

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20190426001

http://www.yykxjz.cn/

李倩, 李贵阳, 李杰, 莫照兰. 利用 mini-Tn10 转座子文库筛选鳃弧菌 M3 表型发生变化的基因. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 160–167  
Li Q, Li GY, Li J, Mo ZL. Construction of a mini-Tn10 transposon library to identify genes associated with several phenotypes of *Vibrio anguillarum* M3. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 160–167

## 利用 mini-Tn10 转座子文库筛选 鳃弧菌 M3 表型发生变化的基因

李倩<sup>1</sup> 李贵阳<sup>2</sup> 李杰<sup>2</sup> 莫照兰<sup>1,2①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 为了寻找影响鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)表型变化的基因,本研究使用转座子 mini-Tn10 (pLOF/Kana)构建了鳃弧菌 M3 突变株文库,筛选影响表型变化的菌株及相关基因,证明这些表型变化的突变子与毒力存在一定的相关性。对 M3 突变文库的 1152 突变子进行筛选,获得泳动能力改变的突变子 1 个(编号为 6G\_1),酪蛋白酶活性发生改变的突变子 3 个(编号为 5A\_11、7B\_12 和 7E\_12),明胶酶活性发生改变的突变子 1 个(编号为 7H\_1),以及菌膜形成能力发生显著变化的突变子 3 个(编号为 5E\_2、6A\_2 和 6E\_12)。对转座子插入位点进一步分析显示,一个磷酸二酯酶相关基因突变引起泳动能力增强( $P<0.05$ ), *leuD*、*rseB* 和 *thiQ* 突变引起酪蛋白酶活性显著减弱( $P<0.05$ ), *potD* 突变引起明胶蛋白酶活性显著减弱( $P<0.05$ ), *leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 的突变引起菌膜形成能力明显减弱( $P<0.05$ )。对这些表型变化的突变子进行毒力感染,发现野生型 M3 是 6G\_1 突变子的半数致死剂量(Lethal dose 50%, LD<sub>50</sub>)的 2.04 倍,该突变子毒力相对增强。5A\_11、7B\_12 和 7E\_12 的突变子 LD<sub>50</sub> 分别为野生型 M3 的 2.96、3.25 和 3.36 倍。7H\_1 的 LD<sub>50</sub> 是野生型 M3 的 1.25 倍,5E\_2、6A\_2 和 6E\_12 的 LD<sub>50</sub> 分别为野生型 M3 的 3.34、4.08 和 1.84 倍,这些突变子毒力相对减弱。本研究结果为进一步阐明鳃弧菌的发病机制提供了理论基础。

**关键词** 鳃弧菌; mini-Tn10 转座子; 突变文库; 表型; 基因

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0019-08

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)广泛存在于大洋、河口等环境,也是多种海洋生物的正常菌群之一,一些致病性菌株可感染多种鱼类,引起出血性败血症(Austin *et al.*, 2007; 丁山等, 2018)。鳃弧菌致病包括粘附、侵袭、体内增殖、产生毒素等一系列过程,而

这些过程又与细菌产生的各种致病因子有关(Frans *et al.*, 2011)。已知的致病因子包括外膜蛋白、鞭毛、蛋白酶、脂多糖和溶血素等(Norqvist *et al.*, 1990; Austin *et al.*, 1995; Hirono *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1996)。鞭毛参与鳃弧菌的运动,当细菌失去运动能力或运动

\* 国家重点研发计划(2018YFC0311300)、国家自然科学基金——山东省人民政府联合基金(U1706205)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017008)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311300), NFSC-Shandong Joint Fund (U1706205), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017008), and Aoshan Technology Innovation Program (2015ASKJ02)]. 李倩, E-mail: 840373607@qq.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-04-26, 收修改稿日期: 2019-07-02

能力下降时, 其感染宿主细胞的能力明显减弱(Ormonde *et al*, 2000)。很多胞外蛋白酶是病原菌的主要致病因子, 它们可以水解组织细胞, 增强其通透性, 产生细胞毒性, 最终造成组织损伤等(Naka *et al*, 2011)。鳗弧菌的金属蛋白酶基因 *priV* 发生突变时, 其对宿主红细胞的溶血活性下降、毒力减弱(Mo *et al*, 2010)。Stewart 等(2001)研究表明, 几乎所有的细菌都可以形成菌膜, 为细菌提供物理和化学屏障, 营造一种相对稳定的状态。菌膜使鳗弧菌能够对消毒剂、抗生素等不利环境具有一定的耐受力, 使其保持持续感染和耐药性(Hall-Stoodley *et al*, 2004; Lindell *et al*, 2012)。一些基因参与调控鳗弧菌菌膜和毒力的形成, 如 *luxR* 能够抑制胞外蛋白的产生、调控菌膜的形成, 进而参与细菌毒力和耐药性的调控(Croxatto *et al*, 2002)。可见, 鳗弧菌在运动、胞外蛋白酶产生、菌膜形成等表型方面的变化与细菌的致病性相关。

转座子 mini-Tn10 是一种微型转座子, 已被广泛应用于多种细菌基因的功能研究, 如用于鉴定炭疽杆菌(*Anthrax bacillus*)未知的调控因子及代谢途径研究(Wilson *et al*, 2007), 用于鉴定影响苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)细菌素产生的基因(Kamoun *et al*, 2009)。为找到影响鳗弧菌表型变化的基因, 本研究使用转座子 mini-Tn10 (pLOF/Kana)构建鳗弧菌 M3 突变菌株文库, 筛选影响表型变化的菌株及相关基因, 为进一步研究鳗弧菌的致病机理提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、实验鱼、引物和培养条件

鳗弧菌 M3(Amp<sup>R</sup>)由本实验室保存, 用胰大豆蛋白胨培养基(TSA 和 TSB)培养, 培养条件为 28℃, 静置或 150 r/min 摇床培养。

大肠杆菌(*Escherich coli*) CC118 (pLOF/Kana, Kana<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>)和大肠杆菌 SM10(Kana<sup>R</sup>)由集美大学鄢庆枇教授惠赠, 用含卡那霉素(Kana) 100 μg/ml 的 LB 液体培养基培养, 培养条件为 37℃、静置或 150 r/min 摇床培养。

斑马鱼(*Barchydanio rerio var*), 体长为 3~4 cm, 购于青岛市南山花鸟虫鱼市场。实验前暂养于 15 L 水族箱中 1 周, 正常换水、喂食, 养殖水温为 22℃。

TCBS 固体培养基(含 Kana 600 μg/ml)用于筛选带有 Kana 抗性的鳗弧菌突变子。

### 1.2 鳗弧菌 M3 mini-Tn10 转座子文库构建

突变文库的构建参照 Herrero 等(1990)方法并适当改进。供体菌 *E.coli* SM10 (pLOF/ Kana)在 LB [氨苄青霉素(Amp), 50 μg/ml; Kana, 100 μg/ml]培养基中 37℃ 震荡培养过夜, 受体菌(鳗弧菌) M3 在 TSB 培养基中 28℃ 震荡培养过夜。分别离心, 收集供体菌和受体菌, 用新鲜培养基洗涤, 并重悬菌体, 供体菌与受体菌按 1:4 的比例混合均匀, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤混合菌液, 取出滤膜置于 TSA 平板上, 28℃ 培养 4 h 后, 用 1 ml TSB 培养基洗脱滤膜上的细菌, 取 50 μl 涂布 TCBS+Kana 平板, 28℃ 培养 24 h。从 TCBS+Kana 平板上挑取单菌落, -80℃ 保存于 96 孔板中。

### 1.3 突变子表型检测

对鳗弧菌转座子突变文库进行泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力等表型检测。具体方法: 将鳗弧菌 M3 及其突变文库菌株在 TSB 过夜培养, 调节菌液为 OD<sub>540 nm</sub>=0.5, 取 2 μl 菌液分别点种于含 0.35% 琼脂、含 1% 酪蛋白、含 1% 明胶的 TSA 平板上, 每组设 3 个重复。28℃ 静置培养 24 h 后, 分别测量平板上细菌的泳动圈直径(Schaber *et al*, 2004)、酪蛋白酶产生直径(Wilhelm *et al*, 2007)、明胶酶产生直径(Zhou *et al*, 2013)。

应用结晶紫染色法检测突变菌株菌膜形成能力(Lazarevic *et al*, 2005)。取 OD<sub>540 nm</sub> 为 0.5 的菌液 150 μl 加入 96 孔板中, 以 TSB 作为空白对照。在 28℃ 静置培养 24 h, 用磷酸盐缓冲液(PBS, 浓度 0.2 mol/L, pH 7.0)洗涤 5 次后, 用包音氏固定液(Bouin's stationary liquid)固定, 37℃ 下静置培养 1 h, 用 PBS 缓冲液清洗除去残留物, 置于 37℃ 恒温培养箱完全干燥后, 加入结晶紫染色、蒸馏水清洗, 加入乙醇溶解吸附结晶紫, 然后, 测定其在 OD<sub>595 nm</sub> 的吸光度。

### 1.4 转座子插入突变子的数量及基因的确定

根据 Lee 等(2008)的方法确定转座子插入突变子的数量, 具体步骤: 鳗弧菌 M3 *rpoB* 基因为单拷贝基因, 选取其作为内参基因, *neoR* 基因为转座子特有, 选取其为目的基因, 根据引物 *rpoB*-for/rev、*neo*-for/rev(表 1)扩增 *rpoB* 和 *neoR* 片段。连接 *rpoB* 片段和 *neoR* 片段, 构建重组载体质粒, 根据该质粒计算 DNA 拷贝数, 并以该重组质粒为模板, *rpoB*-SYBR-for/rev、*neoR*-SYBR-for/rev 为引物, 制作标准曲线, 得到扩增效率 *E* 值(*E*<sub>*rpoB*</sub> 和 *E*<sub>*neoR*</sub>), 再以突变子 DNA 为模板, 进行相对定量 PCR, 得到 Δ*C*<sub>*rpoB*</sub> 和

$\Delta C_{neoR}$ , 由公式计算转座子插入个数。

$$\text{转座子插入个数} = \frac{(1 + E_{neoR})^{-\Delta C_{neoR}}}{(1 + E_{rpoB})^{-\Delta C_{rpoB}}}$$

式中,  $\Delta C_{neoR}$  为扩增 *neoR* 基因时, 突变子株 DNA 为模板的  $C_t$  与重组质粒为模板的  $C_t$  差值。  $\Delta C_{rpoB}$  为扩增 *rpoB* 基因时, 突变子株 DNA 为模板的  $C_t$  与重组质粒为模板的  $C_t$  差值。

根据 Xie 等(2011)的方法适当改进, 确定转座子插入基因, 具体步骤: 根据转座子 mini-Tn10 中 *neoR* 基因序列进行特异性引物设计, 具体引物序列见表 1。

对筛选出的 8 株菌株进行基因步移(Genome walking)扩增。以 8 株突变子菌株基因组 DNA 为模板, 使用外引物 neo-Rrev-0a 和 M3-1-1 进行第 1 轮 PCR; 取适量的第 1 轮 PCR 产物反应液稀释 50 倍后, 使用内引物 neoR-rev-1a 和 M3-1 进行第 2 轮 PCR; 取适量的第 2 轮 PCR 产物反应液稀释 50 倍后, 使用内引物 neoR-rev-b1 和 M3-1 进行第 3 轮 PCR 反应。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 确认目的条带后, 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的片段、连接至载体, 送上海派森诺生物技术有限公司测序, 测序结果与已公布的 M3 基因组信息在 NCBI 上进行比对。

表 1 本实验所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
M3-1	TGGGACACTCGGGATAGTGG
M3-1-1	TGGGACACTCGGGATAGTGNNNNNGGAA
neoR-rev0a	GGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCA
neoR-rev1a	ACGATGGACTCCAGTCCGCGCCATTACGCTCGTCATCAA
neoR-rev-b1	ACCGTTATTCGTGATTGC
rpoB-for	GCGTAGGTCTTGTGCGTGTTG
rpoB-rev	GGATAAGCGAAGCGGCGATTG
rpoB-SYBR -for	CGTGTTGTTGATGGTGTGGTACTGA
rpoB-SYBR -rev	GGATAAGCGAAGCGGCGATTGATACG
neoR-for	GGCAATCAGGTGCGACAATCTAT
neoR-rev	CCGACTCGTCCAACATCAATACAA
neoR-SYBR-for	ATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGG
neoR-SYBR-rev	GGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAAC

## 1.5 突变子毒力检测

利用斑马鱼作为实验动物, 检测突变子的毒力变化, 根据杨茂成(1990)的方法, 鳗弧菌野生型 M3 及 8 株突变菌株作为感染组, 无菌生理盐水作为对照组, 设置细菌浓度梯度为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  和  $10^5$  CFU/ml, TSA 平板检测活菌数。每个梯度 10 尾鱼, 每尾鱼注射 10  $\mu$ l 菌液, 进行肌肉注射攻毒, 记录感染后斑马鱼的死亡情况, 采用改进的寇氏法计算细菌对斑马鱼的半数致死量 (Lethal dose 50%, LD<sub>50</sub>)。

## 1.6 数据分析

细菌的泳动圈直径、酪蛋白酶产生直径、明胶酶产生直径和成膜能力的吸光度采用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD)表示, 并使用 SPSS 软件对这些数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 鳗弧菌 M3 mini-Tn10 转座子文库的构建和筛选

利用 mini Tn10 转座子构建鳗弧菌 M3 的突变文库, 得到 1152 株突变子。对突变子进行泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力的检测, 发现与野生型 M3 相比, 突变子株 6G\_1 的泳动能力明显增强 ( $P < 0.05$ ) (图 1), 5A\_11、7B\_12、7E\_12 的酪蛋白酶活性显著减弱 ( $P < 0.05$ ) (图 2), 7H\_1 的明胶酶活性显著减弱 ( $P < 0.05$ ) (图 3), 5E\_2、6A\_2、6E\_12 的菌膜形成能力显著减弱 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

### 2.2 转座子插入突变子的数量及基因的确定

选取筛选的 8 株菌, 利用实时 PCR 相对定量标准曲线法和  $\Delta C_t$  法确定了转座子插入个数 (表 2)。通过

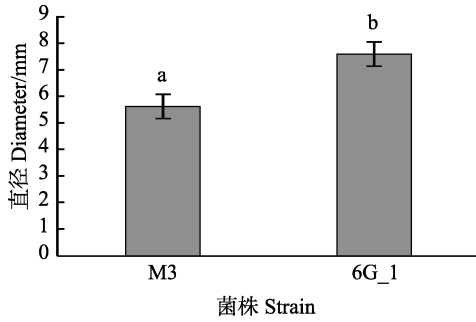


图 1 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子泳动能力检测  
Fig.1 Detection of swimming ability of *V. anguillarum* M3 transposon library

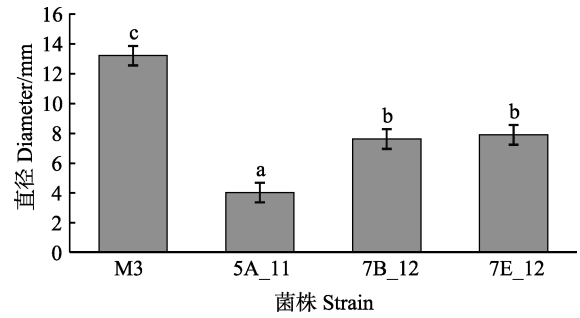


图 2 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子酪蛋白酶活性检测  
Fig.2 Detection of casein activity of *V. anguillarum* M3 transposon library

不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同  
Data with different letters are significantly different among different groups ( $P < 0.05$ ), the same as below

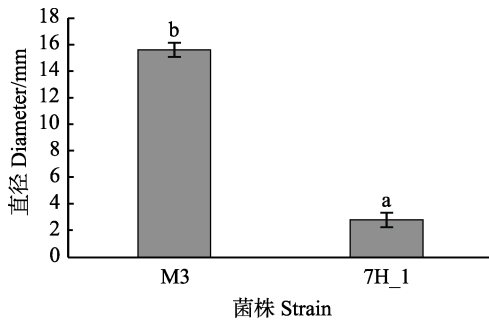


图 3 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子明胶酶活性检测  
Fig.3 Detection of luciferase activity of *V. anguillarum* M3 transposon library

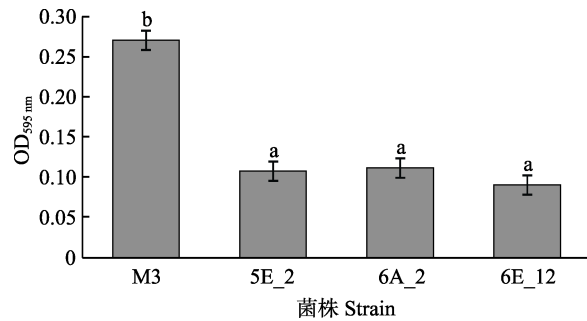


图 4 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子菌膜形成能力检测  
Fig.4 Detection of membrane formation ability of *V. anguillarum* M3 transposon library

表 2 目的基因 *neoR* 和内参基因 *rpoB* 的扩增效率及  $\Delta C_t$  值  
Tab.2 Amplification efficiency and  $\Delta C_t$  of target gene *neoR* and reference gene *rpoB*

菌株 Strain	扩增效率 $E_{rpoB}$	扩增效率 $E_{neoR}$	$\Delta C_{t_{rpoB}}$	$\Delta C_{t_{neoR}}$	转座子插入个数 Inserts number
5E_2			8.53	8.37	1
5A_11			14.60	15.63	1
6A_2			7.85	8.06	1
6E_12	97%	93%	9.23	8.10	2
6G_1			9.19	9.59	1
7B_12			10.41	10.51	1
7E_12			7.80	7.48	1
7H_1			9.22	8.94	1

基因步移扩增法获得转座子插入位点, 将得到的序列与 M3 全基因组序列进行比对, 得到插入基因在 M3 基因组上的位置信息和编码蛋白信息(图 5, 表 3)。*leuD*、*rseB*、*thiQ*、*ilvH*、*grpB* 位于 M3 染色体 I 上, 1 个磷酸二酯酶相关基因和 *potD* 位于染色体 II 上。其中, 磷酸二酯酶相关基因影响 M3 的运动能力, *leuD*、*rseB*、*thiQ* 影响 M3 酪蛋白酶产生, *potD* 影响 M3 明胶蛋白

酶产生, *leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 影响 M3 的菌膜形成能力。

### 2.3 突变子毒力检测

肌肉注射攻毒实验结果见表 4。由表 4 可知, 突变子 6G\_1 的 LD<sub>50</sub> 为  $5.439 \times 10^4$  CFU/尾, 野生型 M3 是该突变子的 2.04 倍, 突变子 5A\_11、7B\_12 和 7E\_12 的 LD<sub>50</sub> 分别为  $3.29 \times 10^5$ 、 $3.734 \times 10^5$  和  $3.734 \times 10^5$  CFU/尾, 分

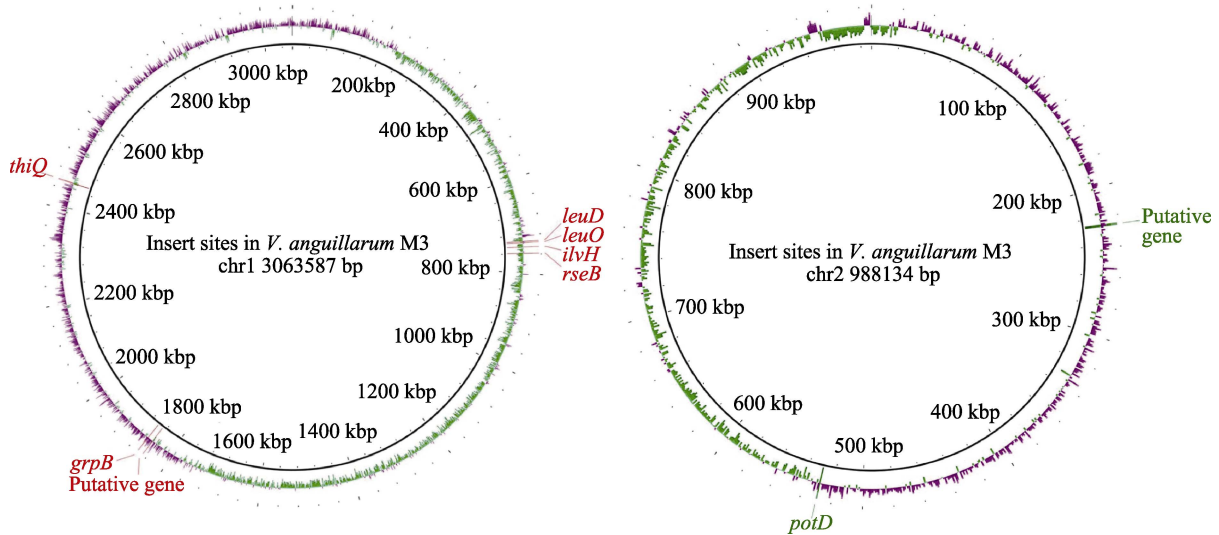


图 5 转座子插入位点及基因

Fig.5 Transposon insertion sites and genes

表 3 转座子插入位点信息

Tab.3 Information of transposon insertion site

菌株 Strain	表型 Phenotype	基因 Gene	基因产物 Gene product	预测功能 Predict function
5A_11	酪蛋白酶活性降低	<i>leuD</i>	异丙基苹果酸异构酶	影响细胞壁合成，钾离子吸收，c-di-AMP 水平，细菌的存活能力
7B_12		<i>rseB</i>	一种直链蛋白	调控外膜完整性，调节 Sigma E 因子转录
7E_12		<i>thiQ</i>	硫胺素 ABC 转运 ATP 结合蛋白	蛋白 TbpA、ThiP 和 TPP 运输系统的一部分
7H_1	明胶酶活性降低	<i>potD</i>	蛋白 PotD 是与底物结合的细胞质组分	转运亚精胺和腐胺
5E_2	菌膜形成能力降低	<i>leuO</i>	2-异丙基苹果酸异构酶	调节群体感应，参与各种基因的表达，影响生物膜的形成
6A_2		<i>ilvH</i>	乙酰乳酸合酶	催化从丙酮酸到 2-乙酰乳酸的合成
6E_12		基因名称不明确	核苷合成蛋白	促进 GTP 的合成，用于天门冬氨酸、天门冬酰胺、酪氨酸和组氨酸的合成
		<i>grpB</i>	2-甲基异柠檬酸裂解酶	促进 2-甲基异柠檬酸酯催化丙酮酸和琥珀酸酯的形成
6G_1	泳动性增强	基因名称不明确	磷酸二酯酶	水解细胞内第二信使(环磷酸腺苷 cAMP 或环磷酸鸟苷 cGMP)

别为野生型 M3 的 2.96、3.25 和 3.36 倍。7H\_1 的 LD<sub>50</sub> 为 1.374×10<sup>5</sup> CFU/尾，是野生型 M3 的 1.25 倍，5E\_2、6A\_2 和 6E\_12 的 LD<sub>50</sub> 分别为 3.716×10<sup>5</sup>、4.453×10<sup>5</sup> 和 2.052×10<sup>5</sup> CFU/尾，分别为野生型 M3 的 3.34、4.08 和 1.84 倍。

### 3 讨论

本研究利用 mini-Tn10 转座子构建了鳃弧菌 M3 的突变文库，筛选得到影响细菌泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力的突变菌株，通过基因

步移和序列比对，找到影响上述表型的相关基因。结果显示，1 个磷酸二酯酶相关基因的突变引起泳动能力增强(P<0.05)，毒力相对增强，*leuD*、*rseB*、*thiQ* 的突变引起酪蛋白酶活性明显减弱(P<0.05)，*potD* 的突变引起明胶蛋白酶活性显著减弱(P<0.05)，*leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 的突变引起菌膜形成能力明显减弱(P<0.05) 且这些菌株毒力相对减弱。研究表明，细菌毒力产生主要包括铁摄取系统、外膜蛋白、胞外蛋白酶、脂多糖和溶血素等(Weber *et al*, 2009; Naka *et al*, 2011)。O’Toole 等(1996)研究发现，鳃弧菌鞭毛被破坏后，泳

表 4 鳃弧菌 M3 野生型及其突变子株攻毒实验结果  
Tab.4 Experimental results of virulence of *V. anguillarum* M3 wild type and its mutants

菌株 Strain	半数致死量 LD <sub>50</sub> (CFU/尾)
M3	1.111×10 <sup>5</sup>
6G_1	5.439×10 <sup>4</sup>
5A_11	3.290×10 <sup>5</sup>
7B_12	3.611×10 <sup>5</sup>
7E_12	3.611×10 <sup>5</sup>
7H_1	1.374×10 <sup>5</sup>
5E_2	3.716×10 <sup>5</sup>
6A_2	4.453×10 <sup>5</sup>
6E_12	2.052×10 <sup>5</sup>

动力减弱的菌株毒力较野生型减弱了几百倍,表明趋化运动是鞭毛对鳃弧菌毒力的一种必需功能。Hao 等(2013)研究表明,鳃弧菌 *rpoN* 基因缺失突变株因为其各种表型缺陷和调控能力丧失,致使鳃弧菌在宿主体内存活能力下降,致病力减弱,证实了表型和毒力存在相关性。

磷酸二酯酶(PDES)具有水解细胞内第二信使(环磷酸腺苷 cAMP 或环磷酸鸟苷 cGMP)的功能,降解细胞内 cAMP 或 cGMP,从而终结这些第二信使所传导的生化作用(田慧等,2003)。Fahmin 等(2017)研究显示, PDES、二腺苷酸环化酶(DACS)和 c-di-AMP 合成酶构成环二腺苷单磷酸(c-di-AMP),PDES 和 DACS 协同调节 c-di-AMP 的稳态, PDES 的缺失可导致革兰氏阳性细菌的细胞壁发生改变、钾离子吸收失调、c-di-AMP 水平改变、细菌的存活率下降。c-di-AMP 在不同的细菌体内具有不同的作用,可以影响生物膜的形成、毒力因子的表达、运动性和碳代谢(Corrigan *et al*, 2013),但其调控细菌表型和毒力的机制尚不清楚(Pham *et al*, 2016; Corrigan *et al*, 2013)。本研究中,由于转座子插入,使鳃弧菌的 1 个 PDES 失活,有可能影响了细菌细胞壁离子代谢和生物膜形成,而导致细菌运动能力改变,具体的影响机制还需进一步探究。

*leuD* 编码异丙基苹果酸异构酶,将  $\alpha$ -异丙基苹果酸催化为  $\beta$ -异丙基苹果酸,为亮氨酸的合成提供前体(Kohlhaw *et al*, 2003)。*qsdS* 编码异丙基苹果酸脱氢酶,具有 N-酰基-L-高丝氨酸内酯(AHL)降解酶活性(Ma *et al*, 2018)。AHL 参加细菌密度感应系统(QS)的调节,调控生物膜形成(Parsek *et al*, 2000)、蛋白酶活性(Waters *et al*, 2005)等。在染色体上,*qsdS* 位于 *leuD* 和 *leuO* 之间,由此推测,*leuD* 的插入失活间接影响了 *qsdS* 的功能,从而影响鳃弧菌 QS 的功能,使蛋白

酶活性、生物膜形成能力受到影响。

*rseB* 编码一种细胞质蛋白,与内层锚定蛋白 RseA 结合,调节膜内蛋白水解与蛋白酶活性(Kim *et al*, 2010); *thiQ* 编码硫胺素 ABC 转运 ATP 结合蛋白,参与细菌的能量代谢,该基因的缺失不仅使细菌整体的能量代谢下降,还使细菌的生长减慢,细菌生物膜合成所需的蛋白、胞外多糖等合成能力减弱(Huang *et al*, 2014)。*potD* 编码一种胞浆蛋白,参与亚精胺和腐胺的转运(Shah *et al*, 2008)。因此,这些基因的缺失可能导致鳃弧菌多种蛋白或蛋白酶合成能力、转运能力下降,间接影响蛋白酶的活性。这些基因对蛋白酶活性的影响机制有待阐明。

*ilvH* 编码乙酰乳酸合酶,催化 2-乙酰乳酸的合成,参与三羧酸循环(Zhao *et al*, 2013); *grpB* 编码 2-甲基异柠檬酸裂解酶,促进 2-甲基异柠檬酸酯催化丙酮酸和琥珀酸酯的形成,参与碳源合成(Hubstenberger *et al*, 2015),说明 *ilvH* 和 *grpB* 与 ATP 合成相关。因此,猜测这 2 个参与能量合成的基因间接影响鳃弧菌菌膜的形成,它们对菌膜形成的影响机制有待阐明。

总之,本研究通过转座子文库,鉴定出 8 个与鳃弧菌运动、胞外蛋白酶活性、菌膜形成有关的基因。由于转座子的插入突变可能会引发极性效应,使得插入位点的下游基因受到影响。因此,后期还需要通过基因敲除、基因回补实验来确证它们与表型变化的关系,在此基础上研究基因的功能及作用机制。

## 参 考 文 献

- Austin B, Alsina M, Austin DA, *et al*. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: A comparison of different methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 1995, 18(2): 285–302
- Austin B, Austin D. Characteristics of the pathogens: Gram-negative bacteria. In: *Bacterial fish pathogens*. Springer Praxis Books. Springer, Dordrecht, 2007
- Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, *et al*. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9084–9089
- Croxatto A, Chalker VJ, Lauritz J, *et al*. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6): 1617–1629
- Ding S, Li SF, Li J, *et al*. Long-term protection effect of *Vibrio anguillarum* trivalent inactivated vaccine. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 137–142 [丁山, 李淑芳, 李杰, 等. 鳃弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 137–142]

- Fahmin T, Port GC, Cho KH. c-di-AMP: An essential molecule in the signaling pathways that regulate the viability and virulence of gram-positive bacteria. *Genes (Basel)*, 2017, 8(8): 197
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(9): 643–661
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 95–108
- Hao B, Mo ZL, Xiao P, *et al.* Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation, and virulence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2575–2585
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(11): 6557–6567
- Hirono I, Masuda T, Aoki T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 1996, 21(3): 173–182
- Huang H, Tao YX. A small molecule agonist *thiQ* as a novel pharmacoperone for intracellularly retained melanocortin-4 receptor mutants. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10(8): 817–24
- Hubstenberger A, Cameron C, Noble SL, *et al.* Modifiers of solid RNP granules control normal RNP dynamics and mRNA activity in early development. *Journal of Cell Biology*, 2015, 211(3): 703–716
- Kamoun F, Fguira IB, Tounsi A, *et al.* Generation of mini-Tn10 transposon insertion mutant library of *Bacillus thuringiensis* for the investigation of genes required for its bacteriocin production. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(2): 141–149
- Kim DY, Kwon E, Choi JK, *et al.* Structural basis for the negative regulation of bacterial stress response by RseB. *Protein Science*, 2010, 19(6): 1258–1263
- Kohlhaw GB. Leucine biosynthesis in fungi: Entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(1): 1–15
- Lazarevic V, Soldo B, Médico N, *et al.* *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 39–45
- Lee C, Lee S, Shin SG, *et al.* Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: Absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 371–376
- Lindell K, Fahlgren A, Hjerde E, *et al.* Lipopolysaccharide O-antigen prevents phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin epithelial cells. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37678
- Ma H, Wang X, Zhang Y, *et al.* The diversity, distribution and function of N-acyl-homoserine lactone (AHL) in industrial anaerobic granular sludge. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 116–124
- Milton DL, O'Toole R, Hörstedt P, *et al.* Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1310–1319
- Mo ZL, Guo DS, Mao YX, *et al.* Identification and characterization of the *Vibrio anguillarum* *prtV* gene encoding a new metalloprotease. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 55–61
- Naka H, Crosa JH. Genetic determinants of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathology*, 2011, 46(1): 1–10
- Norqvist A, Norrman B, Wolf-Watz H. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 1990, 58(11): 3731–3736
- Ormonde P, Hörstedt P, O'Toole R, *et al.* Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(8): 2326–2328
- O'Toole R, Milton DL, Wolf-Watz H. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(3): 625–637
- Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(16): 8789–8793
- Pham TH, Liang ZX, Marcellin E, *et al.* Replenishing the cyclic-di-AMP pool: Regulation of diadenylate cyclase activity in bacteria. *Current Genetics*, 2016, 62(4): 731–738
- Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, *et al.* Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53(Pt 9): 841–853
- Shah P, Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(1): 4–16
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The LANCET*, 2001, 358(9276): 135–138
- Tian H, Zhang Q, Zhu JS. New phosphodiesterase and its new function. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2003, 19(6): 458–460 [田慧, 张奇, 朱景申. 新的磷酸二酯酶及其功能. *中国临床药理学杂志*, 2003, 19(6): 458–460]
- Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21: 319–346
- Weber B, Hasic M, Chen C, *et al.* Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(12): 3018–3028
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, *et al.* The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6695–6703
- Wilson AC, Perego M, Hoch JA. New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(3): 332–335

- Xie C, Zhang B, Wang D, *et al.* Molecular cloning and characterization of an achene-seed-specific promoter from motherwort (*Leonurus japonicus* Hoult). *Biotechnology Letters*, 2011, 33(1): 167–172
- Yang MC. *Veterinary statistics*. Beijing: China Prospect Press, 1990 [杨茂成. 兽医统计学. 北京: 中国展望出版社, 1990]
- Zhao Y, Niu C, Wen X, *et al.* The minimum activation peptide from *ilvh* can activate the catalytic subunit of AHAS from different species. *ChemBiochem*, 2013, 14(6): 746–752
- Zhou MY, Wang GL, Li D, *et al.* Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79668

(编辑 马瑾艳)

## Construction of A mini-Tn10 Transposon Library to Identify Genes Associated with Several Phenotypes of *Vibrio anguillarum* M3

LI Qian<sup>1</sup>, LI Guiyang<sup>2</sup>, LI Jie<sup>2</sup>, MO Zhaolan<sup>1,2①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** The phenotypic characteristics of *Vibrio anguillarum* are related to the pathogenicity of the bacteria, such as swimming motion, ability of membrane formation, and extracellular protease production. To identify the genes affecting phenotypic changes in *V. anguillarum*, this study used transposon mini-Tn10 (pLOF/Kana) to construct a library of *V. anguillarum* M3 mutant strains and to screen the strains and related genes that affect phenotypic changes. It is proved that there is a certain correlation between mutants causing these phenotypic changes and the virulence. Mutations of 1152 strains of M3 mutant library were screened, and mutant strains with significant changes in swimming ability (strain 6G\_1), casein enzyme activity (strains 5A\_11, 7B\_12, and 7E\_12), gelatin enzyme activity (strain 7H\_1), and biofilm formation ability (strains 5E\_2, 6A\_2, and 6E\_12) were noted. Further analysis revealed that a phosphodiesterase-related gene mutation caused increased swimming capacity ( $P<0.05$ ), *leuD*, *rseB*, and *thiQ* mutations caused a significant decrease in caseinase activity ( $P<0.05$ ), and *potD* mutations caused a significant decrease in gelatinase activity ( $P<0.05$ ). Moreover, mutations in *leuO*, *ilvH* and *grpB* resulted in a significant decrease in the ability to form bacterial membranes ( $P<0.05$ ). Moreover, we observed a virulent infection in these mutant strains, which showed that LD<sub>50</sub> of wild type M3 was 2.04 times higher than that of 6G\_1 and the virulence was relatively increased. Additionally, 5A\_11, 7B\_12, and 7E\_12 LD<sub>50</sub> were 2.96 times, 3.25 times, and 3.36 times higher than that of wild-type M3, respectively. The LD<sub>50</sub> with the strain 7H\_1 was 1.25 times higher than that of wild M3, and the LD<sub>50</sub> with the strains 5E\_2, 6A\_2, and 6E\_12 were 3.34, 4.08, and 1.84 times higher than that of wild M3, respectively. These results lay a foundation for further study on the pathogenic mechanism of *V. anguillarum*.

**Key words** *Vibrio anguillarum*; mini-Tn10 transposon; Mutant library; Phenotype; Gene

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn