

马天雨,石富强,刘欣,等.N-乙酰转移酶对罗非鱼无乳链球菌毒力相关特性的影响[J].华中农业大学学报,2024,43(6):289-296.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.06.028

## N-乙酰转移酶对罗非鱼无乳链球菌毒力相关特性的影响

马天雨<sup>1</sup>,石富强<sup>1</sup>,刘欣<sup>1</sup>,张永安<sup>1,2</sup>,曾辉<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学水产学院/湖北洪山实验室,武汉 430070;

2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室,广州 510642

**摘要** 为阐明N-乙酰转移酶(NAT)在无乳链球菌致病过程中的作用,利用同源重组法构建野生株HN016的*nat*基因缺失株 $\Delta nat$ ,并比较野生株和缺失株的生长、形态、黏附入侵细胞能力、抗吞噬能力、全血存活能力和致病力。结果显示, $\Delta nat$ 的溶血能力降低,并且*nat*缺失导致无乳链球菌对罗非鱼脑细胞的黏附和入侵能力下降,并增加了细菌对血液杀伤和吞噬细胞吞噬的敏感性。罗非鱼感染试验结果显示,*nat*基因缺失株 $\Delta nat$ ( $2 \times 10^8$  CFU/尾,致死率为36%)对罗非鱼的致死力显著低于野生株HN016( $2 \times 10^8$  CFU/尾,致死率为85%)。罗非鱼感染12 h后,与野生对照株相比, $\Delta nat$ 突变株在血液、脾脏和脑组织中载菌量显著降低。研究表明,N-乙酰转移酶参与无乳链球菌抵抗宿主血液和吞噬细胞的清除,并协助细菌对罗非鱼组织的入侵和定植。

**关键词** 无乳链球菌; N-乙酰转移酶; 基因缺失; 生物学特性; 罗非鱼

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)06-0289-08

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一种革兰氏染色呈紫色的链状球菌,又称B族链球菌(group B streptococcus, GBS)。近年来,无乳链球菌已成为水生环境中的主要病原体之一,能感染许多养殖鱼类,导致败血症和脑膜炎<sup>[1]</sup>,给养殖业尤其是罗非鱼(*Oreochromis* spp.)养殖业造成了巨大的经济损失。

细菌发挥致病作用的前提是能够响应宿主体内微环境的变化,而这种响应依赖于蛋白翻译后的修饰<sup>[2]</sup>。乙酰化修饰是蛋白翻译后修饰中最保守的方式之一。乙酰化可以调节RcsB蛋白的活性,从而影响大肠杆菌(*Escherichia coli*)在酸胁迫下的存活和鞭毛合成<sup>[3]</sup>。乙酰化的过程需要乙酰转移酶的参与,乙酰转移酶可以催化乙酰基从乙酰辅酶A转移到底物,并通过催化底物的乙酰化,协调细菌的各种生物过程<sup>[7]</sup>。已鉴定的乙酰转移酶被分为3个家族,分别为GCN5 (general control non-repressed 5 protein, GCN5)、CBP/p300 (cyclic-AMP response binding protein-binding protein, CBP)和MYST (Moz,

Ybf2, Sas2和Tip60, MYST),其中GCN5家族乙酰转移酶是细菌中最主要的乙酰转移酶<sup>[5]</sup>。GNAT (GCN5-related N-acetyltransferase, GNAT)将乙酰辅酶A的乙酰基转移到蛋白质的N-氨基上,因此称为N-乙酰转移酶。

N-乙酰转移酶在细菌耐药性和代谢等多种生理活动中发挥重要作用。例如,在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中,具有N-乙酰转移酶活性的Eis蛋白可以通过乙酰化修饰氨基糖苷类抗生素,从而削弱其与核糖体的结合,导致耐药性<sup>[6]</sup>;在炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)中,N-乙酰转移酶可以乙酰化和灭活链霉素,导致细菌抵抗链霉素的抑制和杀灭<sup>[7]</sup>;在牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)中,N-乙酰转移酶能够调节牙龈痛蛋白酶的激活和成熟<sup>[8]</sup>。目前,在链球菌中关于乙酰转移酶的研究并不多见。已报道的相关研究包括氯霉素乙酰转移酶CAT可以赋予粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和A族链球菌氯霉素抗性,并且将CAT基因重组到质粒上用于科学研究<sup>[9]</sup>;由无乳链球菌的*neuD*基因

收稿日期:2023-08-17

基金项目:武汉市知识创新专项-基础研究项目(2023020201010103);中央高校基本科研业务费专项(2662023PY021);国家现代农业产业技术体系专项(CARS-46);国家自然科学基金面上项目(32173015);岭南现代农业实验室科研项目(NT2021008)

马天雨, E-mail: legenyu@163.com

通信作者: 曾辉, E-mail: huizeng@mail.hzau.edu.cn

编码的O-乙酰转移酶是细菌荚膜多糖唾液酸所必需的<sup>[10]</sup>,而无乳链球菌中的N-乙酰转移酶尚未见报道。

本研究构建无乳链球菌 *nat* 基因缺失株,探究该基因缺失对细菌溶血能力、全血存活能力、黏附入侵能力、抗吞噬能力、组织定植能力以及对罗非鱼致死率的影响,以期阐明N-乙酰转移酶在无乳链球菌致病过程中的作用,促进对无乳链球菌致病机制的了解。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、细胞和试剂

无乳链球菌野生株HN016分离自广东省某养殖场患脑膜炎的罗非鱼。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 购自北京全式金生物技术有限公司。温敏型自杀载体pSET4s由华中农业大学周洋教授惠赠。TiB细胞是一种来自罗非鱼大脑的成纤维细胞系,由佛山科学技术学院曾伟伟教授赠送。小鼠单核细胞巨噬细胞(RAW264.7)由笔者所在实验室保存并传代。

DNA聚合酶混合液、核酸Marker、限制性核酸内切酶、核酸连接酶、pMD9-T载体、反转录试剂盒和荧光定量PCR酶混合物购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取、琼脂糖凝胶核酸回收和原核生物的RNA提取试剂盒购自Tiangen公司;DL-苏氨酸购自Invitrogen公司;蔗糖、磷酸氢二钾、氢氧化钾和甘油购自国药集团化学试剂有限公司;革兰氏染色试剂盒和PBS(磷酸盐缓冲液)购自Solarbio公司;麻醉剂MS-222购自Macklin公司;药敏片购自杭州微生物有限公司;壮观霉素(spectinomycin, Spc)购自德国Biofroxx公司;胎牛血清和DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基购自Gibco公司;THB(Todd-Hewitt broth)和LB(Luria-Bertani broth)培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

### 1.2 菌株及细胞的培养

无乳链球菌在THB或含1.5%(*m/V*)琼脂的THB培养基中培养,温度为37℃。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 在LB或含1.5%(*m/V*)琼脂的LB培养基上生长,温度为37℃。必要时将壮观霉素加入固体培养基或肉汤中,终质量浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。小鼠单核细胞巨噬细胞(RAW264.7)在37℃、5%二氧化碳条件下用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。罗非鱼脑细胞系(TiB)在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,培养温度为28℃。

### 1.3 $\Delta nat$ 缺失株的构建

1)基因缺失质粒的构建。以HN016基因组为模板,分别用目的基因上游引物和下游引物扩增上下游同源臂。用融合PCR的方法将2个同源片段连接,再与pMD19-T载体连接测序,之后用相应的限制性内切酶酶切后克隆至质粒pSET4s的合适位置,采用热击方法转入大肠杆菌感受态细胞中,提取质粒备用。

2)感受态细胞的制备。将过夜培养菌液按1:100转接至THY(含40 mmol/L DL-苏氨酸的THB)培养液中,37℃,180 r/min培养至OD<sub>600nm</sub>为0.4~0.6;冰浴30 min后,12 000 r/min,4℃离心10 min收集菌体;用EB缓冲溶液(10%蔗糖、2 mmol/L磷酸氢二钾)重悬细菌,同上离心;再用超纯水洗2次,之后用15%甘油溶液重悬细菌,洗2次。最后用15%甘油重悬菌体,按每管80~100  $\mu\text{L}$ 分装,于-80℃冻存待用。

3)电转化。将该菌的感受态细胞与基因缺失质粒以体积比10:1混合(质粒最终的剂量控制在1  $\mu\text{g}$ )后加到电转化杯中,冰上放置0.5 h。电转化时,仪器设置:电压2.35 kV/cm、电阻200  $\Omega$ 和电容25  $\mu\text{F}$ 。电转化结束后立即将1 mL复苏液加入电击杯中。将电转化后的无乳链球菌在28℃和180 r/min振荡培养3 h,然后加入壮观霉素至终质量浓度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,继续培养过夜。

4)缺失株的筛选。将培养过夜的菌液涂布在固体THB培养基上,直至长出单克隆。挑取单克隆接种至含有100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的THB液体培养基中。之后,在不含抗生素的THB培养液中,28℃、180 r/min连续传代培养,在温度和抗性的双重选择下促使重组缺失质粒与基因组上具有相同序列的基因片段发生同源重组。将传代后的菌液梯度稀释后涂在含有壮观霉素抗性和无抗性的THB平板过夜培养。当无抗性的平板上长的菌落明显多于抗性平板时挑选无抗性平板上的菌落,用缺失基因的内部引物和上下游同源臂引物进行PCR筛选。

5)缺失株的验证。用同源臂引物PCR扩增疑似缺失株相应片段,并通过DNA胶回收试剂盒纯化PCR产物,测序,测序结果只含有缺失基因上下游片段,则说明缺失株构建成功。另外,将培养至对数生长期的无乳链球菌野生株和缺失株进行RNA的提取,用DNase I去除基因组DNA干扰。用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。使用SYBR premix

Ex Taq™ Kit, 采用说明书两步法 qRT-PCR 检测目的基因的 mRNA 水平, 以 16S rRNA 基因作为内参。所用引物见表 1, 均由北京擎科生物公司合成。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析 mRNA 水平的差异<sup>[11]</sup>。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	功能 Function
<i>nat</i> -A	CCCGGGGCATAGTCTGTGCTTTTCAG	<i>nat</i> 上游同源臂
<i>nat</i> -B	GTGAGTTAGACACATGATTATCAAAGTGGATTAGTGAACATGG	<i>nat</i> upstream fragment
<i>nat</i> -C	CCATGTTCACTAATCCACTTTGATAATCATGTGTCTAACTCAC	<i>nat</i> 下游同源臂
<i>nat</i> -D	GTCGACGTCGGTACAACAAGTGTGAC	<i>nat</i> downstream fragment
<i>nat</i> -F	AAAGTGGATTAGTGAACATGG	<i>nat</i> 内部序列
<i>nat</i> -R	GATAATCATGTGTCTAACTCAC	<i>nat</i> internal fragment
<i>nat</i> -qF	CCACAGCCAATAATCTCATCTC	<i>nat</i> 序列用于 qRT-PCR
<i>nat</i> -qR	TGATACAGCATATTCAGACCCTC	<i>nat</i> fragment for qRT-PCR
16S-qF	CGACGATACATAGCCGACCT	内参基因用于 qRT-PCR
16S-qR	CCGTCCTTGGTAGATTTTCC	Reference gene for qRT-PCR
Up-F	TCGTTAAGCGACTAGATGCG	<i>nat</i> 上游基因用于 qRT-PCR
Up-R	CGTTACAAAAGGTGATCGGAC	<i>nat</i> upstream fragment for qRT-PCR
Down-F	AATCACAGGACCACCAAAGC	<i>nat</i> 下游基因用于 qRT-PCR
Down-R	CTTGATGAGCCGACAAATGAC	<i>nat</i> downstream fragment for qRT-PCR

#### 1.4 表型测定

1) 生长曲线。将过夜培养的菌液按 1:100 稀释到新鲜的 THB 培养基中, 培养至对数中期 ( $OD_{600\text{ nm}}=0.4\sim 0.5$ )。培养物在新鲜的 THB 培养基中稀释至  $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.1。取稀释后的培养物 200  $\mu\text{L}$  至 96 孔微孔板中, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育, 每小时摇动 10 s 后测量  $OD_{600\text{ nm}}$  值, 设置 4 个技术重复。根据重复的平均值绘制  $OD_{600\text{ nm}}$  随时间的变化曲线图。

2) 溶血性。将过夜培养的细菌划线接种于血平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 48 h, 使其形成明显溶血圈, 观察溶血情况并拍照。

3) 革兰氏染色。先涂片固定, 草酸铵结晶紫染 1 min, 蒸馏水冲洗; 再加碘液覆盖涂面染约 1 min, 水洗, 用吸水纸吸去水分; 再加 95% 乙醇数滴, 轻轻摇动脱色, 20 s 后水洗, 吸去水分; 番红染色液染 1 min 后用蒸馏水冲洗; 干燥, 镜检。

#### 1.5 全血存活试验

试验参照文献[12]描述的方法, 并有所修改。在罗非鱼的尾静脉取血, 立即加入 0.1% 肝素钠, 备用。准备好已经生长到对数期的无乳链球菌, 稀释至合适浓度加到血液中, 控制细菌最终的浓度为  $1\times 10^3$  CFU/mL, 将混合液置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱并保持微翻转。分别于 0 和 1.5 h 取一定量的混合液, 涂布到 THB 固体培养平板上, 记录长出的菌落数。

#### 1.6 黏附和入侵试验

试验参照文献[12]描述的方法, 并有所修改。

1) 黏附试验。用 0.25% 胰酶处理单层 TiB 细胞后, 显微镜观察并计算细胞数量, 再加入到 24 孔细胞培养板培养。无乳链球菌野生株 HN016 和缺失株培养至对数期 ( $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.6), 洗菌液 3 次, 调整到浓度为  $4\times 10^6$  CFU/mL, 将菌液加入细胞孔 (复合感染比  $\text{MOI}=10$ ), 低速离心后将细胞板放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 1 h。取出后用 PBS 缓冲液洗 3~5 次, 再加入纯水裂解细胞并进行平板计数菌落数。黏附率是衡量细菌黏附细胞的一个重要指标, 黏附率 (裂解后菌落数量/加入细菌数量) 越高说明细菌黏附细胞的能力越强。

2) 入侵试验。方法同黏附试验, 不同的是 PBS 洗涤后, 需加入青霉素 G 至终质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 继续培养细胞 1 h。入侵率是衡量细菌侵入细胞的一个重要指标, 入侵率 (裂解后菌落数量/加入细菌数量) 越高说明细菌侵入细胞的能力越强。

#### 1.7 抗吞噬试验

试验参照文献[12]描述的方法。RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 营养液在 5%  $\text{CO}_2$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下传代培养, 以  $4\times 10^5$  细胞/孔传代至 24 孔板上, 形成单层贴壁细胞。以  $\text{MOI}$  为 10, 即  $4\times 10^6$  细胞/孔的细菌悬液感染 RAW264.7 细胞。接种

后将24孔板在室温下1 000 r/min离心15 min使细菌与细胞充分接触。24孔板置37 °C、5% CO<sub>2</sub>作用1 h。用PBS洗3~5遍,每孔加入1 mL含100 μg/mL庆大霉素和5 μg/mL青霉素的DMEM,以彻底清除巨噬细胞外残余细菌。加入抗生素1 h后用无菌PBS清洗2遍再加入去离子水裂解细胞。将该裂解液梯度稀释后涂平板计数菌落数。吞噬率是衡量细菌抵抗吞噬的一个重要指标,吞噬率(裂解后菌落数量/加入细菌数量)越低说明细菌抗吞噬的能力越强。

### 1.8 致死率试验

试验参照文献[12]描述的方法,并有所修改。试验用罗非鱼均购自广东粤强丰水产养殖场,体重(10±1) g,于实验室暂养2周后进行相关试验。通过2次离心收集对数后期的细菌,并用PBS重悬,备用。将120尾鱼随机分为3组(野生株组、突变株组和对照组),每组40尾。对照组注射无菌PBS 0.1 mL,试验组罗非鱼用90 mg/L的MS-222麻醉后腹腔注射0.1 mL细菌悬液(每尾鱼注射2×10<sup>8</sup> CFU)。对被注射感染的鱼进行监测,连续14 d,从所有死鱼的脑组织中重新分离出细菌并进行鉴定。试验重复2次。

### 1.9 组织载菌量试验

试验参照文献[19]描述的方法,并有所修改。将20尾鱼随机分为2组,每组10尾。分别腹腔注射野生株HN016和突变株,每尾鱼注射2×10<sup>8</sup> CFU。麻醉的处理方法同本文“材料与方法1.8”。感染后12 h,采集脑、脾脏和血液样本,称测各组织质量。匀

浆后用PBS连续稀释至10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-5</sup>和10<sup>-6</sup>进行平板计数。计数时选取菌落数在30~300的平板。

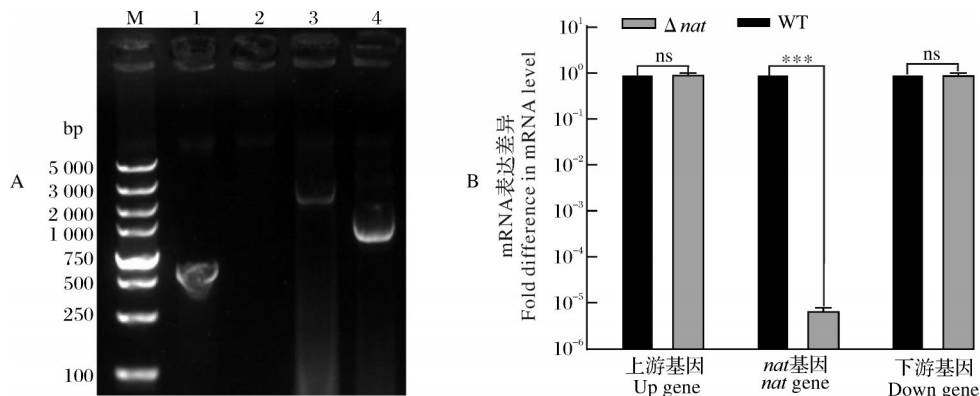
### 1.10 数据处理

采用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。除了特殊说明,所有试验均进行3次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 无乳链球菌 *nat* 基因缺失株的构建

如图1A所示,用*nat*基因内部引物(*nat*-F/*nat*-R)进行PCR扩增,以缺失株Δ*nat*基因组为模板,无法获得扩增产物,以野生株HN016基因组为模板能获得约500 bp的产物;以*nat*基因外部引物(*nat*-A/*nat*-D)进行PCR扩增,以缺失株Δ*nat*基因组为模板,PCR扩增产物大小为上下游同源臂的大小之和约1 000 bp,而以野生株HN016基因组为模板,PCR扩增产物大小为上下游同源臂加*nat*基因长度约2 200 bp。结果表明缺失株Δ*nat*构建成功。用qRT-PCR检测*nat*基因mRNA的表达水平,结果(图1B)显示,*nat*基因的mRNA在野生菌株中正常表达,而在缺失株Δ*nat*中未检测到表达;另外,用qRT-PCR检测*nat*基因的上游基因(SAHN016\_RS06510)和下游基因(SAHN016\_RS06520)的mRNA表达水平,结果(图1B)显示在缺失株Δ*nat*和野生株HN016中*nat*上下游基因的mRNA表达水平没有显



A. Δ*nat*缺失株PCR验证电泳图。M: DNA marker; 1,3:野生株扩增结果;2,4:Δ*nat*缺失株扩增结果;1-2使用外部引物*nat*-A/*nat*-D,3-4使用内部引物*nat*-F/*nat*-R。B. 缺失株qRT-PCR验证。ns:无差异。A. PCR validation of the deletion strain. M: DNA marker; 1,3: Amplification of wild strain; 2,4: Amplification of deletion strain; 1-2: Primers of *nat*-A/*nat*-D; 3-4: Primers of *nat*-F/*nat*-R. B. qRT-PCR validation of the deletion strain. ns: No difference.

图1 Δ*nat*缺失株验证

Fig. 1 Verification of the deletion strain Δ*nat*

著差异。因此, *nat* 基因缺失不影响上下游基因的表达。

## 2.2 *nat* 基因缺失对无乳链球菌生长特性、菌落形态和溶血能力的影响

如图 2A 所示, 缺失株  $\Delta nat$  和野生株 HN016 均在 2 h 左右进入对数生长期, 4 h 左右进入平台期, 表

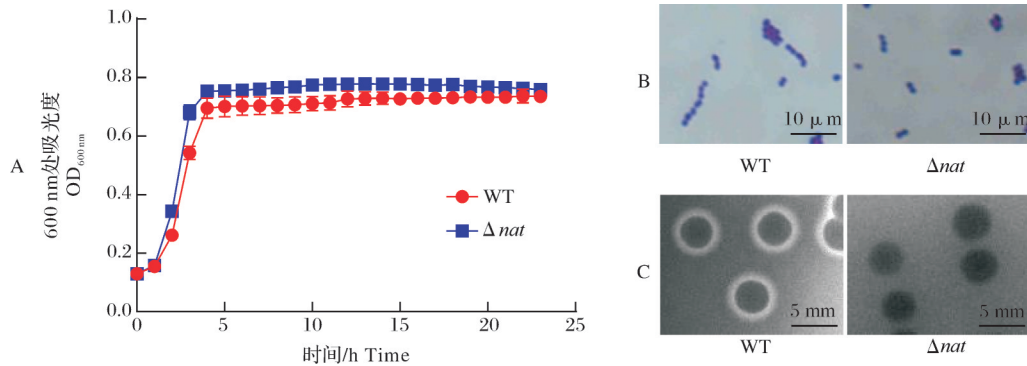


图 2  $\Delta nat$  和野生株的生长曲线(A)、革兰氏染色(B)和溶血性(C)

Fig. 2 Growth curve (A), Gram stain (B), and hemolytic (C) of  $\Delta nat$  and wild type

## 2.3 *nat* 基因缺失对无乳链球菌在血液中生存能力的影响

如图 3 所示, 与罗非鱼全血孵育 1.5 h 后, 野生株 HN016 增长了 14.6 倍, 缺失株  $\Delta nat$  增长了 11.9 倍,  $\Delta nat$  在血液中的生存能力显著弱于野生株 HN016。说明 *nat* 基因缺失显著降低无乳链球菌在罗非鱼全血中的生存能力。

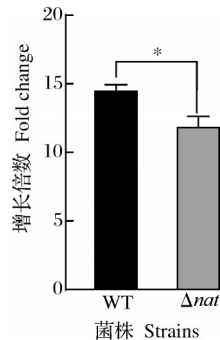


图 3  $\Delta nat$  和野生株在罗非鱼全血中生存能力

Fig. 3 Survival of  $\Delta nat$  and wild type in whole blood of tilapia

## 2.4 *nat* 基因缺失对无乳链球菌黏附和入侵罗非鱼脑细胞能力的影响

如图 4A 所示, 野生型 HN016 对 TiB 细胞的入侵率为 0.8%, 缺失株  $\Delta nat$  对 TiB 细胞的入侵率为 0.19%,  $\Delta nat$  的入侵率比野生型下降了 75.6% (图 4A)。如图 4B 所示, 野生型 HN016 对 TiB 细胞的黏附率为 24.1%, 缺失株  $\Delta nat$  对 TiB 细胞的黏附率为 13.8%,  $\Delta nat$  对 TiB 细胞的黏附性下降了 42.7% (图

明缺失株  $\Delta nat$  和野生株 HN016 生长无显著差异, 这表明 *nat* 基因缺失不影响细菌生长。同时革兰氏染色结果也表明基因缺失不影响细菌革兰氏染色 (图 2B)。另外通过比较缺失株  $\Delta nat$  和野生株 HN016 在血平板上的溶血环, *nat* 基因缺失使无乳链球菌的溶血能力减弱 (图 2C)。

4B)。这些结果表明 *nat* 基因缺失显著降低无乳链球菌黏附和入侵罗非鱼细胞的能力。

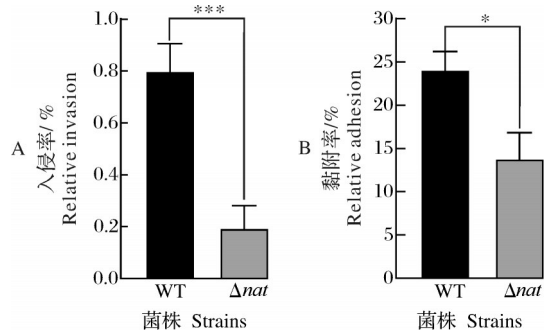


图 4  $\Delta nat$  和野生株对罗非鱼脑细胞的黏附(A)和入侵能力(B)

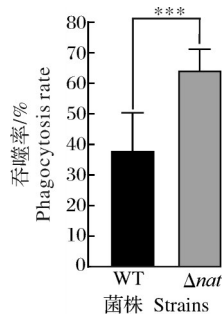
Fig. 4 Adhesion(A) and invasion ability(B) of  $\Delta nat$  and wild type to tilapia brain cells

## 2.5 *nat* 基因缺失对无乳链球菌抗吞噬能力的影响

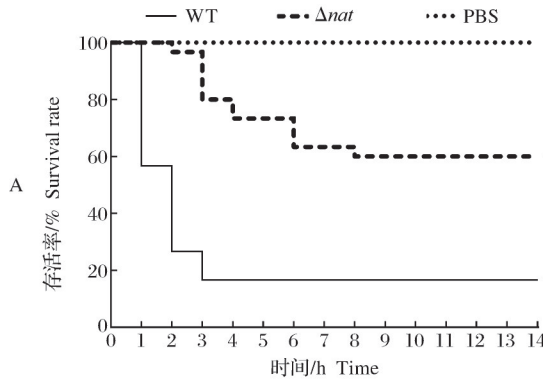
用 RAW264.7 评价  $\Delta nat$  的抗吞噬能力, 突变株  $\Delta nat$  和野生株 HN016 的吞噬率分别为 64.5% 和 38.2%,  $\Delta nat$  比 HN016 更容易被吞噬 (图 5)。结果表明,  $\Delta nat$  对 RAW264.7 的吞噬作用更敏感, *nat* 基因缺失显著降低无乳链球菌对巨噬细胞吞噬作用的抗性。

## 2.6 *nat* 基因缺失对无乳链球菌致病力的影响

对培养至对数期的野生株和缺失株以  $2 \times 10^8$  CFU/尾的剂量, 腹腔注射的方式攻毒罗非鱼, 并在之后的 14 d 内观察存活情况。结果如图 6 所示,

图5  $\Delta nat$ 和野生株的抗吞噬能力Fig. 5 Evaluation of anti-phagocytosis ability of  $\Delta nat$  and wild type

HN016感染罗非鱼3 d内可造成85%死亡率,第4~14天内没有出现死鱼。 $\Delta nat$ 感染罗非鱼8 d后造成36%罗非鱼死亡,第8~14天内没有出现死鱼。PBS



对照组在试验周期内并没有造成罗非鱼的死亡。感染HN016的罗非鱼表现出典型的出眼症、角膜混浊、鳃帽下缘出血等症状,而感染 $\Delta nat$ 的罗非鱼症状较轻或无明显症状(图6B)。这些结果表明 $nat$ 基因缺失显著降低了无乳链球菌的致病力。

## 2.7 缺失株 $\Delta nat$ 感染组织载菌量的变化

如图7所示,罗非鱼感染野生株12 h后,脑、脾脏和血液载菌量分别为 $4.81 \times 10^5$ 、 $3.77 \times 10^7$ 和 $4.5 \times 10^6$  CFU/mg,感染突变株 $\Delta nat$ 后,脑、脾脏和血液载菌量分别为 $3 \times 10^4$ 、 $2.86 \times 10^6$ 和 $2.6 \times 10^4$  CFU/mg(图7), $\Delta nat$ 感染后的组织载菌量较野生株显著下降,其中在大脑减少93.8%,在脾脏减少92.4%,在血液中减少了99.4%。这些结果进一步表明 $nat$ 基因缺失降低了无乳链球菌毒力。

蓝色箭头指示眼睛突出和角膜混浊,红色箭头指示鳃帽下缘出血。Blue arrow indicates eye protrusion and corneal opacity, and red arrow indicates hemorrhage at the lower margin of the branchial cap.

图6 感染突变株和野生株后罗非鱼存活曲线(A)和症状(B)

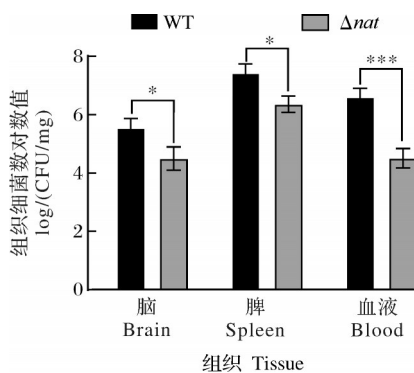
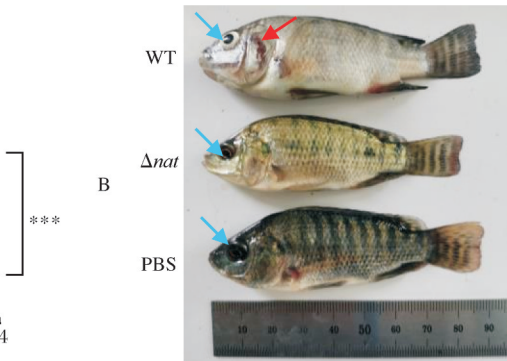
Fig. 6 Tilapia survival curves (A) and symptoms (B) after infection with  $\Delta nat$  and wild type

图7 罗非鱼组织载菌量

Fig. 7 Tissue bacterial load in tilapia

## 3 讨论

本研究通过同源重组构建了无乳链球菌 $nat$ 基因缺失菌株,发现与野生株相比, $\Delta nat$ 的革兰氏染色和在培养基中的生长无明显差异,表明 $nat$ 基因缺失



对细菌生长和形态的影响不大。但 $nat$ 缺失明显削弱细菌在全血中的存活能力,表明 $nat$ 基因有助于无乳链球菌在血液中生存。溶血性试验结果表明, $nat$ 基因的缺失导致了无乳链球菌溶血能力减弱,这与大肠杆菌中的乙酰转移酶缺失的表型一致<sup>[13]</sup>,大肠杆菌中的溶血素需要乙酰化才能发挥溶血活性,这表明 $nat$ 基因的缺失,可能导致了溶血素不能被乙酰化,最终导致无乳链球菌溶血性降低。荚膜多糖是细菌关键毒力因子,对细菌在血液中存活至关重要<sup>[14]</sup>。在大肠杆菌中,乙酰化的荚膜多糖可以使细菌逃避血液的杀伤,避免宿主的免疫防御<sup>[15]</sup>。因此,我们推测 $nat$ 缺失导致无乳链球菌在血液中生存能力的下降可能是因为细菌荚膜多糖不能被乙酰化修饰,这还需要进一步的实验验证。

脑膜炎是无乳链球菌感染最常见的临床综合征,细菌导致脑膜炎需要黏附和入侵脑细胞。本研

究利用罗非鱼大脑成纤维细胞 TiB 评估基因缺失对细菌黏附入侵能力的影响。结果显示  $\Delta nat$  黏附和入侵 TiB 的比率远低于野生株,表明 *nat* 基因参与无乳链球菌入侵大脑过程。与上述结果相似, CheY 也是一种乙酰化蛋白, Yao 等<sup>[16]</sup>的研究表明 CheY 促进单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 与上皮细胞的初步黏附并有助于单增李斯特菌对上皮细胞的入侵。插入沉默空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 的 *cheY* 基因可导致该细菌获得较高的体外黏附和入侵能力,但无法在体内定植和引起疾病<sup>[11]</sup>。抵抗吞噬细胞吞噬是无乳链球菌发挥致病作用的关键,因此我们还探究了 *nat* 缺失对无乳链球菌抗 RAW264.7 吞噬能力的影响,结果表明缺失株对吞噬细胞的敏感性显著增加。这说明致病菌的乙酰转移酶在抗吞噬过程中发挥重要作用。

黏附和入侵减少以及吞噬敏感性增加是否会导致无乳链球菌对罗非鱼致病力的降低? 为了回答这个问题,我们利用罗非鱼感染模型验证了缺失株和野生株对罗非鱼的致死率和在器官中的定植能力。当使用  $2 \times 10^8$  CFU/尾的剂量攻毒罗非鱼时,野生株死亡率为 85%,而 *nat* 基因缺失株仅为 36%,同时感染野生株的罗非鱼死亡速度更快,在感染最初的 2 d 发生集中性大量死亡,但缺失株没有发生集中性死亡,表明 *nat* 基因缺失导致无乳链球菌对罗非鱼致死率发生明显下降。为了更全面地了解细菌致病力,我们采集了受感染罗非鱼的脾脏、血液和大脑,并统计了不同组织和血液中的细菌载量。结果显示缺失株在器官和血液中的载量均低于野生株,表明 *nat* 基因的缺失导致无乳链球菌更容易被免疫系统清除,血液和脾脏中的细菌密度显著降低可以证明这一点。而在大脑中观察到的细菌密度的减少再次证明  $\Delta nat$  进入大脑的能力受损。由此可见, *nat* 基因表达的 N-乙酰转移酶是无乳链球菌关键毒力因子, *nat* 基因缺失导致无乳链球菌毒力减弱。乙酰转移酶介导的乙酰化修饰可调节多种细菌毒力。在沙门氏菌中,乙酰转移酶可以通过乙酰化调控 PhoP 的活性,而 PhoP 是细菌毒力的重要转录调节因子,因此,推测乙酰转移酶具有调控细菌毒力的功能<sup>[17]</sup>。在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中, *kdsA* 基因产物被乙酰化,参与脂多糖的生物合成,是铜绿假单胞菌毒力所必需的<sup>[18]</sup>。因此,我们推测  $\Delta nat$  毒力的减弱可能是细菌中某些毒力因子乙酰化程度降低导致的,需要进一步进行实验验证。

综上,本研究初步探究了无乳链球菌 N-乙酰转移酶的功能,发现 N-乙酰转移酶参与无乳链球菌通过血液运输并感染罗非鱼器官的过程,并且能够协助无乳链球菌抵抗吞噬细胞和血液的清除,最终导致无乳链球菌对罗非鱼的高致病力。这一结果阐明了 N-乙酰转移酶在无乳链球菌中的作用,为进一步探索无乳链球菌致病机制提供了理论依据。本研究中,我们成功地以 HN016 的基因组为模板, PCR 扩增并纯化出 *nat* 基因片段,并通过尝试酶切酶连或者重叠 PCR 的方法将 *nat* 基因连接到回补质粒 pSET4s 上,但是,目前我们还没有获得正确的回补质粒,后续会继续尝试获得回补株,并检测回补株的表型和毒力。

## 参考文献 References

- [1] CHEN M, LI L P, WANG R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. *Veterinary microbiology*, 2012, 159 (3/4): 526-530.
- [2] 陆雨星. 氨基酸小分子变构调控 ACT-GNAT 型乙酰转移酶功能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2017. LU Y X. Study on the function of ACT-GNAT acetyltransferase regulated by amino acid small molecule allosteric regulation[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [3] CASTAÑO-CEREZO S, BERNAL V, POST H, et al. Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli* [J/OL]. *Molecular systems biology*, 2014, 10 (11): 762 [2023-08-17]. <https://doi.org/10.15252/msb.20145227>.
- [4] SHIRMAST P, GHAFORI S M, IRWIN R M, et al. Structural characterization of a GNAT family acetyltransferase from *Elizabethkingia anophelis* bound to acetyl-CoA reveals a new dimeric interface [J/OL]. *Scientific reports*, 2021, 11 (1): 1274 [2023-08-17]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79649-5>.
- [5] BERNDSEN C E, DENU J M. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases [J]. *Current opinion in structural biology*, 2008, 18 (6): 682-689.
- [6] CHEN W J, BISWAS T, PORTER V R, et al. Unusual region versatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB [J]. *PNAS*, 2011, 108 (24): 9804-9808.
- [7] BURCKHARDT R M, ESCALANTE-SEMERENA J C. Insights into the function of the N-acetyltransferase SatA that detoxifies streptothricin in *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis* [J/OL]. *Applied and environmental microbiology*, 2019, 85 (6): e03029-e03018 [2023-08-17]. <https://doi.org/10.1128/AEM.03029-18>.
- [8] MISHRA A, ROY F, DOU Y T, et al. Role of acetyltransferase

- ase PG1842 in gingipain biogenesis in *Porphyromonas gingivalis* [J/OL]. *Journal of bacteriology*, 2018, 200 (24) : e00385-e00318 [2023-08-17]. <https://doi.org/10.1128/jb.00385-18>.
- [9] ALBERTÍ S, ASHBAUGH C D, WESSELS M R. Structure of the has operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A *Streptococcus* [J]. *Molecular microbiology*, 1998, 28(2):343-353.
- [10] LEWIS A L, HENSLER M E, VARKI A, et al. The group B streptococcal sialic acid O-acetyltransferase is encoded by neuD, a conserved component of bacterial sialic acid biosynthetic gene clusters [J]. *Journal of biological chemistry*, 2006, 281(16):11186-11192.
- [11] DONS L, ERIKSSON E, JIN Y X, et al. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence [J]. *Infection and immunity*, 2004, 72(6):3237-3244.
- [12] DONG Y H, MA K, CAO Q, et al. CRISPR-dependent endogenous gene regulation is required for virulence in piscine *Streptococcus agalactiae* [J]. *Emerging microbes & infections*, 2021, 10(1):2113-2124.
- [13] HACKER J, HUGHES C. Genetics of *Escherichia coli* hemolysin [J]. *Current topics in microbiology and immunology*, 1985, 118:139-162.
- [14] LEYING H, SUERBAUM S, KROLL H P, et al. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli* [J]. *Infection and immunity*, 1990, 58(1):222-227.
- [15] COLINO J, OUTSCHOORN I. The form variation of the capsular polysaccharide K1 is not a critical virulence factor of *Escherichia coli* in a neonatal mouse model of infection [J]. *Microbial pathogenesis*, 1999, 27(4):187-196.
- [16] YAO R, BURR D H, GUERRY P. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence [J]. *Molecular microbiology*, 1997, 23(5):1021-1031.
- [17] REN J, SANG Y, QIN R, et al. Metabolic intermediate acetyl phosphate modulates bacterial virulence via acetylation [J]. *Emerging microbes & infections*, 2019, 8(1):55-69.
- [18] OUIDIR T, COSETTE P, JOUENNE T, et al. Proteomic profiling of lysine acetylation in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the diversity of acetylated proteins [J]. *Proteomics*, 2015, 15(13):2152-2157.

## Effect of N-acetyltransferase on virulence properties of *Streptococcus agalactiae*

MA Tianyu<sup>1</sup>, SHI Fuqiang<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1</sup>, ZHANG Yongan<sup>1,2</sup>, ZENG Hui<sup>1,2</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China;

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

**Abstract** To explore the effect of N-acetyltransferase (NAT) on the pathogenicity of *Streptococcus agalactiae*, the *nat* gene deletion strain  $\Delta nat$  was constructed by homologous recombination in the background of a wild strain HN016. The growth curve, morphology, cell adhesion, invasion, antiphagocytosis, whole blood survival and pathogenicity of wild strain and  $\Delta nat$  strain were compared. The results showed that the hemolytic capacity of  $\Delta nat$  decreased, and the loss of *nat* decreased the adhesion and invasion of *S. agalactiae* to tilapia brain cells and increased the bacterial susceptibility to blood killing and phagocytosis. The result of challenge experiment of tilapia showed that the lethality of  $\Delta nat$  ( $2 \times 10^8$  CFU/fish, the mortality rate was 36%) was significantly lower than that of wild strain HN016 ( $2 \times 10^8$  CFU/fish, the mortality rate was 85%). And the bacterial loads of  $\Delta nat$  were much less than that of HN016 in blood, spleen and brain tissue at 12 h post infection. This study firstly reports that NAT plays an important role in *S. agalactiae* resistance to host blood and phagocyte clearance, and assists in the bacterial invasion and colonization of tilapia tissues.

**Keywords** *Streptococcus agalactiae*; N-acetyltransferase; gene deletion; biological characteristics; tilapia

(责任编辑:边书京)