

[引用格式] 吴雨薇, 黄文树, 李东利, 等. GFP 标记的 *alt* 基因缺失嗜水气单胞菌株的构建[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2026, 31(4): 379-397. DOI: 10.19715/j.jmuzr.2026.04.01.

GFP 标记的 *alt* 基因缺失嗜水气单胞菌株的构建

吴雨薇^{1,2,3}, 黄文树^{1,2,3}, 李东利^{1,2,3}, 黄 贝^{1,2,3},

梁 英^{1,2,3}, 徐继松^{1,2,3}, 熊 静^{1,2,3}

(1. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

2. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021;

3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了阐明不耐热肠毒素 (heat-labile cytotoxic enterotoxin) / 脂肪酶基因 (*alt/lipase*) 在嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染宿主过程中的生物学功能及致病机制, 以鳗鲡源性嗜水气单胞菌 B11 为材料, 采用荧光标记与基因缺失技术, 成功构建了携带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的菌株 B11::GFP、*alt/lipase* 基因缺失的菌株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt*, 并分析了这 4 株细菌的特征。结果显示, 缺失 *alt/lipase* 不影响 B11 生长速度, 但明显降低 B11 生物被膜的形成能力; 通过激光共聚焦荧光显微镜可以在活体斑马鱼中观察到细菌感染定位。

[关键词] 嗜水气单胞菌; 绿色荧光蛋白标记; 不耐热肠毒素/脂肪酶; 基因缺失株

[中图分类号] S 917.4 [文章编号] 1007-7405(2026)04-0379-19 [DOI] 10.19715/j.jmuzr.2026.04.01

Construction of GFP-Labeled *Aeromonas hydrophila* Strains with *alt* Gene Deletion

WU Yuwei^{1,2,3}, HUANG Wenshu^{1,2,3}, LI Dongli^{1,2,3}, HUANG Bei^{1,2,3},

LIANG Ying^{1,2,3}, XU Jisong^{1,2,3}, XIONG Jing^{1,2,3}

(1. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Xiamen 361021, China;

3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To elucidate the biological functions and pathogenic mechanisms of the heat-labile cytotoxic enterotoxin/lipase gene (*alt/lipase*) in *Aeromonas hydrophila* in the process of infection, this study used *A. hydrophila* strain B11 isolated from eels as the research material. By employing fluorescence labeling and gene knockout technologies, four engineered strains GFP-labeled strain B11::GFP, *alt/lipase* gene knockout strain B11::GFP $\Delta alt/lipase$, *lipase* complementation strain B11::GFP C-*lipase* and *alt* complementation strain B11::GFP C-*alt* were successfully constructed. Characterization of these strains revealed that deletion of *alt/*

[收稿日期] 2025-06-07

[基金项目] 国家重点研发计划重点专项 (2024YFD2401003); 厦门市自然科学基金项目 (3502Z20227206)

[通信作者] 熊静, 博士, 高级实验师, 从事水产动物病害防治研究, E-mail: xiongjing@jmu.edu.cn; 黄文树, 博士, 教授, 从事水产动物病害防治研究, E-mail: wshuang@jmu.edu.cn

lipase didn't affect their growth kinetics, but significantly impaired the biofilm formation capacity. Furthermore, laser confocal fluorescence microscopy demonstrated the infection locations of these strains in zebrafish.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; green fluorescent protein (GFP)-labeled; heat-labile cytotoxic enterotoxin/lipase; gene-deleted mutant

0 引言

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于气单胞菌科气单胞菌属, 是革兰氏阴性兼性厌氧菌, 普遍存在于自然界中, 是一类重要的人-畜-鱼共患致病菌^[1]。该菌可引起人类腹泻、胃肠炎、创伤感染、败血症等, 已被纳入腹泻病原的常规检测范围; 它也可以导致多种陆生动物腹泻感染和多种水产动物的细菌性肠炎、烂鳃、赤皮、竖鳞和出血性败血等, 给水产养殖业带来巨大的经济损失^[2]。在预防医学、预防兽医学、公共卫生学、鱼类病害学等领域, 致病性嗜水气单胞菌被高度关注。

嗜水气单胞菌的致病性与其所携带毒力因子的种类和数量密切相关, 不同毒力因子所导致的疾病症状和致病机制各不相同^[3]。肠毒素是嗜水气单胞菌的重要毒力因子, 包括不耐热细胞肠毒素 (编码基因为 *alt*)、耐热细胞肠毒素 (编码基因为 *ast*) 和细胞毒性肠毒素 (编码基因为 *act*) 3 类^[4-6]。其中, 不耐热细胞肠毒素是一种对热不稳定 (56 ℃ 条件下 20 min 即失活) 的胞外毒素, 在污染食品、人类腹泻和病鱼等样本所分离的细菌中, 该基因的阳性检出率高, 分别达 43% ~ 99%^[2,7-8]、66.7% ~ 100%^[9-10]、56% ~ 92%^[11-12]。携带 *alt* 基因的菌株可引起人类和多种水产动物的腹泻、肠道充血发红、肠道溃疡、溃疡性结肠炎等肠炎症状, 严重时可导致宿主死亡^[2,13-14]。不耐热细胞肠毒素具有细胞毒性和肠毒性, 其细胞毒性可通过提高真核细胞中环磷酸腺苷 (cAMP) 的水平, 引起仓鼠卵巢细胞发生形变拉长; 肠毒性可引起实验兔和大鼠结扎肠袢内液体分泌物增加^[6]。此外, *alt* 缺失的嗜水气单胞菌株在实验小鼠肠道内的定植能力显著下降^[5]。尽管 *alt* 可能在嗜水气单胞菌诱发宿主肠炎过程中发挥着重要作用, 然而该基因的功能及致病机制仍未解析。

本课题组从患有严重肠胃炎和腹腔充血的鳊鲈病灶部位分离、纯化并鉴定到一株嗜水气单胞菌 B11。首先, 利用特异性 PCR 引物分别检测了肠毒素的 3 类基因 (*alt*、*ast* 和 *act*), 结果显示, 该菌株仅携带 *alt*, 不含 *act* 和 *ast*^[15-16]。随后, 将 *alt* 部分序列 (822 bp) 在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 发现该序列与 *alt* 基因 (Gene ID L77573.1, 1371 bp) 和脂肪酶 *lipase* 基因 (Gene ID AB237183.1, 2418 bp) 的序列均高度相似, 相似度分别高达 96.72% 和 96.84%。同时, 对 B11 进行全基因组测序 (ID CP053859.1), 结果发现, 在 B11 基因组中, *alt* 位于注释为 *lipase* (*lipase* 位于基因组第 4 699 830 ~ 4 702 247 位, 全长为 2418 bp) 的第 4 699 830 ~ 4 701 328 位, 全长为 1499 bp, 该结果与之前报道^[6,17]的结果相近。由于当前研究数据尚不足以明确区分 *alt* 与 *lipase* 的功能差异, 因此文中采用 *alt/lipase* 表示该基因区域。

构建基因缺失株是解析细菌特定基因功能的重要手段^[18], 而荧光标记技术可为致病菌的动态研究提供可视化工具^[19]。基因缺失技术与荧光标记技术的结合, 则可同时实现

可视化追踪特定基因在致病菌中的功能, 为深入理解基因功能及致病机制提供重要材料。为了解析 *alt/lipase* 的基因功能及其致病机制, 本文通过同源重组双交换技术构建绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的 B11::GFP 菌株, 在此基础上, 利用自杀质粒同源重组技术构建 *alt/lipase* 缺失菌株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$, 利用抗性质粒构建回补株 B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt*。此外, 本文通过分析上述不同菌株的生长和生物被膜形成能力变化, 并通过激光共聚焦荧光显微镜观察 GFP 标记菌株在斑马鱼活体中的感染情况, 为进一步探究 *alt/lipase* 的生物学功能及其致病机制提供重要的生物材料。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

嗜水气单胞菌 B11 菌株分离自患有严重肠胃炎和腹腔充血的鳊鲃病灶部位, 本课题组分离保种; *E. coli* β 2155、*E. coli* WM3064 为本课题组储备。质粒 pCVD442 (氨苄西林抗性)、pACYC184 (四环素抗性)、pMMB207 (氯霉素抗性) 为本课题组储备。

1.2 引物的设计与合成

根据嗜水气单胞菌 B11 基因组 (CP053859.1), 分别以 *hu* (第 2 616 733 ~2 621 665 位) 基因序列设计荧光标记上下游同源重组臂引物对; 以 *lipase* (第 4 699 830 ~4 702 247 位) 基因序列设计敲除、回补上下游引物对。本研究所用引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Prime sequences used in this study

序列名称	引物序列	用途
<i>hu</i> -5F	gtaatccggttcgtgctgatgtggcc	<i>hu</i> 上游同源重组臂引物
<i>hu</i> -5R	gttgaccgcgtctttcagggccttac	
<i>hu</i> -3F	gccgggcgctgattctacatcgg	<i>hu</i> 下游同源重组臂引物
<i>hu</i> -3R	cttcatcggagactttcacgtcacccagatagg	
<i>gfp-Em</i> -F	gtaaggccctgaaagacgcggtcaaccgtggttctggtggaag	<i>gfp-Em</i> 扩增引物
<i>gfp-Em</i> -R	ccgatgtagaatcagcggccggcggttaagggatgcagtttatgcac	
B11-outF	gacttctacgagaagcgcgacatccacg	外侧鉴定引物
B11-outR	cagcagatagtcgaccttgacctgctcgtc	
<i>lipase</i> -5F	cagcaggagggtgaagcgcttcctg	<i>lipase</i> 上游同源重组臂引物
<i>lipase</i> -5R	gtgaccaacggcagcctgctcaag	
<i>lipase</i> -3F	cagcatagcactgacgactcggc	<i>lipase</i> 下游同源重组臂引物
<i>lipase</i> -3R	gacttcgtcagctgcatgactacgacatc	
<i>Tc</i> -F	cttgagcaggctgccgttggtcacccaagggttggttgccg	四环素抗性基因扩增引物
<i>Tc</i> -R	gccgcagtcgtcagtgtctatgtgttaattctcatgtttgacagcttatcatc	
<i>lipase</i> -outF	cactggtggactacctctccacc	外侧鉴定引物
<i>lipase</i> -outR	cttacctacatccctgtggtgcagg	

续表 1

序列名称	引物序列	用途
<i>lipase</i> -inF	cattgccgatggactggttgcgac	内侧鉴定引物
<i>lipase</i> -inR	cagatctatgccggcatgcaggcag	
pMMB207-F	gagctgttgacaattaatcatcgcc	载体通用引物
pMMB207-R	ctacggcgtttcactctgagttc	
<i>lipase</i> -F	acacaggaacagaaattcacgccgtcagcatttcaggataac	<i>lipase</i> 扩增引物
<i>lipase</i> -R	ctgcaggtcgactctagattactgcttgagcaggtgcc	
<i>alt</i> -F	acacaggaacagaaattcgaccgcaccgccagagcgagttg	<i>alt</i> 扩增引物
<i>alt</i> -R	ctgcaggtcgactctagattactgcttgagcaggtgcgcgttg	

1.3 GFP 标记嗜水气单胞菌株 B11::GFP 的构建与筛选

1.3.1 打靶片段的获取

利用超保真 DNA 聚合酶从嗜水气单胞菌 B11 基因组中（CP053859.1:2616733 ~ 2621665）以 *hu* 基因的上游引物 *hu*-5F/5R 或下游引物 *hu*-3F/3R 分别扩增上游、下游同源臂。采用的反应体系为：2 × PrimeSTAR Max Premix（TaKaRa）10 μL，B11 基因组 DNA 0.2 μL，*hu*-5F/5R（50 μmol/L）各 0.2 μL 或 *hu*-3F/3R（50 μmol/L）各 0.2 μL，水补足至 20 μL。从 pUC57-*gfp*-*Em* 质粒中扩增 *gfp* 基因、红霉素抗性基因（*Em*），构建引物序列（*gfp*-*Em*-F/R），反应体系为：2 × PrimeSTAR Max Premix 10 μL，pUC57-*gfp*-*Em*（10 mg/L）0.2 μL，*gfp*-*Em*-F/R 各 0.2 μL，水补足至 20 μL。利用融合 PCR 技术将 *hu* 基因上游、下游同源臂与 *gfp*、*Em* 序列连接，反应体系为：2 × PrimeSTAR Max Premix 10 μL，*hu*-5F/5R 扩增产物 3.2 μL，*hu*-3F/3R 扩增产物 3.2 μL，*gfp*-*Em*-F/R 扩增产物 3.2 μL，*hu*-5F 0.2 μL，*hu*-3R 0.2 μL。通过 PCR 扩增获得完整打靶片段 *hu*-*gfp*-*Em*（上游同源臂-*gfp*-*Em*-下游同源臂）。

1.3.2 打靶载体 pCVD442-*hu*-*gfp*-*Em* 的构建和供体菌株的制备

利用限制性内切酶 *Sma* I 将 pCVD442 质粒于 30 ℃ 酶切 4 h，电泳并回收线性化产物。将打靶片段与线性化载体进行连接，连接体系为：pCVD442/*Sma* I（50 mg/L）2 μL，*hu*-*gfp*-*Em*（50 mg/L）6 μL，10 × T4 buffer 1 μL，T4 DNA ligase（5 U/μL，MBI）1 μL。将连接产物电转化入大肠杆菌 DH5α λpir，利用含 50 mg/L 氨苄青霉素（Amp）和 200 mg/L *Em* 的 LB 平板进行抗性筛选，阳性克隆命名为 pCVD442-*hu*-*gfp*-*Em*。

37 ℃ 扩大培养单克隆，提取打靶质粒 pCVD442-*hu*-*gfp*-*Em*，将其电转化进入大肠杆菌 β2155 菌株，铺含 100 mg/L Amp、0.5 mmol/L 二氨基庚二酸（DAP）LB 平板进行抗性筛选，37 ℃ 培养至单克隆形成。此克隆即为用于接合实验的供体菌株 β2155/pCVD442-*hu*-*gfp*-*Em*。

1.3.3 菌株接合与同源重组双交换

将节 1.3.2 制备的 500 μL 供体菌 β2155/pCVD442-*hu*-*gfp*-*Em* 菌液与 500 μL 受体菌嗜水气单胞菌 B11 菌液混合进行接合，将接合后菌液洗脱于 1 mL LB 培养液，吸取 50 μL

涂布含抗 LB 平板 (含 200 mg/L Em), 30 ℃ 培养至单克隆形成。这些克隆的基因组上通过一侧同源臂重组整合有完整的打靶质粒序列, 即为单交换重组克隆, 命名为 B11/pCVD442-*hu-gfp-Em*。随机挑选若干单克隆, 接种于无抗性 LB 培养液, 30 ℃、220 r/min 扩大培养, 筛选双交换重组克隆。

1.3.4 GFP 标记菌株的阳性筛选

利用重组手臂外侧引物对双交换重组克隆进行菌液 PCR 鉴定。取阳性克隆少量菌液, 划线接种 LB 蔗糖平板 (不含 NaCl, 含 10% (质量分数) 蔗糖和 200 mg/L Em), 30 ℃ 培养至单克隆形成, 以去除整合有自杀质粒的单交换重组克隆和双交换重组回复的原始克隆。挑取阳性克隆扩大培养, 外侧引物再次验证。

1.3.5 GFP 标记的嗜水气单胞菌株 B11::GFP 的构建流程

GFP 标记的嗜水气单胞菌株 B11::GFP 的构建流程见图 1。

1.4 GFP 标记 *lipase* 基因缺失嗜水气单胞菌株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的构建与筛选

1.4.1 打靶片段的获取

用超保真 DNA 聚合酶从嗜水气单胞菌 B11 基因组上扩增 *lipase* 基因的上游、下游同源臂, 引物序列为 *lipase*-5F/5R 和 *lipase*-3F/3R, 反应体系为: 2 × PrimeSTAR Max Premix 10 μL, B11 基因组 DNA 0.2 μL, *lipase*-5F/5R (50 μmol/L) 0.2 μL 或 *lipase*-3F/3R (50 μmol/L) 0.2 μL, 水补充至 20 μL。从 pACYC184 质粒上扩增四环素抗性基因 (*Tc*), 反应体系为: 2 × PrimeSTAR Max Premix 10 μL, pACYC184 (10 mg/L) 0.2 μL, *Tc*-F/R (50 μmol/L) 各 0.2 μL, 水补充至 20 μL。利用融合 PCR 技术, 将 *lipase* 基因上游、下游同源臂与 *Tc* 抗性基因片段连接, 反应体系为: 2 × PrimeSTAR Max Premix 10 μL, *lipase*-5F/5R 扩增产物 3.2 μL, *lipase*-3F/3R 扩增产物 3.2 μL, *Tc*-F/R 扩增产物 3.2 μL, *lipase*-5F 0.2 μL, *lipase*-3R 0.2 μL。扩增得到完整打靶片段 $\Delta lipase::Tc$ (上游同源臂-*Em*-下游同源臂)。

1.4.2 打靶质粒 pCVD442- $\Delta lipase::Tc$ 的构建与供体菌株的制备

利用限制性内切酶 *Sma* I 将 pCVD442 质粒在 30 ℃ 条件下酶切 4 h。将打靶片段与线性化 pCVD442 质粒 16 ℃ 连接过夜, 连接体系为: pCVD442/*Sma* I (50 mg/L) 2 μL, $\Delta lipase::Tc$ (50 mg/L) 6 μL, 10 × T4 buffer 1 μL, T4 DNA ligase 1 μL。连接产物回收纯化, 并电转化入大肠杆菌 DH5α λpir, 在含 50 mg/L Amp 和 10 mg/L *Tc* 的 LB 平板上涂

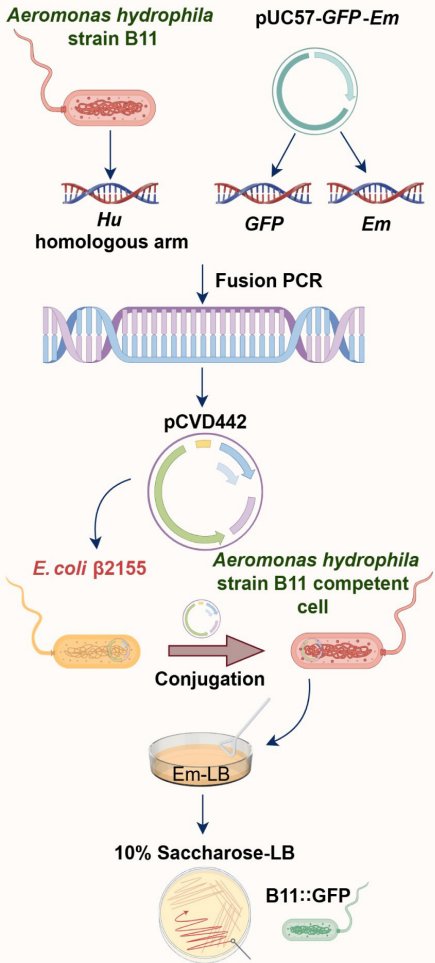


图 1 GFP 标记的嗜水气单胞菌株 B11::GFP 的构建流程图

Fig.1 Construction flowchart of GFP-labeled *Aeromonas hydrophila* strain B11::GFP

板，于 37 ℃ 培养至单克隆形成。在 Amp、Tc 双抗性平板上生长的克隆为含有打靶片段的阳性克隆，命名为 pCVD442- $\Delta lipase::Tc$ 。

将上述阳性克隆扩大培养并提取打靶质粒 DNA，将打靶质粒 pCVD442- $\Delta lipase::Tc$ 电转化入大肠杆菌 $\beta 2155$ 菌株，铺 LB 平板（含 100 mg/L Amp，0.5 mmol/L DAP），37 ℃ 培养至单克隆形成。此克隆即为用于接合实验的供体菌株 $\beta 2155/pCVD442-\Delta lipase::Tc$ 。

1.4.3 菌株接合

将 500 μ L 供体菌 $\beta 2155/pCVD442-\Delta lipase::Tc$ 菌液与 500 μ L 受体菌嗜水气单胞菌 B11::GFP 菌液进行接合。取 50 μ L 接合后菌液涂布于含有 20 mg/L Tc 的 LB 平板，30 ℃ 培养至单克隆形成。随机挑选单克隆扩大培养，取 50 μ L 培养液铺于含 10%（质量分数）蔗糖的 LB 平板（含 20 mg/L Tc，不含 NaCl），30 ℃ 培养至单克隆形成。

1.4.4 *lipase* 基因敲除菌株筛选

随机挑取单克隆并扩大培养，利用 *lipase* 基因内侧、外侧引物对其进行菌液 PCR 鉴定。将阳性克隆命名为 B11-GFP/*Em*/ $\Delta lipase::Tc$ ，简称为 B11::GFP $\Delta lipase$ 。

1.4.5 GFP 标记 *lipase* 基因缺失嗜水气单胞菌株 B11::

GFP $\Delta alt/lipase$ 的构建流程

GFP 标记 *lipase* 基因缺失嗜水气单胞菌株 B11::GFP $\Delta lipase$ 的构建流程见图 2。

1.5 回补株 B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 的构建

1.5.1 基因扩增与克隆

用超保真 DNA 聚合酶扩增 *lipase*（或 *alt*）基因片段。使用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 将 pMMB207 质粒线性化，利用 In-fusion 方法将 *lipase*（或 *alt*）基因片段与线性化 pMMB207 质粒连接，将连接产物热激转化 TOP10 化学感受态细胞后，吸取 100 μ L 菌液铺在含 20 mg/L 氯霉素（Cm）的 LB 平板上，于 37 ℃ 培养至单克隆形成。随机挑取若干单克隆并扩大培养，利用 pMMB207-F/R 载体通用引物对菌液进行 PCR 鉴定。

1.5.2 供体菌的制备

将构建的质粒 pMMB207-*lipase* 或 pMMB207-*alt* 电转化入大肠杆菌 WM3064 菌株。取 50 μ L 复苏后电转化菌液铺 LB 平板（含 20 mg/L Cm、0.5 mmol/L DAP），37 ℃ 培养至单克隆形成，克隆命名为 WM3064/pMMB207-*lipase* 或 WM3064/pMMB207-*alt*。

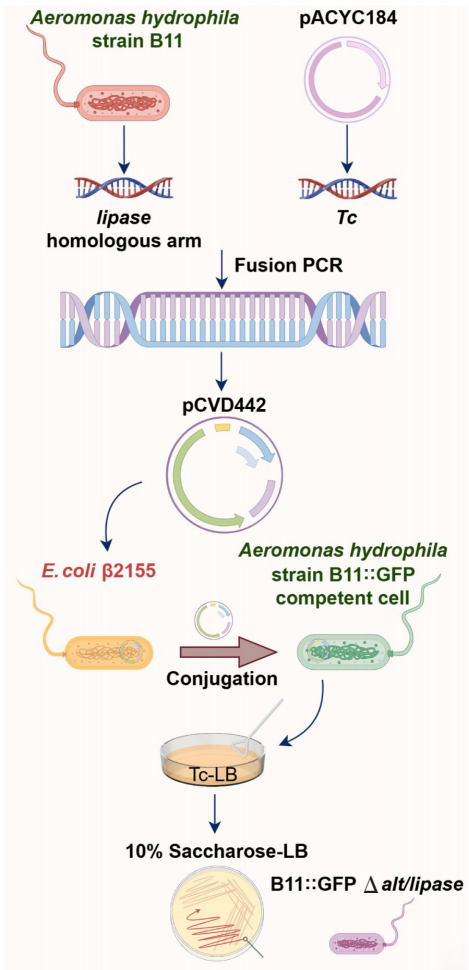


图 2 GFP 标记 *lipase* 基因缺失嗜水气单胞菌株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的构建流程

Fig.2 Construction flowchart of GFP-labeled *lipase*-deleted *Aeromonas hydrophila* strain B11::GFP $\Delta alt/lipase$

1.5.3 接合反应及阳性克隆的鉴定

取 500 μL 供体菌 WM3064/pMMB207-*lipase* 菌液或 WM3064/pMMB207-*alt* 菌液, 与 500 μL 受体菌 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 菌液混合进行接合实验。取 100 μL 接合后菌液涂布于含有 20 mg/L Cm 的 LB 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至单克隆形成。挑取单克隆扩大培养, 用 pMMB207-F/R 引物对其进行菌液 PCR 鉴定。将阳性克隆命名为 B11::GFP C-*lipase* 或 B11::GFP C-*alt*。

1.5.4 回补株 B11::GFP C-*lipase* 与 B11::GFP C-*alt* 的构建流程

回补株 B11::GFP C-*lipase* 与 B11::GFP C-*alt* 的构建流程见图 3。

1.6 实时荧光定量 PCR 验证

利用 Promega Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒分别提取 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase* 与 B11::GFP C-*alt* 的总 RNA 后, 用 biosharp[®] Reverse Transcription Kit 逆转录试剂盒制备各菌 cDNA 模板。使用 RNase free H₂O 将制备的 cDNA 质量浓度调整至 100 mg/L 作为模板。利用 qRT-PCR 反应体系, 以 16S rRNA 作为内参 (16S rRNA-qF:TAAT-ACCGCATACGCCCTAC; 16S rRNA-qR:GGACCGTG-TCTCAGTTCCAG)^[20], 检测 *alt* 毒力基因 (*alt*-qF:CCAAGGATGCCCTCAACACC; *alt*-qR:CAGCG-CATAGGCGTTCTCTT) 的相对表达水平。反应体系为: 2 $\times$ SuperReal qPCR Premix (SYBR Green) 5 μL , *alt*-qF/qR (或 16S rRNA-qF/qR) 各 0.2 μL , cDNA 0.25 μL , RNase free H₂O 补足 10 μL 。两步法扩增, 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

1.7 生长曲线的绘制

将 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase*、B11::GFP C-*alt* 分别于相应抗性 LB 平板 (200 mg/L Em、20 mg/L Tc、20 mg/L Cm、20 mg/L Cm) 划线接种, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 复苏。挑取单克隆培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.6 \sim 0.9$)。用无抗 LB 培养液将上述菌株分别调整至 $A_{600} = 0.2$, 使用 LB 培养液稀释 10 000 倍。96 孔板各孔吸入 200 μL 菌液, 每株菌共进行 6 个重复孔, 将板放置酶标仪内, 设定 30 $^{\circ}\text{C}$ 连续线性振荡培养 48 h, 程序设定每间隔 1 h 检测一次 A_{600} , 用以指示菌株生长情况^[21]。

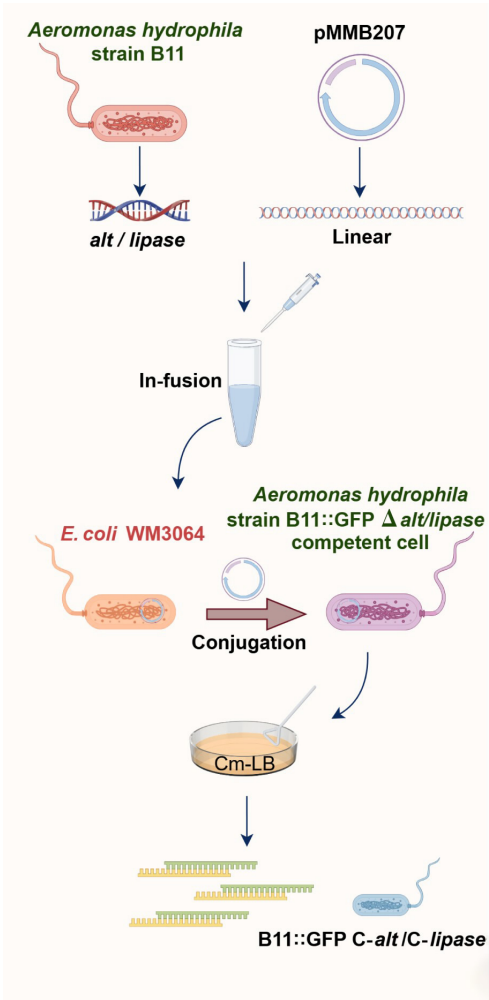


图3 回补株 B11::GFP C-*lipase* 与 B11::GFP C-*alt* 的构建流程图
Fig.3 Construction flowchart of B11::GFP C-*lipase* and B11::GFP C-*alt*

1.8 生物被膜形成能力的测定

将 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase*、B11::GFP C-*alt* 调整至 $A_{600} = 0.2$ 。96 孔板每孔上样 100 μL 各菌液,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养 24 h,用灭菌 PBS 轻洗每孔 3 次,风干 10 min。每孔加入 150 μL 0.1% (质量分数) 结晶紫溶液对孔内形成的生物膜染色 15 min。PBS 轻洗后,每孔加入 200 μL 33% (体积分数) 乙酸溶液,轻轻吹打混匀。将板放置酶标仪内测定 590 nm 处的吸光度值,每株菌 6 个重复孔,用以指示生物被膜形成情况^[22]。

1.9 激光共聚焦荧光显微镜的观察

1) 观察 GFP 标记菌株。将 B11::GFP 菌液 4000 r/min 离心 3 min,吸弃上清液,灭菌 PBS 清洗 2 次,PBS 重悬菌体沉淀。吸取 15 μL 菌液滴于无菌载玻片中央以制片。同时设置未加 GFP 荧光标记的 B11 菌株作为阴性对照。激光共聚焦显微镜对载玻片进行拍照观察,进一步验证 GFP 标签是否添加成功。

2) 观察菌株感染过程。制备 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase* 的 PBS 菌悬液,并将菌液浓度调至 1×10^6 CFU/mL,对孵化 6 d 后的斑马鱼幼鱼进行浸泡感染 30 min。使用 MS-222 麻醉液将幼鱼麻醉,用 1% (质量分数) 低熔点琼脂糖固定幼鱼,于激光共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 B11::GFP 的构建、筛选与鉴定

首先,选择 B11 基因组 (CP053859.1) 第 2 616 733 ~ 2 621 665 位的 *hu* 基因区域插入 *gfp* 基因。利用 PCR 技术成功扩增得到 *hu* 的上游、下游同源臂,大小分别为 785 bp (图 4a 的泳道 1) 和 791 bp (图 4a 的泳道 2);同时,成功从 pUC57-*gfp-Em* 质粒上扩增得到 *gfp-Em* 扩增片段,大小为 1665 bp (图 4a 的泳道 3);通过融合 PCR 技术,成功连接 *hu* 基因上游、下游同源臂序列与 *gfp-Em* 序列,得到完整打靶片段 *hu-gfp-Em*,大小为 3192 bp (图 4a 的泳道 4)。

然后,利用同源臂外侧引物 (B11-out F/R) 对双交换重组克隆进行菌液 PCR 鉴定,结果如图 4b 所示,第 17 号克隆扩增到与预期大小相符的双片段,长度为 3378、1765 bp (图 4b 的泳道 19)。取第 17 号阳性克隆,划线接种于 LB 蔗糖平板 (不含 NaCl,含 10% 蔗糖和 200 mg/L Em),30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至单克隆形成,挑取阳性克隆扩大培养,外侧引物再次验证,扩增到与预期大小相符的 3378 bp 片段 (图 4a 的泳道 6),说明第 17 号阳性克隆荧光标记成功,且成功除去整合有自杀质粒的单交换重组克隆和双交换重组回复的原始克隆。

对 B11::GFP 菌株进行进一步的荧光标记鉴定,结果显示,B11::GFP 菌株可以明显观察到绿色荧光蛋白标记的菌体,而未添加 GFP 标记的 B11 菌株则无法在荧光显微镜视野中成像 (图 4c)。

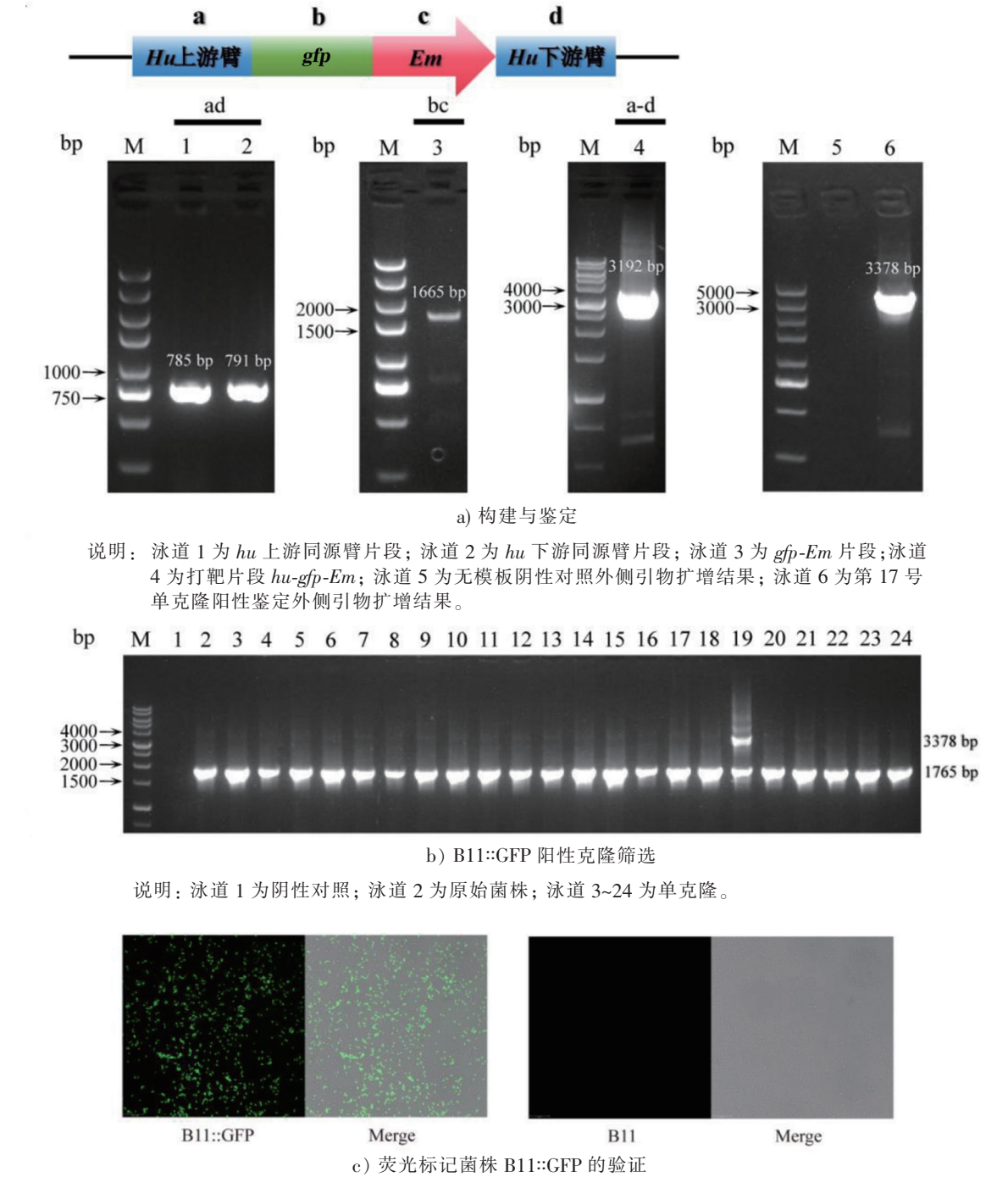


图 4 B11::GFP 的构建、筛选与鉴定

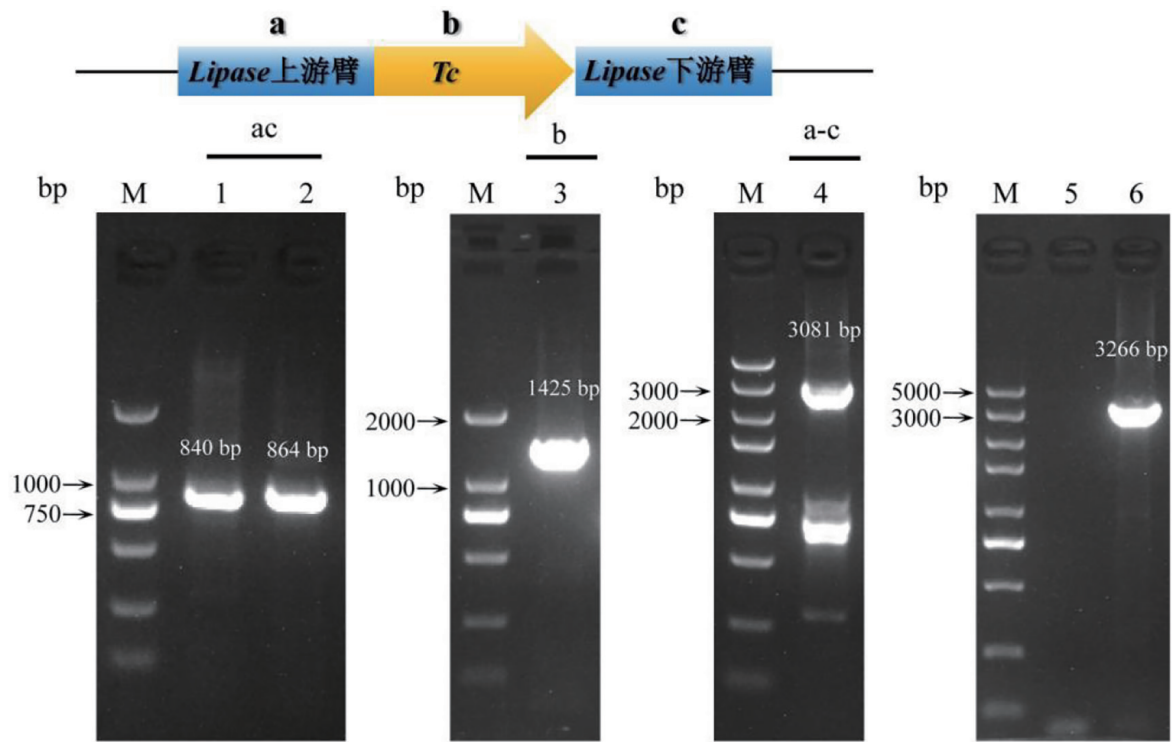
Fig.4 Construction,screening and identification of B11::GFP

2.2 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的构建、筛选与鉴定

PCR 扩增得到 *lipase* 基因上游同源臂、下游同源臂和四环素抗性基因编码序列，片段大小分别为 840 bp（图 5a 的泳道 1）、864 bp（图 5a 的泳道 2）和 1425 bp（图 5a 的泳道 3）；融合 PCR 技术成功将这 3 个片段融合，得到打靶片段 $\Delta lipase::Tc$ ，大小为 3081 bp（图 5a 的泳道 4）。

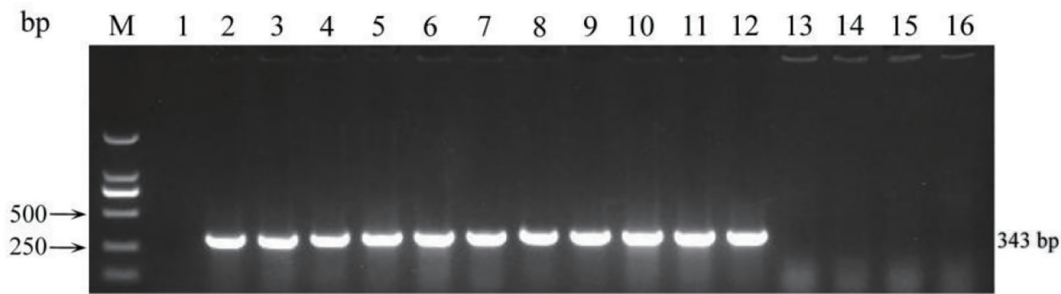
四环素抗性和 10% 蔗糖对单克隆进行筛选，利用内侧引物（*lipase-in* F/R）进行鉴定，结果（图 5b）显示，1 ~ 10 号克隆扩增到了片段大小为 343 bp 的 *lipase* 特异性序列（泳道 3 ~ 12），说明基因缺失失败；11 ~ 14 号克隆则显示无任何扩增片段（泳道 13 ~ 16），说明 *lipase* 缺失成功。

用外侧引物（*lipase-out* F/R）进一步鉴定，结果（图 5a）显示，扩增到与预期替代片段大小相符的 3266 bp 片段（图 5a 的泳道 6），说明 *lipase* 基因缺失成功。此外，将扩增片段进行了测序，与预期序列相符，表明成功构建了 *lipase* 基因缺失株 B11:: $\Delta alt/lipase$ 。



a) 构建与鉴定

说明：泳道 1 为 *lipase* 上游同源臂片段；泳道 2 为 *lipase* 下游同源臂片段；泳道 3 为四环素抗性基因片段；泳道 4 为打靶片段 $\Delta lipase::Tc$ ；泳道 5 为阴性对照；泳道 6 为第 14 号阳性单克隆外侧引物扩增结果。



b) B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 阳性克隆筛选内部引物扩增结果

说明：泳道 1 为阴性对照；泳道 2 为原始菌株，含有 *alt/lipase*；泳道 3~16 为待筛选的单克隆。

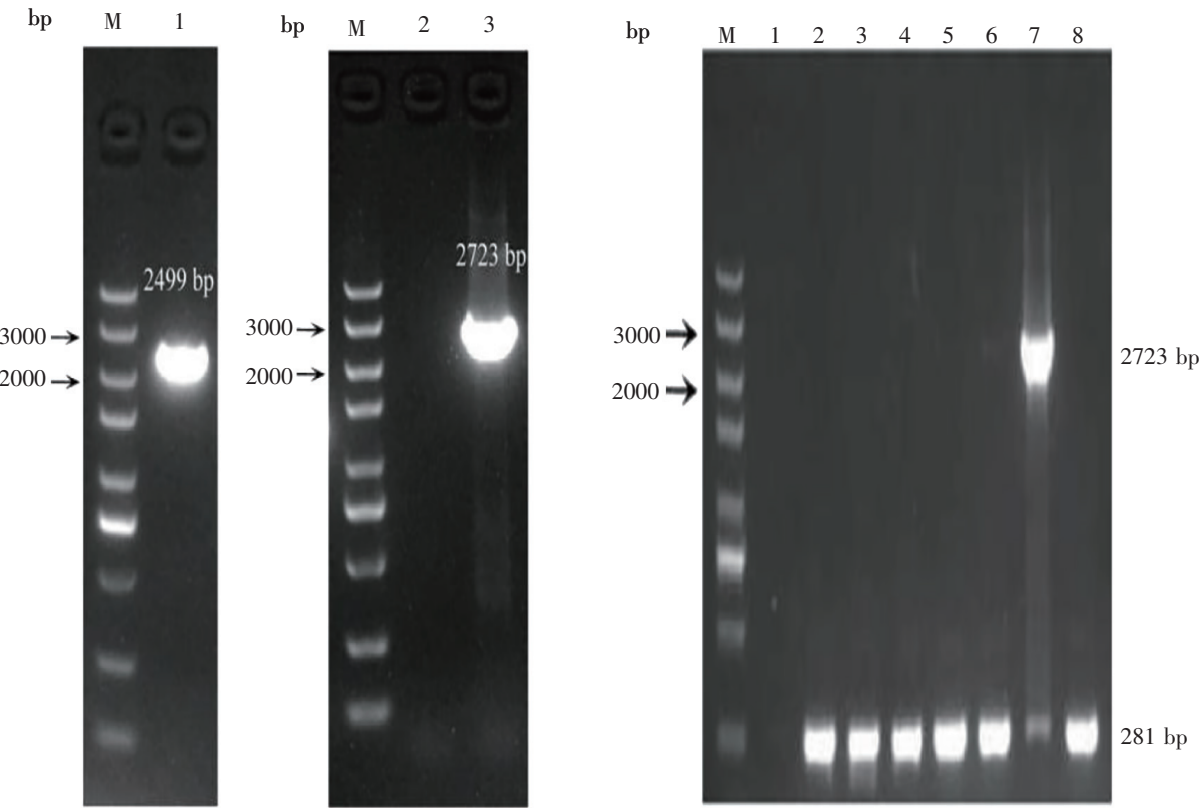
图 5 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的构建、筛选与鉴定

Fig.5 Construction, screening and identification of B11::GFP $\Delta alt/lipase$

2.3 回补株 B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 的构建、筛选与鉴定

采用携带氯霉素抗性基因的 pMMB207 质粒作为缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的回补质粒。当 *lipase* 或 *alt* 基因克隆入设计位点后, 扩增产物长度分别为 2723、1517 bp。结果显示, 成功扩增到 *lipase* 基因, 片段长度为 2499 bp (图 6a 的泳道 1)。利用 pMMB207-F/R 载体通用引物进行 Top10 阳性克隆鉴定, 结果显示, 单克隆 1~5 号 (图 6b 的泳道 2~6) 和 7 号 (图 6b 的泳道 8) 仅扩增到 281 bp 片段, 说明 pMMB207-*lipase* 质粒转化失败; 单克隆 6 号扩增到了与预期大小相符的 2723 bp 片段 (图 6b 的泳道 7), 说明单克隆 6 号 pMMB207-*lipase* 质粒转化 Top10 成功。

菌株接合鉴定结果显示, 单克隆菌液扩增到与预期大小 2723 bp 相符的片段 (图 6a 的泳道 3), 表明成功构建了回补菌株 B11::GFP C-*lipase*。同理, 图 7 的结果显示, 成功扩增了 *alt* 基因, 片段长度为 1293 bp (图 7a 的泳道 1)。Top10 阳性克隆鉴定结果显示, 11 个单克隆均扩增到与预期大小 1517 bp 相符的片段 (图 7b 的泳道 3、5、7、8、11、13、14、15、17、18、20), 为 *alt* 基因的阳性质粒回补株。菌株接合鉴定结果显示, 单克隆菌液具有符合预期长度的 1517 bp 扩增片段 (图 7a 的泳道 3), 表明成功构建了回补菌株 B11::GFP C-*alt*。



a) 构建与鉴定
说明: 泳道 1 为 *lipase* 基因扩增结果; 泳道 2 为阴性对照; 泳道 3 为 6 号阳性克隆 pMMB207 通用引物扩增结果。

b) pMMB207-*lipase* 阳性克隆筛选扩增结果
说明: 泳道 1 为阴性对照; 泳道 2~8 为单克隆 pMMB207 通用引物扩增结果。

图 6 回补株 B11::GFP C-*lipase* 的构建、筛选与鉴定
Fig.6 Construction, screening and identification of B11::GFP C-*lipase*

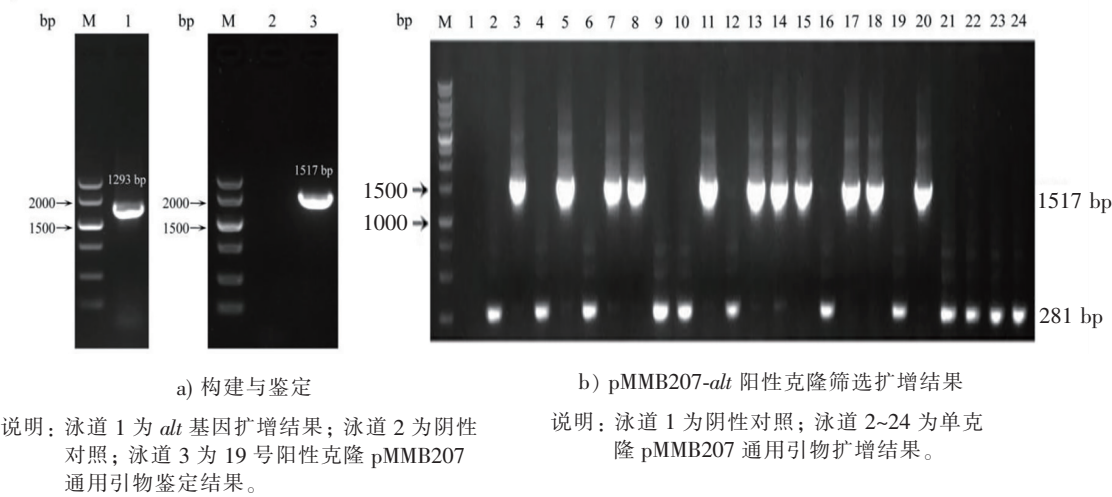


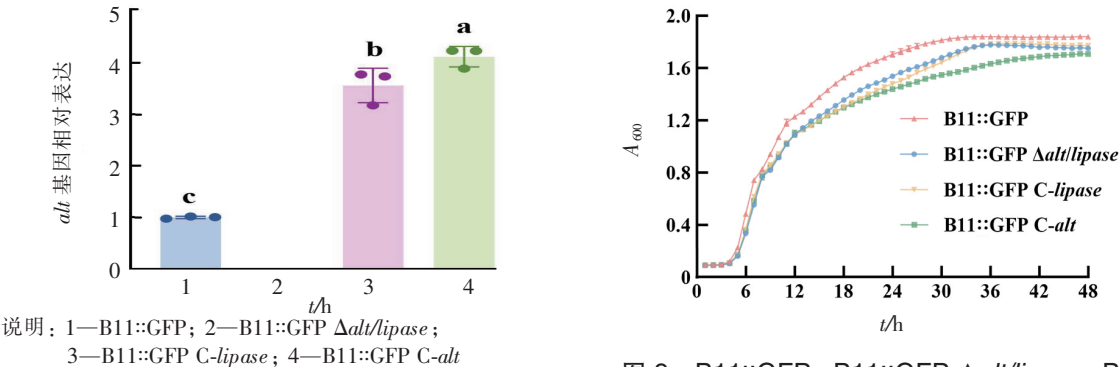
图 7 回补株 B11::GFP C-*alt* 的构建、筛选与鉴定
Fig.7 Construction, screening and identification of B11::GFP C-*alt*

2.4 实时荧光定量 PCR 验证结果

以 16S rRNA 作为内参，以 *alt* 为检测靶标，定量检测 B11::GFP、B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 中的 *alt* 相对表达量。结果（图 8）显示，*alt* 在缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 中不表达，说明 *alt/lipase* 缺失彻底；回补株 B11::GFP C-*alt* 中 *alt* 表达量是 B11::GFP 的 4.09 倍；回补株 B11::GFP C-*lipase* 中 *alt* 表达量是 B11::GFP 的 3.53 倍，说明以质粒形式回补的菌株中，*alt/lipase* 的拷贝数显著提升。

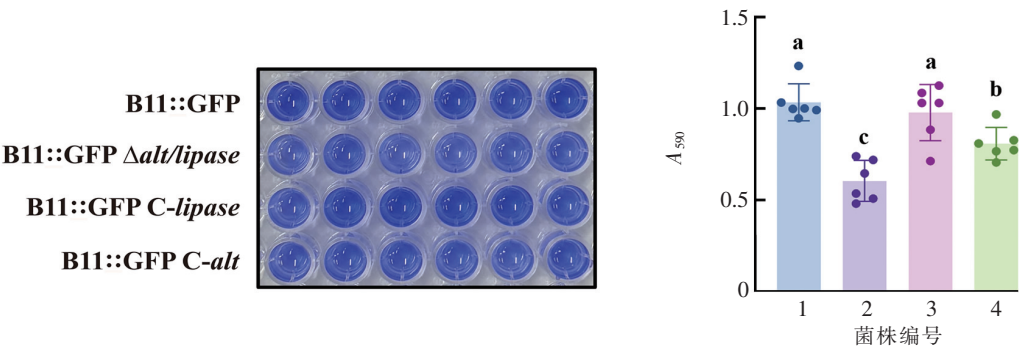
2.5 生长曲线的绘制

将 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株（B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt*）调整至相同 A_{600} 值，接种于 96 孔板，培养 48 h，每间隔 1 h 检测 A_{600} 值。结果（图 9）显示，B11::GFP、B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 在 4 h 内生长速率无差异，约 5 h 时均进入对数生长期；8 ~ 34 h 时，B11::GFP 生长速率较 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 稍快，四者生长趋势相同；42 h 后四者生长速率相似。表明 *alt/lipase* 的缺失并未影响嗜水气单胞菌的生长。



2.6 生物被膜形成能力

采用结晶紫法测定 B11::GFP、缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase* 和 B11::GFP C-*alt* 的生物被膜形成能力。结果（图 10）显示，缺失株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 的生物被膜形成能力较 B11::GFP 显著降低；回补株 B11::GFP C-*lipase*、B11::GFP C-*alt* 的生物被膜形成能力恢复，介于 B11::GFP 和 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 之间。表明，*alt/lipase* 缺失可显著降低嗜水气单胞菌生物被膜形成能力。



说明：不同小写字母表示差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。1—B11::GFP；2—B11::GFP $\Delta alt/lipase$ ；3—B11::GFP C-*lipase*；4—B11::GFP C-*alt*

图 10 *alt/lipase* 缺失对嗜水气单胞菌生物被膜形成能力的影响

Fig.10 Effect of *alt/lipase* deletion on the biofilm formation ability of *A. hydrophila*

2.7 荧光活体观察

斑马鱼幼鱼人工感染嗜水气单胞菌后，荧光观察结果（图 11）显示，在斑马鱼幼鱼头部内可以明显观察到 GFP 标记的嗜水气单胞菌定位情况，表明嗜水气单胞菌 GFP 标记株、基因缺失与回补株可应用于活体示踪观察。

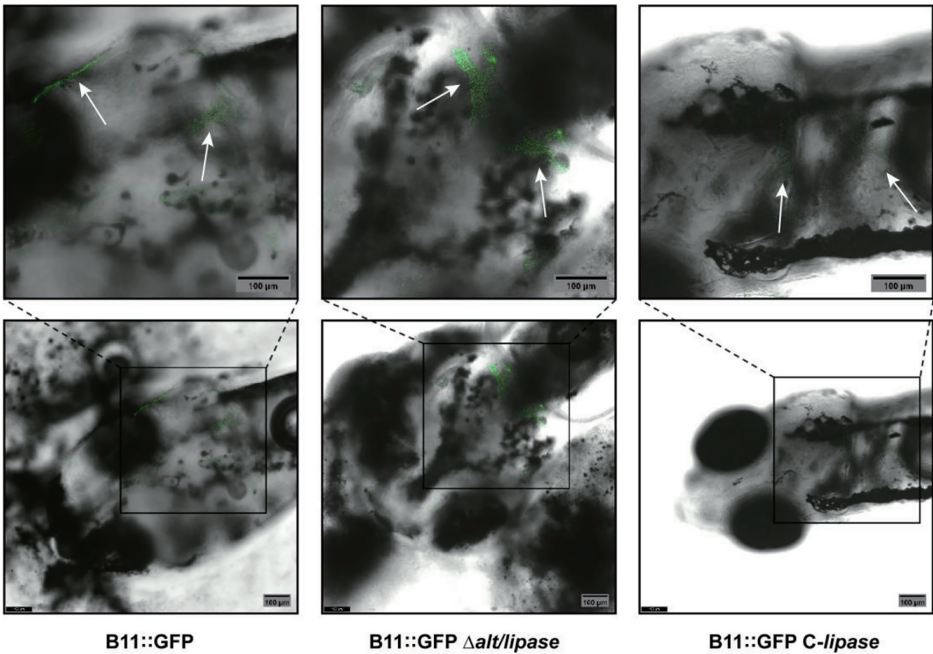


图 11 B11::GFP、B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、B11::GFP C-*lipase* 感染斑马鱼幼鱼活体成像图
Fig.11 *In vivo* imaging of zebrafish larvae infected with B11::GFP, B11::GFP $\Delta alt/lipase$ and B11::GFP C-*lipase*

3 讨论

3.1 采用同源重组双交换技术构建荧光标记的嗜水气单胞菌菌株 B11: GFP

荧光蛋白标记技术为研究致病菌入侵宿主的动态过程提供了强有力的可视化工具。其中,绿色荧光蛋白(GFP)因其分子质量相对较小、基因序列短、发光机制独特(紫外或蓝光范围波长的激发下不需添加其他外源底物即可发出绿色荧光)、检测方便等优点在生物学研究中得以广泛应用^[23]。目前,GFP基因已成功转化到嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)^[24]、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)^[25]、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[19]、灿烂弧菌(*V. splendidus*)^[19]等多种水产动物致病菌,通过GFP示踪可以实时观察致病菌入侵活细胞的动态过程,定量检测致病菌增殖情况,可视化展示组织切片中致病菌在细胞或组织中的分布情况,为研究致病菌侵染宿主的相关致病机制提供了有效手段。然而,上述研究中GFP荧光标记主要依靠外源表达质粒载体,其原理是首先将GFP基因克隆到适当的表达载体上,然后通过电击、热激或化学等方法将携带GFP基因的表达载体导入宿主菌,最后利用选择性培养基或抗生素等筛选方法,筛选出成功转化并表达荧光标记物的阳性菌株^[19,24-25]。这种传统的荧光标记方式需要利用载体质粒和抗生素来维持荧光标记物的表达,一旦载体质粒丢失或菌株产生了耐药性,就会造成GFP荧光标记的失败。

本文利用同源重组双交换技术,将GFP基因直接整合到目标菌株的基因组中以实现荧光标记^[26-27]。将GFP基因克隆到自杀质粒载体pCVD442上,并在其两端引入与宿主菌基因组中目标整合位点同源的序列;利用电击法将其转入大肠杆菌中制备供体菌;通过接合转移的方式将携带GFP基因的自杀质粒通过同源重组整合到宿主菌基因组的指定位置。由于自杀质粒无法在宿主菌中自主复制,因此,在选择性压力下(如10%蔗糖)筛选出同源重组成功的阳性菌株^[26]。目前,利用同源重组双交换技术已经成功将GFP基因有效整合至青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)基因组指定区域,并发现其生物学特性、致病性与野生菌株的差异不具有统计学意义^[28]。

与传统荧光标记的方法相比,本研究构建的GFP标记菌株能将荧光特性稳定遗传给下一代,更加适合进行长期观察和研究,同时减少对外源质粒的依赖,以及抗生素耐药性等带来的荧光信号减弱或丢失的风险,且在后续实验中无需额外操作来保持荧光信号的稳定性。以这种方法构建荧光标记菌株,更加适合在此基础上构建特定基因的缺失菌株。可见,本研究构建的嗜水气单胞菌荧光标记菌株B11: GFP具有稳定性强、无外源质粒依赖、操作简单等优势,同时为进一步构建荧光标记的基因缺失菌株和回补菌株提供了更加稳定的菌株材料。

3.2 采用自杀载体同源重组法构建缺失株 B11:: GFP Δ alt/lipase

构建基因缺失株是研究细菌相关致病基因功能的重要途径。目前,常见的基因缺失方法主要有同源重组法、随机插入突变法、RNA干扰法、锌指核酸酶技术(ZFN法)、转录激活因子样效应蛋白核酸酶技术(TALEN法)和CRISPR/Cas技术等^[29]。其中,同源重组法常用于细菌基因功能的研究,主要包括自杀载体同源重组法和Red同源重组法。相比于Red同源重组法,自杀载体法优势在于可以做到无痕缺失,不会在细菌基因

组上残留 FRT 位点, 更加适合难以通过热击或电击导入外源 DNA 的菌种^[30]。目前, 国内外已有许多利用自杀载体介导的同源重组技术成功构建基因缺失菌株的报道^[30-32]。

本研究采用自杀载体同源重组法构建嗜水气单胞菌 B11 的 *alt/lipase* 基因缺失株。目前, 同源重组常用的自杀载体有 pCVD442、pK18mob、pSVP202、pKSV7、pEX18Tc 等, 不同自杀载体实现缺失的原理不尽相同^[33]。本研究选择 pCVD442 自杀载体, 主要考虑该载体具有同源序列短、重组效率高、操作相对简单等优势^[33]。此外, 大多数革兰氏阴性菌无法产生 π 蛋白, 而这种蛋白质又是 pCVD442 载体复制所必需的。因此, 当 pCVD442 载体进入宿主细胞后, 迫于生存压力, 它会促使自身与宿主染色体发生整合, 这也是自杀载体 pCVD442 用于实现基因缺失工具的理论基础^[33]。本研究选择同源重组技术, 利用 pCVD442 载体构建嗜水气单胞菌 B11 的 *alt/lipase* 基因缺失株, 主要有 2 个关键步骤: 1) 当含有目的基因 *alt/lipase* 同源臂的自杀载体 pCVD442 导入目的菌株 B11 时, 由于 B11 无法产生 pCVD442 载体复制所必需的 π 蛋白, 于是在生存压力下, 自杀载体 pCVD442 与 B11 染色体 DNA 同源重组, 完成第 1 轮单交换; 2) 在 10% 蔗糖反向筛选的压力下发生第 2 轮的单交换消除载体, 以在蔗糖平板上生长, 最终将基因敲除, 成功构建嗜水气单胞菌 B11 的 *alt/lipase* 基因缺失株。至此, 本研究结合荧光示踪技术和基因缺失技术成功构建了 B11::GFP $\Delta alt/lipase$, 为实现致病菌特定基因的功能缺失和可视化追踪, 以及进一步深化对基因功能及致病机制的理解提供了实验材料。

3.3 *alt* 与 *lipase* 的序列同源性分析

本项目组从患有严重肠胃炎和腹腔充血的鳗鲡病灶部位分离、纯化并鉴定到一株嗜水气单胞菌 B11, 对 B11 全基因组 (ID CP053859.1) 测序完成后, 发现 *alt* 基因位于 *lipase* 基因内部的后半部分。其中: *lipase* 位于 B11 基因组第 4 699 830 ~ 4 702 247 位, 全长为 2418 bp; *alt* 位于 B11 基因组第 4 699 830 ~ 4 701 328 位, 全长为 1499 bp, 两者都有完整的开放阅读框。经 BLAST 多序列同源比对发现, B11 基因组中的 *alt* 全长序列不但与多条气单胞菌 *alt* 基因全序列 (例如 Gene ID L77573.1、DQ302128.1、DQ302130.1、DQ302131.1、DQ302132.1、DQ074979.1 等) 高度相似 (相似度超过 97%), 还与多条气单胞菌 *lipase* 基因全序列 (例如 Gene ID AB237183.1、AB237182.1、AB237181.1、B237180.1、AB237179.1、AB237176.1、AB237175.1、AB237174.1、EF522105.1) 和数百条气单胞菌基因组中 *lipase* 的序列 (ID CP000462.1、CP187186.1、CP178405.1、OY731380.1、CP023141.1、CP149124.1、CP018201.1、CP121802.1、CP097203.1) 相似性超过 97%, 这与之前的报道结果^[4,17]相吻合。

为了进一步验证和了解 *alt* 与 *lipase* 的关系, 通过查阅文献发现, 目前主要有 5 对特异性 PCR 引物用于扩增气单胞菌属的 *alt*, 分别是 *alt* 引物序列 (*alt*-F: TGACCCAGTCCTGGCACGGC; *alt*-R: GGTGATCGATCACCACCAGC, 扩增全长为 442 ~ 444 bp)^[14-15,34-38]、*alt* 引物序列 (*alt*-F: TGCTGGGCCTGCGTCTGGCGGT; *alt*-R: AGGAACTCGTTGACGAAGCAGG, 扩增全长为 361 bp)^[8,10,12,39]、*alt* 引物序列 (*alt*-F: CCATCCCCAGCCTTTACCCAT; *alt*-R: TTTCACCGAGGTGACGCCGT, 扩增全长为 338 bp)^[7,40-42]、*alt* 引物序列 (*alt*-F: CAGAACATCGGCCGCTT; *alt*-R: CAGCGCATAGGCGTTCTCT, 扩增全长为 153 bp)^[7]

和 *alt* 引物序列 (*alt*-F: CAAGCTGCCCTACTTCCTCT; *alt*-R: CCACCGGTATCGAACTTGA, 扩增全长为 819 ~ 822 bp)^[16]。

接着对上述各对 *alt* 引物在 NCBI 数据库中使用 prime-blast 软件进行扩增, 发现所有引物对扩增产物均覆盖 *alt* 和 *lipase*。下面以引用率较高的 2 对引物为例进行阐述。

1) *alt* 引物序列 (扩增全长为 442 ~ 444 bp)^[34] 可扩增 17 条 *alt* 非全长序列 (KP942461.1、KP942457.1、KP942456.1、KP942452.1、JX489377.1、JX489376.1、JX489375.1、JQ003209.1、JQ003208.1、JQ003196.1、N602726.1、JN602725.1、JN602724.1、JN602723.1、JF738033.1、PQ356187.1、KU527550.1)、6 条 *alt* 全长序列 (ID DQ074979.1 的第 2 ~ 445 位、L77573.1 的 107 ~ 550 bp、DQ302132.1、DQ302131.1、DQ302130.1、DQ302128.1 的第 2 ~ 445 位) 和数百条气单胞菌全基因组中注释的 *lipase* (如 ID CP038513.1、CP178405.1、CP187186.1、CP178405.1、OY731380.1、CP023141.1、CP149124.1、CP018201.1、CP121802.1、CP097203.1、CP118942.1、CP102368.1、CP010947.1、LR963138.1、LR963135.1、LR963132.1、LR963129.1、LR963127.1、CP007576.1、CP000462.1、CP187186.1 等)。随机挑选其中 20 条序列, 经过多重序列比对发现, 序列相似性均约为 97%。

2) *alt* 引物序列 (扩增全长为 361 bp)^[38] 可扩增 6 条 *alt* 全长序列 (ID L77573.1 686 ~ 1046 bp、DQ302128.1、DQ302130.1、DQ302131.1、DQ302132.1、DQ074979.1 581 ~ 941 bp)、1 条 *alt* 非全长序列 (ID EU 849094.1 410 ~ 767 bp)、10 条 *lipase* 全长序列 (ID AB237173.1、AB237174.1、AB237175.1、AB237176.1、AB237177.1、AB237178.1、AB237179.1、AB237180.1、AB237181.1、AB237182.1、AB237183.1 1607 ~ 1967 bp)、3 条 extracellular *lipase* (ID EF522105.1 1824 ~ 2204 bp、S65123.1 2128 ~ 2481 bp、U63543.1 1988 ~ 2341 bp)、2 条 phospholipase A1 (AF092033.1 1782 ~ 2142 bp、U14011.1 1814 ~ 2617 bp) 和数百条气单胞菌全基因组注释的 *lipase* (如 CP038513.1、CP178405.1、CP187186.1、CP178405.1、OY731380.1、CP023141.1、CP149124.1、CP018201.1、CP121802.1、CP097203.1、CP118942.1、CP102368.1、CP010947.1、LR963138.1、LR963135.1、LR963132.1、LR963129.1、LR963127.1、CP007576.1、CP000462.1、CP187186.1 等)。

此外, 利用 *lipase* 引物序列 (*Lip*-F: ATCTTCTCCGACTGGTTCGG; *Lip*-R: CCGTGC-CAGGACTGGGTCTT, 扩增全长为 383 bp)^[35] 进行扩增, 结果显示, 只特异性扩增 *lipase*, 不扩增 *alt*。分析发现, 该 *Lip*-F/R 扩增片段靠近 *lipase* 基因的 5' 端部分, 与 *alt* 部分不重合。例如, 该片段可扩增 11 条 *lipase* 全长序列 (ID AB237173.1 ~ AB237183.1, 全长 2418 bp, 扩增部分位于第 664 ~ 1046 位)、3 条 extracellular *lipase* 基因 (ID EF522105.1, 全长 3476 bp, 扩增部分位于 664 ~ 1046 位; ID S65123.1, 全长 2568 bp, 扩增部分位于 1180 ~ 1564 位; ID U63543.1, 全长 2761 bp, 扩增部分位于 1166 ~ 1544 位) 和 2 条 phospholipase C 基因 (ID U14011.1, 全长 2254 bp, 扩增部分位于 866 ~ 1250 位; ID AF092033.1, 全长 2593 bp, 扩增部分位于 839 ~ 1221 位), 其余对应的均是气单胞菌全基因组注释的 *lipase* 基因前面部分和 *lipase* 非全长序列。

总之,由于 *alt* 靠近 *lipase* 的 3' 端,因此当引物设计靠近 5' 端时,则仅显示扩增 *lipase*;而当引物设计靠近 *lipase* 的 3' 端时(与 *alt* 重复部分),则扩增结果就会覆盖 *alt* 和 *lipase*。目前检索到的文献显示,所有 *alt* 的引物序列均可同时扩增 *alt* 和 *lipase*,但目前缺少气单胞菌 *alt* 和 *lipase* 两者基因功能的比较研究。在本研究的嗜水气单胞菌 B11 基因组中发现,*alt* 完整阅读框与 B11 基因组测序注释为 *lipase* 基因共用了一段序列。因此,为了更好地研究两者之间的关系,本文在缺失株构建的同时,也分别构建了 *lipase* 和 *alt* 回补株作为后续研究材料。

4 结论

本研究结合荧光标记与基因缺失技术,成功构建了 GFP 标记的嗜水气单胞菌 B11 菌株 B11::GFP、GFP 标记的基因缺失菌株 B11::GFP $\Delta alt/lipase$ 、回补株 B11::GFP C-*lipase* 和回补株 B11::GFP C-*alt*;初步确定 *alt/lipase* 缺失可以降低 B11 的致病性;激光共聚焦荧光显微镜观察结果显示,荧光标记菌株有望实现斑马鱼活体感染途径示踪。这为进一步解析 *alt/lipase* 基因功能和致病机制提供了材料支撑与理论基础,同时也为后续嗜水气单胞菌其他潜在毒力基因敲除株的构建提供技术支持。

[参 考 文 献]

[1] Abdella B, Shokrak N M, Abozahra N A, et al. Aquaculture and *Aeromonas hydrophila*: a complex interplay of environmental factors and virulence[J]. Aquaculture International, 2024, 32(6): 7671-7681. DOI: 10. 1007/ s10499-024-01535-y.

[2] Pathak N K, Rana K, Rana N, et al. Molecular detection of enterotoxins in multidrug resistant *Aeromonas* from ready to eat foods in North Western Himalayas: public health significance[J]. Acta Tropica, 2024, 256: 107258. DOI: 10. 1016/ j. actatropica. 2024. 107258.

[3] Fernández-Bravo A, Figueras M J. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity[J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 129. DOI: 10. 3390/ microorganisms8010129.

[4] Chopra A K, Houston C W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis[J]. Microbes and Infection, 1999, 1(13): 1129-1137. DOI: 10. 1016/ S1286-4579(99)00202-6.

[5] Sha J, Kozlova E V, Chopra A K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxin activity[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(4): 1924-1935. DOI: 10. 1128/ iai. 70. 4. 1924-1935. 2002.

[6] Chopra A K, Peterson J W, Xu X J, et al. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbial Pathogenesis, 1996, 21(5): 357-377. DOI: 10. 1006/ mpat. 1996. 0068.

[7] Chang Y C, Wang J Y, Selvam A, et al. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(10): 2094-2099. DOI: 10. 4315/ 0362-028X-71. 10. 2094.

[8] Hoel S, Vadstein O, Jakobsen A N. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 931. DOI: 10. 3389/ fmicb. 2017. 00931.

[9] Khajanchi B K, Fadl A A, Borchardt M A, et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2313-2325. DOI: 10. 1128/ aem. 02535-09.

[10] Ruiz DE Alegría Puig C, Fernández Martínez M, DE Malet Pintons Fonseca A. Virulence genes of *Aeromonas* spp. isolates from stool in Spain[J]. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed), 2023, 41(10): 625-628. DOI: 10.

1016/j. eimce. 2022. 12. 015.

- [11] DE Silva B C J, Hossain S, Dahanake P S, et al. *Aeromonas* spp. from marketed Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): molecular characterization, phylogenetic analysis, virulence properties and antimicrobial susceptibility [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(1): 288-299. DOI:10. 1111/jam. 14106.
- [12] Leanovich S, Maksimuk Y, Dziahtsiaryk S, et al. Diversity, virulence factors and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* species isolated from farmed fish in Belarus [J]. The Microbe, 2025, 7: 100397. DOI:10. 1016/j. microb. 2025. 100397.
- [13] Yi S W, You M J, Cho H S, et al. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*) [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 164(1/2): 195-200. DOI:10. 1016/j. vetmic. 2013. 02. 006.
- [14] Ninh D T, Le D V, Van K V, et al. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture [J]. Antibiotics, 2021, 10(5): 532. DOI:10. 3390/antibiotics10050532.
- [15] 熊静, 赖晓健, 余钦, 等. 7 株鳃鳙致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 76-85.
- [16] Xiong J, Huang B, Guo S L, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulent *Aeromonas* in cultured eels [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(2): 418-428. DOI:10. 1111/jam. 14311.
- [17] Watanabe N, Morita K, Furukawa T, et al. Sequence analysis of amplified DNA fragments containing the region encoding the putative lipase substrate-binding domain and genotyping of *Aeromonas hydrophila* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 145-151. DOI:10. 1128/AEM. 70. 1. 145-151. 2004.
- [18] Xiong C J, Jiao H Y, Ran J Y, et al. A comprehensive understanding of the influence and molecular mechanism of *exxA* on the pathogenicity in *Aeromonas hydrophila* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 284: 138080. DOI:10. 1016/j. ijbiomac. 2024. 138080.
- [19] Wang D, Van Stappen G, Loor A, et al. Can only one physiological trait determinate the adverse effect of green fluorescent protein (GFP) incorporation on *Vibrio* virulence? [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105: 7899-7912. DOI: 10. 1007/s00253-021-11556-9.
- [20] 毛磊磊, 鄢代彬, 黄力行, 等. *luxR* 基因调控嗜水气单胞菌耐药性的分子机制初探 [J]. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 147-155. DOI:10. 19663/j. issn2095-9869. 20180531001.
- [21] Zhao Y, Liu Y Y, Li N, et al. Significance of broad-spectrum racemases for the viability and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Future Microbiology, 2022, 17(4): 251-265. DOI:10. 2217/fmb-2021-0112.
- [22] Jayaraman S, Rajendhran N, Kannan M A, et al. Quercetin disrupts biofilm formation and attenuates virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(7): 326. DOI:10. 1007/s00203-024-04034-z.
- [23] 杜雪梅. 绿色荧光蛋白标记的示踪菌株在评估大肠杆菌在食品中增殖的应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020: 4.
- [24] Muturi E J, Ramirez J L, Kim C H. Green, yellow, and red fluorescent proteins as markers for bacterial isolates from Mosquito Midguts [J]. Insects, 2019, 10(2): 49. DOI:10. 3390/insects10020049.
- [25] Rodríguez-Pedrouzo A, Cisneros-Sureda J, Martínez-Matamoros D, et al. Detection of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection in zebrafish by labelling bacteria with GFP and a fluorescent probe based on the siderophore amonabactin [J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 185: 106394. DOI:10. 1016/j. micpath. 2023. 106394.
- [26] Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 2773-2793. DOI:10. 3390/ijms15022773.
- [27] Rudenko O, Baseggio L, McGuigan F, et al. Transforming the untransformable with knockout minicircles: high-efficiency transformation and vector-free allelic exchange knockout in the fish pathogen *Photobacterium damsela* [J]. Microbiology Open, 2023, 12(4): 1374. DOI:10. 1002/mbo3. 1374.
- [28] 黄金玲, 吴雨霜, 唐慧全, 等. 花生青枯菌 GFPuv 标记菌株的构建和致病性分析 [J]. 广东农业科学, 2024, 51(11): 102-112.
- [29] 常雅洁, 丁雪燕, 王思权, 等. 常见细菌基因敲除技术的研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(10): 1118-1123.

- [30] 黄伊,丁信,黄楠,等. 奇异变形杆菌 *modABC* 基因缺失株的构建及其生物学特性[J]. 南方医科大学学报,2023,43(5):859-867.
- [31] Ji X M, Lu P, Xue J, et al. The lipoprotein NlpD in *Cronobacter sakazakii* responds to acid stress and regulates macrophage resistance and virulence by maintaining membrane integrity[J]. Virulence,2021,12(1):415-429. DOI:10.1080/21505594.2020.1870336.
- [32] 熊威振,冀笑明,任豆豆,等. 胸膜肺炎放线杆菌 *tadF* 基因缺失株构建及生物学特性研究[J]. 动物医学进展,2025,46(2):10-16.
- [33] 王雪,黄建忠,李力. 基因敲除技术在微生物中的应用[J]. 微生物学杂志,2019,39(4):100-106.
- [34] Kingombe C I B, Huys G, Tonolla M, et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12):5293-5302. DOI:10.1128/AEM.65.12.5293-5302.1999.
- [35] Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities; a PCR identification[J]. Journal of Applied Microbiology,2004,97(5):1077-1086. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x.
- [36] Nawaz M, Khan S A, Khan A A, et al. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. Food Microbiology,2010,27(3):327-331. DOI:10.1016/j.fm.2009.11.007.
- [37] Roges E M, Gonalves V D, Cardoso M D, et al. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from animal, food, and human sources in Brazil[J]. BioMed Research International,2020(1):1052607. DOI:10.1155/2020/1052607.
- [38] Kingombe C I B, D'Aoust J Y, Huys G, et al. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes[J]. Applied and Environmental Microbiology,2010,76(2):425-433. DOI:10.1128/AEM.01357-09.
- [39] Robertson B K, Harden C, Selvaraju S B, et al. Molecular detection, quantification, and toxigenicity profiling of *Aeromonas* spp. in source- and drinking-water[J]. Open Microbiology Journal,2014,8:32-39. DOI:10.2174/1874285801408010032.
- [40] Martínez O, Rodríguez-Calleja J M, Santos J A, et al. Foodborne and indicator bacteria in farmed molluscan shellfish before and after depuration[J]. Journal of Food Protection,2009,72(7):1443-1449. DOI:10.4315/0362-028X-72.7.1443.
- [41] Pablos M, Remacha M A, Rodríguez-Calleja J M, et al. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease,2010,29(9):1163-1172. DOI:10.1007/s10096-010-0982-3.
- [42] Pablos M, Rodríguez-Calleja J M, Santos J A, et al. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors[J]. International Journal of Food Microbiology,2009,135(2):158-164. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.020.

(责任编辑 马建华 英文审校 黄力行)