



sodA、*sodB* 和 *KatG* 在嗜水气单胞菌 抗氧化胁迫中的协同作用

陈李维^{1,2}, 张梅梅¹, 张焦南², 黄力行¹, 赵玲敏¹,
徐晓津¹, 覃映雪^{1,2*}, 鄢庆枇^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省特种水产配合饲料重点实验室, 福建 福清 350300)

摘要: 以嗜水气单胞菌野生株 B11 和基因稳定沉默株 *sodA*-RNAi、*sodB*-RNAi 和 *KatG*-RNAi 为研究对象, 比较野生株和沉默株在不同氧化胁迫条件下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相关性及与细菌生长和存活的相关性, 以探讨抗氧化胁迫基因在细菌抵御氧化胁迫过程中的作用和机制。结果显示, 无氧化胁迫条件下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 中任何一个基因被沉默后, 其余两个基因的表达均受到显著抑制, 说明这些抗氧化胁迫基因在表达上密切相关。在外源 H₂O₂ 胁迫下, *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 中任何一个基因被沉默后, 其他两个抗氧化胁迫基因的表达均表现为显著上调; 在甲基紫晶 (MV) 诱导的内源性活性氧 (ROS) 胁迫下, 各沉默株中 *sodA* 或 *sodB* 的表达水平总体表达为上调, 但是在 *KatG* 的表达却呈现下调, 说明 *sods* 的表达在细菌抵御内源性 ROS 的损伤中更为重要性。在 H₂O₂ 胁迫下, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 野生株 B11 的存活率仍然保持在较高的水平, 而沉默株 *sodA*-RNAi、*sodB*-RNAi 和 *KatG*-RNAi 的存活率则显著降低; 此外, 菌株生长曲线显示, *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 的表达可影响嗜水气单胞菌生长曲线延滞期的长短。在不同浓度 MV 诱导的 ROS 胁迫下, 野生株 B11 和沉默株 *KatG*-RNAi 的存活率仍然保持在较高的水平, 沉默株 *sodA*-RNAi 和 *sodB*-RNAi 的存活率则显著降低, 但 4 株菌仍然能保持一定的生长能力。研究表明, 在不同氧化胁迫条件下, 细菌可通过不同抗氧化胁迫基因的协同作用, 共同抵御 ROS 的损伤, 在 H₂O₂ 的胁迫下, *KatG* 对嗜水气单胞菌的生存更为重要, 而在 MV 诱导的内源性 ROS 胁迫下, *sod* 的表达对嗜水气单胞菌生存的贡献更为突出。

关键词: 嗜水气单胞菌; *sodA*; *sodB*; *KatG*; 氧化胁迫; 协同作用

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为弧菌科 (Vibrionaceae) 气单胞菌属革兰氏阴性短杆菌, 是一种典型的人—鱼—畜共患的病原菌^[1-2]。在适宜温度下, 可引发鱼类败血症, 发病迅速, 死亡率极高, 给养殖户带来经济损失^[3-4]。然而,

嗜水气单胞菌的致病机制尚不清楚, 抗生素仍然是最常见的防控措施。但是抗生素的不规范使用容易导致越来越多耐药菌株的出现, 使得疾病更加难以控制^[5]。因此, 进一步揭示嗜水气单胞菌的致病机理, 寻找安全高效的治疗方法

收稿日期: 2020-06-28 修回日期: 2020-09-01

资助项目: 国家自然科学基金 (31502194); 福建省特种水产配合饲料重点实验室项目 (TMKJZ1908)

第一作者: 陈李维 (照片), 从事水生动物病原微生物学研究, E-mail: 1581911046@qq.com

通信作者: 覃映雪, E-mail: yxqin@jmu.edu.cn; 鄢庆枇, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn



迫在眉睫。

病原菌入侵、感染宿主过程中往往会受到多种抗菌物质的杀伤, 其中活性氧 (ROS) 是关键性的杀菌因子之一^[6-7], 因此, 病原菌与 ROS 的抗争不可避免^[8]。依据来源不同, ROS 可分为外源性和内源性两类, 外源性 ROS 可以直接作为活性分子从体外引入, 内源性 ROS 主要是细胞内正常代谢过程中的各类分子自主产生。研究发现, 一些病原菌已经进化出直接参与防御 ROS 损伤的解毒酶和修复氧化损伤的细胞组分, 使其能在宿主体内存活、生长和繁殖^[8]。在多种抗氧化酶中, 过氧化氢酶和超氧化物歧化酶 (SODs) 的作用尤为重要。过氧化氢酶是细菌抗氧化损伤解毒途径的中心组成部分之一^[9], 细菌中发现至少有 3 种类型的过氧化氢酶基因, 分别为 *KatA*、*KatB* 和 *KatG*。其中 *KatA* 和 *KatB* 只具有过氧化氢酶活性, 而 *KatG* 不仅具有过氧化氢酶活性, 还有过氧化物酶和过氧亚硝酸还原酶活性, 并有研究发现, *KatG* 在结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和土拉热弗朗西式菌 (*Francisella tularensis*) 抵抗宿主细胞 ROS 和活性氮 (RNS) 的氧化伤害, 以及在宿主细胞中存活和复制过程中发挥着重要作用^[10-11]。SODs 也是细菌抗氧化胁迫的重要酶类, 细菌一般有 1 种或 2 种 SODs^[12], 能够催化超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$) 与氢离子 (H^+) 反应生成过氧化氢 (H_2O_2) 和氧气 (O_2)。SODs 已经被证实是奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 的抗氧化胁迫

重要组分之一^[13]。

近年来, 本课题组在研究病原嗜水气单胞菌 B11 菌株致病机制的过程中发现, 该菌可在体外感染宿主鱼的吞噬细胞, 且可在鱼类吞噬细胞中存活, 存活的时间显著长于非致病性菌株, 部分细菌在细胞中存活时间可达 24 h^[14-16]。对嗜水气单胞菌 B11 菌株基因组测序和分析发现, 该菌株基因组中只有 1 个过氧化氢酶基因 *KatG*, 有 2 种 SOD 基因, 分别编码 MnSOD (*SodA*) 和 FeSOD (*SodB*) 这 2 种金属蛋白 (GenBank accession number: CP053859)。然而, 这 3 种重要的抗氧化胁迫基因在嗜水气单胞菌抗氧化胁迫过程的确切作用尚未被阐明。因此, 本实验将以这 3 种代表性抗氧化胁迫基因为研究对象, 探究这 3 种基因分别沉默后的菌株在不同氧化胁迫条件下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 的表达及细菌存活和生长情况, 从而揭示不同抗氧化胁迫基因在病原菌抵御 ROS 杀伤过程中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

嗜水气单胞菌野生株及沉默株采用 LB 培养基或营养肉汤培养基 28 °C 条件下培养。不同菌株培养根据需要加入相应抗生素, 使用的抗生素浓度为链霉素 (Sm) 10 μg/mL 和氯霉素 (Cm) 34 μg/mL。菌株基因型或表型特性见表 1。

表 1 本研究中的菌株

Tab. 1 Strains used in this study

菌株 strain	基因型或表型 genotype or phenotype	来源 source
B11	嗜水气单胞菌野生株(链霉素抗性) <i>A. hydrophila</i> wild-type strain (Sm ^R)	由郭松林教授提供 provided by Prof. Guo
<i>sodA</i> -RNAi	B11 菌株的 <i>sodA</i> 基因稳定沉默株(链霉素和氯霉素抗性) <i>sodA</i> was silenced by shRNA (Sm ^R , Cm ^R)	[17]
<i>sodB</i> -RNAi	B11 菌株的 <i>sodB</i> 基因稳定沉默株(链霉素和氯霉素抗性) <i>sodB</i> was silenced by shRNA (Sm ^R , Cm ^R)	[17]
<i>KatG</i> -RNAi	B11 菌株的 <i>KatG</i> 基因稳定沉默株(链霉素和氯霉素抗性) <i>KatG</i> was silenced by shRNA (Sm ^R , Cm ^R)	[18]

1.2 无氧化胁迫下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相关性

菌株 B11、*sodA*-RNAi、*sodB*-RNAi 和 *KatG*-

RNAi 培养至对数生长期, 收集菌体提取 RNA, 测定浓度及电泳检测后进行反转录。以 B11 菌株作为对照, 选取稳定表达的 16S rRNA 基因作为内参, 进行 qRT-PCR, 具体引物序列见表 2。

反转录和荧光定量 PCR 过程参照试剂盒说明书进行操作。qRT-PCR 反应体系为 10 μ L: q-PCR Mix 5 μ L, ddH₂O 4 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 上、下游引物各 0.25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环。

表 2 qRT-PCR 引物

Tab. 2 Primers for qRT-PCR

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence (5'-3')
16S rRNA F	5'-TAATACCGCATACGCCCTAC-3'
16S rRNA R	5'-GGACCGTGTCTCAGTTCAG-3'
sodA F	5'-CGCCATCACCAGACTTACATCA-3'
sodA R	5'-GCCTCAAACCCGTCAGATC-3'
sodB F	5'-CTTCGCCGAGTCAAGGAT-3'
sodB R	5'-GGTTGCGGAAGTCGATGTAG-3'
KatG F	5'-GTCGCCATCAAGGAGGAAG-3'
KatG R	5'-AAGGCGTCGGAGAAGAGGT-3'

1.3 氧化胁迫下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相关性及细菌存活率

实验参照文献^[13, 19-20]中的方法进行, 并稍作改进。用无菌水将 H₂O₂ 和 MV 配制成不同浓度的溶液, 取各浓度溶液 2.5 mL 加入到 2.5 mL 双倍浓缩营养肉汤中, 再取 100 μ L 稀释至 2×10^8 CFU/mL 的 B11 菌株的菌悬液接种至含不同浓度 H₂O₂ 和甲基紫晶 (MV) 的营养肉汤中, 每个样本 3 个重复, 另取 3 支未接种菌液的营养肉汤作为阴性对照, 测出 H₂O₂ 和 MV 对野生株 B11 的最小抑菌浓度 (MIC)。接着, 参照 MIC 设置 4 个浓度梯度, 对各菌株进行胁迫处理, 其中 H₂O₂ 的浓度梯度分别为 0、0.22、0.44 和 0.66 mmol/L, MV 的浓度梯度分别为 0、10、20 和 30 mmol/L。将过夜培养的菌液转接至新鲜 LB 液体培养基中, 剧烈振荡 4 h 后离心收集菌体并重悬至 2×10^8 CFU/mL。在 5 mL 离心管中加入菌悬液及不同浓度的 H₂O₂ 和 MV, 使 H₂O₂ 终浓度分别为 0、0.22、0.44 和 0.66 mmol/L, MV 终浓度分别为 0、10、20 和 30 mmol/L, 胁迫处理 3 h 后采用 qPCR 检测 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达情况, 具体方法参照“无氧化胁迫下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相

关性”。同时, 采用平板菌落计数法对胁迫处理 0 和 3 h 的各样品中的细菌数量进行计数。不同浓度 H₂O₂ 或 MV 处理 3 h 后存活的细菌数比 0 h 各样品中的细菌数量, 再乘以 100% 即为各菌株的相对存活率。实验中每个样品设 3 个重复, 数据采用 EXCEL 和 SPSS 等软件进行统计学分析。

1.4 氧化胁迫下野生株和沉默株的生长

将含 H₂O₂ 和 MV 的 LB 培养基加入 96 孔板中, 再将培养至对数期的野生株和沉默株菌液稀释至 OD_{600 nm}=0.03 后加入含 H₂O₂ 和 MV 的 LB 培养基, 使 H₂O₂ 终浓度分别为 0、0.22、0.44 和 0.66 mmol/L, MV 终浓度分别为 0、10、20 和 30 mmol/L, 对照组为不含菌液的 LB 培养基, 每个样品 3 个重复。将 96 孔板放入多功能酶标仪, 每小时测定 OD_{600 nm}, 最后选取 0、1、2、4、8、16、24、32、40 和 48 h 的 OD 值进行生长曲线的绘制。

2 结果

2.1 无氧化胁迫下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相关性

sodA 沉默后, *sodB* 和 *KatG* 的表达量分别下降了 65.4% 和 72.7%; *sodB* 沉默后, *sodA* 和 *KatG* 的表达量分别下降了 82.2% 和 74.7%; *KatG* 沉默后, *sodA* 和 *sodB* 的表达量分别下降了 87.1% 和 60.7% (图 1)。结果表明, 在没有氧化胁迫的条件下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 中任何一个被沉默后, 其他 2 个基因的表达均受到显著抑制, 这些抗氧化胁迫基因之间在表达上密切相关。

2.2 氧化胁迫下嗜水气单胞菌 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 表达的相关性

H₂O₂ 胁迫下各沉默株中 1 个抗氧化胁迫基因沉默后, 其他 2 个抗氧化胁迫基因的表达均表现为显著上调。在不同浓度 H₂O₂ 胁迫下, 沉默株 *sodB*-RNAi 和 *KatG*-RNAi 中 *sodA* 基因表达量最高时与对照组相比分别上调了 6.9 倍和 9.5 倍 (图 2-a, b), 沉默株 *sodA*-RNAi 和 *KatG*-RNAi 中 *sodB* 基因表达量最高时与对照组相比分别上调了 9.2 倍和 10.2 倍 (图 2-c, d), 沉默株 *sodA*-RNAi 和 *sodB*-RNAi 中 *KatG* 基因表达量最高时与对照组相比分别上调了 14.0 倍和 14.1 倍 (图 2-e, f)。

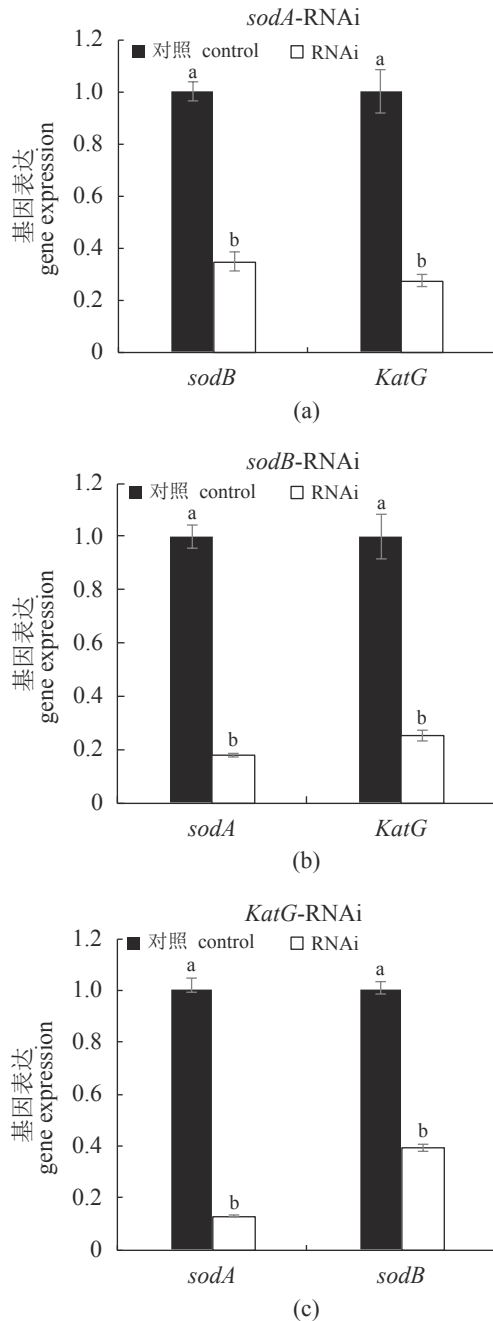


图 1 无氧化胁迫下 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 基因表达的相关性

柱上不同字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Correlation between *sodA*, *sodB* and *KatG* expressions without oxidative stress

(a) *sodA*-RNAi, (b) *sodB*-RNAi, (c) *KatG*-RNAi; bar charts with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

结果表明, 在 H_2O_2 胁迫下, 1 个抗氧化基因沉默后, 可通过其他抗氧化胁迫基因的上调, 抵御 H_2O_2 带来的生存压力。

在 MV 诱导的内源性 ROS 胁迫下, 沉默株中的 *sodA* 和 *sodB* 基因的表达水平总体上调, 但是在沉默株 *sodA*-RNAi 和 *sodB*-RNAi 中, *KatG* 的表达却呈现下调 (图 3), 这表明在 MV 诱导产生的内源性 ROS 胁迫下, 细菌 *sods* 的表达对抵御 ROS 损伤更具重要性。

2.3 氧化胁迫下嗜水气单胞菌野生株和沉默株的存活率

随着 H_2O_2 浓度的增加, 野生株 B11 的存活率仍然保持在较高的水平, 而沉默株 *sodA*-RNAi、*sodB*-RNAi 和 *KatG*-RNAi 的存活率则显著降低, 其中沉默株 *KatG*-RNAi 的存活率下降最为显著 (图 4-a)。在不同浓度 MV 胁迫下, 野生株 B11 和沉默株 *KatG*-RNAi 的存活率仍然保持在较高的水平, 而沉默株 *sodA*-RNAi 和 *sodB*-RNAi 的存活率则显著降低 (图 4-b)。可以推测, 在不同氧化胁迫条件下, 细菌可通过不同抗氧化胁迫基因的协同作用, 共同抵御 ROS 的损伤。在 H_2O_2 的胁迫下, *KatG* 对嗜水气单胞菌的生存更为重要, 而在 MV 诱导的内源性 ROS 胁迫下, 则 SODs 的表达对嗜水气单胞菌生存的贡献更为突出, 且存在其他机制参与抵御 ROS。

2.4 H_2O_2 和 MV 胁迫下嗜水气单胞菌野生株和沉默株的生长

在无 H_2O_2 胁迫下, 4 株菌的生长曲线在早期基本重合, 各取样点间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 5-a)。在 H_2O_2 胁迫下, 4 株菌生长曲线延滞期阶段细胞数量均没有变化, 生长处于停滞甚至短暂休眠的状态, 延滞期随 H_2O_2 浓度的增高而延长, 而且沉默株在生长后期, 随着 H_2O_2 浓度的升高, 与野生株延滞期的差异有增大的趋势 (图 5-b~d)。结果表明, 没有 H_2O_2 胁迫下, 抑制 *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 的表达对嗜水气单胞菌生长的影响并不明显, 但是在 H_2O_2 胁迫下, *sodA*、*sodB* 和 *KatG* 的表达均可影响嗜水气单胞菌延滞期的长短。

在无氧化胁迫下, 4 株菌的生长曲线基本一致, 各取样点间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 6-a), 在 MV 诱导的 ROS 胁迫下, 4 株菌仍然能保持较好的生长能力, 随 MV 浓度升高, 沉默株细菌的延滞期有所延长, 表明 MV 诱导的 ROS 胁迫下,

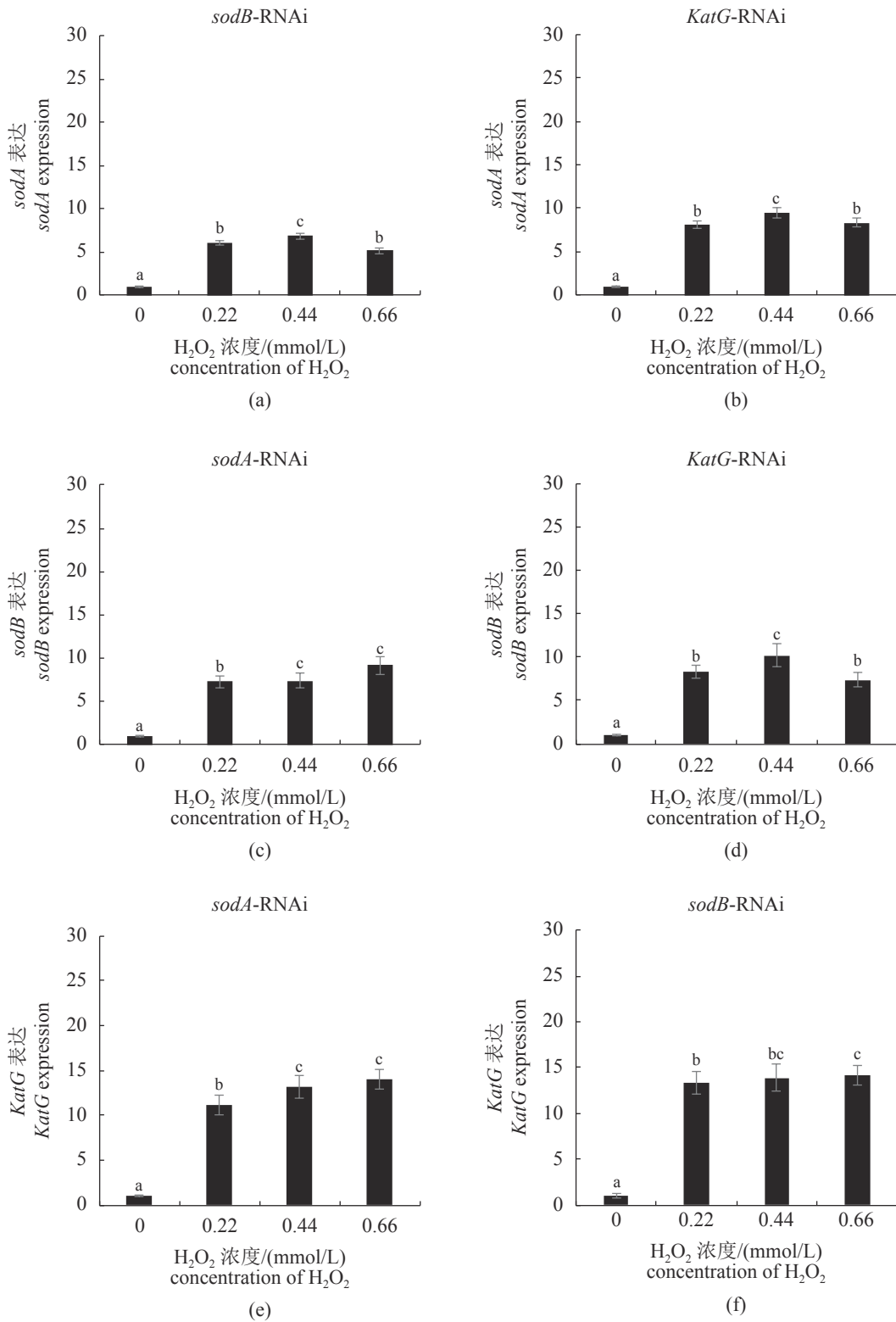


图2 H_2O_2 胁迫下沉默株中抗氧化胁迫基因的表达

柱上不同字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$), 图3同

Fig. 2 Expression of antioxidative stress genes in silencing strains under H_2O_2 stress

Bar charts with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same as Fig. 3

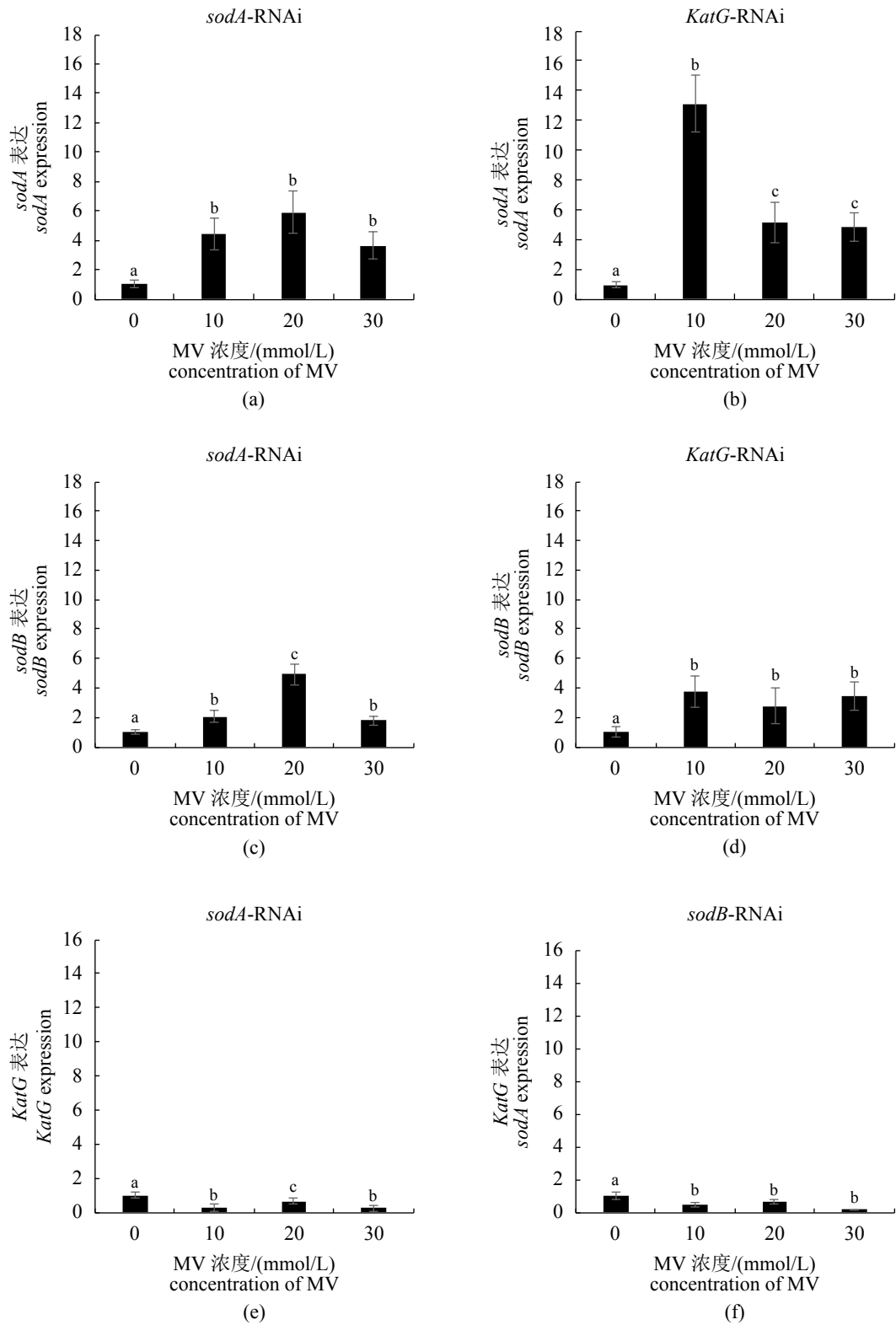


图3 MV胁迫下沉默株中抗氧化胁迫基因的表达

Fig. 3 Expression of antioxidative stress genes in silencing strains under MV stress

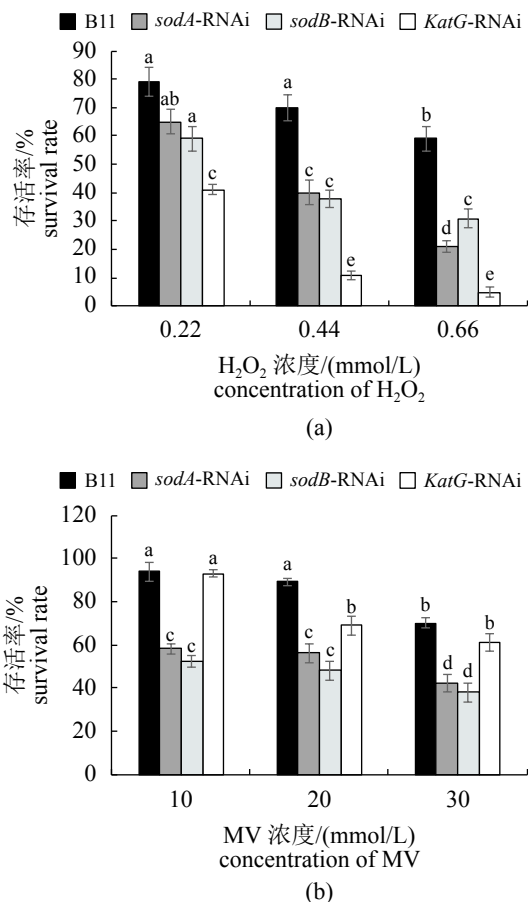


图4 H₂O₂和MV胁迫下野生株和沉默株的存活率

柱上不同字母表示不同浓度间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Survival rates of wild and silencing strains under H₂O₂ stress and MV stress

Bar charts with different letters indicate significant differences within different concentration ($P < 0.05$)

细菌可能采取其他机制抵御ROS以维持生长。

3 讨论

本结果显示,无氧化胁迫的条件下,*sodA*、*sodB*和*KatG*中任何1个基因被沉默后,其他2个基因的表达均受到显著抑制,说明这些抗氧化胁迫基因之间在表达上密切相关。不同氧化胁迫条件下,嗜水气单胞菌抗氧化胁迫基因的表达和相应基因沉默株的存活率表明,在H₂O₂的胁迫下,*KatG*对嗜水气单胞菌的生存更为重要,而在MV诱导的内源性ROS环境中,则SODs的表达对嗜水气单胞菌生存的贡献更为突出。这一结果说明,嗜水气单胞菌可通过不同抗氧化胁迫基因的协同作用,共同抵御ROS带

来的生存压力,在ROS的胁迫下保持存活。

细菌中存在多种抗氧化胁迫基因,而且这些抗氧化胁迫基因之间经常存在协同作用,这一现象在其他微生物中已有报道。如Staerck等^[21]研究发现细菌在进入宿主吞噬细胞后,为了生存,会通过多种编码抗氧化胁迫酶基因的高表达产生一系列抗氧化胁迫酶类,如SODs、Catalase、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和硫醇过氧化物酶等清除高反应性和具有毒害作用的因子。Das等^[22]研究发现,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)被吞噬细胞吞噬后,该菌的*catalase*和*sod*分别显著表达,产生足够多的*catalase*和*sod*,帮助细菌抵抗吞噬细胞的氧化胁迫。但是这些研究并未阐明不同氧化胁迫条件下,各氧化胁迫基因协作机制。本研究中嗜水气单胞菌的抗氧化胁迫基因之间同样存在协同作用,而且不同氧化胁迫条件下,抗氧化胁迫的主导基因不同。外源性ROS的种类因环境而异,起主导作用的抗氧化胁迫基因可能不尽相同;而内源性ROS可能是 $\cdot\text{O}_2^-$ 占优势,且SODs在抗氧化胁迫过程中起着主导作用。

本研究还发现,在无氧化胁迫下,抗氧化胁迫基因表达沉默对细菌的生长没有影响。在H₂O₂胁迫下,*sodA*、*sodB*和*KatG*基因表达主要影响嗜水气单胞菌的延滞期长短。可能是因为嗜水气单胞菌有多种酶或多条代谢途径解除外源性ROS的胁迫,在对抗H₂O₂中,*KatG*的作用占主导,且推测*KatG*是以组成酶的形式存在,而其他解除H₂O₂胁迫的酶则以诱导酶的形式存在,在氧化胁迫压力下诱导酶的表达需要一定的时间,因此细菌生长曲线的延滞期明显延长。而在MV胁迫下,*sodA*、*sodB*和*KatG*的表达虽然会降低嗜水气单胞菌的整体生长能力,并影响细菌生长曲线延滞期,但影响的显著程度不如H₂O₂胁迫,且细菌仍然可以保持一定的生长水平。这一结果反映,除SODs外,细菌可能采取多种机制抵御内源性ROS以维持生长,且推测其他抵御内源性ROS的酶也是细菌细胞中的组成酶,在氧化胁迫压力下可较快进行表达和补充,以弥补SODs表达缺失造成的不足。细菌抗氧化胁迫基因的表达与生长的相关性已多有研究。如迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[23]在无氧胁迫条件下,任一*KatB*或者*KatG*基因的突变并不影响该菌的生长能力,说明这2个基因

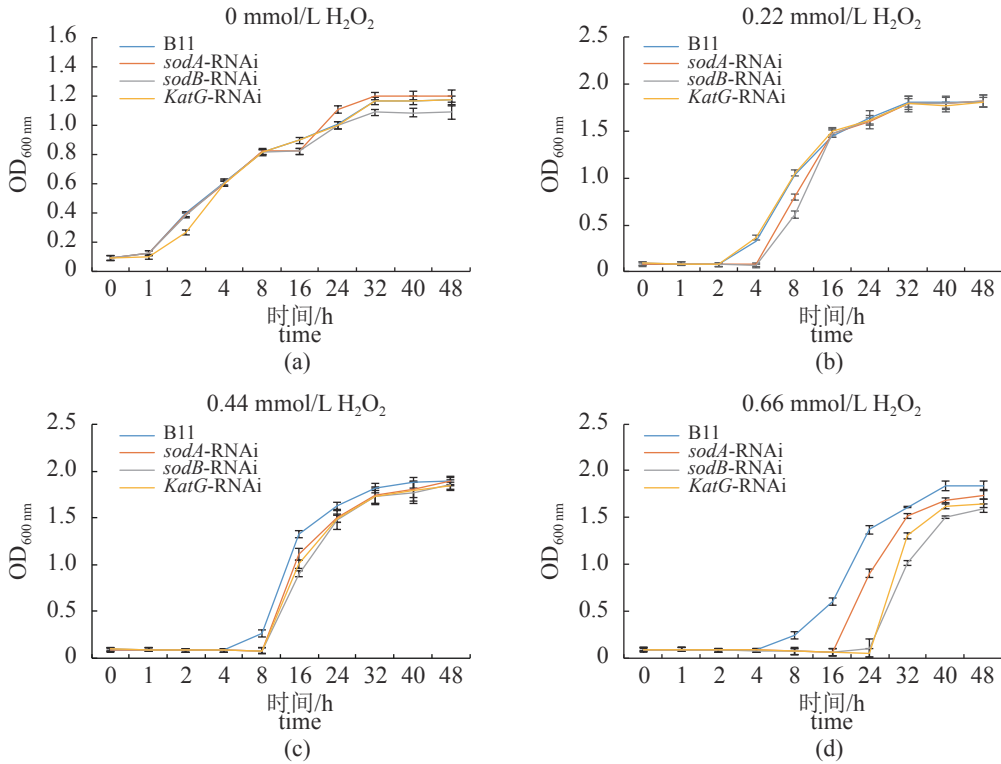


图 5 H_2O_2 胁迫下野生株和沉默株的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of wild and silencing strains under H_2O_2 stress

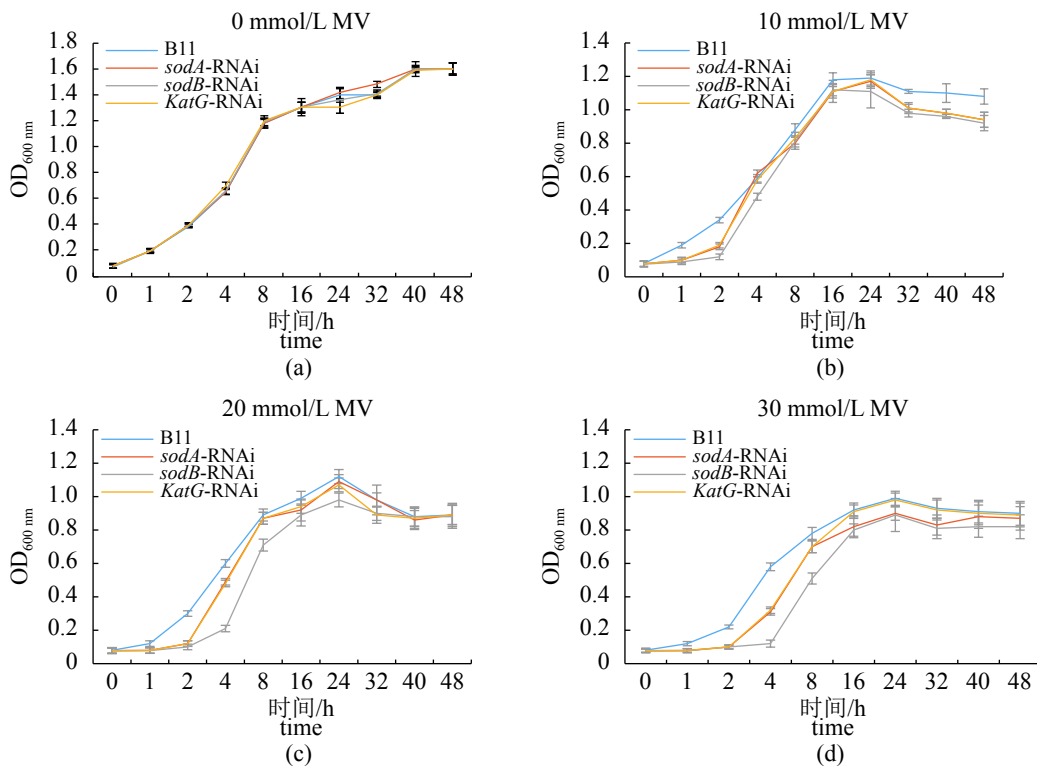


图 6 MV 胁迫下野生株和沉默株的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of wild and silencing strains under MV stress

可以互相补偿。Manca等^[24]研究发现, 5株野生型结核分枝杆菌在细胞内数目倍增时间为27~32 h, 而一株临床分离的 *KatG* 缺陷型菌株(ATCC 35825)的生长能力变弱, 要在76 h内才能数目翻倍。以上这些研究结果都与本实验结果大体一致, 说明细菌抗氧化胁迫基因具有较为复杂的协作机制, 在不同的胁迫条件下, 参与协作的基因不同, 主导抗氧化胁迫的方式也不同。

参考文献 (References):

- [1] 王艺, 刘文珍, 傅松哲, 等. 一株从草鱼中分离的嗜水气单胞菌的病原学及基因组特征[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 1181-1191.
Wang Y, Liu W Z, Fu S Z, et al. Etiology and genomic characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Ctenopharyngodon idella*[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 1181-1191(in Chinese).
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [3] 周宇, 周秋白. 嗜水气单胞菌防控技术研究进展[J]. 生物灾害科学, 2012, 35(2): 126-133.
Zhou Y, Zhou Q B. A review of the method in prevent and control the harm of *Aeromonas hydrophila*[J]. Biological Disaster Science, 2012, 35(2): 126-133(in Chinese).
- [4] 沈锦玉, 陈月英, 沈智华, 等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病原的研究I. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的分离、致病性及生理生化特性[J]. 科技通报, 1993, 9(6): 397-401.
Shen J Y, Chen Y Y, Shen Z H, et al. Study on pathogen of outbreaks of infectious disease of fishes in Zhejiang province I. Isolation, pathogenicity, physiological and biochemical and biochemical characteristics of *Aeromonas hydrophila*[J]. Bulletin of Science and Technology, 1993, 9(6): 397-401(in Chinese).
- [5] 左洋洋, 朱永肖, 罗晓雯, 等. 草鱼源嗜水气单胞菌的毒力与耐药性检测[J]. 河南水产, 2019(1): 26-29, 39.
Zuo Y Y, Zhu Y X, Luo X W, et al. The virulence and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* from *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Henan Fisheries, 2019(1): 26-29, 39(in Chinese).
- [6] Grayfer L, Hodgkinson J W, Belosevic M. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 43(2): 223-242.
- [7] Klionsky D J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(11): 931-937.
- [8] Imlay J A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77: 755-776.
- [9] Tondo M L, Petrocelli S, Ottado J, et al. The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* is required for full virulence in citrus plants[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10803.
- [10] Lindgren H, Shen H, Zingmark C, et al. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(3): 1303-1309.
- [11] Ng V H, Cox J S, Sousa A O, et al. Role of KatG catalase - peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(5): 1291-1302.
- [12] Fee J A. Regulation of *sod* genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(11): 2599-2610.
- [13] Aiassa V, Barnes A I, Albesa I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 393(1): 84-88.
- [14] 陈文博. 嗜水气单胞菌在巨噬细胞内存活的相关基因及其功能研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012.
Chen W B. Identification and characterization of intracellular survival related genes of *Aeromonas hydrophila* in macrophages[D]. Xiamen: Jimei University, 2012 (in Chinese).
- [15] 邵光富, 鄢庆枇, 徐晓津, 等. 鳊鲃外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的建立[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 68-74.
Tai G F, Yan Q P, Xu X J, et al. Establishment of quant-

- itative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing *Aeromonas hydrophila* *in vitro*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 68-74(in Chinese).
- [16] Qin Y U, Lin G F, Chen W B, *et al.* Flagellar motility contributes to the invasion and survival of *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla japonica* macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 273-279.
- [17] Zhang M M, Qin Y X, Huang L X, *et al.* The Role of *sodA* and *sodB* in *Aeromonas hydrophila* resisting oxidative damage to survive in fish macrophages and escape for further infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 88: 489-495.
- [18] Zhang M M, Yan Q P, Mao L L, *et al.* *KatG* plays an important role in *Aeromonas hydrophila* survival in fish macrophages and escape for further infection[J]. *Gene*, 2018, 672: 156-164.
- [19] Darsigny M, Babeu J P, Seidman E G, *et al.* Hepatocyte nuclear factor-4 α promotes gut neoplasia in mice and protects against the production of reactive oxygen species[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(22): 9423-9433.
- [20] Yamamoto T, Hanawa T, Ogata S, *et al.* Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* *gsrA* gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(8): 2980-2987.
- [21] Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, *et al.* Microbial antioxidant defense enzymes[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 110: 56-65.
- [22] Das D, Saha S S, Bishayi B. Intracellular survival of *Staphylococcus Aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines[J]. *Inflammation Research*, 2008, 57(7): 340-349.
- [23] Xiao J, Chen T, Wang Q, *et al.* Comparative analysis of the roles of catalases *KatB* and *KatG* in the physiological fitness and pathogenesis of fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(5): 425-432.
- [24] Manca C, Paul S, Barry III C E, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes *in vitro*[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(1): 74-79.

Synergism of *sodA*, *sodB* and *KatG* in *Aeromonas hydrophila* under antioxidative stress

CHEN Liwei^{1,2}, ZHANG Meimei¹, ZHANG Jiaonan², HUANG Lixing¹, ZHAO Lingmin¹,
XU Xiaojin¹, QIN Yingxue^{1,2*}, YAN Qingpi^{1*}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Key Laboratory of Special Aquatic Compound Feed, Fuqing 350300, China)

Abstract: To further explore the mechanism of *Aeromonas hydrophila* against oxidative stress, the correlations between the expressions of *sodA*, *sodB* and *KatG* in wild-type strain B11 and the gene silencing strains *sodA*-RNAi, *sodB*-RNAi and *KatG*-RNAi under different oxidative stresses were analyzed. Meanwhile, the correlation between the expressions of *sodA*, *sodB* and *KatG* and bacterial growth and survival was also studied. The results indicated that of the three genes (*sodA*, *sodB* and *KatG*), the silencing of any one gene resulted in significantly suppressed expression of the other two genes when they were under no oxidative stress. This indicated that these antioxidant stress genes were closely correlated in expression. Under H₂O₂ stress, silencing of one gene was always coupled with the significant up-regulation of the other two genes. Under MV-induced ROS stress, the expression of *sodA* and *sodB* genes in silencing strains was up-regulated, but the expression of *KatG* in strains *sodA*-RNAi and *sodB*-RNAi was down-regulated, indicating that the expression of two SODs genes was essential in resisting MV induced ROS damage. With the increase of H₂O₂ concentration, the survival rate of wild strain B11 remained at a high level, but the survival rate of gene silencing strains *sodA*-RNAi, *sodB*-RNAi and *KatG*-RNAi decreased significantly, and the expression of *sodA*, *sodB* and *KatG* was correlated with the length of the lag phase of *A. hydrophila*. Under different concentrations of MV stress, the survival rate of wild strain B11 and silencing strain *KatG*-RNAi remained at a relatively high level, while the survival rate of silencing strains *sodA*-RNAi and *sodB*-RNAi decreased significantly. But all the strains still maintained relatively good growth ability. These results suggested that under different oxidative stress conditions, bacteria can resist ROS damage through the synergism of different antioxidant stress genes. Under H₂O₂ stress, *KatG* is more important for the survival of *A. hydrophila*. Under MV-induced endogenous ROS stress, the expression of SODs genes contributes more to the survival of *A. hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; *sodA*; *sodB*; *KatG*; oxidative stress; synergism

Corresponding authors: QIN Yingxue. E-mail: yxqin@jmu.edu.cn;

YAN Qingpi. E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31502194); Fujian Province Key Laboratory of Special Aquatic Formula Feed(Fujian Tianma Science and Technology Group Co., Ltd.)(TMKJZ1908)