

## 溶藻弧菌双组分调控系统 KdpDE 减毒活疫苗的构建 及其免疫效果评价

张燕飞<sup>1,2,3,4</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>,  
汤菊芬<sup>1,2,3</sup>, 吴灶和<sup>2,3,6\*</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. 肇庆市水产技术推广中心, 广东 肇庆 526060;
5. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

**摘要:** 为了研究溶藻弧菌双组分调控系统 KdpDE 减毒活疫苗对鱼体的免疫保护作用, 本研究采用 Overlap PCR 和同源重组技术, 构建了 *kdpD/kdpE* (*kdpDE*) 基因无标记基因框内敲除突变株。对野生株和缺失突变株的生物学特性及致病性进行了比较研究, 发现 *kdpDE* 的缺失对溶藻弧菌的生长速率和胞外蛋白酶活性的影响不明显, 但是突变株的泳动能力、生物被膜形成能力较野生株下降。斑马鱼致病性实验结果显示, 突变株毒力下降 78.5 倍, 表明减毒株构建成功, 可以作为减毒活疫苗的候选菌株。突变株在鱼体内存活能力实验结果显示, 注射免疫 7 d 后, 鱼体内未检测到该菌。以突变株  $\Delta kdpDE$  为抗原, 分别用注射和浸泡的方式免疫斑马鱼, 免疫后第 28 天用溶藻弧菌和哈维氏弧菌攻毒, 评估该疫苗候选株及不同免疫方式对斑马鱼的保护效果。实验结果表明, 免疫后的斑马鱼能够抵抗溶藻弧菌的感染, 其中注射免疫组的免疫保护率达 83.3%, 浸泡免疫组次之 (66.7%); 同时, 该减毒活疫苗能刺激斑马鱼对哈维氏弧菌产生交叉保护效应, 其中注射免疫组的免疫保护率为 65.5%, 浸泡免疫组为 55.2%。以上结果表明, *kdpDE* 基因敲除突变株可能是抵抗溶藻弧菌感染的有效候选减毒活疫苗。

**关键词:** 溶藻弧菌; KdpDE; 减毒活疫苗; 斑马鱼; 免疫保护率

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

双组分调控系统 (two-component regulatory system) 是细菌信号转导机制的重要因子之一, 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>[1-2]</sup>。双组分调控系统 KdpDE 是由组氨酸激酶 KdpD 和反应调控因子 KdpE 组成的, 其能感知环境中  $K^+$  缺少或高渗透压胁迫, 从而调控下游相关基因的表达以适应环境压力。KdpD 是一种感应蛋白, 其 N 端含有 ATP 结合位点, C 端结构域含有组氨酸磷

酸化位点。当外界信号作用于激酶的膜外配体结合区时, KdpD 的 ATP 结合部位被激活, 水解 ATP 使 KdpD 发生自身磷酸化。随后, 磷酸基团转移到 KdpE 的天冬氨酸位点上并使 KdpE 发生磷酸化。磷酸化的 KdpE 与 KdpFABC 的启动子结合, 启动 KdpFABC 的转录, 进而维持胞内正常的  $K^+$  水平和渗透压<sup>[3-5]</sup>。KdpDE 系统不仅参与细菌耐受环境压力的调控, 也与维持部分细菌的毒性密切相关, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 在侵染过程中, 由自然环境进入到高  $K^+$

收稿日期: 2015-01-26 修回日期: 2015-07-10

资助项目: 广东省海洋经济创新发展区域示范专项 (GD2012-B01-004); 国家科技支撑计划 (2012BAD17B02、2012BAD17B03); 广东高校国际合作创新平台 (2013gjh0008)

通信作者: 吴灶和, E-mail: wuzaohe@163.com

水平的宿主体内环境,其 KdpDE 转录水平发生上调,从而引起外毒素基因表达水平上升<sup>[6]</sup>。

近年来,随着养殖环境的恶化,溶藻弧菌引起的弧菌病频繁暴发,严重影响了水产经济动物养殖业的健康发展<sup>[7-8]</sup>。目前,细菌病的治疗仍是以抗生素为主,由抗生素长期使用而带来的细菌耐药现象和水产品的药物残留问题不容忽视<sup>[9]</sup>。免疫防控是通过激发机体自身的免疫防御系统来提高机体对病害的抵抗能力<sup>[10]</sup>,可在很大程度上避免细菌耐药性和药物残留的问题,且具有较好的防病效果。因而,鱼类疫苗的研发与应用受到广泛关注。KdpDE 双组分调控系统是调控细菌毒力的重要组分之一,本实验利用 Overlap PCR 和同源重组方法构建了一株溶藻弧菌 *kdpDE* 双基因突变株,检测 *kdpDE* 基因敲除后对细菌生物学性状和毒力的影响,并评价该突变株在鱼体中的存活能力及其免疫保护效果,将为弧菌减毒活疫苗的研究和应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和实验鱼

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 强毒株

HY9901 分离自广东省湛江港海域患病红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 鱼体,哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 强毒株 ZJ0706 分离自广东省湛江市养殖鱼排患病红笛鲷,两者保存于广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存;大肠杆菌 MC1061 ( $\lambda$ pir)、S17-1 ( $\lambda$ pir) 和自杀质粒 pRE112 由中国科学院水生所惠赠;实验用斑马鱼 (*Danio rerio*) 购自霞山水产市场,每尾鱼体长 3~4 cm,体质量 0.2 g 左右,健康,游动活跃,无外伤,水温调节至 28 °C,在室内实验箱暂养 2 周后用于实验。

### 1.2 试剂和引物

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;pMD18-T 载体、Ex Taq DNA 聚合酶、Prime STAR™ HS DNA 聚合酶、Kpn I、Sac I 和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;引物由上海生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 本研究所用的引物序列

Tab.1 Sequence of primers in the study

引物 primers	序列 sequence(5' →3')	酶切位点 restriction site
<i>kdpD1</i>	ATGAGCTTCAAATCTCGCTT	
<i>kdpD2</i>	TTAGATTGCGAGAAGTGTGA	
<i>kdpE1</i>	ATGGAACAACAGGCAATC	
<i>kdpE2</i>	TTAGAGTCTTGGCTGAAA	
<i>kdpD</i> -for	GGGGTACCTGTGTAGCACCATAAATCGTT	Kpn I
<i>kdpD</i> -int-rev	ATTGACGAAGGTAAAAATGGGAACGGATTACAACCCT	
<i>kdpD</i> -int-for	CATTTTACCTTCGTCAAT CAC	
<i>kdpD</i> -rev	C GAGCTCACACTAATCCATCTTGCG	Sac I
<i>kdpE</i> -for	GGGGTACCAAGGTATTTCCGGCAATGGAT	Kpn I
<i>KdpE</i> -int-rev	ATCAACGCCTGCTTCTACTTGGTGTCCCTTGAAACTT	
<i>KdpE</i> -int-for	GAAGCAGCGTTGAT GACTAC	
<i>kdpE</i> -rev	GGGGTACCTTTAGGGTTGTAATCCGTTCC	Sac I
16S rRNA1	TTGCGAGAGTGAGCGAATCC	
16S rRNA2	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG	

### 1.3 *kdpD* 和 *kdpE* 基因的克隆

以溶藻弧菌总 DNA 为模板,分别用引物 *kdpD1/kdpD2* 和 *kdpE1/kdpE2* 进行 PCR 扩增。2 个基因的 PCR 反应条件均为 94 °C 预变性 4 min;94 °C 30 s,62 °C 40 s,72 °C 60 s,共 35 个循

环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后,用切胶试剂盒进行切胶回收。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接(载体与插入片段物质的量的比为 1:3),然后转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,菌落 PCR 鉴定后阳性克隆送

上海生物工程有限公司测序。

#### 1.4 缺失株的构建及鉴定

参照方法<sup>[11]</sup>略改动。采用 Overlap PCR 的技术,通过两步 PCR 得到缺失片段。第一步,用特异性引物 *kdpE*-for/*KdpE*-int-rev 和 *KdpE*-int-for/*kdpE*-rev,分别扩增 *kdpE* 基因的上、下游片段;第二步,以上、下游序列为模板,上游序列 3' 端和下游序列 5' 端包含 15 bp 的互补序列,用引物 *kdpE*-for 和 *kdpE*-rev 进行 PCR 扩增,得到 *kdpE* 缺失片段。测序正确后,利用内切酶 *Kpn* I/*Sac* I 对 pRE112 自杀质粒和 *kdpE* 缺失片段分别进行双酶切,将酶切回收后的 pRE112 质粒和 *kdpE* 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- $\Delta$ *kdpE*。将质粒转化入 *E. coli* MC1061 感受态细胞,并涂布于 LB 平板(氯霉素终浓度为 25  $\mu$ g/mL),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- $\Delta$ *kdpE* 质粒的 *E. coli* S17-1 和溶藻弧菌 HY9901 至菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 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,去上清液,重悬菌体,并将重悬液接种于 TSA 平板上(无抗生素),28  $^{\circ}$ C 培养 24 h,此时发生第 1 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  $^{\circ}$ C 培养 48 h。挑取单菌落,以 *kdpE*-for 和 *kdpE*-rev 为引物进行菌落 PCR,筛选第 1 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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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 2 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 平板上,28  $^{\circ}$ C 培养 48 h。选取仅在没有抗性的平板上生长,而在含氯霉素的平板上不生长的单菌落,以 *kdpE*-for 和 *kdpE*-rev 为引物进行菌落 PCR 检测,并送测验证突变位点。根据测序碱基序列与融合片段碱基序列的一致性结果来判断该菌株是否为  $\Delta$ *kdpE* 缺失突变株。

以  $\Delta$ *kdpE* 敲除突变株为母本株,用上述方法敲除 *kdpD* 基因,构建  $\Delta$ *kdpDE* 双基因敲除突变株。

#### 1.5 突变株的遗传稳定性检测

将突变株  $\Delta$ *kdpDE* 分别接种至 TSA 平板上,连续盲传 30 代,用 PCR 方法检测,确定其遗传稳定性。

#### 1.6 细菌的生长速率比较

取等量(OD<sub>600</sub> 培养至 0.5)的野生株 HY9901 和突变株  $\Delta$ *kdpDE* 菌液,以 1:100 的比例接种到 TSB 培养基中,28  $^{\circ}$ C 振荡培养,每隔 1 h 测定 OD<sub>600</sub>,每组 3 个重复,取平均值,绘制生长曲线。

#### 1.7 胞外蛋白酶活性检测

参照方法<sup>[12]</sup>略改动,将野生株 HY9901 和突变株  $\Delta$ *kdpDE* 分别涂布于铺有无菌玻璃纸的 TSA 平板上,28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,用液体培养基冲洗细菌,4  $^{\circ}$ C 离心 30 min,过滤上清液,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  $^{\circ}$ C 温育 30 min。加入 10% (W/V)的三氯乙酸 400  $\mu$ L,室温静置 30 min 终止反应。离心 5 min 后,将上清液转移至新的离心管,加入 800  $\mu$ L NaOH 溶液(525 mmol/L)显色,测定溶液 OD<sub>442</sub>。

#### 1.8 细菌泳动实验

使用无菌牙签分别蘸取野生株 HY9901 和突变株  $\Delta$ *kdpDE*(OD<sub>600</sub> 培养至 0.5),点种于琼脂含量为 0.35% 的 TSA 平板上,每组设 3 个重复,28  $^{\circ}$ C 静置培养 24 h,用游标卡尺测定泳动圈直径。

#### 1.9 生物被膜形成能力检测

参照方法<sup>[13]</sup>略改动,将野生株 HY9901 和突变株  $\Delta$ *kdpDE*(OD<sub>600</sub> 培养至 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  $^{\circ}$ C 静置培养。在第 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<sub>570</sub>。

#### 1.10 半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)测定

分别接种野生株和突变株  $\Delta$ *kdpDE* 的单菌落至 TSB 液体培养基中,28  $^{\circ}$ C 振荡培养 18 h,以 4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用无菌 PBS 缓冲液清洗沉淀 2 次,细菌重悬至 OD<sub>600</sub> = 0.5(约 10<sup>8</sup> CFU/mL),10 倍梯度稀释菌液,取合适稀释

度涂布于 TSA 平板,进行菌落计数。确定野生株的注射浓度:  $9.21 \times 10^3$ 、 $9.87 \times 10^4$ 、 $1.10 \times 10^6$ 、 $9.71 \times 10^6$  和  $1.08 \times 10^8$  CFU/mL,  $\Delta kdpDE$  的注射浓度:  $9.87 \times 10^4$ 、 $9.77 \times 10^5$ 、 $9.52 \times 10^6$ 、 $1.03 \times 10^8$  和  $9.80 \times 10^8$  CFU/mL。

实验用鱼共 220 尾,随机分组,每组 20 尾,用加热棒将水温调节至 28 °C。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 PBS。记录 14 d 内实验鱼死亡数目,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,确定其是否由溶藻弧菌攻毒致死,并利用寇氏法<sup>[14]</sup> 计算突变株和野生株的半数致死剂量。

### 1.11 突变株在鱼体内的存活能力检测

实验用斑马鱼随机分为 5 组,每组 30 尾,用加热棒将水温调节至 28 °C。取浓度为  $10^6$  CFU/mL 的突变株  $\Delta kdpDE$ ,每尾肌肉注射 5  $\mu$ L 突变株菌液;对照组:每尾肌肉注射 5  $\mu$ L 生理盐水。注射完成后,每隔 1 d 取样,连续 7 d 取样。肾脏和脾脏是溶藻弧菌感染宿主的主要器官<sup>[15-17]</sup>,因此,可选取其为减毒株在鱼体内的存活能力的检测对象。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,于 28 °C 培养 24 h 后,统计板上菌落数。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 测序来确定板上菌落是否为目的菌。

### 1.12 疫苗的制备与接种

突变株  $\Delta kdpDE$  于 28 °C 摇瓶培养 18 h,无菌人工海水洗涤并悬浮,调节菌液浓度。实验鱼随机分为 4 组,每组 80 尾,用加热棒将水温调节至 28 °C。注射免疫组:每尾肌肉注射 5  $\mu$ L  $\Delta kdpDE$  菌液 ( $5 \times 10^7$  CFU/mL);对照组 1:每尾肌肉注射 5  $\mu$ L PBS;浸泡免疫组:用  $5 \times 10^6$  CFU/mL 浓度的  $\Delta kdpDE$  菌液连续充气浸泡未划痕鱼体,时长 30 min;对照组 2:正常饲养。

### 1.13 免疫保护率的测定

在免疫后第 28 天,每组各随机取鱼 30 尾,肌肉注射 5  $\mu$ L 溶藻弧菌 ( $5 \times 10^8$  CFU/mL);每组各随机取鱼 30 尾,肌肉注射 5  $\mu$ L 哈维氏弧菌 ( $5 \times 10^8$  CFU/mL);另从未免疫组取健康鱼 30 尾,肌肉注射 5  $\mu$ L 无菌生理盐水作为对照组 3。

用加热棒将水温调节至 28 °C,记录 14 d 内实验鱼死亡数目,直至死亡情况稳定,重新分离发病组织的细菌,确定其是否由活菌攻毒致死。实验结束后计算相对免疫保护率 (relative percentage survival, RPS)

$$RPS(\%) = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\% \text{ [18]}。$$

### 1.14 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,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 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 *kdpD* 和 *kdpE* 基因的克隆

PCR 扩增获得一条大小约 1 300 bp 的 *kdpD* 基因特异条带;以及一条大小约 730 bp 的 *kdpE* 基因特异条带(图 1)。测序结果显示,*kdpD* 包含一个 1 374 bp 的开放阅读框 (ORF),编码 457 个氨基酸;*kdpE* 包含一个 732 bp 的开放阅读框 (ORF),编码 243 个氨基酸。将 2 个基因提交至 GenBank,*kdpD* 登录号为 KJ544668,*kdpE* 登录号为 KJ476728。

### 2.2 敲除突变株的构建

以溶藻弧菌 HY9901 为模板,PCR 扩增得到 670 bp 的 *kdpE* 上游片段和 740 bp 的 *kdpE* 下游片段(图 2,泳道 1、2),用引物 *kdpE*-for/*kdpE*-rev 对野生株和缺失株  $\Delta kdpE$  基因组进行 PCR, HY9901 得到 1 602 bp 的片段, $\Delta kdpE$  扩增出 1 410 bp 的片段(图 2,泳道 3、4),对扩增产物进行 DNA 测序。测序结果表明碱基序列与野生型缺失 *kdpE* 内部片段后的碱基序列完全一致。以  $\Delta kdpE$  敲除突变株为模板,PCR 扩增得到 415 bp 的 *kdpD* 上游片段和 505 bp 的 *kdpD* 下游片段(图 2,泳道 5、6),用引物 *kdpD*-for/*kdpD*-rev 对野生株和缺失株  $\Delta kdpDE$  基因组进行 PCR, HY9901 得到 1 943 bp 的片段, $\Delta kdpDE$  扩增出 920 bp 的片段(图 2,泳道 7、8)。将扩增产物进行 DNA 测序,测序结果显示碱基序列与野生型缺失 *kdpD* 内部片段后的碱基序列吻合。

### 2.3 突变株的遗传稳定性

突变株  $\Delta kdpDE$  连续盲传 30 代后,用引物 *kdpD*-for/*kdpD*-rev 和 *kdpE*-for/*kdpE*-rev 检测

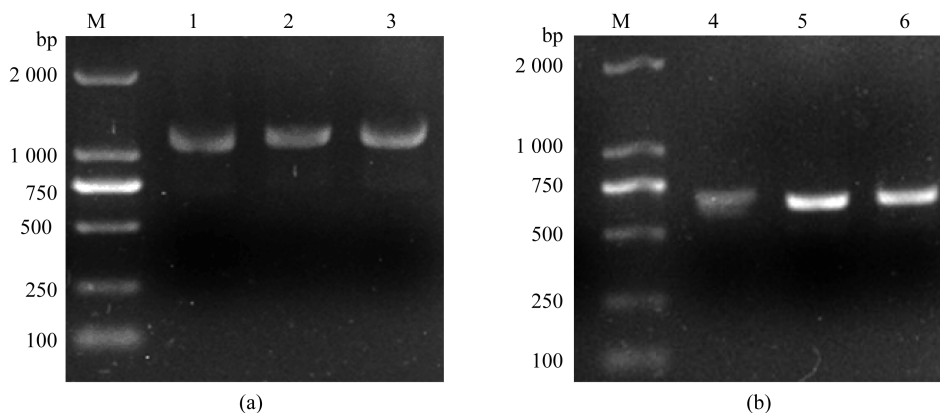


图1 *kdpD* 基因的克隆 (a) 和 *kdpE* 基因的克隆 (b)

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~3: *kdpD* PCR 产物; 4~6: *kdpE* PCR 产物

Fig. 1 Cloning by PCR of *kdpD* gene (a) and *kdpE* (b) gene

M: DNA marker DL2000; 1-3: *kdpD* PCR products; 4-6: *kdpE* PCR products

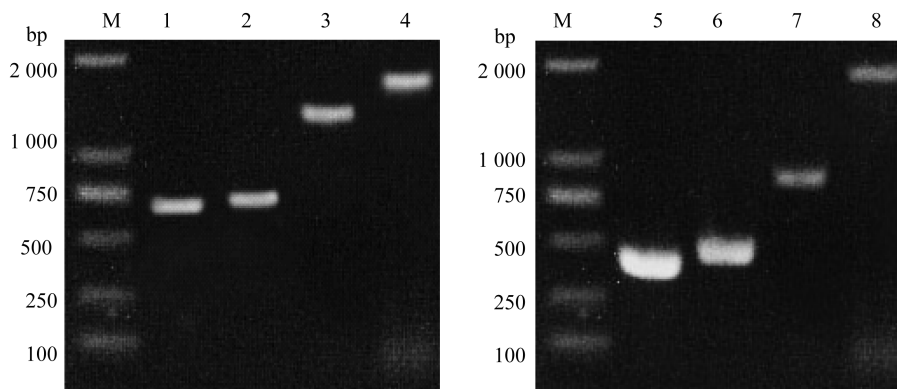


图2 突变株  $\Delta kdpDE$  的构建

M. DL2000; 1. *kdpE*-for/*kdpE*-int-rev PCR 产物; 2. *kdpE*-int-for/*kdpE*-rev PCR 产物; 3, 4. *kdpE*-for/*kdpE*-rev PCR 产物; 5. *kdpD*-for/*kdpD*-int-rev PCR 产物; 6. *kdpD*-int-for/*kdpD*-rev PCR 产物; 7, 8. *kdpD*-for/*kdpD*-rev PCR 产物; 其中 1, 2, 4~6 和 8 为野生株扩增条带; 3 为突变株  $\Delta kdpE$  扩增条带; 7 为突变株  $\Delta kdpDE$  扩增条带

Fig. 2 Construction of the knockout mutant strain  $\Delta kdpDE$

M. DL2000; 1. PCR products with *kdpE*-for/*kdpE*-int-rev; 2. PCR products with *kdpE*-int-for/*kdpE*-rev; 3, 4. PCR products with *kdpE*-for/*kdpE*-rev; 5. PCR products with *kdpD*-for/*kdpD*-int-rev; 6. PCR products with *kdpD*-int-for/*kdpD*-rev; 7, 8. PCR products with *kdpD*-for/*kdpD*-rev, genomic DNAs from the wild-type strain (lanes 1, 2, 4-6, 8), the mutant  $\Delta kdpE$  (lane 3) and mutant  $\Delta kdpDE$  (lane 7), were used as templates

$\Delta kdpDE$  的遗传稳定性,发现  $\Delta kdpDE$  能扩增出 920 和 1 410 bp 的特异性条带;阴性对照不加模板,发现不能扩增出特异性条带(图 3),表明突变株能稳定遗传。

#### 2.4 细菌的生长速率比较

将实验所得数据进行统计学分析,在同一时间点,溶藻弧菌野生株 HY9901 和突变株  $\Delta kdpDE$  的生长速率接近,无显著差异 ( $P > 0.05$ )。溶藻弧菌整个生长周期较短,生长迅速,于接种后 4 h 左右进入对数生长期,OD<sub>600</sub> 约为 1.5,在培养 12 h

后进入平台期,OD<sub>600</sub> 约为 2.7(图 4)。

#### 2.5 泳动性实验

将野生溶藻弧菌 HY9901 与突变株  $\Delta kdpDE$  接种于泳动平板上,其泳动结果如下,野生株泳动圈为 (21.33 ± 0.09) mm,突变株为 (17.17 ± 0.06) mm(图 5)。突变株  $\Delta kdpDE$  的泳动圈直径小于野生株 ( $P < 0.05$ ),说明缺失了 *kdpDE* 后,溶藻弧菌的泳动能力有所减弱。对 2 种菌的胞外蛋白酶进行检测,结果发现,溶藻弧菌缺失了 *kdpDE* 基因后,其胞外蛋白酶的活性没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

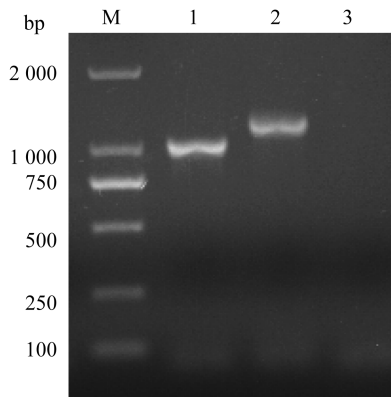


图 3 突变株的遗传稳定性

M:DL2000 分子量标准; 1 和 2 为  $\Delta kdpDE$  扩增条带; 3 为阴性对照

Fig. 3 Hereditary stability of the knockout mutants

M;DL2000 marker; 1;PCR products with *kdpD*-for/*kdpD*-rev; 2:PCR products with *kdpE*-for/*kdpE*-rev; the negative control group was 3

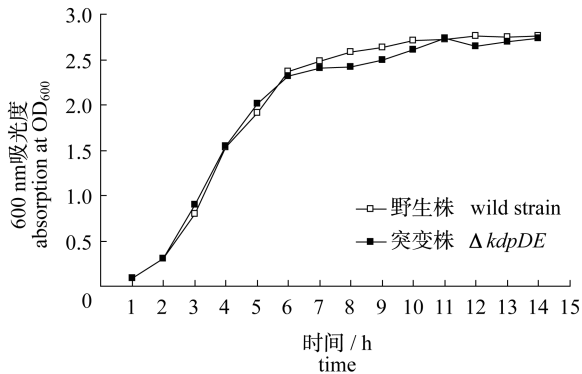


图 4 溶藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpDE$  的生长曲线

Fig. 4 Growth characteristics of the *kdpDE* mutant and *V. alginolyticus* HY9901



图 5 溶藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpDE$  的泳动能力

Fig. 5 Swarming ability of the *kdpDE* mutant and *V. alginolyticus* HY9901

## 2.6 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膜形成分别在第 48 和第 72 h,有极显著差异 ( $P < 0.01$ ,图 6),说明 *kdpDE* 的缺失可能会影响溶藻弧菌生物膜的形成。

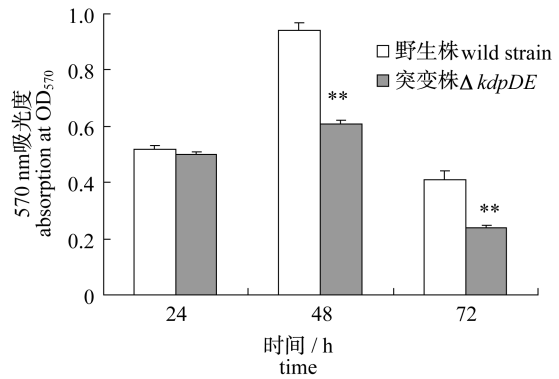


图 6 溶藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpDE$  的生物膜形成能力

Fig. 6 Biofilm formation of the *kdpDE* mutant and *V. alginolyticus* HY9901

## 2.7 半数致死剂量 ( $LD_{50}$ ) 测定

为了验证 *kdpDE* 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。突变株  $\Delta kdpDE$  的半数致死量比野生株提高了 78.5 倍(表 2)。对发病鱼进行观察,发现其出现下颌部和腹部发红肿大、体表充血、游动缓慢等症状。对濒死鱼脾脏、肝脏和肠道进行病原分离鉴定,证实是死于攻毒引发的感染。

## 2.8 突变株在鱼体内的存活能力检测

为了检测突变株在鱼体内的存活能力,以注射方式进行攻毒,在攻毒后 1 周内每隔 1 天,取鱼消毒,在无菌条件下分别取肾脏和肝脏称重,研磨后倍比稀释涂平板。对照组菌落数量为 0 CFU,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,为凸起和边缘光滑的黄色单菌落,从形态上可初步判断板上菌落为溶藻弧菌。随机挑取板上单菌落,用引物 16S rDNA 1/16S rDNA 2 进行 PCR 和测序验证。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,在第 0 ~ 2 天,肾脏和脾脏中突变株的数量有所上升;在第 3 ~ 7 天,肾脏和脾脏中细菌数量出现下降,第 7 天基本检测不出突变株(图 7)。

## 2.9 免疫保护率

用疫苗候选株  $\Delta kdpDE$  以注射和浸泡途径免

表 2 溶藻弧菌 HY9901 和突变株  $\Delta kdpDE$  对斑马鱼的 LD<sub>50</sub> 测定  
 Tab. 2 LD<sub>50</sub> determinations of the  $kdpDE$  mutant and *V. alginolyticus* HY9901

菌株 bacterial strains	攻毒浓度 /(CFU/mL) concentration	累计结果 cumulative results			半数致死剂量/ (CFU/尾) LD <sub>50</sub>
		存活数/尾 survival number of bacteria	死亡数/尾 death number of bacteria	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	
	$9.21 \times 10^3$	20	0	0	
突变株 $\Delta kdpDE$	$9.80 \times 10^8$	3	17	85	$1.90 \times 10^6$
	$1.03 \times 10^8$	13	7	35	
	$9.52 \times 10^6$	18	2	10	
	$9.77 \times 10^5$	20	0	0	
	$9.87 \times 10^4$	20	0	0	

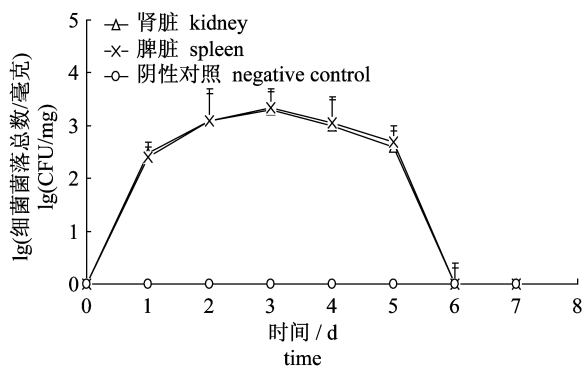


图 7 溶藻弧菌 HY9901 和突变株在鱼体内的存活能力  
 Fig. 7 Survival ability of the mutants and *V. alginolyticus* HY9901 in vivo

疫斑马鱼。免疫后第 28 天,用溶藻弧菌 HY9901 对受免鱼进行攻毒,注射无菌生理盐水的对照组 3 在 14 d 内未出现死亡,注射免疫组的死亡率为 16.7%,注射免疫对照组的死亡率为 100%,相对免疫保护率为 83.3%;浸泡免疫组的死亡率为 33.3%,浸泡免疫对照组的死亡率为 100%,相对免疫保护率为 66.7%。对受免鱼进行哈维氏弧菌 ZJ0706 攻毒,结果发现注射免疫组的相对免疫保护率为 65.5%,浸泡免疫组的相对免疫保护率为 55.2% (图 8),表明免疫后的斑马鱼对哈维氏弧菌有一定的交叉免疫保护力,注射组的相对免疫保护率略高于浸泡组。对发病鱼进行观察,发现其症状与半数致死剂量测定实验中发病鱼的症状一致。对濒死鱼脾脏、肝脏和肠道进行病原分离鉴定,证实死于攻毒引发的感染。

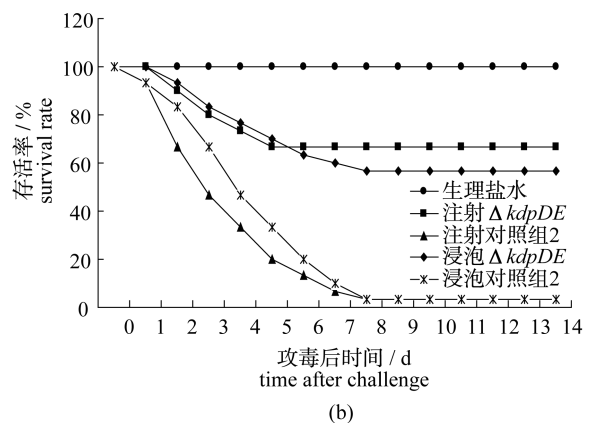
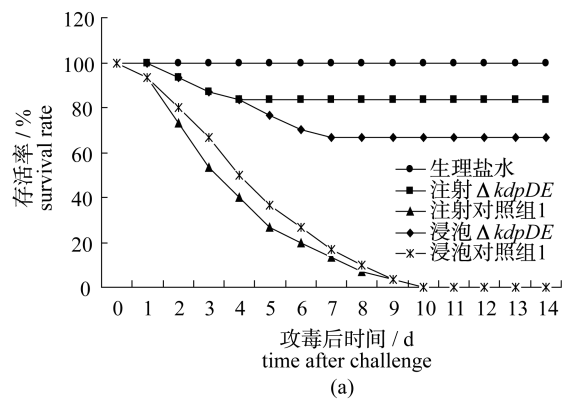


图 8 受免鱼攻毒后的存活率

(a) 分别用  $\Delta kdpDE$  以注射和浸泡方式免疫后溶藻弧菌攻毒;(b) 分别用  $\Delta kdpDE$  以注射和浸泡方式免疫后哈维氏弧菌攻毒

Fig. 8 Survival rate of zebrafish after being challenged

(a) injection challenged with *V. alginolyticus* after injected vaccination and immersed vaccination;(b) injection challenged with *V. harveyi* after injected vaccination and immersed vaccination

### 3 讨论

目前关于鱼类病原和宿主的相互作用机制已经得到了较为深入的分析,以此为理论基础,开发高效的新型疫苗已成为水产病害研究的一大热点。利用基因敲除方法构建减毒菌株,是获得候选减毒活疫苗的一种重要手段。本实验以重组自杀质粒 pRE112 为载体,利用质粒上的正向选择的氯霉素抗性基因和反向选择的蔗糖敏感基因 (*sacB*),经过 2 次同源重组,获得框内无标记的 *kdpDE* 双基因敲除突变株。框内缺失突变 (*in-frame deletion*) 技术构建的突变株,其整体基因转录和翻译不会受到影响,遗传性状稳定,也不含外源的抗性基因<sup>[19]</sup>,因此该技术适宜筛选减毒活疫苗。在生物学特性实验中,*kdpDE* 双基因敲除突变株和野生株在生长速率和胞外蛋白酶活性方面均无明显差异,这与本课题组构建的 *kdpD* 基因突变株和 *kdpE* 基因突变株的结果一致<sup>[20]</sup>。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>[21-22]</sup>。在本研究中,发现突变株  $\Delta kdpDE$  的生物被膜形成能力明显降低。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>[23]</sup>。金黄色葡萄球菌的 A1-2 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>[24]</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是非常复杂的,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>[25]</sup>。双组分调控系统 KdpDE 在溶藻弧菌生物膜形成调控过程中担当何种角色有待进一步研究。

本研究用模式动物斑马鱼进行细菌攻毒实验,*kdpDE* 突变株的半数致死量为  $1.90 \times 10^6$  CFU/尾,野生株的半数致死量为  $2.42 \times 10^4$  CFU/尾,突变株的毒力下降了 78.5 倍。笔者在之前的研究中构建的 *kdpD* 基因突变株和 *kdpE* 基因突变株,在攻毒实验中同样出现毒力下降现象<sup>[20]</sup>。最近,Xue 等<sup>[6]</sup>发现金黄色葡萄球菌中的双组分调控系统 KdpDE 可以调控将近 100 个毒力基因。因此推测双组分调控系统 KdpDE 的信号转导过程受到阻碍,将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。

*kdpDE* 突变株毒力减弱表明溶藻弧菌减毒株构建成功,提示该菌株可作为减毒活疫苗候选株。

减毒活疫苗仍保留活性,疫苗进入鱼体短时间内会有一定增殖,感染过程类似于自然感染过程,因此能诱导鱼体作出免疫应答,刺激鱼体长期地产生抗体<sup>[26]</sup>。然而,疫苗在受免鱼体内的残留也成为危害生物和食品安全的隐患。为检测该突变株在鱼体内的存活能力,本研究以  $10^6$  CFU/mL 的菌液浓度注射斑马鱼,结果显示在免疫后 1 周内,肾脏和脾脏内的突变株逐渐被清除,第 7 天基本在体内检测不到。一定剂量的突变株进入鱼体,受免鱼的免疫系统在受到刺激后,可能会启动相应的应答机制,从而在短时间内清除鱼体中的突变株。遗传稳定性也是评价突变株安全性的一项重要指标。本研究发现该突变株具有较好的遗传稳定性。上述结果初步确定该突变株是相对安全的。

免疫效果检测是评价疫苗是否具有实用性最直接的指标。本研究用溶藻弧菌对受免鱼进行了攻毒实验,发现免疫组的死亡率远远低于对照组,相对免疫保护率达 83.3%。Zhang 等<sup>[27]</sup>用鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 减毒活疫苗 MVAV6203 免疫斑马鱼,免疫 1 个月后用鳗弧菌野生株攻毒,发现免疫组的累积死亡率低于 10%,其对斑马鱼的 RPS 达 90% 以上。Xiao 等<sup>[28]</sup>通过框内缺失突变技术构建 14 株迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 敲除突变株,并进行疫苗免疫保护率实验,发现其对斑马鱼最高的 RPS 为 81%。交叉保护是鱼类疫苗应用中的常见现象<sup>[29-30]</sup>。减毒活疫苗保留了病原菌大部分的表面结构,因此容易产生对同属菌的交叉保护作用。溶藻弧菌和哈维氏弧菌同属弧菌属,且具有较高的同源性,有共同的细胞表面抗原,如外膜蛋白抗原和鞭毛抗原<sup>[31-33]</sup>。本研究中哈维氏弧菌攻毒实验发现免疫组的相对免疫保护率达 65.5%,表明该疫苗能诱导鱼体产生对哈维氏弧菌的交叉免疫保护效应。这与 Zhang 等<sup>[27]</sup>和潘燕华等<sup>[30]</sup>的鳗弧菌减毒活疫苗交叉保护率实验结果相似。以上结果表明本实验构建的减毒活疫苗可作为一个有效的候选疫苗,增强鱼体的综合抗病能力,为渔用弧菌疫苗的研发以及常见弧菌病的防治提供了实践经验。

本研究用注射和浸泡方式免疫鱼体,28 d 后



用活菌进行攻毒,结果发现 2 种免疫方式均有一定的免疫保护作用,但免疫效果不相同。庞欢瑛等<sup>[34]</sup>用溶藻弧菌突变株  $\Delta vscO$  以浸泡和注射方式免疫斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*),腹腔注射方式攻毒,发现注射免疫组的 RPS 为 84%,浸泡免疫组的 RPS 为 68%。这可能与浸泡免疫的免疫机制有关。黏膜免疫独立于鱼类系统免疫<sup>[35-36]</sup>,浸泡免疫主要由鱼体黏膜免疫系统(鳃和皮肤等)产生的黏膜抗体发挥作用<sup>[37]</sup>。注射攻毒使病原菌直接越过黏膜防御进入鱼体,导致黏膜免疫保护失效。由此推测,注射攻毒不能准确反映浸泡免疫的实际保护效果。因此,在分析疫苗免疫保护效果时需要采用对采用的免疫和攻毒途径进行综合考虑,以获得疫苗的最佳评价效果。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction [ J ]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69 ( 1 ) : 183 - 215.
- [ 2 ] Li M, Hu F Q, Tang J Q. Dual signal transduction system and bacterial pathogenicity [ J ]. Journal of Microbiology, 2007, 27 ( 1 ) : 50 - 54. [ 李明, 胡福泉, 唐家琪. 二元信号转导系统与细菌的致病性. 微生物学杂志, 2007, 27 ( 1 ) : 50 - 54. ]
- [ 3 ] Walderhaug M O, Polarek J W, 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.
- [ 4 ] Heermann R, Altendorf K, Jung K. The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 ( 51 ) : 51277 - 51284.
- [ 5 ] Heermann R, Jung K. The complexity of the "simple" two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli* [ J ]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 304 ( 2 ) : 97 - 106.
- [ 6 ] Xue T, You Y B, Hong D, et al. The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K<sup>+</sup> sensing and Agr signaling to infection programming [ J ]. Infection and Immunity, 2011, 79 ( 6 ) : 2154 - 2167.
- [ 7 ] Tall A, Hervio H D, Teillon A, et al. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by *pyrH* sequencing [ J ]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114 ( 6 ) : 1713 - 1724.
- [ 8 ] Luo P, Jiang H, Wang Y, et al. Prevalence of mobile genetic elements and transposase genes in *Vibrio alginolyticus* from the southern coastal region of China and their role in horizontal gene transfer [ J ]. International Microbiology, 2012, 15 ( 4 ) : 201 - 210.
- [ 9 ] Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [ J ]. The Lancet Infectious Diseases, 2010, 10 ( 9 ) : 597 - 602.
- [ 10 ] Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination [ J ]. Nature Immunology, 2011, 12 ( 6 ) : 509 - 517.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Windle H J, Kelleher D. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori* [ J ]. Infection and Immunity, 1997, 65 ( 8 ) : 3132 - 3137.
- [ 13 ] Di H L, 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. [ 狄慧玲, 陈偿, 石磊. 溶藻弧菌 OP/Tr 变体生物被膜形成能力及其相关因素的比较研究. 现代食品科技, 2010, 26 ( 11 ) : 1177 - 1180. ]
- [ 14 ] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [ J ]. American Journal of Hygiene, 1938, 27 ( 3 ) : 493 - 497.
- [ 15 ] Sangster C R, Smolowitz R M. Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis* [ J ]. The Biological Bulletin, 2003, 205 ( 2 ) : 233 - 234
- [ 16 ] Huang R F. *Vibrio alginolyticus* in the Grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. Fisheries Science, 2005, 24 ( 6 ) : 1 - 3. [ 黄瑞芳. 斜带石斑鱼溶藻弧菌病的研究. 水产科学, 2005, 24 ( 6 ) : 1 - 3. ]
- [ 17 ] Jin S, Cai W Q, Yu H, et al. Studied on cell pathology of *Vibrio alginolyticus* disease to large yellow croakers [ J ]. Marine Science, 2003, 27 ( 2 ) :

- 59-62. [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. 海洋科学,2003,27(2):59-62.]
- [18] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [C]// International Symposium on Fish Biologics. Serodiagnostics and Vaccines. Leetown. Developments in Biological Standardization, 1981, 49:447-454.
- [19] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. *Gene*, 1989, 77(1): 51-59.
- [20] Zhang Y F. Construction of an attenuated two-component regulatory system KdpDE strains of *Vibrio alginolyticus* and evaluation of their immunogenic and cross-protective effects as vaccines [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015. [张燕飞. 溶藻弧菌双组分调控系统 KdpDE 减毒活疫苗的构建及其交叉免疫保护性研究. 湛江:广东海洋大学,2015.]
- [21] Parsek M R, Singh P K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 2003, 57(1): 677-701.
- [22] 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.
- [23] Alegado R A, Chin C Y, Monack D M, *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.
- [24] Zhao L P, 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.
- [25] Yildiz F H, Visick K L. Biofilms: so much the same yet so different [J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109-118.
- [26] Zhang Y X, Ma Y, Sun X Q. Marine fish disease vaccine development and bioreactors for mass production [J]. *High Technology Letters*, 2002, 10(2): 1-5. [张元兴,马悦,孙修勤. 海洋鱼病疫苗开发与生物反应器大规模生产. 高技术通讯,2002,10(2):1-5.]
- [27] Zhang Z H, Wu H Z, Xiao J F, *et al.* Immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) induced by bath-vaccination with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine candidate [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(1): 36-41.
- [28] Xiao J, Chen T, Wang Q, *et al.* Search for live attenuated vaccine candidate against edwardsiellosis by mutating virulence-related genes of fish pathogen *Edwardsiella tarda* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(4): 430-437.
- [29] Zhang C W, Mao Z J, Yu L. Selection of cross-protective antigens from outer membrane proteins of three pathogenic vibrios isolated from infected large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(12): 1460-1472. [张崇文,毛芝娟,于涟. 大黄鱼三种病原弧菌外膜蛋白交叉保护性抗原筛选. 生物工程学报,2012,28(12):1460-1472.]
- [30] Pan Y H, Ma Y, Zhao D L, *et al.* Study on immune response of *Paralichthys olivaceus* induced by live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine [J]. *Food and Drug*, 2009, 11(3): 12-15. [潘燕华,马悦,赵东玲,等. 鳃弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究. 食品与药品,2009,11(3):12-15.]
- [31] Li N, Yang Z, Bai J, *et al.* A shared antigen among *Vibrio* species: Outer membrane protein-OmpK as a versatile vibriosis vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(5-6): 952-956.
- [32] Liang H Y, Xia L Q, Wu Z H, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of *flaB* gene from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus sanguineus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(1): 139-146. [梁海鹰,夏立群,吴灶和,等. 溶藻弧菌 HY9901 鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆及原核表达. 水产学报,2010,34(1):139-146.]
- [33] Li Y, Li Q, Zhang X Y. Research progress on and its main pathogenic factors [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(4): 159-166. [李洋,李强,张显昱. 哈维弧菌及其主要致病因子的研究进展. 中国农业科技导报,2014,16(4):159-166.]
- [34] Liang H Y, Xia L Q, Wu Z H, *et al.* Construction of live attenuated *Vibrio alginolyticus* vaccine and its immunogenic and protective effects [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 769-776. [庞欢瑛,周泽军,丁燊,等. 溶藻弧菌减毒活疫苗的构建及其免疫保护性. 中国水产科学,2014,21

- (4):769–776.]
- [35] Xu Z, Chen C F, Mao Z J, *et al.* Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(3–4):243–247.
- [36] Luo X, Pan H J, Gong H, *et al.* Changes of skin mucus antibody in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) after immersion vaccination against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5):823–828. [罗霞, 潘厚军, 巩华, 等. 鳊浸泡嗜水气单胞菌全菌疫苗后皮肤黏液抗体的变化. *中国水产科学*, 2007, 14(5):823–828.]
- [37] Vervarcke S, Ollevier F, Kinget R, *et al.* Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(2):125–133.

## Construction of an attenuated two-component regulatory system KdpDE strain of *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its immunogenic and protective effects as a vaccine

ZHANG Yanfei<sup>1,2,3,4</sup>, PANG Huanying<sup>1,2,3</sup>, JIAN Jichang<sup>1,2,3</sup>,  
LU Yishan<sup>1,2,3</sup>, TANG Jufen<sup>1,2,3</sup>, WU Zaohe<sup>2,3,5\*</sup>

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

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

3. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China;

4. Zhaoqing Aquatic Technologies Popularizing Center, Zhaoqing 526060, China;

5. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** To study the immune protection of fish vaccinated by the live attenuated *Vibrio alginolyticus* vaccine, we constructed an in-frame deletion mutant of *kdpD/kdpE* (*kdpDE*) genes using overlap PCR and homologous recombination technology, to investigate the effects of this mutant on the biological characteristics. We then compared the differences of the biological characteristics and virulence between the gene deletion mutant and wild strain. Furthermore, the immunoprotection of the vaccine was analyzed by challenge test. The mutant  $\Delta kdpDE$  showed no differences of ECPase activity and growth from the wild-type strain. But the decreases in swarming ability and biofilm formation were found. Virulence of the mutant declined by 78.5 times in zebrafish model. No bacteria survived in zebrafish 7 days later after injection vaccination. Furthermore, the mutant was used as an antigen to immunize zebrafish. To estimate immunoprotection and immune routes of the live attenuated vaccine, the zebrafish were challenged by *V. alginolyticus* and *V. harveyi* at 28 days after immersed and injected vaccination. The relative percentage survival (RPS) value of injection group was 83.3%, and the RPS value of immersion group was 66.7%. The results showed that the  $\Delta kdpDE$  of *V. alginolyticus* has a high immunogenicity. In addition, the vaccination led to cross-protection from *V. harveyi* and the RPS values of injection group and immersion group were 65.5% and 55.2% respectively. These results indicate that the *kdpDE* mutant is an effective vaccine candidate against *V. alginolyticus* infection.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; KdpDE; live attenuated vaccine; zebrafish; relative percent survival

**Corresponding author:** WU Zaohe. E-mail: wuzaohe@163.com