

文章编号: 1674-5566(2023)03-0481-10

DOI:10.12024/jsou.20220303784

鳃弧菌 *vah1* 缺失菌株构建及致病性评估

胡存洁^{1,2}, 车金远^{1,2}, 黄旭雄^{1,2}, 罗土炎³, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 通过基因重组技术, 敲除鳃弧菌毒力基因 *vah1*, 成功构建 *vah1* 缺失鳃弧菌菌株 $\Delta vah1$ 。 $\Delta vah1$ 菌株溶血活性下降 89.4%, 生物膜形成能力下降 16%。 $\Delta vah1$ 菌株感染凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的半数致死量为 $(9.77 \pm 0.50) \times 10^5$ cfu/mL, 相比鳃弧菌野生菌株的半数致死量 $(3.16 \pm 0.80) \times 10^5$ cfu/mL 提高了 2.09 倍; 相比鳃弧菌野生菌株, $\Delta vah1$ 菌株在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肝胰腺的定殖能力明显下降, 对肝胰腺细胞造成溶解和空泡化的破坏程度也相对较小, 肝胰腺免疫相关基因 *CAT*、*SOD*、*PO*、*LZM* 和 *ACP* 的表达水平降低。这些研究结果表明, *vah1* 缺失影响鳃弧菌对凡纳滨对虾的致病能力, $\Delta vah1$ 菌株为后续鳃弧菌减毒疫苗或抗鳃弧菌免疫增强剂的制备奠定了基础。

关键词: 鳃弧菌; *vah1* 基因; 致病性; 凡纳滨对虾; 减毒菌株

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是海洋、河口常见的革兰氏阴性菌^[1], 也是水产养殖动物常见的病原菌, 鳃弧菌可感染花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[2]、虹鳟 (*Oncorhynchus mikiss*)^[3]、日本鳃鲷 (*Anguilla japonica*)^[4]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[5]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[6]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[7] 等多种养殖鱼类, 导致宿主出血性败血症。鳃弧菌也是凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[8]、中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[9] 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[10] 等多种养殖对虾的病原, 导致对虾急性肝胰腺坏死。目前防治弧菌病主要依赖抗生素, 但抗生素的使用会使弧菌出现耐药性, 也会造成水产品的食用安全^[11]。

鳃弧菌疫苗或针对鳃弧菌的免疫增强剂的研究, 有望能有效预防和减少水产动物鳃弧菌疾病的发生^[12]。通过破坏毒力因子, 构建安全性较高的鳃弧菌减毒菌株是研发鳃弧菌疫苗或针对鳃弧菌的免疫增强剂的基础。溶血素是鳃弧菌的主要毒力因子, 会破坏红细胞的细胞膜, 导致

血红蛋白被释放出来, 造成宿主的溶血现象^[13-16]。 *vah1* 是鳃弧菌 1 个重要的溶血素基因^[17-19], 通过敲除鳃弧菌中 *vah1* 基因, 有望降低鳃弧菌的致病性, 为鳃弧菌减毒疫苗或针对鳃弧菌的特异免疫增强剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、大肠杆菌 CC118 (*Escherichia coli* CC118)、pSR47s 自杀质粒和 pHelper 辅助质粒均为本实验室保存, 凡纳滨对虾虾苗来自上海滨海基地。本实验所用引物由上海生物工程有限公司合成 (表 1)。

1.2 鳃弧菌缺失菌株构建

以鳃弧菌基因组 DNA 为模板, 通过表 1 的引物对 *vah1*-F1/*vah1*-F2 和 *vah1*-F3/*vah1*-F4, 分别扩增出目的基因的上下游片段, 再通过 Overlap PCR 进行融合。采用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Not* I 对融合片段以及质粒 pSR47s 进行双酶切, 通过

收稿日期: 2022-03-21 修回日期: 2022-06-23

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

作者简介: 胡存洁 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: 1096471433@qq.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>

T4 DNA 连接酶 4 ℃ 过夜连接后转化到大肠杆菌 CC118 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的固体 LB 培养基上培养,挑取单克隆菌落,利用引物 pSR47s-M13F 和 pSR47s-VECR 进行 PCR,测序验证重组质粒 CC118-pSR47s- $\Delta vah1$ 。然后将野生菌株、带有重组质粒的大肠杆菌和带有辅助质粒的大肠杆菌进行扩增培养,收集菌体涂布在氨苄西林钠和卡那霉素的固体培养基上培养,挑取单

菌落,用引物对 *vah1*-F1/*vah1*-F4 进行验证,挑选出第一次重组成功的含有双条带(长条带为 3 198 bp,短条带为 1 054 bp)的单菌落,涂布在含有氨苄西林钠和 15% 蔗糖的固体培养基上培养,挑取单菌落用引物对 *vah1*-F1/*vah1*-F4 进行 PCR 验证,筛选出仅含有短条带的菌株,用 *vah1*-F1/*vah1*-F4、16s-F/16s-R 引物进行测序和菌株鉴定,获得 *vah1* 缺失的鳗弧菌菌株。

表 1 本研究所用引物

Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5' - 3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	用途 Purpose
<i>vah1</i> -F1	CGAGCTCGCCATGGAGACTGGCAATAT	56	基因敲除
<i>vah1</i> -F2	CCATCGGCTAACCAACCTTCCAATAGCGCTGAGTGCCTTTTC		基因敲除
<i>vah1</i> -F3	GAAAAGCACTACGCGCTATTGGAAGTTGGTTAGCCGATGG	56	基因敲除
<i>vah1</i> -F4	AAGGAAAAAAGCGGCCGAGACTTGAGCCACCTAGACC		基因敲除
pSR47s-M13F	CAGGAAACAGCTATGAC	54	基因敲除
pSR47s-VECR	GATTTGCAGACTACGGGCCTA		基因敲除
16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54	菌株鉴定
16S-R	GGTTACCTTGTTCAGACTT		
CAT-F	GGCTATGGTTCTCGTACTTCCAAGC	60	CAT 定量 PCR
CAT-R	GCATTGTATAGGTCCTTGTGCA		
SOD-F	AGTTTCACCAACCTGCTTGC	60	SOD 定量 PCR
SOD-R	GCCTGCTGTACGACAATACCC		
PO-F	GATAAGGTGACCCAGCCAGC	60	PO 定量 PCR
PO-R	CGGACCCCAATTGAAGGGA		
LZM-F	GAAGCGACTACGGCAAGAAC	60	LZM 定量 PCR
LZM-R	AACCGTGAGACCAGCACTCT		
ALF-F	AACCCTGAGCAACGTGAGAG	60	ALF 定量 PCR
ALF-R	TCACGCCCTTTTCTACGACC		
18S-F	AACGCTCCTAGTTTACTTCTGC	60	18S DNA 定量 PCR
18S-R	CACGACCATTGCGGGCTGTA		

1.3 遗传稳定性的测定

将菌株 $\Delta vah1$ 接种于含氨苄西林钠的 LB 琼脂培养基上,连续传代 30 次后,抽提菌落 DNA,用引物 *vah1*-F1、*vah1*-F4 进行 PCR 扩增,如能扩增出 1 054 bp 大小的片段,表明该缺失菌株传代过程中遗传稳定。

1.4 生长曲线绘制

挑取鳗弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的单克隆,在含氨苄西林钠的 LB 液体培养基中 28 ℃ 下 150 r/min 振荡培养 24 h,再以 1% 的接种量接种于新的培养基中于 28 ℃ 下 150 r/min 振荡培养 30 h,每隔 2 小时取 1 次样,用分光光度计测定不同时间菌液的 OD₆₀₀ 值。实验重复 3 次,取 3 次数据的平均值,以培养时间为横坐标,以吸光度 OD₆₀₀ 值为纵坐标,绘制两种菌株的生长曲线。

1.5 溶血活性的测定

将过夜培养的鳗弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 按 1% 接种量转接至含氨苄西林钠的液体 LB 培养基中,28 ℃ 下 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ = 1.0 后,各取 5 μL 菌液垂直悬空点于提前打好的绵羊血琼脂平板(比克曼生物)的孔中(打孔直径为 0.15 cm),每个菌株 3 个平行,28 ℃ 正置培养,观察溶血斑的变化并拍照记录,利用 Photoshop 软件测量溶血斑直径,并通过直径计算溶血圈面积^[20]。

1.6 生物膜形成能力的测定

收集过夜培养的菌液,用 LB 液体培养基将野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的 OD₆₀₀ 值调整为 0.01,并转入 96 孔板中,每孔为 200 μL,每个样品重复 6 次,并以 LB 液体培养基为阴性对照,于

28 °C 培养箱中静置培养 24 h 后,用无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每孔加入 200 μ L 甲醇,固定 1 h 后除去多余甲醇,然后加入 150 μ L 1% 结晶紫染色 30 min,最后用 33% 的乙酸溶解结晶紫,利用酶标仪在 595 nm 处测定其吸光值^[21-23]。

1.7 半数致死量测定

以体长 3~5 cm,体质量 0.88~2.10 g 的凡纳滨对虾苗为感染对象,经过一段时间暂养适应后,挑取规格大小统一、反应灵敏、体表无损伤的健康对虾进行感染实验,通过浸泡感染对虾来测定鳎弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的半数致死量。不管是鳎弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$,实验均分为 7 组,以不加菌的对虾为空白对照组,6 组不同菌液含量的实验组(梯度为 1.0×10^4 cfu/mL、 1.0×10^5 cfu/mL、 1.0×10^6 cfu/mL、 1.0×10^7 cfu/mL、 1.0×10^8 cfu/mL 和 1.0×10^9 cfu/mL),每组设立 3 个平行,每个平行各 50 尾对虾。实验过程不投饵,每天换水和添加鳎弧菌,以保持水体鳎弧菌数量稳定。实验共感染 96 h,每隔 1 小时观察并记录凡纳滨对虾的死亡数量和症状,利用寇氏法计算野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的半数致死量^[24]。

1.8 组织切片

取样感染 72 h 的对照组、野生菌株感染组和缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染组的凡纳滨对虾,其肝胰腺组织用作病理切片制备。经过脱水、石蜡包埋、切片和 H. E 染色后,用光学显微镜进行组织病理观察。

1.9 体内定殖能力评估

为了比较鳎弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 在凡纳滨对虾体内定殖能力的差异,分别取感染后 24、48、72 h 的野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染的凡纳滨对虾,用灭菌的 PBS 缓冲液清洗干净后,称取相同质量的肝胰腺组织,充分研磨后用无菌的 PBS 缓冲液进行梯度稀释,然后涂布在含有氨苄西林钠的 TCBS 固体培养基上,28 °C 过夜培养,通过平板分离计数,用引物 *vah1*-F1/*vah1*-F4 扩增 16S DNA 进行菌种的鉴定。TCBS 固体培养基上长出的克隆数越多,表明其在凡纳滨对虾肝胰腺的定殖能力越强。

1.10 RT qPCR

分别取感染 3、6、12、24、48、72 h 后的凡纳滨对虾肝胰腺,每个平行取 3 尾对虾,用 Trizol

法提取肝胰腺 RNA,用于过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LZM)、酸性磷酸酶(ACP)等免疫相关基因的定量 RT-PCR 检测。将不同感染时间的肝胰腺 RNA 反转录为 cDNA,采用 SYBR Green 荧光法进行 RT-qPCR 的扩增,扩增引物见表 1,20 μ L 反应体系包括 2 \times Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix 10 μ L,上下引物各 1 μ L,模板 cDNA 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,65 °C 延伸 5 s,共 40 个循环;95 °C 延伸 5 min。

2 结果

2.1 鳎弧菌 *vah1* 缺失菌株 $\Delta vah1$ 的构建

通过先后 2 次基因重组[图 1(a)],在含有蔗糖的 LB 固体培养基上挑选阳性单克隆,野生菌株作为阳性对照,野生菌株可扩增出 3 198 bp 的条带[图 1(b)],缺失菌株 $\Delta vah1$ 可扩增出 1 054 bp 的条带[图 1(b)],表明目的基因被剔除了 2 144 bp,进一步测序比对,表明缺失菌株 $\Delta vah1$ 构建成功。

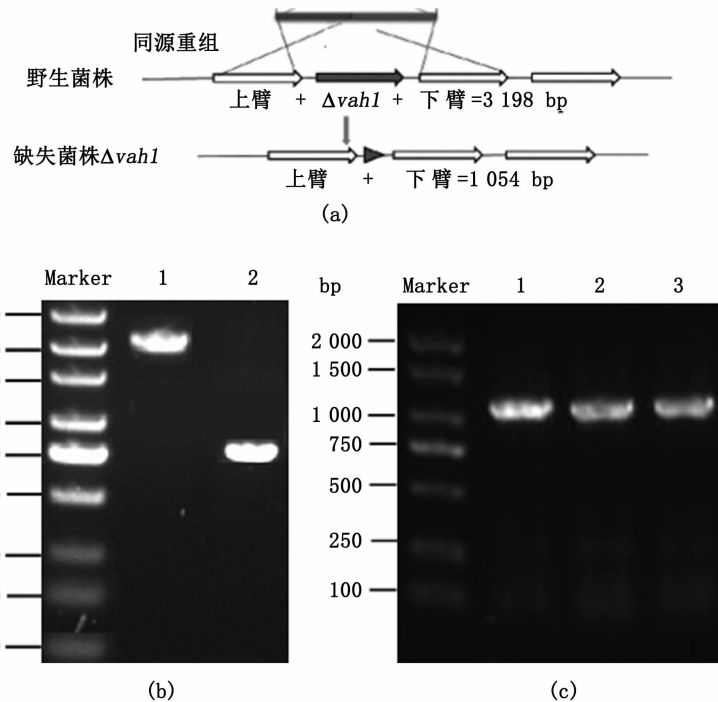
将缺失菌株 $\Delta vah1$ 通过传代培养 30 次后,PCR 可扩增出大小为 1 054 bp 的融合片段[图 1(c)],说明缺失菌株 $\Delta vah1$ 可在后代中稳定遗传。

2.2 *vah1* 缺失影响鳎弧菌的溶血性和生物膜形成

vah1 缺失影响鳎弧菌的溶血能力。野生菌株在培养 12 h 后就表现出溶血活性(图版 I),而缺失菌株 $\Delta vah1$ 在培养 120 h 才出现溶血活性(图版 I)。在血平板培养 120 h 时,野生菌株的溶血圈平均面积为 0.66 cm²,缺失菌株 $\Delta vah1$ 溶血圈平均面积为 0.07 cm²,缺失菌株 $\Delta vah1$ 溶血活性下降 89.4%,二者的溶血圈面积呈现出显著性差异($P < 0.001$),见图 2(a)。

vah1 缺失影响鳎弧菌的生物膜形成,如图 2(b)所示,相比野生菌株,缺失菌株 $\Delta vah1$ 的生物膜 OD 值下降了 16%,且呈现显著差异($P < 0.05$)。

vah1 缺失不影响鳎弧菌的生长能力。野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的生长曲线见图 2(c),缺失菌株 $\Delta vah1$ 的生长速率与野生菌株的生长速率基本趋于一致,在培养 5 h 时 2 种菌株都进入对数生长期,培养 20 h 时 2 种菌株都进入平台生长期。

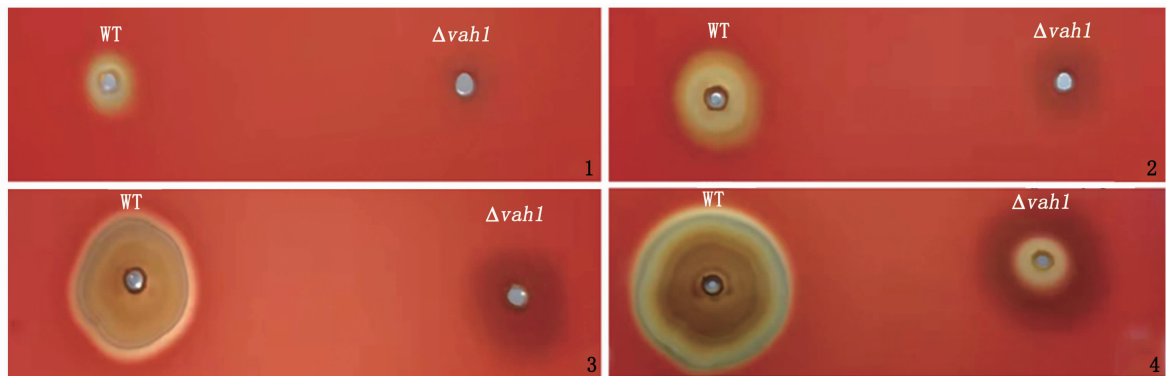


(a) 鳗弧菌缺失菌株 $\Delta vah1$ 基因重组交换示意图; (b) 泳道 1 为野生菌株对照条带大小为 3 198 bp, 泳道 2 为缺失菌株 $\Delta vah1$ 的扩增融合片段条带 1 054 bp; (c) 缺失菌株 $\Delta vah1$ 稳定遗传性的测定, 泳道 1, 2, 3 均为传代 30 次的缺失菌株 $\Delta vah1$ 融合片段条带, 大小为 1 054 bp。

(a) The schematic diagram of $\Delta vah1$ gene recombination and exchange of *V. anguillarum* deletion strain; (b) Lane 1 is the wild strain control band, with a size of 3 198 bp, and lane 2 is the amplified fusion fragment band of the missing strain $\Delta vah1$, with a size of 1 054 bp; (c) Determination of the stable heritability of the deletion strain $\Delta vah1$. Lanes 1, 2 and 3 are the fusion fragment bands of the deletion strain $\Delta vah1$ after 30 passages, with a size of 1 054 bp.

图 1 鳗弧菌 $\Delta vah1$ 缺失株的构建和遗传稳定性的检测

Fig. 1 Construction of *V. anguillarum* $\Delta vah1$ and detection of genetic stability

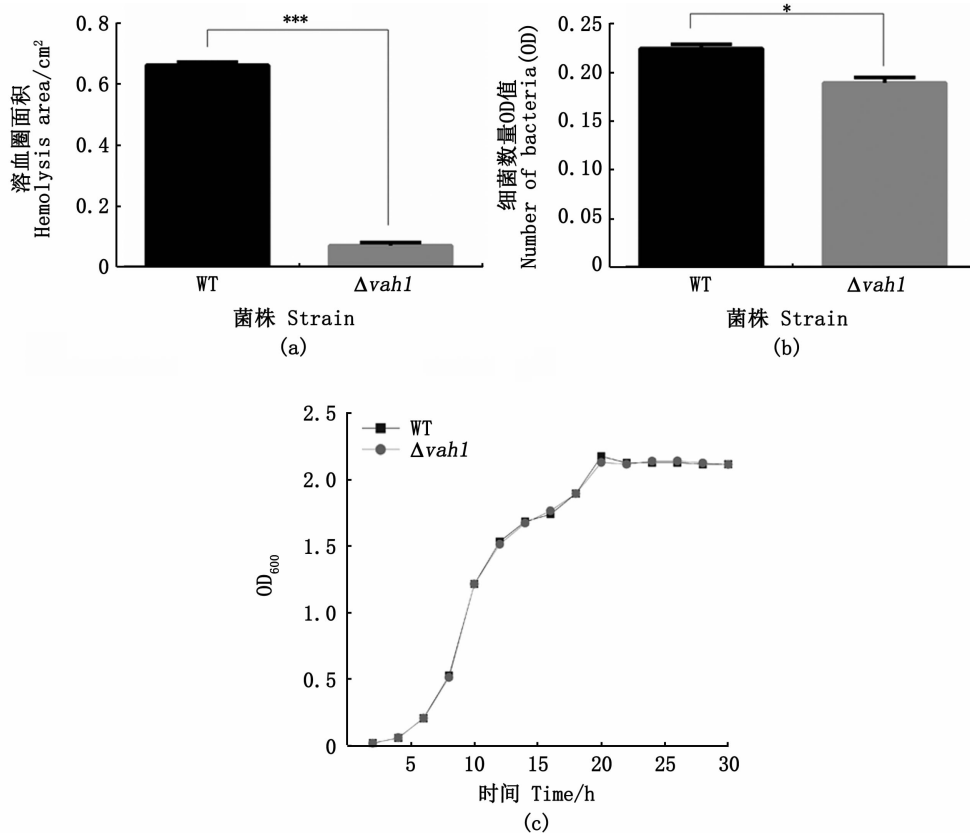


1. 溶血 12 h; 2. 溶血 48 h; 3. 溶血 96 h; 4. 溶血 120 h。

1. 12 hours of hemolysis; 2. 48 h of hemolysis; 3. 96 h of hemolysis; 4. 120 h of hemolysis.

图版 I 鳗弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 溶血平板

Plate I Wild strain and $\Delta vah1$ of *V. anguillarum* on blood agar plate

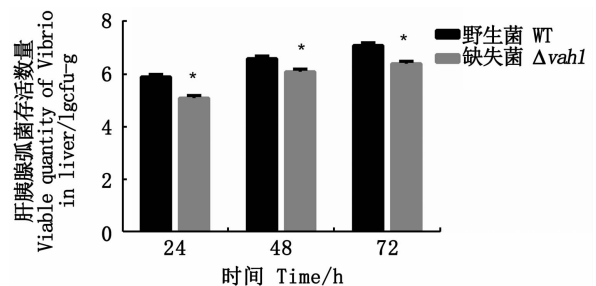


柱状图上方含“*”代表差异显著($P < 0.05$),柱状图上方含“***”代表差异极显著($P < 0.001$);(a)溶血120 h野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的溶血圈大小的统计比较;(b)两株鳎弧菌生物膜形成能力的统计比较;(c)两株鳎弧菌的生长曲线。“*” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.05$), “***” above the bar graph represents extremely significant difference ($P < 0.001$); (a) The histogram shows the statistical comparison of hemolytic circle size between wild strain and deletion strain $\Delta vah1$ after hemolysis for 120 h; (b) Statistical comparison of biofilm forming ability between two strains of *V. anguillarum*; (c) Growth curves of two strains of *V. anguillarum*.

图2 鳎弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 的比较分析
Fig. 2 Comparison between wild strain and deletion strain $\Delta vah1$ of *V. anguillarum*

2.3 *vah1* 缺失影响鳎弧菌感染凡纳滨对虾的能力

vah1 缺失影响鳎弧菌在凡纳滨对虾肝胰腺中的定殖能力,感染24、48和72 h时,野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 在凡纳滨对虾肝胰腺中的定殖弧菌数量逐渐增多,在这3个时间点,野生菌株的定殖数量都高于缺失菌株 $\Delta vah1$ 的定殖数量。野生菌株在24、48和72 h时的弧菌数量分别为 6.3×10^5 cfu/g、 3.2×10^6 cfu/g、 1.0×10^7 cfu/g,缺失菌株 $\Delta vah1$ 分别为 1.0×10^5 cfu/g、 1.0×10^6 cfu/g、 2.0×10^6 cfu/g。可见,缺失菌株 $\Delta vah1$ 在肝胰腺中的定殖数量显著低于野生菌株在肝胰腺中的定殖数量($P < 0.05$),在感染72 h时,野生菌株的定殖数量是缺失菌株 $\Delta vah1$ 定殖数量的5倍,见图3。



柱状图上方含“*”代表差异显著($P < 0.05$)。“*” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.05$).

图3 鳎弧菌野生菌株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 在凡纳滨对虾肝胰腺的定殖能力
Fig. 3 The statistical comparison of the colonization ability in *L. vannamei* between wild strains and $\Delta vah1$ of *V. anguillarum*

2.4 *vah1* 缺失影响鳗弧菌感染凡纳滨对虾的致死率

鳗弧菌感染凡纳滨对虾的半数致死量如表 2 所示,野生菌株半数致死量为 $(3.16 \pm 0.80) \times$

10^5 cfu/mL, 缺失菌株 $\Delta vah1$ 半数致死量为 $(9.77 \pm 0.50) \times 10^5$ cfu/mL, 缺失菌株 $\Delta vah1$ 的半数致死量相比野生菌株的半数致死量提高了 2.09 倍。

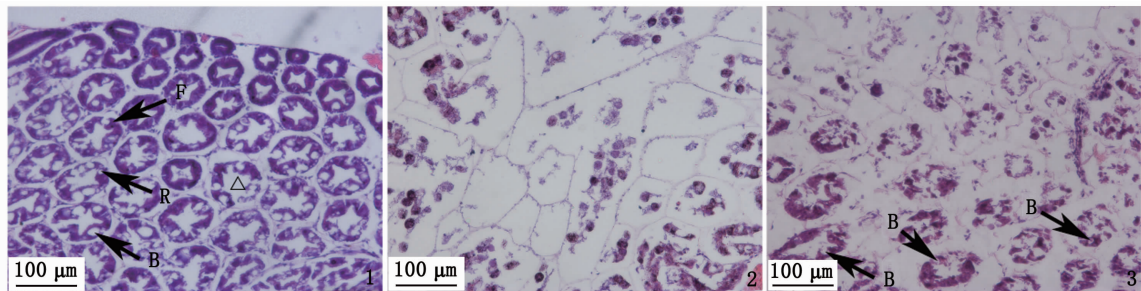
表 2 鳗弧菌野生株和缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染凡纳滨对虾的半数致死量

Tab. 2 Determination of LD₅₀ of *L. vannamei* after being challenged with wild strain WT and $\Delta vah1$

菌 Strain	感染浓度 Infection concentration/ (cfu/mL)	实验对虾数 Number of experimental shrimp/尾	死亡对虾数 Number of dead shrimp/尾	死亡率 Mortality/%	半数致死量 LD ₅₀ Median lethal dose/ (cfu/mL)
WT	10^9	50	50	100	$(3.16 \pm 0.80) \times 10^5$
	10^8	50	44	87	
	10^7	50	43	86	
	10^6	50	36	72	
	10^5	50	28	55	
$\Delta vah1$	10^9	50	50	100	$(9.77 \pm 0.50) \times 10^5$
	10^8	50	44	87	
	10^7	50	35	69	
	10^6	50	30	59	
	10^5	50	18	36	

vah1 缺失影响鳗弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺组织的破坏程度。从图版 II-1 中可以看出健康对虾肝胰腺细胞排列紧密,细胞形状完整,可清晰地观察到肝小管的星形官腔结构以及肝胰腺细胞中的一些消化功能性细胞,如吸收细胞(F 细胞)、储存细胞(R 细胞)和分泌细胞(B 细胞)。野生菌株感染 72 h 后,肝胰腺组织切片已无完整

的肝胰腺细胞,多数细胞内容物溶解并脱落,出现大量的空泡化细胞(图版 II-2); 缺失菌株 $\Delta vah1$ 的感染症状较野生菌株轻,有些肝胰腺细胞仍保留着细胞轮廓,多数肝胰腺细胞处于溶解过程中,细胞内容物逐渐脱落,肝胰腺细胞逐渐出现空泡化,此时有些肝胰腺细胞甚至能看到 B 细胞(图版 II-3)。



1. 健康凡纳滨对虾肝胰腺石蜡切片显微结构图, B 代表分泌细胞, R 代表储存细胞, F 代表吸收细胞, “Δ” 代表肝小管; 2. 野生菌株感染凡纳滨对虾肝胰腺石蜡切片显微结构图; 3. 缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染凡纳滨对虾石蜡切片显微结构图。

1. The microstructure of paraffin section of normal hepatopancreas of *L. vannamei*; B stands for secreting cell, R for storing cell, F for absorbing cell, and “Δ” for hepatic tubule; 2. The microstructure of paraffin section of hepatopancreas of *L. vannamei* infected by wild strain; 3. The microstructure of paraffin section of *L. vannamei* infected by strain $\Delta vah1$.

图版 II 鳗弧菌感染后凡纳滨对虾肝胰腺石蜡切片显微结构

Plate II The microstructure of hepatopancreas in *L. vannamei* after infected by *V. anguillarum*

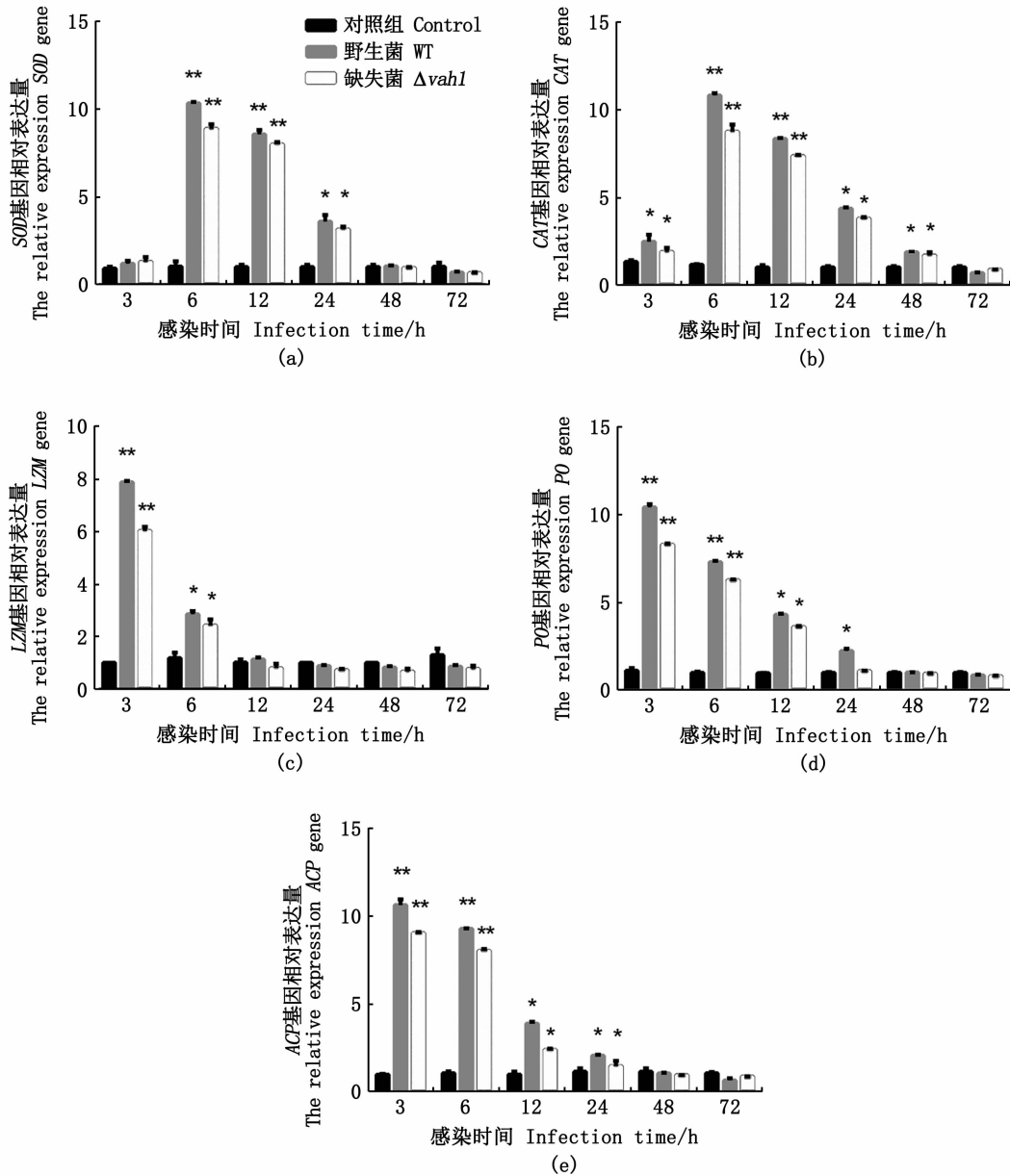
2.5 *vah1* 缺失鳗弧菌影响凡纳滨对虾免疫相关基因表达

凡纳滨对虾对野生鳗弧菌和缺失菌株 $\Delta vah1$

的免疫反应有明显差异(图 4), 免疫相关基因 *SOD*、*CAT*、*LZM*、*PO* 和 *ACP* 的表达量在感染前期迅速升高, 在感染后期各基因的表达量迅速降

低,感染 72 h 时各实验组基因表达量均低于空白对照组。其中 *SOD*、*CAT* 在感染 6 h 时表达量达到最大,当感染持续到 24 h 时,其表达量迅速下降,*LZM*、*PO* 和 *ACP* 在感染 3 h 时表达量达到最大,*LZM* 在感染 6 h 时表达量迅速下降,而 *PO* 和

ACP 在感染 12 h 后表达量迅速下降。在整个感染过程中,缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染引起的免疫相关基因的表达量一直低于野生菌株,且二者差异显著 ($P < 0.05$)。



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

“*” above the bar graph represents significant difference ($P < 0.05$); “**” above the bar graph represents extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 4 凡纳滨对虾肝胰腺组织相关免疫基因的表达水平变化

Fig. 4 Expression patterns of immune relate genes in hepatopancreas of *L. vannamei* after challenge with *V. anguillarum*

3 讨论

本文利用 pSR47s 自杀质粒为载体,通过 Overlap PCR 和同源重组技术,成功构建了鳗弧菌缺失菌株 $\Delta vah1$,其溶血性下降了 89.4%。HIRONO 等^[13]通过克隆鳗弧菌溶血素基因 *vah1*,得出含有 *vah1* 基因的大肠杆菌细胞表现出溶血活性。ROCK 等^[17]在鳗弧菌中利用定点突变技术,构建了 *vah1* 氨基酸突变的菌株,其溶血性降低。与野生菌相比,鳗弧菌缺失菌株 $\Delta vah1$ 生长没有明显差异,生物膜形成能力下降 16%,说明 *vah1* 影响鳗弧菌生物膜的形成。

Vah1 对鳗弧菌感染水产动物的毒力影响只在大西洋鲑中有报道^[17],本文则首次研究了 *vah1* 对鳗弧菌感染凡纳滨对虾及致死程度的影响,发现 *vah1* 基因缺失的鳗弧菌菌株 $\Delta vah1$ 感染凡纳滨对虾的致死能力有所下降,相比野生菌株,缺失菌株 $\Delta vah1$ 的半数致死量提高了 2 倍以上(表 2)。弧菌感染凡纳滨对虾导致的急性肝胰腺坏死引起的死亡,是当前对虾养殖减产的主要原因之一^[25],鳗弧菌野生菌株感染凡纳滨对虾,对肝胰腺细胞造成严重破坏,肝胰腺细胞完全丧失了细胞的形状,细胞内容物大量脱落,出现大量的空泡化细胞,而缺失菌株 $\Delta vah1$ 对肝胰腺细胞的破坏程度较轻,感染的肝胰腺细胞中有些还保留着肝胰腺细胞的外形轮廓(图版 II),这一方面可能与缺失菌株 $\Delta vah1$ 在凡纳滨对虾肝胰腺的定殖能力减弱有关(图 3),另一方面也可能与缺失菌株 $\Delta vah1$ 的溶血能力下降有关(图版 I,图 2)。由于缺失菌株 $\Delta vah1$ 对凡纳滨对虾肝胰腺破坏程度略轻,缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染凡纳滨对虾的致死能力也有一定程度的下降。

弧菌感染凡纳滨对虾后可迅速引起虾体内的一系列免疫反应,肝胰腺被认为是虾类主要的免疫器官,可以清除体内入侵的病原菌^[26-28]。肝胰腺主要的免疫相关因子会有反应,其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)是对虾中重要的抗氧化免疫酶:当对虾遭到病原菌的入侵时,会在体内产生大量的活性氧,大量的活性氧会对凡纳滨对虾的机体造成损害,此时这 2 种免疫因子可以将体内多余的活性氧清除掉;当病原菌侵入对虾时会激活酚氧化酶(PO),PO 产生的代谢产物可杀死病原菌;酸性磷酸酶(ACP)、溶

菌酶(LZM)可直接将入侵的病原菌溶解掉^[29-30]。本研究鳗弧菌感染凡纳滨对虾后,肝胰腺免疫基因 *CAT*、*SOD*、*PO*、*LZM* 和 *ACP* 的基因表达水平变化有所不同,不同基因表达的启动早晚有所不同,但总体趋势是先升高后下降(图 4)。表达水平升高可能是感染初期受到鳗弧菌的侵袭,对虾体内启动了免疫机制,对病原菌的侵入进行抵制,感染后期免疫因子表达水平降低甚至低于对照组,可能是因为此时凡纳滨对虾的免疫系统遭到了破坏^[31-32],凡纳滨对虾肝胰腺针对鳗弧菌 *vah1* 缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染引起的免疫基因表达水平普遍低于野生菌株,表明缺失菌株 $\Delta vah1$ 感染凡纳滨对虾引起的毒性要弱于野生菌株。

总之,本研究通过构建鳗弧菌 *vah1* 基因缺失菌株,对其溶血性、生物膜形成能力等进行了分析,对其感染凡纳滨对虾的能力和致病能力进行了详细评估,表明已通过基因工程技术成功构建了一株减毒的鳗弧菌菌株,后续将在缺失菌株 $\Delta vah1$ 的基础上进一步敲除其他毒力基因,构建毒性更小的鳗弧菌菌株,为鳗弧菌减毒疫苗或免疫增强剂开发奠定基础。

参考文献:

- [1] YANG G H, WANG C, WANG X T, et al. Complete genome sequence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* and genome-wide transposon mutagenesis analysis of genes essential for in vivo infection [J]. *Microbiological Research*, 2018, 216: 97-107.
- [2] 郭伟荣,刘利平,张宗锋,等. 感染鳗弧菌对花鲈非特异性免疫功能的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 89-95.
- [3] GUO W R, LIU L P, ZHANG Z F, et al. The impact of *Vibrio anguillarum* challenging on non-specific immune responses of sea perch *Lateolabrax japonicus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(1): 89-95.
- [4] 赵鹏. 虹鳟鱼常见细菌性疾病的防治技术[J]. *黑龙江水产*, 2015(6): 24-26.
- [5] ZHAO P. Control techniques of common bacterial diseases of Rainbow trout [J]. *Heilongjiang Fisheries*, 2015(6): 24-26.
- [6] 韩先朴,卢全章. 鳗弧菌病原菌的分离与鉴定[J]. *微生物学报*, 1984, 24(4): 386-391.
- [7] HAN X P, LU Q Z. Isolation and identification of *Vibrio anguillarum* from eels [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1984, 24(4): 386-391.
- [8] 严林飞,安昕,包苗苗,等. 大黄鱼过氧化氢酶基因的克隆及其对鳗弧菌感染的响应[J]. *水产学报*, 2017, 41(5):

- 641-648.
- LAN L F, AN X, BAO M M, et al. Expression of catalase in *Larimichthys crocea* after infection of *Vibrio anguillarum*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 641-648.
- [6] 郭杨柳, 吴楠, 房海, 等. 大菱鲆病原鳃弧菌的检验与分析[J]. 生物技术通报, 2015, 31(11): 222-227.
- GUO Y L, WU N, FANG H, et al. Examination and analysis on pathogenic *Vibrio anguillarum* from turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(11): 222-227.
- [7] 薛洁, 宋晓青, 邢婧, 等. 牙鲆注射免疫鳃弧菌灭活疫苗后 13 种免疫相关基因表达的变化[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(2): 42-53.
- XUE J, SONG X Q, XING J, et al. Expression analysis of thirteen immune related genes of flounder (*Paralichthys olivaceus*) vaccinated with formalin-inactivated *Vibrio anguillarum*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(2): 42-53.
- [8] 向赞, 王刚, 陈兆明, 等. 不同温度条件下鳃弧菌和白斑综合征病毒对凡纳滨对虾的致病性[J]. 热带生物学报, 2015, 6(1): 11-17.
- XIANG Y, WANG G, CHEN Z M, et al. The pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and white spot syndrome virus against *Litopenaeus vannamei* under different temperature conditions [J]. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(1): 11-17.
- [9] 郑国兴, 沈亚林, 李何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报, 1990, 14(1): 1-7.
- ZHENG G X, SHEN Y L, LI H. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in *Penaeus orientalis* kishinouye[J]. Journal of Fisheries of China, 1990, 14(1): 1-7.
- [10] 段亚飞, 董宏标, 王芸, 等. 鳃弧菌感染对斑节对虾免疫相关指标的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(9): 44-50.
- DUAN Y F, DONG H B, WANG Y, et al. The non-specific immune related indexes response of *Penaeus monodon* to *Vibrio anguillarum* challenge [J]. Marine Sciences, 2015, 39(9): 44-50.
- [11] HAMEED A S S, BALASUBRAMANIAN G. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load [J]. Aquaculture, 2000, 183(3/4): 195-205.
- [12] BENMANSOUR A, DE KINKELIN P. Live fish vaccines: history and perspectives [J]. Developments in Biological Standardization, 1997, 90: 279-289.
- [13] HIRONO I, MASUDA T, AOKI T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum* [J]. Microbial Pathogenesis, 1996, 21(3): 173-182.
- [14] KREGER A S, BERNHEIMER A W, ETKIN L A, et al. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes [J]. Infection and Immunity, 1987, 55(12): 3209-3212.
- [15] ZHANG X H, AUSTIN B. Haemolysins in *Vibrio* species [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(5): 1011-1019.
- [16] MENESTRINA G, MOSER C, PELLET S, et al. Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family[J]. Toxicology, 1994, 87(1/3): 249-267.
- [17] ROCK J L, NELSON D R. Identification and characterization of a hemolysin gene cluster in *Vibrio anguillarum* [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(5): 2777-2786.
- [18] LI L, ROCK J L, NELSON D R. Identification and characterization of a repeat-in-toxin gene cluster in *Vibrio anguillarum*[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(6): 2620-2632.
- [19] ONO T, PARK K S, UETA M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1032-1042.
- [20] 陈妍妍. 溶藻弧菌定植因子 *AcfA* 的功能及其对 *SOD*、*Flg* 和 *Dct* 的调控[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- CHEN Y Y. Study on the function and regulation of accessory colonization factor *AcfA* of *Vibrio alginolyticus* to *SOD*, *Flg* and *Dct* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.
- [21] 吴从文, 鲍宝龙. 金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶生理功能分析[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(3): 411-419.
- WU C W, BAO B L. Phenotypic function of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(3): 411-419.
- [22] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493-497.
- [23] CONEJERO M J U, HEDREYDA C T. PCR detection of hemolysin (vhh) gene in *Vibrio harveyi*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2004, 50(3): 137-142.
- [24] 赵东康, PENGLEE R, 车金远, 等. *aguA* 基因缺失对嗜水气单胞菌致病性的影响[J/OL]. 上海海洋大学学报, 2022: 1-15 [2022-07-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20220516.1200.002.html>.
- ZHAO D K, PENGLEE R, CHE J Y, et al. Deletion of the *aguA* gene affects its pathogenicity in *Aeromonas hydrophila* [J/OL]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022: 1-15 [2022-07-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20220516.1200.002.html>.
- [25] 贾丹, 史成银, 黄隼, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103-111.
- JIA D, SHI C Y, HUANG J, et al. Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 103-111.
- [26] DUAN F Y, ZHANG J S, DONG H B, et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio*

- parahaemolyticus* challenge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 354-365.
- [27] RAMESHTHANGAM P, RAMASAMY P. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* fabricius[J]. Aquaculture, 2006, 254(1/4): 32-39.
- [28] BIANCHINI A, MONSERRAT J M. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: protective role of sesamol [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 67(1): 100-108.
- [29] 王依龙. 凡纳滨对虾肝胰腺和肠道对不同致病因素响应机制的研究[D]. 青岛: 中国科学院大学, 2020.
WANG Y L. Responses mechanism of hepatopancreas and intestinal of *Penaeus vannamei* to different pathogenic factors [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, University of Chinese Academy of Sciences, 2020.
- [30] 崔青曼, 蔡凡帆, 展文豪, 等. 小球藻多糖对南美白对虾血细胞吞噬及免疫相关因子基因表达的影响[J]. 饲料研究, 2019, 42(11): 42-45.
CUI Q M, CAI F F, ZHAN W H, et al. Effect of Chlorella polysaccharide on hemocyte phagocytosis and gene expression of immune related factors in *Penaeus vannamei* [J]. Feed Research, 2019, 42(11): 42-45.
- [31] ZHANG Z, LI S K, XIE C P, et al. Innate immune response and gene expression of *Scylla paramamosain* under *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 462-471.
- [32] LI C C, YEH S T, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 853-860.

Construction and pathogenicity evaluation of *Vibrio anguillarum* strain with *vah1* deletion

HU Cunjie^{1,2}, CHE Jinyuan^{1,2}, HUANG Xuxiong^{1,2}, LUO Tuyan³, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: The virulence gene *vah1* in *Vibrio anguillarum* was knocked out by gene recombination, and the strain $\Delta vah1$ with *vah1* deletion was constructed in this study. The hemolytic activity of $\Delta vah1$ strain decreased by 89.4% and the biofilm forming ability decreased by 16%. The median lethal dose (LD₅₀) of $\Delta vah1$ strain infected *Litopenaeus vannamei* was $(9.77 \pm 0.50) \times 10^5$ cfu/mL, compared with $(3.16 \pm 0.80) \times 10^5$ cfu/mL of the LD₅₀ of the wild strain of *V. anguillarum*, it increased by 2.09 times; the colonization ability of $\Delta vah1$ strain in *L. vannamei* decreased evidently after *vah1* deletion. Compared with the wild strain of *V. anguillarum*, the destruction degree of $\Delta vah1$ strain on hepatopancreas cells was significantly smaller. After $\Delta vah1$ strain infected *L. vannamei*, the expression levels of immune related genes *CAT*, *SOD*, *PO*, *LZM* and *ACP* in hepatopancreas decreased to some extent. These results showed that the hemolysis and pathogenicity to *L. vannamei* of the *vah1* deficient *V. anguillarum* strain were reduced in varying degrees, which laid a foundation for the preparation of subsequent attenuated vaccines or specific immune enhancers against *V. anguillarum*.

Key words: *Vibrio anguillarum*; *vah1* gene; pathogenicity; *Litopenaeus vannamei*; attenuated strain