



## 溶血相关基因缺失降低鳗弧菌感染花鲈的致病性

姜 维<sup>1</sup>, 周家宇<sup>1</sup>, 王雨果<sup>1</sup>, 胡存洁<sup>1</sup>, 方 秀<sup>2</sup>,  
罗士炎<sup>3</sup>, 刘 洋<sup>3</sup>, 鲍宝龙<sup>1\*</sup>

(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,

水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 福建闽威实业股份有限公司, 福建 福鼎 355200;

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:** 为阐明毒力因子溶血素对鳗弧菌感染花鲈过程中发挥的作用, 实验以花鲈为研究对象, 通过对花鲈幼鱼分别注射  $5.0 \times 10^5$  CFU 鳗弧菌野生株和缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ , 评估了溶血相关基因缺失对花鲈的感染能力、花鲈各组织的病理变化情况以及免疫响应的影响。结果显示, 花鲈感染野生株后的  $LD_{50}$  为  $2.103 \times 10^5$  CFU/mL, 感染缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  后  $LD_{50}$  为  $1.837 \times 10^6$  CFU/mL, 溶血相关基因缺失使鳗弧菌毒性降到原来的 11.44%; 鳗弧菌主要定植在花鲈的肠道和鳃中, 溶血相关基因缺失降低鳗弧菌在花鲈体内的定植能力, 同时降低对鳃和肠道的损伤程度; 转录组分析表明 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 缺失后, 头肾组织的差异表达基因显著富集到造血细胞谱系、抗原处理和呈递、细胞黏附分子、肠道免疫网络的 IgA 生产等免疫通路, 并用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 对表达水平进行了验证。研究表明, 溶血相关基因缺失降低了鳗弧菌感染花鲈的致病能力。研究结果有助于进一步了解鳗弧菌的致病机制, 并为开发花鲈抗弧菌免疫增强剂或减毒疫苗提供依据。

**关键词:** 花鲈; 鳗弧菌; 溶血素; 细菌感染; 免疫应答

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是一种常见的海洋革兰氏阴性致病细菌, 能引起鱼类、甲壳动物等的感染及发病<sup>[1-4]</sup>。花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 作为中国、日本等沿海地区的重要海洋经济鱼类, 受养殖密度增加、水质污染日益严重等影响, 因鳗弧菌造成的渔业损失越来越严重<sup>[5-7]</sup>。肖慧等<sup>[8-9]</sup>从烂鳃烂尾的日本花鲈鱼苗分离得到一株鳗弧菌 W-1, 人工感染日本花鲈后表现出较强的致病力; 郭伟荣等<sup>[10]</sup>注射感染鳗弧菌后, 花鲈表现出鳍条充血甚至溃烂, 脾脏肿大、肠道充血等症状。

鳗弧菌依赖于多种致病因子侵染并存活于宿主体内, 主要包括 VI 型分泌系统、溶血素、胞外蛋白酶、铁摄取系统、密度感应系统等<sup>[11-13]</sup>。其中溶血素作为穿孔毒素, 可通过溶解宿主红细胞从而释放血红蛋白, 这一过程既为细菌繁殖提供营养, 又导致了宿主的出血性败血症<sup>[14-16]</sup>。目前, 已发现鳗弧菌中存在多种编码溶血活性的毒力基因, 分别为 VAH 毒素同源基因 *vah1* ~ 5 和 RTX 毒素 (*rtxA*、*rtxB*、*rtxC*、*rtxD*、*rtxE*)<sup>[15,17-18]</sup>。研究表明, 相较于其他 VAH 毒素同源基因, VAH4 具

收稿日期: 2023-03-03 修回日期: 2024-04-21

资助项目: 福建省区域发展项目 (2021N3016); 国家重点研发计划 (2022YFD2400100); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2020R1022009)

第一作者: 姜维 (照片), 从事水产微生物学研究, E-mail: wjiang1998@126.com

通信作者: 鲍宝龙, 从事鱼类和细菌协同进化研究, E-mail: blbao@shou.edu.cn



有较低的溶血活性与对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的致病性<sup>[19]</sup>。Li 等<sup>[17]</sup>通过构建 RTX 毒素缺失株发现, 当鳗弧菌缺失 *rtxA* 基因时, 其对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 幼鱼丧失致病能力; 当鳗弧菌 *vah1* 和 *rtxA* 基因同时缺失时, 其溶血能力显著下降。为了评估溶血相关基因缺失对鳗弧菌感染花鲈的致病力的影响, 实验基于同源重组技术构建了一株溶血相关基因 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 同时缺失的鳗弧菌减毒菌株, 比较了该株减毒菌株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  与野生株对花鲈致病性的影响, 以期对鳗弧菌致病机制有进一步的了解, 并为开发花鲈抗弧菌免疫增强剂或减毒疫苗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及引物

鳗弧菌 775 菌株为具有氨苄霉素抗性的条件

性致病菌, 由本实验室保藏。鳗弧菌  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  菌株为本实验基于同源重组技术构建并保存的具有氨苄霉素抗性的工程菌<sup>[20]</sup>。鳗弧菌与缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  于 28 °C 在 LB 培养基中培养, 氨苄霉素抗生素工作浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用 Primer premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。

### 1.2 实验用鱼

实验用花鲈均来自福建省闽威实业花鲈养殖基地, 平均体长为 (13.00 $\pm$ 1.56) cm, 平均体重为 (35.00 $\pm$ 4.69) g。选取健康花鲈于 (28 $\pm$ 1) °C 下养殖海水水箱暂养 1 周, 定期检测水体细菌生长情况并观察实验鱼的健康状况。在进行相关实验前, 花鲈均提前使用 MS-222 麻醉。本研究获得上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学动物保护和伦理委员会伦理规范。

表 1 本实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	长度/bp length	用途 usage
<i>vah1</i> -F	GCCATGGAGAGTGGCAATAT	56	3 034/1 039	细菌检测
<i>vah1</i> -R	AGACTTGAGCCACGTAGACC			
<i>vah4</i> -F	TCAGTCTACTTCGTGACGCTCT	56	1 590/1 049	细菌检测
<i>vah4</i> -R	GTGGACCCAGACGTAAAGGT			
<i>rtxA</i> -F	TCTCCTTTTGGTCACGGACGTC	56	3 714/1 518	细菌检测
<i>rtxA</i> -R	CGGTGACGTTTAGGCCATCTC			
16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1 446	菌种鉴定
16S-R	GGTTACCTTGTACGACTT			
<i>VAI3</i> -F	GGTTGTTCTATGCAGCGAG	58	173	定量 PCR
<i>VAI3</i> -R	CTATTTCCCGCAACGTCTCG			
<i>RLN3</i> -F	TGTGTGCAGTGGTTCATGTG	58	169	定量 PCR
<i>RLN3</i> -R	CGTTTGGACAACCTGGGAGC			
<i>HLA-DRA</i> -F	CAGCAAACATCGAGGCCTAC	58	175	定量 PCR
<i>HLA-DRA</i> -R	TGCGGGTGTAACCTCCAGAT			
<i>FGA</i> -F	CAGTCGGCTAACTTGAATGGG	58	153	定量 PCR
<i>FGA</i> -R	AGCAGCCAGTCGAATAAACA			
<i>DES</i> -F	CTACATCGAGAAGGTCGCT	58	171	定量 PCR
<i>DES</i> -R	ACCTCTATGCGTGACCTCTG			
<i>Csrp1</i> -F	GCCTCAAAGTTTGCCAGAA	58	180	定量 PCR
<i>Csrp1</i> -R	GATCTCCCCGTCTCTGTGACG			
<i>FGFRL1</i> -F	CAGATCTGAAGCCCCAAAGC	58	162	定量 PCR
<i>FGFRL1</i> -R	GGGAAGACGAGGATGAGGAG			
<i>Cd22</i> -F	CAACAGCGTTGAACCTCACA	58	191	定量 PCR
<i>Cd22</i> -R	CCGTGTTGAAGCTGTGTTGA			
18S-F	AGAAACGGCTACCACATCCA	58	176	定量 PCR
18S-R	AGCTCGTAGTTGGATCTCGG			

### 1.3 花鲈半致死浓度 (LD<sub>50</sub>) 测定

将鳗弧菌接种于氨苄霉素浓度为 100 mg/mL 的 LB 液体中, 28 °C 培养过夜。种子液以 1 : 100 (体积比) 进行接种扩培, 收集 OD<sub>600</sub>=0.6 的菌体并用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤并稀释得到 1.0×10<sup>3</sup>、1.0×10<sup>4</sup>、1.0×10<sup>5</sup>、1.0×10<sup>6</sup>、1.0×10<sup>7</sup> 和 1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL。将 100 μL 供试菌液以腹腔注射方式注射至鱼体中, 菌体各浓度处理 10 尾实验鱼, 每组设立 3 个平行, 对照组为同体积无菌 PBS。统计 7 d 内各处理组的花鲈死亡情况, 采用寇氏法进行 LD<sub>50</sub> 的计算<sup>[21]</sup>。

### 1.4 鳗弧菌感染花鲈实验

每尾花鲈腹腔注射 5.0×10<sup>5</sup> CFU 菌体, 野生株、缺失株各 30 尾, 并设立 3 个平行, 同时设 PBS 作对照。在处理 0、12、24、48 和 72 h 分别采集 3 尾实验鱼的肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心、皮、肌、脑、眼等 10 种组织, 充分研磨后 PBS 定容至 1 mL。均匀稀释样本并涂布在添加 100 mg/mL 氨苄霉素的 TCBS 固体培养基上, 28 °C 培养过夜。随机挑选单菌落各 100 个, 以菌落为模板, 用 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 基因特异引物鉴定鳗弧菌野生株或缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  并计数, 计算每 1 g 组织中相应弧菌数量<sup>[22]</sup>。

### 1.5 病理组织切片

在注射感染后 72 h 随机选取花鲈解剖并采集肠道和鳃组织, 经过脱水、石蜡包埋、切片和苏木精-伊红 (H.E) 染色后, 利用尼康 EclipseCi-L 显微镜观察组织及细胞形态变化和差异<sup>[23]</sup>。

### 1.6 总 RNA 提取与测序

头肾作为花鲈免疫系统重要的造血免疫器官, 参与早期免疫反应和早期免疫细胞的产生。因此采集注射感染后 12 h 的不同处理组花鲈头肾, 液氮速冻后储存在 -80 °C。TRIzol 法提取总 RNA 并将 3 个平行样品进行混合, 送至广州基迪奥生物科技有限公司完成转录组测序。

### 1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

为验证转录组测序结果的准确性, 随机选择 8 个差异表达的基因 [ $\log_2(\text{fold change}) > 1$ ,  $P < 0.05$ ] 进行验证。用 RNAiso 试剂 (TaKaRa) 从组织中提取总 RNA, 用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒合成 cDNA 第一链。

qRT-PCR 检测采用 SYBR Green 荧光法, 使用 Bio-Rad CFX 96 实时 PCR 系统, 扩增条件: 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, 并进行熔解曲线分析。用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法将基因表达水平归一化为 18S *rRNA* 基因的表达水平<sup>[24]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 溶血素相关基因缺失降低鳗弧菌感染花鲈的致死率

花鲈注射感染野生株后的半数致死量为 2.103×10<sup>5</sup> CFU/mL, 注射感染缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  后的半数致死量为 1.837×10<sup>6</sup> CFU/mL。缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  的半数致死量相比野生株的半数致死量提高了 8.74 倍, 即鳗弧菌缺失株  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  的毒性比野生株降到原来的 11.44% (表 2)。

### 2.2 溶血素相关基因缺失影响鳗弧菌在花鲈体内的定植

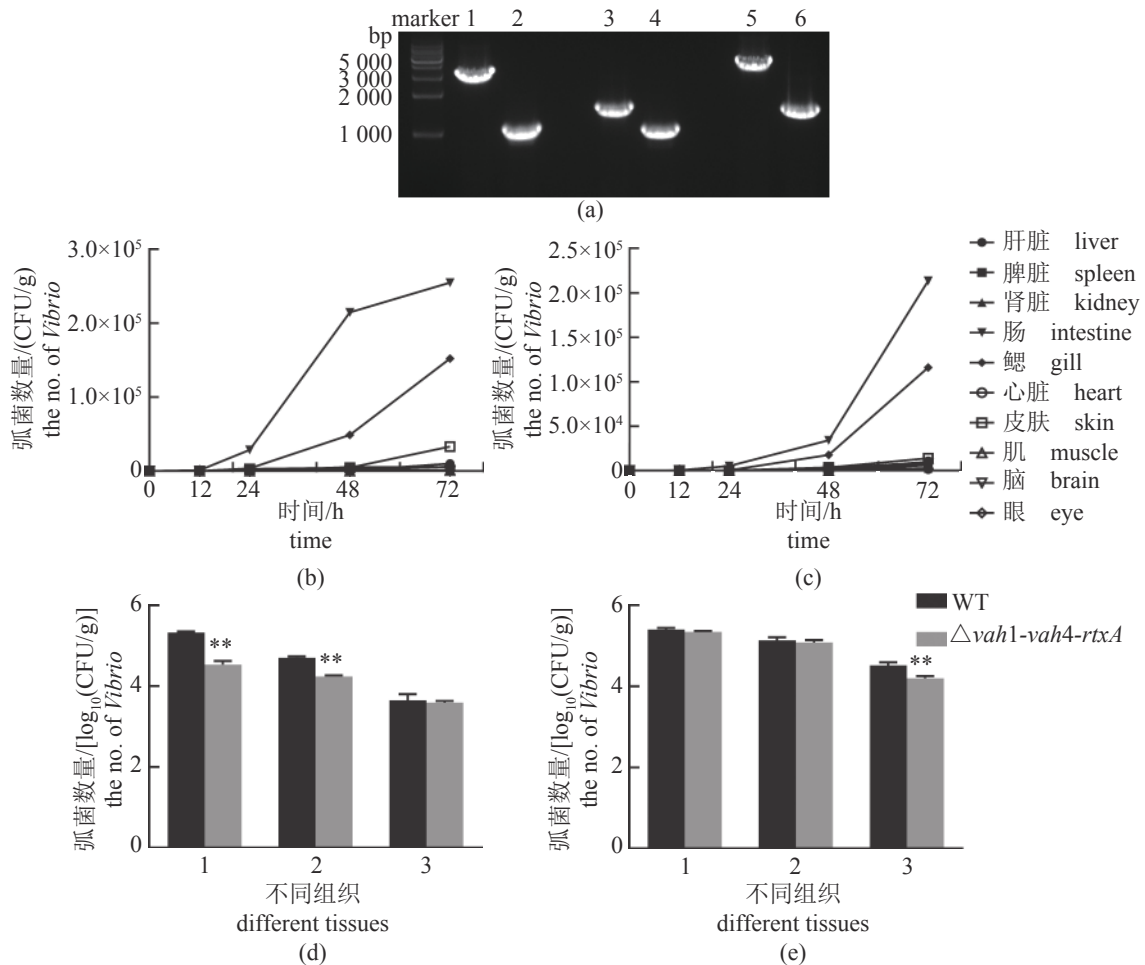
利用 *vah1*、*vah4*、*rtxA* 基因特异引物对鳗弧菌进行鉴定, 野生株包含基因与上下游同源臂序列, 缺失株仅包含基因上下游同源臂 (图 1-a)。注射感染后, 野生株和缺失株在花鲈不同部位均显示出逐渐增多的趋势, 且在肠道与鳃中最为明显。感染 24 h 野生株在花鲈肠道中最先被观察到大量定植, 48 h 在鳃部被观察到定植数量明显增加, 72 h 在皮肤中定植数量明显增加 (图 1-b); 而缺失株直至 48 h 才显示出在肠道和鳃中较明显的定植 (图 1-c)。感染 48 h 野生株和缺失株 2 个样本在肠道和鳃中的均值差异极显著, 感染 72 h 两者在皮肤中呈现极显著差异 ( $P < 0.01$ ) (图 1-d,e)。

### 2.3 溶血素相关基因缺失降低鳗弧菌对花鲈鳃和肠道组织的损伤

花鲈感染鳗弧菌 72 h 后, 鳃丝病变卷曲, 鳃小片末端出现淤血肿胀。随着鳃小片局部上皮细胞的脱落和血细胞的破裂, 鳃组织结构完整性被破坏。同时, 缺失菌  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  处理组的感染症状较野生株处理组轻, 鳃小片仍保持较整齐形态, 毛细血管扩张淤血, 鳃小片发生轻微卷曲 (图版-1~4)。感染鳗弧菌后花鲈肠道组织也出现了损伤现象, 肠道黏膜下层发生萎缩, 与固有层分离, 多处肠道黏膜上皮细胞脱落, 肠道结构被严重破坏。缺失菌  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  处理组损伤程度

表 2 花鲈注射鳃弧菌野生株和缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 的半数致死量测定Tab. 2 The LD<sub>50</sub> of *L. maculatus* after injected with wild strain WT and  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 

菌株 strains	感染浓度/(CFU/mL) infection concentration	数量/尾 total number	死亡数量/尾 number of deaths	死亡率/% mortality	半数致死量LD <sub>50</sub> /(CFU/mL) median lethal dose
WT	1×10 <sup>8</sup>	30	30	100	2.103×10 <sup>5</sup>
	1×10 <sup>7</sup>	30	25	83.33	
	1×10 <sup>6</sup>	30	17	56.67	
	1×10 <sup>5</sup>	30	13	43.33	
	1×10 <sup>4</sup>	30	8	26.67	
	1×10 <sup>3</sup>	30	4	13.33	
$\Delta vah1-vah4-rtxA$	1×10 <sup>8</sup>	30	28	93.33	1.837×10 <sup>6</sup>
	1×10 <sup>7</sup>	30	18	60	
	1×10 <sup>6</sup>	30	11	36.67	
	1×10 <sup>5</sup>	30	8	26.67	
	1×10 <sup>4</sup>	30	6	20	
	1×10 <sup>3</sup>	30	3	10	
PBS	0	30	1	3.33	

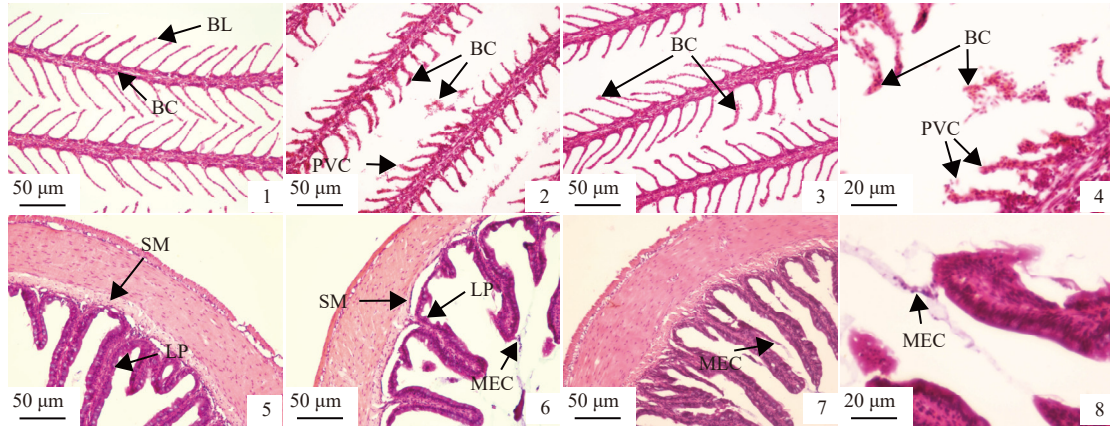
图 1 鳃弧菌 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 的检测与定植能力比较

(a) 鳃弧菌检测电泳图, 泳道 1、3、5 分别为野生株对照条带 *vah1*、*vah4*、*rtxA*, 泳道 2、4、6 分别为缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 扩增条带 *vah1*、*vah4*、*rtxA*, (b) 野生株在花鲈不同组织部位的定植, (c) 缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 在花鲈不同组织部位的定植, (d)(e) 分别处理 48 h 和 72 h 后花鲈各组织的弧菌总数, 1. 肠道, 2. 鳃, 3. 皮肤。

Fig. 1 Detection and colonization ability comparison of strain  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 

(a) detection of the strain  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ , lanes 1, 3 and 5 were the genes of *vah1*, *vah4* and *rtxA* in wild strain, and lanes 2, 4 and 6 were the genes of *vah1*, *vah4* and *rtxA* in strain  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ , (b) colonization of WT in different tissues of *L. maculatus*, (c) colonization of  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  in different tissues of *L. maculatus*, (d) (e) the no. of *Vibrio* in different organizations after 48 h and 72 h, 1. intestine, 2. gill, 3. skin.





图版 花鲈感染鳃弧菌后肠道和鳃石蜡切片显微结构

1、5. 健康花鲈, 2、6. 鳃弧菌野生株处理组, 3、7. 缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 处理组, 4、8. 组织损伤后细胞观察; 1~4. 花鲈鳃组织, 5~8. 花鲈肠道组织; LP. 固有层, SM. 黏膜下层, MEC. 肠道黏膜上皮细胞, BL. 鳃小片, BC. 血细胞, MRC. 线粒体丰富细胞, PVC. 扁平上皮细胞。

**Plate Microstructure of paraffin section of gill and intestine of *L. maculatus* after challenge with *V. anguillarum***

1,5. healthy *L. maculatus*, 2,6. *L. maculatus* treated by *V. anguillis* wild strain, 3,7. *L. maculatus* treated by  $\Delta vah1-vah4-rtxA$ , 4,8. cell observation after tissue injury; 1-4. gill of *L. maculatus*, 5-8. intestine of *L. maculatus*; LP. lamina propria, SM. submucosa, MEC. intestinal mucosal epithelial cells, BL. branchial lamella, BC. blood cell, PVC. pavement cell.

较野生株处理组低 (图版-5~8)。

#### 2.4 溶血素相关基因缺失影响花鲈对鳃弧菌感染的免疫应答

分析野生株处理组和缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ 处理组的差异表达基因, 共得到 3 440 个差异表达基因, 其中 1 725 个基因表达量显著上调, 1 715 个基因表达量显著下调 (图 2-a)。从筛选鉴定出的免疫基因中随机挑选了 8 个基因进行 qRT-PCR 验证, 结果显示, 随机挑选的基因变化趋势均与转录组测序分析结果一致 (图 2-b)。分析差异表达基因富集到了一些可能与免疫相关的 GO term 中, 包括 signal transduction (GO:0007165)、cellular response to stimulus (GO:0051716)、ATP binding (GO:0005524)、response to stimulus (GO:0050896) 等。富集到的 KEGG 通路共 330 条, 其中富集分布 TOP20 中与免疫相关的 Pathway 有造血细胞谱系 (hematopoietic cell lineage)、同种异体移植排斥 (allograft rejection)、细胞黏附分子 (cell adhesion molecules)、肠道免疫网络的 IgA 生产 (intestinal immune network for IgA production)、抗原处理和呈递 (antigen processing and presentation)、蛋白质消化吸收 (protein digestion and absorption) (图 2-c)。这些通路中富含了较多与先天性免疫、适应性免疫与造血相关的基因。

根据差异基因 GO 和 KEGG pathway 富集分析结果, 结合 ImmPort 数据库 (<https://www.immport.org/home>), 共筛选到 37 个关键免疫相关基因, 按具体功能分为 6 类, 分别是 BCR 信号通路、抗菌肽、抗原处理和呈递、趋化因子、细胞因子、细胞因子受体 (表 3)。

### 3 讨论

实验首次对溶血相关基因 *vah1*、*vah4* 和 *rtaA* 对鳃弧菌感染花鲈致病能力的影响进行评估。通过对花鲈幼鱼分别注射鳃弧菌野生株和缺失株 $\Delta vah1-vah4-rtxA$ , 可知缺失株的 LD<sub>50</sub> 较野生株提高 8.74 倍, 可见, 溶血相关基因缺失后的鳃弧菌对花鲈的毒性下降了。Rock 等<sup>[25]</sup> 通过定点诱变获得 *vah1* 突变株, 并发现其对大西洋鲑 (*Salmon salar*) 的毒力降低; Rodkhumd 等<sup>[19]</sup> 构建的溶血相关基因突变体对虹鳟处理的半数致死量 LD<sub>50</sub> 高于野生株处理组, 且发现 *vah4* 的毒力最强; Li 等<sup>[17]</sup> 研究发现 *rtaA* 突变的鳃弧菌株对大西洋鲑毒力较野生株处理组低, 这与本研究结果相符。弧菌主要通过鱼类肠道、鳃和皮肤等组织进行侵染, 陈强<sup>[26]</sup> 通过对溶藻弧菌对黏膜系统黏附的动力学研究, 发现大黄鱼鳃和肠黏液对溶藻弧菌生长具有促进作用<sup>[26]</sup>; Hu 等<sup>[27]</sup> 发现, 鱼体能够通过不断脱落

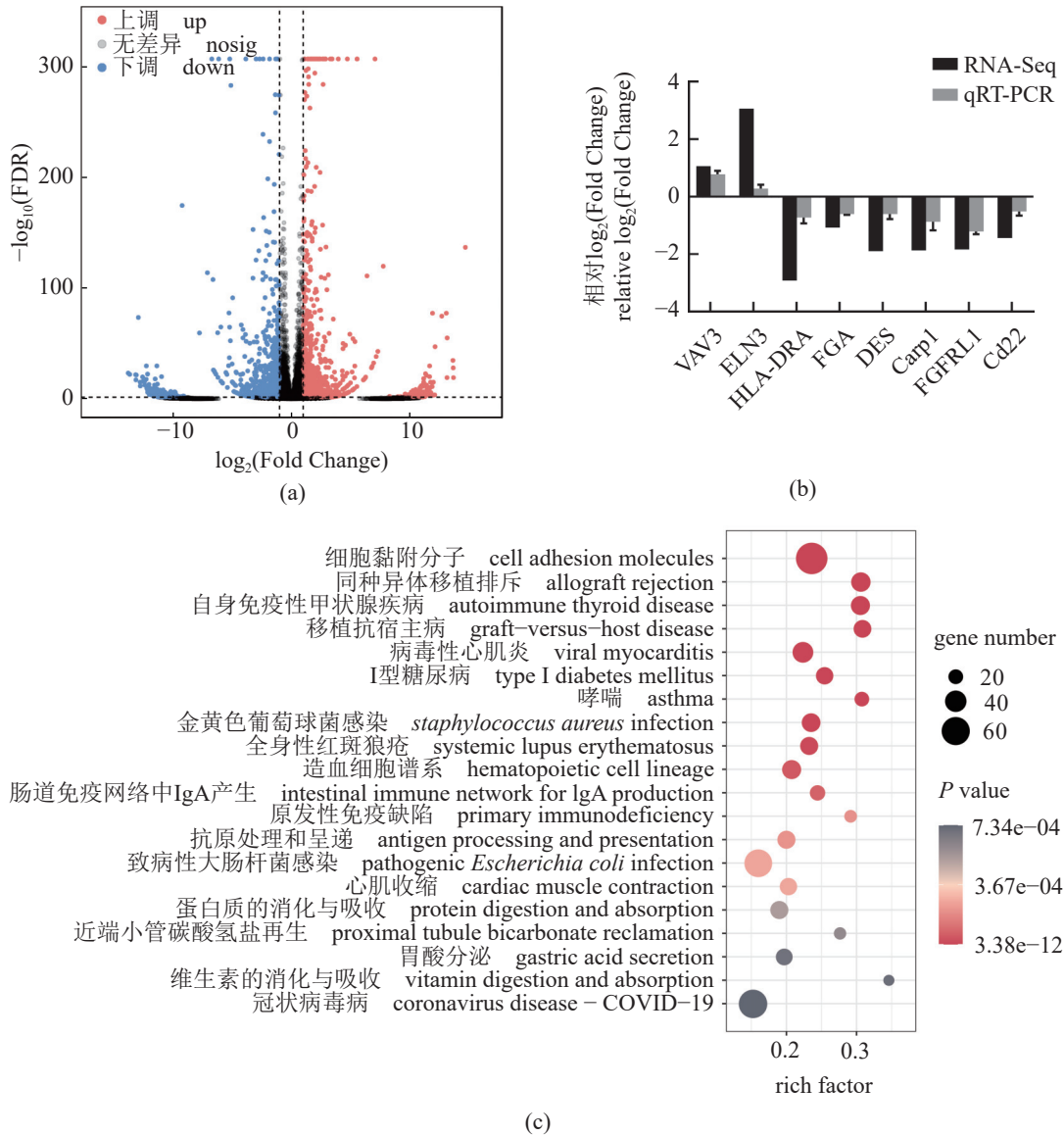


图2 花鲈野生株处理组和缺失株处理组转录组验证和差异基因分析

(a) 差异基因火山图, (b) 免疫基因的RNAseq测序分析和qRT-PCR验证分析, (c) 差异基因KEGG富集因子图。

**Fig. 2 qRT-PCR verification and analysis of differential genes between WT group and  $\Delta$ vah1-vah4-rtxA group**

(a) volcanc map of differential genes, (b) RNA-seq sequencing analysis and qRT-PCR verification analysis of immune genes, (c) KEGG enrichment entries of differential genes.

肠道上皮细胞使得细菌排出体外, 同时副溶血弧菌可以通过促进鱼类肠道上皮细胞的增殖来增强细菌在肠道内的定植和致病能力。其中, 定植能力是细菌感染能力的重要标志, 定植在弧菌侵染宿主的过程中起到了重要作用, 定植能力的降低对鳃弧菌侵染宿主是不利的<sup>[28-29]</sup>。本研究发现鳃弧菌在花鲈肠道与鳃中的定植能力显著大于其他组织, 这与陈强等<sup>[26]</sup>的研究结果相一致。且在肠道、鳃和皮肤的感染过程中, 野生株的定植能力

和引起的组织损伤程度均高于缺失株, 表明溶血相关基因的缺失影响鳃弧菌在花鲈体内的定植能力。通过分析花鲈感染野生株和缺失株的肠道和鳃的病理切片, 发现花鲈感染缺失株的症状较感染野生株的肠道空泡化、鳃丝坏死程度低。由此推测溶血素相关基因缺失将导致菌株毒力、定植能力下降, 从而降低菌株对宿主的致病能力。

实验首次比较了鳃弧菌及缺失株感染花鲈 12 h 后头肾的差异基因, 并通过 GO 和 KEGG 通路富

表 3 免疫基因鉴定与聚类

种类 category	基因编码 gene ID	基因 gene
BCR信号通路 BCR signaling pathway	Unigene0011606	<i>IGHV3-21</i>
	Unigene0030797	<i>IGKV2-28</i>
抗菌肽 antimicrobials	Unigene0041120	<i>Cd22</i>
	Unigene0041511	<i>VAV3</i>
	Unigene0045132	<i>IGLC1</i>
	Unigene0003423	<i>DUOX2</i>
	Unigene0003504	<i>FABP7</i>
	Unigene0004044	<i>Dmbt1</i>
	Unigene0004572	<i>CRP</i>
	Unigene0009353	<i>FGA</i>
	Unigene0012806	<i>Csrp1</i>
	Unigene0013029	<i>des</i>
	Unigene0013031	<i>DES</i>
	Unigene0014384	<i>hamp</i>
	Unigene0019385	<i>COLEC12</i>
	Unigene0020791	<i>crabp1</i>
	Unigene0026426	<i>MUC5AC</i>
Unigene0030051	<i>CLDN4</i>	
Unigene0031595	<i>Fabp2</i>	
Unigene0033565	<i>CYLD</i>	
Unigene0041262	<i>F2r1</i>	
抗原处理和呈递 antigen processing and presentation	Unigene0000059	<i>Mr1</i>
	Unigene0023474	<i>CD209</i>
	Unigene0024495	<i>HLA-DRA</i>
趋化因子 chemokines	Unigene0011402	<i>FGF10</i>
细胞因子 cytokines	Unigene0003211	<i>CHGA</i>
	Unigene0015152	<i>RLN3</i>
	Unigene0023083	<i>ghrl</i>
	Unigene0029618	<i>fam3c</i>
	Unigene0030050	<i>FGF21</i>
	Unigene0039534	<i>CCN2</i>
	Unigene0003569	<i>EGFR</i>
细胞因子受体 cytokine receptors	Unigene0014302	<i>IL20RA</i>
	Unigene0020073	<i>IL1R1</i>
	Unigene0032400	<i>FGFRL1</i>
	Unigene0035504	<i>NR12</i>
	Unigene0043616	<i>MET</i>

集分析发现, 差异表达基因富集到的 GO term 与免疫应答相关的有 signal transduction、ATP binding 等, 表明鳗弧菌 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 缺失可能对花鲈细胞的功能基因的调控和代谢等有一定影响。KEGG 富集中与免疫相关的通路有造血细胞谱系、抗原处理和呈递、细胞黏附分子、肠道免疫网络的 IgA 生产。造血细胞谱系对机体免疫系

统的调节具有重要作用, 是机体产生白细胞、T 细胞和 B 细胞等免疫细胞的重要通路<sup>[30-31]</sup>。血细胞抵御病原菌侵染的能力受生化环境影响, 机体仍需借助其他免疫通路来响应侵染<sup>[32]</sup>。抗原处理和呈递在宿主免疫应答中起到传递作用, 先天免疫系统的细胞非特异性识别并降解抗原后, 通过抗原呈递来激活后天免疫系统<sup>[33]</sup>。在缺失溶血相关基因 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 后, 鳗弧菌缺失株的致病性和花鲈体内存活数量均降低, 可能受到了造血细胞谱系、抗原处理和呈递等免疫相关通路通路的调控。黏附分子在炎症过程中发挥重要作用, 一旦炎症被触发, 黏附分子基因在内皮细胞和免疫细胞中发生上调, 以促进白细胞黏附和迁移到炎症部位<sup>[34]</sup>。定植检测发现弧菌主要分布于肠道和鳃中, 组织中丰富的黏液细胞为弧菌生长提供生长繁殖条件, 同时上皮细胞的脱落与增殖也促进了弧菌的黏附作用, 同样在转录组结果筛选得到了 IgA 生产等免疫通路, 以对抗病原微生物的侵染<sup>[30]</sup>。从显著性差异基因中筛选到 37 个免疫相关基因, 筛选到免疫相关的抗菌肽基因有 *DUOX2*、*hamp* 等, 是鱼类普遍有效的抗菌机制<sup>[35]</sup>。BCR 信号通路在鱼类体液免疫中起着至关重要的作用, 发掘到与其相关的免疫相关基因有 *IGHV3-21*、*Cd22* 等<sup>[36]</sup>。另外在抗原处理和呈递、趋化因子、细胞因子、细胞因子受体等也筛选到部分免疫相关基因, 该筛选结果在基因层面说明鳗弧菌溶血相关基因的缺失可引起花鲈免疫相关基因差异表达。可见, 溶血素相关基因在鳗弧菌侵染花鲈的过程中发挥了重要的作用。

综上所述, 本研究评估了溶血相关基因 *vah1*、*vah4* 和 *rtxA* 缺失对鳗弧菌毒性、定植能力的影响, 并对花鲈感染鳗弧菌野生株和缺失株  $\Delta$ *vah1-vah4-rtxA* 后的肠道和鳃病理变化、免疫应答进行了研究, 研究结果表明, 溶血相关基因缺失降低了鳗弧菌感染花鲈的致病性。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Duan Y F, Liu P, Li J T, et al. cDNA cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 5 gene in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(12): 6569-



- 6577.
- [ 2 ] 王小鹿, 李杰, 李贵阳, 等. *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株 Hcp 表达和杀菌能力的影响 [J]. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 125-134.  
Wang X L, Li J, Li G Y, *et al.* The effect of *rpoS* on Hcp expression and bactericidal activity in *Vibrio anguillarum* MHK3[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 125-134 (in Chinese).
- [ 3 ] Guanhua Y, 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.
- [ 4 ] 张玲玲, 余莉, 李长红, 等. 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) CC 型趋化因子受体 3(CCR3) 基因的分子鉴定及其对鳗弧菌感染响应的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2021, 52(6): 1456-1464.  
Zhang L L, Yu L, Li C H, *et al.* Molecular identification of CC motif chemokine receptor 3 (CCR3) gene and its response to *Vibrio anguillarum* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2021, 52(6): 1456-1464 (in Chinese).
- [ 5 ] 张晓燕, 温海深, 张凯强, 等. 花鲈等渗点分析及海水淡化对 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> 浓度、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性及基因表达的影响 [J]. 水产学报, 2018, 42(8): 1199-1208.  
Zhang X Y, Wen H S, Zhang K Q, *et al.* Analysis of the isotonic point and effects of seawater desalination on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> concentration, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and relative gene expressions in *Lateolabrax maculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(8): 1199-1208 (in Chinese).
- [ 6 ] 温海深, 张美昭, 李吉方, 等. 我国花鲈养殖产业现状与种子工程研究进展 [J]. 渔业信息与战略, 2016, 31(2): 105-111.  
Wen H S, Zhang M Z, Li J F, *et al.* Research progress of aquaculture industry and its seed engineering in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) of China[J]. Fishery Information & Strategy, 2016, 31(2): 105-111 (in Chinese).
- [ 7 ] 张新中, 张世秀, 李海平, 等. 海水养殖动物致病性 (Pathogenicity) 鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的研究综述 [J]. 现代渔业信息, 2007, 22(1): 16-19, 22.  
Zhang X Z, Zhang S X, Li H P, *et al.* Review on research of *Vibrio anguillarum*-pathogenicity to aquatic animals in mariculture[J]. Modern Fisheries Information, 2007, 22(1): 16-19, 22 (in Chinese).
- [ 8 ] 肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 92-98.  
Xiao H, Li J, Wang X H, *et al.* Studies on pathogens of rotted gill and rotted caudal fins of seaperch (*Lateolabrax japonicus*) fry[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(1): 92-98 (in Chinese).
- [ 9 ] 肖慧, 唐学玺, 陈吉祥, 等. 鳗弧菌 W-1 对花鲈鱼苗致病性的初步研究 [J]. 海洋科学, 2008, 32(3): 36-39.  
Xiao H, Tang X X, Chen J X, *et al.* Preliminary studies on the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* W-1 in seaperch fry[J]. Marine Sciences, 2008, 32(3): 36-39 (in Chinese).
- [ 10 ] 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.  
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 (in Chinese).
- [ 11 ] Li L, Mou X Y, Nelson D R. Characterization of *Plp*, a phosphatidylcholine-specific phospholipase and hemolysin of *Vibrio anguillarum*[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 271.
- [ 12 ] Tang L, Yue S, Li G Y, *et al.* Expression, secretion and bactericidal activity of type VI secretion system in *Vibrio anguillarum*[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(8): 751-760.
- [ 13 ] 孙晶晶, 高晓建, 张晓君, 等. 病原性鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立 [J]. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 49-55.  
Sun J J, Gao X J, Zhang X J, *et al.* Detection of pathogenic *Vibrio anguillarum* by using duplex PCR and LAMP assays[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 49-55 (in Chinese).
- [ 14 ] Zhang X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1011-1019.
- [ 15 ] Hirono I, Masuda T, Aoki T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 1996, 21(3): 173-182.
- [ 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 ] 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.
- [ 18 ] 王雪彤. 鳗弧菌基因组测序及生长和感染相关基因的分析 [D]. 上海: 华东理工大学, 2018.  
Wang X T. Genome sequencing and identification of genes essential for *in vivo* infection in fish pathogen *Vibrio anguillarum* MVM425[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.



- University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [19] Rodkhum C, Hirono I, Crosa J H, *et al.* Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2005, 39(4): 109-119.
- [20] 胡存洁, 车金远, 黄旭雄, 等. 鳗弧菌 *vah1* 缺失菌株构建及致病性评估 [J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(3): 481-490.
- Hu C J, Che J Y, Huang X X, *et al.* Construction and pathogenicity evaluation of *Vibrio anguillarum* strain with *vah1* deletion[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(3): 481-490 (in Chinese).
- [21] 赵东康, Rachit Penglee, 车金远, 等. *aguA* 基因缺失影响嗜水气单胞菌致病性 [J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(4): 449-459.
- Zhao D, Penglee R, Che J, *et al.* Deletion of the *aguA* gene affects pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(4): 449-459 (in Chinese).
- [22] 孟璐, 车金远, 黄旭雄, 等. 溶藻弧菌 *RseB* 基因缺失对凡纳滨对虾致病性的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(4): 681-689.
- Meng L, Che J Y, Huang X X, *et al.* Deletion of *RseB* gene attenuates the pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(4): 681-689 (in Chinese).
- [23] 程安怡, 王永阳, 翁华松, 等. 转录组分析揭示溶藻弧菌感染早期大黄鱼的免疫应答特征 [J]. *水生生物学学报*, 2022, 46(12): 1845-1854.
- Cheng A Y, Wang Y Y, Weng H S, *et al.* Transcriptome analysis revealed the immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in early stage of *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(12): 1845-1854 (in Chinese).
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] 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.
- [26] 陈强. 致病性溶藻弧菌对大黄鱼粘液的粘附研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- Chen Q. Adhesion of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to mucus of large yellow croakers[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006 (in Chinese).
- [27] Hu M Z, Zhang Y B, Gu D, *et al.* Nucleolar c - Myc recruitment by a *Vibrio* T3SS effector promotes host cell proliferation and bacterial virulence[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(2): e105699.
- [28] Almagro-Moreno S, Pruss K, Taylor R K. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004787.
- [29] 张依琳, 吴凡, 简纪常, 等. 海水养殖病原弧菌对鱼类宿主定植机制研究进展 [J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(6): 138-146.
- Zhang Y L, Wu F, Jian J C, *et al.* Review on host-invaded colonization and regulatory mechanism by pathogenic *Vibrio* in mariculture[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(6): 138-146 (in Chinese).
- [30] 童正飞, 胡亚洲, 谭进, 等. 中华鳖脾脏转录组比较及免疫相关基因分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5449-5456.
- Tong Z F, Hu Y Z, Tan J, *et al.* Transcriptome comparison and immune related gene analysis of spleen of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5449-5456 (in Chinese).
- [31] 张媛媛, 宋理平. 鱼类免疫系统的研究进展 [J]. *河北渔业*, 2018(2): 49-56.
- Zhang Y Y, Song L P. Progress of the immune system in fish[J]. *Hebei Fisheries*, 2018(2): 49-56 (in Chinese).
- [32] 赵丹, 周丽青, 吴彪, 等. 魁蚶各组织溶菌酶活性对鳗弧菌侵染的响应 [J]. *水产学报*, 2020, 44(3): 480-486.
- Zhao D, Zhou L Q, Wu B, *et al.* Response of lysozyme activity to *Vibrio anguillarum* infection in different tissues of *Scapharca broughtonii*[J]. *Journal of fisheries of china*, 2020, 44(3): 480-486 (in Chinese).
- [33] 陈劲松. 尼罗罗非鱼对丽鱼三代虫感染的免疫机制研究 [D]. 广州: 中山大学, 2019.
- Chen J S. Studies on the immunity mechanism of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Gyrodactylus cichlidarum* infection[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2019 (in Chinese).
- [34] Diniz B S, Teixeira A L. Advances in the neurobiology of late-life depression[M]//Quevedo J, Carvalho A F, Zarate C A. New York: Neurobiology of Depression. Academic Press, 2019: 441-449.
- [35] Chen J, Jiang W, Xu Y W, *et al.* Sequence analysis of hepcidin in barbel steed (*Hemibarbus labeo*): QSHLS motif confers hepcidin iron-regulatory activity but limits its antibacterial activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103845.
- [36] Mo Z Q, Yang M, Wang H Q, *et al.* Grouper (*Epinephelus coioides*) BCR signaling pathway was involved in response against *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 198-205.

## Deletion of hemolysis-related genes attenuates the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* to *Lateolabrax maculatus*

JIANG Wei<sup>1</sup>, ZHOU Jiayu<sup>1</sup>, WANG Yuguo<sup>1</sup>, HU Cunjie<sup>1</sup>, FANG Xiu<sup>2</sup>,  
LUO Tuyan<sup>3</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, BAO Baolong<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fujian Minwell Industrial Co., Ltd, Fuding 355200, China;

3. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** *Lateolabrax maculatus* is an important mariculture fish in China. In recent years, fishery losses caused by diseases have become more and more serious. *Vibrio anguillarum* is a gram-negative pathogenic bacterium widely distributed in seawater and marine organisms, and it is one of the important sources of bacterial diseases in mariculture and can cause serious infections in fish. Hemolysin is an essential component of virulence factor of *V. anguillarum*, which causes hemorrhagic septicemia in the host. However, very little information is available about hemolysin in *L. maculatus*. To explore the role of hemolysin in *V. anguillarum* infection of the fish,  $5.0 \times 10^5$  CFU *V. anguillarum* wild strain or  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  was immunized by intraperitoneal injection, and the colonization ability of bacteria in *L. maculatus*, histopathological changes and immune response of *L. maculatus* after deletion of hemolysis-related genes were evaluated. The results showed that the virulence of *V. anguillarum* decreased by 8.74 times after the deletion of hemolysis-related genes, and the LD<sub>50</sub> of wild strain or  $\Delta vah1-vah4-rtxA$  was  $2.103 \times 10^5$  CFU/mL and  $1.837 \times 10^6$  CFU/mL, respectively. The intestine and gill were the main colonization sites of *V. anguillarum*, which were seriously damaged after infection. After the deletion of hemolysis-related genes, the colonizing ability of *V. anguillarum* and the damage degree of intestinal mucosa vacuolation and gill necrosis was reduced. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched into hematopoietic cell lineage, antigen processing and presentation, cell adhesion molecules and intestinal immune network for IgA production signal pathways related to immune response. The above results showed that deletion of hemolysis-related genes attenuated the pathogenicity of *V. anguillarum* to *L. maculatus*. The results of this study will help to further understand the pathogenic mechanism of *V. anguillarum* and provide a basis for the development of anti-*Vibrio* immune enhancer or attenuated vaccine for *L. maculatus*.

**Key words:** *Lateolabrax maculatus*; *Vibrio anguillarum*; hemolysin; bacterial infection; immune response

**Corresponding author:** BAO Baolong. E-mail: [blbao@shou.edu.cn](mailto:blbao@shou.edu.cn)

**Funding projects:** the Regional Development Project of Fujian (2021N3016); the National Key R&D Program of China (2022YFD2400100); the Basic Research Projects for Public Research Institutes of Fujian (2020R1022009)