

马世林, 李继红, 马倩倩, 等. 嗜水气单胞菌双组分系统 EnvZ/OmpR 功能探究[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 161-167.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.020

# 嗜水气单胞菌双组分系统 EnvZ/OmpR 功能探究

马世林<sup>1</sup>, 李继红<sup>2</sup>, 马倩倩<sup>1</sup>, 吴志豪<sup>1</sup>, 陈愿<sup>1</sup>, 张永安<sup>1,3,4</sup>, 周洋<sup>1,3</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广州 510642;

4. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070

**摘要** 为探究嗜水气单胞菌双组分系统的调控功能, 通过同源重组法敲除嗜水气单胞菌双组分基因 *envZ/ompR*, 检测各菌株在不同盐浓度胁迫条件下的生长情况, 采用结晶紫染色法比较各菌株的生物被膜形成能力, 通过全血共培养试验评估各菌株抵御鱼血杀伤的能力; 比较不同菌株感染斑马鱼的半数致死量(LD<sub>50</sub>), 通过草鱼组织载菌量评判各菌株的侵袭能力, 采用荧光定量 PCR 检测各脏器的促炎因子的转录水平。结果显示, 在不同盐度条件下嗜水气单胞菌双基因缺失株  $\Delta envZ/ompR$  的生长没有显著差异, 而其下游基因 *ompF* 和 *ompC* 的转录水平显著受到影响;  $\Delta envZ/ompR$  株的生物被膜形成能力以及抗鱼全血杀伤能力相较野生型都显著下降。 $\Delta envZ/ompR$  的斑马鱼刮伤感染 LD<sub>50</sub> 较野生型增长了 4.8 倍, 致病力减弱, 在草鱼腹腔感染中其全身扩散能力也较野生株显著减弱, 并且  $\Delta envZ/ompR$  感染组草鱼脾脏、肝脏和肾脏中促炎因子 *TNF- $\alpha$*  和 *IL-6* 的转录水平相对于野生株感染组均显著降低。上述结果表明嗜水气单胞菌双组分系统 EnvZ/OmpR 参与响应渗透胁迫, 参与调控生物被膜形成, 且在致病过程尤其是在宿主体内系统扩散过程中发挥重要作用。

**关键词** 嗜水气单胞菌; 双组分系统 EnvZ/OmpR; 盐胁迫; 生物被膜; 致病力; 斑马鱼; 草鱼

**中图分类号** Q 938.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0161-07

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于革兰氏阴性菌, 是一种重要的条件致病菌<sup>[1]</sup>。该菌在自然界广泛分布, 由其引起的鱼类出血性败血症(MAS)给水产养殖业带来了严重的经济损失<sup>[2]</sup>。嗜水气单胞菌的主要毒力因子包括胞外毒素(气溶素、溶血素、肠毒素等)、胞外蛋白酶(金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶等)和黏附因子(S蛋白、菌毛、外膜蛋白等)等<sup>[3-4]</sup>。研究表明, 嗜水气单胞菌致病过程包含多个毒力因子的协同作用<sup>[5]</sup>, 因此, 解析嗜水气单胞菌毒力因子的协同和调控机制显得尤为重要。

双组分系统(two-component system, TCS)是细菌感受、响应和适应环境改变或自身胞内状态的一种信号转导机制, 细菌感应的信号包括细菌细胞自身的氧化还原状态、营养状况、外界环境的渗透压和抗生素浓度等<sup>[6-7]</sup>。EnvZ/OmpR系统是经典的双组分系统之一, 可响应外界渗透压的变化, 其中EnvZ是定位于细胞膜上的组氨酸蛋白激酶, OmpR是位于细胞质中具有转录活性的反应调控因子,

EnvZ感应到外界信号后, 通过磷酸基团转移将信号传递给OmpR, 进而调节下游外膜孔蛋白OmpF和OmpC的转录<sup>[8]</sup>。有研究者发现鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) EnvZ/OmpR双组分系统在细菌渗透压调节、运动和毒力调控上发挥关键作用<sup>[9]</sup>。致病性大肠杆菌(pathogenic *Escherichia coli*)双组份系统 EnvZ/OmpR下游基因 *ompF* 和 *ompC* 缺失后显著影响细菌对宿主的侵袭、定植和黏附能力<sup>[10]</sup>。目前, 嗜水气单胞菌中双组分系统 EnvZ/OmpR 的功能未知, 本研究通过同源重组的方法构建了双基因缺失株  $\Delta envZ/ompR$ , 探究双组分系统 EnvZ/OmpR 是否影响嗜水气单胞菌生物被膜形成、抗血液杀伤、全身性侵袭性扩散等过程, 旨在为阐明 EnvZ/OmpR 在嗜水气单胞菌致病过程中发挥的功能提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和实验试剂

嗜水气单胞菌野生株 ZYAH72 于 2014 年分离

收稿日期: 2021-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772889)

马世林, E-mail: msldzh-6265@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 周洋, E-mail: zhouyang@mail.hzau.edu.cn

自湖北荆州某渔场患病鲫,由笔者所在实验室保存,NCBI 序列号为 NZ\_CP016989.1。大肠杆菌  $\lambda$ 7213 感受态及自杀质粒 pRE112 均为笔者所在实验室保存。草鱼肾细胞 CIK 细胞系 (grass carp kidney cell line, CVCL\_CV32) 由笔者所在实验室保存并传代,在含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素双抗的 M199 培养基中培养。

胎牛血清和 M199 培养基购自 Gibco 公司; PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA Marker 购自诺唯赞公司; 所有抗生素 (青霉素-链霉素双抗和氯霉素) 均购自海博生物试剂公司; 逆转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription System 购自美国 Promega 公司; 荧光定量 PCR 检测试剂盒 (SYBR Green PCR master mix) 购自美国 Bio-Rad 公司; 试验中使用的引物 (表 1), 均由擎科生物技术有限公司合成。

## 1.2 $\Delta envZ/ompR$ 缺失株的构建

$\Delta envZ/ompR$  缺失株构建策略如图 1 所示,以嗜水气单胞菌 ZYAH72 全基因组为模板,用 P1/P2 和 P3/P4 引物分别进行 PCR 以扩增上下游同源臂,再用 P1/P4 引物经融合 PCR 连接上下游同源臂。经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切后连接到自杀性质粒 pRE112 对应多克隆位点,然后转化至大肠杆菌

$\lambda$ 7213。将构建的  $\lambda$ 7213-pRE112-*envZ/ompR* 作为供体菌,嗜水气单胞菌 ZYAH72 作为受体菌,进行接合转移。具体操作如下:供体菌和受体菌分别培养至对数生长期,用无菌 PBS 洗涤 2 次后混合均匀。将混合液小心加到提前放置于无抗 LA 平板上的无菌硝酸纤维素膜上,28 °C 静置 6 h 后用 LB 培养基冲洗,适当梯度稀释后涂布于氯霉素抗性平板上。28 °C 培养待结合子长出后,用 P1/P4 引物进行 PCR 验证。验证为阳性的单交换子在 7% 蔗糖 LB 培养基中连续传代后检测氯霉素抗性。对于氯霉素敏感菌株用 P5/P6 引物进行 PCR 验证,PCR 鉴定结果为阴性即表明  $\Delta envZ/ompR$  缺失株构建成功。

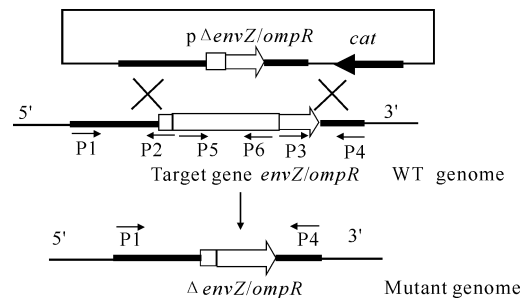


图 1  $\Delta envZ/ompR$  缺失株构建策略

Fig.1 Construction strategy of  $\Delta envZ/ompR$

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称 Primers	序列 5'-3' Sequence 5' to 3'	目标基因 Target genes
P1	CATGAATTCCTCCGGGAGAGCTCGACGAGAAGGTGAACCTGAA	<i>envZ/ompR</i> 上游同源臂
P2	GTCAATACCTCGAAGCCGGCCCTGGTCAGGTATTCGTTGA	Upstream fragment of <i>envZ/ompR</i>
P3	GCCGGCTTCGAGGTATTGACTACGCATCATCATCGGAC	<i>envZ/ompR</i> 下游同源臂
P4	CGATCCCAAGCTTCTTCTAGAACCGTCTGGCTGAGAGTC	Downstream fragment of <i>envZ/ompR</i>
P5	CTGAACGAAGAGGAGATCCA	<i>envZ/ompR</i> 内部序列
P6	CTGAACAGCCGCTCTCTATC	Internal sequence of <i>envZ/ompR</i>
OmpF-F	CAACGGTTTCTACTTCGC	<i>ompF</i>
OmpF-R	CCCAGCAGGGTTTCGTC	
OmpC-F	GCGAGAAGACCATCAGCG	<i>ompC</i>
OmpC-R	CACGGTTGGTGGCGAAG	
TNF- $\alpha$ -F	ATTTATCTCGGTGCGGCCTT	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>
TNF- $\alpha$ -R	GCTTACAGAGCAAACACCCC	
IL-6-F	CTCAACCCTGGTCAACGACA	<i>IL-6</i>
IL-6-R	GCATCCATGCGGATTTGACC	
$\beta$ -actin-F	GCCCCACCTGAGCGTAAATA	<i><math>\beta</math>-actin</i>
$\beta$ -actin-R	GCATCCATGCGGATTTGACC	

## 1.3 NaCl 胁迫实验

分别配制含有 0.25%、1.00%、2.00% NaCl 的培养基,将嗜水气单胞菌以体积比 1:100 转接到盐胁迫培养基中,混匀后转接至 96 孔板,每孔 200

$\mu$ L,每个样品 3 个重复。28 °C 条件下培养,每 0.5 h 测 OD<sub>600 nm</sub> 值,连续培养 30 h。实验独立重复 3 次。

## 1.4 qRT-PCR 检测相关基因表达

使用 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript

TMRT Kit) 进行反转录,  $2 \times$  TSINGKE Master qPCR Mix-SYBR 进行荧光定量 PCR。其中嗜水气单胞菌 ZYAH72 的内参为 16S rRNA, 草鱼的内参为  $\beta$ -actin。实验独立重复 3 次, 分析方法采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[11]</sup>。

### 1.5 生物被膜生成量检测

取 10  $\mu$ L 菌液和 100  $\mu$ L LB 至 96 孔板中, 28  $^{\circ}$ C 培养 36 h。吸出菌液并用无菌水洗去未附着菌体, 用 100  $\mu$ L 0.2% 结晶紫染色 5 min。无菌水洗涂后放置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱烘干, 用 33% 冰醋酸溶解生物被膜, 分光光度计测定每孔的 OD<sub>600 nm</sub> 值。实验独立重复 3 次。

### 1.6 全血杀伤实验

采集健康成年草鱼血液, 用 EDTA 作抗凝处理, 调节菌浓度为  $10^5$  CFU/mL, 菌和血液以体积 1:9 比例混匀置于 28  $^{\circ}$ C 培养箱静置培养。作用 1 h 后取 100  $\mu$ L 菌-血液混合物, 使用无菌 PBS 进行 10 倍梯度稀释后涂布平板, 28  $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养, 第 2 天进行菌落计数。

### 1.7 斑马鱼攻毒实验

斑马鱼购自武汉东湖生态旅游风景区万物水族经营部, 于华中农业大学水产基地暂养 1 周后进行攻毒实验。根据菌落计数的结果, 用 PBS 将生长至对数生长期的嗜水气单胞菌洗涤 2 次, 置于冰上备用。注射感染组斑马鱼用无菌注射器经腹腔注射, 设置 6 个攻毒浓度, 每组 10 尾斑马鱼, 每尾 10  $\mu$ L, 同时注射 PBS 组作为空白对照。浸泡感染组的斑马鱼背鳍前方小片鳞片用手术刀片刮掉, 分别浸泡在 6 个浓度梯度菌液的鱼缸中, 20 min 后捞出并用曝气水清洗, 放到干净水源的鱼缸中。设置刮伤后 PBS 浸泡组为空白对照组。所有斑马鱼感染后持续观察 14 d, 记录死亡数据, 采用 Karber 法计算 LD<sub>50</sub><sup>[12]</sup>。

### 1.8 草鱼攻毒实验

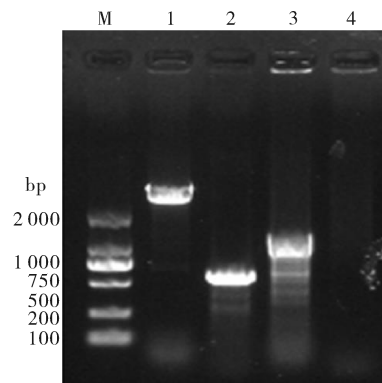
试验用草鱼(体质量  $20 \pm 10$  g、体长 8~10 cm) 购自湖北仙桃市某草鱼养殖基地, 于华中农业大学水产基地暂养 1 周后进行攻毒实验。草鱼感染剂量为  $2.0 \times 10^5$  CFU/尾。感染 24 h 后, 解剖草鱼后取脾脏、头肾和体肾组织, 分别称取其质量。向组织中加入 1 mL 的 PBS, 使用研磨棒研磨组织获得悬浮液, 涂布平板进行菌落计数, 最后计算出每克组织中

的载菌量。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜水气单胞菌双组分系统 *envZ/ompR* 基因组分析及 $\Delta envZ/ompR$ 缺失株构建

对嗜水气单胞菌 ZYAH72 全基因组序列分析, 发现 *envZ/ompR* 的同源序列, 将其命名为 *envZ/ompR* (BFW97\_22565/ BFW97\_22560)。为进一步研究 *envZ/ompR* 功能, 通过同源重组法构建 *envZ/ompR* 双基因缺失株, 通过基因外部引物 (P1/P4) PCR 扩增, 野生型获得 3 080 bp 产物,  $\Delta envZ/ompR$  产物为 1 205 bp, 通过基因内部引物 (P5/P6) PCR 扩增, 野生型获得 535 bp 产物,  $\Delta envZ/ompR$  无对应片段因此无法获得扩增产物, 结果均与预期一致, 表明  $\Delta envZ/ompR$  缺失株构建成功 (图 2)。



泳道 1、3 为野生型 ZYAH72 扩增产物, 泳道 2、4 为缺失株 *envZ/ompR* 扩增产物, 泳道 1、2 引物为外引物 P1/P4, 泳道 3、4 引物为内引物 P5/P6。Lanes 1 and 3 are the amplified products of wild-type ZYAH72, lanes 2 and 4 are the amplified products of  $\Delta envZ/ompR$ , the primers of lanes 1 and 2 are P1/P4, and the primers of lanes 3, 4 are P5/P6.

图 2  $\Delta envZ/ompR$  缺失株 PCR 验证

Fig.2 PCR verification of mutant strain  $\Delta envZ/ompR$

### 2.2 双组分系统 *EnvZ/OmpR* 对 *ompF* 和 *ompC* 基因的转录调控

渗透胁迫实验结果显示, 在低渗 (0.25% NaCl)、等渗 (1.00% NaCl) 和高渗 (2.00% NaCl) LB 培养基中  $\Delta envZ/ompR$  与野生株生长速度无显著性差异 (图 3)。对下游 *ompF* 和 *ompC* 基因转录水平的检测结果显示, 野生型菌株在低渗 (0.25% NaCl) 条件较等渗 (1.00% NaCl) 条件下 *ompF* 的转录水平上调了 64.6%, *envZ/ompR* 缺失后, *ompF*

的转录水平显著被抑制(图 4)。在高渗(2.00% NaCl)条件下,野生型菌株 *ompC* 的转录水平较等渗(1.00% NaCl)条件上调了 48.2%,而 *envZ/ompR* 缺失后,*ompC* 的上调表达被显著抑制(图 5)。

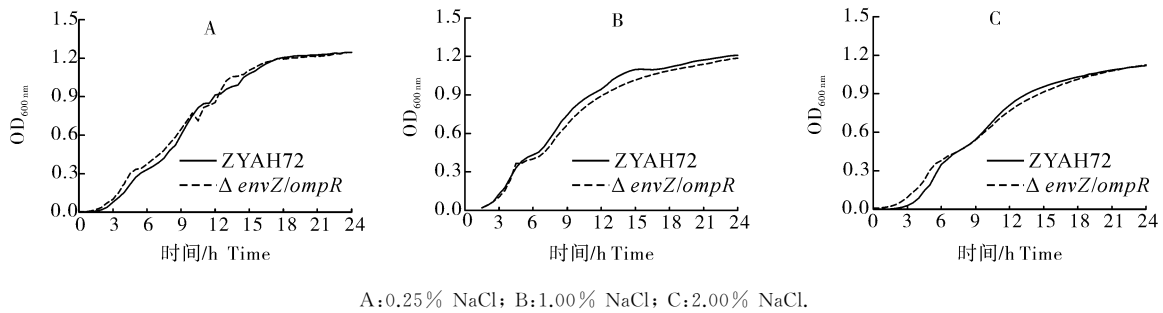


图 3 细菌在不同 NaCl 质量分数 LB 培养条件下的生长曲线

Fig.3 Growth curve of bacteria cultured in LB medium with different NaCl concentration

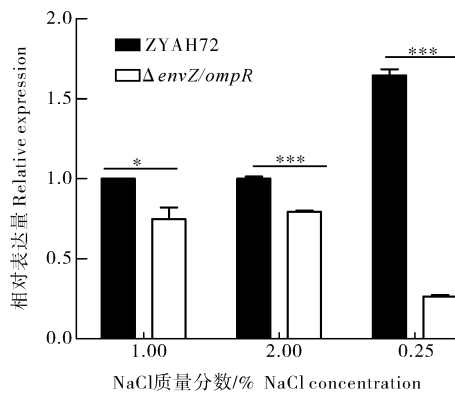


图 4 *ompF* 在不同 NaCl 质量分数 LB 培养条件下的转录水平

Fig.4 Transcription level of *ompF* under different

NaCl concentration LB culture conditions

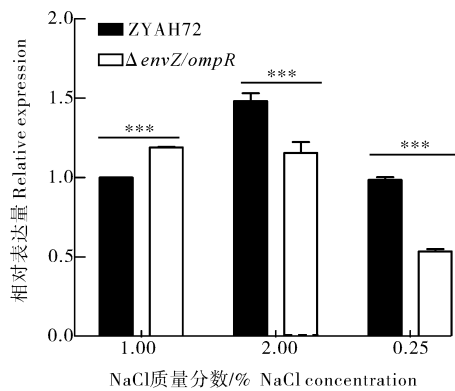


图 5 *ompC* 在不同 NaCl 质量分数 LB 培养条件下的转录水平

Fig.5 Transcription level of *ompC* under different

NaCl concentration LB culture conditions

### 2.3 双组分系统 EnvZ/OmpR 在嗜水气单胞菌生物被膜形成和抗全血杀伤中的作用

通过检测体外生成生物被膜的生成量,探究双组分系统 EnvZ/OmpR 是否参与嗜水气单胞菌生物被膜形成过程,结果显示  $\Delta envZ/ompR$  的生物被

膜形成能力较野生型下调 19.9%(图 6)。此外,  $\Delta envZ/ompR$  在抗宿主免疫清除方面也表现出缺陷。野生型在与草鱼全血孵育 1.0 h 后,细菌数量为起始菌量的 3.82 倍,而  $\Delta envZ/ompR$  被草鱼全血有效杀伤,孵育 1.0 h 后菌量仅为起始菌量的 90.1%(图 7),表明 *envZ/ompR* 缺失后,细菌抗全血杀伤能力显著下降。

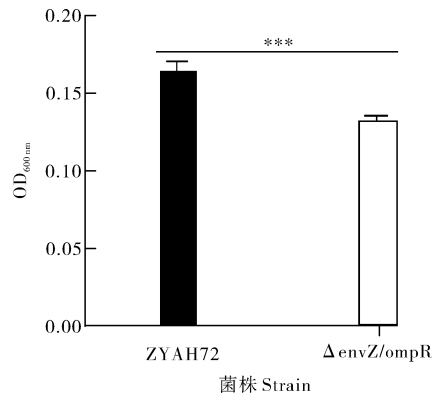


图 6 生物被膜形成能力检测

Fig.6 Biofilm formation test

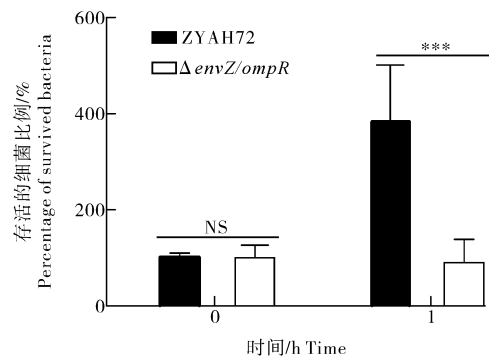


图 7 抗全血杀伤能力检测

Fig.7 Capacity of anti-whole blood killing assay

## 2.4 双组分系统 EnvZ/OmpR 在嗜水气单胞菌感染过程中的作用

斑马鱼攻毒实验结果显示,腹腔注射感染方式下, $\Delta envZ/ompR$  的  $LD_{50}$  相较野生型增长了 1.80 倍,而在创伤感染方式下, $\Delta envZ/ompR$  的  $LD_{50}$  相较野生型增长了 4.80 倍(表 2)。进一步检测野生株

与  $\Delta envZ/ompR$  感染后分别在草鱼内脏组织载菌量上的差异,结果显示:在脾脏中, $\Delta envZ/ompR$  的载菌量仅为野生株的 5.5%;在体肾组织中, $\Delta envZ/ompR$  的载菌量仅为野生株的 11.3%;在头肾组织中,野生载菌量为  $10^3$  CFU/g,而  $\Delta envZ/ompR$  的载菌量为 0(图 8)。

表 2 斑马鱼攻毒结果

Table 2 Zebrafish challenge results

斑马鱼创伤感染 Zebrafish wound infection				斑马鱼注射攻毒 Zebrafish injection challenge			
ZYAH72		$\Delta envZ/ompR$		ZYAH72		$\Delta envZ/ompR$	
攻毒剂量 Dose/CFU	死亡数目 Deaths	攻毒剂量 Dose/CFU	死亡数目 Deaths	攻毒剂量 Dose/CFU	死亡数目 Deaths	攻毒剂量 Dose/CFU	死亡数目 Deaths
$0.97 \times 10^7$	10	$1.16 \times 10^7$	10	$0.98 \times 10^6$	10	$0.86 \times 10^6$	10
$0.97 \times 10^6$	9	$1.16 \times 10^6$	8	$0.98 \times 10^5$	9	$0.86 \times 10^5$	8
$0.97 \times 10^5$	9	$1.16 \times 10^5$	5	$0.98 \times 10^4$	7	$0.86 \times 10^4$	9
$0.97 \times 10^4$	2	$1.16 \times 10^4$	2	$0.98 \times 10^3$	4	$0.86 \times 10^3$	0
$0.97 \times 10^3$	1	$1.16 \times 10^3$	0	$0.98 \times 10^2$	0	$0.86 \times 10^2$	1
$0.97 \times 10^2$	0	$1.16 \times 10^2$	0	$0.98 \times 10^1$	5	$0.86 \times 10^1$	0
$LD_{50}: 2.44 \times 10^4$		$LD_{50}: 1.17 \times 10^5$		$LD_{50}: 3.02 \times 10^3$		$LD_{50}: 5.41 \times 10^3$	

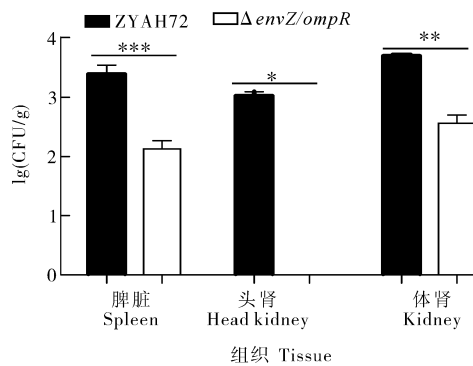
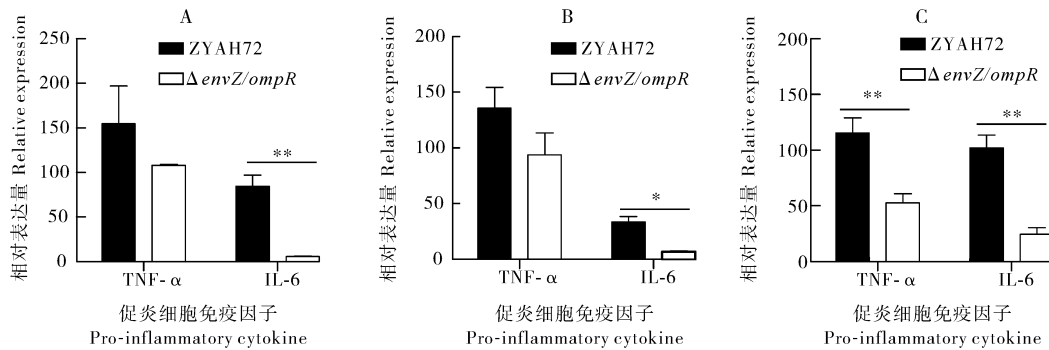


图 8 草鱼组织载菌量

Fig.8 Bacterial loads in grass carp tissues

## 2.5 双组分系统 EnvZ/OmpR 对于促炎性细胞因子表达的影响

野生株感染草鱼后脾脏中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的转录水平分别上调了 154.6 倍和 84.5 倍,而  $\Delta envZ/ompR$  感染组脾脏中,上述促炎细胞因子也上调表达,上调倍数分别为 107.8 倍和 5.6 倍;在肝脏中野生株感染后 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的转录水平分别上调了 115.6 倍和 102.0 倍,而缺失株感染组仅为 52.6 倍和 24.6 倍(图 9)。上述结果说明野生株感染后能够引起草鱼强烈的炎症反应,而  $envZ/ompR$  基因缺失后降低了炎症反应程度。



A:脾脏; B:肾脏; C:肝脏。A:Spleen; B:Kidney; C:Liver.

图 9 草鱼促炎细胞免疫因子的相对表达量

Fig.9 Relative expression of pro-inflammatory cytokine of grass carp

## 3 讨论

自 20 世纪 80 年代起,嗜水气单胞菌的流行病

给全球水产养殖业造成了严重的经济损失<sup>[13]</sup>。嗜水气单胞菌的致病机制一直以来都是业内研究热点。本研究通过同源比对,将 ZYAH72 (NZ\_

CP016989.1) 菌株 BFW97\_22565/ BFW97\_22560 基因命名为 *envZ/ompR*, 成功构建了基因缺失株  $\Delta envZ/ompR$ , 并初步分析了该基因的功能。

根据功能域分析推测双组分系统 EnvZ/OmpR 可能和渗透胁迫有关, 然而, 实验结果显示缺失株渗透胁迫能力变化并不显著。在基因功能预测时发现 ZYAH72 基因组中共有 4 对双组分基因和渗透胁迫有关, 推测 *envZ/ompR* 基因失活后其他双组分系统代偿了 EnvZ/OmpR 渗透胁迫的功能。为了验证这个猜想, 用 qRT-PCR 的方法检测了下游渗透调控相关因子的表达变化, 结果显示, 低渗条件下, 外膜孔蛋白基因 *ompF* 受双组分系统 EnvZ/OmpR 调控转录水平上调, 而高渗条件下外膜孔蛋白基因 *ompC* 受双组分系统 EnvZ/OmpR 调控转录水平显著上调。上述结果与大肠杆菌中双组分系统 EnvZ/OmpR 对于下游蛋白的调控结果一致<sup>[14]</sup>, 表明嗜水气单胞菌中 EnvZ/OmpR 与渗透胁迫响应相关, 但因为在 ZYAH72 菌株中还存在其他功能类似的双组分系统, 这些双组分系统如何协调互作, 具体调控机制还有待进一步研究。

生物被膜与细菌抗生素抗性和致病性密切相关, 生物被膜还可以作为细菌对外的屏障, 有效抵御宿主杀伤<sup>[15-17]</sup>。之前的研究发现嗜水气单胞菌 QseB/C 双组分系统正向调节泳动及涌动、溶血活性和负向调节生物膜的形成, 影响细菌毒力<sup>[10]</sup>。本研究发现双组分系统 EnvZ/OmpR 正调控嗜水气单胞菌生物被膜的形成和抗血液杀伤能力。

研究表明, 鲍曼不动杆菌 EnvZ/OmpR 双组分系统调控细菌的渗透压和毒力<sup>[9]</sup>。此外, 大肠杆菌双组分系统下游基因 *ompF* 和 *ompC* 也被发现和细菌的定植、黏附能力及毒力有关<sup>[10]</sup>。本研究测算了  $\Delta envZ/ompR$  的斑马鱼 LD<sub>50</sub>, 发现腹腔感染后缺失株毒力和野生株毒力差异并不明显。然而刮伤感染结果显示  $\Delta envZ/ompR$  毒力有明显下降, 提示 EnvZ/OmpR 在嗜水气单胞菌由皮肤创口向全身系统扩散过程发挥作用。为进一步验证这一结论, 用草鱼构建感染模型检测了组织载菌量,  $\Delta envZ/ompR$  感染草鱼后各脏器的载菌量相比于野生株显著降低, 表明 EnvZ/OmpR 促进细菌的全身侵袭能力。在实际生产中, 鱼体体表伤口也是嗜水气单胞菌感染的途径之一。最后我们还发现,  $\Delta envZ/ompR$  感染引起的宿主促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达量减少, 过多的炎性细胞因子产生会导致组织损伤、器官衰竭甚至最终

死亡。因此, 上述结果也与  $\Delta envZ/ompR$  致病力的结果相一致。

综上, 本研究初步探究了嗜水气单胞菌双组分系统 EnvZ/OmpR 的功能, 发现其参与响应渗透胁迫, 参与调控生物被膜形成, 且在致病过程尤其是宿主体内系统扩散过程发挥重要作用, 这一结果可为嗜水气单胞菌致病调控机制的研究提供科学依据。

## 参考文献 References

- [1] 姜艳丽, 李丽丽. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2015(2): 142-146. JIANG Y L, LI L L. Research progress on *Aeromonas hydrophila* [J]. Heilongjiang agricultural sciences, 2015(2): 142-146 (in Chinese with English abstract).
- [2] 付立霞. 嗜水气单胞菌非质粒依赖性菌蛻疫苗的研制及评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2012. FU L X. Generation and evaluation of *Aeromonas hydrophila* plasmid-independent ghost vaccine [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [3] 储卫华. 嗜水气单胞菌侵袭机制及其胞外蛋白酶的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002. CHU W H. Invasion mechanism and extracellular protease of *Aeromonas hydrophila* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2002 (in Chinese with English abstract).
- [4] 庞茂达. 嗜水气单胞菌流行株基因组特征及毒力相关基因研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015. PANG M D. Genomic characteristics and virulence-associated genes analysis of *Aeromonas hydrophila* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [5] FADL A A, GALINDO C L, SHA J, et al. Deletion of the genes encoding the type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alters host responses to *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Microbial pathogenesis, 2006, 40(5): 198-210.
- [6] 李泳榆, 汪川, 唐田. 沙门菌 PhoP-PhoQ 双组分系统信号响应机制研究进展[J]. 现代预防医学, 2017, 44(22): 4168-4170, 4180. LI Y Y, WANG C, TANG T. Research progress on the signal response mechanism of *Salmonella* PhoP/PhoQ bi-component system [J]. Modern preventive medicine, 2017, 44(22): 4168-4170, 4180 (in Chinese with English abstract).
- [7] ZHENG C K, LI L Z, GE H J, et al. Role of two-component regulatory systems in the virulence of *Streptococcus suis* [J]. Microbiological research, 2018, 214: 123-128.
- [8] WANG L C, MORGAN L K, GODAKUMBURA P, et al. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm [J]. The EMBO journal, 2012, 31(11): 2648-2659.
- [9] TIPTON K A, RATHER P N. An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075 [J/OL]. Journal of bacteriology, 2017, 199(3): e00705-16 [2021-03-16]. <https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>.
- [10] HEJAI R H M A, ZHU Y C, MA J L, et al. Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic

- Escherichia coli* [J]. Microbial pathogenesis, 2017, 107: 29-37.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] 顾兵, 张政, 李玉萍, 等. 半数致死量及其计算方法概述 [J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507-508, 511. GU B, ZHANG Z, LI Y P, et al. Summary of median lethal dose and its calculation methods [J]. China occupational medicine, 2009, 36(6): 507-508, 511 (in Chinese with English abstract).
- [13] 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).
- [14] CAI S J, INOUE M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli* [J]. Journal of biological chemistry, 2002, 277(27): 24155-24161.
- [15] HAUSSLER S, FUQUA C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field [J]. Journal of bacteriology, 2013, 195(13): 2947-2958.
- [16] VENKATESAN N, PERUMAL G, DOBLE M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria [J]. Future microbiology, 2015, 10(11): 1743-1750.
- [17] HEUMANN A, ASSIFAOU I A, DA SILVA BARREIRA D, et al. Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lactocaseibacillus paracasei* [J/OL]. NPJ biofilms and microbiomes, 2020, 6: 44 [2021-03-16]. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00159-3>.

## Functional analysis of two component systems (TCS) EnvZ/OmpR in *Aeromonas hydrophila*

MA Shilin<sup>1</sup>, LI Jihong<sup>2</sup>, MA Qianqian<sup>1</sup>, WU Zhihao<sup>1</sup>,  
CHEN Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Yongan<sup>1,3,4</sup>, ZHOU Yang<sup>1,3</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

3. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China

4. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Wuhan 430070, China

**Abstract** To explore the regulatory function of the two-component system (TCS) in *Aeromonas hydrophila*, *envZ* and *ompR* genes were knocked out via homologous recombination. *In vitro*, the growth of each strain under different salt concentration stress was tested, the biofilm formation capacity of each strain was compared via the crystal violet staining test, and the resistance to fish blood killing was examined via whole blood killing assay. *In vivo*, LD<sub>50</sub> of each strain was calculated by infecting zebrafish, the systemic invasive ability of each strain in grass carp was compared, and the transcription levels of proinflammatory cytokines were measured by quantitative PCR. The results showed that the  $\Delta envZ/ompR$  growth did not show significant differences at different salt concentrations *in vitro*. However, with the deletion of *envZ/ompR*, the transcription levels of the downstream genes *ompF* and *ompC* were significantly affected.  $\Delta envZ/ompR$  also showed a significant decrease in biofilm formation and resistance to fish whole blood killing compared with the wild type. In the zebrafish scratch infection model, the LD<sub>50</sub> of  $\Delta envZ/ompR$  increased 4.8-fold compared to the wild type, indicating reduced virulence. In the  $\Delta envZ/ompR$ -infected grass carp, the systemic spreading ability of  $\Delta envZ/ompR$  was significantly weakened, and the transcript levels of pro-inflammatory factors *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* were significantly reduced in the spleen, head-kidney, and kidney. Taken together, the above results indicated that the TCS EnvZ/OmpR involved in response to osmotic stress, in the regulation of biofilm formation and in pathogenic processes, especially in the systemic diffusion process in the host.

**Keywords** *Aeromonas hydrophila*; TCS EnvZ/OmpR; salt stress; biofilm; pathogenicity; zebra fish; grass carp

(责任编辑:边书京)