

# *flgK* 对美人鱼发光杆菌美人鱼亚种生理生化和分子调控机制

刘浩哲<sup>1,2</sup>, 张志琪<sup>2,3</sup>, 于永翔<sup>2,3</sup>, 王春元<sup>2,3</sup>, 王印庚<sup>2,3</sup>, 荣小军<sup>2,3</sup>,  
廖梅杰<sup>2,3</sup>, 罗璋<sup>1</sup>, 张正<sup>2,3\*</sup>

1 天津农学院 水产学院, 天津

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛

3 青岛海洋科技中心, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛

刘浩哲, 张志琪, 于永翔, 王春元, 王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 罗璋, 张正. *flgK* 对美人鱼发光杆菌美人鱼亚种生理生化和分子调控机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3583-3599.

LIU Haozhe, ZHANG Zhiqi, YU Yongxiang, WANG Chunyuan, WANG Yingeng, RONG Xiaojun, LIAO Meijie, LUO Zhang, ZHANG Zheng. Physio-biochemical and molecular regulation mechanism of *flgK* on *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3583-3599.

**摘要:** 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种广泛存在于海水中的致病菌, 能够感染多种经济鱼类, 对全球水产养殖业造成巨大经济损失。鞭毛基因 *flgK* 可编码鞭毛钩蛋白 FlgK, 该蛋白对细菌鞭毛的正常形成至关重要。【目的】系统解析 *flgK* 基因对 PDD 感染宿主毒力作用的影响机制。【方法】采用高效自杀质粒介导的同源重组方法构建 PDD 的 *flgK* 基因缺失突变株( $\Delta flgK$ -PDD), 并通过基因测序证实突变成功。对  $\Delta flgK$ -PDD 在生物学特性、毒力基因表达及致病性等方面与野生株(WT-PDD)的差异进行比较分析。【结果】 $\Delta flgK$ -PDD 的生长能力、溶血活性、磷脂酶活性与 WT-PDD 无显著差异。然而,  $\Delta flgK$ -PDD 的运动能力和生物被膜形成能力较 WT-PDD 显著下降。透射电子显微镜观察显示,  $\Delta flgK$ -PDD 未能形成鞭毛结构。通过人工感染实验发现  $\Delta flgK$ -PDD 对许氏平鲉的 LD<sub>50</sub> 为 WT-PDD 的 557%, 致病性显著降低。实时荧光定量 PCR 结果进一步表明, 与 WT-PDD 株相比,  $\Delta flgK$ -PDD 的鞭毛相关基因 *fliK* 和 *flgL*, II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS)相关基因 *gspC* 和 *gspD* 以及毒力基因 *hlyA<sub>pl</sub>* 表达显著下调; 而鞭毛相关基因 *fliH*, T2SS 相关基因 *gspE*, 外膜相关基因 *ompP*、*flhB* 和脂多糖相关基因 *lapB* 表达显著上调, 其余基因未见显著变化。【结论】*flgK* 基因的突变可导致  $\Delta flgK$ -PDD

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400704); 山东省自然科学基金(ZR2021MC027); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD29)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400704), the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021MC027), and the Fundamental Research Funds of the Chinese Academy of Fishery Sciences (2023TD29).

\*Corresponding author. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

Received: 2025-01-14; Accepted: 2025-03-14; Published online: 2025-05-29

无法形成完整的鞭毛结构，并显著改变鞭毛相关基因的相对表达水平，从而降低其运动性和定殖能力，最终导致其致病性显著下降。

关键词：美人鱼发光杆菌美人鱼亚种；*flgK* 基因；致病性；分子机制

## Physio-biochemical and molecular regulation mechanism of *flgK* on *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

LIU Haozhe<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhiqi<sup>2,3</sup>, YU Yongxiang<sup>2,3</sup>, WANG Chunyuan<sup>2,3</sup>, WANG Yingeng<sup>2,3</sup>, RONG Xiaojun<sup>2,3</sup>, LIAO Meijie<sup>2,3</sup>, LUO Zhang<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>2,3\*</sup>

1 College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin, China

2 State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong, China

3 Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao, Shandong, China

**Abstract:** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD), a pathogenic bacterium widely found in seawater, can infect a variety of economic fish and cause huge economic losses to the global aquaculture industry. The flagellar gene *flgK* encodes the flagellar hook protein FlgK, which is essential for the normal formation of bacterial flagella. **[Objective]** To systematically analyze the influencing mechanism of *flgK* on the virulence of PDD. **[Methods]** The *flgK*-deleted mutant of PDD ( $\Delta flgK$ -PDD) was constructed by homologous recombination mediated by a high-efficiency suicide plasmid, and the mutation was confirmed by gene sequencing. The biological characteristics, virulence gene expression, and pathogenicity were compared between  $\Delta flgK$ -PDD and the wild-type strain (WT-PDD). **[Results]** There was no significant difference in the growth ability, hemolytic activity or phospholipase activity between  $\Delta flgK$ -PDD and WT-PDD. However, the motility and biofilm formation of  $\Delta flgK$ -PDD were significantly lower than those of WT-PDD. Transmission electron microscopy showed that  $\Delta flgK$ -PDD failed to form a flagellar structure. The artificial infection experiments showed that the LD<sub>50</sub> of  $\Delta flgK$ -PDD in *Sebastes schlegelii* was 557% that of WT-PDD, and the pathogenicity was significantly reduced. Real-time quantitative PCR results showed that compared with WT-PDD,  $\Delta flgK$ -PDD demonstrated significantly down-regulated expression of the flagellar-related genes *fliK* and *flgL*, the type II secretion system (T2SS)-related genes *gspC* and *gspD*, and the virulence gene *hlyA<sub>pl</sub>*. The expression levels of flagellar-related gene *fliH*, T2SS-related gene *gspE*, outer membrane-related genes *ompP*, *lapB*, and *flhB* were significantly up-regulated, and those of the remaining genes did not change significantly. **[Conclusion]** The mutation of *flgK* can lead to the failure of  $\Delta flgK$ -PDD to form a complete flagellar structure and significantly change the relative expression levels of flagellar-related genes, thereby reducing the motility and colonization ability and ultimately weakening the

pathogenicity of PDD.

**Keywords:** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; *flgK*; pathogenicity; molecular mechanism

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是广泛分布于海洋环境中的革兰氏阴性细菌<sup>[1]</sup>, 是花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)等<sup>[2]</sup>重要经济鱼类的病原体, 同时对鲸类、小鼠以及人类等哺乳动物也具有致病性<sup>[3]</sup>。感染后主要表现为败血症出血症状, 包括皮肤溃疡及肝、肾、脾等内脏组织的局灶性坏死<sup>[4]</sup>。此外, PDD 还会引起人类的机会性感染, 可能发展为坏血性筋膜炎<sup>[5]</sup>, 甚至导致死亡, 对海洋食品安全和人类健康构成威胁<sup>[6]</sup>。

PDD 的致病性与其毒力因子和胞外产物密切相关, 毒力因子是病原菌入侵宿主、产生病理损伤和逃避宿主防御的关键因素<sup>[7]</sup>。PDD 主要有 4 种不同的毒力因子<sup>[8]</sup>: 包括具有磷脂酶-D 活性的 Dly 毒素<sup>[9]</sup>和成孔毒素 PhlyP<sup>[10]</sup>, 二者均由毒性质粒 pPHDD1 编码<sup>[11]</sup>; 还有磷脂酶 PlpV<sup>[3]</sup>和溶血素 PhlyC<sup>[12]</sup>。此外, PDD 还具有铁离子摄取系统, 与 PDD 的致病能力密切相关<sup>[13]</sup>, 在细菌致病过程中发挥关键作用。

鞭毛是细菌的重要结构, 与细菌的运动和生存密切相关<sup>[14]</sup>。研究表明, 鞭毛对于细菌的定殖、侵袭和毒力表达也非常重要<sup>[15]</sup>。鞭毛由基体、鞭毛钩、鞭毛丝和鞭毛帽四部分组成<sup>[16]</sup>, 其中鞭毛钩是一个弯曲的结构, 连接基体和鞭毛丝, 其灵活性允许细菌在运动中快速改变方向<sup>[17]</sup>。在某些病原性细菌中, 鞭毛的存在和功能与细菌的毒力直接相关。例如, 鞭毛有助于细菌逃避宿主的免疫反应, 或在感染过程中发挥特定的致病作用<sup>[18]</sup>。

*flgK* 基因编码的鞭毛钩蛋白 FlgK 是细菌鞭毛结构的关键组成部分, 与细菌的运动性与致病性密切相关; FlgK 蛋白对于维持细菌的运动能力、黏附性以及生物被膜形成等生物学功能

具有显著作用<sup>[19]</sup>。FlgK 蛋白在鞭毛结构中靠近 FlgE, 对于鞭毛的轴向运动和传递鞭毛钩至鞭毛丝的过程至关重要<sup>[20]</sup>。在沙门氏菌和嗜水气单胞菌中, FlgK 蛋白的缺失会导致鞭毛组装异常和黏附能力减弱<sup>[21]</sup>。在阪崎克罗诺杆菌中, FlgK 不仅参与了细菌的运动和细胞入侵, 还有助于抵抗环境压力<sup>[22]</sup>。在变形假单胞菌中, FlgK 的功能更为多样, 它不仅调节细菌的运动和黏附, 还参与生物被膜的形成, 并影响炎症反应和免疫应答。通过 RNA 干扰技术抑制 FlgK 的表达后, 斑点石斑鱼(*Epinephelus coioides*)在受到感染后的存活率比野生型提高了 55%<sup>[23]</sup>。尽管 *flgK* 基因在多种细菌中对鞭毛的形成和功能至关重要, 并影响细菌的运动、黏附、侵袭和生物被膜形成等与致病性相关的性状<sup>[24]</sup>, 但其在 PDD 中的作用尚无明确报道。

本研究采用自杀质粒介导的二次同源重组的方法, 将 PDD 强毒力菌株中编码 FlgK 蛋白的基因敲除, 并对野生株(WT-PDD)和突变株( $\Delta flgK$ -PDD)分别进行生物学特性验证, 比较二者的表型特征及毒力差异, 以期揭示 PDD 强毒力菌株中 *flgK* 基因在毒力调控中的作用机制, 进而明确该基因在 PDD 毒力侵染过程中的关键作用, 为理解 *flgK* 在 PDD 的生物学特性和致病机制中的作用提供新的见解, 并为开发新的抗菌策略提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

表 1 列出了本研究使用的菌株和质粒。实验选取的菌株 WT-PDD (ID: PDD-1605)分离自海水网箱养殖患病许氏平鲈的体表溃疡处, 现存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原菌株库内<sup>[25]</sup>。PDD 菌株在 28 °C 下培养过夜, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) S17- $\lambda$ pir 在

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids                                | Characteristic  | Source                                      |
|---|---|---|
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> | Wild-type strain, Amp <sup>r</sup>  | Lab stock                                   |
| $\Delta flgK$ -PDD                                  | <i>flgK</i> deletion mutant of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , Amp <sup>r</sup> | This study                                  |
| <i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda$ pir         | RP4-2 (Km::Tn7, Tc::Mu-1), pro-82, LAMpir, recA1, endA1, thiE1, hsdR17, creC510                       | Lab stock                                   |
| pRE112  | Suicide plasmid, sacB, Cm <sup>r</sup>  | Southwest University, Prf. R. H. Wu donated |
| pRE112-UD <i>flgK</i>                               | pRE112 carrying the recombinant fragment UD <i>flgK</i>   | This study                                  |

37 °C下培养过夜。阳性选择抗生素浓度为氨苄西林 (ampicillin, Amp) 100  $\mu$ g/mL, 氯霉素 (chloramphenicol, Cm) 30  $\mu$ g/mL。第二次同源重组筛选蔗糖浓度为 200 mg/mL。

## 1.2 $\Delta flgK$ -PDD 的构建

使用细胞基因组 DNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取 WT-PDD 基因组 DNA。以 PDD 基因组为模板, 使用两对引物 *flgK*-1F (*Sac* I)/*flgK*-1R 和 *flgK*-2F/*flgK*-2R (*Xba* I) 进行 PCR 扩增, 以扩增 *flgK* 基因的上游和下游区域。使用引物 *flgK*-1F (*Sac* I)/*flgK*-2R (*Xba* I) 连接上下游, 得到的片段称为 UD*flgK*。将 UD*flgK* 和自杀质粒 pRE112 分别用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切并纯化后, 用 T4 DNA 连接酶将 UD*flgK* 连接到 pRE112 的 *Sac* I/*Xba* I 位点, 构建重组质粒 pRE112-UD*flgK*。然后将测序成功的重组质粒转化到 *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir 中, 用引物 pRE112-F/R 验证重组质粒是否转入大肠杆菌。将正确测序的大肠杆菌与 WT-PDD 进行接合转移, 在其自我分裂增殖的过程中促进第 1 次同源重组。第 1 次同源重组获得的菌株在含 20% 蔗糖的 TSB 液体培养基中培养, 以促进第 2 次同源重组, 用引物 in-*flgK*-F/in-*flgK*-R 进行 PCR 验证突变。将获得的 *flgK* 基因突变株连续传代 50 次, 用引物 in-*flgK*-F/in-*flgK*-R 验证突变株是否具有遗传稳定性。所有用于构建突变株的引物序列见表 2。

PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix (P222-01) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 10  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。

## 1.3 生长曲线测定

将培养过夜的 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 菌悬液按 1:100 的比例稀释接种于 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ L, 每株菌设 3 个平行, 含 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基为空白对照。使用全自动生长曲线分析仪每隔 2 h 测定 1 次 OD<sub>600</sub> 值, 绘制生长曲线。实验重复 3 次。

## 1.4 溶血活性和磷脂酶活性测定

在含 1.5% NaCl 的 TSB 固体培养基中加入 5% 脱纤维绵羊血, 制备打孔绵羊血平板。每孔加入 200  $\mu$ L 菌液, 28 °C 正置培养 48 h, 记录溶血现象。实验重复 3 次。在含 1.5% NaCl 的 TSB 培养基中加入 3% 卵黄乳液, 制备打孔卵黄平板。每孔加入 100  $\mu$ L 菌液, 28 °C 正置培养 48 h, 记录磷脂酶活性。实验重复 3 次。

## 1.5 生物被膜形成能力实验

将 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 菌株在 TSB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 值为

表2 用于构建 $\Delta flgK$ -PDD的引物序列Table 2 The primer sequences for constructing  $\Delta flgK$ -PDD

| Primer name                     | Sequence (5'→3')                 | Product length (bp)             | Target DNA                     |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>flgK</i> -1F ( <i>Sac</i> I) | CGTCTAGACCGATGTATCAACACGCTT      | 612                             | Up stream <i>flgK</i>          |
| <i>flgK</i> -1R                 | AACCGCTCAGAGTGACCGAACTTGTTACGACA |                                 |                                |
| <i>flgK</i> -2F                 | AACCAAGTTCGGTCACTCTGAGCGTTTGTTC  | 555                             | Down stream <i>flgK</i>        |
| <i>flgK</i> -2R ( <i>Xba</i> I) | GCGAGCTCTGGCTATTAGCACCTGTTTT     |                                 |                                |
| pRE112-F                        | CGGGTTGAGAAGCGGTGTA              | 1 487 (pRE112-UD <i>flgK</i> )/ | Target gene cloned to          |
| pRE112-R                        | CAGCCAATCCCTGGGTGAG              | 378 (pRE112)                    | pRE112                         |
| in- <i>flgK</i> -F              | AGCCACCGACATAATACGA              | 1 546 (WT-PDD)/                 | Internal region of <i>flgK</i> |
| in- <i>flgK</i> -R              | AGAACAAGCGAAACAAACC              | 449 ( $\Delta flgK$ -PDD)       | gene for identification        |
| 27F                             | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG             | 1 516                           | 16S rDNA                       |
| 1492R                           | TACGGCTACCTTGTTACGACTT           |                                 |                                |

0.5–0.6, 然后倍比稀释至  $10^{-2}$ 。取 200  $\mu$ L 稀释菌液加入无菌 96 孔板, 每株菌设 5 个平行孔, 使用无菌 TSB 作为阴性对照, 其余孔中加入 200  $\mu$ L 无菌 ddH<sub>2</sub>O。密封 96 孔板后, 28 °C 培养 48 h。吸去菌液, 用 PBS 清洗, 风干后用甲醇固定 15 min。晾干后结晶紫染色 5 min, ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次, 干燥后用 100  $\mu$ L 95% 乙醇溶解生物被膜, 使用酶标仪测定  $OD_{595}$  值。实验重复 3 次。

## 1.6 运动性实验

将 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 菌种活化于添加 1.5% NaCl 的 TSB 固体培养基上, 然后用解剖针分别挑取单菌落接种于 0.3% 和 0.6% 琼脂的 TSB 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h, 观察并分析其运动能力。实验重复 3 次。

## 1.7 药物敏感性测试

采用 K-B 纸片扩散法进行 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的抗生素药敏实验。用灭菌镊子夹取药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)贴于涂有菌液的 TSB 平板上, 28 °C 倒置培养 14 h, 测量抑菌圈直径。实验结果与美国临床和实验室标准

协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 的标准进行对比。实验重复 3 次。

## 1.8 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察细胞形态

将纯化的 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 单菌落分别接种于含 1.5% NaCl 的 TSB 固体培养基上, 参考文献[26]的方法, 将单菌落以 1% 的比例接种到新的 TSB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  值为 0.6 左右。在载玻片上滴 1 滴菌液, 将铜网放在菌液上吸附 2 min, 小心吸去多余菌液, 用 5% 磷钨酸负染色液在铜网上染色 1 min, 吸去多余染料, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 1 次, 晾干过夜。使用 TEM 观察 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的细胞形态差异。

## 1.9 半数致死量(LD<sub>50</sub>)测定

将 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 单菌落接种到 TSB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 12 h, 然后将 1% 的菌液接种到新的液体培养基中, 继续培养 12 h。用浊度计调节细菌浓度至  $10^8$  CFU/mL。用 TSB 稀释菌液至  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  CFU/mL 这 5 个浓度梯度。以 100  $\mu$ L/尾的剂

量腹腔注射许氏平鲈，每个浓度梯度注射 20 尾，对照组注射等量无菌 TSB。观察 1 周并统计死鱼数量，根据寇氏法<sup>[27]</sup>计算 LD<sub>50</sub> 值，评估  $\Delta flgK$ -PDD 和 WT-PDD 对许氏平鲈的致病性。本研究严格遵守中国水产科学研究院黄海水产研究所动物实验伦理审查委员会的规定(编号为 YSFRI-2024063)。

### 1.10 *flgK* 基因突变对毒力基因转录表达的影响(RT-qPCR)

根据通用 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的说明，提取 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的总 RNA，然后用逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)合成 cDNA。RT-qPCR 采用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)作为荧光染料。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L，模板(cDNA) 2  $\mu$ L，上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L，RNase free 水 7.2  $\mu$ L。PCR 反应条件：95  $^{\circ}$ C 30 s；95  $^{\circ}$ C 15 s，60  $^{\circ}$ C 30 s，循环 40 次。以 *gyrB* 为管家基因<sup>[28]</sup>，检测的基因包括鞭毛相关基因(*flgK*、*flgL*、*fliK*、*fliH*)、毒力相关基因(*dly*、*hlyA<sub>ch</sub>*、*hlyA<sub>pl</sub>*、*plpV*)、II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS)相关基因(*gspC*、*gspD*、*gspE*、*gspF*)、铁摄取相关基因(*fur*)、外膜相关基因(*ompP*、*flhB*)、趋化蛋白相关基因(*cheW*、*cheY*)和脂多糖相关基因(*lapB*)。所有引物均根据 WT-PDD 基因组设计，每个基因的相对表达量采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法<sup>[29]</sup>计算。实验重复 3 次，引物信息见表 3。

### 1.11 数据分析

采用 Excel、Graphpad Prism 9.0 分析软件对数据进行统计分析。结果以平均值 $\pm$ 标准偏差(mean $\pm$ SD)表示。直径、吸光度和菌落形成单位计数之间的统计差异采用独立样本 *t* 检验，以

$P < 0.05$  为显著性标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺失株的构建

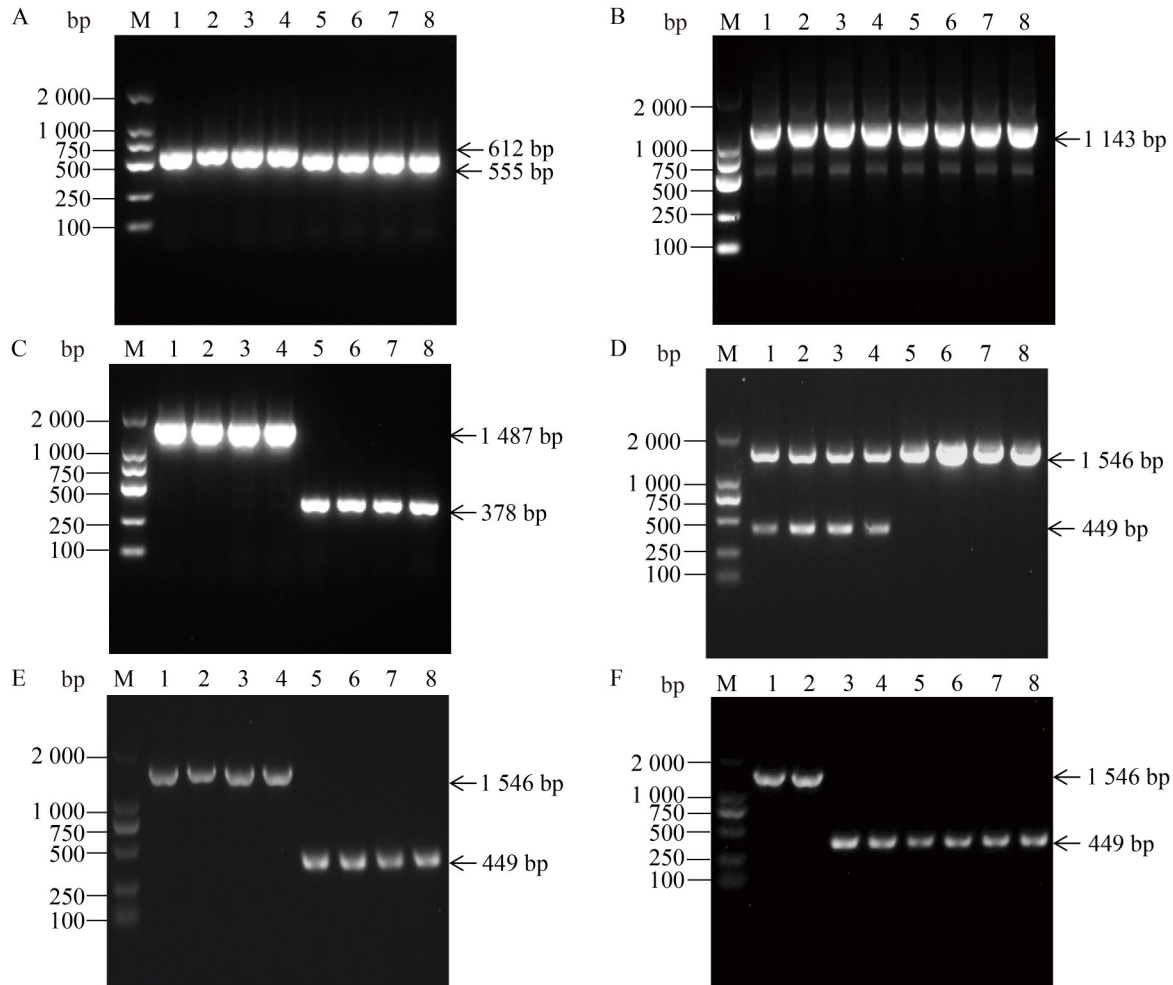
以 WT-PDD 基因组为模板，分别用引物 *flgK*-1F (*Sac* I)/*flgK*-1R 和 *flgK*-2F/*flgK*-2R (*Xba* I) 扩增 *flgK* 基因的上游和下游同源臂，上游长度为 612 bp，下游长度为 555 bp (图 1A)。以上游和下游 PCR 产物为模板，使用 *flgK*-1F (*Sac* I)/*flgK*-2R (*Xba* I) 引物通过重叠延伸 PCR 进行扩增，得到大小为 1 143 bp 的片段(图 1B)。将构建的重组质粒导入 S17- $\lambda$ pir 后，用 pRE112-F/pRE112-R 引物进行验证，得到 1 487 bp 和 378 bp 的片段，其中 378 bp 片段为空质粒扩增的条带，重组质粒扩增出 1 487 bp 条带(图 1C)。WT-PDD 与含有重组质粒的 S17- $\lambda$ pir 进行共培养，培养完成后将混合菌液涂布于含有 Cm 和 Amp 的 TSB 固体培养基上。使用 in-*flgK*-F/in-*flgK*-R 引物验证单菌落。成功接合的菌株获得了 1 546 bp 和 449 bp 的双条带，而接合失败的菌株为 1 546 bp 单条带(图 1D)。选择扩增出双条带的单菌落，经过多次蔗糖筛选，并用 in-*flgK*-F/in-*flgK*-R 引物进行验证，直至全部扩增出 449 bp 缺失条带，对照 WT-PDD 扩增出 1 546 bp 条带(图 1E)。最后将带有缺失条带的单菌落连续培养 50 代，然后用 in-*flgK*-F/in-*flgK*-R 引物再次扩增，WT-PDD 得到大小为 1 546 bp 的片段， $\Delta flgK$ -PDD 得到 449 bp 条带，表明  $\Delta flgK$ -PDD 可以稳定遗传，具有良好的遗传稳定性(图 1F)。

### 2.2 生长曲线对比

为了研究 *flgK* 基因对 PDD 生长的影响，本研究对 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的生长速率进行了测定。结果显示， $\Delta flgK$ -PDD 的生长趋势与 WT-PDD 无显著差异(图 2)。

表3 用于RT-qPCR检测WT-PDD和 $\Delta$ flgK-PDD相关基因的引物序列Table 3 The primer sequences for RT-qPCR to detect WT-PDD and  $\Delta$ flgK-PDD related genes

| Genes                    | ID            | Sequences (5'→3')                                   | Product length (bp) |
|--------------------------|---------------|---|---------------------|
| <i>gyrB</i>              | NZ_CP073684.1 | F: GTGATACTGATCGTACAGGT<br>R: CTTTCTGGTGAATTGGTGTT  | 246                 |
| <i>gspC</i>              | NZ_CP073684.1 | F: ACTGAGTAGTTACAGGAGCCG<br>R: AATGAAGCGATTAAAGGGA  | 160                 |
| <i>gspD</i>              | NZ_CP073684.1 | F: CAGAAATGCCAGTTAGGGT<br>R: TGAATCGTTAAATAAGAGTGC  | 236                 |
| <i>gspE</i>              | NZ_CP073684.1 | F: CCAGAAATAATGCCGTGAGG<br>R: GCAGTGGATGTGCGTGTAT   | 169                 |
| <i>gspF</i>              | NZ_CP073684.1 | F: ACTTCACCCCAAAGACCAC<br>R: AGCGATGATTTATCCAACC    | 215                 |
| <i>dly</i>               | NZ_CP073687.1 | F: ATGCGACAGCACAAGAACC<br>R: GACCGCTCGTCCAAATAAG    | 236                 |
| <i>plpV</i>              | NZ_CP073684.1 | F: AACGCTGCTGATATTACCTA<br>R: GCCTAAGAACCAAGAGTTTG  | 195                 |
| <i>hlyA<sub>pl</sub></i> | NZ_CP073687.1 | F: AAAACTCGCATAACTAAGAGG<br>R: GTAAAGATGGACCGAAAGC  | 248                 |
| <i>hlyA<sub>ch</sub></i> | NZ_CP073684.1 | F: GATAACCTTCCGACCATAACA<br>R: CGAGTCTTCAGGCTAATGC  | 186                 |
| <i>fur</i>               | NZ_CP073684.1 | F: CACATTAGTGC GGAAGACC<br>R: TTGCCACAATCTAAACAAACA | 197                 |
| <i>cheW</i>              | NZ_CP073684.1 | F: AGAGGCTAAATGGGTTGAC<br>R: TCCTGATTCTAAGGGGTCTA   | 139                 |
| <i>cheY</i>              | NZ_CP073684.1 | F: GTCGGTAATAACAAAGTCAAA<br>R: GTGAAGAACTTACTGCGTGA | 111                 |
| <i>ompP</i>              | NZ_CP073684.1 | F: CACTGGTAACTTTGGTGGTC<br>R: GGTGTAGTACCTTGCTGATTT | 174                 |
| <i>lapB</i>              | NZ_CP073684.1 | F: ATGATTGAGTTAGGTGCC<br>R: TTGCCTGCTTGTATTCTTG     | 139                 |
| <i>flhB</i>              | NZ_CP073684.1 | F: TCAGGCTTACCTTCTGTCTC<br>R: CTGCTCGTTATTAGTGGTTG  | 123                 |
| <i>flgK</i>              | NZ_CP073684.1 | F: GAAAAGCCATCGACAGAG<br>R: ATTAAGCCATTAGGCAGTAA    | 194                 |
| <i>flgL</i>              | NZ_CP073684.1 | F: TAAGGGTAAGTTCAAAGTCAAG<br>R: CAGGTAGTACGGCAGGAG  | 297                 |
| <i>fliK</i>              | NZ_CP073684.1 | F: ACTCGGTCAGAAGAGGTCG<br>R: GAATGCAGTTGGCTCAAAG    | 184                 |
| <i>fliH</i>              | NZ_CP073684.1 | F: AACAGCAATAGGCGTAGCG<br>R: CCATTAACAGCGGCAGATC    | 246                 |



**图1**  $\Delta flgK$ -PDD的构建和验证。A: *flgK*基因上下游片段扩增(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-4: 上游同源臂; 泳道5-8: 下游同源臂); B: *flgK*基因上下游片段的连接(UD*flgK*) (泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-8: 重叠延伸PCR的结果); C: 大肠杆菌S17-1 $\lambda$ pir的筛选(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-4: 携带重组质粒的大肠杆菌; 泳道5-8: 携带空载质粒的大肠杆菌); D: *flgK*突变株的第一次筛选鉴定(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-4: 第一次同源重组成功的菌株; 泳道5-8: 第一次同源重组失败的菌株); E: *flgK*突变株的筛选鉴定(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-4: WT-PDD; 泳道5-8:  $\Delta flgK$ -PDD); F: 遗传稳定性检测(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-4: WT-PDD; 泳道5-8:  $\Delta flgK$ -PDD)。

Figure 1 Construction and verification of  $\Delta flgK$ -PDD. A: Amplification of upstream and downstream fragments of *flgK* gene (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-4: Upstream homologous arm; Lanes 5-8: Downstream homologous arm); B: The upstream and downstream fragments of *flgK* gene (UD*flgK*) (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-8: Overlap extension PCR results); C: *Escherichia coli* S17-1 $\lambda$ pir transformation screening (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-4: Recombinant plasmid was successfully transferred into *E. coli*; Lanes 5-8: Empty plasmid was transferred into *E. coli*); D: Screening and identification of *flgK* gene mutant strain for the first time (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-4: Strains that completed the first homologous recombination; Lanes 5-8: Strains failed in the first homologous recombination); E: Screening and identification of *flgK* mutant strain (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-4: WT-PDD; Lanes 5-8:  $\Delta flgK$ -PDD); F: Genetic stability test (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-4: WT-PDD; Lanes 5-8:  $\Delta flgK$ -PDD).

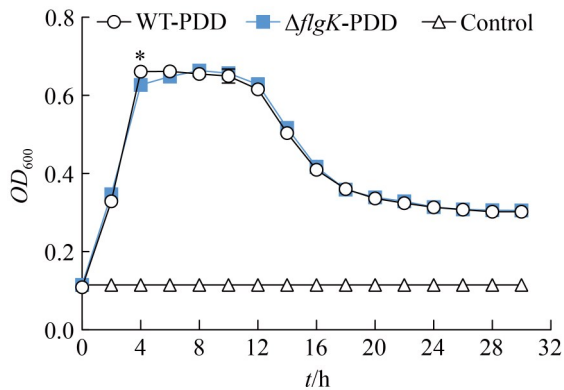


图2 WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD的生长曲线测定。用全自动生长曲线测量仪测量每个时间点的 $OD_{600}$ 值并绘制生长曲线图, \*表示 $P < 0.05$ 。结果以均数 $\pm$ 标准差( $n=3$ )表示。

Figure 2 Growth curves determination of WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD.  $OD_{600}$  values at each time point were measured by a spectrophotometer and displayed in the chart. \*:  $P < 0.05$ . The results were expressed as mean $\pm$ SD ( $n=3$ ).

## 2.3 半数致死量(LD<sub>50</sub>)测定

用16S-F/16S-R引物对从死鱼中分离得到的细菌进行验证, PCR产物测序后与已知序列比对, 确认该细菌为PDD。统计感染后许氏平鲈的死亡数并计算半致死剂量。如图3所示, WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD的LD<sub>50</sub>分别为 $1.08 \times 10^5$  CFU/mL和 $6.02 \times 10^5$  CFU/mL。结果表明, 突变菌株的LD<sub>50</sub>为野生型菌株的557%, 毒力显著降低( $P < 0.05$ )。

## 2.4 溶血活性和磷脂酶活性

WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD均表现出强 $\beta$ -溶血性和强磷脂酶活性。与WT-PDD相比,  $\Delta flgK$ -PDD的溶血活性和磷脂酶活性并无显著变化(图4)。结果表明, 鞭毛结构基因 $flgK$ 的缺失对PDD的溶血活性和磷脂酶活性无显著影响。

## 2.5 运动性对比

通过测量不同琼脂浓度培养基上的菌落直

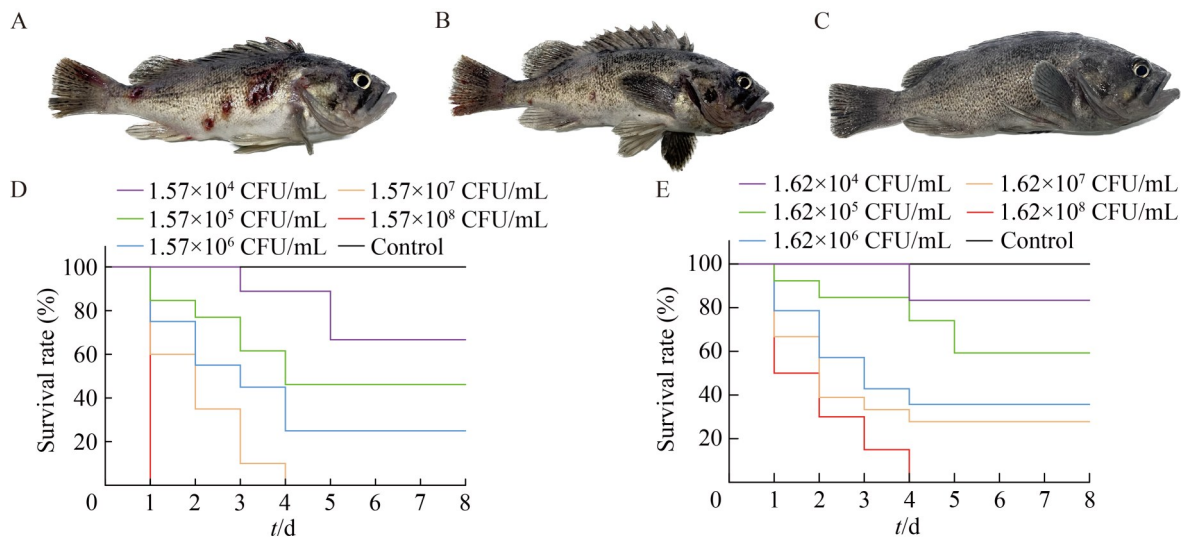
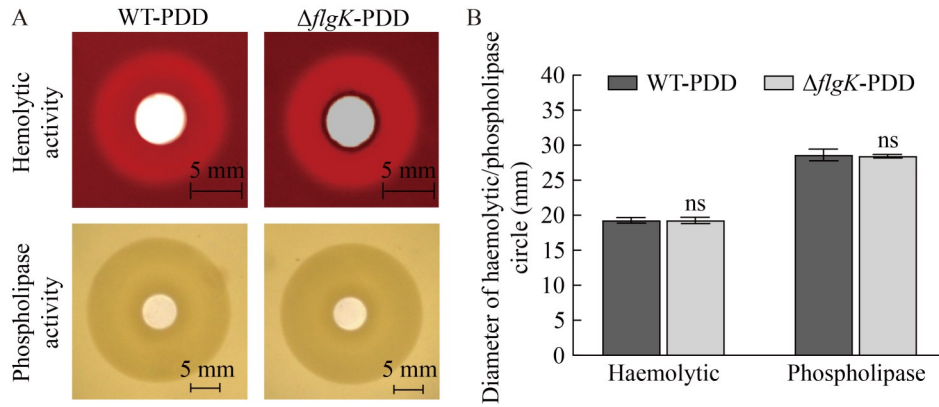


图3 WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD对许氏平鲈人工感染实验症状对比。A: 许氏平鲈感染WT-PDD的症状; B: 许氏平鲈感染 $\Delta flgK$ -PDD的症状; C: 健康许氏平鲈; D: 感染WT-PDD的许氏平鲈的存活曲线; E: 感染 $\Delta flgK$ -PDD的许氏平鲈的存活曲线。

Figure 3 Comparison of WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD on the symptoms of artificial infection of *Sebastes schlegelii*. A: The apparent symptoms of *S. schlegelii* infected with WT-PDD; B: The apparent symptoms of *S. schlegelii* infected with  $\Delta flgK$ -PDD; C: The apparent state of healthy *S. schlegelii*; D: The survival curves of *S. schlegelii* infected with WT-PDD; E: The survival curves of *S. schlegelii* infected with  $\Delta flgK$ -PDD.

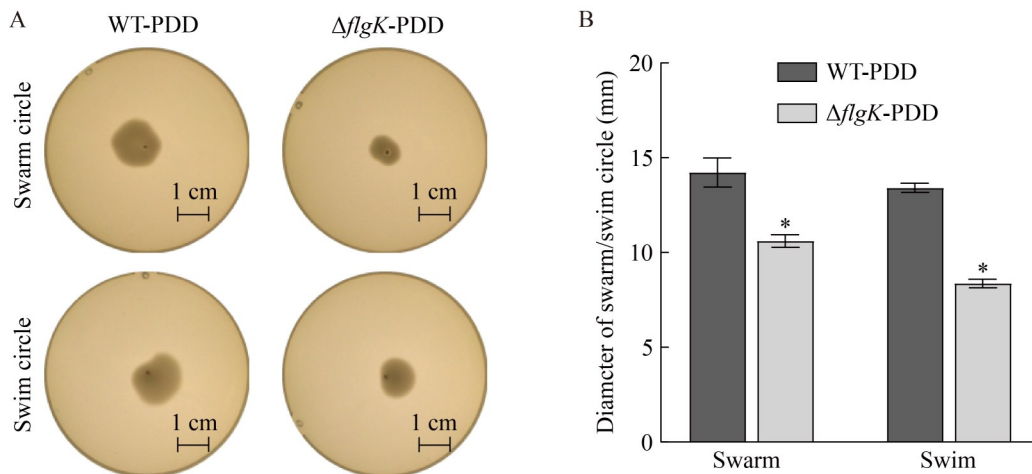
径,发现 WT-PDD 的集群能力为(14.22±0.77) mm,  $\Delta flgK$ -PDD 为 (10.61±0.33) mm; WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的游动距离分别为(13.41±0.24) mm

和(8.37±0.23) mm。统计分析显示,  $\Delta flgK$ -PDD 的运动能力较 WT-PDD 分别降低了 25.4% 和 37.6% ( $P<0.05$ , 图 5)。



**图4** *flgK*基因对PDD的溶血活性和磷脂酶活性的影响。A: WT-PDD与 $\Delta flgK$ -PDD在牛津杯穿孔的绵羊血平板上形成的溶血圈直径及在卵黄平板上形成的磷脂酶活性环的形态; B: WT-PDD与 $\Delta flgK$ -PDD溶血环直径及磷脂酶活性环直径的比较(结果以均数±标准差表示,  $n=3$ , ns表示无显著差异)。

Figure 4 Effects of *flgK* gene on phospholipase activity and hemolytic activity of PDD. A: The diameter of the hemolysis ring formed by WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD on the Oxford cup perforated sheep blood plate and the morphology of the phospholipase active ring formed on the yolk plate; B: Comparison of hemolysis ring diameter and phospholipase active ring diameter between WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD. The results were expressed as mean±SD ( $n=3$ ), ns indicates no significant difference.



**图5** WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD运动能力的对比。A: WT-PDD和 $\Delta flgK$ -PDD在不同浓度琼脂固体培养基上菌落直径的比较; B: *flgK*对PDD运动能力影响的统计数据。\*表示 $P<0.05$ 。

Figure 5 Comparison of motility between WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD. A: Comparison of colony diameter of WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD on different concentrations of agar solid medium; B: Statistics of the effect of *flgK* on PDD motility. \*:  $P<0.05$ .

## 2.6 生物被膜形成能力

采用微孔板结晶紫染色法, 结合在 595 nm 的吸光度测定, 分析 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的生物被膜形成能力。如图 6 所示, WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的  $OD_{595}$  值分别为  $1.51 \pm 0.13$  和  $1.17 \pm 0.04$ 。与 WT-PDD 相比,  $\Delta flgK$ -PDD 的生物被膜形成能力显著降低了 23%。

## 2.7 药物敏感性对比

WT-PDD 及  $\Delta flgK$ -PDD 对 38 种抗生素药物敏感性结果如表 4 所示。2 种菌株对氯霉素、氟苯尼考等 29 种抗生素均表现出高度或中度敏感, 而对其余 9 种抗生素表现出耐药性。 $flgK$  基因的缺失并未导致菌株对所检测抗生素的敏感性发生改变, 这也间接证实该基因并非介导 PDD 耐药性的主要基因。

## 2.8 PDD 缺失 $flgK$ 时鞭毛形态学观察

TEM 结果显示(图 7), WT-PDD 染色后菌体具有一条完整的鞭毛结构(黑色箭头所示), 而  $\Delta flgK$ -PDD 染色后未观察到鞭毛结构的存在, 表

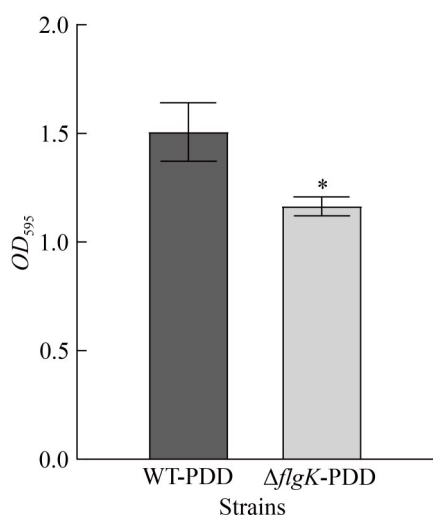


图6 WT-PDD和 $\Delta flgK$  PDD生物被膜形成能力对比。生物被膜形成能力用 $OD_{595}$ 表示。\*表示 $P < 0.05$ 。  
Figure 6 Comparison of biofilm formation ability between WT-PDD and  $\Delta flgK$  PDD. The ability to form biofilms is reflected by  $OD_{595}$ . \*:  $P < 0.05$ .

明  $flgK$  基因的缺失影响了 PDD 鞭毛结构的正常形成。

## 2.9 $flgK$ 基因突变对毒力基因转录表达的影响

本研究通过 RT-qPCR 检测了 PDD 的毒力基因、T2SS 相关基因和鞭毛相关基因在 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 中的相对表达量。如图 8 所示, 在  $\Delta flgK$ -PDD 中, T2SS 相关基因  $gspC$ 、 $gspD$ , 鞭毛相关基因  $flgL$ 、 $fliK$ , 趋化蛋白基因  $cheW$ , 毒力基因  $hlyA_{pl}$  表达量显著下调; 而 T2SS 相关基因  $gspE$ , 外膜相关基因  $flhB$ 、 $ompP$ , 鞭毛相关基因  $fliH$  和脂多糖蛋白相关基因  $lapB$  表达量显著上调。本研究选取的其余基因表达量基本无明显变化。

## 3 讨论

鞭毛(flagellum)普遍存在于革兰氏阴性菌中, 主要由蛋白质亚单位组成, 具有高度的组织结构和功能多样性, 是细菌用于运动的复杂细胞器<sup>[30]</sup>。 $flgK$  基因编码的鞭毛钩蛋白(FlgK)位于鞭毛钩和鞭毛丝的连接处, 对正常的鞭毛形成至关重要<sup>[20]</sup>。鞭毛钩蛋白是鞭毛结构中的关键组成部分, 它连接于鞭毛丝和基体, 可改变鞭毛旋转的角度, 在细菌运动过程中发挥着重要的作用<sup>[31]</sup>。然而, 目前关于  $flgK$  基因在 PDD 致病过程中具体机制尚不清楚, 其对 PDD 的生物被膜形成能力、药物敏感性和毒力影响的分子机制也未见报道。因此, 本研究采用自杀质粒介导的同源重组方法对 PDD 的鞭毛钩蛋白基因  $flgK$  进行突变, 成功建立了一个遗传稳定的  $\Delta flgK$ -PDD 突变株, 为探索  $flgK$  在 PDD 中的功能提供了理想的材料。

鞭毛可促进细菌在宿主体内的成功定殖和存活, 并对宿主产生毒力作用<sup>[32]</sup>。在对许氏平鲉的感染实验中发现,  $\Delta flgK$ -PDD 的  $LD_{50}$  为 WT-PDD 的 557%, 说明  $flgK$  基因的缺失导致 PDD 致病力降低。为了探究致病力下降的原因,

表4 WT-PDD和 $\Delta$ flgK-PDD对38种抗生素敏感性对比Table 4 Comparison of sensitivity of WT-PDD and  $\Delta$ flgK-PDD to 38 antibiotics

| Antibiotic                           | Content<br>( $\mu$ g/disc) | Judgement |           | Antibacterial circle diameter (mm) |                   | Result |                   |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------|-----------|------------------------------------|-------------------|--------|-------------------|
|                                      |                            | R         | S         | WT-PDD                             | $\Delta$ flgK-PDD | WT-PDD | $\Delta$ flgK-PDD |
| Penicillin                           | 10                         | $\leq 11$ | $\geq 15$ | 0 $\pm$ 0                          | 0 $\pm$ 0         | R      | R                 |
| Oxacillin                            | 1                          | $\leq 14$ | $\geq 20$ | 0 $\pm$ 0                          | 0 $\pm$ 0         | R      | R                 |
| Ampicillin                           | 10                         | $\leq 13$ | $\geq 17$ | 0 $\pm$ 0                          | 0 $\pm$ 0         | R      | R                 |
| Cephalexin                           | 30                         | $\leq 14$ | $\geq 18$ | 15.12 $\pm$ 0.25                   | 16.49 $\pm$ 0.21  | I      | I                 |
| Cefazolin                            | 30                         | $\leq 14$ | $\geq 18$ | 18.75 $\pm$ 0.26                   | 20.39 $\pm$ 0.19  | S      | S                 |
| Cefradine                            | 30                         | $\leq 14$ | $\geq 18$ | 18.94 $\pm$ 0.26                   | 19.77 $\pm$ 0.19  | S      | S                 |
| Ceftazidime                          | 30                         | $\leq 17$ | $\geq 21$ | 23.26 $\pm$ 0.28                   | 24.19 $\pm$ 0.18  | S      | S                 |
| Ceftriaxone                          | 30                         | $\leq 19$ | $\geq 23$ | 31.80 $\pm$ 0.33                   | 36.08 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Cefotaxime/Clavulanic acid           | 30/10                      | $\leq 22$ | $\geq 26$ | 33.21 $\pm$ 0.33                   | 36.49 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Cefazoxime                           | 30                         | $\leq 21$ | $\geq 25$ | 32.81 $\pm$ 0.33                   | 37.51 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Cefoperazone/Sulbactam               | 75/75                      | $\leq 15$ | $\geq 21$ | 32.61 $\pm$ 0.33                   | 35.36 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |
| Amikacin                             | 30                         | $\leq 13$ | $\geq 18$ | 12.72 $\pm$ 0.24                   | 12.49 $\pm$ 0.23  | R      | R                 |
| Gentamicin                           | 10                         | $\leq 12$ | $\geq 15$ | 13.01 $\pm$ 0.24                   | 14.75 $\pm$ 0.22  | I      | I                 |
| Kanamycin                            | 30                         | $\leq 13$ | $\geq 18$ | 13.51 $\pm$ 0.24                   | 14.14 $\pm$ 0.22  | I      | I                 |
| Streptomycin                         | 10                         | $\leq 11$ | $\geq 15$ | 10.20 $\pm$ 0.23                   | 10.16 $\pm$ 0.23  | R      | R                 |
| Neomycin                             | 30                         | $\leq 17$ | $\geq 23$ | 14.12 $\pm$ 0.24                   | 13.32 $\pm$ 0.22  | R      | R                 |
| Tetracycline                         | 39                         | $\leq 11$ | $\geq 15$ | 25.47 $\pm$ 0.29                   | 26.85 $\pm$ 0.17  | S      | S                 |
| Doxycycline (D $\times$ doxycycline) | 30                         | $\leq 10$ | $\geq 14$ | 22.87 $\pm$ 0.28                   | 24.29 $\pm$ 0.18  | S      | S                 |
| Minocycline                          | 30                         | $\leq 12$ | $\geq 16$ | 28.8 $\pm$ 0.31                    | 26.75 $\pm$ 0.18  | S      | S                 |
| Erythromycin                         | 15                         | $\leq 13$ | $\geq 23$ | 10.00 $\pm$ 0.23                   | 11.57 $\pm$ 0.23  | R      | R                 |
| Acetylspiramycin                     | 30                         | $\leq 13$ | $\geq 18$ | 8.49 $\pm$ 0.22                    | 9.62 $\pm$ 0.24   | R      | R                 |
| Clarithromycin                       | 15                         | $\leq 13$ | $\geq 18$ | 7.99 $\pm$ 0.22                    | 10.34 $\pm$ 0.24  | R      | R                 |
| Azithromycin                         | 15                         | $\leq 13$ | $\geq 18$ | 14.83 $\pm$ 0.24                   | 15.67 $\pm$ 0.21  | I      | I                 |
| Nalidixic acid                       | 30                         | $\leq 13$ | $\geq 19$ | 37.13 $\pm$ 0.35                   | 37.51 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Piperic acid                         | 30                         | $\leq 22$ | $\geq 28$ | 29.29 $\pm$ 0.31                   | 31.16 $\pm$ 0.16  | S      | S                 |
| Norfloxacin                          | 10                         | $\leq 12$ | $\geq 17$ | 27.48 $\pm$ 0.30                   | 34.03 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |
| Ofloxacin                            | 5                          | $\leq 12$ | $\geq 16$ | 35.82 $\pm$ 0.35                   | 38.95 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Ciprofloxacin                        | 5                          | $\leq 15$ | $\geq 21$ | 36.53 $\pm$ 0.35                   | 40.49 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Nomefloxacin                         | 10                         | $\leq 18$ | $\geq 22$ | 33.41 $\pm$ 0.33                   | 35.36 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |
| Flurofloxacin                        | 5                          | $\leq 15$ | $\geq 19$ | 32.31 $\pm$ 0.33                   | 37.01 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Polymyxin B                          | 300 IU                     | $\leq 11$ | $\geq 12$ | 13.01 $\pm$ 0.24                   | 17.52 $\pm$ 0.21  | S      | S                 |
| Neomycin                             | 30                         | $\leq 17$ | $\geq 22$ | 25.27 $\pm$ 0.29                   | 33.01 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |
| Sulfafurazole                        | 300                        | $\leq 10$ | $\geq 16$ | 28.09 $\pm$ 0.30                   | 29.11 $\pm$ 0.16  | S      | S                 |
| Furazolidone                         | 30                         | $\leq 14$ | $\geq 17$ | 24.47 $\pm$ 0.28                   | 24.09 $\pm$ 0.18  | S      | S                 |
| Rifampicin                           | 5                          | $\leq 16$ | $\geq 20$ | 26.48 $\pm$ 0.29                   | 27.77 $\pm$ 0.17  | S      | S                 |
| Chloramphenicol                      | 30                         | $\leq 12$ | $\geq 18$ | 35.42 $\pm$ 0.34                   | 35.77 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |
| Enrofloxacin                         | 10                         | $\leq 15$ | $\geq 19$ | 31.91 $\pm$ 0.33                   | 37.72 $\pm$ 0.14  | S      | S                 |
| Florfenicol                          | 30                         | $\leq 12$ | $\geq 18$ | 30.20 $\pm$ 0.32                   | 33.62 $\pm$ 0.15  | S      | S                 |

R: 耐药; I: 中度敏感; S: 高度敏感。

R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible.

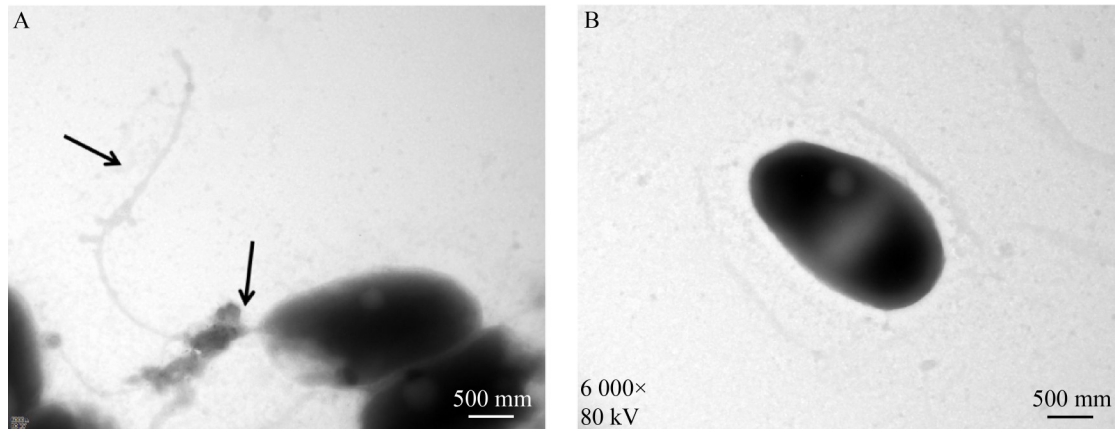


图7 WT-PDD与 $\Delta flgK$ -PDD的形态学观察。A: 透射电子显微镜下观察WT-PDD (黑色箭头表示WT-PDD的鞭毛结构); B:  $\Delta flgK$ -PDD的透射电镜观察。放大倍数均为6 000倍。

Figure 7 Morphological observation of WT-PDD and  $\Delta flgK$ -PDD. A: Observation of WT-PDD under transmission electron microscope. Black arrows indicate the flagella structure of WT-PDD; B: Observation of  $\Delta flgK$ -PDD under transmission electron microscope. The magnification is 6 000 times.

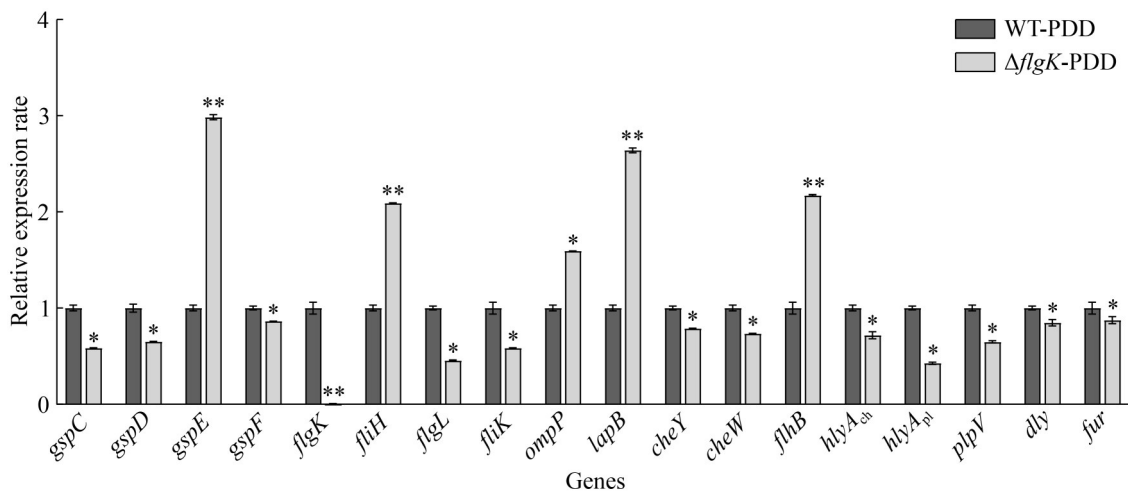


图8 RT-qPCR 检测 $\Delta flgK$ -PDD的毒力相关基因、T2SS相关基因、外膜相关基因和鞭毛相关基因的相对表达量。\*表示 $P<0.05$ , \*\*表示 $P<0.01$ 。结果表示为平均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ )。

Figure 8 RT-qPCR was used to detect the relative expression levels of virulence, T2SS-related genes, outer membrane-related genes and flagella-related genes of the deletion strain  $\Delta flgK$ -PDD. Two-tailed Student's *t* test was used to evaluate the statistical difference. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ . Result is expressed as mean $\pm$ SD ( $n=3$ ).

本研究对  $\Delta flgK$ -PDD 和 WT-PDD 进行了多方面的测定。生长能力检测的结果显示,  $\Delta flgK$ -PDD 和 WT-PDD 的生长能力并无显著性差异, 说明 *flgK* 并非 PDD 的关键代谢基因, 这也为后续实验排除了因生长能力差异而造成致病力结果偏

差的可能性。

细菌病原体可通过分泌具有生物活性的胞外产物促进其在宿主体内的成功定殖和存活, 并对宿主产生毒力作用。已有研究表明, 细菌性病原体的致病力与对宿主红细胞的溶血性紧

密相关<sup>[5,33-34]</sup>。PDD 在生长过程中可释放溶血素溶解红细胞，同时释放磷脂酶溶解卵黄磷脂，二者可引起宿主组织的破坏和出血，协助病原菌感染宿主并引发多种病变，在 PDD 的发病机制中起到了至关重要的作用<sup>[35]</sup>。因此，体外分析 PDD 的磷脂酶活性和溶血性是研究其毒力与鞭毛相关性的的重要手段。本研究结果表明，*flgK* 基因的缺失对 PDD 的溶血活性和磷脂酶活性未造成影响。与 WT-PDD 相比， $\Delta flgK$ -PDD 的溶血活性和磷脂酶活性无显著变化。初步推测，*flgK* 基因的缺失并不影响 PDD 中溶血素和磷脂酶的表达。

细菌的涌动性和运动性是指移动细菌从接种部位向培养基表面周围区域的大量移动，这种移动依赖于鞭毛和菌毛<sup>[36]</sup>。它可以为细菌提供生态优势，使其能够快速迁移到营养丰富的环境中，并在宿主组织中吸附和定殖。运动性被认为是某些细菌的重要毒力因素，它允许病原体从最初的感染部位迅速传播到不同的组织，从而导致危及生命的感染<sup>[37]</sup>。运动性是一种复杂的适应性行为，它与细菌的结构、基因表达水平、代谢水平等诸多方面密切相关。在运动能力测定中，发现 *flgK* 基因的突变导致 PDD 的运动能力显著降低，推测运动能力的下降可能与 *flgK* 基因缺失有关。TEM 的结果证实了这一猜想， $\Delta flgK$ -PDD 菌株中未见鞭毛结构，说明 *flgK* 缺失导致 PDD 无法形成完整的鞭毛结构，这与之前的研究结果一致<sup>[21]</sup>。

细菌生物被膜是一类细菌在固体界面上定居并生长形成的复杂结构，是细菌在自然环境中常见的生存形式<sup>[38]</sup>。生物被膜赋予细菌对外界环境的抵抗力，包括对抗生素的耐受性<sup>[39]</sup>、对宿主免疫系统吞噬作用的抗性<sup>[40]</sup>，以及强大的黏附能力<sup>[19]</sup>，这些特性使得细菌生物被膜成为导致持续感染和慢性疾病的关键因素<sup>[41]</sup>。在本研究中，对 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 的生物被膜形成能力和耐药性差异进行了分析，结果显示  $\Delta flgK$ -PDD 的生物被膜形成能力显著下降，

这与之前的研究结果<sup>[42]</sup>一致。相关研究表明，生物被膜可以影响细菌的耐药性，例如在铜绿假单胞菌中，*flgL* 基因的缺失导致生物被膜形成能力和耐药性增强<sup>[43]</sup>。然而，在本研究中  $\Delta flgK$ -PDD 与 WT-PDD 的耐药性无明显差异，这种差异可能与细菌种类有关。

为了进一步探讨 *flgK* 基因突变对 PDD 毒力和生物学特性影响的分子机制，本研究选择了 PDD 的部分毒力基因、T2SS 相关基因、鞭毛相关基因和外膜蛋白相关基因，分析了 *flgK* 基因缺失对这些基因表达水平的影响。已有研究表明，T2SS 参与植物病原菌鞭毛的分泌<sup>[44]</sup>。在本研究中， $\Delta flgK$ -PDD 中 T2SS 相关蛋白基因表达出现了不同程度的上调和下调，表明 T2SS 相关基因的表达与鞭毛基因存在相互作用，*flgK* 基因的缺失对 T2SS 基因的表达具有调控作用。FlhB 是膜蛋白的一部分，在革兰氏阴性菌中负责转运底物的识别，并参与特定底物的转运<sup>[45]</sup>。FlhK 是鞭毛钩长度调节蛋白，通过其 N 端和 C 端结构域与膜蛋白 FlhB 协作，精确控制钩的长度<sup>[46]</sup>。FlhH 是鞭毛组装蛋白<sup>[47]</sup>，FlgL 是鞭毛钩相关蛋白，FlgK 和 FlgL 两种蛋白确保了鞭毛中钩和丝之间的平滑连接，与 PDD 鞭毛的正常形成密切相关<sup>[20]</sup>。CheW 和 CheY 是信号转导途径中的单域蛋白，在细菌趋化过程中将信息从跨膜受体传递到鞭毛马达。已有许多研究表明，趋化性可促进细菌生物被膜的形成<sup>[48]</sup>。在本研究中， $\Delta flgK$ -PDD 中 *cheY* 和 *cheW* 的相对表达水平下调，生物被膜形成能力也显著下降，与之前的研究结果一致<sup>[49]</sup>。磷脂酶-D (Dly) 由 *dly* 基因编码，是一种外毒素，与 *hlyA<sub>pl</sub>* 编码的具有溶血活性的成孔毒素 phobalysin P (PhlyP) 在对宿主细胞损伤过程中起协同作用<sup>[35]</sup>。*plpV* 基因调控的磷脂酶 PlpV 与由 *hlyA<sub>ch</sub>* 基因编码的溶血素 PhlyC 同样作为毒力因子影响 PDD 对宿主的致病力。PDD 具有由 *fur* 基因编码的铁载体调控因子，当 PDD 处于铁源充足的环境中时，其对宿主的致病力增强<sup>[50-52]</sup>。本研究表明，在  $\Delta flgK$ -PDD

中, 生物学特性的改变和致病性的显著降低可能与鞭毛相关基因、毒力相关基因和 T2SS 相关基因相对表达水平的变化有关。结合实验结果, 推测 *flgK* 基因的缺失导致 PDD 无法形成完整的鞭毛结构, 降低了 PDD 的运动和侵染能力, 进而使 PDD 的致病性下降。初步推断,  $\Delta flgK$ -PDD 毒力的下降是鞭毛结构缺失以及部分毒力基因表达下调共同作用的结果, 但其背后的具体信号通路仍有待进一步研究。

## 4 结论

本研究成功构建了一株可稳定遗传的 PDD *flgK* 基因缺失菌株  $\Delta flgK$ -PDD, 并比较了 WT-PDD 和  $\Delta flgK$ -PDD 在生物学特性、致病力和基因表达水平上的差异。结果显示,  $\Delta flgK$ -PDD 的生长能力、溶血活性、磷脂酶活性和药物敏感性与 WT-PDD 无显著差异。然而, 与 WT-PDD 相比,  $\Delta flgK$ -PDD 无法形成鞭毛结构, 其运动能力、生物被膜形成能力和致病力均显著下降, 且  $\Delta flgK$ -PDD 的 T2SS 相关基因以及部分毒力基因表达水平均出现了不同程度的下调。因此, 可以得出结论,  $\Delta flgK$ -PDD 致病力的降低与鞭毛结构缺失导致的运动能力减弱有关, 并且鞭毛基因和部分毒力基因表达水平的下调进一步导致了  $\Delta flgK$ -PDD 致病力的降低。这些结果为探究 *flgK* 基因在 PDD 致病机制中的重要作用提供了理论依据。

## 作者贡献声明

刘浩哲: 执行调研, 方法论, 撰写文章, 完成呈现; 张志琪: 数据分析, 方法论; 于永翔: 数据收集与监管, 软件程序; 王春元: 实验验证; 王印庚: 提供资源; 荣小军: 监督管理, 参与论文讨论; 廖梅杰: 监督管理, 执行调研; 罗璋: 监督管理, 完成呈现; 张正: 提出概念, 方法论, 获取基金, 编辑和审阅文章。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] KIM HR, KIM JW, LEE MK, KIM JG. Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report[J]. *Infection*, 2009, 37(6): 555-556.
- [2] HUNDENBORN J, THURIG S, KOMMERELL M, HAAG H, NOLTE O. Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: a case report and review of the literature[J]. *Case Reports in Medicine*, 2013, 2013: 610632.
- [3] OSORIO CR, VENCES A, MATANZA XM, TERCETI MS. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00002-18.
- [4] KRUPESHA SHARMA SR, PRADEEP MA, SADU N, DUBE PN, VIJAYAN KK. First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from cage-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(7): 953-958.
- [5] PEDERSEN K, SKALL HF, LASSEN-NIELSEN AM, BJERRUM L, OLESEN NJ. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(5): 465-472.
- [6] TERCETI MS, OGUT H, OSORIO CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the black sea: evidence of a multiclonal origin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3736-3745.
- [7] MORICK D, BLUM SE, DAVIDOVICH N, ZEMAH-SHAMIR Z, BIGAL E, ITAY P, ROKNEY A, NASIE I, FELDMAN N, FLECKER M, RODITI-ELASAR M, AHARONI K, ZURIEL Y, WOSNICK N, TCHERNOV D, SCHEININ AP. *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* pneumonia in Dead, Stranded Bottlenose Dolphin, Eastern Mediterranean Sea[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2023, 29(1): 179-183.
- [8] RIVAS AJ, VENCES A, HUSMANN M, LEMOS ML, OSORIO CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, plasmid-encoded HlyA, and chromosome-encoded HlyA are secreted via the type II secretion system[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(4): 1246-1256.
- [9] KREGER AS, BERNHEIMER AW, ETKIN LA, DANIEL LW. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes[J]. *Infection and Immunity*, 1987, 55(12): 3209-3212.
- [10] Von HOVEN G, RIVAS AJ, HUSMANN M. Phobalysin:

- fish-eye view of membrane perforation, repair, chemotaxis and adhesion[J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 412.
- [11] RIVAS AJ, BALADO M, LEMOS ML, OSORIO CR. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617-4627.
- [12] VENCES A, RIVAS AJ, LEMOS ML, HUSMANN M, OSORIO CR. Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00401-17.
- [13] LINDSEY RL, GLADNEY LM, HUANG AD, GRISWOLD T, KATZ LS, DINSMORE BA, IM MS, KUCEROVA Z, SMITH PA, LANE C, CARLETON HA. Rapid identification of enteric bacteria from whole genome sequences using average nucleotide identity metrics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1225207.
- [14] WADHWA N, BERG HC. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(3): 161-173.
- [15] PAKBIN B, BRÜCK WM, ROSSEN JWA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(18): 9922.
- [16] CARROLL BL, LIU J. Structural conservation and adaptation of the bacterial flagella motor[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1492.
- [17] SINGH PK, SHARMA P, AFANZAR O, GOLDFARB MH, MAKLASHINA E, EISENBACH M, CECCHINI G, IVERSON TM. CryoEM structures reveal how the bacterial flagellum rotates and switches direction[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(5): 1271-1281.
- [18] NAKAMURA S, MINAMINO T. Flagella-driven motility of bacteria[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(7): 279.
- [19] GUTTENPLAN SB, KEARNS DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(6): 849-871.
- [20] BULIERIS PV, SHAIKH NH, FREDDOLINO PL, SAMATEY FA. Structure of FlgK reveals the divergence of the bacterial Hook-Filament Junction of *Campylobacter*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15743.
- [21] LU JH, XIONG CY, WEI JM, XIONG CJ, LONG R, YU YX, YE H, OZDEMIR E, LI Y, WU RH. The role and molecular mechanism of *flgK* gene in biological properties, pathogenicity and virulence genes expression of *Aeromonas hydrophila*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 258: 129082.
- [22] LI P, ZONG WY, ZHANG ZY, LV W, JI XM, ZHU DD, DU XJ, WANG S. Effects and molecular mechanism of flagellar gene *flgK* on the motility, adhesion/invasion, and desiccation resistance of *Cronobacter sakazakii*[J]. *Food Research International*, 2023, 164: 112418.
- [23] YUAN B, ZHAO LM, ZHUANG ZX, WANG XR, FU Q, HUANG HB, HUANG LX, QIN YX, YAN QP. Transcriptomic and metabolomic insights into the role of the *flgK* gene in the pathogenicity of *Pseudomonas plecoglossicida* to orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Zoological Research*, 2022, 43(6): 952-965.
- [24] BEN HAMED S, TAVARES RANZANI-PAIVA MJ, TACHIBANA L, de CARLA DIAS D, ISHIKAWA CM, ESTEBAN MA. Fish pathogen bacteria: adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 550-562.
- [25] YU YX, ZHANG Z, WANG YG, LIAO MJ, RONG XJ, LI B, WANG K, CHEN J, ZHANG H. Complete genome sequence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strain SSPD1601 isolated from deep-sea cage-cultured *Sebastes schlegelii* with septic skin ulcer[J]. *International Journal of Genomics*, 2019, 2019: 4242653.
- [26] CHI YY, JIAO HY, RAN JY, XIONG CY, WEI JM, OZDEMIR E, WU RH. Construction and efficacy of *Aeromonas veronii* mutant  $\Delta$ hcp as a live attenuated vaccine for the largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 136: 108694.
- [27] FINNEY DJ. The median lethal dose and its estimation[J]. *Archives of Toxicology*, 1985, 56(4): 215-218.
- [28] KASAI H, WATANABE K, GASTEIGER E, BAIROCH A, ISONO K, YAMAMOTO S, HARAYAMA S. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria[J]. *Genome Informatics Workshop on Genome Informatics*, 1998, 9: 13-21.
- [29] GANGER MT, DIETZ GD, HEADLEY P, EWING SJ. Application of the common base method to regression and analysis of covariance (ANCOVA) in qPCR experiments and subsequent relative expression calculation[J]. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21(1): 423.
- [30] TERASHIMA H, KOJIMA S, HOMMA M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor[J]. *International review of cell and molecular biology*, 2017, 270: 39-85
- [31] JONES CJ, AIZAWA SI. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function[M]// *Advances in Microbial Physiology*. Amsterdam: Elsevier, 1991: 109-172.
- [32] HAIKO J, WESTERLUND-WIKSTRÖM B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence[J]. *Biology*, 2013, 2(4): 1242-1267.
- [33] PUGSLEY AP. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria[J]. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(1): 50-108.
- [34] BORREGO JJ, MORINIGO MA, BARJA JL, BOSCA M, CASTRO D, MARTINEZ-MANZANARES E, TORANZO AE. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1991, 35(5): 264-269.
- [35] RIVAS AJ, BALADO M, LEMOS ML, OSORIO CR. Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3287-3299.
- [36] DUAN QD, ZHOU MX, ZHU LQ, ZHU GQ. Flagella and bacterial pathogenicity[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(1): 1-8.

- [37] PALMA V, GUTIÉRREZ MS, VARGAS O, PARTHASARATHY R, NAVARRETE P. Methods to evaluate bacterial motility and its role in bacterial-host interactions[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 563.
- [38] DAVEY ME. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 847-867.
- [39] SOARES A, CARON F, ETIENNE M. Commentary: tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2164.
- [40] CHWALIBOG. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2010: 631.
- [41] VESTBY LK, GRØNSETH T, SIMM R, NESSE LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(2): 59.
- [42] NASKAR S, HOHL M, TASSINARI M, LOW HH. The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(3): 412-424.
- [43] VALENTIN JDP, STRAUB H, PIETSCH F, LEMARE M, AHRENS CH, SCHREIBER F, WEBB JS, van der MEI HC, REN Q. Role of the flagellar hook in the structural development and antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(4): 1176-1186.
- [44] CORBETT M, VIRTUE S, BELL K, BIRCH P, BURR T, HYMAN L, LILLEY K, POOCK S, TOTH I, SALMOND G. Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(4): 334-342.
- [45] LOGIN FH, WOLF-WATZ H. YscU/FlhB of *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a C-terminal type III secretion signal[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(43): 26282-26291.
- [46] WATERS RC, O'TOOLE PW, RYAN KA. The FliK protein and flagellar hook-length control[J]. *Protein Science*, 2007, 16(5): 769-780.
- [47] KINOSHITA M, MINAMINO T, UCHIHASHI T, NAMBA K. FliH and FliI help FlhA bring strict order to flagellar protein export in *Salmonella*[J]. *Communications Biology*, 2024, 7: 366.
- [48] ALEXANDRE G, ZHULIN IB. Different evolutionary constraints on chemotaxis proteins CheW and CheY revealed by heterologous expression studies and protein sequence analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(2): 544-552.
- [49] FRANČETIC O. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion[J]. *The EMBO Journal*, 19(24): 6697-6703.
- [50] PUENTES B, BALADO M, BERMÚDEZ-CRESPO J, OSORIO CR, LEMOS ML. A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 257-264.
- [51] FOUZ B, BIOSCA EG, AMARO C. High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 82(2): 157-167.
- [52] FOUZ B, TORANZO AE, BIOSCA EG, MAZOY R, AMARO C. Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 121(2): 181-188.