

刘芳园,胡瑞雪,余芳,等.外膜蛋白OmpA在蛙源米尔伊丽莎白菌致病性中的功能[J].华中农业大学学报,2024,43(1):203-209.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.023

外膜蛋白OmpA在蛙源米尔伊丽莎白菌致病性中的功能

刘芳园,胡瑞雪,余芳,侯家昊,于子润,顾泽茂

华中农业大学水产学院/湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心/
农业农村部水生动物疫病专业实验室(华中农业大学),武汉430070

摘要 为探究外膜蛋白A(outer membrane protein A, OmpA)对米尔伊丽莎白菌致病作用的影响,以蛙源米尔伊丽莎白菌FL160902为研究对象,通过同源重组法构建OmpA缺失株 $\Delta ompA$,比较缺失株和野生株的生长特性、生物膜形成能力、抗血清杀伤能力、对细胞的黏附能力以及对蛙的致病性差异。结果显示: $\Delta ompA$ 的生长能力和抗血清杀伤能力与野生株无显著差异;但与野生株相比, $\Delta ompA$ 的生物膜形成能力增加了66%, $\Delta ompA$ 对bEnd.3细胞的黏附能力降低了61%;黑斑蛙感染试验显示, $\Delta ompA$ 在黑斑蛙血液、脾和脑组织中的载菌量分别为 $(3.15 \times 10^8 \pm 0.09 \times 10^8)$ 、 $(2.11 \times 10^8 \pm 0.07 \times 10^8)$ 和 $(6.61 \times 10^8 \pm 0.16 \times 10^8)$ copies/g,均显著低于野生株,且 $\Delta ompA$ 对黑斑蛙的致死率为37%,显著低于野生株的致死率(75%)。上述结果表明,*ompA*基因缺失不改变米尔伊丽莎白菌的抗血清杀伤能力,但增加了菌株的生物膜形成能力,减弱了菌株的黏附能力,从而降低了该菌对蛙的致病性。

关键词 米尔伊丽莎白菌;基因缺失;外膜蛋白A;致病性

中图分类号 S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0203-07

牛蛙(*Rana catesbeiana*)、棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)、黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculata*)等蛙类在我国分布比较广泛,因其肉质鲜美、营养丰富、经济价值高,我国于20世纪80年代开始了人工养殖^[1-2]。经过40多年的发展,蛙类的养殖模式和养殖技术逐渐成熟,蛙类饲料已经专业化^[3]。近年来,牛蛙和黑斑蛙养殖在我国长江以南地区呈现集约化、规模化、智慧化,养殖密度和产量均较高。据不完全统计,2021年,我国蛙类年产量为17.5万t,总产值超过千亿,不仅为人们提供了优质蛋白,还有力促进了农村经济发展^[4]。然而,蛙类养殖业在快速发展的过程中,其病害问题十分严重,尤其在成蛙养殖时,“歪头病”已经成为制约产业健康发展的瓶颈因素^[5-6]。“歪头病”是蛙类脑膜炎败血症的俗称,其病原是米尔伊丽莎白菌(*Elizabethkingia miricola*)^[7]。

米尔伊丽莎白菌是一种革兰氏阴性短杆菌,隶

属于黄杆菌目(Flavobacteriales)、威克斯氏菌科(Weeksellaceae)、伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*)^[8],该菌可感染蛙的脑组织,造成神经损伤^[9-10]。目前,米尔伊丽莎白菌对蛙的致病机制尚不清楚,挖掘该菌重要的毒力因子,解析其关键致病功能,对蛙类“歪头病”的防控及健康养殖具有重要意义。有学者从该菌的基因组序列中预测到了一些毒力因子,包括外膜蛋白、荚膜多糖、分泌系统蛋白和调控相关因子等^[11],但这些毒力因子在该菌中的功能尚未得到验证。

外膜蛋白A(outer membrane protein A, OmpA)是革兰氏阴性菌外膜蛋白的重要组成部分,参与维持细菌结构的完整性^[12],在细菌致病性方面发挥着重要的作用^[13]。研究发现,禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*)的OmpA缺失后,菌株对脑微血管内皮细胞的黏附和侵袭能力分别下降了约37%和43%,且在宿主脑组织中的定殖能力

收稿日期:2022-11-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32202990);湖北省农业科技创新中心(2021-620-000-001-33);湖北省自然科学基金项目(2021CFB128);中国博士后科学基金项目(2021M701351)

刘芳园,E-mail:liufangyuan@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:顾泽茂,E-mail:guzemao@mail.hzau.edu.cn

下降了67%，由此可见，OmpA影响细菌对宿主的黏附和侵袭能力，进而影响其致病力^[14]。鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的OmpA能与宿主的补体调节因子H结合，阻断宿主补体系统的旁路途径，细菌逃避宿主的免疫杀伤并在体内大量繁殖，进而引发感染^[15]。目前，OmpA在米尔伊丽莎白菌致病过程中的功能尚不清楚。本研究以蛙源米尔伊丽莎白菌FL160902为研究对象，利用同源重组法构建OmpA缺失株 $\Delta ompA$ ，分析 $\Delta ompA$ 的生物学特性及致病性，以期明确OmpA在米尔伊丽莎白菌致病性中的功能，为解析米尔伊丽莎白菌的致病机制奠定基础，也为蛙类“歪头病”防控药物和弱毒疫苗的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞系

米尔伊丽莎白菌FL160902株为本研究所用野生型菌株(wild type strain, WT)^[9]，由笔者所在实验室保存。大肠杆菌S17-1 λ pir感受态细胞购自唯地生物公司。自杀质粒pRE112由中国科学院水生生物研究所谢海侠研究员惠赠，质粒pSAM-Spc-Amp-RpsLpro由华中农业大学周祖涛副教授惠赠。小鼠脑微血管内皮细胞bEnd.3细胞系由笔者所在实验室保存并传代。

1.2 试剂和引物

细菌基因组DNA提取试剂盒、质粒中提试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司；PCR产物回收试剂盒购自美国Omega公司； $2 \times A8$ FastHiFi PCR MasterMix购自北京艾德莱生物科技有限公司；限制性内切酶Sac I、Xba I和DNA marker均购自宝生物工程(大连)有限公司；Uniclone One Step Seamless Cloning Kit购自北京金沙生物科技有限公司；胎牛血清(FBS)和DMEM培养基购自Gibco公司；氨苄青霉素(Amp)、壮观霉素(Spc)、氯霉素(Cm)，均购自Biosharp公司；脑心浸液培养基(BHI)购自美国OXOID公司；琼脂粉购自德国Biofrox公司。引物(表1)由武汉擎科生物科技有限公司合成。

1.3 米尔伊丽莎白菌缺失株 $\Delta ompA$ 的构建

参照文献^[16]描述的方法，参考GenBank中米尔伊丽莎白菌FL160902株全基因组(NZ_CP040516.1)序列，以米尔伊丽莎白菌FL160902株基因组DNA为模板，扩增ompA(gene-3180)基因左右同源臂，以质粒pSAM-Spc-Amp-RpsLpro为模

表1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequence
<i>ompA</i> -left-F	CATGAATTCCTCCGGGAGAGCTCCATTCCG-GTTGCAGCTGTT
<i>ompA</i> -left-R	CAGAAGACGGCATAACGAACTCTGAGCT-GTTGATAC
<i>ompA</i> -right-F	AGAGTAGGGAAGCTGCCAGGCGAAGAA-CAGAAGGGTAG
<i>ompA</i> -right-R	CGATCCCAAGCTTCTTCTAGAAT-CAAATCCTGGGAAGCTGC
<i>ompA</i> -F	GTTTCCTTACCTGAATCCG
<i>ompA</i> -R	GCAGCCAAAGGATTATCC
<i>ompA</i> -check-F	TCTGAACGATATATGCC
<i>ompA</i> -check-R	GAAATCGGTATAGCAACG
<i>Spc</i> -F	TTCGTATGCCGTCTTCTG
<i>Spc</i> -R	CTGGCAGTTCCCTACTCT
<i>ureG</i> -F	TCTGGAAAACGTGCTGCTAA
<i>ureG</i> -R	TGTGGGTTCTGGTAAAAGTGC
<i>PNGase F</i> -F	GACAGGATCTGGGTCTGGTA
<i>PNGase F</i> -R	CTTTGGCTGCTTCTCTCC

板，扩增壮观霉素基因(*Spc*)片段，扩增引物如表1。将ompA基因左右同源臂和壮观霉素基因片段连接到自杀质粒pRE112，转化到大肠杆菌S17-1 λ pir。将含有重组质粒的大肠杆菌S17-1 λ pir作为供体菌，米尔伊丽莎白菌FL160902作为受体菌，进行接合转移。具体操作如下：将供体菌和受体菌分别培养至对数生长期，两者混合后用10 mmol/L MgSO₄洗涤3次，将混合菌液滴于贴有硝酸纤维素膜的BHI平板，37℃培养18~24 h后，用BHI液体培养基洗下膜上的菌苔，涂布于100 μ g/mL Spc、100 μ g/mL Amp和34 μ g/mL Cm的BHI平板，37℃培养36~48 h。挑取平板上的单菌落于BHI液体培养基传代后，涂布于10%蔗糖的BHI平板上，37℃培养36~48 h，对平板上的菌落进行PCR验证。

1.4 野生株与 $\Delta ompA$ 生长能力的测定

将野生株和 $\Delta ompA$ 接种于BHI液体培养基中，37℃ 200 r/min震荡培养过夜，调整各菌液OD₆₀₀为0.8左右，菌液以1:100接种至BHI液体培养基，涡旋混匀细菌悬浮液，取200 μ L细菌悬浮液加入到灭菌的96孔板中，用微生物生长曲线全自动检测系统FLUOstar Omega测定，设置程序：温度37℃，连续振荡，每1 h测定1次OD₆₀₀，连续培养24 h。每个样品3个平行，试验独立重复3次。

1.5 野生株与 $\Delta ompA$ 生物被膜形成能力的测定

参照文献^[17]描述的方法，将野生株和 $\Delta ompA$

分别接种于BHI液体培养基中,37℃ 200 r/min震荡培养过夜,调整各菌液OD₆₀₀为1.0左右。菌液分别按1:100接种于BHI液体培养基,吸取200 μL细菌悬浮液加入96孔细胞培养板,置于37℃恒温培养箱中培养48 h。将孔内菌液吸弃,用无菌PBS洗涤3次,0.5%结晶紫溶液常温染色30 min,再用无菌PBS洗涤3次,常温下风干,最后每孔加入100 μL 95%乙醇,用多功能酶标仪测定OD₅₉₀。每个样品5个平行,重复3次。

1.6 野生株与 $\Delta ompA$ 抗血清杀伤能力的测定

参照文献[18]描述的方法,从健康蛙心脏处采血,血液在4℃条件下静置过夜后离心取血清,过0.22 μm滤膜除菌,即为正常血清(normal serum, NS)。取NS置于56℃水浴30 min以灭活补体,即为灭活血清(heat-inactivated serum, HS)。调整野生株和 $\Delta ompA$ 菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,分别取100 μL NS和HS加入到1.5 mL离心管中,加入100 μL菌液后混匀,使血清体积分数为50%,将混合物置于37℃培养箱静置培养1 h后置于冰上10 min终止反应,用无菌PBS倍比稀释混合物,将稀释液涂布于BHI平板,37℃培养过夜后记录菌落数。存活率=NS中存活的菌落数/HS中存活的菌落数 $\times 100\%$,试验重复3次。

1.7 野生株与 $\Delta ompA$ 对细胞的黏附试验

参照文献[19]描述的方法,将小鼠脑微血管内皮细胞bEnd.3于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养至细胞长势良好且大致铺满6孔细胞培养板,用无抗生素的DMEM洗涤bEnd.3细胞3次后待用。调节野生株和 $\Delta ompA$ 浓度为 1×10^8 CFU/mL,取100 μL各菌液和PBS(作为阴性对照)分别加入6孔细胞培养板中,37℃条件下孵育1.5 h,用无菌的PBS清洗3~4次,每孔加入1 mL 1% Triton X-100裂解细胞,裂解30 min后,将细胞裂解物10倍倍比稀释后涂平板,37℃培养24~36 h,之后进行菌落计数。每个样品设置2个平行孔,试验重复3次。

1.8 黑斑蛙人工感染试验

试验所用黑斑蛙购自湖北省潜江市黑斑蛙养殖基地,黑斑蛙个体质量为(30 \pm 0.5) g,暂养于华中农业大学淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心。暂养1周后开始人工感染试验,用野生株和 $\Delta ompA$ 感染黑斑蛙后,分别测定黑斑蛙的组织载菌量和存活率。组织载菌量测定试验共3组,分别为野生株组、

$\Delta ompA$ 组和对照组PBS组,每组15只蛙,攻毒途径为下肢肌肉注射,攻毒所用各菌液浓度均为 1×10^8 CFU/mL,剂量为200 μL。攻毒5 d后,每组随机抽取3只发病蛙,在无菌条件下进行解剖,从心脏处抽取血液,并称量相同质量的脾脏和脑组织,将血液和各组织按照试剂盒进行组织基因组DNA提取,以提取的各组织基因组DNA为模板,按照笔者所在实验室前期建立的米尔伊丽莎白菌RT-qPCR定量检测方法进行计数^[20],所有样本进行3次重复。黑斑蛙存活率测定试验同样分为3组(野生株组、 $\Delta ompA$ 组、PBS组),感染方法同上,感染后持续观察14 d,记录每天蛙死亡的数据。

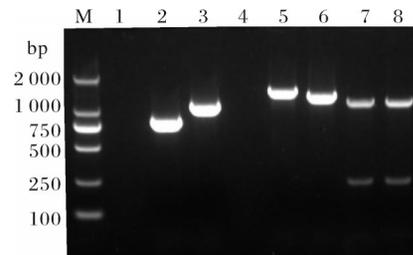
1.9 数据分析

试验数据均表示为平均值 \pm 标准差(mean \pm SD),采用GraphPad Prism软件对数据进行处理,利用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示有显著差异。

2 结果与分析

2.1 米尔伊丽莎白菌缺失株 $\Delta ompA$ 的构建与验证

如图1所示,对 $\Delta ompA$ 进行PCR鉴定,用 $ompA$ 基因内部引物($ompA$ -F/R)进行PCR扩增, $\Delta ompA$ 无法获得扩增产物,野生株获得约800 bp产物;用 Spc 基因引物(Spc -F/R)进行PCR扩增, $\Delta ompA$ 获得约1 200 bp产物,野生株无法获得扩增产物;用 $ompA$ 基因外部引物($ompA$ -check-F/R)进行PCR扩增, $\Delta ompA$ 获得的扩增产物与野生株相差约300



M: DL2 000 DNA marker; 1、3、5、7: 缺失株扩增产物; 2、4、6、8: 野生株扩增产物; 1~2: $ompA$ 基因内部引物 $ompA$ -F/R 验证; 3~4: Spc 基因引物 Spc -F/R 验证; 5~6: $ompA$ 基因外部引物 $ompA$ -check-F/R 验证; 7~8: 米尔伊丽莎白菌双重 PCR 鉴定。M: DL2 000 DNA marker; 1, 3, 5, 7: Amplified products of the mutant; 2, 4, 6, 8: Amplified products of wild-type strain; 1-2: Primers of $ompA$ -F/R; 3-4: Primers of Spc -F/R; 5-6: Primers of $ompA$ -check-F/R; 7-8: Primers of duplex PCR of *E. miricola*.

图1 缺失株 $\Delta ompA$ 的PCR鉴定

Fig.1 Identification of the $ompA$ mutant strain by PCR

bp;用双重PCR引物 *ureG*-F/R、*PNGase F*-F/R进行扩增, $\Delta ompA$ 获得约250和1200 bp产物,野生株为阳性对照,证明 $\Delta ompA$ 为米尔伊丽莎白菌,上述PCR产物测序结果正确。将 $\Delta ompA$ 在BHI平板上连续传10代,用上述引物对每代缺失株进行PCR鉴定,未发现回复突变。上述结果表明,缺失株 $\Delta ompA$ 构建成功。

2.2 *ompA* 基因缺失对菌株生长能力的影响

如图2所示,在37℃条件下,野生株和 $\Delta ompA$ 均在6 h左右进入对数生长期,17 h左右进入生长稳定期, $\Delta ompA$ 的生长速度与野生株相比无显著差异 ($P>0.05$),表明 *ompA* 基因缺失不改变米尔伊丽莎白菌的生长能力。

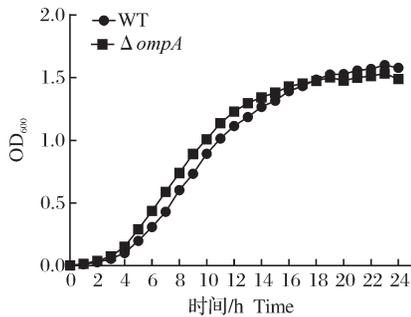


图2 野生株和缺失株 $\Delta ompA$ 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of the wild-type strain and mutant strain $\Delta ompA$

2.3 *ompA* 基因缺失对菌株生物膜形成能力的影响

通过结晶紫染色法测定米尔伊丽莎白菌生物膜的形成量,OD值代表乙醇脱色液的吸光值,OD值越高,表明被结晶紫染色的生物膜含量越高。由图3可见,在48 h时,野生株组的OD₅₉₀值为0.215±0.001, $\Delta ompA$ 组的OD₅₉₀值为0.638±0.038, $\Delta ompA$ 的生物膜形成能力较野生株增加了66%,表明 *OmpA* 参与负调控米尔伊丽莎白菌生物膜的形成。

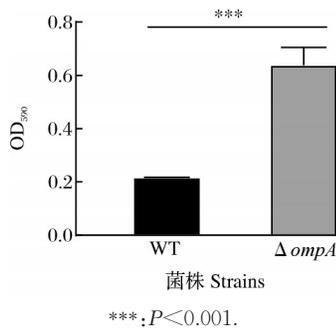


图3 野生株和缺失株 $\Delta ompA$ 的生物膜形成能力

Fig.3 Biofilm formation capacities of the wild-type strain and mutant strain $\Delta ompA$

2.4 *ompA* 基因缺失对菌株抗血清杀伤能力的影响

如图4所示,在50%的血清中作用后,野生株的存活率为(84.52±4.95)%, $\Delta ompA$ 的存活率为(79.55±6.01)%, $\Delta ompA$ 的存活率略低于与野生株,但无显著差异 ($P>0.05$),表明 *ompA* 基因缺失不改变米尔伊丽莎白菌的抗血清杀伤能力。

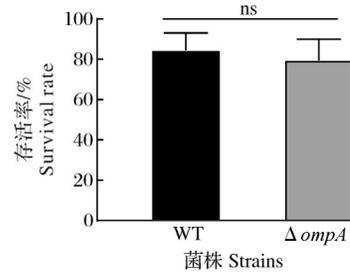


图4 野生株和缺失株 $\Delta ompA$ 在50%血清中的存活能力

Fig.4 Survival rate of the wild-type strain and mutant strain $\Delta ompA$ in 50% serum

2.5 *ompA* 基因缺失对菌株细胞黏附作用的影响

如图5所示,黏附bEnd.3细胞的野生株和 $\Delta ompA$ 的浓度分别为(7.33×10⁴±0.67×10⁴)、(2.83×10⁴±0.60×10⁴) CFU/mL, $\Delta ompA$ 黏附bEnd.3细胞能力较野生株下降了61%,表明 *ompA* 基因缺失导致米尔伊丽莎白菌对细胞的黏附能力显著下降。

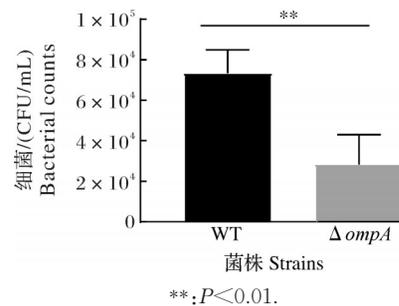


图5 野生株和缺失株 $\Delta ompA$ 黏附bEnd.3细胞能力

Fig.5 Adherence abilities of the wild-type strain and mutant strain $\Delta ompA$

2.6 *ompA* 基因缺失对菌株致病力的影响

用野生株和 $\Delta ompA$ 感染黑斑蛙,检测黑斑蛙的组织载菌量和存活率。结果如图6所示,感染5 d后,野生株在黑斑蛙血液、脾和脑组织中的载菌量分别为(3.47×10⁸±0.06×10⁸)、(3.47×10⁸±0.06×10⁸)和(7.72×10⁸±0.14×10⁸) copies/g, $\Delta ompA$ 在黑斑蛙血液、脾和脑组织中的载菌量分别为(3.15×10⁸±0.09×10⁸)、(2.11×10⁸±0.07×10⁸)和(6.61×10⁸±0.16×10⁸) copies/g, $\Delta ompA$ 在黑斑蛙上述各组织中的载菌量较野生株显著下降 ($P<0.05$)。如图7所

示,感染 14 d 后,野生株和 $\Delta ompA$ 对黑斑蛙的致死率分别为 75% 和 37%。上述结果表明 *ompA* 基因缺

失降低了米尔伊丽莎白菌在黑斑蛙组织中的定殖能力,且 $\Delta ompA$ 对黑斑蛙的致病力显著减弱。

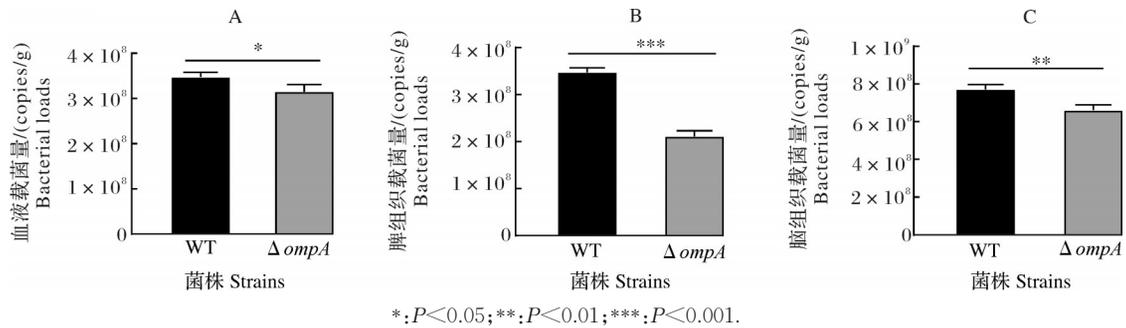


图6 感染后黑斑蛙血液(A)、脾(B)和脑组织(C)中载菌量

Fig.6 Bacterial loads in blood (A), spleen (B) and brain (C) of infected frogs

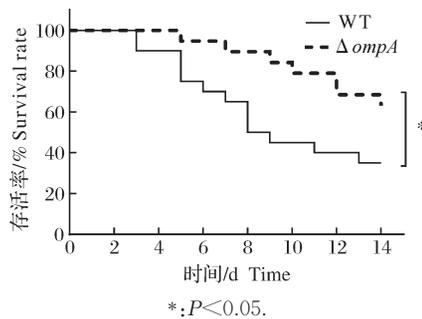


图7 黑斑蛙感染野生株和缺失株 $\Delta ompA$ 后的存活率

Fig.7 Survival rate of frogs infected with the wild-type strain and mutant strain $\Delta ompA$

3 讨论

本研究成功构建了蛙源米尔伊丽莎白菌 OmpA 缺失株 $\Delta ompA$, 并基于此初步探究了 OmpA 在米尔伊丽莎白菌致病性中的功能。我们发现 OmpA 不影响米尔伊丽莎白菌的生长特性, 排除菌株生长特性差异对后续 OmpA 致病功能研究结果的影响。

米尔伊丽莎白菌能形成生物膜, 附着在基质的表面, 帮助细菌抵抗抗菌药物和宿主免疫杀伤, 是该菌存活力和致病性的重要体现^[21-22]。然而, 目前调控该菌生物膜形成的机制尚不清楚。本研究中, 我们发现 *ompA* 基因缺失导致米尔伊丽莎白菌生物膜形成能力增加了 66%, 这表明 OmpA 负调控该菌的生物膜形成, 这与大肠杆菌中 OmpA 增加菌株生物膜形成能力的结果相反^[23]。我们推测米尔伊丽莎白菌的 OmpA 可能直接调控该菌生物膜形成相关基因, 也有可能通过某种调控系统间接调控该菌生物膜的形成, 其具体的调控机制有待进一步研究。

米尔伊丽莎白菌黏附宿主细胞是引发感染的第一步, 也是该菌定殖机体, 从而发挥其致病作用的前

提^[24]。研究证实, 在细菌感染早期, OmpA 能协助细菌通过不同的受体黏附于宿主细胞^[13], 如大肠杆菌的 OmpA 通过结合宿主脑微血管内皮细胞的受体 Ecgp, 介导细菌的黏附作用^[25]。本研究中, 我们利用小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 评价 OmpA 对于米尔伊丽莎白菌黏附能力的影响, 结果显示, *ompA* 基因缺失导致菌株对细胞的黏附能力下降了 61%。目前, OmpA 参与调控米尔伊丽莎白菌黏附能力的机制还未知, 我们推测, 该菌的 OmpA 可能作为一种潜在的黏附因子, 靶向宿主细胞特定的受体蛋白, 协助细菌黏附宿主细胞, 进而引发感染。

我们通过黑斑蛙感染模型进一步评估了 OmpA 对米尔伊丽莎白菌致病力的影响。结果显示, 野生株和 $\Delta ompA$ 感染黑斑蛙后, $\Delta ompA$ 在黑斑蛙血液、脾、脑组织中的载菌量较野生株显著下降, 且 $\Delta ompA$ 对黑斑蛙的致死率显著低于野生株, 这表明在米尔伊丽莎白菌致病过程中, *ompA* 基因缺失降低了该菌在宿主体内的定殖能力, 导致该菌致病性减弱。本研究结果与副溶血弧菌中 OmpA 的研究结果类似, 在副溶血弧菌中, *ompA* 基因缺失株在小鼠各脏器中的定殖能力下降, 且对小鼠的致死率显著降低^[26]。然而, 目前尚无稳定的伊丽莎白菌基因回补体系, 无法验证 OmpA 的致病调控作用, 对 OmpA 致病调控机制的研究还需进一步挖掘和验证。

综上, 本研究初步探究了 OmpA 在米尔伊丽莎白菌致病性中的功能, 发现 OmpA 负调控米尔伊丽莎白菌的生物膜形成, 不改变细菌的抗血清杀伤能力, 但是参与调控了细菌的黏附能力, 影响了其致病性, 表明 OmpA 为米尔伊丽莎白菌重要的毒力因子, 这是目前该菌中首个被验证的毒力因子, 本研究结

果可为米尔伊丽莎白菌致病机制的研究及“歪头病”防控策略的制定提供新的思路。

参考文献References

- [1] 蓝蔚青,杜金涛,刘大勇,等.3种养殖蛙类肌肉基本营养成分分析[J].广东海洋大学学报,2022,42(2):142-147.LAN W Q,DU J T,LIU D Y,et al.Analysis of the basic nutrient composition of muscle in three species of cultured frogs[J].Journal of Guangdong Ocean University,2022,42(2):142-147 (in Chinese with English abstract).
- [2] 刘焕亮.中国养殖的两栖动物生物学研究进展[J].大连水产学院学报,2004,19(2):120-125.LIU H L.The advancement of biological research in amphibian culture in China[J].Journal of Dalian Fisheries University,2004,19(2):120-125 (in Chinese with English abstract).
- [3] 李兴华,涂军明,陈展鹏,等.稻蛙绿色种养模式研究及其可持续发展策略[J].农学学报,2020,10(12):98-103.LI X H,TU J M,CHEN Z P,et al.Rice-frog planting and raising mode and its sustainable development strategy[J].Journal of agriculture,2020,10(12):98-103 (in Chinese with English abstract).
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会.中国渔业统计年鉴-2022[M].北京:中国农业出版社,2022.Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook [M].Beijing:China Agriculture Press,2022 (in Chinese).
- [5] 李巧玲,吴新仪,姜维,等.蛙类病害与防治研究进展[J].丽水学院学报,2018,40(5):7-11.LI Q L,WU X Y,JIANG W,et al.Research progress of frog diseases and their control[J].Journal of Lishui University,2018,40(5):7-11 (in Chinese with English abstract).
- [6] TRIMPERT J,EICHHORN I,VLADIMIROVA D,et al.*Elizabethkingia miricola* infection in multiple anuran species [J]. Transboundary and emerging diseases,2021,68(2):931-940.
- [7] 胡瑞雪.蛙源伊丽莎白菌的鉴定、分子流行病学及其碳青霉烯酶多样性研究 [D].武汉:华中农业大学,2020.HU R X. Identification, molecular epidemiology and diversity of carbapenemases in *Elizabethkingia* sp. from frog [D].Wuhan: Huazhong Agricultural University,2020 (in Chinese with English abstract).
- [8] NICHOLSON A C,GULVIK C A,WHITNEY A M,et al. Revisiting the taxonomy of the genus *Elizabethkingia* using whole-genome sequencing, optical mapping, and MALDI-TOF, along with proposal of three novel *Elizabethkingia* species:*Elizabethkingia bruuniana* sp.nov,*Elizabethkingia ursingii* sp. nov, and *Elizabethkingia occulta* sp. nov. [J]. Antonie van leeuwenhoek,2018,111(1):55-72.
- [9] HU R X,YUAN J F,MENG Y,et al.Pathogenic *Elizabethkingia miricola* infection in cultured black-spotted frogs, China, 2016 [J]. Emerging infectious diseases,2017,23(12):2055-2059.
- [10] HUANG X L,FENG Y,TANG H,et al.Candidate animal disease model of *Elizabethkingia* spp.infection in humans, based on the systematic pathology and oxidative damage caused by *E.miricola* in *Pelophylax nigromaculatus* [J/OL]. Oxidative medicine and cellular longevity,2019,2019:6407524 [2022-11-22]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31641424/.DOI:10.1155/2019/6407524.
- [11] LIANG C Y,YANG C H,LAI C H,et al.Comparative genomics of 86 whole-genome sequences in the six species of the *Elizabethkingia* genus reveals intraspecific and interspecific divergence [J/OL].Scientific reports,2019,9:19167 [2022-11-22].https://doi.org/10.1038/s41598-019-55795-3.
- [12] SMITH S G J,MAHON V,LAMBERT M A,et al.A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression [J].FEMS microbiology letters,2007,273(1):1-11.
- [13] CONFER A W,AYALEW S.The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity [J].Veterinary microbiology,2013,163(3/4):207-222.
- [14] 许姝.禽致脑膜炎型大肠杆菌外膜蛋白 OmpA 突破血脑屏障致病机制的研究 [D].扬州:扬州大学,2020.XU S.Pathogenic mechanism of OmpA from avian pathogenic *Escherichia coli* for blood-brain barrier breakthrough [D].Yangzhou: Yangzhou University,2020 (in Chinese with English abstract).
- [15] KIM S W,CHOI C H,MOON D C,et al.Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins [J]. FEMS microbiology letters,2009,301(2):224-231.
- [16] 周小进.鸭疫里默氏杆菌特异性单克隆抗体的研制以及生物被膜和 OmpA 缺失株的研究 [D].扬州:扬州大学,2010.ZHOU X J.Preparation of monoclonal antibody against *Riemerella anatipestifer* and the study of bacterial biofilm and OmpA gene deletion [D].Yangzhou: Yangzhou University,2010 (in Chinese with English abstract).
- [17] PUAH S M,FONG S P,KEE B P,et al.Molecular identification and biofilm-forming ability of *Elizabethkingia* species [J/OL]. Microbial pathogenesis,2022,162:105345 [2022-11-22].https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105345.
- [18] 王湘如.副猪嗜血杆菌毒力因子筛选和 *capD* 基因功能研究及致脑膜炎大肠杆菌突破血脑屏障的分子机制研究 [D].武汉:华中农业大学,2014.WANG X R.Identification of the putative virulence factors and functional study of the *capD* gene in *Haemophilus parasuis*, and the molecular mechanism study of meningitis-causing *Escherichia coli* penetration of the blood brain barrier [D].Wuhan: Huazhong Agricultural University,2014 (in Chinese with English abstract).
- [19] HU Q H,HAN X G,ZHOU X J,et al.OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer* [J].Veterinary microbiology,

- 2011, 150(3/4): 278-283.
- [20] 张琦. 米尔伊丽莎白菌快速分子检测方法的建立与应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. ZHANG Q. Establishment and application of rapid molecular diagnostic method for detecting *Elizabethkingia miricola* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [21] BELAS R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria[J]. Trends in microbiology, 2014, 22(9): 517-527.
- [22] HU S H, LÜ Y, XU H, et al. Biofilm formation and antibiotic sensitivity in *Elizabethkingia anophelis* [J/OL]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2022, 12: 953780 [2022-11-22]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.953780>.
- [23] MA Q, WOOD T K. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system[J]. Environmental microbiology, 2009, 11(10): 2735-2746.
- [24] RIBET D, COSSART P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues [J]. Microbes and infection, 2015, 17(3): 173-183.
- [25] PRASADARAO N V. Identification of *Escherichia coli* outer membrane protein A receptor on human brain microvascular endothelial cells [J]. Infection and immunity, 2002, 70 (8): 4556-4563.
- [26] 白雪瑞, 王权, 陈永军, 等. 副溶血弧菌 *ompA* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 902-910. BAI X R, WANG Q, CHEN Y J, et al. Biological characteristics and pathogenicity of an *ompA* mutant of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 902-910 (in Chinese with English abstract).

Function of outer membrane protein A in pathogenicity of *Elizabethkingia miricola* from frog

LIU Fangyuan, HU Ruixue, YU Fang, HOU Jiahao, YU Zirun, GU Zemao

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Hubei Engineering Technology

Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention/

National Aquatic Animal Diseases Para-Reference Laboratory (HZAU), Wuhan 430070, China

Abstract To study the role of outer membrane protein A (OmpA) in the pathogenicity of *Elizabethkingia miricola*, the *ompA* gene mutant strain ($\Delta ompA$) was constructed via homologous recombination using *E. miricola* FL160902 as the wild type strain. Subsequently, the growth characteristics, biofilm formation, serum survival ability, adhesion ability, bacterial colonization of the wild strain and $\Delta ompA$, as well as their pathogenicity to frogs were analyzed. The results showed that there was no significant difference in growth characteristics and survive ability in frog serum between $\Delta ompA$ and wild strain. However, compared with the wild strain, the biofilm formation capacity of $\Delta ompA$ increased by 66%, and the adhesion capacity of $\Delta ompA$ to bEnd.3 cells decreased by 61%. The results of animal experiment showed that the average bacterial load of $\Delta ompA$ in the blood, spleen and brain of infected frogs were ($3.15 \times 10^8 \pm 0.09 \times 10^8$), ($2.11 \times 10^8 \pm 0.07 \times 10^8$) and ($6.61 \times 10^8 \pm 0.16 \times 10^8$) copies/g, respectively, which were significantly lower than that of the wild strain infected frogs ($P < 0.05$), and the lethality rate of frogs infected with $\Delta ompA$ was 37%, which was significantly lower than that of the wild strain (75%). The results indicated that *ompA* deletion did not change the antiserum killing ability of *E. miricola*, but increased the biofilm forming ability of *E. miricola*, reduced its adhesion ability and decreased its pathogenicity to frogs.

Keywords *Elizabethkingia miricola*; gene deletion; outer membrane protein A; pathogenicity

(责任编辑:边书京)