

文章编号: 1000-0615(2017)04-0613-09

DOI: 10.11964/jfc.20160310322

杀香鱼假单胞菌Ⅲ型分泌系统转录调控蛋白ExsA突变株的构建及其对大黄鱼的毒力特征分析

张杰¹, 郭海杰², 高丽婷¹, 毛芝娟^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 杀香鱼假单胞菌是大黄鱼内脏白点病的致病菌, 感染该菌常会导致养殖大黄鱼很高的死亡率和严重的经济损失。病原株NB2011编码典型的Ⅲ型分泌系统, 可能是该菌重要的毒力因子, ExsA是控制此分泌系统表达的重要调控蛋白。为确认ExsA在NB2011致病过程中的作用, 开发有效疫苗, 实验采用双交换同源重组法构建了ExsA内部序列被卡那霉素基因替换的突变株, 检测突变株与野生株对鼠巨噬细胞J774的黏附、内化和胞内增殖特性, 并比较对大黄鱼的毒力变化, 同时, 通过透射电子显微镜观察人工感染后大黄鱼内脏组织的病理变化。研究表明, 巨噬细胞对突变株的内化率降低, 内化的细菌在12 h内被清除, 野生株在内化后虽然一段时间内数量稍有下降, 12~24 h期间数量急剧上升; 突变株对大黄鱼的96 h LD₅₀为2.59×10⁷/mL, 比野生株高数百倍; 电镜切片中未观察到组织内有菌体的存在, 表明突变株的毒力明显减弱, 可以作为弱毒疫苗的开发对象。

关键词: 大黄鱼; 杀香鱼假单胞菌; Ⅲ型分泌系统转录调控蛋白ExsA; 突变; 毒力

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)是大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的病原菌^[1-2]。致病株NB2011基因组测序和注释结果表明, 该菌编码典型的Ⅲ型分泌系统(type III secretion system, T3SS)^[3], 该系统存在于很多革兰氏阴性致病菌中, 形态表现为跨越细菌外膜直接插入真核宿主细胞膜的针形复合体, 菌体通过此复合体将效应分子输送到宿主细胞中, 发挥破坏宿主细胞骨架结构、改变信号传递和免疫反应类型、控制宿主细胞的应答等功能, 从而建立感染、实现传播^[4]。NB2011的T3SS与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)相应系统的结构和组成最为相似。铜绿假单胞菌T3SS全长约35 kb, 由40多个基因组成, 编码包括结构蛋白、转位蛋白、效应子和分子伴侣等; 整个系统所有基因的表达

受转录调控蛋白ExsA的调控, ExsA活性则受到其他调控蛋白ExsC、ExsE和ExsD的反馈调控^[5]。在NB2011 T3SS中发现的ExsA与铜绿假单胞菌相应蛋白的氨基酸同源性达65%, 推测具有相似的功能^[3]。

本实验通过双交换同源重组法构建ExsA替换突变的杀香鱼假单胞菌菌株, 检测野生株和突变株对大黄鱼的毒力、感染后病理特征及在鼠巨噬细胞中的内化、增殖情况, 旨在了解ExsA的生物学功能, 获得毒力减弱的菌株, 为进一步的疫苗研制提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、细胞株与培养基

大肠杆菌*E. coli* TOP10、DH5α、β2155菌株

收稿日期: 2016-03-23 修回日期: 2016-09-01

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY15C190006); 浙江省重中之重学科重点实验室资助项目(1740002280); 宁波市科技创新团队项目(2015C110005, 2015C110018)

通信作者: 毛芝娟, E-mail: mzzjane@hotmail.com

为本实验室保存, 杀香鱼假单胞菌NB2011为本实验室分离和保存。质粒pKD4、pUC19、pCVD442由上海意泓生物科技有限公司提供。小鼠巨噬细胞J774由上海拜力生物科技有限公司提供; DMEM培养基购自Gibco公司。假单胞菌显色平板由CHROMagar公司提供。

1.2 试剂

Pfu DNA聚合酶、dNTP混合物、限制性内切酶*EcoR* I、*Bam*H I、*Pst* I等购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); DNA连接试剂盒、DNA 1 kb Marker、DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、氯霉素、庆大霉素等购自Invitrogen。

1.3 NB2011基因组DNA的提取

在LB平板上挑取单个菌落, 接种于LB培养液中28 °C振荡过夜, 之后离心收集菌体, 用常规CTAB法提取基因组DNA。

1.4 PCR扩增

根据已知的NB2011*ExsA*基因及两侧序列(GenBank登录号: ASJX00000000), 用Primer premier 6.0软件设计5对引物, 包括上游同源臂引物、下游同源臂引物、卡那霉素抗性基因引物、靶基因外侧鉴定引物和内侧鉴定引物(表1)。反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 退火(温度分别为66、65、55、65和63 °C) 45 s, 72 °C延伸90 s, 循环30次; 72 °C终延伸7 min。以NB2011基因组DNA或相应质粒为模板进行扩增, 反应结束后, 用5 μL扩增产物于1%琼脂糖凝胶上进行电泳确认反应产物, 切胶纯化回收(回收产物即为同源重组片段)。

1.5 同源重组质粒pUC19-Δ*ExsA*的构建

同源重组片段PCR产物经纯化回收后根据设计的位点进行双酶切反应; 质粒pUC19用相同酶进行酶切。反应产物进行电泳分离和凝胶纯化, 在同一管中加入纯化的pUC19酶切产物、上游手臂和下游手臂酶切片段、反应缓冲液和T₄ DNA连接酶, 16 °C过夜连接。连接产物通过化学法转化入*E. coli* TOP10感受态细胞, 在LB平板(Amp, 50 μg/mL)上于37 °C培养至单克隆形成。

随机挑取生长的单克隆, 进行菌液PCR检测。阳性反应对应克隆为含上下游打靶片段的阳性克隆, 称为pUC19-Δ*ExsA*。接种阳性克隆入5 mL LB(氨苄青霉素, 50 μg/mL), 37 °C培养过夜, 次日柱离心法纯化质粒DNA。

1.6 打靶载体(pCVD442-Δ*ExsA*-Kan)及供体菌的构建

通过PCR反应从pKD4质粒上扩增得到Kan抗性基因表达框, 经*Bam*H I切割后, 克隆入pUC19-Δ*ExsA*; 在含Amp(50 μg/mL)和Kan(25 μg/mL)平板上, 获得含有卡那霉素抗性基因完整打靶片段的双抗性克隆。随机挑取一个克隆, 小量制备质粒DNA, 获得pUC19-Δ*ExsA*-Kan, 分别以*ExsA*-5F和*ExsA*-3R为上下游引物, PCR扩增鉴定重组质粒。

制备pCVD442质粒, 分别以*Bam*H I消化pUC19-Δ*ExsA*-Kan和pCVD442质粒, 纯化回收后建立连接反应, 连接产物转化大肠杆菌DH5α λpir, 在LB平板(Kan, 25 μg/mL)上于37 °C培养至单克隆形成。挑取单克隆, 接种入LB培养基(Amp, 50 μg/mL, Kan, 25 μg/mL), 37 °C培养过夜后提取质粒, 获得打靶载体pCVD442-Δ*ExsA*-Kan。

将打靶载体pCVD442-Δ*ExsA*-Kan电转化进

表1 实验中所用的引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 name of primers	用途 usage	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')
<i>ExsA</i> -5F	扩增上游同源臂	ATAGAATT <u>CGT</u> CGACAAGTGGCGACGAAGCAACATCATTGAGC
<i>ExsA</i> -5R	amplification of upstream homology arm	ATAGGATCCCGACTCAGACGACATAGCAAGCCTCCTACA
<i>ExsA</i> -3F	扩增下游同源臂	ATAGGATCCATGGGCGCTGGCTGATAAAAATGTCAAGG
<i>ExsA</i> -3R	amplification of downstream homology arm	ATACTG <u>CAG</u> TCGACACGCAATCCACACCAAGCTCAG
<i>Bam</i> HI-Kan-F	扩增卡那霉素抗性基因	ATAGGATCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC
<i>Bam</i> HI-Kan-R	amplification of kanamycin resistant gene	ATAGGATCCGAGCTGCTTCAAGTTCCTA
<i>ExsA</i> -outF	鉴定靶基因外部序列	GCAATGAGCATAGGGTCATGTTTCAGGTAGAG
<i>ExsA</i> -outR	amplification of external sequence of the target gene	GTTGAGCTTCTGAGCGCATCTTCGATATG
<i>ExsA</i> -InF	鉴定靶基因内部序列	CACGTACATCATTGGCAGTGACACTC
<i>ExsA</i> -InR	amplification of internal sequence of the target gene	CTCCTTGAACACCGTCAGGCTAGTG

注: 下划线字母代表酶切位点序列

Notes: underlined letters indicated the restriction enzyme recognition sequence

入大肠杆菌 β 2155菌株,铺LB平板[Amp, 50 μ g/mL, 0.5 mmol/L二氨基庚二酸(DAP)], 30 $^{\circ}$ C培养至单克隆形成。此克隆即为用于接合实验的供体菌株 β 2155/pCVD442- Δ ExsA-Kan。

1.7 接合实验及ExsA基因替换菌株筛选

挑取LB平板上生长好的杀香鱼假单胞菌NB2011单克隆入5 mL LB; β 2155/pCVD442- Δ ExsA-Kan单克隆入5 mL LB(Amp, 25 μ g/mL), 30 $^{\circ}$ C, 220 r/min培养过夜。取500 μ L供体菌 β 2155/pCVD442- Δ ExsA-Kan菌液与1000 μ L受体菌(NB2011)菌液混合(体积比1:2), 轻轻吹打混合后, 6000 r/min离心5 min, 收集菌体, 无抗性LB培养液(DAP, 0.5 mmol/L)洗涤1次, 菌体重悬于1 mL LB培养液(DAP, 0.5 mmol/L)中, 取100 μ L铺到0.22 μ m无菌滤膜上, 30 $^{\circ}$ C培养过夜。次日, 滤膜上菌体在5 mL生理盐水中吹打洗脱, 取40 μ L菌液涂布于含有Kan (25 μ g/mL)的LB平板, 30 $^{\circ}$ C培养过夜。在Kan抗性平板上, 随机挑选15个克隆, 分别挑入20 μ L LB培养基, 采用外侧引物进行PCR检测。选择扩增产物长度略大于原始克隆扩增产物长度(原始菌株扩增长度3475 bp; ExsA被Kan抗性基因替代菌株扩增长度4168 bp)的克隆, 这些克隆应该是ExsA基因打靶质粒直接完成基因替换后的阳性克隆。

取上述第1号克隆的菌液划线接种LB蔗糖平板(含10%蔗糖, 无NaCl), 30 $^{\circ}$ C培养至单克隆形成。随机挑选1个克隆接种5 mL LB(Kan, 25 μ g/mL), 30 $^{\circ}$ C培养过夜。次日取菌液, 分别采用外侧和内部引物, 进行PCR鉴定。ExsA外侧引物扩增产物长度4000~5000 bp, 内部引物鉴定结果阴性克隆即为ExsA基因被卡那霉素抗性基因取代的克隆, 命名为NB2011/ Δ ExsA-Kan(Δ exsA NB2011)。

1.8 突变株对J774细胞的黏附和胞内增殖特性检测

突变株对J774细胞的黏附和胞内增殖特性的检测参照已有方法^[6], 分别以野生型和突变型菌株在DMEM完全培养液中感染细胞[感染倍数(multiplicity of infection, moi) = 10:1], 继续培养。30 min后检测黏附在J774单细胞层上的细菌数量: 以PBS清洗细胞6次, 加入500 μ L 1% Triton X-100裂解细胞, 经平板培养法测量活菌落数; 检测内化的细菌数量时, 细胞经PBS清洗后以添加200 μ g/mL庆大霉素的DMEM培养基孵

育2 h, 杀死胞外细菌, 然后经相同程序清洗、裂解和活菌数量检测, 黏附和內化比率为3次重复实验中两孔的平均值; 检测细菌在巨噬细胞内的增殖数量时, 以含10 μ g/mL庆大霉素的DMEM培养基继续培养细胞, 并以此时作为零点, 每隔4 h, 除去培养基, 经相同方法裂解、检测活菌数量, 重复3次取平均值。

1.9 突变株对大黄鱼的LD₅₀检测

平均体质量(75 \pm 15) g的健康大黄鱼幼鱼, 随机分成5组, 每组10尾, 充气暂养于直径1 m的圆型水族箱中, 实验开始前适应7 d。1~4组每尾鱼在胸鳍基部注射0.2 mL浓度分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 和 1.0×10^8 CFU/mL的NB2011 Δ ExsA活菌液, 第5组则注射相同剂量的 1.0×10^5 CFU/mL NB2011活菌液, 对照组注射0.2 mL无菌生理盐水。记录10 d内的发病和死亡情况, 并进行病原的再分离确定死亡原因。经SPSS17.0的机率单位加权回归法(Bliss)计算96 h的LD₅₀。

1.10 突变株感染大黄鱼的超微病理分析

电镜超薄切片依常规方法制备。在人工攻毒后0、24、48和72 h, 分别无菌采取实验鱼的肝脏、肾脏和脾脏组织, 以解剖刀切割成1 mm \times 1 mm \times 1 mm的小块, 加入锇酸和戊二醛进行双重固定, 于4 $^{\circ}$ C保存。经乙醇梯度脱水后, 将组织样品置于丙酮和Spurr树脂的混合液中, 然后移入装有包埋剂的小管, 70 $^{\circ}$ C加热9 h。包埋后样品经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧钨50%乙醇饱和溶液各染色15 min, 超薄切片, 以H-7650透射型电子显微镜(TEM, 日立)观察, 拍照。

2 结果

2.1 打靶片段的扩增和克隆载体的构建

分别以上下游打靶引物扩增NB2011基因组DNA, PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测到了预期的目的片段, 预期长度分别为904和977 bp(图1-a)。在氨苄平板上生长的16个克隆子经菌液PCR后, 除1、8和16号克隆无预期目的片段, 呈阴性外, 其他克隆子均扩增出了1881 bp的预期片段(图1-b), 初步表明重组载体构建成功。

2.2 打靶载体的构建

自pKD4质粒上成功扩增到卡那霉素抗性基

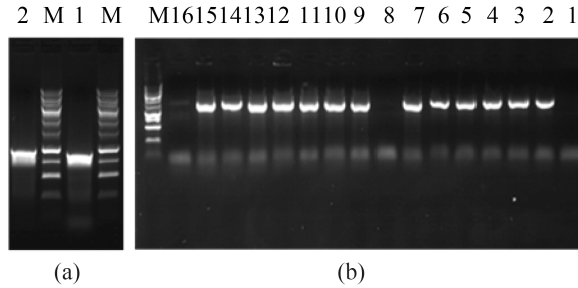


图1 打靶片段的PCR扩增和打靶载体的构建

(a) 打靶片段的PCR扩增结果; M. 10 kb DNA ladder; 1. 上游同源重组臂, 长度904 bp; 2. 下游同源重组臂, 长度977 bp; (b) 打靶载体的构建, 1~16. 第1~16号克隆的扩增结果, 阳性克隆PCR产物长度1881 bp

Fig. 1 PCR amplification of the targeted fragments and construction of the targeting vector

(a) PCR amplification of the targeted fragments; M. 10 kb DNA ladder; 1. upstream homologous arm, 904 bp; 2. downstream homologous arm, 977 bp; (b) construction of targeting vector; 1~16. PCR amplification of No. 1~16 clones, respectively, the length of the PCR product of positive clones is 1881 bp

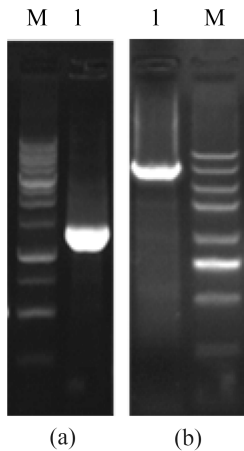


图2 卡那霉素抗性基因的克隆和打靶载体的构建

M. 10 kb DNA ladder; (a) 1. 卡那霉素抗性基因表达框扩增产物, 长度1519 bp; (b) 1. 完整打靶片段的PCR验证, 长度3360 bp (引物为ExsA-5F和ExsA-3R)

Fig. 2 PCR amplification of the kanamycin resistance gene and identification of the targeting plasmid

M. 10 kb DNA ladder; (a) 1. PCR product of kanamycin resisting gene, with the length of 1519 bp; (b) 1. PCR identification of the whole targeting fragment with the expected length of 3360 bp (primers: ExsA-5F and ExsA-3R)

因, 预期长度1519 bp (图2-a)。将卡那抗性基因克隆入pUC19-ExsA载体后获得重组质粒pUC19-ExsA-Kan; 在此载体上以BamH I将ExsA-Kan片段切下, 克隆入pCVD442, 重组质粒经PCR扩增到了约3360 bp的特异性片段, 表明成功获得打靶载体pCVD442-ΔExsA-Kan(图2-b)。

<http://www.scxuebao.cn>

2.3 供体菌的构建、接合实验及ExsA基因替换菌株筛选

打靶载体pCVD442-ΔExsA-Kan电转化入*E. coli* β2155后获得菌株β2155/pCVD442-ΔExsA-Kan, 用作接合实验的供体菌。通过杂交, 质粒PCVD442-ΔExsA-Kan从供体菌穿梭进入受体菌杀香鱼假单胞菌NB2011, 在Kan抗性平板上随机挑选的5个克隆以外侧引物PCR检测结果显示, 所有克隆的扩增产物长度均略大于原始克隆的扩增产物长度(图3-a)。这些克隆应该是ExsA基因打靶质粒直接完成基因替换后的阳性克隆。其中克隆1继续通过10%蔗糖LB平板筛选, 生长的克隆经PCR扩增(图3-b), ExsA外侧引物扩增产物长度4000~5000 bp, 内部引物鉴定结果为阴性, 表明获得同源重组菌株NB2011/ΔExsA-Kan。

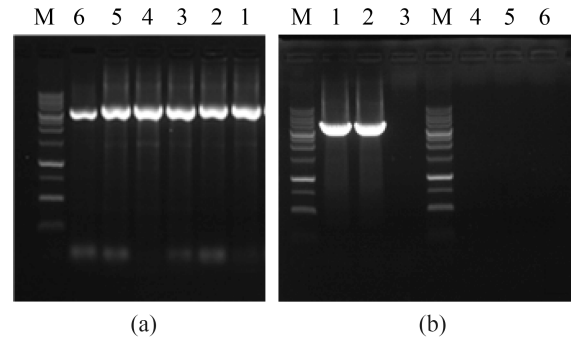


图3 卡那平板生长菌株的PCR鉴定及蔗糖平板上生长克隆的内外侧引物PCR鉴定

(a) 接合实验卡那平板生长菌株的PCR鉴定; M. 10 kb DNA ladder; 1~5. 第1~5号克隆的扩增结果; 6. 原始菌株的扩增结果; (b) 蔗糖平板上生长克隆的内外侧引物PCR鉴定; 1、2. ExsA基因外侧引物扩增结果, 平行管; 3. 阴性对照; 4、5. ExsA基因内侧引物扩增结果, 平行管; 6. 阴性对照

Fig. 3 PCR identification of clones growing on LB agar with kanamycin or sucrose agar

(a) PCR identification of clones grew on kanamycin agar after conjugation experiment; M. 10 kb DNA ladder; 1~5. PCR products of clones of no. 1~5, respectively; 6. PCR product of the wild strain; (b) PCR identification of clones grew on sucrose agar; 1, 2. amplification products with the primers targeted the external sequence; 3. the negative control; 4, 5. amplification products with the primers targeted the internal sequence; 6. the negative control

2.4 突变株对大黄鱼的LD₅₀检测

制备野生菌株NB2011和突变菌株ΔExsA NB2011不同浓度的菌悬液, 分别经腹腔注射感染健康的大黄鱼幼鱼, 统计了攻毒后9 d内实验鱼的发病和死亡情况(表2)。从刚死病鱼内脏中

表2 野生和突变菌株的人工感染大黄鱼实验

Tab. 2 Artificial challenge of *L. crocea* against the wild and mutant strains of NB2011

组别 groups	菌液浓度/(CFU/mL) concentration of bacteria	菌株 strain	实验鱼数/尾 no. of samples	攻毒后9 d内累计死亡数量/尾 cumulative mortality in nine days post challenge									死亡率/% mortality
				1	2	3	4	5	6	7	8	9 d	
1	1.0×10 ⁸	ΔExsA	10	0	0	1	7	8	9	10	10	10	100
2	1.0×10 ⁷	ΔExsA	10	0	0	1	3	5	6	6	6	6	60
3	1.0×10 ⁶	ΔExsA	10	0	0	0	2	0	3	4	5	5	42
4	1.0×10 ⁵	ΔExsA	10	0	0	0	0	0	1	1	2	3	30
5	1.0×10 ⁵	NB2011	10	0	0	4	7	8	10	10	10	10	100
6	0.75% NaCl		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

重新分离出与NB2011形态和理化特性相同的细菌,表明死亡是由人工感染引起。经SPSS17.0计算突变菌株感染96 h内的LD₅₀为2.59×10⁷ CFU/mL。

2.5 突变株对鼠巨噬细胞J774的黏附和胞内增殖情况

将不同时间处理获得的样品涂布于假单胞菌显色平板上,培养28 h后进行计数(图4)。结果表明ExsA的突变对于菌体对巨噬细胞的黏附基本没有影响,对应时间点为-2 h;但降低了菌体的内化率,对应的时间点为0 h;并且,突变菌体内化后细菌数量持续减少,对应的时间点为0~12 h,随着时间推移,胞内菌体减少至检测不出,表明菌体被消化降解后清除。而同期野生株在细胞内的数量呈现先下降后增加的趋势,0~2 h内菌体数量骤降,2~8 h内维持很低的数量,但12~28 h细菌数量倍增。

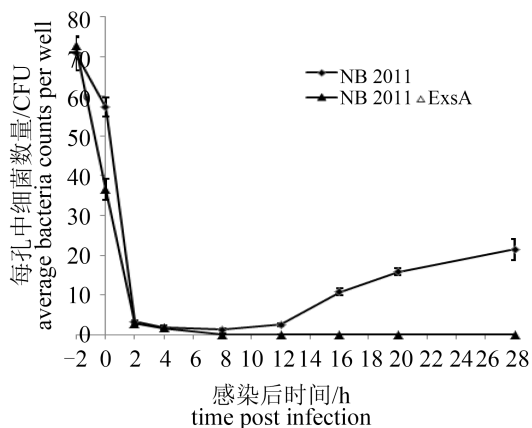


图4 突变株与野生株对巨噬细胞J774的黏附、内化和胞内增殖情况

Fig. 4 Adhesion of macrophage J774, internalization and intracellular reproduction of the wild and mutated strains of ΔExsA NB2011

2.6 突变株感染大黄鱼的超微病理观察

以野生株和突变株分别感染健康大黄鱼,检测感染后72 h内内脏组织的病变和菌体增生情况(图版)。结果发现,健康鱼组织细胞界限分明,胞内细胞器完整(图版-1~3);野生株感染48 h后,大黄鱼肝脏、肾脏、脾脏中出现菌体,均位于巨噬细胞中(图版-4~6);至72 h,组织中出现大量菌体,部分巨噬细胞破裂,菌体释放到周围组织(图版-5,图版-7,8);而突变株感染鱼组织中72 h内未检测到菌体,组织结构有序,细胞形态正常,巨噬细胞内含大量残余小体,未观察到明显病变(图版-9)。感染24 h则所有实验鱼组织中未观察到菌体和明显病变。

3 讨论

III型分泌系统是一些革兰氏阴性病原菌发挥致病性的重要武器,如耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、志贺氏菌属(*Shigella*)种类、铜绿假单胞菌和迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)等^[4]。ExsA是铜绿假单胞菌T3SS的转录调控蛋白,ExsA正向调控T3SS相关蛋白的表达,突变菌毒力减弱,这在铜绿假单胞菌和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中均已得到验证^[7-8]。本实验构建的杀香鱼假单胞菌T3SS ExsA基因缺失突变菌株也表现出明显的毒力下降,与野生株^[9]相比,人工感染中菌株对大黄鱼的毒力降低了约190倍;相同感染浓度(1×10⁵ CFU/mL)条件下,野生株感染鱼第3天出现40%死亡,而突变株无死亡;毒力的降低也表现在对离体培养细胞的感染特性及大黄鱼感染的组织病理中,野生株感染后,J774细胞和鱼体内脏巨噬细胞内持续存在大量菌体,表现了野

生株在巨噬细胞内存活和增殖特性；而突变株感染J774细胞之后，内化的细胞数量持续下降，至12 h被全部清除，感染鱼内脏巨噬细胞中也未观察到活菌体的存在，提示了巨噬细胞能够有效清除突变菌，T3SS是该菌在巨噬细胞内生存和增殖所必需的。本研究推测*ExsA*的突变导致效应蛋白的表达关闭，其中已验证了一重要效应蛋白PP_exoU在突变株中不表达，该蛋白拥有磷脂酶A1活性，可能与该菌在巨噬细胞的胞内存活和增殖相关^[10]，推测其他种类的效应分子也不表达，这应该是突变株毒力减弱，从而被机体迅速清除的重要原因。不过，本实验中突变株的毒力并未完全去除，表明该菌还存在其他的毒力因子和致病机制，需要进一步研究。

本实验野生株经替换突变后原*ExsA*基因内部序列被卡那霉素抗性基因代替，并且使相应序列长度增加(从3475增加到4168 bp)，序列和长度的改变可能会影响下游基因的表达，从而增加突变株表型的复杂性和不确定性。本研究的初衷是实现*ExsA*基因的无痕缺失突变，曾数次尝试将表达FLP重组酶的质粒(pCP20TC)经电转化进入NB2011/ Δ *ExsA*-Kan，预期在重组酶的作用下Kan抗性基因被剔除，最终获得*ExsA*基因敲除株，但未能成功。此方法在数种其他革兰氏阴性菌中已成功应用^[11-13]，但在杀香鱼假单胞菌中不能实现，推测可能是pCP20TC在该菌中表达水平较低，或者重组酶的活性受到抑制，具体机制有待阐明。

迟缓爱德华氏菌是海水鱼类的重要病原菌，其T3SS是该菌实现巨噬细胞内增殖的重要毒力因子，编码和表达多种效应蛋白，包括*EseB*、*EseC*和*EseD*等，此3基因敲除的突变株在鼠巨噬细胞中不增殖^[14]。联合敲除效应蛋白基因*EseB*、*EseC*、*EseD*和转位蛋白*EscA*及*aroC*基因，获得的突变株毒力比野生株减弱了5700倍，激发了显著的细胞和体液免疫，为牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)提供了有效保护^[6]。针对杀香鱼假单胞菌，前期研究和本实验中均观察到了NB2011株在大黄鱼巨噬细胞内的生存和增殖现象^[1]；同迟缓爱德华氏菌一样，减毒疫苗免疫应该是预防此类感染的重要途径。本研究通过对*ExsA*基因的替换突变成功获得了毒力减弱的杀香鱼假单胞菌菌株，为阐明T3SS在该菌致病机制中的作用、开展弱毒疫苗研究迈出了第一步。深入研

究并尝试联合敲除多个效应蛋白或毒力因子的基因，或许可获得重大进展。

参考文献：

- [1] Mao Z J, Ye J, Li M F, *et al.* Vaccination efficiency of surface antigens and killed whole cell of *Pseudomonas putida* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology* 2013, 35(2): 375-381.
- [2] Zhang, J T, Zhou S M, An S W, *et al.* Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Journal of Fish Diseases* 2014, 37(2): 113-121.
- [3] Mao, Z J, Li M F, Chen J G. Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Genome Announcements* 2013, 1(4): e00586-13.
- [4] Coburn, B, Sekirov I, Finlay B B. Type III secretion systems and disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(4): 535-549
- [5] 罗勤, 金守光. 铜绿假单胞菌III型分泌系统的分子调控机制[J]. *微生物学报*, 2008, 48(10): 1413-1417.
Luo Q, Jin S G. Molecular determinants in regulating *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10): 1413-1417(in Chinese).
- [6] Xiao, J, Chen, T, Liu, B, *et al.* *Edwardsiella tarda* mutant disrupted in type III secretion system and chorismic acid synthesis and cured of a plasmid as a live attenuated vaccine in turbot[J]. *Fish & Shellfish Immunology* 2013, 35(3): 632-641.
- [7] Zhou X H, Shah DH, Konkel M E, *et al.* Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD[J]. *Molecular Microbiology* 2008, 69(3): 747-764.
- [8] Lee E J, Evans D J, Fleiszig S M. Role of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA in penetration through corneal epithelium in a novel *in vivo* model[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; 44(12): 5220-7.
- [9] 邱杨玉, 郑磊, 毛芝娟, 陈孝煊等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的病原分离和组织病理学观察[J]. *微生物通报*, 2012, 39(3): 361-370.
Qiu Y Y, Zheng L, Mao Z J, *et al.* Isolation and

- identification of the causative agent and histopathology observation of white-spots disease in internal organs of *Larimichthys crocea*[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(3): 361-370 (in Chinese).
- [10] Zhang J, Wang Y, Guo H, *et al.* Identification and characterization of a phospholipase A1 activity type three secreted protein, PP_exoU from *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011, the causative agent of visceral granulomas disease in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, doi: 10.1111/jfd.12565.
- [11] 何素芬, 原志伟, 朱国强. 禽致病性大肠杆菌 I 型菌毛 *fimH* 基因缺失突变株的构建及部分生物学特性的分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(2):252-256.
- He S F, Yuan Z W, Zhu G Q. Construction and characterization of type I fimbriae *fimH* deletion mutant from avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(2): 252-256 (in Chinese).
- [12] 冉金宝, 廖翔, 周围, 等. 弗氏志贺菌 M90T 毒力相关膜蛋白复合物组成基因缺失突变体的构建[J]. *生物技术通讯*, 2012, 23(6): 777-710.
- Ran J B, Liao X, Zhou W, *et al.* Construction of gene knock-out mutants of components of a virulence related membrane protein complex of *Shigella flexneri* M90T[J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(6): 777-710 (in Chinese).
- [13] 董立伟. 肠炎沙门氏菌鞭毛素 *fliC* 基因缺失突变株的构建及相关功能性分析[D]. 扬州:扬州大学, 2014.
- Dong L W. Establishment of *fliC* deletion mutant from *Salmonella enteritidis* and corresponding function analysis[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014 (in Chinese).
- [14] Okuda J, Kiriya M, Suzaki E, *et al.* Characterization of proteins secreted from a type III secretion system of *Edwardsiella tarda* and their roles in macrophage infection[D]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 84(2): 115-121.

Construction of ExsA, the transcription regulator of Type III secretion system mutated *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011, and characterization of the virulence against large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

ZHANG Jie¹, GUO Haijie², GAO Liting¹, MAO Zhijuan^{1*}

(1. Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

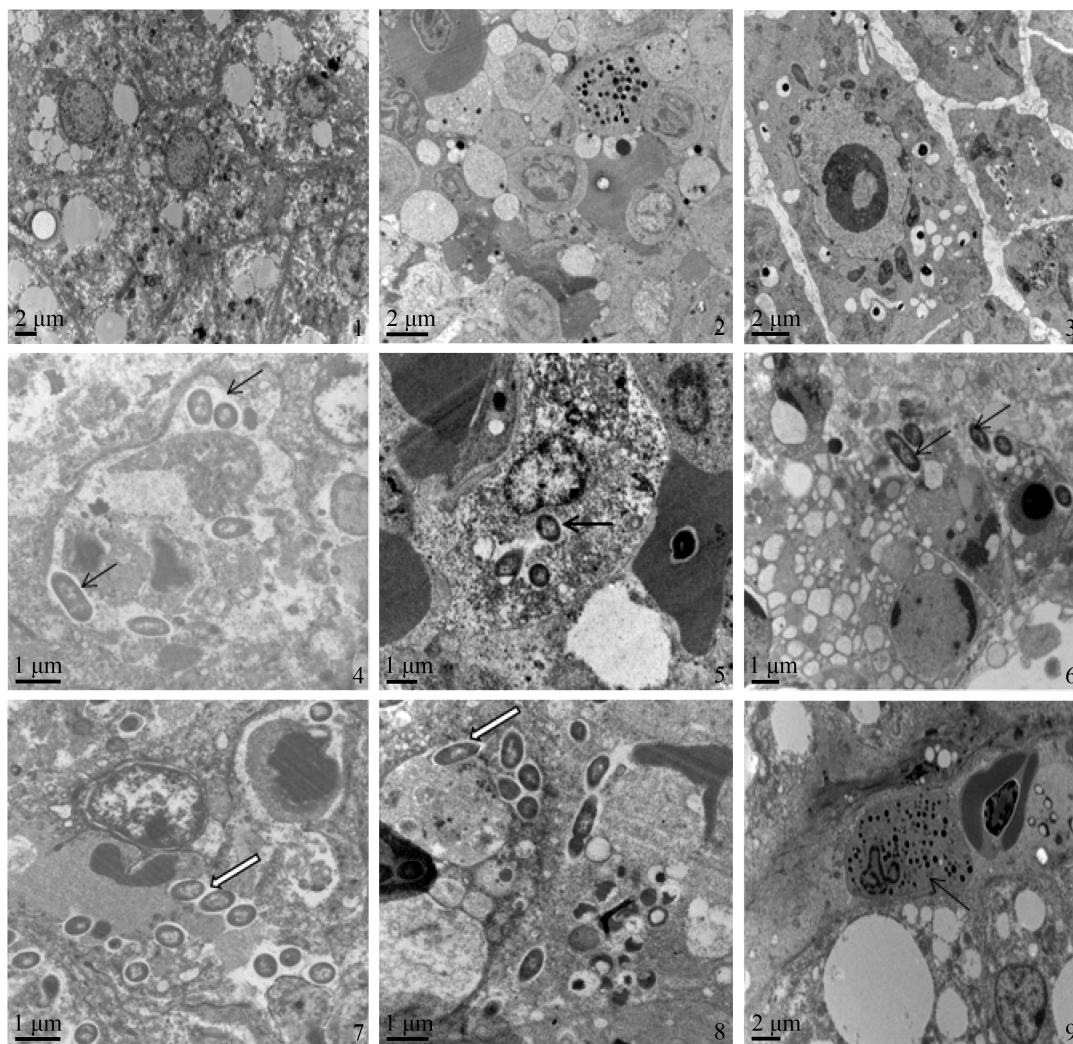
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Pseudomonas plecoglossicida* has been reported as the causative agent of the visceral granulomas disease in farmed *Larimichthys crocea*. The pathogenic strain NB2011 encodes a typical type III secretion system, which is present in many Gram-negative pathogens, and may be an important virulence factor of this strain. ExsA, the transcription regulator of this system, is essential for the type III expression and function. In this study, the mutant strain Δ ExsA NB2011 was obtained by the method of double homologous recombination whose internal sequence of the *ExsA* gene of NB2011 was replaced by a kanamycin resisting gene. Adhesion, internalization of macrophage J774, and intracellular replication of the mutant strain were detected, LD₅₀ of artificial challenge was tested, and the ultrastructure pathology of infected fish was investigated. Compared to the wild strain, the number of the internalized mutant strain in the macrophages was a little lower, the number decreased in several hours and was too low to be detected in 12 h; while the number of wild strain increased after 12 h post internalization; LD₅₀ of the mutant strain increased to over 190 times the wild strain; TEM observation results showed the wild bacteria survived and replicated in macrophages of the infected fish, while no mutant bacteria were observed in the fish tissue during the experiment time. The results indicated a dramatic virulence attenuation of Δ ExsA NB2011. The strain may serve as a good candidate for vaccine development.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Pseudomonas plecoglossicida*; type III secretion system transcription regulator ExsA; mutation; virulence

Corresponding author: MAO Zhijuan. E-mail: mzjjane@hotmail.com

Funding projects: Natural Scientific Funds of Zhejiang Province (LY15C190006); Project Supported by the Key Laboratory of Zhejiang Province (1740002280); Innovation Team Project of Ningbo Science and Technology Bureau (2015C110005, 2015C110018)



图版 野生株和突变株感染大黄鱼的组织病理观察

1~3. 健康对照鱼肝脏、脾脏和肾脏组织; 4~6. NB2011株感染48 h大黄鱼的脾脏、肾脏和肝脏组织中的巨噬细胞, 黑色箭头代表菌体; 7~8. NB2011感染72 h鱼的脾脏和肾脏组织中的巨噬细胞, 白色箭头指示细胞膜破裂; 9. Δ exsA NB2011感染72 h大黄鱼的肝脏组织, 黑色箭头表示正常巨噬细胞中大量残余小体

Plate Tissue pathology of *L. crocea* infected by mutated and wild strains of *P. plecoglossicida* NB2011

1-3. the tissue of liver, spleen and kidney from healthy control fish, respectively; 4-6. macrophages in the tissue of liver, spleen and kidney from NB2011 infected fish 48 h post infection, black arrows indicated the bacteria; 7-8. macrophages in the tissue of NB2011 infected fish 72 h post infection, the white arrow indicated the broken cell membrane; 9. the liver tissue from Δ exsA NB2011 infected fish 72 h post infection, the black arrow suggested plenty of residual bodies in a macrophage