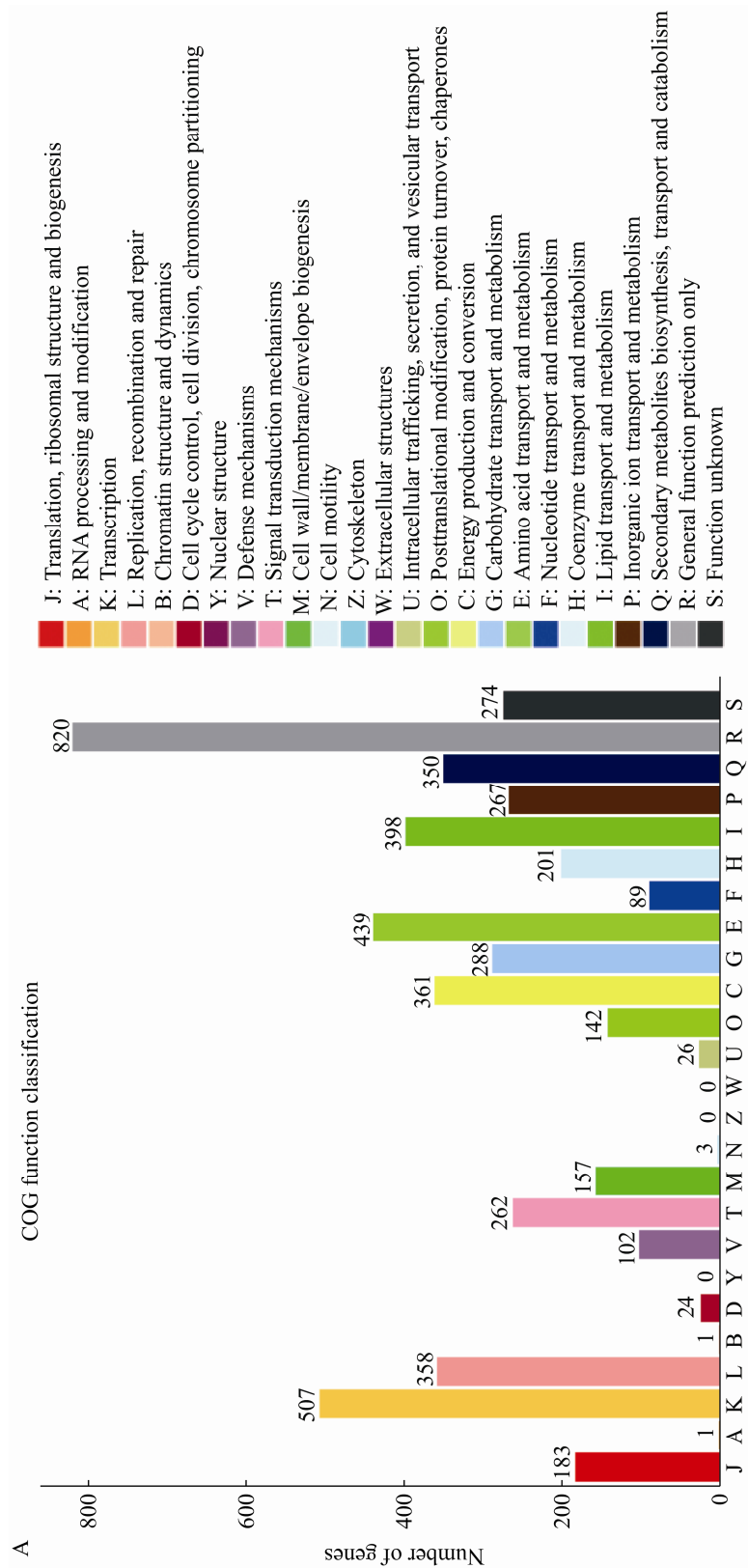
2.3.2 COG 和 KEGG 聚类分析

将试验菌 NK201610020 基因组中具有生物学功能的蛋白编码基因与蛋白质直系同源簇数据库(Clusters of Orthologous Genes, COG)比对, 根据 COG 分类标准将基因划分为 25 类, 以英文大写字母(A–Z)表示每一类的代码, 进行同源基因注释分类, 结果发现共有 5 253 个蛋白编码基因被注释。结果如图 4A 所示, 其中, 基础功能预测基因的注释结果最为丰富, 共 820 个, 占注释基因总数的 15.61%; 其次为转录相关基因, 共 507 个基因, 占注释基因总数的 9.65%, 而氨基酸代谢及转运(439 个基因, 占 8.36%)、脂质运输和新陈代谢(398 个基因, 占 7.58%)、能量生产和转换(361 个基因, 占 6.88%)等基因

表 1 鳢诺卡氏菌 NK201610020 与其他近缘鳢诺卡氏菌全基因组概况

Table 1 Genomic features of the *N. seriolae* NK201610020 genome and comparison with genomes of other *Nocardia seriolae* strains

菌株 Strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离 时间 Year of isolation	地区 Area	分离来源 Isolation origin	基因组 大小 Genome size (bp)	CDS 数量 No. of CDSs	GC 含量 GC content (mol%)	tRNA 数量 No. of tRNAs	rRNA 数量 No. of rRNAs
NK201610020	NZ_CP063662.1	2013	中国广东 Guangdong, China	乌斑杂交鳢 <i>C. maculata</i> ♀× <i>C. argus</i> ♂	8 294 329	7 812	68.10	64	3
ZJ0503	NZ_JNCT01000000	2014	中国广东 Guangdong, China	卵形鲳鲙 <i>T. ovatus</i>	7 708 091	7 297	68.25	62	1
HSY-NS01	PXZE000000000.1	2014	中国四川 Sichuan, China	乌鳢 <i>C. argus</i>	7 907 139	7 043	68.20	65	5
CK-14008	NZ_MOYO000000000.1	2014	韩国 Korea	乌鳢 <i>C. argus</i>	8 370 754	7 903	68.10	66	12
EM150506	CP017839.1	2015	韩国 Korea	日本鳢 <i>A. japonica</i>	8 304 518	7 794	68.10	65	12
NBRC_15557	NZ_BJWY000000000.1	2019	韩国 Korea	黄条鳢 <i>S. quinquerediata</i>	7 606 457	6 787	68.30	61	3
N-2927	BAWD000000000.2	2007	日本 Japan	黄条鳢 <i>S. quinquerediata</i>	7 758 286	7 531	68.30	63	3
UTF1	AP017900	2008	日本 Japan	黄条鳢 <i>S. quinquerediata</i>	8 121 733	7 697	68.10	63	4
U-1	BBYQ000000000.1	2011	日本 Japan	黄条鳢 <i>S. quinquerediata</i>	7 766 019	7 429	68.30	62	6



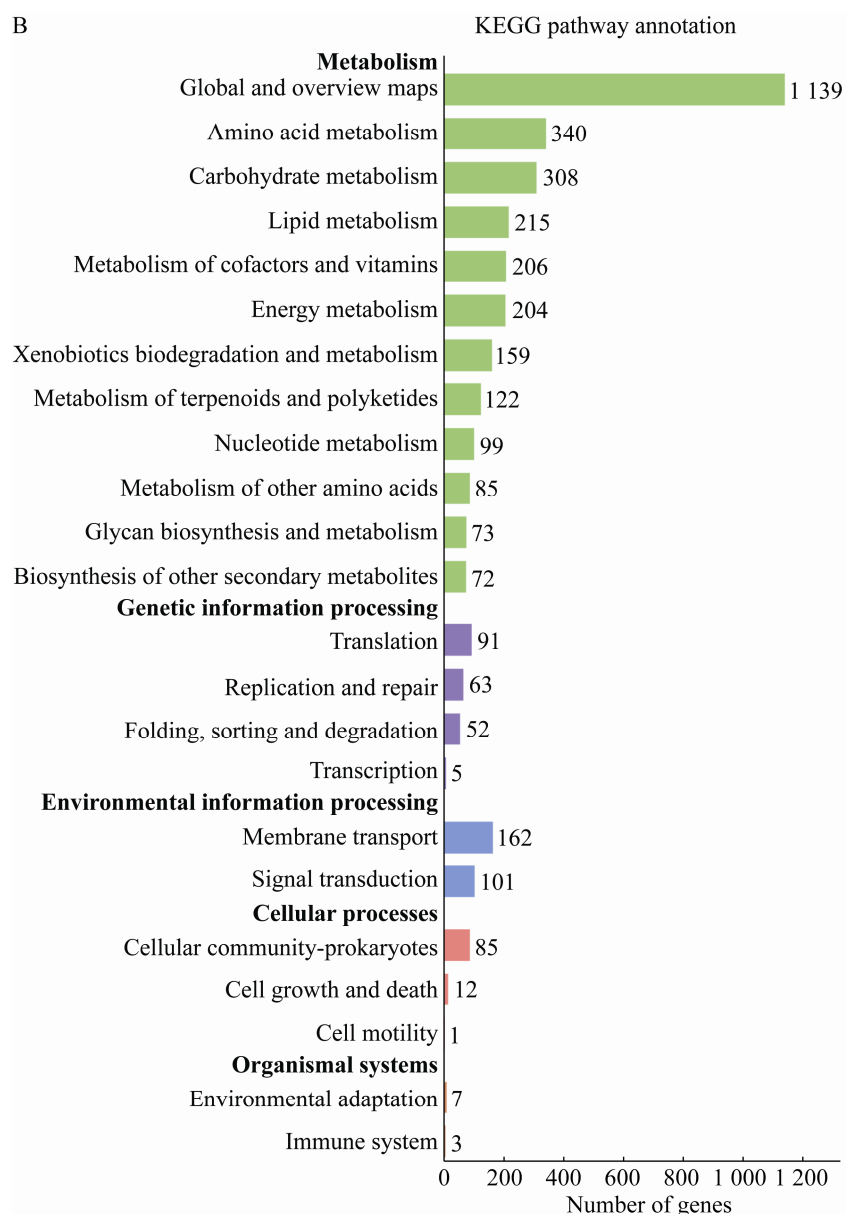


图4 鳢诺卡氏菌 NK201610020 的 COG (A)和 KEGG (B)功能注释

Figure 4 COG (A) and KEGG (B) function of classification of *Nocardia seriolae* NK201610020.

也得到较多的注释。此外, 271 个(5.16%)功能未知的基因有待今后进一步研究。

KEGG 是在分子水平上对基因、基因组及代谢通路进行标注的数据库。将鳢诺卡氏菌 NK201610020 基因组与 KEGG 数据库进行比对分析, 对应到 KEGG 通路的 5 610 个基因富集

在 152 条代谢通路中, 占菌株基因总数的 71.81%; 如图 4B 所示, 代谢通路相关基因总共可分为 23 个类型, 归为五大类, 即代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程和生物系统。KEGG 富集分析显示, 菌株参与新陈代谢途径最多, 其余则分布在环境信息处理。

2.4 比较基因组学分析

2.4.1 基因组进化树分析

通过比对试验菌与 8 株鱼源鳗诺卡氏菌全基因组序列构建进化树(图 5), 结果表明, 不同地区鳗诺卡氏菌一致性高达 99%。来自不同地区但分离自同一类鱼的菌株聚为一簇, 如来自不同地域的 3 株鳗源鳗诺卡氏菌聚为一簇, 4 株分离自不同地区的黄条鳗源鳗诺卡氏菌聚为一簇; 卵形鲳鲹源菌株 ZJ0503 同为海水鱼中的鲈形目鱼类, 也与黄条鳗源菌株聚为一类; 日本鳗源菌株 EM150506 则单独成为一簇。

基于全基因组序列构建的进化树结果中, 在全基因组圈图(图 6)也观察到以试验菌 NK201610020 作为参考菌, 与其近缘的鳗源鳗诺卡氏菌 CK-14008 和 HSY-NS01 相较于其他菌株基因组缺失更少。

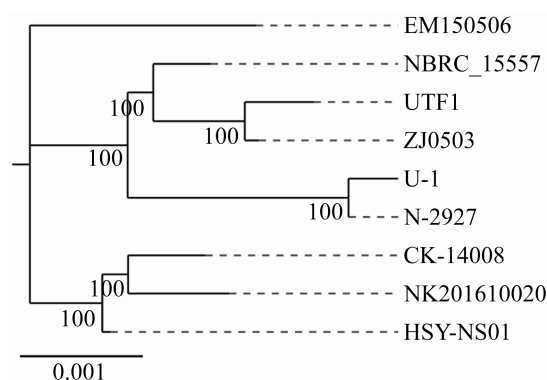


图 5 9 株鱼类鳗诺卡氏菌全基因组进化树

Figure 5 Genome-wide phylogenetic tree of nine *Nocardia seriolae* strains.

2.4.2 共线性分析

通过 MUMmer 比对进行基因组 scaffolds 的排序, 使用 BLASTn 对 4 株已经报道完全测序的鳗诺卡氏菌全基因组进行比对分析, 结果发现(图 7), 试验菌 NK201610020 分别与韩

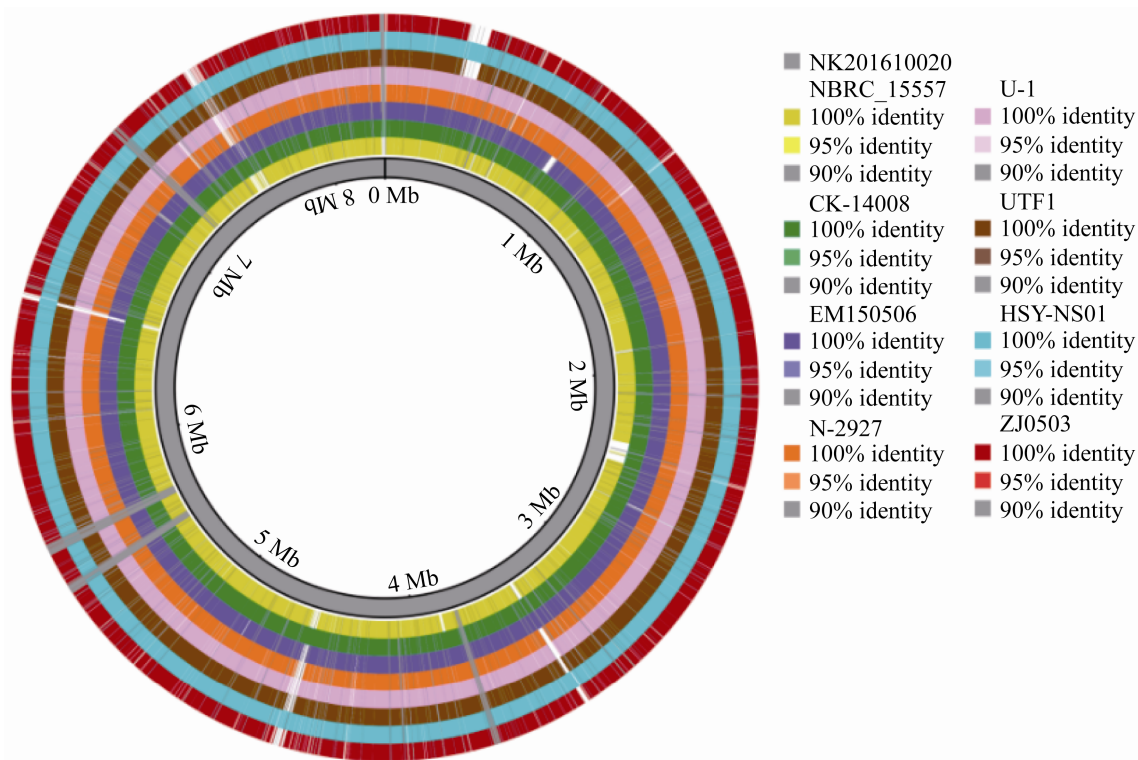


图 6 9 株鳗诺卡氏菌基因组圈图

Figure 6 Circular genome map of nine *Nocardia seriolae* strains.

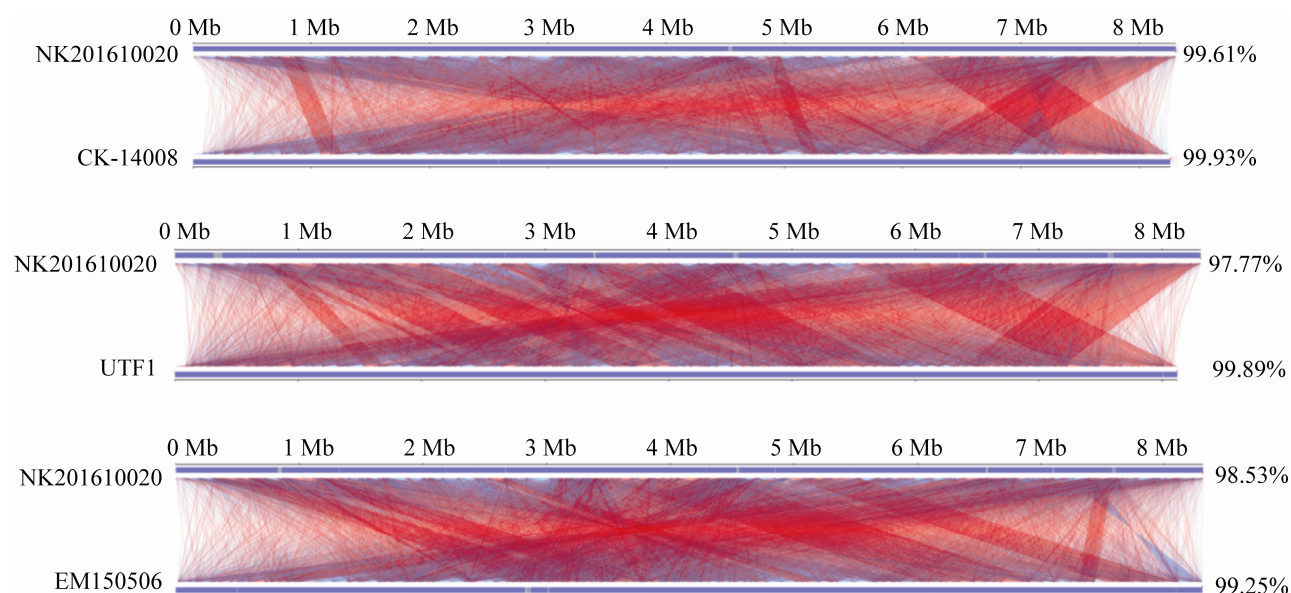


图 7 共线性分析结果

Figure 7 Collinear analysis results.

国鳢源分离菌 CK-14008 和日本鳢源分离菌 EM150506、日本黄条鳢分离菌 UTF1 在总体上都具有良好的共线性, 通过 BLAST 所得出来的同源序列所占目的菌株基因序列的比重均在 97% 以上, 但是基因排列的顺序具有较大的差异。与 3 株鳢诺卡氏菌相比, 两株鳢源鳢诺卡氏菌 NK201610020 和 CK-14008 的一致性最高。

2.5 毒力因子分析

通过与毒力基因数据库(virulence factor database, VFDB)进行比对, 预测试验菌 NK201610020 全基因组中有 171 个编码序列可能为毒力基因。根据毒力因子的功能分类, 可以将预测毒力基因分为与细胞壁合成相关因子、与营养代谢相关因子、与细菌持续感染相关因子三大类, 具体毒力基因信息见表 2。其中, 与细胞壁合成相关因子包括 *fbpA/B/C*、*KasA/B*、*cma*、*inhA*、*mbtA-H*、*mma* 等 6 类毒力基因。与营养代谢相关基因最多, 包括有哺

乳动物细胞侵入因子(mammalian cell entry, MCE)家族基因、*fad*、*ksh*、*plcA/B*、*gln*、*icl*、*glpX*、*erpA*、*idrR*、*fur*、*devR-devS* 等 11 类毒力基因, 这些基因都与鳢诺卡氏菌在宿主细胞内的持续存活相关。与氧化应激相关因子包含 *mmpL*、*HbhA*、*sigA/F/H*、*eis*、*ptpA/B*、*ndk*、*RelA*、*sodA/C/F*、*nirB/D*、*whiB3*、*ahpC/D*、*oxyR*、*phoP/R*、*katG* 共 14 类毒力基因, 这些基因都与鳢诺卡氏菌进行氧化和亚硝化应激反应有着密不可分的联系。

在试验菌 NK201610020 全基因组序列中, 发现了与 VFDB 数据库中结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的 MCE 家族数量和结构不完全相同的操纵子。鳢诺卡氏菌具有 8 个相同的完整 MCE 操纵子, 每个操纵子的结构基因都是呈线形排列, 具体结构如图 8 所示。每个完整的操纵子核苷酸长度在 7 741–8 963 bp 之间, 除 MCE3 由 9 个结构基因组成外, 其余 7 个操纵子均由 8 个结构基因组成。

表 2 鮭诺卡氏菌 NK201610020 预测毒力基因表

Table 2 Predicted virulence gene of *Nocardia seriolae* NK201610020

类别	基因	产物	功能	文献
Category	Genes	Products	Functions	References
细胞壁合成相关因子 Cell wall synthesis related factors	<i>kasA, kasB</i>	酮酰基-ACP 合酶 Ketoacyl-ACP synthase	参与细胞壁分枝菌酸生物合成 Mycolic acid subunits synthesis	[16]
	<i>cma</i>	环丙烷 α -分枝菌酸 Cyclopropane α -mycolic acid	参与细胞壁分枝菌酸生物合成 Mycolic acid subunits synthesis	[16]
	<i>inhA</i>	烯酰基还原酶 Enoyl reductase	参与细胞壁分枝菌酸生物合成 Mycolic acid subunits synthesis	[16]
	<i>mbtA-H</i>	分枝杆菌素生物合成粗簇 Mycobactin biosynthetic cluster	参与细胞壁分枝菌酸生物合成 Mycolic acid subunits synthesis	[17]
	<i>mma</i>	甲氧基分枝杆菌酸合酶 Methoxy mycolic acid	参与细胞壁分枝菌酸生物合成 Mycolic acid subunits synthesis	[17]
	<i>fbpA, fbpB, fbpC</i>	Ag85 蛋白 The antigen 85 proteins	具有分枝菌酸转移酶活性 Mycolic acid transferase activity	[13]
	<i>mce</i>	MCE 家族蛋白 MCE family Protein	入侵宿主细胞, 参与胆固醇代谢 Invasion, cholesterol metabolism	[13]
	<i>fad</i>	脂肪酸去饱和酶 Fatty acid desaturase	参与胆固醇代谢 Cholesterol metabolism	[16]
	<i>ksh</i>	3-甾酮-9 α -羟基化酶 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase	参与胆固醇代谢 Cholesterol metabolism	[17]
	<i>plcA, plcB</i>	磷脂酶 C Phospholipase C	水解宿主细胞膜上的磷脂 Hydrolysis of host cell membrane phospholipids	[16]
营养代谢相关因子 Nutritional metabolic-related factors	<i>gln</i>	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase	抑制吞噬体酸化作用 Inhibiting phagosome acidification	[16]
	<i>icl</i>	异柠檬酸裂解酶 Isocitrate lyase	参与乙醛酸循环 Glyoxylate cycle	[18]
	<i>glpX</i>	果糖 1,6-二磷酸酶 Fructose 1,6-bisphosphatase	参与糖异生作用 Gluconeogenesis	[19]
	<i>erpA</i>	铁硫聚类插入蛋白 Iron-sulfur cluster insertion protein	硫铁簇组装、呼吸代谢 Iron-sulfur cluster assembly, respiratory metabolism	[20]
	<i>ideR</i>	铁依赖调节蛋白 Iron-dependent repressor protein	调节吸收铁、铁载体合成 Iron uptake/regulation, siderophore synthesis	[16]
	<i>fur</i>	铁吸收调控因子 Ferric uptake regulator	调节 <i>ideR</i> 基因 <i>ideR</i> gene regulation	[16]
	<i>devR-devS</i>	DNA 结合转录激活子 DNA-binding transcriptional activator	缺氧条件下自行激活转录 Activates its own transcription under hypoxic	[16]
	<i>mmpl</i>	膜蛋白家族 Membrane protein large	参与细胞内的物质运输和药物外排 Involved in the transport of substances within cells and drug excretion	[16]
	<i>HbhA</i>	肝素结合血凝素 Heparin-binding hemagglutinin	参与质内脂质包裹体的形成, 调节细胞粘性 Formation of intracytosolic lipid inclusions, mediating adherence to epithelial cells	[21]
	<i>sigA, sigF, sigH</i>	σ 因子 Sigma factors	与细菌持续感染相关 Persistent bacteria infection	[16]

(待续)

(续表 2)

<i>eis</i>	N-乙酰转移酶 N-acetyltransferase	增强细菌在巨噬细胞内的存活能力 Enhances the survival of bacteria in macrophages	[18]
<i>ptpA, ptpB</i>	低分子量磷酸酶家族蛋白 Low molecular weight phosphatase family protein	宿主巨噬细胞内存活 Survival within host macrophages	[13]
<i>ndk</i>	核酸二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase	加强 ATP 诱导细胞死亡的能力 Strengthens the ability of ATP to induce cell death	[13]
<i>RelA</i>	双功能(p)ppGpp 合成/水解酶 Bifunctional (p)ppGpp synthase/hydrolase	参与细菌在生存压力下引起的严谨反应 Involve in the bacterium's strict response to survival pressure	[13]
<i>sodA, sodC, sodF</i>	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	抵抗巨噬细胞杀伤 Resistance to macrophage killing	[18]
<i>nirB, nirD</i>	亚硝酸盐还原酶 Nitrite reductase	催化亚硝酸盐还原 Catalyzing the reduction of nitrite	[13]
<i>whiB3</i>	铁硫簇蛋白 Iron-sulfur cluster protein	调节氧化还原和毒力 Regulating redox homeostasis and virulence	[22]
<i>ahpC, ahpD</i>	烷基过氧化物还原酶 Alkyl hydroperoxide reductase	抗氧化保护, 宿主巨噬细胞内存活 Antioxidant protection, survival within host macrophages	[16]
<i>oxyR</i>	酮酰-ACP 合成酶 III 家族蛋白 Ketoacyl-ACP synthase III family protein	增强 <i>ahpC</i> 基因 Tightly regulates <i>ahpC</i> gene	[16]
<i>phoP</i>	转录调节蛋白 Transcriptional regulatory protein	调控相关毒力蛋白的表达 Regulation of virulence gene expression	[13]
<i>katG</i>	过氧化氢酶 Catalase peroxidase	长链脂肪酸的抑制和灭活 Long chain fatty acid inhibition, inactivates	[13]

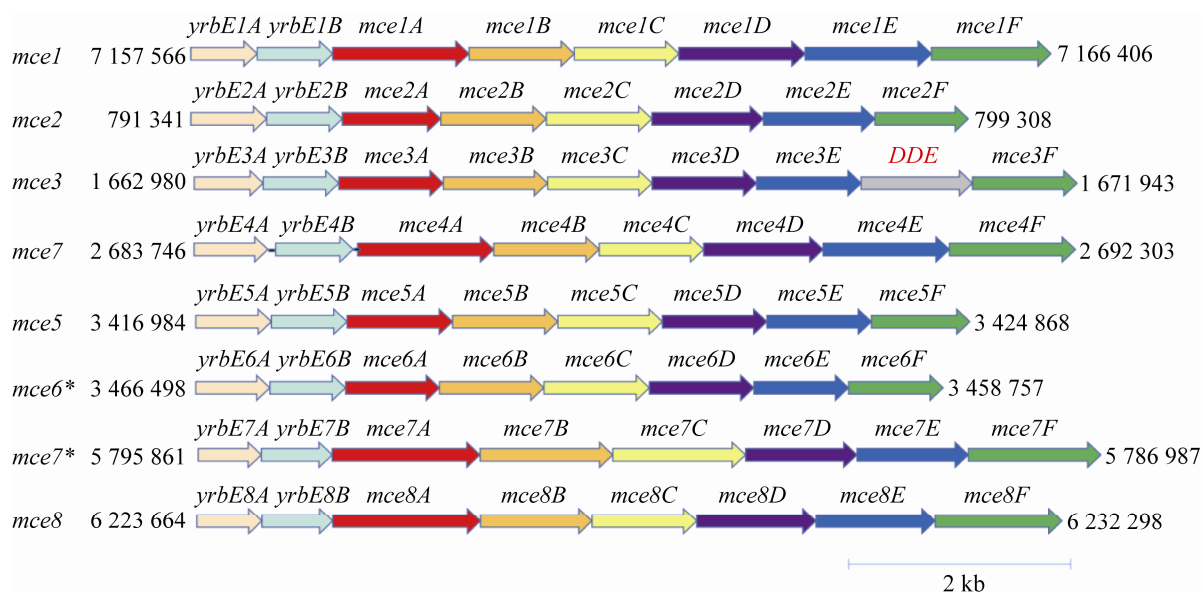


图 8 鳢诺卡氏菌 NK201610020 基因组中 8 个 MCE 操纵子结构图 星号(mce6*和 mce7*)表示序列反向排列
Figure 8 The organization of 8 MCE operons in *Nocardia seriolae* NK201610020 genome. Asterisks (mce6* and mce7*) indicate reverse complement orientation.

在 MCE3 操纵子中, 结构基因 *mce3E* 和 *mce3F* 之间有一个额外的基因, 为编码核酸内切酶的基因 *DDE*。在 8 个操纵子中, MCE6、MCE7 和 MCE8 这 3 个操纵子的基因排列顺序是反向排列的。此外, 还发现有 *mce1R*、*mce2R* 等结构基因游离于操纵子之外。

3 讨论与结论

3.1 鳙诺卡氏菌的致病性与组织病理学分析

近年来, 鳙诺卡氏菌病在乌鳢、大口黑鲈等鱼类中频繁暴发, 对水产养殖产业造成了巨大的损失。鳙诺卡氏菌感染率和死亡率较高, 自然发病率为 20%–60%, 死亡率可高达 100%^[23]。鳙诺卡氏菌病病程较长, 自然发病鱼的体表皮和肌肉出现溃烂, 鳃、肌肉、肝、脾、肾、肠等组织器官均可发现白色结节, 结节边缘界限清晰, 比正常组织更坚硬。在本实验中, 用临床分离的杂交鳊源鳙诺卡氏菌 NK201610020 对实验鱼杂交鳊进行人工感染, 在感染鱼体的脾和肾等器官有大量的白色结节, 与之前报道的症状相一致^[24], 但是在感染鱼体的鳃丝与肌肉未发现明显结节, 可能与自然感染途径不同有关。为进一步了解鳙诺卡氏菌对杂交鳊的毒力, 本研究设置了 6 个浓度的菌液 (1.5×10^3 、 1.5×10^4 、 1.5×10^5 、 1.5×10^6 、 1.5×10^7 和 1.5×10^8 CFU/mL) 对杂交鳊进行人工感染, 结果显示高浓度组比低浓度组提前 3–4 d 出现死亡, 高浓度组死亡率为 100%, 低浓度组感染死亡率仍高达 90%, 发病症状均无明显差异。细菌的致病性与毒力因子、侵入机体的数量、侵入途径及机体的免疫状态等密切相关^[25]。病原菌侵入宿主机体后能否引起感染, 除取决于毒力因子外, 还与其是否有足够的细菌数量密切相关。一般来说, 细菌毒力越强, 引起感染所需要的细菌数量就越少, 反之则需要的细菌数

量较大。本研究中, 1.5×10^4 CFU/mL 感染组的实验鱼致死率也高达 90%, 而 1.5×10^3 CFU/mL 感染组的实验鱼则 14 d 内未出现死亡, 通过 Reed-Muench 法计算 LD_{50} 为 1.079×10^3 CFU/mL, 比王文基等^[26]报道的卵形鲳鲷分离菌 ZJ0503 的 LD_{50} 要低, 说明本实验中鳊源鳙诺卡氏菌的毒力更强。

研究发现, 鱼类被鳙诺卡氏菌感染后内脏组织会出现纤维化并形成白色结节, 鱼体会出现亚急性炎症, 当鳙诺卡氏菌侵入到机体内部后, 随着血液循环扩散到达各个靶器官, 然后在相应的器官组织增殖, 局部的巨噬细胞会将其吞噬, 并将刺激呈递给淋巴细胞, 巨噬细胞与活化的 T 淋巴细胞释放大量的细胞因子、趋化因子及黏附因子, 促使巨噬细胞、血液中的单核巨噬细胞和淋巴细胞聚集到感染部位; 与此同时, 巨噬细胞可分化为上皮样细胞和多核巨噬细胞一起参与肉芽肿的形成^[27-28]。本实验通过 NK201610020 感染杂交鳊后, 剖取发病鱼体的心、肝、脾和肾进行临床观察, 发现这些组织表面均有界限分明、质地较硬的白色结节; 经过组织病理学观察, 其肝、脾和肾上均出现了多处坏死灶, 是界限清楚的肉芽肿结构, 由坏死的组织碎片及中央被包围的细菌组成, 外周还有上皮样细胞聚集, 与常藕琴等^[29]报道的自然发病乌鳊的病理结果一致。然而本实验鱼的心脏感染前后组织病理方面未发生明显变化。结果推测鳙诺卡氏菌感染杂交鳊后, 肝、肾、脾等组织产生病变, 影响了宿主的正常生长代谢与免疫活动, 进而出现死亡。

3.2 基于全基因组的鳙诺卡氏菌同源性分析

本研究采用了二代和三代相结合的测序技术获得鳙诺卡氏菌 NK201610020 的全基因组序列。在数据库现有的鳙诺卡氏菌基因组测序基础信息水平上, 鳙诺卡氏菌测序的全基因组大

小都相对较大(7.6–8.5 Mb)且 GC 含量较高(约 68%)。本研究的鳢诺卡氏菌 NK201610020 基因组由一条环状染色体组成, 大小为 8 294 329 bp, 基因组整体的 GC 含量为 68.10%, 与数据库中其他不同地区不同宿主分离的鳢诺卡氏菌菌株基因信息的特点基本一致。

在基因功能方面, 通过 COG 库注释得到 5 253 个基因, 这些基因分别不同程度地参与了细菌的合成和代谢过程, 如翻译、核糖体结构生成、细胞壁细胞膜的合成、能量转化产生、转录、碳水化合物及氨基酸的运输等。有相关研究^[6]也表明, 在诺卡氏菌中, 每个类别基因的相对丰度大致相似, “转录”和“氨基酸转运和代谢”类别相关的基因最丰富。然而在鳢诺卡氏菌中, 涉及复制、重组和修复的基因在基因组中所占的比例相较于其他诺卡氏菌更高一些, 该类别中的许多基因均涉及具有高度可重复序列的可移动元件, 例如转座酶和噬菌体, 这些功能与菌株 NK201610020 的感染机制关联性很大。通过比对 KEGG 库, 代谢通路富集显著的有氨基酸、膜运转、能量、碳水化合物等, 这些重要的功能或富集通路与胞内运输、毒力、基因表达的调控等都有不可或缺的关系。在基因功能水平上, 不同来源的鳢诺卡氏菌无明显差别。

通过在 NCBI 数据库中挑选出的 8 株从患病鱼类上分离的鳢诺卡氏菌进行进化树分析, 通过基因组计算, 一致性超过 99.9%, 构建出的进化树将 9 株鳢诺卡氏菌主要分了 3 簇, 3 株分别来源于韩国和中国的乌鳢源菌株聚为一簇, 3 株分别来源于韩国和日本的黄条鳢源菌株也聚为一簇, 表明同种宿主来源的鳢诺卡氏菌的基因序列高度相似, 在进化上与地理差异无明显关系。另外, 本研究发现除了鳢源鳢诺卡氏菌 EM150506 单独成簇外, 其他分别

来自淡水鱼和海水鱼的菌株各自聚为一簇, 表明来自淡水鱼和海水鱼的菌株其基因组的组成存在一定差异, 与 Kim 等^[30]的研究结果一致。共线性比较分析结果也显示, 尽管菌株分离的来源不同, 但是鳢诺卡氏菌基因组的一致性很高, 并且不同地区相同宿主分离鳢诺卡氏菌的一致性更高。罗愿等^[31]也对不同时间、不同地区、不同宿主分离的鳢诺卡氏菌通过生理生化特性、致病性、基因型等进行比对分析发现, 这几株临床分离菌基因型相同、毒力相同, 提示在华南地区鲈形目淡水鱼分离的鳢诺卡氏菌均为同一流行株。综上表明, 鳢诺卡氏菌在进化水平上基因组序列极为保守, 宿主适应性存在一定差异, 但其生理功能、营养代谢及毒力等差异不大。基因组学研究更好地掌握了鳢诺卡氏菌的遗传信息, 为进一步针对鳢诺卡氏菌病的疫苗研发奠定基础。

3.3 鳢诺卡氏菌的毒力基因分析

鳢诺卡氏菌的细胞壁组成成分种类很多, 主要包括肽聚糖、阿拉伯甘露聚糖和脂质等, 是保护细菌的一道天然屏障。与结核分枝杆菌类似, 在鳢诺卡氏菌的细胞壁中也有分枝菌酸的存在, 是构成细胞壁的主要成分, 与抗酸性有关^[32]。分枝菌酸主要由 α -分枝菌酸、酮-分枝菌酸和甲氧基分枝菌酸 3 种结构组成, 在试验菌 NK201610020 中发现与分枝菌酸合成相关的 *kasA*、*kasB* 和 *inhA* 等基因, 与 FAS-II 系统所需各种功能的合成酶、还原酶和异构酶的合成有关, 主要负责由 FAS-I 系统到 FAS-II 系统的转换^[32]。在菌株 NK201610020 序列中也发现 *fbpA*、*fbpB* 和 *fbpC* 等基因, 其所编码的抗原 85 复合物(Ag85)具有分枝菌酸转移酶的活性, 与细胞壁阿拉伯半乳聚糖的合成和索状因子的生物起源有关, 影响毒力因子的形成, 并在发病机理中起着至关重要的作用^[13]。

鳕诺卡氏菌与人源诺卡氏菌都属于细胞内病原体,可以侵入包括巨噬细胞在内的宿主细胞,并能够在宿主细胞内存活下来。鳕诺卡氏菌这一特性使其在水产养殖业的实际生产中难以防控。致病诺卡氏菌的主要毒力特征表现为侵入包括巨噬细胞在内的宿主细胞^[33-34]。MCE 家族最早在结核分枝杆菌中发现,在结核分枝杆菌中具有 4 个操纵子,每个操纵子由 6 个结构基因组成,在功能上主要是与分枝杆菌入侵宿主细胞和在宿主细胞内存活有关^[35]。为了附着并侵入宿主细胞,诺卡氏菌中的 MCE 家族也发挥了重要作用。有研究表明,MCE 操纵子数量越多,可侵染的宿主种类越多^[36]。在试验菌 NK201610020 中发现了 8 个完整的 MCE 操纵子,与日本 UTF1 菌株中 MCE 家族的结构相似,但是在编码 MCE3 操纵子基因中,UTF1 的 *mce3E* 和 *mce3F* 中间多了一个额外的基因 *orf3406*^[13]。此外,本试验菌 NK201610020 在 MCE 家族基因中还存在游离于操纵子之外的 *mce1R* 和 *mce2R* 等结构基因,可能起到负调控的作用^[37]。有研究表明,MCE 家族中 Mce1A 蛋白已被证实了具有促进侵入细胞的功能,Mce4A 蛋白具有增强病原菌摄取碳源供给自身代谢的能力,还有助于增强在宿主细胞内的生存能力,能够影响宿主巨噬细胞 *IL-1B*、*iNOS* 和 *TNF- α* 基因 mRNA 的表达^[38]。鳕诺卡氏菌的 MCE 家族是否具有与结核分枝杆菌同样的功能,有待进一步研究。

鳕诺卡氏菌在生长过程中需要各类的营养物质与辅助因子,如碳源、氮源的生物合成与分解,以及一些金属元素的摄取,这些生物过程都需要很多酶的参与,编码酶的基因有所改变就会影响鳕诺卡氏菌的毒力,这对细菌生长过程中获得营养物质具有重要作用。在菌株 NK201610020 全基因组中,发现有编码异柠檬

酸裂解酶(isocitrate lyase, ICL)的基因,其主要作用是在乙醛酸代谢的过程中将异柠檬酸转为琥珀酸,为柠檬酸代谢提供碳源^[17]。有研究发现^[39],将 *icl* 基因敲除后,用突变株感染小鼠,感染一段时间后细菌就会失去感染的能力,将 *icl* 基因重新插入突变株后就恢复了和野毒株表型一样的感染能力,这说明 *icl* 对于病原菌在宿主细胞内的持留能力具有非常重要的作用。在菌株 NK201610020 全基因组中,也发现有编码磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)基因的存在。磷脂酶 C 主要由 *plcA*、*plcB*、*plcC* 和 *plcD* 这 4 个基因编码而成,其主要功能是可以分解鞘磷脂和卵磷脂,对病原菌侵入宿主也起到一定的帮助作用。有研究表明,病原菌如沙门氏菌 (*Salmonella*) 及致病性大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 等黏附宿主细胞后,可激活胞内磷脂酶 C 信号分子,促使胞内 Ca^{2+} 浓度增加,触发微丝肌动蛋白(F-actin)细胞骨架重排,最终导致细菌内化入细胞^[40],这可能与鳕诺卡氏菌对宿主的入侵与后期持续存活有密切联系。巨噬细胞在被激活时会启动一系列的抗菌机制以对被吞噬的病原体进行杀灭。吞噬体是巨噬细胞对病原性微生物的细胞内杀伤和消化是必不可少的。核苷二磷酸激酶(nucleotide diphosphokinase, Ndk)和蛋白酪氨酸磷酸酶 A (protein tyrosine phosphatase A, PtpA)可阻止巨噬细胞吞噬体成熟,从而使病原菌在吞噬细胞内能够生存下来并且长期存在^[13]。夏立群等^[41]通过对鳕鱼诺卡氏菌 *ptp* 基因克隆和功能初步研究,发现 *ptp* 基因可能与诱导细胞凋亡相关。由于铁在巨噬细胞内的浓度非常低且处于不溶状态,因此需要有效的铁捕获系统才能使病原菌得以生存,这可能有助于鳕诺卡氏菌在宿主巨噬细胞内存活。

在宿主的细胞内尤其是在巨噬细胞中,入

侵的病原体必须有能够抵御宿主细胞发挥保护作用而产生的活性氧^[39]。诺卡氏菌对宿主细胞的这种氧化性攻击会产生抗氧化蛋白,例如过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。在现有的已经分析的基因组中都检测到了编码过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的基因。病原菌能够依靠自身所携带的毒力因子来打破宿主的防御机制并成功入侵到宿主内,从而在宿主中生长、增殖与扩散。相关研究表明,诺卡氏菌能够借助过氧化氢酶和超氧化物歧化酶来破坏吞噬细胞的氧化杀伤机制,从而达到入侵和定殖并逃避寄主杀灭的目的^[42]。在菌株 NK201610020 全基因组中,发现有 *sod*、*kat* 和 *ahpC* 等基因的存在,这可能有助于鳢诺卡氏菌在接收刺激信号的巨噬细胞内的低氧条件下存活^[13]。有研究报道^[43],巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*) HUJEG-1 通过 BHI 培养基传代 200 次后获得的菌株基因组发生了缺失,缺失的基因包括编码超氧化物歧化酶基因、硝酸盐还原酶基因及部分 MCE 家族基因,经过实验验证表明该菌株毒力有所减弱,推测这些基因的缺失可能与其毒力的减弱有密切关系。除了过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和硝酸盐还原酶以外,烷基氢过氧化物酶基因 *ahpC* 和 *ahpD* 也具有很重要的作用。在过氧化氢酶基因 *katG* 的表达活性降低时,病原菌为了在感染期间存活,*ahpC* 和 *ahpD* 基因在抗氧化方面提供重要的氧化保护作用。在病原菌的 *ahpC/ahpD* 抗氧化防御系统中,*oxyR* 基因有增强体系抗氧化功能的作用^[13]。

综上所述,本研究临床分离的鳢源鳢诺卡氏菌毒力强,基因组序列保守,通过全基因组测序和比较基因组分析初步掌握了鳢源鳢诺卡氏菌源 NK201610020 的基因组的整体分布、基因组成、蛋白功能和毒力因子信息等,该基因组

携带多种与细胞壁合成、营养代谢及细菌持续感染等相关的毒力因子。本研究结果为进一步在分子水平上开展鳢诺卡氏菌的致病机理研究提供了数据支撑。

REFERENCES

- [1] 张建丽, 刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 513-517
Zhang JL, Liu ZH. Taxonomy of the nocardioform actinomycetes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(4): 513-517 (in Chinese)
- [2] Shimahara Y, Huang YF, Tsai MA, Wang PC, Yoshida T, Lee JL, Chen SC. Genotypic and phenotypic analysis of fish pathogen, *Nocardia seriolae*, isolated in Taiwan[J]. Aquaculture, 2009, 294(3/4): 165-171
- [3] Wang GL, Yuan SP, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson)[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(6): 339-345
- [4] 王国良, 徐益军, 金珊, 祝璟琳, 朱文渊. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283
Wang GL, Xu YJ, Jin S, Zhu JL, Zhu WY. Research on the nocardiosis and pathogen in reared snakehead, ophioccephalus *Argus cantor*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 277-283 (in Chinese)
- [5] Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M. Estimation of the time for *Nocardia seriolae* infection of cultured yellowtail[J]. Fish Pathology, 2008, 43(2): 86-88
- [6] Han HJ, Kwak MJ, Ha SM, Yang SJ, Kim JD, Cho KH, Kim TW, Cho MY, Kim BY, Jung SH, et al. Genomic characterization of *Nocardia seriolae* strains isolated from diseased fish[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(3): e00656
- [7] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 鲁义善, 余坦健. 卵形鲳鲹结节病原的分离与鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 49-53
Huang YC, Jian JC, Wu ZH, Lu YS, Yu TJ. Isolation and identification of the pathogen causing sarcoidosis of *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(4): 49-53 (in Chinese)
- [8] 2021 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社. 2021: 30-33
China Fishery Statistical Yearbook[M]. Bei Jing: China Agriculture Press. 2021: 30-33
- [9] Isik K, Chun J, Hah YC, Goodfellow M. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(Pt 2):

- 833-837
- [10] Bransden MP, Carson J, Munday BL, Handler JH, Carter CG, Nowak BF. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(1): 83-85
- [11] 满其蒙. 鲰鱼诺卡氏菌致病机制的研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2013
- Man QM. Studies on pathogenic mechanism of *Nocardia seriolae*[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese)
- [12] Strauss EJ, Falkow S. Microbial pathogenesis: genomics and beyond[J]. Science, 1997, 276(5313): 707-712
- [13] Yasuike M, Nishiki I, Iwasaki Y, Nakamura Y, Fujiwara A, Shimahara Y, Kamaishi T, Yoshida T, Nagai S, Kobayashi T, et al. Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: the first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173198
- [14] Xia LQ, Cai J, Wang B, Huang YC, Jian JC, Lu YS. Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* ZJ0503, a fish pathogen isolated from *Trachinotus ovatus* in China[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01223-e01214
- [15] 曹阅, 陈立志, 刘晓颖, 冯二凯, 汪孙杰, 徐晶, 冯卓. 坏死梭杆菌斑马鱼模型建立与 LD₅₀ 的测定[J]. 特产研究, 2012, 34(1): 14-18
- Cao Y, Chen LZ, Liu XY, Feng EK, Wang SJ, Xu J, Feng Z. Establishment of zebrafish model with *Fusobacterium necrophorum* biotype AB and determination of LD₅₀[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2012, 34(1): 14-18 (in Chinese)
- [16] Sundararajan S, Muniyan R. Latent tuberculosis: interaction of virulence factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(8): 6181-6196
- [17] Quadri LE, Sello J, Keating TA, Weinreb PH, Walsh CT. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(11): 631-645
- [18] 王旻, 肖春玲. 以异柠檬酸裂解酶为靶点筛选抗滞留结核分枝杆菌药物[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(7): 391-395
- Wang Y, Xiao CL. Isocitrate lyase, a new target in anti-tuberculosis drug research[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2007, 32(7): 391-395 (in Chinese)
- [19] Ganapathy U, Marrero J, Calhoun S, Eoh H, de Carvalho LPS, Rhee K, Ehrh S. Two enzymes with redundant fructose bisphosphatase activity sustain gluconeogenesis and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Communications, 2015, 6: 7912
- [20] TA Weinreb PH, Walsh CT. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(11): 631-645,
- [21] Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Loch C. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1996, 184(3): 993-1001
- [22] Saini V, Farhana A, Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: a novel iron-sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 16(7): 687-697
- [23] 蒋依依, 李言伟, 周素明, 李安兴. 加州鲈诺卡菌病原的分离与鉴定[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(1): 76-81
- Jiang YY, Li YW, Zhou SM, Li AX. Isolation and identification of *Nocardia*, a pathogen of nocardiosis in largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2012, 51(1): 76-81 (in Chinese)
- [24] 王二龙, 汪开毓, 陈德芳, 王均, 贺扬, 刘韬. 养殖乌鳢内脏结节病的病原分离、鉴定与药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5): 90-98
- Wang EL, Wang KY, Chen DF, Wang J, He Y, Liu T. Isolation, identification and drug sensitivity test of causative pathogen of farmed snakehead (*Channa argus*) with visceral sarcoidosis[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(5): 90-98 (in Chinese)
- [25] 郭伟, 张杰, 李颖. 细菌的致病性[J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(4): 8-9, 11
- Guo W, Zhang J, Li Y. Pathogenicity of bacteria[J]. China Healthcare Innovation, 2008, 3(4): 8-9, 11 (in Chinese)
- [26] 王文基, 陈建林, 侯素莹, 鲁义善, 夏立群. 鲰鱼诺卡氏菌感染乌斑杂交鳢的组织病理学研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4439-4446
- Wang WJ, Chen JL, Hou SY, Lu YS, Xia LQ. A histopathological study of *Nocardia seriolae* infection in hybrid snakehead[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(10): 4439-4446 (in Chinese)
- [27] 满其蒙, 徐力文, 区又君, 苏友禄, 郭志勋, 冯娟. 鲰鱼诺卡氏菌感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(21): 132-135

- Man QM, Xu LW, Ou YJ, Su YL, Guo ZX, Feng J. Histopathological study on golden pompano *Trachinotus ovatus* infected with *Nocardia seriolae*[J]. Guangdong Agricultural Sciences. 2012, 39(21): 132-135 (in Chinese)
- [28] 田蔚蔚, 王洪生, 王千秋. 分枝杆菌肉芽肿形成的细胞及分子机制研究进展[J]. 国际皮肤性病学杂志, 2012, 38(1): 55-58
- Tian WW, Wang HS, Wang QQ. Cellular and molecular mechanisms underlying the formation of mycobacterial granuloma: an update[J]. International Journal of Dermatology and Venereology, 2012, 38(1): 55-58 (in Chinese)
- [29] 常藕琴, 石存斌, 潘厚军, 付小哲, 吴淑勤. 鳢诺卡氏菌病的组织病理学[J]. 水产学报, 2008(2): 209-216
- Chang OQ, Shi CB, Pan HJ, Fu XZ, Wu SQ. Histopathological study on nocardiosis of *Ophicephalus argus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008(2): 209-216 (in Chinese)
- [30] Kim BS, Do Huh M, Roh HJ. The complete genome of *Nocardia seriolae* MH196537 and intra-species level as analyzed by comparative genomics based on random forest algorithm[J]. Current microbiology, 2021, 78(6): 2391-2399
- [31] 罗愿, 邓玉婷, 赵飞, 谭爱萍, 张美超, 姜兰. 9 株鳢源鳢诺卡氏菌生物学特征和致病性比较[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2733-2749
- Luo Y, Deng YT, Zhao F, Tan AP, Zhang MC, Jiang L. Comparative on characteristics and pathogenicity of *Nocardia seriolae* isoalted from 9 fishes[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2733-2749 (in Chinese)
- [32] 孙丕, 梅建. 结核分枝杆菌中的分枝菌酸[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(7): 397-402
- Sun P, Mei J. Study on mycolic acid in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2010, 32(7): 397-402 (in Chinese)
- [33] Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Emerging Infectious Diseases, 1992, 56(4): 648-661
- [34] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis[J]. Science, 1997, 276(5317): 1420-1422
- [35] Itano T, Nakaoka N, Kawakami H, Kono T, Sakai M. Comparison of sensitivity between Yellowtail *Seriola quinqueradiata* and Red Sea Bream *Pagrus major* to *Nocardia seriolae*[J]. Fish Pathology, 2006, 41(4): 135-139
- [36] Hemati Z, Derakhshandeh A, Haghkah M, Chaubey KK, Gupta S, Singh M, Singh SV, Dhama K. Mammalian cell entry operons; novel and major subset candidates for diagnostics with special reference to *Mycobacterium avium* sub species paratuberculosis infection[J]. Veterinary Quarterly, 2019, 39(1): 65-75
- [37] Casali N, White AM, Riley LW. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis mce1* operon[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(2): 441-449
- [38] 徐广贤. 牛结核分枝杆菌 Mce4A 和 Mce4E 蛋白与牛肺泡巨噬细胞相互作用的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2007
- Xu GX. Research on interaction of *Mycobacterium Bovis* proteins Mce4A and Mce4E with bovine alveolar macrophage[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [39] Shukla H, Kumar V, Singh AK, Rastogi S, Khan SR, Siddiqi MI, Krishnan MY, Akhtar MS. Isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* is inhibited by quercetin through binding at N-terminus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 78: 137-141
- [40] 徐水凌, 徐妍, 黄佳, 范宏彦, 金梦媚. 磷脂酶 C 分子在结核分枝杆菌触发树突状细胞细胞骨架重排中的作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42(2): 184-191
- Xu SL, Xu Y, Huang J, Fan HY, Jin MM. Role of phospholipase C in cytoskeleton rearrangements of dendritic cells invaded by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2013, 42(2): 184-191 (in Chinese)
- [41] 夏立群, 童邦卓, 徐亮, 苏泽杰, 陈锐敏, 廖保山, 鲁义善. 一种鳢鱼诺卡氏菌酪氨酸蛋白磷酸酶基因的克隆及功能初步研究[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1017-1027
- Xia LQ, Tong BZ, Xu L, Su ZJ, Chen RM, Liao BS, Lu YS. Gene cloning and preliminary function study of protein tyrosine phosphatase from *Nocardia seriolae*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(7): 1017-1027 (in Chinese)
- [42] Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(10): 820-832
- [43] Gonzalez-Carrillo C, Millan-Sauceda C, Lozano-Garza HG, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Welsh O, Ocampo-Candiani J, Vera-Cabrera L. Genomic changes associated with the loss of *Nocardia brasiliensis* virulence in mice after 200 *in vitro* passages[J]. Infection and Immunity, 2016, 84(9): 2595-2606