

马倩倩,周洋,张永安.嗜水气单胞菌双组分系统FlrBC的功能探究[J].华中农业大学学报,2022,41(3):221-228.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.025

嗜水气单胞菌双组分系统FlrBC的功能探究

马倩倩¹,周洋^{1,2,3},张永安^{1,2,3}

1.华中农业大学水产学院,武汉 430070; 2.岭南现代农业科学与技术广东省实验室,广州 510542;
3.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 为明确双组分系统FlrBC在嗜水气单胞菌极生鞭毛合成、生物被膜形成及致病机制中的作用,通过同源重组法,以嗜水气单胞菌ZYAH72为野生菌株构建双组分系统FlrBC缺失株 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$,比较不同菌株鞭毛合成及游动性、生物被膜形成、胞外多糖分泌、细胞黏附以及抗全血杀伤能力差异。结果显示:与野生株相比, $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 仍能形成极生鞭毛,细菌游动能力无显著差异;而结晶紫染色发现 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 相较于野生株的生物被膜形成能力分别下降了27.2%和22.3%;刚果红检测结果显示,与野生株相比, $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 的胞外多糖分泌分别下降了18.4%和14.2%;实时荧光定量PCR的结果显示, $flrB$ 和 $flrC$ 的缺失不同程度抑制了鞭毛合成、生物被膜相关通路基因的表达;与草鱼肾细胞共孵育后, $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 的细胞黏附率与野生株相比分别下降了23.2%和18.2%;全血杀伤实验结果显示, $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 抗全血杀伤能力均显著减弱。以上结果表明,双组分系统FlrBC不是嗜水气单胞菌极生鞭毛形成所必需,但在细菌鞭毛形成组装和生物被膜形成中发挥调控作用,并且影响嗜水气单胞菌致病性。

关键词 嗜水气单胞菌;双组分系统FlrBC;极生鞭毛;游动性;生物被膜;胞外多糖;细胞黏附;全血杀伤

中图分类号 Q938.8 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2022)03-0221-08

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是我国流行最广泛的水生动物致病菌之一,几乎能够感染所有大宗淡水养殖鱼类品种。该菌在高密度人工养殖鱼塘极易引起暴发性疾病^[1],造成严重经济损失。近年来该菌引起的运动性气单胞菌败血症对全球水产养殖业造成毁灭性影响^[2],甚至观赏鱼养殖也面临该菌的威胁^[3]。嗜水气单胞菌致病过程复杂,解析其致病机制对于预防和治疗嗜水气单胞菌病具有重要意义。

双组分系统(two-component system, TCS)是细菌感受环境并及时做出反应的信号转导机制,在细菌生长、分化、代谢、毒力、滞留性、致病性等多个方面发挥调控作用^[4]。FlrBC是一对经典的双组分系统,可激活下游鞭毛基因转录,对于细菌极生鞭毛形成至关重要^[5]。鞭毛不仅作为细菌的运动胞器参与多种运动过程,在生物被膜形成过程中也起着重要作用,细菌可通过控制生物被膜形成来间接调控致

病性^[6]。目前在嗜水气单胞菌中关于双组分系统的研究不多,仅见到CpxA/R^[7]、QseB/C^[8]、EnvZ/OmpR^[9]等双组分系统,而嗜水气单胞菌中双组分系统FlrBC未见报道,该系统的功能未知,调控的下游基因仍不明确,因此,本研究构建了双组分系统FlrBC的单基因缺失株 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$,以期初步阐明FlrBC在嗜水气单胞菌极生鞭毛合成、生物被膜形成及致病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

嗜水气单胞菌野生株ZYAH72^[10]分离自湖北省荆州市某渔场患病鲫,由笔者所在实验室保存,NCBI序列号为NZ_CP016989.1。大肠杆菌(*E. coli*) χ 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

收稿日期:2022-03-08

基金项目:岭南现代农业实验室科研项目(NT2021008);现代农业产业技术体系(CARS-46);国家自然科学基金项目(31772889)

马倩倩,E-mail: maqianqian@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:张永安,E-mail: yonganzhang@mail.hzau.edu.cn

传代。

1.2 试剂

胎牛血清(FBS)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;青霉素-链霉素双抗和氯霉素均购自海博生物试剂公司;RNA提取试剂

盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒PrimeScript TMRT Kit购自TaKaRa公司;实时荧光定量PCR检测试剂盒(SYBR Green PCR master mix)购自美国Bio-Rad公司;试验中使用的引物见表1,均由擎科生物技术有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Primers information

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence	目标基因 Target genes
P1	CATGAATTCCCGGGAGAGCTCATGGAATCCCTGATGCAGTA	<i>flrB</i> 上游同源臂
P2	AGACACCGGTGGGCAGCGCGTGAAGATGGCGTAAAAGCTG	Upstream fragment of <i>flrB</i>
P3	GGCGCTGCCACCGGTGTCTCCAGATTTTCGAACCCCTTCT	<i>flrB</i> 下游同源臂
P4	CGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGTAGGCAGTCATCAACAGCA	Downstream fragment of <i>flrB</i>
P5	CAGCTTTACGCCATCTTCAC	<i>flrB</i> 内部序列
P6	ATGTCGCTGATCTGCTTTTC	Internal sequence of <i>flrB</i>
P7	CTCGATATCGCATGCGGTACCTGGTGTTCATCAACGATCTG	<i>flrC</i> 上游同源臂
P8	AGTTTTCGATGAGAGATCATAGAAGGGTTCGAAAATCTGG	Upstream fragment of <i>flrC</i>
P9	ATGATCTCTCATCGAAAACTCGAAACCGTACTCAACCATC	<i>flrC</i> 下游同源臂
P10	CGATCCCAAGCTTCTTCTAGACGCCAGATTGATGTAGCTCT	Downstream fragment of <i>flrC</i>
P11	GGTGGATACCCTGTTGCTC	<i>flrC</i> 内部序列
P12	GGAGTTGTCGTGGATGTAGC	Internal sequence of <i>flrC</i>
<i>flgB</i> -F	GACCAGTGAGAAGCATTTCG	<i>flgB</i>
<i>flgB</i> -R	CGCTGATCTTGCTGTTTCATA	
<i>flgM</i> -F	TTGGATTCTGAAGCTGAACAT	<i>flgM</i>
<i>flgM</i> -R	GACTGACTCCGTCTCCTTGA	
<i>flaA</i> -F	GCAGTTGTGCCAGAGAGAT	<i>flaA</i>
<i>flaA</i> -R	GGATACATCCTACACCCGTCT	
<i>malB</i> -F	TACCTCCCAGTCGTTTGA	<i>malB</i>
<i>malB</i> -R	ACTTCCGTTTCAAGGTGTCG	
<i>ompAII</i> -F	TGCTGGTTGGGCTTATGG	<i>ompAII</i>
<i>ompAII</i> -R	GCAAACACGGAGAAGATGTCC	
<i>malE</i> -F	GACGGCATCGGCTCGCCATTCT	<i>malE</i>
<i>malE</i> -R	AACGCCGCCAGCCGAACAA	
<i>deoD</i> -F	GTCTCGCATCTCCATCAT	<i>deoD</i>
<i>deoD</i> -R	CCACGTCACGCAGTTTCA	
<i>glnA</i> -F	AGGGTCATCGTCCTTTCGT	<i>glnA</i>
<i>glnA</i> -R	GTCTTGTTGTAGGCGTGGG	
<i>mglB</i> -F	GGCGTCATCCAGTTCGTG	<i>mglB</i>
<i>mglB</i> -R	CAGGCGTCCATCTTGTC	
<i>omp 38</i> -F	GCCATTCTGCCCTGCTT	<i>omp 38</i>
<i>omp 38</i> -R	TATTCGGCGGCGTTGACC	
16S rRNA-F	GCCCCACCTGAGCGTAAATA	16S rRNA
16S rRNA-R	GCATCCATGCGGATTTGACC	

1.3 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 基因缺失株的构建

通过同源重组法构建 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 基因缺失株。以 $\Delta flrB$ 缺失株构建为例,以嗜水气单胞菌ZYAH72基因组DNA为模板,用引物P1/P2和P3/P4扩增 $flrB$ 上下游同源臂,再将上下游同源臂作为模板通过Overlap PCR连接。将提取的pRE112质粒和上下游同源臂融合片段进行双酶切再利用同源重组酶连接,然后转化至大肠杆菌 $\chi 7213$ 。将构建成功的 $\chi 7213$ -pRE112- $flrB$ 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,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次后混合均匀。将混合液加到提前放置于无抗LA平板上的无菌硝酸纤维素膜上,28℃静置6h后用LB液体培养基冲洗,适当梯度稀释后涂布于氯霉素抗性平板上。28℃生长36h待结合子长出,用P1/P4外部引物进行PCR验证,验证为阳性的单交换子在7%蔗糖LB培养基中连续传代筛选。对于氯霉素敏感菌株用内部引物P5/P6进行PCR验证,PCR鉴定结果为阴性即表明 $\Delta flrB$ 缺失株构建成功。

1.4 细菌鞭毛的观察实验

将菌株接种到LA平板上,28℃培养12~14h后用无菌PBS重悬,用铜网蘸取适量菌液,然后用1%钨酸负染5min,空气中晾干后在透射电镜(日立HITACHI,H-7650,100kV)下观察。

1.5 菌株游动性观察实验

配制琼脂质量分数为0.25%的半固体平板。将待观察的菌株用LB液体培养基培养至对数生长期,将各菌株菌液稀释至 $OD_{600\text{nm}}=1.0$ 。用牙签蘸取菌液点在半固体平板中央,平板置于28℃条件下培养14~16h,拍照观察菌株的游动半径,每株菌设置3个重复。

1.6 生物被膜形成能力检测实验

用结晶紫染色检测菌株的生物被膜形成能力。操作步骤如下:将新鲜菌液稀释至 $OD_{600\text{nm}}=1.0$,在细胞板中以1:200体积比接种到3mL液体LB中,保证培养基不会完全挥发,28℃恒温培养箱静置培养48h后,用枪头将菌液取出,用无菌PBS洗涤3次,以去除松散黏附的细胞。剩余的附着细菌用甲醇固定15min。在空气中干燥后,加入3mL 0.1%的结晶紫溶液染色20min,无菌PBS清洗3次以除去未被结合的结晶紫,用质量分数为33%的冰醋酸溶解生物被

膜,分光光度计测定每孔的 $OD_{595\text{nm}}$ 值。每株菌设置3个重复。

1.7 刚果红吸附实验

收集过夜培养的菌液,以1:100体积比接种到液体LB中,培养至 $OD_{600\text{nm}}=1.0$ 。取2mL稀释后的菌液离心,去上清液,用含40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刚果红的LB液体重悬菌体后置于28℃振荡培养12h。然后离心将菌体及其吸附的刚果红沉淀到底部,取上清液部分测量光密度值 $OD_{490\text{nm}}$,用于评价培养基中剩余的刚果红量。另外用同样含40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刚果红的LB液体的 $OD_{490\text{nm}}$ 做阳性对照,阳性对照值减去培养基中剩余刚果红的值即为被胞外多糖吸附的刚果红含量。每株菌设置3个重复。

1.8 qRT-PCR检测

使用TaKaRa反转录试剂盒(PrimeScript TMRT Kit)进行反转录,2 \times SYBR Green PCR master mix进行荧光定量PCR,用于定量生物被膜合成基因 $flgB$ 、 $flgM$ 、 $flaA$ 、 $malB$ 、 $ompAII$ 、 $malE$ 、 $deoD$ 、 $glnA$ 、 $omp38$ ^[11],内参基因为16S rRNA。qRT-PCR反应体系(20 μL):模板cDNA 2 μL ,上下游引物各0.5 μL ,2 \times SYBR Green master mix 10 μL ,ddH₂O 7 μL 。反应程序:95℃预变性5min;95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环。实验独立重复3次,分析方法采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[12]。

1.9 对草鱼肾细胞CIK黏附实验

收集新鲜菌液,用无血清、无抗生素的M199培养基将菌浓度调节为 $1.0\times 10^8\sim 2.0\times 10^8$ cfu/mL。取含有单层细胞的24孔细胞培养板,去除培养液,用Hank's平衡盐溶液洗涤3次,将100 μL 菌液接种至细胞板孔内,所有孔补加900 μL 培养液,不加细菌的细胞为阴性对照。37℃、5%CO₂孵育3h后,去除上清,用PBS洗5~6次,每孔加入200 μL 0.025%胰酶消化细胞10min,加入800 μL 培养液吹打细胞。稀释后涂平板,置于28℃培养,记录菌落总数^[13]。每株菌设置3个重复。

1.10 全血杀伤实验

采集健康成年草鱼全血,用EDTA作抗凝处理,调节菌浓度为 10^5 cfu/mL,菌和全血以1:9体积比混匀后于28℃培养箱静置培养。作用1h后取100 μL 菌-全血混合物,使用无菌PBS 10倍梯度稀释后涂布平板,28℃培养箱中过夜培养,第2天进行菌落计数^[14]。

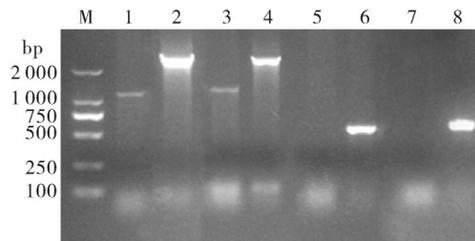
1.11 数据分析

数据处理用 Graphpad Prism 6.0 软件做图,利用 t 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著统计学差异, $P < 0.001$ 为有极显著的统计学差异。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌 F1rBC 双组分系统 $\Delta flrB$ 、 $\Delta flrC$ 缺失株构建

以嗜水气单胞菌 ZYAH72 基因组为模板,通过 $flrB$ 基因外部引物(P1/P4)PCR 扩增,野生型获得大约 2500 bp 产物, $\Delta flrB$ 产物为 1120 bp,通过 $flrB$ 基因内部引物(P5/P6)PCR 扩增,野生型获得 480 bp 产物, $\Delta flrB$ 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 $\Delta flrB$ 缺失株构建成功(图1)。通过 $flrC$ 基因外部引物(P7/P10)PCR 扩增,野生型获得大约 2500 bp 产物, $\Delta flrC$ 产物为 1122 bp,通过 $flrC$ 基因内部引物(P11/P12)PCR 扩增,野生型获得 466 bp 产物, $\Delta flrC$ 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 $\Delta flrC$ 缺失株构建成功(图1)。



M. DNA marker; 2、4、6、8: 野生型 ZYAH72 扩增产物; 1、3、5、7: 缺失株扩增产物; 1-2 和 3-4: 外引物 P1/P4 和 P7/P10 验证; 5-6 和 7-8: 内部引物 P5/P6 和 P11/P12。M. DNA marker; 2、4、6、8 are the amplified products of wild-type ZYAH72; 1、3、5、7 are the amplified products of the mutants; the primers of 1-2 and 3-4 are P1/P4 and P7/P10; the primers of lanes 5-6 and 7-8 are P5/P6 and P11/P12.

图1 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 缺失株 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of mutant strain $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$

2.2 $flrB$ 、 $flrC$ 基因缺失对细菌极生鞭毛合成及游动性的影响

通过透射电镜多视野观察细菌鞭毛发现,野生型 ZYAH72 有单根附着的极生鞭毛, $flrB$ 或 $flrC$ 基因缺失不影响这一表型,在 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 中也均有着生的极生鞭毛(图2A),未观察到鞭毛断裂的现象。半固体培养基检测各菌株游动能力差异,发现野生型 ZYAH72、 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 均有明显扩散,且游动性

没有显著差异,表明 $flrB$ 和 $flrC$ 缺失对于细菌游动性无显著影响(图2B)。

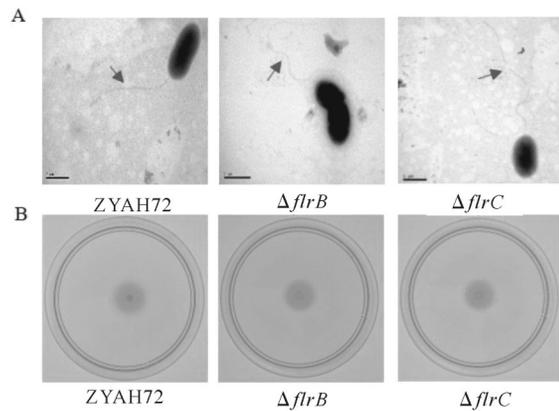


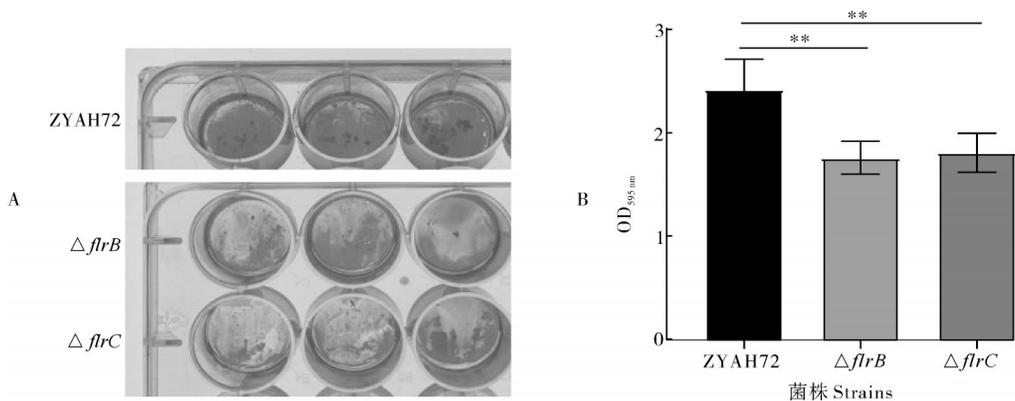
图2 细菌的鞭毛(A)和半固体平板上细菌的游动性(B)
Fig. 2 Bacterial flagella (A) and motility (B) on semi-solid plates

2.3 $flrB$ 、 $flrC$ 基因缺失对细菌生物被膜形成能力影响

通过检测生物被膜的形成果,探究双组分系统 F1rBC 是否参与嗜水气单胞菌生物被膜形成过程。结晶紫染色结果(图3A)显示,与野生株相比, $\Delta flrB$ 的生物被膜形成能力下降了 27.2%, $\Delta flrC$ 的生物被膜形成能力下降了 22.3%(图3B)。这些结果说明双组分系统 F1rBC 参与嗜水气单胞菌的生物被膜形成。

2.4 $flrB$ 、 $flrC$ 基因缺失对嗜水气单胞菌极生鞭毛合成及生物被膜相关基因的影响

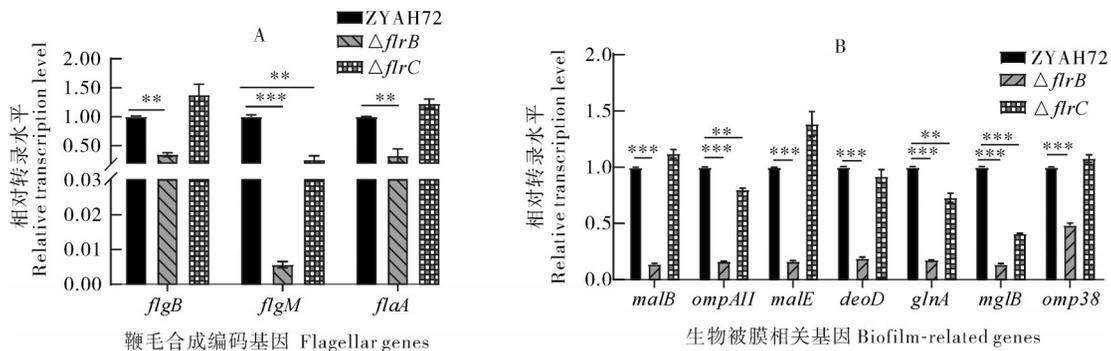
实时荧光定量 PCR 结果显示,与野生型相比, $\Delta flrB$ 中 $flaA$ 、 $flgB$ 、 $flgM$ 的表达水平分别下调了 67%、65.2%、99.4%,而在 $\Delta flrC$ 中只有 $flgM$ 下调了 74.8%(图4A),说明 $flrB$ 和 $flrC$ 的缺失对不同鞭毛合成编码基因影响程度不同。对于生物被膜相关基因表达水平检测发现,与野生型相比, $\Delta flrB$ 中 $malB$ 、 $ompAII$ 、 $malE$ 、 $deoD$ 、 $glnA$ 、 $mglB$ 、 $omp38$ 的表达水平都显著下调,对应为 86.4%、83.9%、84.0%、81.3%、82.8%、86.6%、51.7%,而在 $\Delta flrC$ 中 $malB$ 、 $malE$ 、 $deoD$ 、 $omp38$ 表达水平与野生株相比无差异, $ompAII$ 、 $glnA$ 、 $mglB$ 分别下调了 20.1%、27.1%、59.2%(图4B)。上述结果表明 $flrB$ 和 $flrC$ 基因缺失后对鞭毛组装通路、生物被膜形成相关基因表达都有影响,但对不同的基因调控程度不同, $flrB$ 缺失对上述相关通路基因表达的影响明显强于 $flrC$ 。



ZYAH72:野生型菌株;Δ*flrB*:*flrB*基因缺失株;Δ*flrC*:*flrC*基因缺失株。下同。“**”代表差异极显著, $P<0.01$ 。ZYAH72: Wild type strain; Δ*flrB*: *flrB* deletion strain; Δ*flrC*: *flrC* deletion strain. The same as below. “**” represents significant difference, $P<0.01$.

图3 结晶紫染色法定性(A)和定量(B)检测细菌生物被膜形成($n=3$)

Fig.3 Biofilm formation of qualitative (A) and quantitative (B) detection



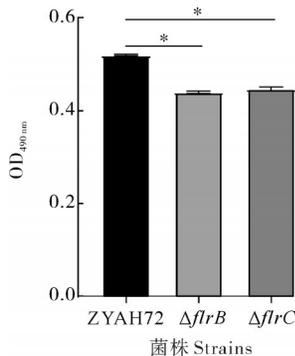
A:不同菌株中鞭毛合成基因*flgB*、*flgM*和*flaA*的表达情况; B:不同菌株中生物被膜基质编码基因*malB*、*ompAII*、*malE*、*deoD*、*glnA*、*mgIB*、*omp38*的表达情况。“**”代表差异显著, $P<0.01$ ，“***”代表差异极显著, $P<0.001$ 。A: The expression of flagellar synthesis genes *flgB*, *flgM* and *flaA* in different strains; B: The expression of biofilm components genes *malB*, *ompAII*, *malE*, *deoD*, *glnA*, *mgIB*, *omp38* in different strains. “**” represents significant difference, $P<0.01$, “***” represents extremely difference, $P<0.001$.

图4 细菌鞭毛合成基因和生物被膜基质编码基因的相对表达变化($n=3$)

Fig.4 Relative expression changes of bacterial flagellar synthesis and biofilm components genes

2.5 *flrB*、*flrC*基因缺失对胞外多糖分泌的影响

通过刚果红吸附实验检测细菌胞外多糖产生量,结果显示,与野生型相比,Δ*flrB*和Δ*flrC*的胞外多糖产生量分别下降了18.4%和14.2%(图5),该



“*”代表有显著差异, $P<0.05$ 。下同。“*” represents a difference, $P<0.05$. The same as below.

图5 细菌鞭毛胞外多糖含量检测($n=3$)

Fig.5 Exopolysaccharide formation test

结果与2.3中Δ*flrB*和Δ*flrC*生物被膜形成量减少的表型相符,表明*flrB*和*flrC*基因缺失后细菌胞外基质中多糖组分减少,从而导致生物被膜形成减少。

2.6 *flrB*、*flrC*基因缺失后对草鱼肾细胞CIK黏附能力影响

与野生株相比,*flrB*基因缺失后细菌对草鱼肾细胞CIK细胞黏附下降了23.2%,*flrC*基因缺失后对草鱼CIK细胞黏附下降了18.2%(图6),表明双组分系统FlrBC参与细胞黏附过程。

2.7 *flrB*、*flrC*基因缺失对嗜水气单胞菌抗全血杀伤中的作用

在抗全血杀伤实验中,野生型在与草鱼全血孵育3.0 h后,细菌数量为起始菌量的22.79倍,而Δ*flrB*、Δ*flrC*被草鱼全血有效杀伤,孵育3.0 h后菌量仅为起始菌量的1.73、2.21倍(图7),表明*flrB*和*flrC*缺失后,细菌抗全血杀伤能力显著下降。

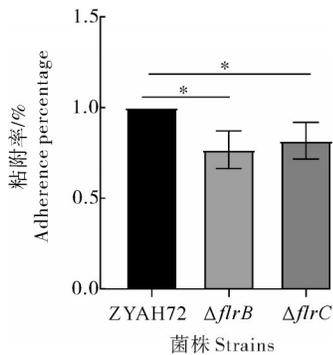
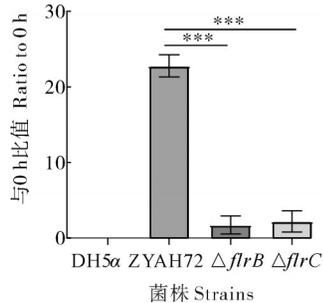


图6 细菌对草鱼肾细胞CIK的黏附能力检测($n=3$)

Fig.6 Detection of bacterial adhesion to CIK cells



DH5α: 大肠杆菌 DH5α; “***”代表差极显著, $P < 0.001$ 。

DH5α: *Escherichia coli* DH5α; “***” represents extremely difference, $P < 0.001$.

图7 抗全血杀伤能力检测($n=3$)

Fig.7 Capacity of anti-whole blood killing assay

3 讨论

本研究成功构建了嗜水气单胞菌双组分系统 FlrBC 基因缺失株 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$, 并基于此初步探究了双组分系统 FlrBC 的功能。鉴于双组分系统 FlrBC 是嗜水气单胞菌极生鞭毛形成中的二级基因, 我们推测其与鞭毛合成有关, 本研究结果表明双组分系统 $flrB$ 或 $flrC$ 单基因缺失并不影响极生鞭毛形成及细菌游动性, 然而参与调控下游鞭毛合成基因表达。该结果与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 相反, 在上述细菌中 FlrBC 对于形成完整极生鞭毛必不可少, 且参与调控多个鞭毛合成基因表达^[15-16]。但我们的结果与奥奈达希瓦氏菌中 FlrBC 对于鞭毛合成调控的结果一致^[17], 表明在细菌不同种属中, 双组分系统 FlrBC 对于鞭毛合成的调控机制存在多样性。为进一步验证这一假设, 可构建 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 互补菌株, 然而在本研究中未能构建成功。

细菌在感染过程面对宿主免疫系统的清除杀伤或是在环境中面临各种胁迫, 建立生物被膜是细菌自我保护最有效的措施之一。据报道, 鞭毛在生物

被膜形成初期和成熟后期中发挥重要作用^[18-19], 鞭毛合成基因突变株的生物被膜形成能力下降^[20], 我们的研究也证实了这一点, 表明双组分系统 FlrBC 作为鞭毛合成基因正调控嗜水气单胞菌生物被膜形成。前人研究证明嗜水气单胞菌生物被膜合成基因包括 *malB*, *ompAII*, *malE*, *deoD*, *glnA*, *mglB*, *omp38*^[11], 我们也证明在基因表达水平上, FlrBC 调控生物被膜合成基因表达, $flrB$ 缺失后大部分生物被膜合成基因 *malB*, *ompAII*, *malE*, *deoD*, *glnA*, *mglB*, *omp38* 表达显著下调, $flrC$ 缺失后 *ompAII*, *mglB* 和 *glnA* 表达显著下调, 表明 FlrB 和 FlrC 对这些基因的调控模式不同, FlrB 对于嗜水气单胞菌生物被膜形成过程的调控作用大于 FlrC。关于生物被膜合成基因研究较少, *OmpAII* 在维氏气单胞菌 (*Aeromonas versonii*) 中被证实是黏附因子^[21], 在大肠杆菌生物被膜形成中过量表达^[22]。*glnA* 基因编码的谷氨酰胺合成酶最近证明影响细菌体外生长和体内定植^[23]。*mglB* 基因编码的半乳糖 ABC 转运蛋白, 影响细菌两极的细胞定位^[24]。在嗜水气单胞中, 这些生物被膜合成基因是否发挥生物被膜形成之外的功能还有待进一步研究。

鞭毛是细菌重要的黏附素, 鞭毛组装通路影响细菌黏附^[25]。CIK 黏附实验结果表明, $flrB$ 、 $flrC$ 缺失后细菌对 CIK 细胞黏附能力显著低于野生株, 这意味着虽然 $flrB$ 和 $flrC$ 对嗜水气单胞菌极生鞭毛合成及游动是非必需的, 但仍然参与嗜水气单胞菌极生鞭毛合成的调控过程。实时荧光定量结果显示, 鞭毛合成基因 *flaA*, *flgB* 和 *flgM* 在 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 中有不同程度的差异表达, 可能导致 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 的细胞黏附能力变化, 其中, $flrB$ 和 $flrC$ 缺失导致 *flgM* 表达下调最多。在香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 中 FlgM 参与调节毒力, *flgM* 在感染石斑鱼过程中表达水平显著上调, *flgM* 基因沉默菌株感染组石斑鱼较野生型感染组死亡延迟、死亡率降低, 脾脏病变减轻, 表明 *flgM* 基因沉默导致香鱼假单胞菌毒力降低, 且转录组测序分析表明, *flgM* 基因沉默菌株感染组石斑鱼较野生型感染组 17 个免疫相关基因差异表达^[26]。本研究中, 抗草鱼全血杀伤结果表明, $flrB$ 和 $flrC$ 基因缺失后嗜水气单胞菌抵抗宿主杀伤能力显著降低, 表明缺失株的毒力下降, 该表型可能与 $\Delta flrB$ 和 $\Delta flrC$ 中 *flgM* 转录下调相关。

综上, 本研究初步探究了嗜水气单胞菌双组分系统 FlrBC 的功能, 发现其对极生鞭毛合成及细菌游

动是非必需的,但影响生物被膜形成和胞外多糖分泌,调控鞭毛合成和生物被膜胞外基质组分相关基因表达,且在细菌黏附和抵抗宿主全血杀伤过程中发挥重要作用,这一结果可为嗜水气单胞菌致病调控机制的解析提供理论依据。

参考文献 References

- [1] RASMUSSEN-IVEY C R, FIGUERAS M J, MCGAREY D, et al. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification[J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 1337 [2022-03-08].<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>.
- [2] SHIRAJUM M M, YUSOFF S M, MOHAMAD A, et al. Vaccination of tilapia against motile *Aeromonas* septicemia: a review [J]. *Journal of aquatic animal health*, 2020, 32(2): 65-76.
- [3] ANJUR N, SABRAN S F, DAUD H M, et al. An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control [J]. *Veterinary world*, 2021, 14(5): 1143-1152.
- [4] ZSCHIEDRICH C P, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction [J]. *Journal of molecular biology*, 2016, 428(19): 3752-3775.
- [5] WILHELM S M, Molero R, SHAW J G, et al. Transcriptional hierarchy of *Aeromonas hydrophila* polar-flagellum genes [J]. *Journal of bacteriology*, 2011, 193(19): 5179-5190.
- [6] GALLEGO-HERNANDEZ A L, DEPAS W H, PARK J H, et al. Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity [J]. *PNAS*, 2020, 117(20): 11010-11017.
- [7] XIE Q, MEI W, YE X, et al. The two-component regulatory system CpxA/R is required for the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* [J/OL]. *Fems microbiology letters*, 2018, 365(22): 218 [2022-03-08].<https://doi.org/10.1093/femsle/fny218>.
- [8] KHAIANCHI B K, KOZLOVA E V, SHA J, et al. The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 259-271.
- [9] 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. MA S L, LI J H, MA Q Q, et al. Functional analysis of two component systems (TCS) EnvZ/OmpR in *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(6): 161-167 (in Chinese with English abstract).
- [10] LI J H, MA S L, LI Z, et al. Construction and characterization of an *Aeromonas hydrophila* multi-gene deletion strain and evaluation of its potential as a live-attenuated vaccine in grass carp [J/OL]. *Vaccines*, 2021, 9(5): 451 [2022-03-08].<https://doi.org/10.3390/vaccines9050451>.
- [11] 王娜.嗜水气单胞菌浮游态和生物被膜状态比较蛋白质组学及相关蛋白特性分析 [D]. 南京:南京农业大学, 2012. WANG N. Comparative proteomic analysis between biofilm and planktonic cells of *Aeromonas hydrophila* characteristics of related proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [12] LINAK 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 (San Diego, Calif.)*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] DUAN Q D, ZHOU M, ZHU X, et al. The flagella of F18ab *Escherichia coli* is a virulence factor that contributes to infection in a IPEC-J2 cell model *in vitro* [J]. *Veterinary microbiology*, 2012, 160(1/2): 132-140.
- [14] CHEN D D, LI J H, YAO Y Y, et al. *Aeromonas hydrophila* suppresses complement pathways via degradation of complement C3 in bony fish by metalloprotease [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2019, 94: 739-745.
- [15] SYED K A, BEYHAN S, CORREA N, et al. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors [J]. *Journal of bacteriology*, 2009, 191(21): 6555-6570.
- [16] DASGUPTA N, WOLFGANG M C, GOODMAN A L, et al. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecular microbiology*, 2003, 50(3): 809-824.
- [17] SHI M, GAO T, JU L, et al. Effects of FlrBC on flagellar biosynthesis of *Shewanella oneidensis* [J]. *Molecular microbiology*, 2014, 93(6): 1269-1283.
- [18] GEORGE O, HEIDI B K, ROBERTO K. Biofilm formation as microbial development [J]. *Annual review of microbiology*, 2000, 54(1): 49-79.
- [19] 孟千琳,凌保东.抗生物被膜感染药物研究进展 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(8): 984-987. MENG Q L, LING B D. Advances in research on anti-infective agents that inhibit biofilm formation [J]. *Journal of pathogen biology*, 2021, 16(8): 984-987 (in Chinese with English abstract).
- [20] KIROV S M, CASTRISIOS M, SHAW J G. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. [J]. *Infection and immunity*, 2004, 72(4): 1939-1945.
- [21] NAMBA A, MANO N, TAKANO H, et al. OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an optimistic pathogen that habituates in carp intestinal tract [J]. *Journal of applied microbiology*, 2008, 105(5): 1441-1451.
- [22] ORME R, DOUGLAS C W I, RIMMER S, et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA [J]. *Proteomics*, 2006, 6(15): 4269-4277.
- [23] HERROU J, MIGNOT T. Dynamic polarity control by a tunable protein oscillator in bacteria [J]. *Current opinion in cell biology*, 2020, 62: 54-60.
- [24] GUAN Y, YIN K, ZHOU M, et al. EsrB negatively regulates expression of the glutamine synthetase GlnA in the fish pathogen *Edwardsiella piscicida* [J/OL]. *FEMS microbiology letters*, 2018, 365(4): 7 [2022-03-08].<https://doi.org/10.1093/femsle/fny007>.
- [25] 王路.鞭毛组装通路和细菌趋化通路在溶藻弧菌黏附中的作用 [D]. 厦门:集美大学, 2016. WANG L. The roles of flagellar assembly pathway and bacterial chemotaxis pathway in the adher-

ence of *Vibrio alginolyticus* [D]. Xiamen: Jimei University, 2016 (in Chinese with English abstract).
[26] SUN Y, ZHUANG Z, WANG X, et al. Dual RNA-seq reveals

the effect of the *flgM* gene of *Pseudomonas plecoglossicida* on the immune response of *epinephelus coioides* [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2019, 87: 515-523.

Functional analysis of two-component system FlrBC in *Aeromonas hydrophila*

MA Qianqian¹, ZHOU Yang^{1,2,3}, ZHANG Yongan^{1,2,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510542, China;
3. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Wuhan 430070, China

Abstract The two-component system (TCS) FlrBC mutant strains $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ were constructed via homologous recombination using *Aeromonas hydrophila* ZYAH72 as the wild-type strain. Then, differences in polar-flagellum synthesis, swimming motility, biofilm formation, exopolysaccharide secretion, adhesion ability and the resistance against whole-blood killing of the above strains were compared to investigate the function of FlrBC in *A. hydrophila*. The results showed that similar to the wild-type strain, both $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ could form polar flagellum, and there was no significant difference in swimming motility. However, crystal violet staining test revealed that the biofilm formation capacity of $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ decreased by 27.2% and 22.3%, respectively. The result of Congo red test showed that compared with the wild-type strain, the exopolysaccharide secretion of $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ decreased by 18.4% and 14.2%, respectively. The qRT-PCR results showed that the deletion of *flrB* and *flrC* inhibited the gene expression of flagellar synthesis and biofilm-related pathway. After co-incubation with grass carp CIK cells, the adhesion rate of $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ decreased by 23.2% and 18.2% respectively compared with the wild-type strain. The results of whole blood killing assay showed that the ability of $\Delta flrB$ and $\Delta flrC$ to resist whole blood killing was significantly reduced. The above results show that TCS FlrBC is not required for the formation of polar flagella in *A. hydrophila*, but plays a regulatory role in bacterial flagella assembly and biofilm formation, and affects the pathogenicity of *A. hydrophila*.

Keywords *Aeromonas hydrophila*; two-component system FlrBC; polar flagellum; swimming motility; biofilm; exopolysaccharide; cell adhesion; whole blood killing

(责任编辑:边书京)