



单位代码 10635

学 号 112018328001841

西南大學

# 硕士学位论文

舒伯特气单胞菌 *cat* 基因缺失株的构建  
及生物学特性研究

论文作者：龚海燕

指导教师：郑永华 副教授

王 庆 研究员

学科专业：水生生物学

研究方向：水产动物病害防治

提交论文日期：2021年5月28日

论文答辩日期：2021年5月22日

学位授予单位：西南大学

中国·重庆

2021年5月

Dissertation for Master's Degree of  
Southwest University

Construction and Characterization of *cat* gene  
Deleted Mutant of *Aeromonas schubertii*

**Discipline:** Haiyan Gong

**Supervisor:** Associate Prof. Yonghua Zheng

Research Prof. Qing Wang

**Major:** Hydrobiology

**Filed:** Control of aquatic animal diseases

**Chongqing • China**

**May, 2021**

本研究得到广东省科技计划项目（2016A030303028）；现代农业产业技术体系建设专项资金（CARS-46）；中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金（2017HY-ZC0406）的资助。

# 独创性声明

学位论文题目：舒伯特气单胞菌 *cat* 基因缺失株的构建及生物学特性研究

本学位论文是作者在导师指导下独立完成的研究工作及取得的研究成果，恪守学术诚信，遵守学术准则。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

学位论文作者签名：

导师签名：

签名日期：2021 年 5 月 28 日    签名日期：2021 年 5 月 28 日

# 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

本论文公开时间： 获学位当年；  推迟 1 年。

学位论文作者签名：

导师签名：

签名日期：2021 年 5 月 28 日    签名日期：2021 年 5 月 28 日

# 目 录

|   |     |
|---|-----|
| 摘要 .....  | I   |
| Abstract .....  | III |
| 第 1 章 文献综述 .....  | 1   |
| 1 舒伯特气单胞菌研究概况 .....   | 1   |
| 1.1 舒伯特气单胞菌病 .....  | 1   |
| 1.2 舒伯特气单胞菌流行现状及临床症状 .....                                    | 1   |
| 1.3 舒伯特气单胞菌的生物学特性 .....                                       | 2   |
| 1.4 气单胞菌毒力因子 .....  | 3   |
| 2 过氧化氢酶研究概况 .....   | 6   |
| 2.1 过氧化氢酶概述 .....   | 6   |
| 2.2 过氧化氢酶功能研究与环境胁迫 .....                                      | 6   |
| 2.3 过氧化氢酶的应用 .....  | 7   |
| 2.4 过氧化氢酶与巨噬细胞的吞噬机制 .....                                     | 7   |
| 3 研究目的与意义 .....   | 8   |
| 第 2 章 舒伯特气单胞菌缺失株 $\Delta cat$ 和回补株 C- <i>cat</i> 的构建及验证 ..... | 9   |
| 1 材料 .....  | 9   |
| 1.1 实验材料和试剂 .....   | 10  |
| 1.2 仪器 .....  | 10  |
| 1.3 引物 .....  | 11  |
| 2 方法 .....  | 11  |
| 2.1 重组温敏自杀载体 pSET4s- <i>cat</i> 的构建 .....                     | 11  |
| 2.2 <i>A. schubertii</i> WL-2 感受态细胞的制备 .....                  | 13  |
| 2.3 质粒电转化感受态细胞 .....  | 13  |
| 2.4 缺失株诱导与 PCR 鉴定 .....                                       | 13  |
| 2.5 重组质粒 pSmart- <i>cat</i> 的构建 .....                         | 14  |
| 2.6 缺失株 $\Delta cat$ 感受态细胞的制备 .....                           | 16  |

|       |                                      |    |
|-------|--------------------------------------|----|
| 2.7   | <i>cat</i> 基因缺失株 $\Delta cat$ 回补株的构建 | 16 |
| 2.8   | 实时荧光定量检测基因表达量                        | 16 |
| 2.9   | 重组质粒 PET32a-CAT 构建及表达                | 17 |
| 2.10  | 多克隆抗体的制备及鉴定                          | 17 |
| 2.11  | 缺失株和回补株 CAT 蛋白表达鉴定                   | 18 |
| 3     | 结果                                   | 18 |
| 3.1   | 舒伯特气单胞菌缺失株的构建及 PCR 鉴定                | 18 |
| 3.2   | 回补株 C- <i>cat</i> 的构建及 PCR 鉴定        | 22 |
| 3.3   | 实时荧光定量检测基因表达量                        | 23 |
| 3.4   | 缺失株和回补株 CAT 蛋白表达鉴定                   | 23 |
| 4     | 讨论                                   | 25 |
| 5     | 小结                                   | 26 |
| 第 3 章 | <i>cat</i> 基因缺失株、回补株及野生株相关生物学性状分析    | 27 |
| 1     | 材料                                   | 27 |
| 1.1   | 实验菌株                                 | 27 |
| 1.2   | 实验材料和试剂                              | 27 |
| 1.3   | 实验仪器                                 | 27 |
| 2     | 方法                                   | 27 |
| 2.1   | 菌落形态鉴定                               | 28 |
| 2.2   | 溶血活性检测                               | 28 |
| 2.3   | 生长曲线测定                               | 28 |
| 2.4   | 酸碱耐受实验                               | 28 |
| 3     | 结果                                   | 29 |
| 3.1   | 菌落形态鉴定                               | 29 |
| 3.2   | 溶血活性检测                               | 29 |
| 3.3   | 生长曲线测定                               | 30 |
| 3.4   | 酸碱耐受能力                               | 31 |
| 4     | 讨论                                   | 32 |
| 5     | 小结                                   | 33 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 第 4 章 <i>cat</i> 基因缺失株、回补株致病性分析..... | 35 |
| 1 材料 .....                           | 35 |
| 1.1 实验动物和菌株及细胞.....                  | 35 |
| 1.2 实验试剂和仪器.....                     | 35 |
| 2 方法 .....                           | 35 |
| 2.1 触酶实验.....                        | 35 |
| 2.2 过氧化氢存活实验.....                    | 36 |
| 2.3 过氧化氢酶活力实验.....                   | 36 |
| 2.4 巨噬细胞存活实验.....                    | 36 |
| 2.5 杂交鳢致病性实验.....                    | 37 |
| 3 结果 .....                           | 37 |
| 3.1 触酶活性.....                        | 37 |
| 3.2 过氧化氢的耐受能力.....                   | 38 |
| 3.3 过氧化氢酶活性.....                     | 39 |
| 3.4 巨噬细胞存活实验.....                    | 40 |
| 3.5 杂交鳢致病性实验.....                    | 40 |
| 4 讨论 .....                           | 41 |
| 5 小结 .....                           | 42 |
| 结论 .....                             | 45 |
| 参考文献 .....                           | 47 |
| 致谢 .....                             | 57 |
| 攻读硕士期间发表论文 .....                     | 59 |

## 摘要

近年来舒伯特气单胞菌引起的内脏类结节病在养殖鳢科鱼类中频繁爆发,该病病程短、死亡率高、传播速度快,已经成为鳢养殖业的主要病害之一,造成了巨大的经济损失。目前舒伯特气单胞菌相关研究较少,大多集中在细菌分离鉴定以及药物敏感性分析等方面,而对其毒力因子和致病机制的研究报道较少。过氧化氢酶 (Hydrogen Peroxidase),是广泛存在于微生物和动植物中的一种氧化酶,也是一些病原菌重要的毒力因子,研究发现过氧化氢酶能帮助病原菌抵御宿主免疫细胞中过氧化物的毒害,在致病菌逃避宿主天然防御过程中发挥作用。为研究舒伯特气单胞菌过氧化氢酶对细菌毒力的影响,本课题采用同源重组基因编辑技术构建过氧化氢酶 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$ ,同时构建其重组质粒制备回补株 *C-cat*。通过对缺失株、回补株和野生株的菌落形态、溶血活性、生长曲线、酸碱耐受能力等生物学特性和触酶活性、过氧化氢酶活力、过氧化氢酶耐受、巨噬细胞存活实验及对杂交鳢致病性等致病特性进行比较研究,探讨过氧化氢酶在舒伯特气单胞菌致病过程中的作用,为舒伯特气单胞菌病的防控奠定基础。主要研究结果如下:

(1) 成功构建过氧化氢酶 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat*。连接舒伯特气单胞菌过氧化氢酶 *cat* 基因和氯霉素基因到质粒 pSET4s 中构建温敏自杀质粒 pSET4s-*cat*,采用同源重组的方法成功敲除野生株 WL-2 中 581bp *cat* 基因片段,构建舒伯特气单胞菌过氧化氢酶缺失株  $\Delta cat$ ;将重组质粒 pSmart-*cat* 转入缺失株  $\Delta cat$  中,构建回补株 *C-cat*。为验证过氧化氢酶在野生株、缺失株和回补株中的表达情况,在分子水平上采用荧光定量 PCR 方法检测三种菌株中 *cat* 基因的表达量发现,缺失株中 *cat* 基因无表达,回补株中 *cat* 的表达量为野生株中的 0.69 倍。在蛋白水平上,本研究还用原核表达舒伯特气单胞菌过氧化氢酶 CAT 蛋白,制备抗 CAT 多克隆抗体,建立了 CAT 蛋白 Western blot 检测方法。采用建立的方法检测三种菌株中 CAT 的表达发现:缺失株  $\Delta cat$  无 CAT 蛋白表达,野生株 WL-2 和回补株 *C-cat* 有大小为 56kDa 的 CAT 蛋白表达,且野生株中的 CAT 蛋白表达量高于回补株。因而,本研究从分子和蛋白表达水平验证了舒伯特气单胞菌过氧化氢酶 *cat* 基因缺失株和回补株的成功构建。

(2) 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat* 的生物学特性比较研究。在 5% 绵羊血琼脂平板 28 °C 培养 24 h 后发现,三种菌落大小一致,均呈灰白色、湿润、表面光滑、直径 0.6~2.0 mm 的圆形菌落;三株菌培养 48h 后均呈弱的  $\beta$ -溶血;对三株菌生长特性分析发现,三株菌的生长曲线无明显差异,在 2h 和 16h 分别进入对数生长期和平台期,生物学特性比较研究表明 *cat* 基因缺失与野生株和缺失株在菌落形态、溶血特性及生长状态无明显关联。

(3) 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat* 致病性的比较研究。触酶实验发现,缺失株降解过氧化氢能力显著低于野生株和回补株;过氧化氢存活实验显示,缺失株对

$H_2O_2$  的耐受能力低于野生株和回补株，而回补株对  $H_2O_2$  有一定的耐受能力但未恢复到野生株的水平；过氧化氢酶活性测定结果显示，缺失株  $\Delta cat$  过氧化氢酶活性较低，而回补株  $C-cat$  过氧化氢酶活性有所升高但未恢复至野生株水平；三株菌在巨噬细胞中存活试验发现，缺失株  $\Delta cat$  在巨噬细胞中存活能力显著低于野生株 WL-2 ( $P < 0.05$ ) 和回补株  $C-cat$ ，回补株在巨噬细胞存活能力有回复，但低于野生株；杂交鳢致病性实验结果显示，三株菌分别在  $30\text{ }^\circ\text{C}$   $1 \times 10^6$  CFU/ml 浸泡感染杂交鳢 2h 后，野生株感染组实验鱼死亡率 100%，缺失株感染组无死亡，回补株感染组死亡率为 50%。表明过氧化氢酶基因缺失导致舒伯特气单胞菌致病力降低，回补株过氧化氢酶基因后其致病力有所恢复，但未达到野生株水平。

综上，本研究成功构建了舒伯特气单胞菌过氧化氢酶 *cat* 基因缺失株及其回补株。进一步研究发现 *cat* 基因缺失对舒伯特气单胞菌的菌落形态、溶血特性及生长状态影响较小；*cat* 基因缺失降低舒伯特气单胞菌降解过氧化氢能力、在宿主巨噬细胞中的存活能力及其致病能力。推测过氧化氢酶在舒伯特气单胞菌感染过程中的致病机制为：舒伯特气单胞菌被巨噬细胞吞噬后，通过其的过氧化氢酶降解溶酶体中的过氧化氢逃避巨噬细胞的灭杀作用。本研究为进一步研究舒伯特气单胞菌的致病机制提供基础，对舒伯特气单胞菌的防控具有重要作用。

**关键词：**舒伯特气单胞菌；过氧化氢酶；基因缺失；生物学特性；致病性

---

## Abstract

In recent years, sarcoidosis caused by *Aeromonas schubertii* (*A. schubertii*) broke out frequently in the cultivated s Channidae, which has become one of the main diseases in the Channidae industry with a short course of disease and a high mortality rate, causing huge economic losses. At present, there are few studies on *A. schubertii*, most of which focus on isolation, identification and drug sensitivity analysis. There are few reports on the virulence factors and pathogenesis of *A. schubertii*. Hydrogen Peroxidase is a kind of oxidase and exists widely in microorganisms, plants and animals and is also an important virulence factor of some pathogenic bacteria. Some catalase can help pathogenic bacteria resist the toxicity of peroxides in host immune cells and play a role in the process of pathogenic bacteria escaping the host's natural defense. To study the effect of *A. schubertii* catalase on bacterial virulence, the homologous recombinant gene editing technology was used to construct the mutant strain  $\Delta cat$ , and its recombinant plasmid was constructed to prepare the complementary strain C-*cat* in this study. Comparing the mutant strain  $\Delta cat$ , the complementary strain C-*cat* and *A. schubertii* WL-2 of colony morphology, hemolysis activity, growth curve, acid base resistance ability and other biological characteristics and the catalase enzyme activity, hydrogen peroxide enzyme activity, tolerance in macrophage survival and the pathogenicity of hybrid snakehead. To explore the role of catalase in the pathogenic process of *A. schubertii*, and lay a foundation for the prevention and control of *A. schubertii*. The main research results are as follows:

(1) The mutant strain  $\Delta cat$  and the complementary strain C-*cat* was successfully constructed. The *cat* gene of *A. schubertii* and *chloramphenicol* gene were linked into the plasmid pset4S and the thermosensitive suicide plasmid pset4S-*cat* was constructed, the 581bp *cat* gene fragment in *A. schubertii* WL-2 was successfully knockout and the mutant strain  $\Delta cat$  was constructed by homologous recombination; the recombinant *cat* gene plasmid pSmart-*cat* was transferred into the mutant strain  $\Delta cat$  to construct the complementary strain C-*cat*. In order to verify the expression of catalase in the mutant strain  $\Delta cat$  and the complementary strain C-*cat*, for genomic level, fluorescence quantitative PCR method was used to detect the expression level of *cat* gene with the three strains. There was no expression of *cat* gene in the deletion strain. The *cat* gene expression level of the mutant was 0.69 times than the wild strain, which confirmed the successful construction of the mutant and the complement strain. For expressional level, the CAT protein of *A. schubertii* was expressed by prokaryotic expression in this study, and the anti-CAT polyclonal antibody was prepared to establish Western blot method for detecting CAT protein. The established method was used to detect the three strains, and it

was found that the mutant strain  $\Delta cat$  had no CAT protein expression, while the expression of CAT protein of WL-2 and the complement strain C-*cat* was 56kDa, the expression of CAT protein in the wild strain WL-2 was higher than that in the complement strain C-*cat*, indicating that the mutant strain  $\Delta cat$  and the complementary strain C-*cat* were successfully constructed in this study.

(2) Comparative study on the biological characteristics of the mutant strain  $\Delta cat$ , complementary strain C-*cat* and *A. schubertii* WL-2. After cultured at 28 °C for 24 h in 5 % sheep blood agar plate, three strains were found to have the same colony size and the strains were gray, moist, smooth and 0.6-2.0 mm in diameter; the three strains showed weak  $\beta$ -hemolysis after 48h culture; the growth characteristics of the three strains were analyzed and found that there was no significant difference in the growth curves of the three strains, and the three strains entered the logarithmic phase and the plateau phase at 2h and 16h, respectively. Comparison of biological characteristics showed that *cat* gene deletion had no significant correlation with the colony morphology, hemolytic characteristics and growth status between the mutant strain  $\Delta cat$  and *A. schubertii* WL-2.

(3) Comparative study on pathogenicity between the mutant strain  $\Delta cat$ , complementary strain C-*cat* and *A. schubertii* WL-2 showed that the degradation ability of hydrogen peroxide of the  $\Delta cat$  was significantly lower than the WL-2 and the C-*cat*; the hydrogen peroxide survival test showed that the ability of resistant to 100 mmol hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) of  $\Delta cat$  was significantly lower than WL-2 and C-*cat*, while the C-*cat* have a tolerance to  $H_2O_2$  increased but did not return to the level of WL-2; the catalase activity test results showed that the catalase activity of  $\Delta cat$  reduced, but the catalase activity of C-*cat* increased did not return to the level of the WL-2; The macrophage survival test of the three strains showed that the viability of  $\Delta cat$  in macrophages was significantly lower than that of the wild strain WL-2 ( $P < 0.05$ ), and the viability of C-*cat* in macrophages was restored but did not reach the level of the wild strain too; the results of pathogenicity experiment on hybrid snakehead showed that the death rate of wild strain WL-2 group was 100%, the death rate of the mutant strain  $\Delta cat$  group was 100%, and the death rate of complementary strain C-*cat* group was 50% after deal with the three strains which were  $1 \times 10^6$  CFU/ml at 30 °C respectively for 2h. The results showed that the deletion of *cat* gene reduced the pathogenicity of *A. schubertii*, and the pathogenicity of the complement strain was restored after the supplementation, but did not reach to the level of wild strain.

In conclusion, this study successfully constructed the mutant strain  $\Delta cat$  of *A. schubertii* and its complement strain C-*cat*. Further studies showed that the deletion of *cat* gene had little effect on the colony morphology, hemolytic characteristics and growth status of *A. schubertii*.

The deletion of *cat* gene reduces *A. schubertii* 's ability to degrade hydrogen peroxide, survive in host macrophages and pathogenicity. It is speculated that the pathogenic mechanism of catalase in the process of *A. schubertii* infection is after being engulfed by macrophages, *A. schubertii* can escape the killing effect of macrophages by degrading the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secreted in the lysosome through its own catalase. This study provides a basis for further research on the pathogenic mechanism of *A. schubertii* and plays an important role in the prevention and control of *A. schubertii*.

**Keywords :** *Aeromonas schubertii*; Catalase; Biological characteristics; Gene deleted; Pathogenicity

## 第1章 文献综述

### 1 舒伯特气单胞菌研究概况

#### 1.1 舒伯特气单胞菌病

鳢科鱼类属于淡水经济鱼类，其肉质细腻且无肌间刺，深受广大消费者喜爱。2019年，我国乌鳢产量达46.7万吨（农业部渔业渔政管理局，2020），我国养殖的鳢科鱼类主要包括乌鳢（*Channa argus*）、斑鳢（*Channa maculata*）和杂交鳢。随着杂交鳢的养殖规模扩大，杂交鳢已取代乌鳢、斑鳢，成为珠江三角地区主要的养殖品种（刘文奎，2007；Ghaedi *et al.*, 2016；卓孝磊等，2010）。随着鳢科鱼类大规模、高密度的养殖，其病害频繁发生，主要致病菌包括嗜水气单胞菌（孔祎頔等，2018）、舒伯特气单胞菌（*Aeromonas schubertii*）（王国良等，2009）、爱德华氏菌（*Edwardsiella tarda*）（陈言峰等，2014）、弗氏枸橼酸杆菌（*Citrobacter freundii*）（舒新华等，1998）、海豚链球菌（*Streptococcus iniae*）（陈言峰等，2015）等。而自2009年Liu等（Liu *et al.*, 2012）发现第一例舒伯特气单胞菌感染乌鳢以来，舒伯特气单胞菌感染鳢科鱼类引起的规模性死亡已对鳢养殖业造成了严重的经济损失（Chen *et al.*, 2012）。近十年来，舒伯特气单胞菌感染引起的内脏类结节病在养殖鳢科鱼类中流行，鳢科鱼类感染症状为肝、脾、肾肿大且有乳白色结节。该病发病病程较短、鱼体间传播速度迅速、有高死亡率，产生的类结节症状与诺卡氏菌感染鳢科鱼类后症状相似，很容易造成误诊，是鳢科鱼类的主要病害之一，对养殖鳢科鱼类危害极大，能对其造成巨大经济损失。

#### 1.2 舒伯特气单胞菌流行现状及临床症状

舒伯特气单胞菌（*A. schubertii*）分布范围广，在淡水、鱼类、土壤等中都存在，能感染致病人、畜禽和水产动物。曾从患者的皮肤脓液、血液和胸膜液等分离出（Hickman-Brenner *et al.*, 1988；冷如意等，1996；Amy *et al.*, 1989），还能引起坏死性筋膜炎，能感染患者伤口（Kao *et al.*, 2012）。有研究人员发现舒伯特气单胞菌是能使人类急性腹泻的病菌，有人食用有舒伯特气单胞菌的生鱼片导致食物中毒（刘向前等，1999），在检测食物中毒的样品中也检测出该菌（刘燕等，2001；高海英等，2002；陈玲等，2001），在腹泻患者体内以及大便里也检测出舒伯特气单胞菌（王晓萍等，2001；王立华等，2002），有报道在患病猪体内也分离出舒伯特气单胞菌（王茂法等，2006）。

在水产养殖中，2009年在湖北咸宁乌鳢养殖池塘，发生舒伯特气单胞菌病，这次舒伯特气单胞菌感染严重，导致大量乌鳢死亡，40天内的累积死亡率高达45%，解剖发现多个直径0.5-1毫米白色的坚硬结节，分散在整个肾脏，在肝脏中还发现了血凝块（Liu *et al.*, 2012）；2010年，Chen等人（2012）用患病乌鳢内脏组织制作病理学切片，在切片中

发现有许多舒伯特气单胞菌,切片观察到肝、心肌、肠和鳃受损,肝细胞坏死明显溶解,肾脏、脾脏坏死和充血,推测鱼类因为内脏器官衰竭死亡;2011年,刘春等人(2012)在广东佛山、广州两地的患病杂交鳊体内分离两株细菌,并鉴定为舒伯特气单胞菌,其肝、脾、肾上发现有白色的类结节,该类结节边缘整齐,整体平滑且柔软,且形成时间短,回归感染能感染杂交鳊和大口黑鲈;罗霞等人(2012)从广东佛山患病斑鳊中分离鉴定出舒伯特气单胞菌,对病变内脏组织类结节进行涂片观察发现,组织内白色类结节含有大量革兰氏阴性短杆菌,用不同浓度舒伯特气单胞菌进行人工感染,发现死亡快的鱼体,感染浓度较高,其内脏无白点,死亡慢的鱼,感染浓度低,肝脾肾上存在大量白点;2014年,齐冬梅等人(2016)从内脏有白色病灶的乌鳊的肝脏和肾脏中分离出舒伯特气单胞菌,回归实验发现,鱼感染死亡后,鱼的鳃盖四周出血,各个内脏呈黑色,而肠道是透明状,且肠有出血症状,对实验组活鱼进行解剖,发现内脏上有分散小白点。2016年,张德锋等(2017)从患病杂交鳊中分离出舒伯特气单胞菌,患病鱼体表出血,肝脾肾有坏死性病灶。回归感染实验,发现鱼在回归感染24 h后死亡,其症状是有腹水、肝、脾和肾肿大,感染后第三天死亡的鱼,其肝和脾有类结节症状产生。

自2009年以来,由舒伯特气单胞菌引起的内脏类结节病,每年都引起大量死亡,对鳊养殖产业的危害很严重。对罗非鱼养殖业的健康发展也造成危害,2017年养殖罗非鱼也出现舒伯特气单胞菌引起内脏类结节病的报道,发现直径为0.8-2.2毫米的多个白色结节分散在患病鱼的肝脏、脾脏和肾脏中。人工感染后,结节的迹象重现,病理组织学显示大量坏死病灶广泛分布于脾、肝、肾,并有大量细菌浸润(Liu *et al.*, 2018)。另外,近年在金鱼(Smith *et al.*, 2012)、蛙类(Pearson *et al.*, 2000)、贻贝(Latif-Eugen *et al.*, 2016)和虾(Yano *et al.*, 2015)等体内也分离出舒伯特气单胞菌,舒伯特气单胞菌对这些水产动物的养殖也构成了潜在的威胁。

### 1.3 舒伯特气单胞菌的生物学特性

舒伯特气单胞菌,属于气单胞菌科(*Aeromonadaceae*),气单胞菌属(*Aeromonas*),还被称作舒氏气单胞菌,对蔗糖和吲哚反应阴性,其氧化酶反应和触酶反应结果呈阳性(余华等, 2009; 魏美华等, 1994; Kokka *et al.*, 1992),甘露醇反应阴性是其他气单胞菌和舒伯特气单胞菌与区别开来的依据(Hickman-Brenner *et al.*, 1988),属于革兰氏阴性杆菌,舒伯特气单胞菌运动活泼,有单极鞭毛,有 $\beta$ -溶血。在5%绵羊血琼脂平板上,菌落呈灰白色、半透明状,细菌表面湿润光滑、有圆形中央隆起且边缘整齐(刘春等, 2012; 刘向前等, 1999);在双糖斜面上37℃培养24小时,舒伯特气单胞菌的菌苔较厚,颜色乳白;在SS琼脂平板上,37℃培养,18-24小时,菌落直径为1.5-2mm,表面状况与血平板上观察的一致(刘向前等, 1999);LB肉汤培养基中培养,舒伯特气单胞菌生长均匀,培养时间过长,培养液里会生成絮状沉淀,可在表面形成一层较厚菌膜。

目前,关于水产养殖中舒伯特气单胞菌病的研究主要集中在检测方法的建立,耐药性分析和中草药来抑杀病原菌等方面。舒伯特气单胞菌的检测方法的建立:1993年,Ash C等(1993)最早采用PCR分类鉴定人源舒伯特气单胞菌,此后常见检测鉴定舒伯特气单胞菌方法为菌落PCR;刘春(2012;2014)、沈锦玉(2014)和顾颖(2014)利用舒伯特气单胞菌的保守序列,设计引物,从而建立了双重PCR和两步法PCR的检测方法,此外,杨映等(2014)建立多重荧光定量PCR检测方法舒伯特气单胞菌的同时,还能检测,嗜水气和维氏气单胞菌;在荧光定量检测舒伯特气单胞菌上,Liu等人(2018)、刘礼辉等人(2019)分别设计了引物,建立了TaqMan MGB和实时荧光定量PCR检测方法。

舒伯特气单胞菌耐药性分析:余华等人(2009)报道头孢类药物和奇霉素能抑制其分离的舒伯特气单胞菌,表明舒伯特气单胞菌对这两种抗生素药物敏感,而舒伯特气单胞菌对磺胺异恶唑等抗生素耐药;莫金凤等人(2016)分离的舒伯特气单胞菌菌株对8种药物具有耐药性,如酰胺醇类等,对12种药物敏感,如新霉素等,而该菌株对氨苄西林敏感,与大多数气单胞菌对氨苄西林固有耐药性不同;Chen等人(2012)、罗霞等人(2012)分别对舒伯特气单胞菌进行了药敏实验,也发现发现头孢类、喹诺酮类药物能抑制舒伯特气单胞菌,对氯霉素、氟苯尼考、磺胺类药物有耐药性,不同菌株对四环素类药物敏感程度有差异;对鳢源分离株的耐药性和耐药基因进行检测与分析,发现其具有大环内酯类等8种耐药特征,该菌株通过PCR检测发现其携带大环内酯类 $mph(A)$ 等11种耐药基因(张德峰等,2017)。

舒伯特气单胞菌中草药防治:通过单筛和复筛多种中草药,发现以木瓜、乌梅为复方的中草药制剂对治疗杂交鳢舒伯特气单胞菌病有不错效果(周梦,2016);莫金凤等人(2016)通过喂食添加了复方中草药制剂的商品饲料,并用舒伯特气单胞菌对杂交鳢攻毒后,发现在中草药添加量为1.5%时,感染了舒伯特气单胞菌的杂交鳢死亡率只有7%,相对免疫保护率达到了84.4%。

## 1.4 气单胞菌毒力因子

### 1.4.1 外毒素

外毒素是由病原菌合成分泌的多肽分子,是许多病原菌的毒力因子,能破坏宿主体体防御屏障,保护细菌免受有害环境的侵害,在某些环境中具有选择性生长优势(Pastan *et al.*, 1989)。气单胞菌的外毒素主要有,细胞毒性肠毒素(cytotoxic enterotoxin)、溶血毒素(hemolysin)、气溶素(aerolysin)(Chakraborty *et al.*, 1986)。气溶素由II分泌系统分泌外排后,经过一系列的酶促反应形成成孔毒素,气溶素有一些的溶血活性还存在一定的细胞毒性。有研究发现嗜水气单胞菌的气溶素基因进行缺失后,其菌株丢失了溶血活性和细胞毒性,减弱了对动物的致病性(Chakraborty *et al.*, 1987)。溶血素是毒力因子,具有

溶血活性,同时还有细胞毒性和肠毒性的特点,与气溶素一样,溶血素也是一类成孔毒素。溶血素分为 $\alpha$ 溶血素和 $\beta$ 溶血素(Wretlind *et al.*, 1971; Wadström *et al.*, 1976)能造成可逆性溶血和不可逆溶血(Thelestam *et al.*, 1981)。肠毒素有两种:细胞毒性肠毒素和细胞兴奋性肠毒素,嗜水气单胞菌使巨噬细胞和上皮细胞产生炎性介质,诱导肠上皮细胞环腺苷酸(cAMP)分泌上调、细胞凋亡还有前列腺素的分泌上调(Epple *et al.*, 2004),根据与抗胆汁毒素反应差异,可分为热稳定性和热不稳定性细胞肠毒素(Chakraborty *et al.*, 1984; Potomski *et al.*, 1987)。

目前舒伯特气单胞菌在外毒素方面研究包括活性检测和基因序列分析。Carnahan 等人(1989)从病人伤口分离到两株舒伯特气单胞菌,溶血素均为阳性;Kokka 等人(1992)发现某些舒伯特气单胞菌产生的溶血素具有接触依赖性,培养于液体培养基时不会释放到细胞外环境中,与嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌不同;Chen 等人(2012)PCR 扩增鳢源舒伯特气单胞菌溶血素基因,发现与嗜水气单胞菌高度同源(94.1%);莫金凤等(2016)通过 PCR 扩增,确定鳢源舒伯特气单胞菌携带溶血性基因 *hly*;何山等人(2019)发现不同菌株舒伯特气单胞菌,其外毒素基因有差异。

#### 1.4.2 粘附因子

目前细菌的粘附因子包括菌毛、鞭毛、外膜蛋白和脂多糖等。黏附因子位于菌体表面,是接触机体第一步,与病原菌的致病性有关且多数细菌拥有多种粘附素(程宝艳等,2009)。如 S 层蛋白覆于细菌表面保护菌体,参与对宿主细胞的黏附过程,陈怀青等(1996)除验证 S 层蛋白对于宿主细胞的黏附作用外,还验证了嗜水气单胞菌且缺失了 S 层蛋白后其黏附力降低;外膜蛋白(Outer membrane protein)位于细菌外膜上,有研究发现一些外膜蛋白在细菌黏附过程中发挥作用(Rosalina *et al.*, 2010; Namba *et al.*, 2010),对维氏气单胞菌(*A. veronii*)外膜蛋白(OMP) *AI* 和 *A II* 基因进行系统性地研究,结果发现 *OMPA II* 和 *OMPA II* 均具有很高的保守性(康元环等,2014;与张海月等,2016);Brooks 等(2010)等研究表明不同来源的维氏气单胞菌均能编码 IV 型菌毛。Hadi 等(2012)等证实了 MSHA IV 型菌毛在 *A. veronii* 定殖和生物被膜形成过程中具有重要作用。

Cao 等人(2020)发现菌毛 T4P 缺失后,舒伯特气单胞菌颤动能力减弱,体内体外对细胞粘附能力均明显下降;脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞外壁的组成成分,Kokka 等人(1992)发现舒伯特气单胞菌脂多糖侧链异质或缺乏,其致病性、代谢能力较弱。

#### 1.4.3 胞外酶

胞外酶能增强病原菌增殖、入侵的能力,在革兰氏阴性菌致病过程中起重要作用。胞外酶主要包括弹性蛋白酶、脂肪酶、磷脂酶、几丁质酶、过氧化氢酶等,在细菌繁殖、入侵机体过程中发挥不同作用。脂肪酶能与白细胞相互作用(Rollof *et al.*, 1988),也可以脂

解产生游离脂肪酸对免疫系统功能造成影响,卵磷脂酶在细菌增殖、感染过程中提供磷酸盐(Buttke *et al.*, 1984)。在感染过程中几丁质酶通常与几丁质结合蛋白 CBPs(chitin-binding proteins)协同工作发挥作用(Frederiksen *et al.*, 2013)。过氧化氢酶也是某些致病菌逃避宿主天然防御的毒力因子,能够保护致病菌免受过氧化物等的毒害(耿风廷等, 2007; 王晓南等, 2009)。

Kokka 等人(1992)发现舒伯特气单胞菌有胞外酶活性,伤口部位分离的菌株与血液或胸膜液部位相比,蛋白水解活性更强,推测其有蛋白酶并在细菌性伤口感染中起重要作用;Chen 等人(2012)发现,弹性蛋白酶的分泌在不同菌株之间有差异;Liu 等人(2009)从舒伯特气单胞菌中纯化得到两种新的内切几丁质酶;何山等人(2019)扩增舒伯特气单胞菌的毒力基因,发现磷脂酶基因 *lip* 和弹性蛋白酶基因 *ela*、的扩增结果为阳性;而丝氨酸基因 *ahp* 和核酸酶基因 *exu* 均未扩增到。莫金凤等(2016)采用平板法,对鳢源舒伯特气单胞菌进行检测,发现该舒伯特气单胞菌的分离菌株存在溶血活性,还有脂肪酶活性以及蛋白酶活性,PCR 扩增出溶血性基因 *hly* 和弹性蛋白酶基因 *ela*, 未能扩增出 *lip* 基因;Chen 等(2012)对分离菌鳢源舒伯特气单胞菌的溶血素、脂肪酶、弹性蛋白酶等毒力因子上进行了检测,发现不同菌株具有的毒力因子存在差异,也未能扩增出 *lip* 基因。

#### 1.4.4 毒力因子的常用研究方法

目前,基因敲除(gene knockout)是已知研究细菌毒力基因功能的有效方法(梅雯, 2017),基因敲除是利用外源 DNA 与受体生物基因组同源片段进行同源重组,从而定向改变生物遗传特性的方法(Capecch *et al.*, 1989),是研究基因结构和功能,基因表达和调控及毒力因子致病性的重要技术(Yolanda *et al.*, 2008)。基因敲除优点在于其整合位点可确定、且整合精确,基因敲除转移基因频率也很高,而许多微生物的全基因组序列测定也奠定了基因敲除技术研究基因功能的基础(胡福泉等,2002)。目前基因敲除技术已广泛应用于一些细菌的毒力因子及其致病性研究,且取得了较好的效果,如Cao 等人(2020)通过基因敲除菌毛毒力因子,探究菌毛其对舒伯特气单胞菌的致病作用;张鸿等(2019)利用基因敲除构建铜绿假单胞菌 *PA1864* 基因缺失株,发现该细菌对宿主的致病性降低了,该菌的细胞毒性也随之降低;Bachtiar 等(2007)发现空肠弯曲菌荚膜多糖在粘附和侵袭人类胚胎上皮细胞中起着重要作用;有研究者用基因敲除技术发现外膜蛋白 T 是大肠杆菌(惠长野等, 2010)、大肠埃希菌的毒力因子(赵铁等, 2012);王小琳等人(2017)用同源重组敲除了香蕉枯萎病菌的过氧化氢酶基因,发现过氧化氢酶基因的产物通过清除宿主所分泌的活性氧,使香蕉枯萎病菌能躲避活性氧的杀害,以此在致病过程中发挥作用。

## 2 过氧化氢酶研究概况

### 2.1 过氧化氢酶概述

过氧化氢酶 (*Hydrogen Peroxidase*) 是细菌中的一种保守、稳定、高活力的蛋白酶, 又称触酶 (Catalase, CAT), 存在于动植物和微生物体内 (王凡强等, 2010)。生物的抗氧化保护系统则由同过氧化氢酶和超氧化物歧化酶 (*Superoxide dismutase*, SOD) 一起构成。过氧化氢酶 (CAT) 能解除氧自由基对生物的杀伤作用 (施志慧等, 2011; 黄永洪等, 2005)。过氧化氢酶在以往研究中主要以有益的方面来研究, 对生物体及人类生活做出贡献, 而过氧化氢酶在一些研究中表明, 也是某些致病菌逃避宿主天然防御的毒力因子, 保护细菌免受过氧化物的毒害 (耿风廷等, 2007; 王晓南等, 2009)。

CAT 依据不同来源, 可分为真核 CAT 和原核 CAT。依据有无血红素, 提出新的分类方法: 典型过氧化氢酶又称真过氧化氢酶, 含血红素, 过氧化氢酶-过氧化物酶, 也含血红素; 亚基都含有  $Mn^{2+}$ , 也称为锰过氧化氢酶 (张闻等, 2000)。

在植物中, 过氧化氢酶在抗氧化衰老等过程起重要作用。过氧化氢酶基因的表达及 CAT 活性均能被环境因子如植物激素类、光照及温度等多种外界因素影响。在动物中, 过氧化氢酶能影响生物体的正常生长发育, 动物各组织的生长发育与过氧化氢酶的活性相关 (Meng *et al.*, 2007)。在细菌中, 有许多产酶细菌, 能够产生过氧化氢酶, 许多研究者发现一些产过氧化氢酶的菌株, 为工业化生产过氧化氢奠定基础, 而在一些致病性细菌中, 过氧化氢酶担任毒力因子的角色, 在治病菌逃逸宿主天然防御中发挥作用; 如王小琳 (2017) 发现 CAT 通过清除活性氧在致病过程中起作用。

### 2.2 过氧化氢酶功能研究与环境胁迫

白杨等人 (2003) 扩增过氧化氢酶基因片段, 分析过氧化氢酶基因可能存在的生物学特性时, 发现过氧化氢酶基因片段可能存在抗原性和疏水性, 这些结果为用氧化氢酶作抗原的工作做出了贡献。Vincent H 等人 (2004) 构建了一个 MTB 的 *katG* 缺失突变体, 该突变体缺乏 *katG*, 并评估了该突变体在巨噬细胞和小鼠中复制和维持的能力, 发现 *KatG* 在 MTB 发病机制中的主要作用是分解吞噬细胞 NADPH 氧化酶产生的过氧化物。Lee 等人 (2005) 使用了一种过氧化氢酶的非极性、无标记缺失突变体, 证明了 *KatA* 在毒力和氧化渗透胁迫反应中起重要的作用, 揭示铜绿假单胞菌过氧化氢酶在应对环境压力和致病性相互作用中的特殊作用。李充璧等人 (2012) 正确克隆了过氧化氢酶基因, 该研究结果为快速简便地克隆筛选活性细菌过氧化氢酶基因奠定了基础。杨宁等人 (2016 年) 利用原核表达系统表达目的蛋白, 并对其菌株的过氧化氢酶基因进行了敲除, 研究发现缺失过氧化氢酶基因的后菌株抗氧化能力减弱, 且缺失过氧化氢酶基因双基因比缺失单基因菌株

抗氧化能力减弱。即通过研究过氧化氢酶基因发现了副溶血弧菌体内过氧化氢酶能影响该菌的生长，能够提高其在氧化环境中存活能力。

CAT 与 SOD 和过氧化物酶(POD)共同组成了生物体内活性氧防御系统(Hertel *et al.*, 1998)。在清除超氧自由基，过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成方面发挥重要作用。研究发现，在如阳光、盐、除草剂、温度、空气和病原感染的一些因素影响下，CAT 的表达会受到影响，因此，表明环境胁迫与 *cat* 基因的表达有密切关系，尤以过氧化氢、盐（氯化钠为代表）、氧和温度的影响最为明显 (Condon *et al.*, 1987)。

### 2.3 过氧化氢酶的应用

目前，CAT 广泛应用于现实生活和生产实践中，在食品行业、乳制品行业、医药行业、环保以及生物防治方面都有重要的应用价值（何照兴等，2001）。纺织工业和造纸工业已开始广泛使用  $H_2O_2$  替毒性的氯气来漂白和消毒。在食品和乳制品工业中，对奶制品利用  $H_2O_2$  进行低温杀菌，在食品烘焙过程中可用作食品疏松剂。在造纸和纸浆行业中，使用 CAT 来替代传统上  $SO_2$  和  $Na_2SO_3$  去除  $H_2O_2$  的方法。在环保上， $H_2O_2$  可以对除臭废水，也可以减少废水中芳环化合物和脂肪化合物（刘冰等，2005）。CAT 还可以在生产过程中降解残留的  $H_2O_2$  替代化学试剂位置。在临床医药方面，过氧化氢酶在体内或体外实验中均有抑制衰老的作用，对抗衰老方面有一定的价值（朱鸿等，2010；史训龙等，2011）。

在生物防治方面，利用现代分子生物学技术和基因工程方法研究发现，CAT 可刺激机体产生保护性的免疫反应，为过氧化氢酶分子作抗原的疫苗研制工作打基础(Radcliff *et al.*, 1997)。幽门螺杆菌将过氧化氢酶呈现在细菌表面，为免疫反应提供靶位。另外，过氧化氢酶将毒性氧代谢产物转化为水，使其免受中性粒细胞的杀伤 (Marais *et al.*, 1996)。而有些幽门螺杆菌依赖 CAT 等毒力因子逃避宿主的天然防御，在巨噬细胞吞噬体内存活 (Basu *et al.*, 1996)。也有研究表明肠出血性大肠杆菌可感知吞噬体的氧化应激，分泌过氧化氢酶，并降低宿主细胞活性氧 (ROS)，使其容易在宿主细胞中存活 (Wan *et al.*, 1996)。非特异性免疫在鱼体中发挥重要的作用，鱼类的非特异性免疫细胞在吞噬细菌后依靠  $H_2O_2$  的强氧化性来杀灭细菌，CAT 是一些水产病原菌的毒力因子，一些病菌通过 CAT 分解  $H_2O_2$  逃脱巨噬细胞的吞噬并生存繁殖，对鱼具有更高的毒性。

### 2.4 过氧化氢酶与巨噬细胞的吞噬机制

将巨噬细胞的吞噬机制分为氧依赖型杀菌机制和非氧依赖型杀菌机制。

氧依赖型杀菌机制：巨噬细胞吞噬病原时氧吸收增加，即所谓的呼吸爆发。呼吸爆发时产生氧自由基和氮自由基，对细菌和寄生虫有毒害作用。氧自由基：巨噬细胞呼吸爆发，其反应是氧分子的电子在 NADPH 氧化酶催化下，还原成  $O^{2-}$ 。根据局部环境刺激信号的

不同,巨噬细胞可极化为 M1 和 M2 型巨噬细胞(陆二梅, 2016)。巨噬细胞是 M1 型巨噬细胞在受到微生物碎片和 IFN- $\gamma$  刺激后形成,释放促炎因子 IL-12 和 TNF- $\alpha$  并激活 T 细胞; M2 型巨噬细胞是受到 IL-13 或 IL-4 的刺激而形成,通过释放 TNF- $\beta$ 、IL-10 等抗炎因子来抑制炎症反应,也可以促进组织新生和修复(Chen *et al.*, 2017)。鱼类巨噬细胞产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的衍生物是强效杀菌剂。某些细菌逃脱巨噬细胞的吞噬是通过过氧化氢酶抑制氧自由基的产生来实现,如爱德华氏细菌通过抑制牙鲈巨噬细胞氧自由基的产生,避免被氧自由基伤害,而在巨噬细胞内生存下来(Ishibe *et al.*, 2017)。氮自由基:鱼类能产生如 NO 的活性氮自由基,由精氨酸在 NO 合酶作用下合成,在神经系统中,NO 是细胞间和细胞内信使。组织化学研究表明,NO 合酶在大西洋鲑(Ostholm *et al.*, 2017)的中枢神经系统和脑内中存在;NO 合酶在生殖活跃鲑鱼的睾丸中不同细胞类型的表达存在差异(Pathak *et al.*, 2017)。细胞因子诱导后巨噬细胞可以使诱导型 NO 合酶合成 NO。鱼类吞噬细胞产生的 NO 具有一定的杀菌活性,但 NO 合成后可以形成更强的过氧化、硝化和亚硝化基团,如 OH<sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 NO<sub>2</sub><sup>+</sup> 发挥毒力作用。鲑鱼巨噬细胞活化后可杀灭一部分气单胞菌,而 NO 的抑制剂 L-单甲基-精氨酸,能抑制巨噬细胞的杀菌活性(Sin *et al.*, 1997); Stafford 等人(1997)表明金鱼在合成 NO 时,有精氨酸代谢依赖性,还推测除 NO 合酶外,转铁蛋白也能诱导鱼类巨噬细胞产生 NO;在虹鳟中能克隆出诱导型 NO 合酶全长基因(Ostholm *et al.*, 1994);在蝶螈、金鱼和鲑鱼视网膜的放射状胶质细胞,也含有 NO 合酶(Liepe *et al.*, 1994)。

非氧依赖型杀菌机制:巨噬细胞溶酶体含有各种酶类,它能够在巨噬细胞内杀灭一些鱼类病原菌,还可以分泌到巨噬细胞外发挥杀菌作用(Dautigny *et al.*, 1994)。巨噬细胞的凋亡使由基因控制的细胞自主有序的死亡,凋亡可以控制细菌的复制,而毒性较强的菌株会抑制巨噬细胞中凋亡的进行,导致细胞坏死引起周围巨噬细胞的持续感染。巨噬细胞还能产生具有广谱抗菌活性抗菌肽,对细菌有很强的杀伤作用。

### 3 研究目的与意义

本实验室前期研究发现:舒伯特气单胞菌强毒株触酶反应阳性,弱毒株触酶反应阴性,基因组分析发现强毒株具有过氧化氢酶 *cat* 基因,而弱毒株不具有,推测过氧化氢酶是舒伯特气单胞菌重要的毒力因子。因此,本研究通过同源重组基因编辑技术和重组质粒对舒伯特气单胞菌的 *cat* 基因进行敲除及回补,构建 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat*,对缺失株和回补株部分生物学特性及其致病特性进行研究,探讨过氧化氢酶对舒伯特气单胞菌致病性的影响,为该病的防治奠定理论基础。

## 第2章 舒伯特气单胞菌缺失株 $\Delta cat$ 和回补株 C-*cat* 的构建及验证

舒伯特气单胞菌分布范围广，在淡水、鱼类、土壤等中都存在，能感染致病人类、畜禽和水产动物。自 2009 年以来，由舒伯特气单胞菌引起的内脏类结节病，每年都引起大量死亡，对鳢养殖产业的危害很严重 (Liu *et al.*, 2012)。2017 年养殖罗非鱼也出现舒伯特气单胞菌引起内脏类结节病的报道 (Liu *et al.*, 2018)。另外，近年在金鱼 (Smith *et al.*, 2012)、蛙类 (Pearson *et al.*, 2000)、贻贝 (Latif-Eugen *et al.*, 2016) 和虾 (Yano *et al.*, 2015) 等体内也分离出舒伯特气单胞菌，舒伯特气单胞菌对这些水产动物的养殖构成了潜在的威胁。

舒伯特气单胞菌是鳢科鱼类重要的致病菌，近年来得到了较为广泛的关注，舒伯特气单胞菌病发病越来越严重对水产养殖造成了严重危害。目前，关于水产养殖中舒伯特气单胞菌病的研究主要集中在检测方法的建立、耐药性分析和中草药抑杀病原菌。本实验室前期研究发现对杂交鳢毒力较强的菌株 WL-2 触酶反应呈阳性，而对杂交鳢毒力较弱的菌株 LF1708 触酶反应呈阴性，基因组分析也发现 WL-2 株具有过氧化氢酶 *cat* 基因，而 LF1708 株没有 *cat* 基因，推测过氧化氢酶 *cat* 是舒伯特气单胞菌重要的毒力因子。本实验采用同源重组基因编辑技术构建 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$ ，在分子水平上采用荧光定量 PCR 方法检测 *cat* 基因表达量，并对过氧化氢酶 CAT 蛋白进行原核表达，制备多克隆抗体，从蛋白水平检测缺失株及回补株 CAT 蛋白表达情况。

### 1 材料

表2-1 本章所使用的菌株

Table 2-1 The strains used in this study

| 菌株或细胞                     | 来源                              |
|---------------------------|---------------------------------|
| 大肠杆菌DH5 $\alpha$          | 广州擎科生物科技有限公司                    |
| 大肠杆菌BL21                  | 广州擎科生物科技有限公司                    |
| pSET4s                    | 日本国立动物卫生研究所 (Daisuke Takamatsu) |
| pSET5s                    | 日本国立动物卫生研究所 (Daisuke Takamatsu) |
| pET32a 质粒                 | 北京索莱宝科技有限公司                     |
| <i>A. schubertii</i> WL-2 | 中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室      |
| 缺失株 $\Delta cat$          | 本实验                             |
| 回补株C- <i>cat</i>          | 本实验                             |

## 1.1 实验材料和试剂

DNA Marker、2×SYBR® Premix Star Max 购自 TaKaRa; Protein Maker 26616、限制性内切酶 Fast Digest *EcoRI*、Fast Digest *HindIII*、TRIzol Reagent 及 DMEM 细胞培养基购于 Thermo 公司; 无水乙醇购自广东光华科技股份有限公司; 三氯甲烷购自广州化学试剂场; 异丙醇购自国华集团化学试剂有限公司; 2×Es Taq Master Mix 购自康为世纪公司; LB 肉汤 (Luria-bertani Broth) 购自广州环凯生物科技有限公司; BHI 肉汤 (Brain Heart Infusion Broth) 培养基购自美国 BD 生物有限公司; Fast Digest Xcm I 购于美国 NEB 公司; 5×SDS 蛋白上样缓冲液、15% 聚丙烯酰胺凝胶预混液、三抗购自新赛美生物科技有限公司; 20 × PBS 缓冲液 (Phosphate Buffer Saline, PBS)、卡那霉素 (Kanamycin)、氯霉素 (Chloramphenicol)、1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH6.8) 购自北京索莱宝科技有限公司; 移液器枪头、离心管、八连管、96 孔板等购自美国 Axygen 公司。实验兔购自广州市赛柏诺生物科技有限公司, 完全佐剂和不完全佐剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司

## 1.2 仪器

表 2-2 本研究所用到的仪器设备

Table 2-2 The instrument and equipment used in this study

| 主要仪器设备                  | 厂商           |
|-------------------------|--------------|
| SDS-PAGE 蛋白电泳仪          | 美国西格玛有限公司    |
| CO <sub>2</sub> 细菌培养箱   | 中国海尔有限公司     |
| CO <sub>2</sub> 细胞恒温培养箱 | 中国海尔有限公司     |
| 恒温振荡培养箱                 | 美国伯乐生命医学产品公司 |
| 电子天平                    | 美国伯乐生命医学产品公司 |
| 紫外分光光度仪                 | 美国伯乐生命医学产品公司 |
| 麦氏比浊仪                   | 美国伯乐生命医学产品公司 |
| Gene Pulser Xcell 电穿孔仪  | 美国伯乐生命医学产品公司 |
| JYSPB型核酸电泳槽             | 日本三洋仪器设备公司   |
| 低温高速离心机                 | 美国赛默飞世尔科技公司  |
| ABI7500实时荧光定量pcr仪       | 美国赛默飞世尔科技公司  |
| Tecan Sunrise全自动酶标仪     | 帝肯(上海)贸易有限公司 |
| 超低温冰箱                   | 上海智城仪器设备公司   |
| 超净工作台                   | 上海良平仪器仪表有限公司 |
| PCR 仪                   | 美国百克曼公司      |
| 凝胶成像仪                   | 法国生物梅里埃公司    |
| 核酸电泳仪                   | 北京君如意公司      |

### 1.3 引物

本文使用软件 Primer 5.0 设计引物，见下表 2-3，由广州艾基生物技术有限公司合成。

表 2-3 本研究所用到的引物

Table 2-3 Primers used in this study

| 引物名称     | 引物序列   |
|----------|--|
| pSET4s-F | GCTATGACCATGATTACGCC                                 |
| pSET4s-R | GTTGTAAAACGACGGCCAGT                                 |
| Cm-F     | GTTCCGGCAAGTTCGTCATAGTAATTCGATGGGTTCCGAGG            |
| Cm-R     | CTTGCTCACATCGTTCTTGATGCACCGAACTAGAGCTTGATG           |
| Cat-A    | GCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGATCGGAGGCATTACC<br>AGGTAG |
| Cat-B    | GAGCCTCGGAACCCATCGAATTACGTAATGCACATCGCCCTT<br>GG     |
| Cat-C    | CAAGCTCTAGTTCGGTGGCAGATCGAGAAGACAGACAACTT<br>CAGCC   |
| Cat-D    | GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTGCATCGAGGGTGAG<br>TTCCCCT |
| Cat-E    | CGGTCGACATGAACTGGCGCAGCCG                            |
| Cat-F    | CGCTCGAGTTACTTCTGCTGAACAGTCC                         |
| 16S-F    | AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT                        |
| 16S-R    | TACGGCTACCTTGTTACGA CTTCACCCC                        |
| Qcata-F  | TCGCAAAATGGATGGCTTCG                                 |
| Qcata -R | TCCCATTTTCGGGTAGTCGCC                                |

## 2 方法

### 2.1 重组温敏自杀载体 pSET4s-*cat* 的构建

#### 2.1.1 细菌基因组提取

在 BHI 平板上对 *A. schubertii* WL-2 进行划线接种，于 28 °C 细菌培养箱培养 12h；挑单菌落接种于 5 mL BHI 液体培养基，于 28 °C 180 rpm 摇床振荡培养 12 h；1: 100 扩培至 10 mL BHI 液体培养基，于 28 °C 180 rpm 摇床振荡培养 3 h。细菌基因组 DNA 的提取参照细菌 DNA 提取试剂盒说明书方法，对所得产物进行采用琼脂糖凝胶电泳检测，并用分光光度计检测所得产物的浓度后，放入 -20 °C 冰箱保存备用。

## 2.1.2 氯霉素抗性基因 PCR 扩增

以pSET5s质粒为模板,用特异性引物 Cm-F/Cm-R(表3-3)扩增氯霉素抗性基因,扩增体系见表2-4,扩增程序如表2-5。

表 2-4 PCR 体系  
Table 2-4 The PCR systems

| 组分                              | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------------|----------------------|
| pSET5s                          | 2 $\mu\text{L}$      |
| Cm-F (10 $\mu\text{M}$ )        | 1.25 $\mu\text{L}$   |
| Cm-R (10 $\mu\text{M}$ )        | 1.25 $\mu\text{L}$   |
| 2 $\times$ Taq PCR MasterMix II | 25 $\mu\text{L}$     |
| ddH <sub>2</sub> O              | 20.5 $\mu\text{L}$   |
| Total                           | 50 $\mu\text{L}$     |

表 2-5 PCR反应条件  
Table 2-5 PCR reaction conditions

| 过程名称 | 温度                    | 时间    |
|------|-----------------------|-------|
| 预变性  | 95 $^{\circ}\text{C}$ | 3 min |
| 变性   | 95 $^{\circ}\text{C}$ | 30 s  |
| 退火   | 56 $^{\circ}\text{C}$ | 30 s  |
| 延伸   | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 1 min |
| 再延伸  | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min |

注: 变性、退火、延伸三步进行35个循环

PCR产物进行电泳后,用胶回收试剂盒回收产物,并采用微量紫外分光光度计检测其浓度。

2.1.3 *cat* 基因上下游同源臂 PCR 扩增

以 *A. schubertii* WL-2 株的基因组 DNA 为模板,用引物 Cat-A/Cat-B(表2-3)分别扩增 *cat* 基因的上下游片段。PCR 扩增体系及扩增程序参照表2-5,将 PCR 产物进行凝胶电泳分析,对目的条带进行切胶回收,使用微量紫外分光光度计检测浓度。

2.1.4 pSET4s-*cat* 质粒构建及提取

(1)通过融合 PCR(引物: pSET4s F 和 pSET4s R)(表2-3)将三个扩增片段合并扩增。

通过酶切、连接反应,将扩增产物克隆至温度敏感自杀载体 pSET4s 上,构建同源重组温敏自杀质粒 pSET4s-*cat*。

- (2) 将转化产物转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布在氨苄抗性 LB 平板 (100 $\mu$ g/mL) 上过夜培养, 筛选出的阳性克隆置于氨苄抗性 LB 液体中 37 $^{\circ}$ C 摇床 180 rpm 振荡培养 12 h, 提取质粒 pSET4s-*cat*。送测序公司进行质粒测序, 将阳性克隆 DH5 $\alpha$ -pSET4s-*cat* 菌液于 -80 $^{\circ}$ C 保存。
- (3) 将 DH5 $\alpha$ -pSET4s-*cat* LB 平板接种, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取阳性单克隆, 37 $^{\circ}$ C 摇床 180 rpm 振荡培养 14 h, 10000 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体并用质粒提取试剂盒提取质粒, 所得质粒通过琼脂糖凝胶电泳分析, 质粒浓度使用超微量分光光度计测定后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

## 2.2 A. schubertii WL-2 感受态细胞的制备

在无抗性 BHI 琼脂的平板上对 *A. schubertii* WL-2 进行划线, 28 $^{\circ}$ C 细菌培养箱中培养 16 h 后, 转接于 5 mL BHI 液体培养基, 放置 28 $^{\circ}$ C 180 rpm 的摇床中培养 12 h, 1: 100 扩培将上述菌液接种于 300 mL 无抗 BHI 液体培养基, 放置在 28 $^{\circ}$ C 摇床 180 rpm 中继续培养, 直至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8。

将 300 mL *A. schubertii* WL-2 培养液冰浴 30 min, 在 4 $^{\circ}$ C 3000 $\times$ g 离心 15 min, 弃去培养基, 加入预冷无菌去离子水重悬, 于 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm 离心 10 min, 并重复三次, 加入预冷 10% 无菌甘油溶液重悬, 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm 离心 10 min 重复三次, 弃上层甘油, 最后用预冷 1 mL 10% 无菌甘油重悬沉淀, 分装于 1.5 mL 离心管, 每管为 100  $\mu$ L, 将 *A. schubertii* WL-2 株感受态细胞放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

## 2.3 质粒电转化感受态细胞

全程注意无菌操作, 从 -80 $^{\circ}$ C 取出感受态细胞 *A. schubertii* WL-2 株置于冰上融化。吸取 2  $\mu$ L 质粒 (质粒浓度约为 1 ng) 加入感受态细胞中并轻轻吹打混匀, 冰上放置 10 min。取 1 mm 电转杯用预冷 10% 无菌甘油洗三遍后预冷 10 min, 将质粒感受态混合物加入后冰上静置 10 min, 电转杯拿出将杯身用纸擦干后插入电转槽, 设置电转仪参数: 2.1 KV, 一个脉冲进行电转, 电转完成后迅速加入 1 mL 预冷的无抗 BHI 液体培养基轻轻混匀, 随后于 28 $^{\circ}$ C 振荡培养箱 180 rpm 培养 2 h。

## 2.4 缺失株诱导与 PCR 鉴定

### 2.4.1 缺失株的诱导与 PCR 鉴定

将培养菌液离心 5 min 弃去 1 mL 上层培养液后重悬沉淀, 将剩余 100  $\mu$ L 菌液用涂布棒涂于氯霉素抗性 BHI 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 36 h 诱导突变。挑取含氯霉素抗性的 BHI 琼脂平板上的单克隆溶于 100  $\mu$ L 无菌去离子水, 用检测引物 Cat-A/Cat-B (表 2-3) 进行 PCR 扩增, 扩增体系见表 2-6, 程序见表 2-7, 将电泳结果有双条带菌株于氯霉素抗

性 BHI 平板划线, 37 °C 培养箱继续诱导培养, 直至检测结果只有缺失株的单一一条带, 缺失株命名为  $\Delta cat$ 。将产物送至广州艾基生物公司测序, 结果比对。

表 2-6 PCR 体系

Table 2-6 The PCR system

| 组分                              | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------------|----------------------|
| 菌液                              | 1 $\mu\text{L}$      |
| Cat-A (10 $\mu\text{M}$ )       | 1 $\mu\text{L}$      |
| Catj-B (10 $\mu\text{M}$ )      | 1 $\mu\text{L}$      |
| 2 $\times$ Es Taq PCR MasterMix | 12.5 $\mu\text{L}$   |
| ddH <sub>2</sub> O              | 9.5 $\mu\text{L}$    |
| Total                           | 25 $\mu\text{L}$     |

表 2-7 PCR反应条件

Table 2-7 The PCR reaction conditions

| 过程名称 | 温度                    | 时间    |
|------|-----------------------|-------|
| 预变性  | 98 $^{\circ}\text{C}$ | 3 min |
| 变性   | 98 $^{\circ}\text{C}$ | 30 s  |
| 退火   | 55 $^{\circ}\text{C}$ | 30 s  |
| 延伸   | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 1 min |
| 保温   | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min |

注: 变性、退火、延伸三步进行30个循环

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。将电泳结果有双条带菌株于氯霉素抗性 BHI 平板划线, 37 °C 培养箱继续诱导培养, 直至检测结果只有缺失株的单一一条带, 缺失株命名为  $\Delta cat$ 。将产物送至广州艾基生物公司测序, 将测序结果比对。

#### 2.4.2 遗传稳定性检测

将缺失株  $\Delta cat$  在氯霉素抗性 BHI 琼脂培养基通过划线接种传代 30 代, 随机挑取单菌落用检测引物 Cat-A/Cat-B 菌落 PCR 检测缺失株稳定性, 扩增体系和扩增程序参照 2.4.1。

### 2.5 重组质粒 pSmart -*cat* 的构建

#### 2.5.1 细菌基因组的提取

用细菌 DNA 试剂提取盒提取 WL-2 DNA, 步骤同 2.1.1

2.5.2 *cat* 基因片段的扩增

用引物 Cat-C / Cat-D 扩增启动子和含有 Xcm I 酶切位点 *cat* 基因片段, 用胶回收试剂盒, 纯化回收片段, 测定浓度后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。PCR 体系见表 2-8, 扩增程序见上表 2-7。

表 2-8 PCR 体系

Table 2-8 The PCR systems

| 组分                               | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------------------|----------------------|
| WL-2的全基因组DNA                     | 1 $\mu\text{L}$      |
| Cat-C (10 $\mu\text{M}$ )        | 1 $\mu\text{L}$      |
| Cat-D (10 $\mu\text{M}$ )        | 1 $\mu\text{L}$      |
| 2 $\times$ Es Taq PCR Master Mix | 12.5 $\mu\text{L}$   |
| ddH <sub>2</sub> O               | 9.5 $\mu\text{L}$    |
| Total                            | 25 $\mu\text{L}$     |

## 2.5.3 质粒 pSmart-HCKan 提取

将卡那霉素抗性载体质粒 p Smart-HCKan 转入 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  震荡培养箱 180rpm 震荡培养 12-16h。用质粒提取试剂盒提取质粒, 并用微量分光光度计测定浓度和后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

2.5.4 回补重组质粒 pSmart -*cat* 的构建

用限制性内切酶 Xcm I 酶切抗性质粒和 *cat* 基因片段, 纯化回收并测定回收浓度。Xcm I 酶切体系见表 2-9, 酶切反应条件,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15min。

表 2-9 酶切体系

Table 2-9 The enzyme digestion systems

| 组分                   | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------|----------------------|
| 10 $\times$ NEBuffer | 5 $\mu\text{L}$      |
| pSmart-HCKan         | 3 $\mu\text{L}$      |
| Xcm I                | 2 $\mu\text{L}$      |
| ddH <sub>2</sub> O   | 40 $\mu\text{L}$     |
| Total                | 50 $\mu\text{L}$     |

利用 solution I 分别对纯化回收的 *cat* 基因和酶切过后的 pSmart 进行连接, 构建重组质粒 pSmart -*cat*, 连接体系见表 2-10, 连接反应条件:  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4h。

表 2-10 连接体系

Table 2-10 The ligation systems

| 组分           | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------|----------------------|
| Solution I   | 2.5 $\mu\text{L}$    |
| pSmart-HCKan | 0.5 $\mu\text{L}$    |
| <i>cat</i>   | 2 $\mu\text{L}$      |
| Total        | 5 $\mu\text{L}$      |

产物转化入感受态 DH5 $\alpha$ ，以卡那霉素抗性 LB 平板筛选阳性克隆，提取重组质粒 pSmart-*cat*，用载体引物进行 PCR 检测并测序，测序正确后提取质粒，保存备用。

## 2.6 缺失株 $\Delta cat$ 感受态细胞的制备

缺失株  $\Delta cat$  感受态细胞的制备方法同 2.2

## 2.7 *cat* 基因缺失株 $\Delta cat$ 回补株的构建

将连接产物用电转法参照 2.3 步骤，电转入提前制备的缺失株  $\Delta cat$  感受态细胞，加入 1ml BHI 的液体培养基，28  $^{\circ}\text{C}$  摇床，180rpm 振荡培养，离心弃去 1ml 上清，将余下吹打混匀涂布含卡那抗性 BHI 平板，28  $^{\circ}\text{C}$  培养 16h。挑取平板上的单菌落于 BHI 液体培养基 28  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养，进行 PCR 鉴定。阳性的克隆即为回补株。

## 2.8 实时荧光定量检测基因表达量

利用荧光定量 PCR 方法检测 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 中基因的表达量，培养菌株后使用 trizol 提取分别提取三株菌的 RNA，测定其浓度后进行去除 DNA 和反转录成 cDNA，以野生株 WL-2 为对照组，选取能够稳定表达的 16Sr RNA 为内参基因，每个对照组及实验组做 3 个重复；将模板稀释 10 倍和 100 倍，用 TAKARA 公司 TBGreen<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量试剂盒说明书进行操作。RT-PCR 反应体系见表 2-11 和反应条件见表 2-12。

表 2-11 RT-PCR 反应体系

Table 2-11 The RT-PCR systems

| 组分  | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|---|----------------------|
| TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) | 10 $\mu\text{L}$     |
| Primer F (10 $\mu\text{M}$ )                              | 0.8 $\mu\text{L}$    |
| Primer R (10 $\mu\text{M}$ )                              | 0.8 $\mu\text{L}$    |
| ROX Reference Dye II (50 $\times$ )                       | 0.4 $\mu\text{L}$    |
| DNA 模板  | 2 $\mu\text{L}$      |
| ddH <sub>2</sub> O  | 6 $\mu\text{L}$      |
| Total   | 20 $\mu\text{L}$     |

表 2-12 RT-PCR反应条件

Table 2-12 The RT-PCR conditions

| 过程名称 | 温度  | 时间   |
|------|-----|------|
| 预变性  | 95℃ | 30 s |
| 变性   | 95℃ | 5 s  |
| 退火延伸 | 60℃ | 34s  |

注：变性、退火、延伸三步进行40个循环

## 2.9 重组质粒 PET32a-CAT 构建及表达

用 Cat-E / Cat-F 引物 PCR 扩增  $cat$  基因上下行 DNA 片段，克隆到表达载体 pET32a (+)，转化至大肠杆菌 BL21，筛取阳性单菌落，将大肠杆菌接种于 300ml LB/ Amp 培养基中，37 °C，150 rpm，培养至培养物的 OD<sub>600</sub> 达到 0.6。加入 IPTG 后进一步诱导培养 6 小时。对菌体以 10000rpm /min 的速度离心 2min，用 10ml PBS 重悬。再进行 SDS-PAGE 后，用 KCL 将蛋白染成银白色，将银白色蛋白条带切下，放入 PBS 中在摇床上摇至银白色褪去，后将胶剪碎放入 1.5ml 离心管并用 PBS 没过，放于 4 °C 反复冻融后，3000 rpm 离心 5 min 吸取上清液。用 SDS - PAGE 纯化鉴定，检测蛋白浓度，放-20 °C 备用。

## 2.10 多克隆抗体的制备及鉴定

### 2.10.1 多克隆抗体的制备

将纯化 CAT 蛋白从-20 °C 冰箱中取出常温溶解。1: 1 抽取抗原和完全佐剂并混匀，注射 0.5ml 混有完全佐剂的抗原，抗原浓度为 1mg/ml；二免到四免时抗原浓度为 0.5mg/ml，混合佐剂换成不完全佐剂；首免和二免的间隔时间第 14 天，二免后 7 天进行三免；三免后的第 7 天，取血清进行效价检测；检测合格后，7 天后再一次免疫。

采集全血放至离心管中，放置在 37 °C 水浴锅，水浴 15-30 分钟后取出，待冷却后置入 4 °C 冰箱内，血液自动分层后，将上清液放置在 50ml 离心管中用 12000 rpm 离心 2min，将上清液转移到干净离心管中，50ml 上清液加入 100ul 10% 硫柳汞钠溶液(终浓度 0.02%)，混匀后-20 °C 保存。

### 2.10.2 iELISA 鉴定多克隆抗体

用 1 $\mu$ g/ml 的 CAT 蛋白作为抗原进行 iELISA 血清效价检测。待检样品分别稀释 1: 200、1: 1000、1: 4000、1: 16000、1: 64000、1: 256000、1: 1024000 羊抗兔-HRP 二抗采用 1:5K 的比例，最后加入 TMB 底物溶液于已预热过的酶标仪中 (450nm) 进行读数，保存数据，进行分析。

### 2.10.3 抗 CAT 蛋白多克隆抗体 Western blot 鉴定

样品处理及电泳：*A. schubertii*WL-2 于 BHI 平板接种划线，挑单菌落接种于 5 mL BHI 液体培养基，于 28 °C 180 rpm 摇床振荡培养 12 h 后，收集菌体用 100ul PBS 重悬。按预混胶的配置说明书制备 SDS-PAGE 凝胶，进行电泳后转膜，用制备的多克隆抗体孵育，加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG（1:4000）37 °C 孵育。用加强 HRP-DAB 显色试剂盒显色，步骤参考说明书。

### 2.11 缺失株和回补株 CAT 蛋白表达鉴定

*A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 三株菌进行 Western blot，步骤同 2.10.3。

## 3 结果

### 3.1 舒伯特气单胞菌缺失株的构建及 PCR 鉴定

提取 *A. schubertii*WL-2 的基因组，WL-2 基因组用引物分别对 *cat* 基因上、下游的同源基因序列分别进行扩增，并扩增 Cm 抗性片段，再利用酶切和连接反应将上下游基因序列和 cm 抗性片段连接，再融合至温敏自杀载体 pSET4s，成功构建同源重组温敏自杀质粒 pSET4s-*cat*，将质粒电转入由 *A. schubertii* WL-2 制备的感受态细胞后进行诱导，利用 Cat-C/ Cat-D 引物筛选阳性克隆以获得 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$ （如图 2.4），经过 30 代盲传后，PCR 验证结果与预期相符（如图 2.5）；继而对 PCR 产物进行测序，通过测序结果确定 *cat* 基因缺失成功，随后与 *A. schubertii* WL-2 回补株 C-*cat* 进行 Western blot（图 2.10）表明构建的 *cat* 基因缺失突株  $\Delta cat$  无 CAT 蛋白表达。

#### 3.1.1 温敏自杀质粒的构建

将三个扩增片段 *cat* 上游同源臂，Cm 和 *cat* 下游同源臂进行合并扩增，其扩增产物通过酶切、连接反应克隆至温度敏感自杀载体 pSET4s，温敏自杀质粒 pSET4s-*cat* 构建方法如图 2.1，再将连接产物转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞，筛选阳性克隆并提取质粒 pSET4s-*cat* 后，进行琼脂糖凝胶电泳检测（如图 2.2），送艾基公司的测序结果与设计预测的序列一致，表明成功构建同源重组温敏自杀质粒 pSET4s-*cat*。

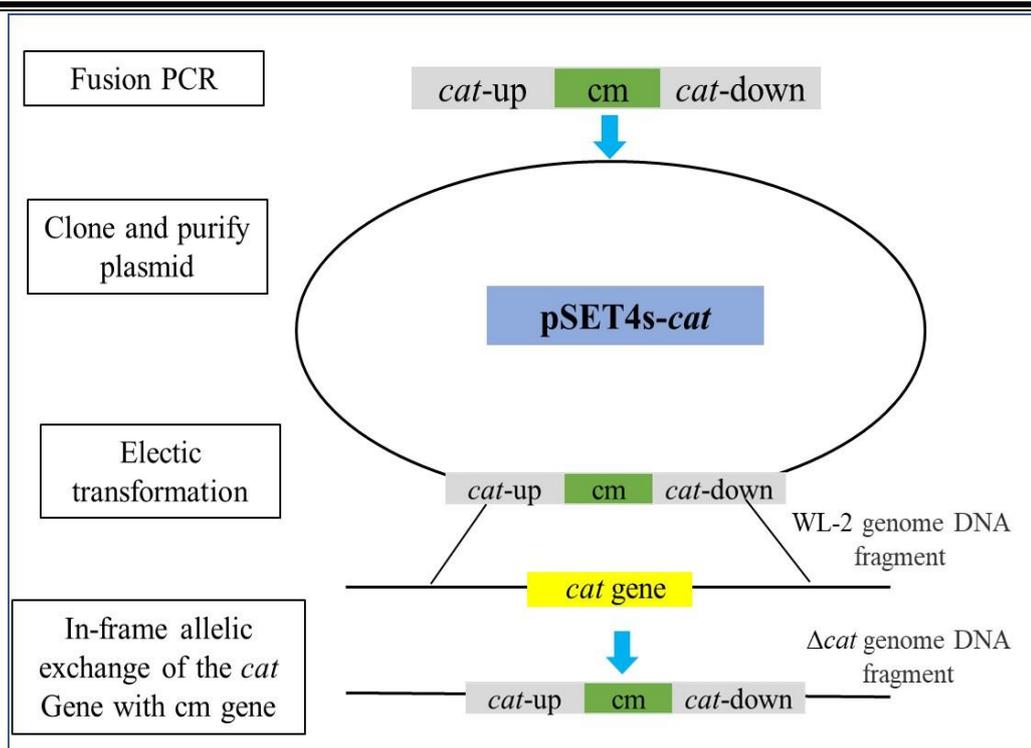


图 2.1 温敏自杀质粒 pSET4s-*cat* 构建及重组示意图

Fig. 2.1 Schematic diagram of the construction of thermosensitive suicide plasmid pSET4s-*cat*

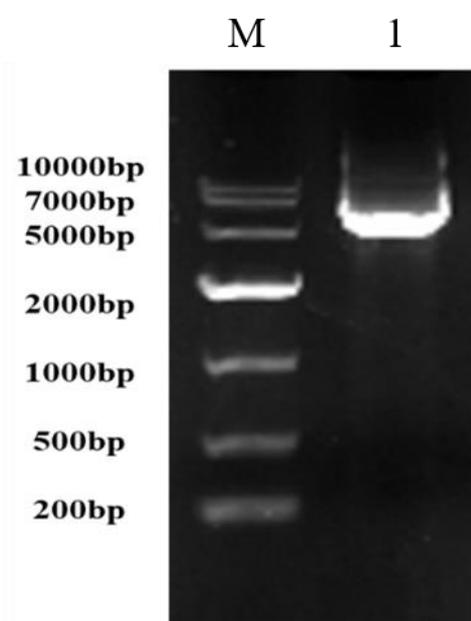


图 2.2 重组自杀性质粒 pSET4s-*cat* PCR 检测

Fig. 2.2 PCR of recombinant suicide plasmid pSET4s-*cat*

M:DL10000 Maker ; 1: pSET4s-*cat* 温敏自杀质粒

### 3.1.2 *cat* 基因缺失株的构建与筛选

将自杀质粒 pSET4s-*cat* 电转入目标菌株 *A. schubertii* WL-2 感受态细胞中, 并利用引物 Cat-C/Cat-D 进行菌落 PCR 检测, 筛选重组菌株; 重组自杀性载体 pSET4s-*cat* 进入感受态细胞后, 将 *cat* 基因缺失片段整合至 *A. schubertii* WL-2 的基因组中, 在对菌株进行筛选时, 我们发现 PCR 结果中存在两个目的片段, 第一个片段大小为 1867bp, 来自于构建重组自杀质粒中携带的 *cat* 基因缺失片段, 第二个片段大小为 1392bp, 来自细菌本身的基因组, PCR 结果与预期相符 (如图 2.3)。将检测到的双条带疑似缺失株在氯霉素抗性 BHI 平板上 4 区划线, 于 37 °C 培养箱继续诱导培养, 直至筛选到缺失株  $\Delta cat$  为单一条带。

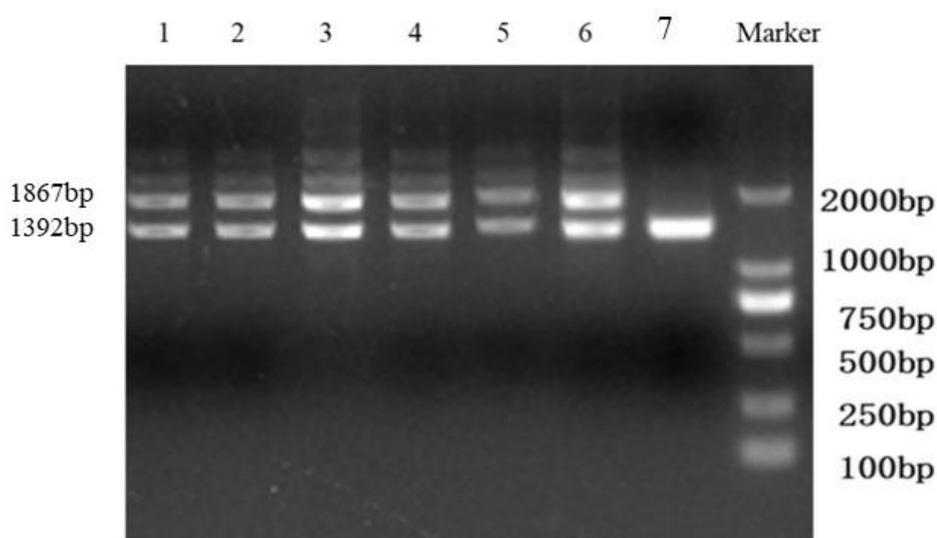


图 2.3 缺失株  $\Delta cat$  筛选

Fig. 2.3 Screening of the mutant strain  $\Delta cat$

第 1-6 泳道为筛选的缺失株  $\Delta cat$ , 扩增片段有两条, 第一个片段大小为 1867 bp, 第二个片段大小为 1392bp; 第 7 泳道为舒伯特气单胞菌 WL-2, 扩增单一片段大小为 1392bp, 与野生株扩增片段相比多大约 581bp; 第 8 泳道是 Marker。

### 3.1.3 缺失株 $\Delta cat$ PCR 鉴定

用检测引物 Cat-A/Cat-B 对缺失株  $\Delta cat$  进行鉴定, 图 2.4 为 PCR 检测结果, 缺失株  $\Delta cat$  的一个扩增条带大小为 1867 bp, 野生株 WL-2 的一个扩增条带大小为 1392 bp, 将缺失株  $\Delta cat$  的 PCR 扩增产物送至广州艾基生物科技有限公司进行测序, 经过比对确认位点缺失成功。

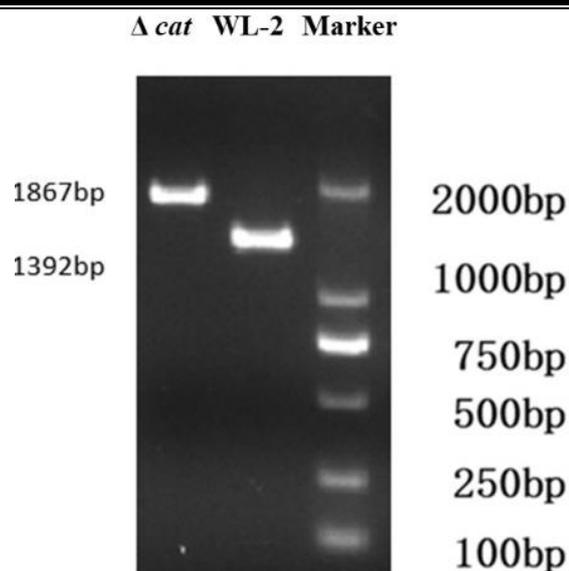


图 2.4 缺失株  $\Delta cat$  鉴定

Fig. 2.4 Identification of the mutant strain  $\Delta cat$

### 3.1.4 遗传稳定性检测

将缺失株  $\Delta cat$  在氯霉素抗性 BHI 琼脂培养板通过划线接种传代 30 代, 随机挑取单菌落用检测引物 Cat-A/Cat-B PCR 检测缺失株稳定性, PCR 结果显示 (如图 2.5), 被检测的菌株扩增条带大小为 1867bp, 而从野生株菌株扩增条带为 1392bp, 说明缺失株稳定遗传。

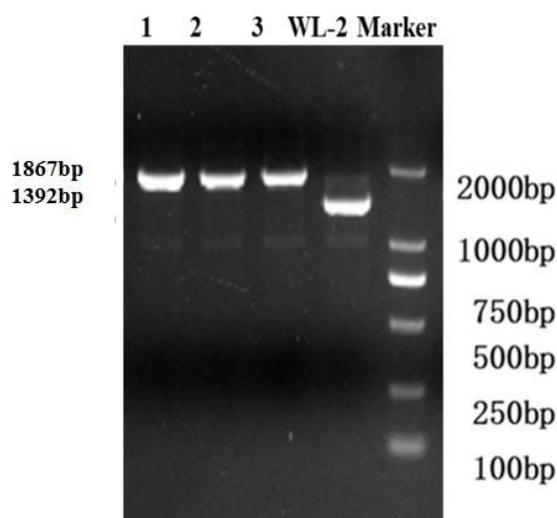


图 2.5 缺失株  $\Delta cat$  稳定性检测

Fig. 2.5 The stability testing of the mutant strain  $\Delta cat$

第 1-3 泳道为遗传稳定性检测的缺失株  $\Delta cat$ , 扩增片段大小为 1867 bp; 第 4 泳道为舒伯特气单胞菌 WL-2, 扩增单一片段大小为 1392bp, 比野生株扩增片段相比多大约 581bp, 第 5 泳道是 Marker。

### 3.2 回补株 C-*cat* 的构建及 PCR 鉴定

回补质粒构建：首先利用 Cat-D/ Cat-E 引物扩增含启动子和 Xcm I 酶切位点的 *cat* 基因片段（如图 2.6A）后胶回收，对提取的 p Smart-HCKan 质粒（如图 2.6B）用限制性核酸内切酶 Xcm I 酶切并纯化回收，将回收的产物连接构建重组质粒 p Smart-*cat* 并进行电泳分析（如图 2.6C）片段约为 4000bp，结果与预期相符，且测序结果比对正确。表明成功构建了重组质粒 pSmart-*cat*。

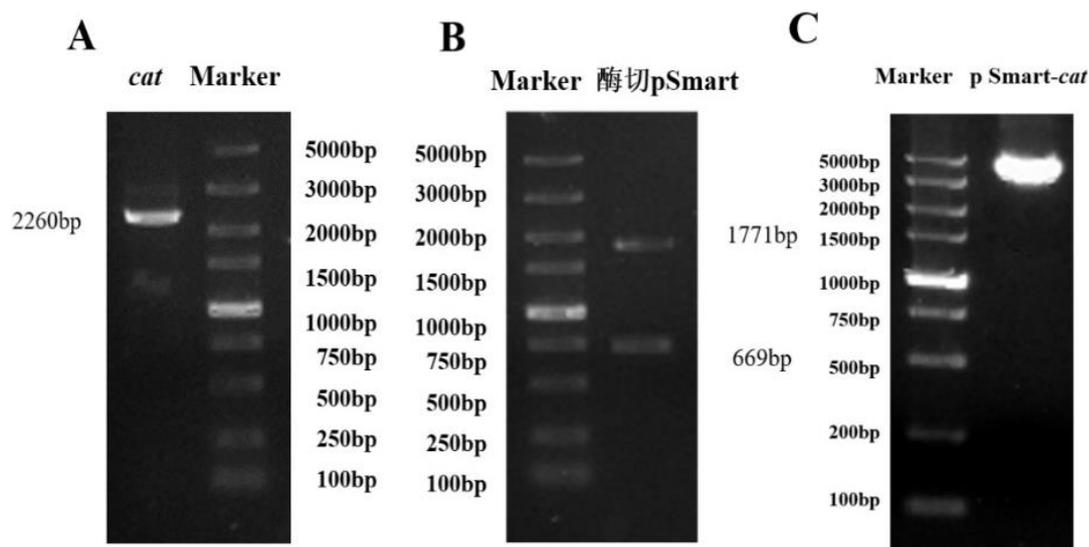


图 2.6 Xcm I 酶切*cat*基因和pSmart-HCKan质粒及重组质粒pSmart- *cat*

Fig. 2.6 Xcm I enzyme *cat* genes and pSmart - HCKan plasmid and pSmart- *cat*

A: Xcm I 酶切*cat*基因; B: Xcm I 酶切 pSmart-HCKan; C:重组质粒p Smart- *cat*

回补株的构建：将重组质粒电转至缺失株 $\Delta cat$  感受态细胞中，卡那抗性平板筛选阳性菌株并用引物Cat-E/Cat-F进行验证，回补株扩增出的基因片段与野生株WL-2和缺失株 $\Delta cat$ 的条带一致。如图2.7，表明成功构建缺失株 $\Delta cat$ 的回补株C-*cat*。

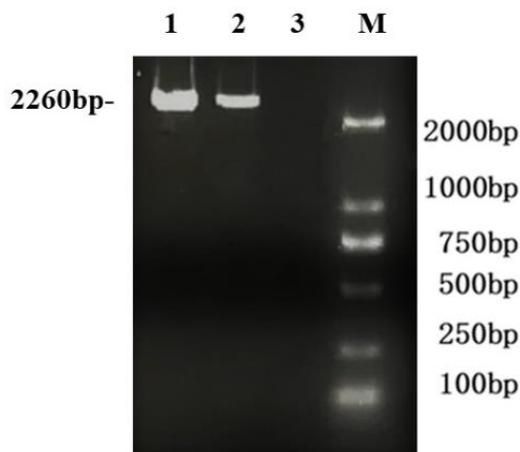


图 2.7 野生株WL-2、缺失株 $\Delta cat$ 和回补株C-*cat*检测

Fig. 2.7 The detection of WL - 2 strains, the mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C - cat  
第1泳道为舒伯特气单胞菌 WL-2; 第2泳道为回补株 C-cat; 第3泳道为缺失株  $\Delta cat$ ; 第4泳道是 Marker。

### 3.3 实时荧光定量检测基因表达量

用荧光定量 PCR 方法检测 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 中基因的表达量, 结果表明, 如图 2.8, 野生株 WL-2 中基因相对表达率为 1.00, *cat* 缺失后, 缺失株 *cat* 基因未表达, 其表达率为 0.02, 回补株的表达量为野生株的 0.69 倍, 证实了基因缺失株与回补株构建成功。

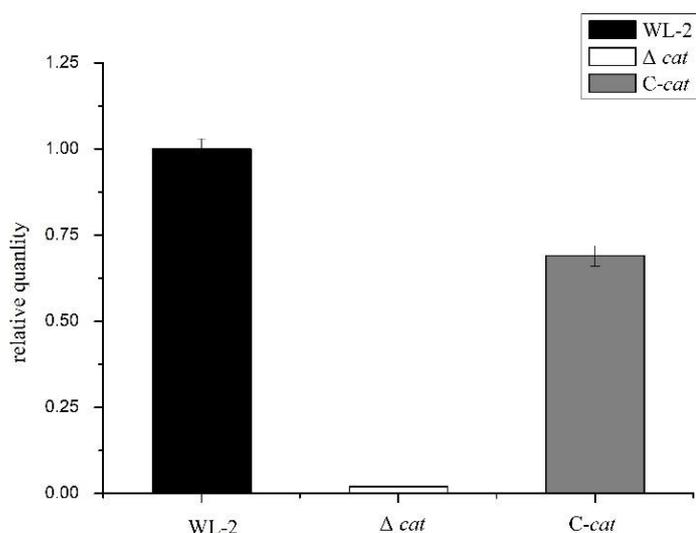


图 2.8 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 中 *cat* 基因的表达水平

Fig. 2.8 The expression level of *cat* gene of WL - 2 strains, the mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C - cat

### 3.4 缺失株和回补株 CAT 蛋白表达鉴定

#### 3.4.1 重组质粒 PET32a-CAT 构建及表达

用 Cat-E/Cat-F 引物进行菌落 PCR 筛选阳性单菌落, 用 1.0 mmol/L IPTG 诱导 6h, 样品处理后, 对诱导菌液进行 SDS-PAGE, 切胶纯化 CAT 蛋白。再用 SDS-PAGE 鉴定纯化的 CAT 蛋白, 用 Bradford 法测蛋白质浓度为 0.5mg/ml 后放 -20 °C 备用。

#### 3.4.2 抗 CAT 蛋白多克隆抗体制备及鉴定

##### (1) 血清效价检测

用间接 ELISA 测定了兔抗 CAT 蛋白血清的效价结果如表 2-13 所示。结果表明, 抗血清效价高达 1/124000, OD 值 0.363, P/N 为 4.745。

表2-13 抗血清效价ELISA检测结果

Table 2-13 Antiserum titer ELISA test results

| 血清稀释倍数 | 1/250  | 1/1K   | 1/4K   | 1/16K  | 1/64K  | 1/256K | 1/124K |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OD值    | 1.843  | 1.982  | 1.849  | 1.823  | 1.344  | 0.859  | 0.363  |
| P/N    | 24.092 | 25.908 | 24.170 | 23.824 | 17.569 | 11.222 | 4.745  |
| 结果     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      |

注：“+”表示阳性结果

P:血清不同稀释倍数的OD值，N:正常兔血清稀释后的OD值。

## (2) 抗CAT蛋白多克隆抗体Western blot鉴定

用*A. schubertii* WL-2全菌蛋白做抗体，对抗CAT蛋白多克隆抗体进行Western blot鉴定，结果如图2.9，结果显示，多克隆抗体能识别*A. schubertii* WL-2的CAT蛋白，条带大小为56kDa。表明，抗CAT蛋白多克隆抗体成功制备。

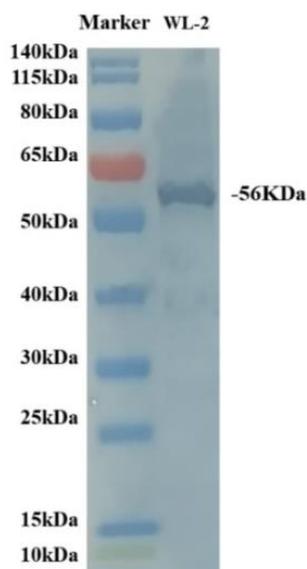


图 2.9 抗CAT蛋白多克隆抗体Western blot鉴定

Fig. 2.9 Western blot identification of polyclonal antibody against CAT protein

### 3.4.3 缺失株 $\Delta cat$ 和回补株 *C-cat* CAT 蛋白鉴定

*A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat* 三株菌的 Western blot 结果如图 2.10 所示，*A. schubertii* 野生株 WL-2 和回补株 *C-cat* 在 56kDa 处有条带，而缺失株  $\Delta cat$  无条带，结果表明，*A. schubertii* 野生株 WL-2 和回补株 *C-cat* 有 CAT 蛋白表达，而缺失株  $\Delta cat$  无 CAT 蛋白表达。

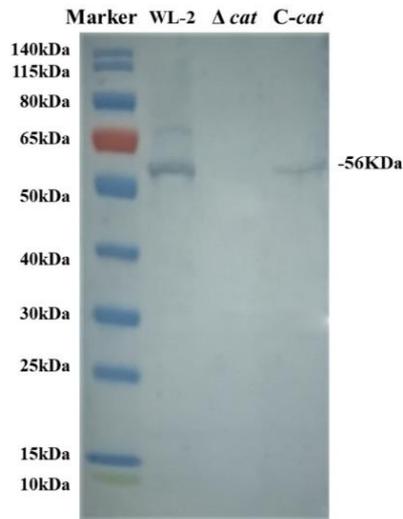
图 2.10 野生株WL-2、缺失株 $\Delta cat$ 和回补株 $C-cat$  CAT蛋白鉴定

Fig. 2.10 Western blot identification of WL - 2 strains, the mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain  $C - cat$

## 4 讨论

近年来对于舒伯特气单胞菌研究较少,且大多是对其进行分离鉴定以及药物敏感性分析研究,而病原菌的毒力研究一直是难点,因此对于舒伯特气单胞菌的毒力因子和致病机制更是少有研究。在病原菌毒力因子的研究中,除了常见的毒力因子如溶血素、鞭毛、蛋白酶、脂多糖等外也在发掘更多未知作用的基因,如  $cat$  基因编码的过氧化氢酶的毒力在多种病原菌中被证实与细菌毒力及致病性相关;一些幽门螺杆菌通过过氧化氢酶等毒力因子逃逸宿主的天然防御使其抵御巨噬细胞吞噬 (Basu *et al.*,2004)。血性大肠杆菌分泌过氧化氢酶来降低宿主细胞 ROS 含量,使其易在宿主细胞中存活 (Wan *et al.*,2017),目前  $cat$  基因作为毒力因子在舒伯特气单胞菌中作用还未有研究,而敲除是研究基因功能的常用手段,因此,本研究利用同源重组技术构建过氧化氢酶  $cat$  基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株  $C-cat$ ,研究过氧化氢酶在舒伯特气单胞菌中的作用。

针对气单胞菌基因的研究中,采用自杀性质粒介导的同源重组技术敲除相关靶基因较多,如 Cao 等人 (2020) 采用温敏自杀性质粒敲除舒伯特气单胞菌的 T4P 合成相关基因簇  $pilM/N/O/P/Q$ ,成功构建了  $\Delta pilI$  突变株,王冬雪等人 (2019) 采用自杀性质粒分别构建了维氏气单胞菌  $rpoN$  基因的缺失株  $\Delta rpoN$ , 以及其回补株  $C-rpoN$ 。自杀性质粒的种类繁多,一般通过两种方式即正向选择和负向选择筛选同源重组的缺失突变株 (Vasquez *et al.*,2001;Wan *et al.*,2004),在负向选择方式中,目标菌株难以获得基因缺失突变株,需要进行多种实验条件的摸索;而在正向选择方式中,整合抗性基因至目标菌株基因组中,可通过相应的抗性对缺失突变株进行筛选,操作方便快捷且成功率高 (Hadi *et al.*, 2012;余泽

辉, 2018; 安鼎杰, 2018), 基于本课题组前期经验, 本研究采用温敏自杀性质粒的同源重组技术对目标菌株舒伯特气单胞菌 WL-2 的 *cat* 基因进行敲除。

在缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 构建时, 感受态的制备对于电转化效率有重要影响, 需要严格控制制备感受态时间, 使细菌处于生长对数期, 否则菌老化会影响转化效率, 制备缺失株和回补株时也需注意菌株的抗性是否发生改变, 本实验在制备回补株 C-*cat* 时, 第一次实验, 重组质粒抗性选择得氨苄抗性, 但在挑选阳性克隆时发现该菌株对氨苄抗性不敏感, 因此在制备感受态后还需要对感受态细胞进行抗性实验以确保对抗性敏感。

本研究构建了含有 *cat* 基因同源片段的温敏自杀质粒 pSET4s-*cat*, 采用同源重组技术敲除舒伯特气单胞菌 WL-2 的 *cat* 基因构建缺失株  $\Delta cat$ ; 通过重组质粒 p Smart-*cat* 构建缺失株  $\Delta cat$  的回补株 C-*cat*, PCR 检测及测序确认 *cat* 基因缺失及回补; 通过荧光定量检测缺失株  $\Delta cat$  无 *cat* 基因表达, 野生株 WL-2 和回补株 C-*cat* 有表达, 且回补株 C-*cat* 的 *cat* 基因表达量低于野生株 WL-2, 通过 Western blot 技术检测从蛋白水平上发现在缺失株  $\Delta cat$  中没有 CAT 蛋白表达, 而在野生株 WL-2 和回补株 C-*cat* 中有 CAT 蛋白表达, 说明本研究成功构建了舒伯特气单胞菌 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat*。缺失株  $\Delta cat$  中没有 CAT 蛋白表达, 而回补株 C-*cat* 的 CAT 蛋白表达量低于野生株 WL-2, 猜测是否含有 *cat* 基因和 CAT 蛋白表达量的多少可能会影响舒伯特气单胞菌的生物学相关特性。缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 的生物学相关特性致病性研究, 分析 *cat* 基因在舒伯特气单胞菌作用。

## 5 小结

- (1) 本实验从 *A. schubertii* WL-2 基因组中扩增 *cat* 基因上下游片段, 构建重组自杀质粒 pSET4s-*cat* 和重组质粒分别成功构建了 *A. schubertii* WL-2*cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat*。
- (2) 用荧光定量 PCR 方法检测 *cat* 基因表达量表明, 缺失株的 *cat* 基因未表达, 回补株的表达量为野生株的 0.69 倍, 证实了缺失株  $\Delta cat$  与回补株 C-*cat* 构建成功。
- (3) 通过构建重组 CAT 表达质粒 PET32a-CAT, 获得重组 CAT 蛋白并制备抗 CAT 多克隆抗体, 并用 iELISA 血清效价检测和 Western blot 检测鉴定抗 CAT 多克隆抗体成功制备, 抗 CAT 多克隆抗体用于检测缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 的 CAT 蛋白表达。
- (4) 用 Western blot 检测过氧化氢酶表达实验表明, 野生株 WL-2 和回补株 C-*cat* 在 56 kDs 处有条带; 缺失株  $\Delta cat$  无条带, 从蛋白水平进一步验证缺失株  $\Delta cat$  及回补株 C-*cat* 构建成功。

## 第3章 *cat* 基因缺失株、回补株及野生株相关生物学性状分析

舒伯特气单胞菌 (*A. schubertii*) 其氧化酶反应和触酶反应结果呈阳性 (魏美华等, 1994; Kokka *et al.*, 1992), 属于革兰氏阴性杆菌, 有  $\beta$ -溶血。在 5% 绵羊血琼脂平板上, 菌落呈灰白色、半透明状, 细菌表面湿润光滑、有圆形中央隆起且边缘整齐 (刘春等, 2012; 刘向前等, 1999); 舒伯特气单胞菌感染鳢科鱼类引起的规模性死亡已对鳢养殖业造成了严重的经济损失 (Chen *et al.*, 2012)

过氧化氢酶 (*Hydrogen Peroxidase*) 又称触酶 (*Catalase*, CAT), 存在于动植物和微生物体内 (王凡强等, 2010)。过氧化氢酶在以往研究中主要以有益的方面来研究, 对生物体及人类生活做出贡献, 而在一些研究中也表明过氧化氢酶是某些致病菌逃避宿主天然防御的毒力因子, 保护细菌免受过氧化物的毒害 (耿风廷等, 2007; 王晓南等, 2009)。鱼类吞噬细胞产生的  $H_2O_2$  及  $H_2O_2$  的衍生物是强效杀菌剂, 某些细菌逃脱吞噬细胞的吞噬是通过过氧化氢酶抑制氧自由基的产生来实现, 当吞噬细胞产生的  $H_2O_2$  及  $H_2O_2$  的衍生物, 就给 *A. schubertii* 在宿主的存活带来较大威胁, 所以该菌要在宿主体内存活和正常生长, 就需要有抵抗宿主免疫系统的抗氧化调控机制。而 *cat* 基因编码过氧化氢酶蛋白能分解宿主产生的  $H_2O_2$  从而使细菌免受杀灭。

目前舒伯特气单胞菌 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  及回补株 C-*cat* 已成功构建, 但未对其生物学特性进行比较研究, 本章对缺失株、回补株与野生株在菌落形态、溶血活性、生长曲线测定、酸碱耐受能力等生物学特性进行比较研究, 分析 *cat* 基因缺失后是否对舒伯特气单胞菌的部分生物学特性产生了影响。

### 1 材料

#### 1.1 实验菌株

*cat* 基因缺失株  $\Delta cat$ ; *cat* 基因回补株 C-*cat*; *A. schubertii* 野生株 WL-2

#### 1.2 实验材料和试剂

5% 绵羊血琼脂培养基购自上海江莱生物科技有限公司, BHI 肉汤 (Brain Heart Infusion Broth) 培养基购自美国 BD 生物有限公司; 移液器枪头、离心管等购自美国 Axygen 公司。

#### 1.3 实验仪器

同第2章 1.2

### 2 方法

## 2.1 菌落形态鉴定

在 BHI 琼脂平板上分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 进行划线，于细菌培养箱 28 °C 培养 12 h。

分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 菌株单克隆于含 5% 绵羊血琼脂培养基进行划线培养，于 28 °C 细菌培养箱培养 24h 后，观察菌落形态并拍照记录。

## 2.2 溶血活性检测

在 BHI 琼脂平板上分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 进行划线，于细菌培养箱 28 °C 培养 12 h。

分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 菌株于含 5% 绵羊血琼脂培养基进行划线培养，在 28 °C 细菌培养箱培养 48h 后，观察溶血状况并拍照记录。

## 2.3 生长曲线测定

- (1) 分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 菌株单克隆接种到 5 mL BHI 液体培养基，于 28 °C 180 rpm 摇床培养 12 h。
- (2) 按照扩大 100 倍的标准扩大培养至 100 ml BHI 液体培养基，于 28 °C 180 rpm 摇床培养，每间隔 2 h 分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 菌株进行取样 2 ml，测定 OD<sub>600</sub> 值。
- (3) 记录并分析数据，绘制三株菌的生长曲线图。

## 2.4 酸碱耐受实验

- (1) 在 BHI 琼脂平板上分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 进行划线，于 28 °C 细菌培养箱培养 12 h。
- (2) 分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 单克隆接种到 5 ml 液体 BHI 培养基中，28 °C 摇床 180 rpm 培养 12 h。
- (3) 用麦氏比浊仪将细菌浓度调为  $2 \times 10^5$  CFU/ml，分别吸取 100  $\mu$ L 菌液于 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 5 mL BHI 液体培养基中，分装到无菌玻璃管中，每个梯度设置 3 个平行，于 28 °C 180 rpm 摇床培养。
- (4) 将野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 三株菌在摇床培养 18 h 后，观察细菌生长情况并测定 OD<sub>600</sub> 值。
- (5) 通过 excel 2019 进行平均值与标准差的计算，通过 IBM SPSS Statistics 21 进行单因素方差分析， $P < 0.05$  表示差异显著， $P > 0.05$  表示无显著差异。

### 3 结果

为比较 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 之间的差异,本研究对三株菌的菌落形态、溶血活性、生长曲线、酸碱耐受能力进行了检测分析。

#### 3.1 菌落形态鉴定

菌落生长形态观察结果:在 5%绵羊血琼脂平板上培养 24 h 后菌落生长情况如图 4.1,结果显示缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 菌形态大小一致,菌落呈灰白色、湿润、表面光滑的圆形菌落,直径约 0.6-2.0 mm,结果表明在缺失和回补了 *cat* 基因的缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 相比,菌落形态未发生改变,*cat* 基因不影响舒伯特气单胞菌的菌落形态。

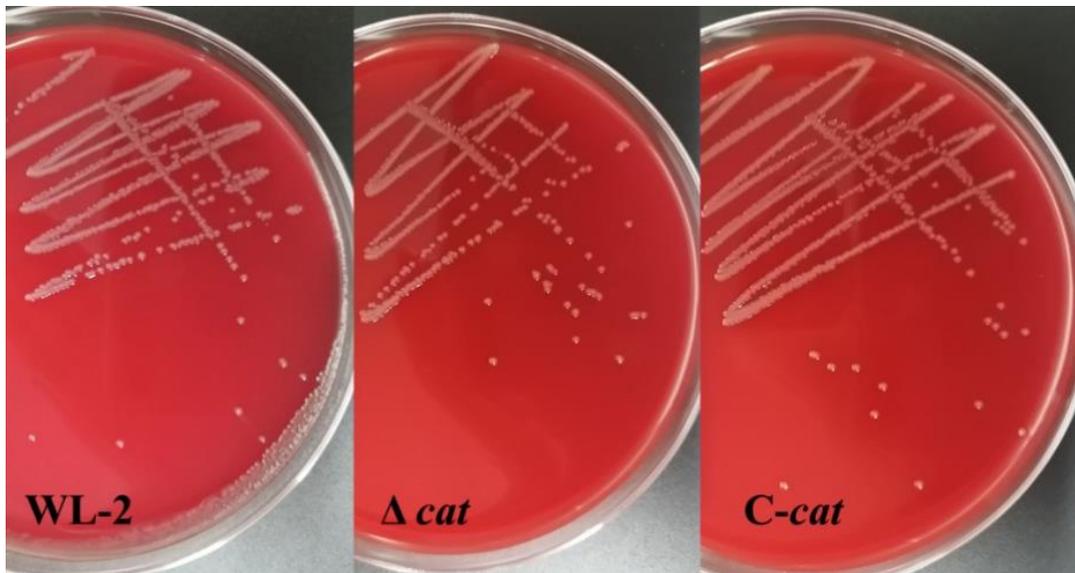


图 3.1 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 菌落形态

Fig. 3.1 The colony morphology of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-*cat*

#### 3.2 溶血活性检测

利用血琼脂平板对三株菌的溶血活性进行检测,三株菌在 5%绵羊血琼脂平板上培养 48h 后,结果显示缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 与野生株 *A. schubertii* WL-2 均呈弱的  $\beta$  溶血,三株菌的溶血特性无明显变化,如图 4.2,结果表明 *cat* 基因与菌株溶血活性之间无明显联系。

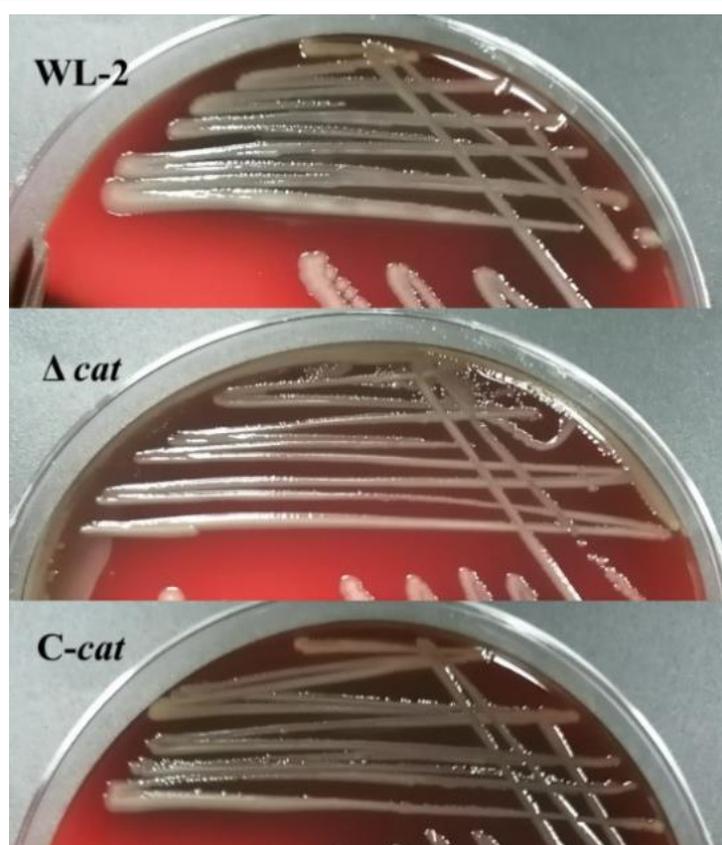
图 3.2 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 溶血活性检测

Fig. 3.2 Hemolytic activity assays of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-cat

### 3.3 生长曲线测定

细菌的量与  $OD_{600}$  值成正比，本实验测定波长 600 nm 下的菌液吸光值，间接反映细菌的生长情况。在 28 °C 振荡培养箱培养，并每隔 2 h 连续测定吸光度直至三株菌进入生长平台期，处理实验数据，对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 生长曲线测定结果并绘制图（图 3.3），结果显示 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 三株菌在每个时间点的吸光度一致，野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 三株菌在 0h-2h 吸光值增长缓慢，在 2h-6h 吸光值迅速增加，在 6h-16h 吸光值的增加变缓，16 h 时吸光值基本保持不变，即三株菌在 0h-2h 生长缓慢，在 2h-6h 处于生长对数期，在 6h-16h 间生长速度变缓，16 h 时进入生长平台期菌体浓度基本维持不变，三株菌的生长状况一致，表明 *cat* 基因的缺失和回补不会影响舒伯特气单胞菌的生长状况。

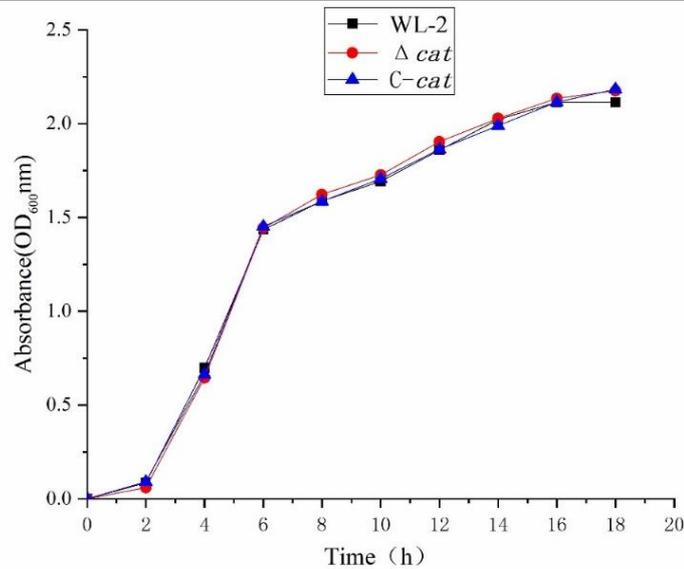


图 3.3 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 生长曲线测定

Fig. 3.3 The growth curve of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-cat

### 3.4 酸碱耐受能力

*A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 在 BHI 液体培养基 pH 为 3-12 中生长状况如图 3.4 所示, 适合三株菌生长的 pH 是 pH7-10, 三株菌无显著差异, 在 pH 为 3, 4, 5, 11, 12 时不适合三株菌的生长。在 BHI 培养基 pH 为 6 时, 缺失株  $\Delta cat$  存活率显著低于野生株 WL-2 和回补株 C-cat ( $P < 0.05$ ), 缺失株在 pH 为 6 时耐受能力显著降低, 回补株 C-cat 与野生株 WL-2 的存活率无差异 ( $P > 0.05$ )。

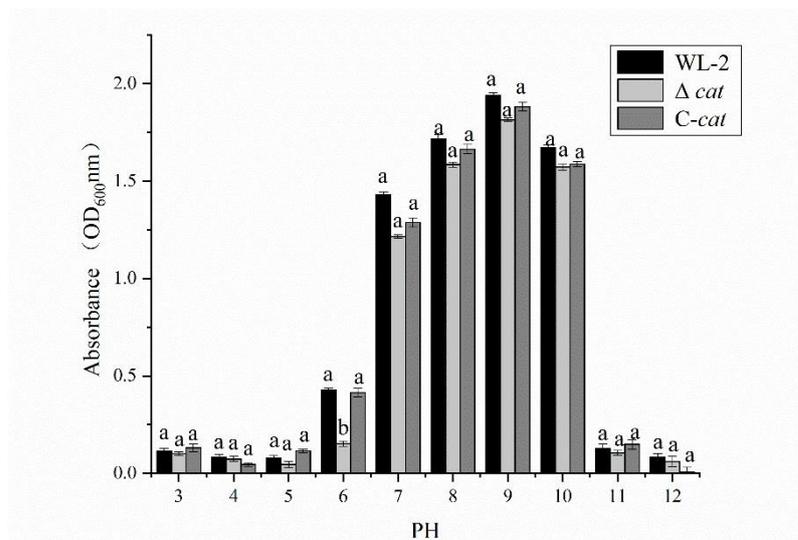


图 3.4 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 酸碱耐受实验

Fig. 3.4 The acid base tolerance test of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-cat

## 4 讨论

通过生物学相关特性的比较能直观地反映缺失目标基因后,基因缺失菌株和回补菌株与野生型菌株之间的区别。根据实验现象及结果,推测缺失目标基因后相关生物学特性是否改变;一些菌株在敲除靶基因后,其生物学特性不会发生改变,如 *gldL*, *gldL-gldN* 基因双缺失株,对鸭疫里默氏杆菌的生长没有明显的差异(陈研,2019);缺失株  $\Delta cpxA/R$  的生长特性与其嗜水气单胞菌野生株相比也没有明显的影响(梅雯,2015),而有些生物学特性会发生改变。在菌落形态方面,对 *VMH* 基因和 *TDH* 基因进行缺失后的拟态弧菌菌落形成大小与野生株相比显著减小(余泽辉,2018);拟态弧菌缺失 II 分泌系统基因簇后缺失株的菌落大小显著小于野生株(余泽辉,2018);在生长能力方面,缺失 *cadB* 基因的维氏气单胞菌的生长能力明显受到抑制(安鼎杰,2018);单增李斯特菌 *lmo2193* 基因缺失后其缺失株生长能力变弱,生长较为缓慢(李红欢,2019);而维氏气单胞菌脂蛋白 *Lpp* 基因缺失株和野生株的生长速度相似(宋格格等,2020)。在溶血活性方面,溶血活性是一种致病菌的特性,在感染和致病过程中发挥着多种作用(Zhang *et al.*,2015),基因缺失株也会导致其溶血活性的改变但未改变其菌株毒力(余泽辉,2018),而 *cpxA/R* 基因缺失株后其菌株溶血特性没有显著差异(梅雯,2015),任静静等(2019)发现基因缺失株溶血特性与野生株保持一致;在酸碱耐受方面,缺失 *T4P* 的舒伯特气单胞菌其酸耐受能力减弱(Cao *et al.*,2020)。为了探究 *cat* 基因缺失后,是否会对其生物学特性造成影响,在第三章构建 *A. schubertii* 野生株 WL-2 的缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 基础上,本章研究了 *cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与 *A. schubertii* 野生株 WL-2 部分生物学特性,即菌落形态、溶血活性、生长曲线、酸碱耐受能力,并将缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 的生物学特性进行对比分析。

结果显示在菌落形态方面,缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 相比无明显变化,菌落均呈灰白色、湿润、表面光滑的圆形,直径约 0.6~2.0 mm,这与 Cao 等(2020)研究的舒伯特气单胞菌 T4P 基因簇缺失突变株的菌落状态一致,说明 *cat* 基因的敲除未影响缺失株和回补株的细菌形态。

缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 的溶血活性没有改变,这与 Cao 等(2020)研究的舒伯特气单胞菌 T4P 基因簇缺失突变株在菌落状态和溶血活性方面结果相同;说明 *cat* 基因的缺失不会改变舒伯特气单胞菌的菌落形态和溶血活性。

在生长状态方面,与野生株 WL-2 相比缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 无明显变化,分别于 2h, 16h 进入生长对数期和平台期,与 Cao 等(2020)的 4h 进入生长对数期不同,本实验的细菌生长 2h 进入生长对数期,可能是由于其过夜培养时间少于本实验培养 12h,导致在扩培时菌体初始浓度较低,因而进入生长对数期时间晚于本实验。

在酸碱耐受实验中，三株菌最适生长的 pH 范围是 7-10，三株菌无显著差异；在 PH 为 3, 4, 5, 11, 12 时不适合三株菌的生长，三株菌无显著差异。在 BHI 培养基 pH 为 6 时，缺失株存活率显著低于野生株 WL-2 和回补株 C-*cat* ( $P < 0.05$ )，回补株 C-*cat* 与野生株 WL-2 的存活率无差异 ( $P > 0.05$ )，在 BHI 培养基 pH 为 6 时，缺失株酸耐受能力显著降低。

## 5 小结

缺失株  $\Delta cat$  与回补株 C-*cat*、野生株 WL-2 三株菌在 5% 绵羊血琼脂平板上培养 24 h 后菌落形态大小一致；三株菌在 5% 绵羊血琼脂平板上培养 48h 后溶血活性无变化，在 100ml BHI 液体培养基中 28 °C 振荡培养 18h，其生长曲线无明显差异，在 2h 后进入生长对数期，16 h 时进入生长平台期菌体浓度基本维持不变；缺失株在 pH 为 6 时耐受能力显著降低。以上结果表明 *cat* 基因缺失与舒伯特气单胞菌的菌落形态、溶血特性及生长状态无明显关联。



## 第4章 *cat* 基因缺失株、回补株致病性分析

舒伯特气单胞菌 (*A. schubertii*) 能感染致病人类、畜禽和水产动物。近十年来, 舒伯特气单胞菌感染引起的内脏类结节病在养殖鳢科鱼类中流行, 鳢科鱼类感染症状为肝、脾、肾脏大且有乳白色结节。该病发病病程较短、鱼体间传播速度迅速、有高死亡率, 产生的类结节症状与诺卡氏菌感染鳢科鱼类后症状相似, 很容易造成误诊, 对养殖鳢科鱼类危害极大, 能对其造成巨大经济损失。

通过实验室前期研究推测 *cat* 基因是 *A. schubertii* 的重要毒力因子, 在构建缺失株  $\Delta cat$  及回补株 *C-cat* 后对其部分生物学特性的研究表明, 在缺失 *cat* 基因后缺失株  $\Delta cat$  及回补株 *C-cat* 与野生株 WL-2 具有相同生物学特性, 其生物学特性未发生改变。本章通过研究三株菌的触酶实验, 过氧化氢酶活性实验, 过氧化氢存活实验, 巨噬细胞存活实验及杂交鳢致病性实验来研究 *cat* 基因对舒伯特气单胞菌致病性的作用, 探讨过氧化氢酶对舒伯特气单胞菌致病性的影响, 揭示过氧化氢酶在舒伯特气单胞菌感染过程中的致病机制, 为该病的防治奠定理论基础。

### 1 材料

#### 1.1 实验动物和菌株及细胞

*cat* 基因缺失株  $\Delta cat$ ; *cat* 基因回补株 *C-cat*; *A. schubertii* 野生株 WL-2; RAW.246 小鼠巨噬细胞 (中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室保存)

实验用鱼杂交鳢, 购自广东佛山某杂交鳢养殖场, 体质健康, 质量为  $20 \pm 5$  g, 在实验室暂养一周后用于实验。

#### 1.2 实验试剂和仪器

见第2章1 材料。

### 2 方法

#### 2.1 触酶实验

- (1) 在 BHI 琼脂平板上分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat* 进行划线, 于 28 °C 细菌培养箱培养 12 h。分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 *C-cat* 单克隆接种到 5 ml BHI 液体培养基, 于 28 °C 摇床 180 rpm 培养 12 h, 按照 1: 50 扩培至 5 ml BHI 液体培养基, 于 28 °C 摇床 180 rpm 培养 2-3 h。
- (2) 用麦氏比浊仪取 1ml 含  $5 \times 10^8$  CFU/mL 三株菌, 低速离心, 去上清, 用 5ml 无菌水重悬, 滴加 50ul  $H_2O_2$ 。

- (3) 观察气泡产生状况并进行拍照和记录。

## 2.2 过氧化氢存活实验

- (1) 在BHI 琼脂平板上分别对*A. schubertii*野生株WL-2、缺失株 $\Delta cat$ 和回补株C-*cat*进行划线，于28℃细菌培养箱培养12 h。分别挑取三株菌单克隆接种到 5 ml BHI 液体培养基，于28℃摇床180 rpm培养12 h，按照1: 50扩培至5 ml BHI 液体培养基，于28℃摇床180 rpm培养 2-3 h。
- (2) 用麦氏比浊仪将细菌浓度分别稀释调至 $5 \times 10^8$  CFU/mL、 $5 \times 10^7$  CFU/mL、 $5 \times 10^6$  CFU/mL、 $5 \times 10^5$  CFU/mL、 $5 \times 10^4$  CFU/mL。加入适量H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液使稀释好的菌液充分混匀，使终浓度调为100 mmol，吸取5  $\mu$ l含100 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混匀菌液滴在BHI 琼脂培养基上，放置在28℃细菌培养箱培养。
- (3) 培养36 h 后观察细菌生长状况并进行拍照和记录。

## 2.3 过氧化氢酶活力实验

采用过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒测定过氧化氢酶活力测定步骤如下：

- (1) 在 BHI 琼脂平板上分别对 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 进行划线，于 28℃细菌培养箱培养 12 h。
- (2) 分别挑取 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 单克隆接种到 2 ml BHI 液体培养基，于 28℃摇床 180 rpm 培养 12 h，按照扩大 100 倍的标准扩培至 5ml BHI 液体培养基，于 28℃ 180 rpm 摇床培养 2-4 h。用生理盐水洗去培养基后重悬并调整浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL，取 2ml 菌液离心后弃上清；加入 2ml 提取液吹打混匀，用超声波破碎细菌，直到溶液澄清；8000g 4℃离心 10 分钟，取上清置冰上待测。测定步骤参照说明书。
- (3) 将测得数据进行分析，通过 excel 2019 进行平均值与标准差的计算，通过 IBM SPSS Statistics 21 进行单因素方差分析， $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异极显著， $P > 0.05$  表示无显著差异，绘制过氧化氢酶活性图。

## 2.4 巨噬细胞存活实验

- (1) 用 10% FBS DMEM 细胞培养液活化 RAW246.7 细胞，12 h 后 RAW 细胞更换一次培养液继续培养及传代。观察细胞状态，直至 RAW 细胞状态良好，将其传至 2 块 12 孔细胞培养板，分别标记为 A、B 两板，每块板设三个实验组（野生株、缺失株和回补株）和一个空白对照，每组 3 个平行，于 37℃细胞培养箱培养过夜，培养至每孔底部有 90% 细胞。

- (2) A、B板用双抗无菌 PBS 缓冲液冲洗,重复3次,并在每个孔中滴加 1.0 mL 细菌浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat*,于 37 °C 孵育 2 h。
- (3) 细菌孵育 2h 后, A、B板分别用双抗无菌 PBS 缓冲液冲洗,重复3次,并在每个孔中滴加 1 mL 双抗 10 % FBS DMEM 细胞培养液,并放置在于 28 °C 培养箱中孵育 30 min。
- (4) A板用双抗无菌 PBS 缓冲液冲洗,重复3次,并在每个孔中滴加 300  $\mu$ L 0.25% Triton X-100,室温静置 10 min,充分使细胞裂解,再在每个孔中滴加 700  $\mu$ l 无菌 PBS,菌液点板 (10  $\mu$ l),于 28 °C 培养箱培养 12 h; B板加入双抗细胞培养液后于 28 °C 培养 6 h 后,处理方法和 A板相同,点板后培养 12 h。
- (5) 统计菌落的数量,分析数据,通过 excel 2019 进行平均值与标准差的计算,通过 IBM SPSS Statistics 21 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P > 0.05$  表示无显著差异。

## 2.5 杂交鳢致病性实验

- (1) 采用浸泡感染方法,用 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 三株菌对杂交鳢进行致病性实验。
- (2) 挑选健康状况良好,体型大小相似的杂交鳢暂养 7 d,分为 4 组,分野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 和对照组。
- (3) 在 BHI 琼脂平板上分别对野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 进行划线,于细菌培养箱 28 °C 培养 12 h。分别挑取三株菌的单克隆接种到 100ml BHI 液体培养基,于 28 °C 180 rpm 摇床培养 12 h,用生理盐水洗去培养基。用麦氏比浊管将野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 菌液调整菌液浓度。
- (4) 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 三组杂交鳢分别用终浓度  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$ 、回补株 C-*cat* 菌液 30 °C 进行浸泡攻毒处理 2h,对照组将菌液替换为生理盐水。
- (5) 持续观察并记录杂交鳢死亡情况,绘制累计死亡曲线。

## 3 结果

### 3.1 触酶活性

*A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 的触酶活性实验结果如图 4.1,滴加 50ul  $H_2O_2$ ,观察三株菌的气泡产生情况分别如下:发现缺失株  $\Delta cat$  气泡产生量低于野生株 WL-2 和回补株 C-*cat*,但还存在少量气泡,回补株气泡量稍少于野生株。

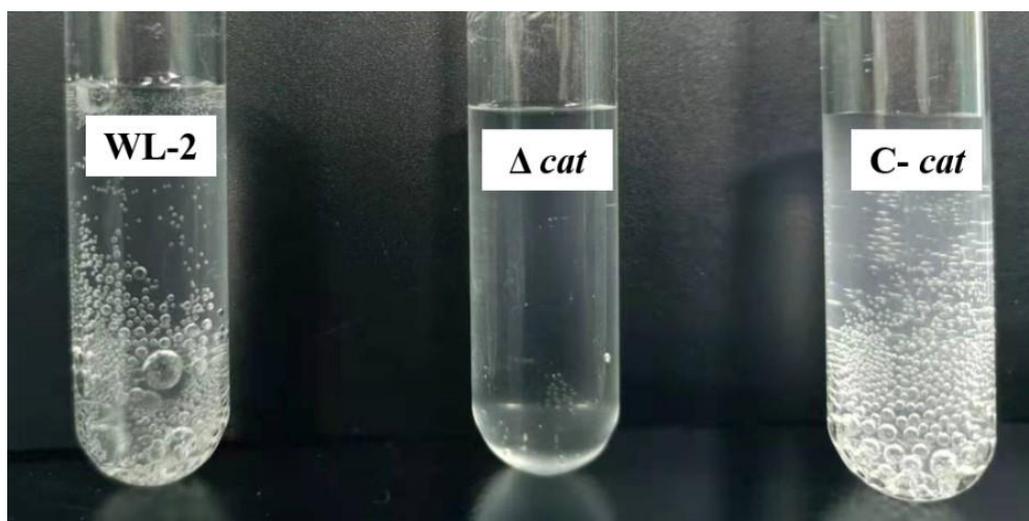
图 4.1 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 触酶实验

Fig. 4.1 The catalase test of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-cat

### 3.2 过氧化氢的耐受能力

*A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 的过氧化氢耐受能力实验结果如图 4.2，经过 100mmol  $H_2O_2$  处理并培养 24h，三株菌的菌落生长情况分别如下：野生株 WL-2 在 5 个浓度下都有菌落存在，在细菌浓度为  $5 \times 10^5$  CFU/ml 时菌落变少，还存在少数单菌落；缺失株  $\Delta cat$  在细菌浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL、 $5 \times 10^7$  CFU/mL、 $5 \times 10^6$  CFU/mL 存在菌落，但在  $5 \times 10^6$  CFU/ml 存在菌落已很少；回补株 C-cat 细菌浓度在  $5 \times 10^5$  CFU/ml 时无菌落存在。三株菌在  $5 \times 10^7$  CFU/ml 时，缺失株  $\Delta cat$  菌落少于野生株 WL-2 回补株 C-cat；在细菌浓度  $5 \times 10^6$  CFU/ml 时，缺失株  $\Delta cat$  菌落显著少于野生株 WL-2，回补株 C-cat 菌落少于野生株 WL-2；细菌浓度  $5 \times 10^5$  CFU/ml 时，缺失株  $\Delta cat$  已无菌落存在，而野生株 WL-2 和回补株 C-cat 仍存在少数菌落。结果表明 *cat* 基因缺失后缺失株  $\Delta cat$  对  $H_2O_2$  的耐受能力显著低于野生株 WL-2 和回补株 C-cat，而回补株 C-cat 对  $H_2O_2$  的耐受能力未恢复到野生株 WL-2 的水平。

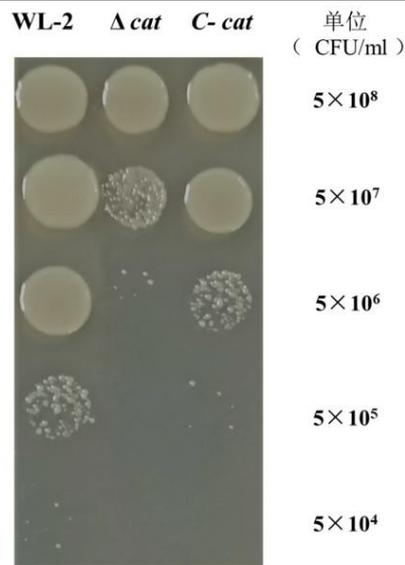


图 4.2 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 过氧化氢耐受实验

Fig. 4.2 The hydrogen peroxide tolerance test of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-*cat*

### 3.3 过氧化氢酶活性

用过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒检测 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性，结果如下图 4.3，野生株 WL-2 的酶活为  $8.68U/10^4 cell$ ，缺失株  $\Delta cat$  的酶活为  $1.78U/10^4 cell$ ，回补株 C-*cat* 的酶活为  $6.08U/10^4 cell$ ；野生株 WL-2 过氧化氢酶活性极显著高于缺失株  $\Delta cat$  ( $P < 0.01$ ) 和显著高于回补株 C-*cat* ( $P < 0.05$ )，回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性显著高于缺失株  $\Delta cat$  ( $P < 0.05$ )，结果表明缺失株  $\Delta cat$  过氧化氢酶活性降低，而回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性有所升高但未恢复至野生株 WL-2 的水平。

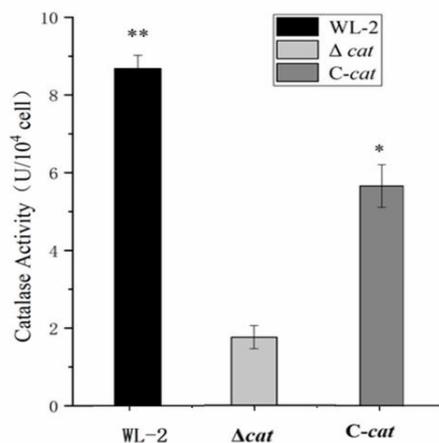


图 4.3 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性实验

Fig. 4.3 The catalase activity test of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-*cat*

### 3.4 巨噬细胞存活实验

用 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 与 RAW264.7 小鼠巨噬细胞孵育后的 0h 和 6h，活菌计数分析结果如图 4.4 所示，在巨噬细胞处理三株菌 2 小时后，野生株 WL-2 的细菌量与缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 有显著差异 ( $P < 0.05$ )，6h 时，野生株 WL-2 在小鼠巨噬细胞中的存活率高于缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* ( $P < 0.05$ ) 回补株 C-*cat* 存活率高于缺失株  $\Delta cat$ ，且缺失株  $\Delta cat$  在巨噬细胞中的存活率无显著差异 ( $P > 0.05$ )，表明缺失株  $\Delta cat$  在巨噬细胞存活能力显著弱于野生株 WL-2，回补株 C-*cat* 在巨噬细胞存活能力有回复，但未达到原始水平，说明 *cat* 基因对舒伯特气单胞菌在巨噬细胞存活能力有提高作用。

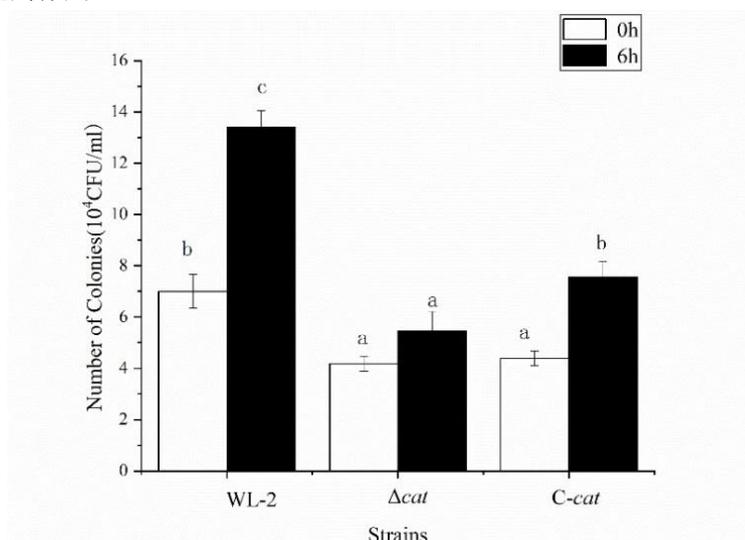


图 4.4 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 在巨噬细胞存活实验

Fig. 4.4 The survive in macrophages test of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-*cat*

### 3.5 杂交鳢致病性实验

为探究 *cat* 基因对舒伯特气单胞菌致病性的影响，本研究采用浸泡感染方式检测 *A. schubertii* 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 对杂交鳢的致病性差异。三株菌浸泡感染杂交鳢后累计死亡率如图 4.5 所示，在浸泡感染后，野生株 WL-2 组，在第 2 天开始死亡，4 天内累计死亡率为 100%；缺失株  $\Delta cat$  组，杂交鳢无死亡其死亡率为 0%；回补株 C-*cat* 组第 2 天开始死亡，7 天内累积死亡率为 50%。结果表明，通过浸泡感染，缺失株  $\Delta cat$  对杂交鳢的致病性与野生株 WL-2 相比明显减弱，而回补株 C-*cat* 对杂交鳢的致病能力有所回复，但致病能力未回复到野生株 WL-2 水平。

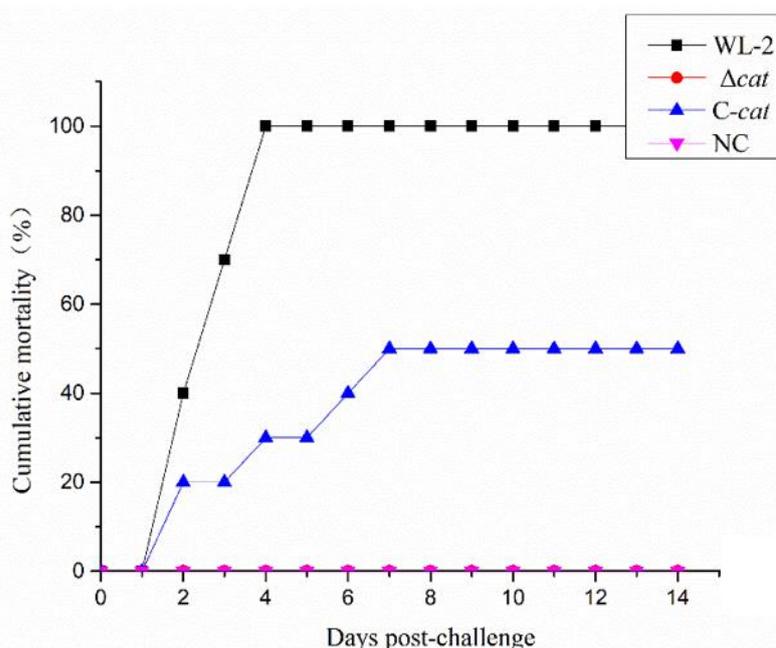


图 4.5 野生株 WL-2、缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 对杂交鳢致病性实验

Fig. 4.5 The pathogenicity to hybrid snakehead of WL-2、mutant strain  $\Delta cat$  and complementary strain C-cat

## 4 讨论

过氧化氢酶是细菌中的一种稳定、高活力的蛋白酶，存在于动植物和微生物体内（王凡强等，2010）。生物的抗氧化保护系统则由过氧化氢酶和超氧化物歧化酶构成，对于过氧化氢酶基因的研究大多在筛选高效的产酶细菌，投入到过氧化氢酶的产出等方面；如在食品行业、乳制品行业、医药行业、环保的应用（何照兴等，2001）。而根据一些文献报道，过氧化氢酶是致病菌的一种毒力因子，能通过分解巨噬细胞释放的过氧化氢从而增强菌株的毒力，造成鱼类大量死亡。如幽门螺杆菌依赖 CAT 等毒力因子逃避宿主的天然防御，保护其免受中性粒细胞的杀伤和巨噬细胞吞噬（Marais *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 1996）；而 *katA* 和 *katAB* 缺失体比野生型对  $H_2O_2$  更敏感，但在  $H_2O_2$  浓度提高后，*katA* 缺失体被完全消除的结果表明铜绿假单胞菌的 *catalase* 基因中的 *katA* 基因是抵抗过氧化物所必需的（Lee *et al.*, 2005）。在对这些毒力因子进行研究时，构建缺失株后通过对缺失株和回补株的过氧化氢耐受实验和在巨噬细胞或者中性粒细胞中存活实验以及致病性等方面进行实验研究，探讨过氧化氢酶相关基因缺失后细菌的致病力情况。在对相关毒力基因进行敲除后，其致病力可能降低也可能不变，如 *ilvI* 基因的缺失导致致病性和对细胞的毒性显著下降（宋明芳，2019），基因缺失株未改变其菌株毒力（余泽辉，2018）。我们猜测在舒伯特气单胞菌中，过氧化氢酶是其毒力因子。在本章中对已构建好的缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-cat 进行了触酶实验、过氧化氢存活实验、过氧化氢酶活性检测、在 RAW246.7 巨噬细

胞存活试验和对杂交鳢致病性实验与野生株 WL-2 进行比较分析过氧化氢酶基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 致病性。

触酶实验显示, 缺失株  $\Delta cat$  气泡产生量低于野生株 WL-2 和回补株 C-*cat*, 还存在少量气泡, 在敲除 *cat* 基因后, 设想的缺失株  $\Delta cat$  是不产生气泡的, 但还有气泡产生; 过氧化氢酶活性实验, 对三株菌浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL 时的过氧化氢酶活性结果比较显示, 缺失株  $\Delta cat$  过氧化氢酶活性降低但还有过氧化氢酶活性, 而回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性有所升高但未回复至野生株 WL-2 的过氧化氢酶活性水平; 通过对该菌基因组分析发现该菌还存在过氧化物酶 *kat* 基因, 推测在敲除舒伯特气单胞菌的 *cat* 基因后其过氧化物酶还能与  $H_2O_2$  发生反应产生气泡, 但这还需要进一步的探究。表明过氧化氢酶基因缺失后舒伯特气单胞菌的过氧化氢酶活性降低, 分解过氧化氢能力减弱, 因为该菌还存在过氧化物酶 *kat* 基因, 推测在敲除舒伯特气单胞菌的 *cat* 基因后, 因还存在过氧化物酶 *kat* 基因, 缺失株还有过氧化氢酶活性, 但这还需要进一步的探究。缺失株  $\Delta cat$  过氧化氢酶活性降低但还有较低过氧化氢酶活性, 对该菌基因组分析发现该菌还存在能够降解过氧化氢的过氧化物酶 *kat* 基因, 推测缺失株在敲除 *cat* 基因后存在的过氧化物酶有较低过氧化氢酶活性, 但这还需要进一步的探究; 过氧化氢存活实验显示缺失株  $\Delta cat$  对  $H_2O_2$  的耐受能力显著低于野生株 WL-2 和回补株 C-*cat*, 而回补株 C-*cat* 未恢复到野生株 WL-2 的水平, 舒伯特气单胞菌缺失 *cat* 基因后其  $H_2O_2$  的敏感度即  $H_2O_2$  耐受能力降低, 表明 *cat* 基因表达的过氧化氢酶能够分解  $H_2O_2$ , 从而提高该菌株对  $H_2O_2$  的耐受能力, 这与 *katA* 突变体对  $H_2O_2$  耐受能力降低一致 (Lee *et al.*, 2005); 在巨噬细胞存活实验结果显示, 缺失株  $\Delta cat$  在巨噬细胞存活能力显著弱于野生株 WL-2, 回补株 C-*cat* 在巨噬细胞存活能力有回复, 但未达到原始水平, 猜测缺乏过氧化氢酶的缺失株  $\Delta cat$  分解巨噬细胞  $H_2O_2$  的能力减弱, 从而存活率降低; 杂交鳢致病性实验中, 与野生株 WL-2 相比缺失株  $\Delta cat$  对杂交鳢死亡率相差 100%, 回补株 C-*cat* 对杂交鳢的致病能力有所回复, 但致病能力未回复到野生株 WL-2 水平。这证明过氧化氢酶缺失株会降低舒伯特气单胞菌致病性, 回补株致病性有所恢复, 但未达到野生株水平, 也印证了第 3 章讨论中猜测, 有无 CAT 蛋白表达和表达量的多少会影响其毒力, 但这还需要进一步研究。

## 5 小结

- (1) 过氧化氢存活实验显示, 缺失株  $\Delta cat$  对  $H_2O_2$  的耐受能力显著低于野生株 WL-2 和回补株 C-*cat*, 而回补株 C-*cat* 对  $H_2O_2$  的耐受能力增加但未回复到野生株 WL-2 的水平。
- (2) 过氧化氢酶活性结果显示, 缺失株  $\Delta cat$  过氧化氢酶活性降低, 而回补株 C-*cat* 过氧化氢酶活性有所升高但未回复至野生株 WL-2 的水平。

- (3) 巨噬细胞存活实验结果显示, 缺失株  $\Delta cat$  在巨噬细胞存活能力显著弱于野生株 WL-2, 回补株 C-*cat* 在巨噬细胞存活能力有回复, 但未达到原始水平, 猜测缺乏过氧化氢酶的缺失株  $\Delta cat$  分解巨噬细胞分泌的  $H_2O_2$  的能力减弱, 从而存活率降低。
- (4) 杂交鳢致病性实验显示: 缺失株  $\Delta cat$  对杂交鳢的致病性与野生株 WL-2 相比明显减弱, 而回补株 C-*cat* 对杂交鳢的致病能力有所回复, 但致病能力未回复到野生株 WL-2 水平。
- (5) 即缺失株  $\Delta cat$  与野生株 WL-2 和回补株 C-*cat* 相比, 对  $H_2O_2$  的耐受能力低, 过氧化氢酶活性降低, 在巨噬细胞存活能力弱, 对杂交鳢毒力减弱, 表明过氧化氢酶是舒伯特气单胞菌的毒力因子, 其产生过氧化氢酶能分解巨噬细胞产生的  $H_2O_2$  等以此来逃逸巨噬细胞的杀灭, 缺失过氧化氢酶基因会降低舒伯特气单胞菌的致病能力。



## 结 论

- (1) 本实验采用同源重组的方法利用重组温敏自杀质粒 pSET4s-*cat* 和重组质粒分别构建了 *A. schubertii cat* 基因缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat*, 在分子水平和蛋白水平上验证缺失株  $\Delta cat$  及回补株 C-*cat* 成功构建。
- (2) 对缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 的菌落形态、溶血活性、生长曲线、酸碱耐受等生物学特性进行研究比较, 发现缺失株  $\Delta cat$  及回补株 C-*cat* 的菌落与野生株 WL-2 菌落形态一致, 三株菌的溶血特性无变化, 三株菌生长曲线一致, 缺失株在 PH 为 6 时酸耐受能力显著降低, 表明舒伯特气单胞菌缺失过氧化氢酶基因后对部分生物学特性无影响。
- (3) 对缺失株  $\Delta cat$  和回补株 C-*cat* 的触酶实验、过氧化氢酶活力实验、过氧化氢存活实验、巨噬细胞存活实验和杂交鳢致病性实验致病性进行研究比较, 发现 *cat* 基因缺失导致舒伯特气单胞菌对  $H_2O_2$  的耐受能力和过氧化氢酶活性降低, 在巨噬细胞存活能力显著降低, 对杂交鳢的毒力降低。表明过氧化氢酶是舒伯特气单胞菌的重要毒力因子, 舒伯特气单胞菌缺失过氧化氢酶基因导致其致病能力降低。
- (4) 综合以上研究, 表明过氧化氢酶是舒伯特气单胞菌的重要毒力因子, 推测过氧化氢酶在舒伯特气单胞菌感染过程中的致病机制: 舒伯特气单胞菌被巨噬细胞等免疫细胞吞噬后, 通过自身的过氧化氢酶降解吞噬细胞内的过氧化氢来逃避宿主免疫系统的灭杀作用。



## 参考文献

- [1] 安鼎杰. 维氏气单胞菌 TH0426 株 *cadA* 和 *cadB* 基因缺失株构建及其基因功能初探[D]. 吉林农业大学, 2018, 36-42.
- [2] 白 杨, 武金宝, 王继德, 等. 幽门螺杆菌过氧化氢酶基因的克隆、序列测定及其生物信息学分析[J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(03):1-4.
- [3] 陈 玲, 李汉芳, 陈淑英, 等. 从食堂菜墩检出舒伯特气单胞菌[J]. 预防医学论坛, 2001, 7(4): 438-439.
- [4] 陈怀青, 陆承平. S 层介导嗜水气单胞菌粘附 Hep-2 细胞[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 16(3): 200-202.
- [5] 陈言峰, 周爱国, 陈冠锋, 等. 养殖杂交鳢迟缓爱德华菌的分离鉴定[J]. 南方水产科学, 2014, 10(5):1-7.
- [6] 陈言峰, 周爱国, 邹 青, 等. 杂交鳢海豚链球菌病原分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2015, 46(2): 332-337.
- [7] 陈 研. 鸭疫里默氏杆 *gldL* 基因缺失株的构建及培养上清中免疫原性蛋白的鉴定[D]. 扬州大学, 2019, 25-26.
- [8] 程宝艳, 张丹俊, 彭明义, 等. 细菌粘附素研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(002):3-5.
- [9] 高海英, 潘慧英, 王 芳. 江阴市首次从食品中检出舒伯特气单胞菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(3): 329-329.
- [10] 耿风廷. 人过氧化氢酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达[D]. 河北大学, 2007, 27-31.
- [11] 顾 颖. 辽宁海域大菱鲆病原微生物的调查及快速检测方法的建立[D]. 辽宁大学, 2016, 25-26.
- [12] 何 山. 杂交鳢源舒伯特气单胞菌的分离鉴定及疫苗制备[D]. 上海海洋大学, 2019, 29-31.
- [13] 何照兴, 袁 军. 过氧化氢酶的应用与实践[J]. 印染, 2001, 27(5):29-30.
- [14] 胡福泉. 微生物基因组学[M]. 人民军医出版社, 2002, 303-305.
- [15] 黄永洪, 花 慧, 等. 猪肝过氧化氢酶提取条件的研究. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 40- 42.
- [16] 康元环, 杨滨僮, 孟庆峰, 等. 不同宿主来源的维氏气单胞菌外膜蛋白 A II 基因的克隆及比较[J]. 中国兽医科学, 2014, (3):271-276.

- [17] 孔祎頔, 单晓枫, 牛小天, 等. 乌鳢细菌类疾病的研究进展[J]. 科学养鱼, 2018, 000(006):62-64.
- [18] 冷如意, 郭思建. 从骨折术后伤口感染患者脓液中分离出 1 株舒伯特气单胞菌[J]. 中国现代医学杂志, 1996, 6(6): 73.
- [19] 李充璧, 李琛, 李赛男. 细菌过氧化氢酶基因的克隆方法研究[J]. 安徽农业科学, 2012, (26):12761-12763.
- [20] 李红欢. 单增李斯特菌 *lmo2193* 基因缺失株的构建及其部分生物学特性研究[D]. 石河子大学, 2019, 31-33.
- [21] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5):223~224, 232.
- [22] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 鱼致病性舒伯特气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1): 54-57.
- [23] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [24] 刘春, 王芳, 李凯彬, 等. 一种绿色荧光蛋白基因标记鳢源舒伯特气单胞菌的方法[P]. 广东: CN106148379A, 2016-11-23.
- [25] 刘礼辉, 胡蕾, 杨圆圆, 等. 舒伯特气单胞菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 047(008):17-24.
- [26] 刘文奎, 樊启学, 朱邦科, 等. 乌鳢养殖技术之一: 雄性乌鳢与雌性斑鳢杂交试验[J]. 中国水产, 2007, 376(3): 37-39.
- [27] 刘向前, 申作江, 陈建文, 等. 一起由舒伯特气单胞菌引起的食物中毒调查报告[J]. 现代预防医学, 1999(4): 536-537.
- [28] 刘燕, 陈道利, 霍开兰. 气单胞菌污染直接入口食品的调查分析[J]. 现代预防医学, 2001(4):120-121.
- [29] 陆二梅, 李益星, 白杨, 等. 巨噬细胞极化的研究进展. 现代生物医学进展, 2016, (32): 6397-6400.
- [30] 罗霞, 邓国成, 廖国礼, 等. 斑鳢内脏白点病病原的分离鉴定[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 95-100.
- [31] 罗晓松, 尚书, 侯化鹏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌 *aopB*~/~*aopD*~/~*aroA*~/~缺失株的构建及鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1):29-35.

- [32] 梅 雯. 嗜水气单胞菌双组份系 *CpxA/R* 的功能研究[D]. 华中农业大学, 2017, 24.
- [33] 莫简主. 医学自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [34] 莫金凤, 姜 兰, 吴灶和. 乌鳢源舒伯特气单胞菌生物学特性及其药物敏感性分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 484-494.
- [35] 莫金凤. 复方中草药对杂交鳢生长, 肉品质及抗细菌感染能力的影响[D]. 仲恺农业工程学院, 2016, 23-25.
- [36] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 中国农业出版社, 2020, 25.
- [37] 齐冬梅, 徐 蕙, 易 婷, 等. 乌鳢舒氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽药杂志, 2016, (2):11-14.
- [38] 任静静, 杨铭伟, 陈云飞, 等. 食源性单增李斯特菌 *inlA/inlB/inlC* 基因缺失株的构建及其生物学特性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 046(001):45-53.
- [39] 沈锦玉, 潘晓艺, 尹文林, 等. 一种舒伯特气单胞菌快速检测试剂盒及其检测方法[P]. 浙江: CN103571950A, 2014-02-12.
- [40] 施志慧. 人源过氧化氢酶的重组稳定表达, PEG 修饰和抗病毒性肺炎作用研究[D]. 复旦大学, 2011, 26-27.
- [41] 史训龙, 施志慧, 周 伟, 等. 重组人源过氧化氢酶表达优化和纯化研究[J]. 工业微生物, 2011, 41(003): 71-75.
- [42] 舒新华, 金燮理, 肖克宇, 等. 乌鳢腹水病病原的分离和鉴定[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 024(004): 286-290.
- [43] 宋格格, 盛天鸽, 张俊辉, 等. 维氏气单胞菌脂蛋白 *Lpp* 基因缺失株的构建及其部分生物学特性分析[J]. 中国兽医科学, 2020, v.50; No.519(11):77-84.
- [44] 宋明芳. 维氏气单胞菌 TH0426 株 *ndk* 与 *ilvI* 基因缺失株的构建及生物学特性分析[D]. 吉林农业大学, 2019, 47.
- [45] 王冬雪. 维氏气单胞菌 TH0426 *rpoN* 与 *rpoE* 基因缺失株的构建及功能的初探[D]. 吉林农业大学, 2019, 32-35.
- [46] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝, 等. 重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化及性质研究[J]. 微生物学报, 2002. 42(3): 348-353.
- [47] 王国良, 徐益军, 金 珊, 等. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283.

- [48] 王立华, 梁玉兰, 刘汉超, 等. 从腹泻病人大便检出 1 株与肠出血性大肠菌 O157 交叉凝集的舒伯特气单胞菌[J]. 预防医学论坛, 2002, 8(002):140-140.
- [49] 王茂法, 尤康春, 林平, 等. 猪舒伯特气单胞菌的分离与鉴定[J]. 浙江畜牧兽医. 2006, 31(2): 27.
- [50] 王小琳. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种 *cat1* 基因敲除与表型分析[J]. 热带作物学报, 2017(2).
- [51] 王晓南, 高鹏, 王丽环. 大肠杆菌中人过氧化氢酶基因的克隆与表达[J]. 亚太传统医药, 2009, (03): 5-6.
- [52] 王晓萍, 陈拱立, 郭维植. 从腹泻患者中检出简产和舒伯特气单胞菌[J]. 海峡预防医学杂志, 1997, 000(001):26.
- [53] 魏美华, 林华, 李岩, 等. 舒伯特气单胞菌新种的分离鉴定[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(6): 250-153.
- [54] 杨宁. 重组副溶血弧菌过氧化氢酶 *catVPF1*, *catVPR2* 的克隆表达及基因功能研究[D]. 湖北师范大学, 2016, 36.
- [55] 杨映, 李华, 于辉. 同时检测三种气单胞菌的多重 PCR 引物组及探针和检测方法[P]. 广东: CN105420373A, 2016-03-23.
- [56] 余华, 何智, 严玉宝, 等. 温泉鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(7): 37-39.
- [57] 余泽辉. 拟态弧菌 SCCF01 株的全基因组解析及基因缺失株的构建与生物学特性的研究[D]. 四川农业大学, 2018, 50-80.
- [58] 张德锋, 刘春, 可小丽, 等. 一株多重耐药鳢源舒氏气单胞菌的分离、鉴定及其耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2017, (12): 981-986.
- [59] 张海月, 康元环, 陈龙, 等. 不同动物源性维氏气单胞菌 OMPA I 基因的克隆及比较研究[J]. 中国兽医科学, 2016(5):607-610.
- [60] 张鸿, 胥志敏, 陈炜, 等. *PA1864* 基因敲除对铜绿假单胞菌毒力及致病性的影响[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 018(006) :465-473.
- [61] 张闻, 罗勤慧. 锰过氧化氢酶及其模型物研究进展[J]. 化学通报, 2000, (10):7-14.
- [62] 周梦. 抑杀杂交鳢源舒伯特气单胞菌的中草药筛选与应用[D]. 西南大学, 2016, 30-31.
- [63] 朱鸿. 芦荟过氧化氢酶的分离纯化及性质和功能基团研究[D]. 西南大学, 2010, 18-20.
- [64] 卓孝磊, 梁日深, 陈言峰, 等. 杂交鳢(乌鳢♂ × 斑鳢♀) 及其亲本血液指标的比较分析

- [J]. 淡水渔业, 2010, 40(3):72-75.
- [65] Amy M C., Marii M A, Fanning G R, *et al.* Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(8): 1826-1830.
- [66] Ash C, Martinezmurcia A J, Collins M D. Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test[J]. Fems Microbiology Letters, 1993, 108(2): 151-155.
- [67] Bachtiar B M, Coloe P J, Fry B N. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2007, 49.
- [68] Basu M, Czinn S J, Blanchard T G. Absence of Catalase Reduces Long-Term Survival of *Helicobacter pylori* in Macrophage Phagosomes [J]. Helicobacter, 2004, 9(3): 211-216.
- [69] Brooks G, Carroll K, Butel J, *et al.* Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Fifth Edition[J]. Medical, 2010.
- [70] Buttke T M, Cuchens M A. Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids II Toxicity of stearic acid towards phytohaemagglutinin-activated T cells[J]. Immunology, 1984, 53(3): 507.
- [71] Cao J Z, Liu C, Wang Q, *et al.* Investigating of type IV pili to the pathogenicity of *Aeromonas schubertii*[J]. Aquaculture, 2020, 530:735800.
- [72] Capecch M R. Altering the genome by homologous recombination [J]. Science, 1989, 244: 1288-1292.
- [73] Carnahan A M, Marii M A, Fanning G R, *et al.* Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(8):1826-1830.
- [74] Chakraborty T, Huhle B, Bergbauer H, *et al.* Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila aerolysin* gene determinant in Escherichia coli K-12[J]. Journal of bacteriology, 1986, 167(1):368-374.
- [75] Chakraborty T, Huhle B, Hof H, *et al.* Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in A.

- hydrophila*-associated systemic infections. [J]. Infection & Immunity, 1987, 55(9):2274-2280.
- [76] Chakraborty T, Montenegro M A, Sanyal S C, *et al.* Cloning of *enterotoxin* gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin.[J]. Infection & Immunity, 1984, 46(2):435.
- [77] Chen Y F, Liang R S, Zhuo X L, *et al.* Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède)[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(6): 421-430.
- [78] Chen Y, Mapp S, Blumenthal A, *et al.* The duality of macrophage function in Chronic Lymphocytic Leukaemia. [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2017, 1868, (1):176-182.
- [79] Condon, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen[J]. Fems Microbiology Letters, 1987, 46(3):269-280.
- [80] Dautigny A, Prager E M, Pham-Dinh D, *et al.* cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2):187-198.
- [81] Epple H J, Mankertz J, Ignatius R, *et al.* *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6) [J]. Infection and immunity, 2004, 72(8): 4848-4858.
- [82] F Latif-Eugen í, Beaz-Hidalgo R, Figueras, M J. First record of the rare species *Aeromonas schubertii* from mussels: phenotypic and genetic reevaluation of the species and a review of the literature[J]. Archives of Microbiology, 2016, 198(4): 333-345.
- [83] Frederiksen R F, Paspaliari D K, Larsen T, *et al.* Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt\_5): 833-847.
- [84] Ghaedi A, Kabir M A, Hashim R. Effect of lipid levels on the reproductive performance of Snakehead murrel, *Channa striatus*[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(3): 983-99
- [85] Hadi N, Qin Y, Barnett T C, *et al.* Bundle-Forming Pilus Locus of *Aeromonas veronii* by *Sobria*[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(4):1351-1360.
- [86] Hadi N, Yang Q, Barnett T C, *et al.* Bundle-forming pilus locus of *Aeromonas veronii* bv. *Sobria*[J]. Infection & Immunity, 2012, 80(4):1351-1360.

- [87] Hertel C, Schmidt G, Fischer M, *et al.* Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *kata* of *Lactobacillus sakei* LTH677[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(4):1359-1365.
- [88] Hickman-Brenner F W, Fanning G R, Arduino M J, *et al.* *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(8):1561-1564.
- [89] Ishibe K, Yamanishi T, Wang Y, *et al.* Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2):386-389.
- [90] Kao T L, Kao M L. A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis after penetrating injury[J]. *American Journal of Emergency Medicine*, 2012, 30(1): 0-25800000.
- [91] Kokka R P, Lindquist D, Abbott S L, *et al.* Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii*[J]. *Infection & Immunity*, 1992, 60(5): 2075-2082.
- [92] Lee J S, Heo Y J, Lee J K, *et al.* *KatA*, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(7):4399-4403.
- [93] Liepe B, Stone C, Koistinaho J, *et al.* Nitric oxide synthase in Muller cells and neurons of salamander and fish retina[J]. *Journal of Neuroscience*, 1994, 14(12):7641-7654.
- [94] Liu C, Chang O Q, Zhang D F, *et al.* *Aeromonas shubertii* as a cause of multi-organ necrosis in internal organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018.
- [95] Liu J Y, Li A H, Liu J Y, *et al.* First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(5).
- [96] Marais A, Monteiro L, Occhialini A, *et al.* Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens[J]. *Gut*, 1999, 44(4):463-7.
- [97] Meng Q, Wong Y T, Chen J, *et al.* Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats[J]. *Mechanisms of ageing and development*,

- 2007, 128(3): 286—292。
- [98] Mittler R, Lam E, Shulaev V, *et al.* Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(5):1025.
- [99] 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*, 2010, 105(5):1441-1451.
- [100] Naok, YO, Satoko, K, Miho I U, *et al.* Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(5).
- [101] Ostholm T, Holmqvist B I, Alm P, *et al.* Nitric oxide synthase in the CNS of the *Atlantic salmon*. [J]. *Neuroscience Letters*, 1994, 168(1-2):233-237.
- [102] Pastan I, Fitzgerald D J. Pseudomonas exotoxin: Chimeric toxins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(26):15157-15160.
- [103] Pathak N, Lal B. Seasonality in expression and distribution of nitric oxide synthase isoforms in the testis of the catfish, *Clarias batrachus*: role of nitric oxide in testosterone production. [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(3):286-293.
- [104] Pearson M D, Hirono I, Aoki T, *et al.* Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigrina* and *R. rugulosa*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(3): 185-193.
- [105] Potomski J, Burke V, Robinson J, *et al.* *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin[J]. *Journal of medical microbiology*, 1987, 23(2): 179-186.
- [106] Radcliff F J, Hazell S L, Kolesnikow T, *et al.* Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination.[J]. *Infection & Immunity*, 1997, 65(11):4668.
- [107] Rollof J, Braconier J H, Söderström C, *et al.* Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function[J]. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 1988, 7(4): 505.
- [108] Rosalina G, Susana M, Maria A, *et al.* Lateral flagella are required for increased cell adherence,

- invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp.[J]. Fems Microbiology Letters, 2010(1):77-83.
- [109] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, *et al.* Targeted Gene Knockout in Mammalian Cells by Using Engineered Zinc-Finger Nucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(15).
- [110] Sin Z. Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997.
- [111] Smith K F, Schmidt V, Rosen G E, *et al.* Microbial Diversity and Potential Pathogens in Ornamental Fish Aquarium Water[J]. PLoS ONE, 2012, 7(9):e39971.
- [112] Stafford J L, Neumann N F, Belosevic M Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(2):101-115.
- [113] Thelestam M, Ljungh A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha-and beta-hemolysins *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection and immunity, 1981, 34(3): 949-956.
- [114] Vasquez, K M, Marburger K, & Intody, *et al.* Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America[J], 2001, 98(15), 8403-8403.
- [115] Wadström T, Ljungh Å, Wretlind B. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections[J]. APMIS, 1976, 84(2): 112-114.
- [116] Wan B, Zhang Q, Ni J, *et al.* Type VI secretion system contributes to *Enterohemorrhagic Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS)[J]. Pathogens, 2017, 13(3): e1006246.
- [117] Wretlind B, Mällby R, Wadström T. Separation of two hemolysins from *Aeromonas hydrophila* by isoelectric focusing[J]. Infection and immunity, 1971, 4(4): 503-505.
- [118] Xu J, Bian C, Chen K, *et al.* Draft genome of the Northern snakehead, *Channa argus*[J]. Giga Science, 2017, 6(4): x11.
- [119] Yano Y, Hamano K, Tsutsui I, *et al.* Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds[J]. Food Microbiology, 2015, 47:21-27.

- [120] Zhang X, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5):1011

## 致 谢

时光飞逝，三年的研究生生活即将落下帷幕。复试时老师问“你人生遇到的最大挫折是什么？你怎么解决”，我回答老师“我好像真的没有经历过挫折，当然如果我遇到挫折的话，会调整心态，积极的去面对挫折。”但我内心想的是“我不会遇到的挫折”。

果然人不能立 flag，挫折随之而来，研一手指骨折些许影响学习和生活，不过天将降大任于斯人也，必先苦其心智，劳其筋骨；研二我想挑战自己，因此去珠江所联培丰富鱼病相关的经验，然后开始了实验不顺之旅，秉承“遇到挫折，积极面对”的态度。但是实验不顺，没能调节自己的情绪，但是有你们在，我渐渐面对挫折并克服挫折，迎来新生。

在这里，非常感谢刘春老师，刘老师专业知识精通，为人幽默风趣，是您无限包容在实验路上磕磕绊绊的我，不断鼓励我，教我分析实验失败的原因，在毕业课题的选定、实验设计与实验思路的拓展和文章撰写上认真指导；感谢王庆老师给我珠江所学习的机会，您是一位专业能力强，做事雷厉风行且为人和蔼的老师，耐心指导修改文章和反修意见以及对我生活上的关心；感谢珠江水产研究所，鱼病室提供的实验平台，感谢张德锋老师对实验提供的建议和修改意见，感谢郑树城师兄和曹际振师兄对我实验文章思路的指导文章写作的指导，也感谢实验室其他老师对本研究中实验方法的指导及问题的解答。感谢胡峰、高艳侠、霍礼侠、蒋艳红等师兄师姐，渠洋、陈佳明、刘小芳、杨玉茹、王家川、黄志深、胡虎子等同学及刘丽娟、王雅慧、吴辉亮、马杰师弟师妹对我实验过程中所提供的帮助和生活情绪上的关心，在这里我不仅学会了实验技能，更重要是对人生的思考。

感谢郑永华老师，郑老师学识渊博，为人和善，工作兢兢业业，虽然我在外学习实验，但会有与其他师弟师妹一视同仁的关心照顾，回学校有实验室聚餐，让我觉得实验室是另一个家，有什么问题的時候郑老师会认真解答。感谢唐洪玉老师，对我学习和生活上的关心。感谢朱成科老师以及实验室的其他老师和水产老师们无私的帮助与支持，感谢辅导员尹斌老师和研究生秘书张娜老师对我其他琐事的帮助。

感谢渔业资源与保护学实验室的卢群、张润田、张禛、王思宇、刘艳佳、龚巧、孟秋、胡芯、陈云川等师兄师姐，同学李松樟、陈灵涵、冯麒凤、郭佳玲、马卉佳、周彬等，师妹龙珍满、彭小倩、朱婷婷等，师弟陈卓、魏士卜等，感谢你们在学校帮我处理事儿，和你们相处的时光虽短暂但也很快乐。

感谢我的家人们，我的奶奶对我无微不至的关心，不断开导我让我能没有压力的学习，感谢我的爸爸妈妈努力工作供我读书。感谢我的朋友们孙正琼、金玲、谈明珠、田玲玲等是你们不断鼓励我，让我在研究生学习路上坚持下去。

感谢你们，我还是我，未来的路还很长，但即使后面还有挫折般的暴风雨，我还是会大喊：“让暴风雨来得更猛烈些吧”，然后微笑大步向前走！



## 攻读硕士期间发表论文

Haiyan Gong, Jizhen Cao, Chun Liu, Chengke Zhu, Sven M. Bergmann, Yonghua Zheng, Qing Wang. Development and application of monoclonal antibody against IgM of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂)[J]. Aquaculture Research.。