

基于 T6SS 毒素 Txe1 的负筛选系统在杀鱼爱德华氏菌基因组编辑中的应用

王鹏程¹, 张明明¹, 张朝政¹, 李超², 曹健波¹, 严小军¹, 陶震^{1*}

1 浙江海洋大学 水产学院, 浙江 舟山

2 青岛农业大学 海洋科学与工程学院, 山东 青岛

王鹏程, 张明明, 张朝政, 李超, 曹健波, 严小军, 陶震. 基于 T6SS 毒素 Txe1 的负筛选系统在杀鱼爱德华氏菌基因组编辑中的应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4565-4578.

WANG Pengcheng, ZHANG Mingming, ZHANG Chaozheng, LI Chao, CAO Jianbo, YAN Xiaojun, TAO Zhen. Application of a T6SS effector Txe1-based counterselection system for genome editing in *Edwardsiella piscicida*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4565-4578.

摘要: 以果聚糖蔗糖酶(sucrose-6-fructosyltransferase, SacB)为基础的双交换同源重组技术虽常用于革兰氏阴性菌基因组编辑, 但其负筛选效率在不同菌株间常存在显著差异, 部分菌株因代谢特性或基因组组成差异导致效率低下。【目的】构建基于 VI 型分泌系统(T6SS)效应蛋白 Txe1 的新型负筛选体系, 以提升无痕基因组编辑效率。【方法】改造传统自杀质粒 pDM4, 引入卡那霉素抗性基因, 获得衍生质粒 pDM4K; 再以阿拉伯糖诱导型 Txe1 毒素 C 端结构域表达盒(*araC-P_{BAD}::txe1^{CTD}*)替换质粒中的 *sacB* 基因, 构建新型负筛选质粒 pTL1010。以杀鱼爱德华氏菌 FC2 株毒力相关基因 *tssB* 为靶点, 系统比较 Txe1 与 SacB 系统的负筛选效率。【结果】阿拉伯糖诱导下, Txe1 系统的负筛选效率达 91.1% (假阳性率 8.9%), 显著优于传统 SacB 系统(假阳性率 100%, $P < 0.01$)。【结论】新型 Txe1 负筛选质粒 pTL1010 显著提高了杀鱼爱德华氏菌的无痕基因组编辑效率, 为革兰氏阴性菌精准遗传操作提供了高效新工具。

关键词: 负筛选标记; VI 型分泌系统; Txe1 毒素; 双交换同源重组; 杀鱼爱德华氏菌

资助项目: 国家自然科学基金(42376108)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42376108).

*Corresponding author. E-mail: taozhen123@zjou.edu.cn

ORCID: TAO Zhen (0000-0002-5413-7112)

Received: 2025-03-19; Accepted: 2025-05-28; Published online: 2025-06-24

Application of a T6SS effector Txel-based counterselection system for genome editing in *Edwardsiella piscicida*

WANG Pengcheng¹, ZHANG Mingming¹, ZHANG Chaozheng¹, LI Chao², CAO Jianbo¹, YAN Xiaojun¹, TAO Zhen^{1*}

1 College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang, China

2 School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong, China

Abstract: Double-crossover homologous recombination using the SacB negative selection system is commonly employed for genome editing in Gram-negative bacteria. However, its negative selection efficiency varies significantly across strains, being frequently compromised by differences in metabolic characteristics or genomic composition. **[Objective]** To develop a novel counterselection system based on the type VI secretion system (T6SS) effector Txel to enhance the efficiency of seamless genome editing. **[Methods]** We first modified the conventional suicide plasmid pDM4 by introducing a kanamycin resistance gene, generating the derivative plasmid pDM4K. Subsequently, we replaced *sacB* with an L-arabinose-inducible expression cassette encoding the C-terminal domain of Txel (*araC*-P_{BAD}::*txe1*^{CTD}), constructing a novel counterselection plasmid pTL1010. Using the virulence gene *tssB* of *Edwardsiella piscicida* FC2 as the target, we systematically evaluated and compared the counterselection efficiency of the Txel system with that of the conventional SacB system. **[Results]** Under induction with L-arabinose, the Txel-based counterselection system achieved the efficiency of 91.1% (false-positive rate of 8.9%), outperforming the SacB system which had a false-positive rate of 100% ($P < 0.01$). **[Conclusion]** The newly developed Txel-based counterselection plasmid pTL1010 significantly enhances the efficiency of seamless genome editing in *E. piscicida* and provides a highly effective tool for precise genetic manipulation in Gram-negative bacteria.

Keywords: counterselection marker; type VI secretion system; Txel toxin; double-crossover homologous recombination; *Edwardsiella piscicida*

基因组精准编辑技术对于阐明病原菌致病机制及开发减毒活疫苗至关重要。基于自杀载体的双交换同源重组技术通过 2 次精确重组实现靶基因无痕替换，因其无外源序列残留的特性，在毒力因子功能鉴定及疫苗工程菌构建中仍具有不可替代的优势^[1-2]。然而，该技术的效率受限于负筛选标记的可靠性^[3-4]。SacB 系统作为经典负筛选标记，依赖 SacB 在蔗糖存在时催化果聚糖合成，通过渗透压应激诱导细胞裂解^[5-6]。然而，由于该系统对代谢途径的依赖性，

导致其在部分革兰氏阴性菌中的筛选效率偏低，在副猪嗜血杆菌(*Glaesserella parasuis*)等病原菌中均有报道^[7]，进一步表明开发新型负筛选策略的必要性。

近年来，基于细菌分泌蛋白毒素的负筛选策略因其强效杀菌特性受到关注^[8]。与 SacB 依赖宿主代谢途径不同，这些毒素蛋白可直接靶向细胞必需组分(如 DNA、细胞膜或翻译系统)，通过不可逆损伤实现高效筛选^[9-10]。本研究选择了杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)

XSDHY-P VI 型分泌系统 (type VI secretion system, T6SS) 的毒素 Txe1, 其 C 端结构域 (Txe1^{CTD}) 具有核酸酶活性, 可诱导宿主细胞死亡^[11]。然而, 毒素的组成型表达可能导致质粒不稳定或宿主细胞提前裂解, 限制了其实际应用。阿拉伯糖诱导型启动子及其调控元件因其低泄漏表达和高诱导效率的特性^[12], 为毒素基因的精准调控提供了理想工具^[8,13]。通过将毒素表达严格限制在筛选阶段, 可有效平衡质粒稳定性与筛选压力, 避免背景毒性对实验的干扰。

本研究针对杀鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella piscicida*) FC2 株中 SacB 系统筛选效率低的问题, 构建了以 T6SS 效应蛋白 Txe1 为负筛选标记的新型自杀质粒系统。通过将 Txe1^{CTD} 编码序列置于受 L-阿拉伯糖诱导的 araBAD 启动子 (P_{BAD}) 下游, 实现毒素表达的精准时序控制设计: 接合转移阶段可维持低表达以保障质粒稳定性, 而在负筛选阶段可通过外源添加阿拉伯糖激活杀伤功能。该系统通过阿拉伯糖诱导调控机制, 以期为解决传统 SacB 系统在杀鱼爱德华氏菌中筛选效率低下的问题提供新的技术路径。

表1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

| 菌株与质粒 Strains and plasmids | 说明 Description | 来源 Source |
|-------------------------------|--|------------------|
| <i>Edwardsiella piscicida</i> | | |
| FC2 | Wild type strain isolated from freshwater fish; Cam ^r | Laboratory stock |
| $\Delta tssB$ | <i>TssB</i> knockout of strain FC2; Cam ^r | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| S17-1 λ pir | Strain for conjugation of π -requiring plasmids, carrying the λ pir gene | [11] |
| Plasmids | | |
| pK18mobSacB | Suicide vector with <i>sacB</i> counterselection gene; Kan ^r | [11] |
| pTxe1CT | Expression vector with arabinose-inducible T6SS toxin Txe1 from <i>P. plecoglossicida</i> | [11] |
| pDM4 | Suicide vector with <i>sacB</i> gene; oriR6K; Cam ^r | [14] |
| pDM4K | pDM4 derivative with chloramphenicol resistance gene replaced by kanamycin resistance gene; Kan ^r | This study |
| pTZ1010 | pDM4K derivative with <i>sacB</i> and upstream promoter replaced by <i>araC</i> - P_{BAD} :: <i>txe1</i> ^{CTD} from pTxe1CT; Amp ^r | This study |
| pTZ1010- $\Delta tssB$ | pTZ1010 vector containing <i>tssB</i> homologous arms; Kan ^r | This study |

1 材料与方法

1.1 菌株与培养条件

本研究所用菌株及质粒如表 1 所示。杀鱼爱德华氏菌 FC2 株分离自印度地区养殖的淡水鱼类, 具有氯霉素抗性表型。该菌株由挪威生命科学大学 Rakesh Das 博士惠赠, 并通过特异性引物对 EPF/EPR^[15] 进行 PCR 扩增验证。杀鱼爱德华氏菌培养于 28 °C 胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 或胰蛋白胨大豆琼脂 (tryptic soy agar, TSA) 培养基中。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) S17-1 λ pir 菌株用于质粒构建和接合转移实验, 培养于 37 °C LB 培养基中。培养基中根据需要添加以下抗生素: 氨苄青霉素 (Amp, 100 μ g/mL)、卡那霉素 (Kan, 50 μ g/mL)、氯霉素 (Cam, 30 μ g/mL)。负筛选实验中, pDM4K 系统使用质量体积分数 5% 蔗糖, pTL1010 系统使用质量体积分数 0.4% 的 L-阿拉伯糖。

1.2 主要试剂

氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素和蔗糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 培养基, 青岛高科技工业园海博生物有限公司; L-阿拉伯糖, Sigma-Aldrich 公司; 2 \times ES Taq Master Mix、

DNA 提取试剂盒, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 限制性内切酶(*Sall*-HF、*SpeI*-HF)、T4 DNA 连接酶、Gibson Assembly® Master Mix 及 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix, NEB 公司; FastPure Plasmid Mini Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计及合成

本研究所用引物如表 2 所示, 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4 自杀质粒 pTL1010 的构建及验证

1.4.1 pDM4K 载体的构建

鉴于杀鱼爱德华氏菌 FC2 株对氯霉素具有

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

| 引物名称 Primers name | 引物序列 Primer sequences (5'→3') | 描述 Description | 退火温度 Annealing temperature (°C) | 产物大小 Product size (bp) |
|-----------------------|--|---|---------------------------------------|------------------------------|
| pDM4-F | CCTTCTTGACGAGTTCTTCTGATTTTT TTAAGGCAGTTATTGGTG | To amplify the resistance gene replacement from pDM4 | 60 | 6 381 |
| pDM4-R | CCCTGAGTGCTTGCGGCAACGTCTCA TTTTCGCCAAAAGT | | | |
| Kan-F | AAAATGAGACGTTGCCGCAAGCACTC AGGGCGCAA | To amplify the kanamycin resistance gene fragment from pK18mobSacB | 60 | 1 172 |
| Kan-R | CAATAACTGCCTTAAAAAATCAGAA GAACTCGTCAAGAAGGCG | | | |
| pDM4K-F | GCTTGCAGAAACAAATAAAAAACGCA AAAGAAAATGCCGATATC | To amplify the suicide plasmid vector pDM4K | 60 | 5 644 |
| pDM4K-R | GTCATAATTGGTAATGGGTTAAAAAG GATCTTAAGGCCT | | | |
| Txe1-F | TTTAACCCATTACCAATTATGACAAC TGACGGCTACATCATT | To amplify the arabinose- induced lethal gene fragments | 60 | 1 671 |
| Txe1-R | TTTGCCTTTTATTGTTTCCGCAAGC CCCCAGT | | | |
| <i>tssB</i> -Seq-F | CAGCGGTCAACCGACTGCG | To amplify DNA fragments of <i>tssB</i> and its flanking regions from <i>E. piscicida</i> KE5 | 60 | 3 091 |
| <i>tssB</i> -Seq-R | CTGCGGCTCATAAAGCTGCC | | | |
| <i>tssB</i> -US-F | <u>CGCACTAGTAAGCGTATGCTGATCGCT</u> AAGCAA | To amplify the upstream fragment of <i>tssB</i> for overlap PCR | 60 | 561 |
| <i>tssB</i> -US-R | TGTTTCGCTCATGGCATGAAGTCATCTC CGTAACATTTCTTACAAC | | | |
| <i>tssB</i> -DS-F | GATGACTTCATGCCATGAGCGAACAG AACTTGCCA | To amplify the downstream fragment of <i>tssB</i> for overlap PCR | 60 | 547 |
| <i>tssB</i> -DS-R | AATGTCGACTGTGAGATCTCCTCCAG CAGGAACA | | | |
| Vec-Ins-F | GGGATGTAACGCACTGAGAA | To target the backbone of pDM4 K/pTL1010 | 55 | 1 430 |
| Vec-Ins-R | TCCAGTGGCTTCTGTTTCTATC | | | |
| <i>tssB</i> -US-inter | CGGATAGTCGAGATTGGAATGAA | To test whether the <i>tssB</i> gene was successfully knocked out | 55 | 386/893 |
| <i>tssB</i> -DS-inter | TCATGCATAATGGCGGAGAG | | | |
| <i>tssB</i> -del-F | GAAAGCAAGCAGCATACGTTGGA | To detect the presence of <i>tssB</i> gene | 55 | 162 |
| <i>tssB</i> -del-R | TTTCAGCTTGGAAGCGGAGTTCG | | | |
| etfD-F | GGTAACCTGATTTGGCGTTC | To verify <i>E. piscicida</i> strains | 55 | 445 |
| etfD-R | GGATCACCTGGATCTTACC | | | |
| EPF | CTTTGATCATGGTTGCGGAA | To identify <i>E. piscicida</i> strains | 58 | 130 |
| EPR | CGGCGTTTCTTTTCTCG | | | |

限制性酶切位点已加下划线标注。

Restriction sites are underlined.

天然抗性, 本研究首先将 pDM4 衍生为卡那霉素抗性载体 pDM4K。以 pK18mobSacB 为模板, 用 Kan-F/R 引物扩增卡那霉素抗性基因(*kanR*)及其上游启动子序列。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix (p515) 25 μ L, Kan-F/R 引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板(约 100 ng) 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。利用 Gibson Assembly 克隆技术将该片段与 pDM4-F/R 线性化的 pDM4 骨架连接, 替换原有的氯霉素抗性基因(*camR*)及其启动子区, 获得自杀质粒 pDM4K。通过卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 并经 PCR 验证和测序确认插入序列的正确性。

1.4.2 pTL1010 载体的构建

采用 Gibson Assembly 克隆方法, 将 pDM4K 质粒上的 *sacB* 基因及其上游启动子片段替换为从质粒 pTxelCT 上扩增得到的 *araC*-pBAD::*txeI*^{CTD} 片段, 构建 pTL1010 质粒。具体步骤如下: 首先, 使用引物 pDM4K-F/R 线性化 pDM4K 载体; 同时, 以 pTxelCT 为模板, 通过

引物对 Txe1-F/R (序列见表 2)扩增 *araC*-pBAD::*txeI*^{CTD} 片段。该片段包含阿拉伯糖调控元件 *araC*-P_{BAD} 和来自杀香鱼假单胞菌 XSDHY-P 菌株的 T6SS 效应蛋白结构域 Txe1^{CTD}。其中, *araC*-P_{BAD} 用于精确控制毒素表达, 而 Txe1^{CTD} 的核酸内切酶活性可导致宿主 DNA 不可逆降解^[11]。将构建完成的 pTL1010 质粒通过热激法转化至大肠杆菌 S17-1 λ pir 感受态细胞, 筛选阳性克隆并进行验证, 包括 PCR 测序确认插入序列的正确性, 以及在含质量体积分数 0.4% 的 L-阿拉伯糖的 LB 平板上验证毒素表型。

1.4.3 pTL1010 质粒的构建策略

本研究首先通过 Gibson Assembly 克隆技术将 pDM4 质粒中的氯霉素抗性基因替换为来自 pK18mobSacB 的卡那霉素抗性基因, 成功构建了衍生质粒 pDM4K。随后, 利用相同方法将 pDM4K 中的蔗糖负筛选标记基因(*sacB*)替换为阿拉伯糖诱导型 Txe1 毒素表达盒 *araC*-P_{BAD}::*txeI*^{CTD}, 最终获得自杀质粒 pTL1010 (图 1)。该质粒通过 AraC/P_{BAD} 系统实现对毒素表达的严格调控, 仅在阿拉伯糖诱导条件下激活毒性效应。

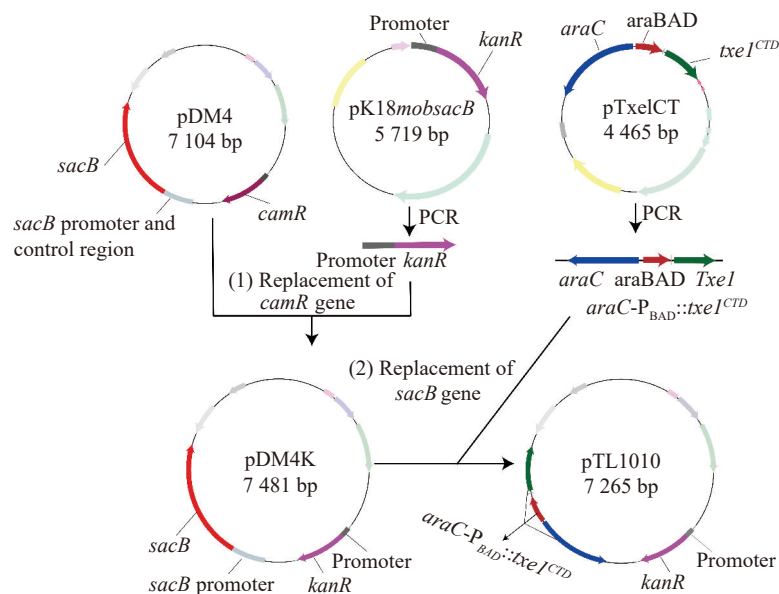


图1 pTL1010质粒构建全过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of the construction process of pTL1010 plasmid.

1.5 比较 pDM4K 和 pTL1010 在杀鱼爱德华氏菌基因敲除中的应用

1.5.1 同源重组质粒的构建

从 NCBI GenBank 数据库获取杀鱼爱德华氏菌 KE5 菌株基因组序列 (GenBank 登录号为 CP090967.1), 作为参考设计引物, 扩增 *tssB* 基因及其上、下游共约 1 200 bp 的片段 (基因组位置: 2 556 888–2 559 978 bp), PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix (p515) 25 μ L, *tssB*-US-F/R 或 *tssB*-DS-F/R 引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 (约 100 ng) 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用引物对 *tssB*-Seq-F/R 对 FC2 菌株基因组中相应片段进行 PCR 扩增和测序。根据测序结果, 设计引物对 *tssB*-US-F/R 和 *tssB*-DS-F/R, 分别扩增 FC2 菌株 *tssB* 基因上、下游同源臂。通过重叠 PCR (overlap PCR) 方法融合上、下游同源臂, 获得 *tssB* 基因敲除盒。将融合片段经 *Sal*I-HF 和 *Spe*I-HF 双酶切后, 克隆至经相同酶切处理的载体 pDM4K 和 pTL1010 中, 分别获得同源重组质粒 pDM4K- Δ *tssB* 和 pTL1010- Δ *tssB*, 并转化至 *E. coli* S17-1 λ pir 感受态细胞。使用引物对 Vec-Ins-F/R (靶向质粒骨架片段) 及 *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter (分别靶向 *tssB* 基因上、下游同源臂内部) 筛选阳性转化子, 并通过测序验证敲除盒片段的准确性。

1.5.2 质粒接合转移及同源重组双交换

将携带 pDM4K- Δ *tssB* 或 pTL1010- Δ *tssB* 质粒的 *E. coli* S17-1 λ pir 菌株 (供体菌) 在含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h, 然后以 1:100 的比例接种到新鲜 LB 培养基中, 培养至对数中期 ($OD_{600} \approx 0.6$)。同时, 将杀鱼爱德华氏菌 FC2 (受体菌) 在 TSB 培养基中培养至对数期。分别收集菌液并用无菌 PBS 洗涤, 将供体菌和受体菌按 2:1 的比例混合, 取 100 μ L 混合菌液点种于 LB 琼脂平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养

24 h 进行接合。将接合后的菌膜刮下, 用 PBS 重悬并进行 10 倍梯度稀释, 取 100 μ L 涂布于含卡那霉素和氯霉素的 TSA 平板上。随机挑选单菌落, 接种至含有 900 μ L TSB 液体培养基的 1.5 mL EP 管中培养 5 h, 该培养基中添加了卡那霉素和氯霉素。分别使用杀鱼爱德华氏菌特异性引物 *etfD*-F/R^[16]、质粒骨架引物 Vec-Ins-F/R 及同源臂引物 *tssB*-inter-US/*tssB*-inter-DS 进行 PCR 鉴定。若 *etfD*-F/R 扩增结果为阳性, 且 Vec-Ins-F/R 扩增显示 1 430 bp 条带, 同时 *tssB*-inter-US/*tssB*-inter-DS 扩增获得 386 bp (融合片段) 和 893 bp (野生型基因组) 2 个条带, 则表明敲除质粒已通过同源重组整合到宿主基因组中 (第一次同源重组)。

根据第一次同源重组结果, 随机选取 3 管含有 pTL1010- Δ *tssB* 或 pDM4K- Δ *tssB* 质粒的杀鱼爱德华氏菌接合子, 分别划线接种于质量体积分数 0.4% 的 L-阿拉伯糖 (pTL1010 组) 或 5% 蔗糖 (pDM4K 组) 的 TSA 平板上进行负筛选 (第二次同源重组)。每个转接合子划线于一个平板上。从每个平板上随机挑选 15 个单菌落, 接种至 TSB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 4 h。使用引物 *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter 进行 PCR 扩增, 检测是否发生第二次同源重组。若扩增获得 386 bp 和 893 bp 两个条带, 表明未发生第二次同源重组; 若获得单一 893 bp 条带, 表明第二次同源重组未发生链交换, 基因组序列未变化仍为野生型; 若获得单一 386 bp 条带, 则为敲除株 Δ *tssB*。同时, 使用引物 *tssB*-del-F/R 对筛选的菌落进行 PCR 验证, 因 *tssB* 基因被敲除, 所以 PCR 验证无条带。

1.6 敲除株的毒力表型验证

参照已建立的人工感染模型^[17], 评估杀鱼爱德华氏菌 FC2 Δ *tssB* 突变株的毒力。从市场购买健康斑马鱼 (体重约 0.4 g), 在实验室水族箱中驯养一周, 水温维持在 (28 \pm 1) $^{\circ}$ C, 每日更换 1/3 体积的水并投喂适量商业饲料。将 FC2 野生型菌株 (WT) 和 Δ *tssB* 突变株分别接种至 TSB 培养

基中, 在 28 °C、180 r/min 条件下培养 10 h 至对数期 ($OD_{600} \approx 0.8$), 用 PBS 洗涤后重悬至约 3×10^5 CFU/mL。将斑马鱼随机分为 3 组(每组 30 尾), 通过微量注射技术腹腔注射 10 μ L 细菌悬液或 PBS (对照组)。将斑马鱼随机分为 3 组(每组 30 尾): WT 组、 $\Delta tssB$ 突变株组和 PBS 对照组。通过微量注射技术腹腔注射 10 μ L 细菌悬液或 PBS。注射后, 将斑马鱼置于 28 °C 水族箱中观察 10 d, 每日记录死亡率及发病情况。对发病或死亡的斑马鱼进行拍照记录, 并取肝脏组织进行病原菌分离鉴定。实验结束后, 绘制累积死亡率曲线, 并统计分析各组间的差异。本次动物实验得到浙江海洋大学实验动物伦理委员会审查, 审批号为 2025058。

1.7 统计分析

同源重组效率定义为阳性菌落数占总筛选菌落数的百分比。同源重组效率及负筛选效率采用独立样本 *t* 检验分析。毒力实验中, 各组斑马鱼的累积死亡率以生存曲线表示, 采用 log-rank 检验比较 WT 组、 $\Delta tssB$ 组和 PBS 对照组之间的生存差异。所有统计分析均使用 GraphPad Prism (v8.0) 软件完成, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 pTL1010 质粒的毒素诱导表达表型验证

为验证 Txel 毒素表达的可控性, 将 pTL1010 空载体转化至大肠杆菌 S17-1 λ pir 感受态细胞中进行表型分析。结果显示, 在仅含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 TSA 平板上, 携带 pTL1010 的菌株正常生长(图 2A); 而在同时含卡那霉素和质量体积分数 0.4% 的 L-阿拉伯糖的 TSA 平板上, 菌株生长受到显著抑制(图 2B)。阴性对照(未携带质粒的大肠杆菌 S17-1 λ pir)在含卡那霉素的平板上不生长(图 2C), 但在质量体积分数 0.4% 的 L-阿拉伯糖的平板上正常生长(图 2D)。上述结果表明, pTL1010 携带的 *araC*-P_{BAD}::

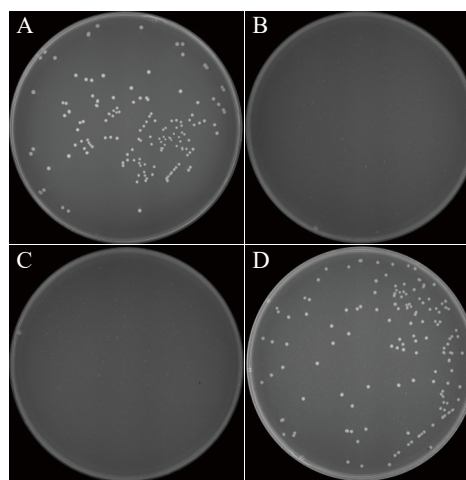


图2 阿拉伯糖诱导的Txel毒素表达调控在大肠杆菌 S17-1 λ pir 中的验证。A: 仅含卡那霉素(50 μ g/mL)的TSA平板; B: 同时含卡那霉素和质量体积分数 0.4%的L-阿拉伯糖的TSA平板; C: 阴性对照, 即未携带质粒的大肠杆菌S17-1 λ pir在含卡那霉素的平板上的生长情况; D: 仅含质量体积分数0.4%的L-阿拉伯糖的TSA平板的生长情况。

Figure 2 Verification of the expression regulation of arabinose-induced Txel toxin in *Escherichia coli* S17-1 λ pir. A: TSA plate containing kanamycin (50 μ g/mL) only; B: TSA plate containing kanamycin and 0.4% (*W/V*) L-arabinose; C: Negative control, *E. coli* S17-1 λ pir without plasmid does not grow on kanamycin plate; D: Growth status on TSA plates containing only 0.4% (*W/V*) L-arabinose.

txeI^{CTD} 系统可有效实现阿拉伯糖诱导的毒素表达调控。上述结果表明, pTL1010 携带的 *araC*-P_{BAD}::*txeI*^{CTD} 系统可有效实现阿拉伯糖诱导的毒素表达调控。

2.2 第一次同源重组效率比较

通过双亲接合转移法, 将携带 pDM4K- $\Delta tssB$ 或 pTL1010- $\Delta tssB$ 质粒的大肠杆菌 S17-1 λ pir 供体菌与杀鱼爱德华氏菌 FC2 受体菌进行共培养。从接合后菌苔涂板中随机挑选 22 个克隆进行 PCR 鉴定, 结果显示所有克隆的 *etfD*-F/R 扩增均为阳性, 且 Vec-Ins-F/R 扩增显示 1 430 bp

条带, 同时 *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter 扩增获得 386 bp (融合片段)和 893 bp (野生型基因组) 2 个条带(图 3)。两组质粒的接合效率无显著差异, 表明将 *sacB* 替换为 *araC*-P_{BAD}::*txeI*^{CTD} 未显著影

响质粒的转移或基因组整合效率。

2.3 第二次同源重组效率比较

本研究通过平行实验比较了 Txe1 毒素系统 (pTL1010- Δ *tssB*)与 SacB 系统(pDM4K- Δ *tssB*)的

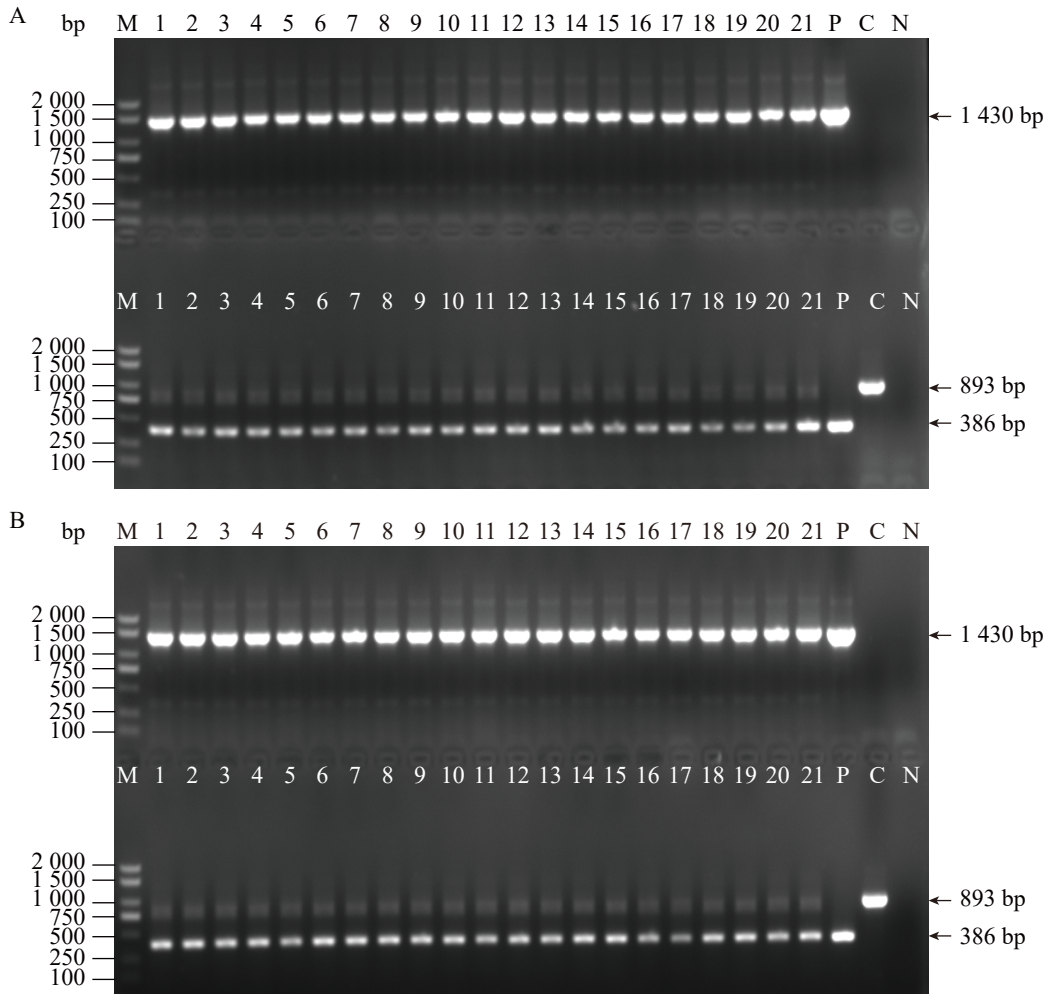


图3 pTL1010- Δ *tssB*与pDM4K- Δ *tssB*组第一次同源重组的PCR验证。A: pTL1010- Δ *tssB*组PCR验证结果; B: pDM4K- Δ *tssB*组PCR验证结果。两图中, 上行为Vec-Ins-F/R引物扩增结果; 下行为*tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter物扩增结果。泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-21: 测试菌落; P: 阳性对照(pDM4K- Δ *tssB*质粒); C: 空白对照(无质粒的FC2野生株); N: 阴性对照(ddH₂O)。

Figure 3 PCR validation of the first homologous recombination in pTL1010- Δ *tssB* and pDM4K- Δ *tssB* groups. A: PCR validation results of the pTL1010- Δ *tssB* group; B: PCR validation results of the pDM4K- Δ *tssB* group. In both panels, the top row represents PCR amplification using the Vec-Ins-F/R primers; The bottom row represents PCR amplification using the *tssB*-US-inter-F/*tssB*-DS-inter-R primers. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-21: Tested colonies; P: Positive control (pDM4K- Δ *tssB* plasmid); C: Blank control (FC2 wild type strain without plasmid); N: Negative control (ddH₂O).

二次同源重组效率。每组设置 3 个独立生物学重复 ($n=3 \times 15$), 分别在 0.4% L-阿拉伯糖(pTL1010 组) 和蔗糖(pDM4K 组) 条件下进行负筛选, 由于蔗糖浓度的高低可能影响 SacB 系统的筛选效率, 因此本研究分别在蔗糖浓度为 5%、10% 及 20% 的条件下进行第二次同源重组。假阳性率定义为未发生二次重组的菌落数占总检测菌落数的比例。实验结果显示, 采用 *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter 引物扩增, pTL1010 组每个重复中少于 2 个菌落显示出未完成第二次同源重组的特征(图 4), 而 pDM4K (5%、10%、20%) 组全部菌落均显示出该特征(图 5)。pTL1010 组的第二次重组阳性率为 $(91.1 \pm 6.3)\%$, 显著高于 pDM4K 组 (5%、10%、20%) 的 0 ($P < 0.01$) (图 6)。此外, 靶向 *tssB* 基因的 *tssB*-del-F/R 引物扩增结果进一步证实, 未显示 162 bp 单条带的菌落为 $\Delta tssB$ 缺

失株(图 7)。这些结果表明, Txe1 毒素系统显著提高了负筛选效率, 降低了假阳性率。

2.4 $\Delta tssB$ 的毒力表型

为了验证 *tssB* 基因敲除对杀鱼爱德华氏菌毒力的影响, 开展了斑马鱼的人工感染实验。实验设 PBS 对照组、 $\Delta tssB$ 突变株组和 WT 菌株组, 每组 30 尾斑马鱼。结果显示, $\Delta tssB$ 突变株组致死率(3.3%)显著低于 WT 组累计死亡率 60% ($P < 0.05$) (图 8A), 且 $\Delta tssB$ 突变株组实验过程中仅 1 尾死亡, 病原菌分离未检出杀鱼爱德华氏菌, 而 WT 菌株组死亡斑马鱼腹腔中均检出杀鱼爱德华氏菌。实验观察期间, PBS 组和 $\Delta tssB$ 突变株组斑马鱼无显著病变, 活动正常; WT 组出现腹部膨胀、腹腔积液, 伴有食欲不振、游动缓慢等症状(图 8B)。这些结果表明 *tssB* 基因敲除显著降低菌株毒力。

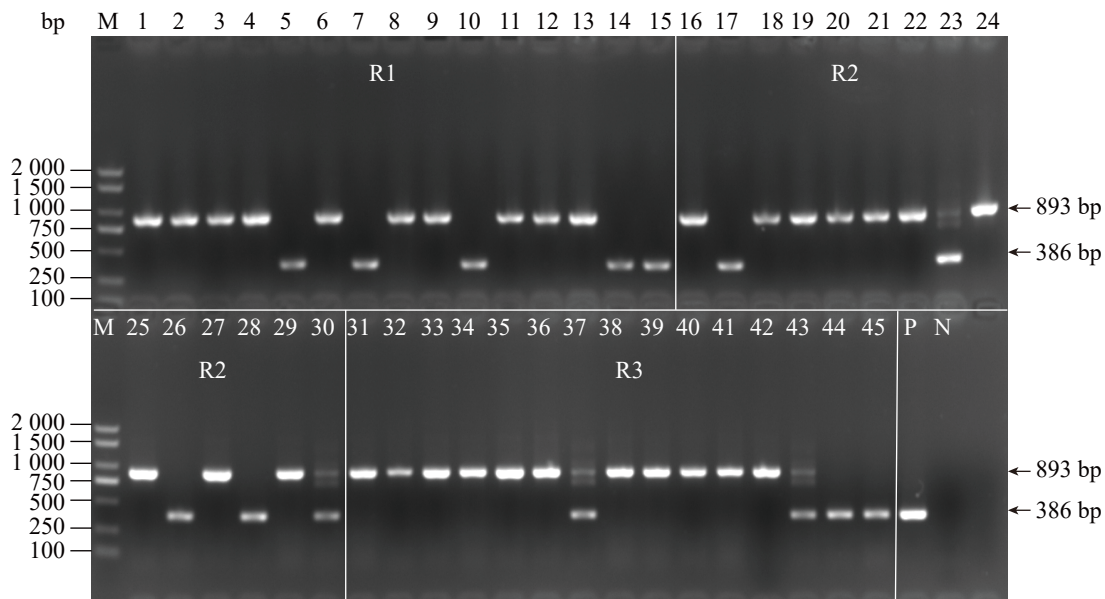


图4 基于 *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter 引物的 pTL1010- $\Delta tssB$ 组第二次同源重组结果对比图。泳道 M: DL2000 DNA marker; 泳道 1-45: 测试菌落; P: 阳性对照(pTL1010- $\Delta tssB$ 或 pDM4K- $\Delta tssB$ 质粒); N: 阴性对照(ddH₂O); R1、R2、R3: 生物学重复。

Figure 4 Comparison of the second homologous recombination results of the pTL1010- $\Delta tssB$ group based on the *tssB*-US-inter/*tssB*-DS-inter primers. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-45: Tested colonies; P: Positive control (pTL1010- $\Delta tssB$ or pDM4K- $\Delta tssB$ plasmid); N: Negative control (ddH₂O); R1, R2, R3: Biological replicates.

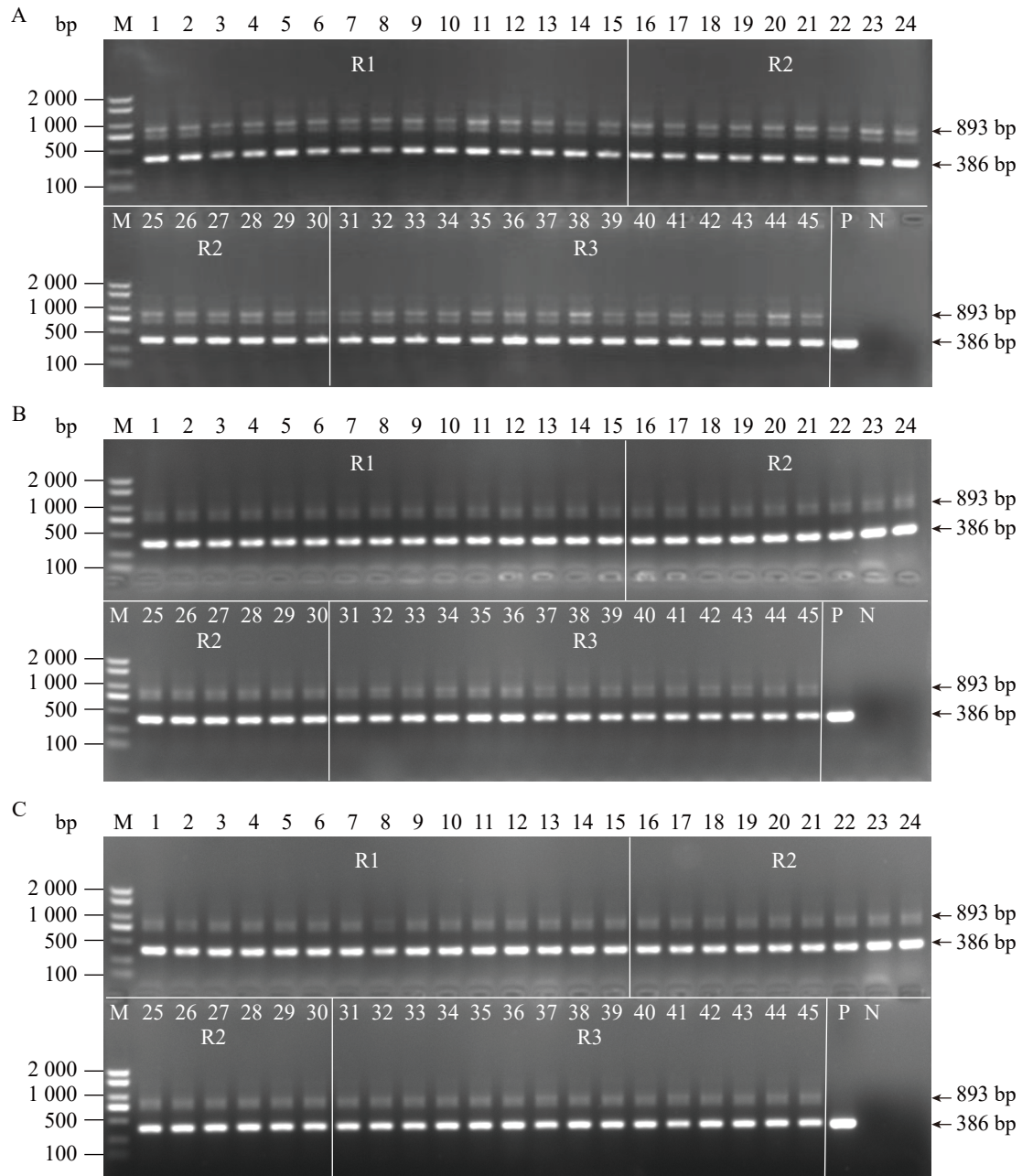


图5 基于*tssB-US-inter/tssB-DS-inter*引物的pDM4K- $\Delta tssB$ 组第二次同源重组结果对比图。A: 5%蔗糖筛选结果; B: 10%蔗糖筛选结果; C: 20%蔗糖筛选结果。泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-45: 测试菌落; P: 阳性对照(pTL1010- $\Delta tssB$ 或pDM4K- $\Delta tssB$ 质粒); N: 阴性对照(ddH₂O); R1、R2、R3: 生物学重复。下同。

Figure 5 Comparison of the second homologous recombination results of the pDM4K- $\Delta tssB$ group based on the *tssB-US-inter/tssB-DS-inter*. A: Screening results with 5% sucrose; B: Screening results with 10% sucrose; C: Screening results with 20% sucrose. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-45: Tested colonies; P: Positive control (pTL1010- $\Delta tssB$ or pDM4K- $\Delta tssB$ plasmid); N: Negative control (ddH₂O); R1, R2, R3: Biological replicates. The same below.

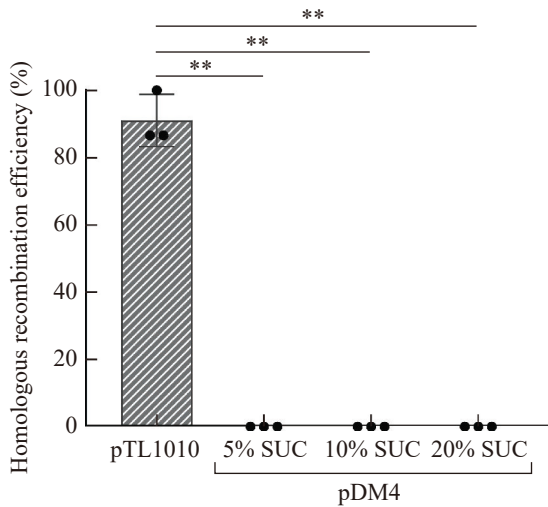


图6 pTL1010- $\Delta tssB$ 与pDM4K- $\Delta tssB$ 系统第二次同源重组效率的比较。pTL1010: pTL1010- $\Delta tssB$ 系统效率; pDM4K (5% SUC、10% SUC、20% SUC): pDM4K- $\Delta tssB$ 在蔗糖浓度为5%、10%及20%时的系统效率。采用独立样本 t 检验比较两组数据; pTL1010系统效率显著高于pDM4K系统(**表示 $P<0.01$)。误差条表示3次独立重复的标准差(均值 \pm SD, $n=3$)。

Figure 6 Comparison of the second homologous recombination efficiencies between pTL1010- $\Delta tssB$ and pDM4K- $\Delta tssB$ systems. pTL1010: Efficiency of the pTL1010- $\Delta tssB$ system; pDM4K (5% SUC, 10% SUC, 20% SUC): The system efficiency of pDM4K- $\Delta tssB$ at sucrose concentrations of 5%, 10%, and 20%. Statistical comparison was performed using an independent-samples t -test; The pTL1010 system efficiency was significantly higher than that of the pDM4K system (** indicates $P<0.01$). Error bars represent the mean \pm SD of three independent replicates ($n=3$).

3 讨论与结论

本研究成功构建了基于杀香鱼假单胞菌 T6SS 毒素 Txel 的新型负筛选系统重组质粒 pTL1010, 有效克服并解决了传统 SacB 系统在杀鱼爱德华氏菌等特定革兰氏阴性菌中筛选效

率低下的问题。实验结果表明, 在 0.4% 阿拉伯糖诱导条件下, Txel 毒素系统的负筛选效率达到 91.1%, 显著优于传统 SacB 系统(0), 为革兰氏阴性菌的无痕基因组精准编辑提供了高效且可靠的新工具。

目前, 在爱德华氏菌基因敲除研究中基于 SacB 系统的同源重组技术是应用最为广泛的基因敲除策略^[18-19]。近年来, CRISPR/Cas9 系统开始被引入该领域^[20-21], 其模块化的靶向编辑能力显著提升了基因操作效率。然而, 该技术的规模化应用仍面临技术壁垒, 在中小规模研究中 sgRNA 文库构建及 Cas9 蛋白表达体系的优化成本显著高于传统方法。相比之下, 基于 pDM4 等载体的 SacB 同源重组敲除方法, 其核心 SacB 负筛选系统的有效性通常受到宿主菌株遗传背景及其代谢状态的严格限制^[7,22]。本研究发现杀鱼爱德华氏菌 FC2 株对 SacB 筛选表现出完全不敏感性, 假阳性率高达 100%, 这一现象与 Khetrpal 等于 2015 年报道的革兰氏阴性菌逃逸 SacB 筛选的结果相符, 宿主菌的内源性果聚糖酶活性、*sacB* 基因突变以及细胞外多糖屏障等因素均可能导致 SacB 系统的蔗糖代谢途径失效^[13]。此外, 有研究报道副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*) 和巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*) 等多种病原菌也对 SacB 负筛选表现出不同程度的天然耐受性^[7,23], 进一步印证了该系统的局限性。

为突破 SacB 系统的这些局限, 研究人员开发了多种基于细菌毒素的负筛选系统, 如靶向 DNA 旋转酶 GyrA 的 *ccdB*、mRNA 内切酶 *mazF* 和 *mqsR*, 以及其他分泌系统毒力效应因子等, 这些毒素系统能够快速作用于宿主菌细胞内的核酸、蛋白质或细胞膜等关键组分, 显著提高第二次同源重组过程的筛选效率^[24-25]。Luo 等^[26]在 2015 年发现并验证了源自拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 的全新毒素-抗毒素系统 vmi480/vmi470, 并将 vmi480 毒素应用于自杀载体, 在多种弧菌中建立了通用的负筛选平台。Lazarus

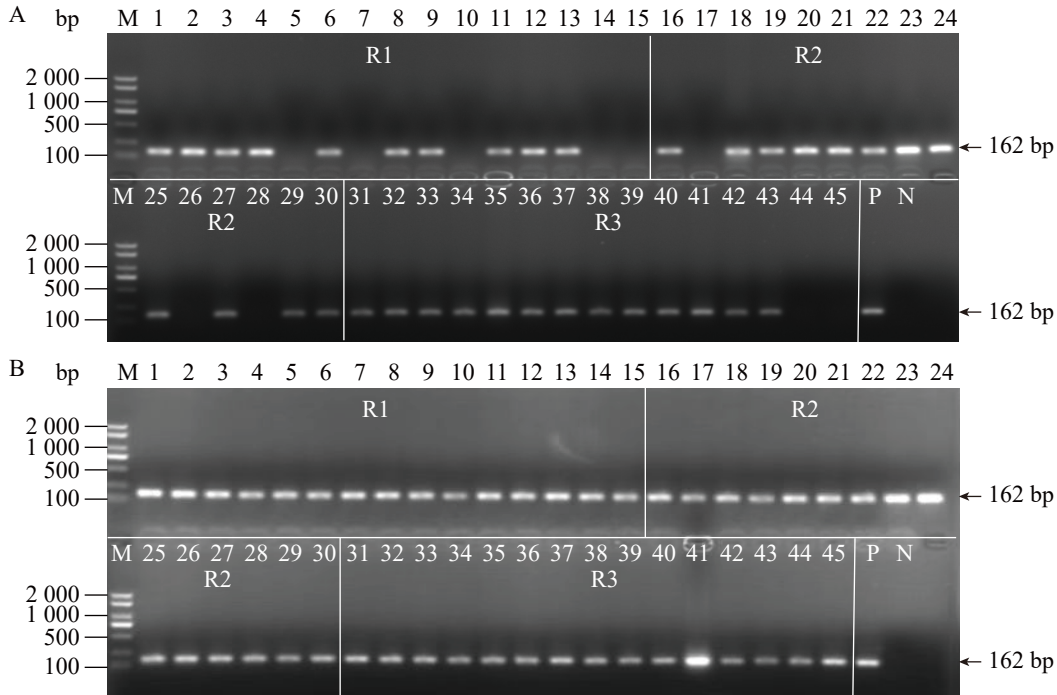


图7 基于 *tssB*-del-F/R 引物的 pTL1010- $\Delta tssB$ 与 pDM4K- $\Delta tssB$ 组敲除 *tssB* 基因的 PCR 验证结果。A: pTL1010- $\Delta tssB$ 组 *tssB* 基因敲除的 PCR 验证结果; B: pDM4K- $\Delta tssB$ 组 *tssB* 基因敲除的 PCR 验证结果。两图中, PCR 扩增使用 *tssB*-del-F/R 引物。

Figure 7 PCR verification results for the *tssB* gene knockout in the pTL1010- $\Delta tssB$ and pDM4K- $\Delta tssB$ groups based on the *tssB*-del-F/R primers. A and B show PCR amplification results using primers *tssB*-del-F/R for colonies selected from the pTL1010- $\Delta tssB$ and pDM4K- $\Delta tssB$ groups, respectively.

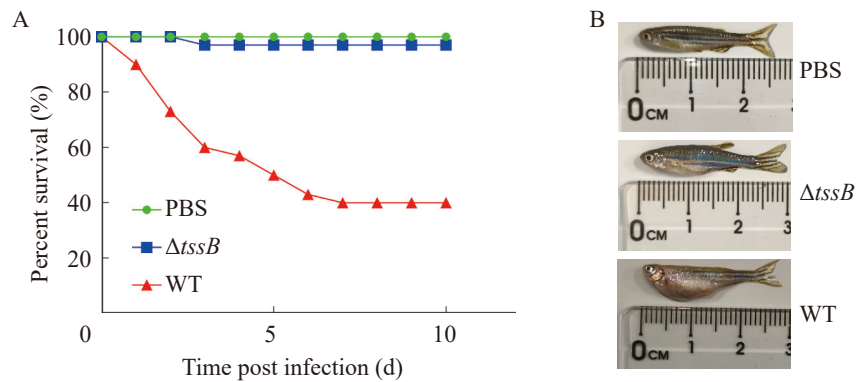


图8 杀鱼爱德华氏菌FC2株 *tssB* 基因敲除突变株对斑马鱼致病性。A: 斑马鱼腹腔注射野生型菌株(WT)、 $\Delta tssB$ 突变株或PBS (对照)后10 d观察期内的生存曲线($n=30$); B: 各处理组斑马鱼的典型临床症状及外观表现。Figure 8 Pathogenicity of the *tssB* gene knockout mutant of *Edwardsiella piscicida* strain FC2 to zebrafish. A: Survival curves of zebrafish following intraperitoneal injection with WT strain, $\Delta tssB$ mutant, or PBS (control) over a 10-day observation period ($n=30$); B: Representative clinical signs and appearances of zebrafish from each treatment group.

等^[27]于 2019 年开发了 pTOX 系列质粒系统, 通过 rhaBAD 启动子控制的多种毒素基因成功应用于多种革兰氏阴性菌的基因敲除。本研究采用了来源于杀香鱼假单胞菌的 T6SS 效应蛋白 Txe1^[11]作为负筛选标记, 首次应用于细菌基因组编辑。Txe1 的 C 端结构域具有核酸酶活性, 可迅速降解宿主 DNA, 引起细胞不可逆死亡, 从分子机制上避免了因宿主代谢适应导致的抗性产生。此外, 毒素系统的模块化设计使得该系统具有跨物种的适用性, 减少了针对不同宿主菌株繁琐的优化过程。

精准诱导表达调控是保证负筛选系统有效实施的重要环节。本研究中采用了 AraC/P_{BAD} 诱导系统实现 Txe1 毒素基因表达的精准时序调控。该系统具有低基础表达特性(泄漏率<0.1%), 确保了质粒在常规培养条件下的稳定性^[28], 避免了组成型表达导致的宿主提前裂解或毒素突变。同时, 通过在负筛选阶段严格添加外源阿拉伯糖诱导毒素表达, 使毒性作用仅在筛选目标阶段发挥, 进一步增强了系统的有效性和精确性。然而, 值得注意的是, 部分菌株可能因 ABC 转运系统的差异而表现出对阿拉伯糖的吸收效率降低, 未来可通过在质粒上共表达阿拉伯糖转运蛋白 AraE 以促进诱导剂的跨膜运输效率^[29]。此外, 若某些菌株具备代谢分解阿拉伯糖的能力, 也可以通过优化启动子系统(如使用鼠李糖诱导系统^[30])进一步提升系统的普适性。

综上所述, 本研究构建的基于 T6SS 毒素 Txe1 的新型负筛选质粒 pTL1010 显著提高了杀鱼爱德华氏菌基因组无痕编辑的效率, 为革兰氏阴性菌的遗传操作提供了高效且通用的技术工具, 具有广泛的应用潜力。

作者贡献声明

王鹏程: 研究构思和设计, 数据收集和處理, 论文撰写和修改; 张明明: 数据收集和處理, 实验操作, 参与论文讨论; 张朝政: 实验操作, 数据分析, 提供技术支持; 李超: 协助

数据分析; 曹健波: 数据分析; 严小军: 项目指导; 陶震: 研究构思和设计, 数据分析, 论文撰写和修改, 项目指导与监督。

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] 晁双英, 胡学军. 基因编辑技术在大肠杆菌中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1446-1461.
CHAO SY, HU XJ. Application of gene editing technology in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1446-1461 (in Chinese).
- [2] 李琦, 武美贤, 郭清华, 邵悠然, 杨俊杰, 蒋宇, 杨晟. 细菌基因组编辑技术进展[J]. 生命科学, 2019, 31(5): 473-492.
LI Q, WU MX, GUO QH, SHAO YR, YANG JJ, JIANG Y, YANG S. Advances in bacterial genome editing techniques[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(5): 473-492 (in Chinese).
- [3] HMELO LR, BORLEE BR, ALMBLAD H, LOVE ME, RANDALL TE, TSENG BS, LIN CY, IRIE Y, STOREK KM, YANG JJ, SIEHNEL RJ, HOWELL PL, SINGH PK, TOLKER-NIELSEN T, PARSEK MR, SCHWEIZER HP, HARRISON JJ. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange[J]. Nature Protocols, 2015, 10(11): 1820-1841.
- [4] REYRAT JM, PELICIC V, GICQUEL B, RAPPUOLI R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(9): 4011-4017.
- [5] GAY P, Le COQ D, STEINMETZ M, BERKELMAN T, KADO CI. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 164(2): 918-921.
- [6] BLOMFIELD IC, VAUGHN V, REST RF, EISENSTEIN BI. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(6): 1447-1457.
- [7] 肖静, 肖坤雪, 王翘楚, 陈焕春, 蔡旭旺, 徐晓娟. 副猪嗜血杆菌 Flp-FRT 双基因敲除方法的建立与优化[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(1): 219-230.
XIAO J, XIAO KX, WANG QC, CHEN HC, CAI XW, XU XJ. Development and optimization of double-gene knockout method for *Glaesserella parasuis* based on the flp-FRT system[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(1): 219-230 (in Chinese).
- [8] BENCIVENGA-BARRY NA, LIM B, HERRERA CM, TRENT MS, GOODMAN AL. Genetic manipulation of wild human gut *Bacteroides*[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(3): e00544-19.

- [9] JURÉNAS D, JOURNET L. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion effectors[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(3): 383-394.
- [10] ALLSOPP LP, BERNAL P. Killing in the name of: T6SS structure and effector diversity[J]. *Microbiology*, 2023, 169(7): 001367.
- [11] LI YY, YAN XJ, TAO Z. Two type VI secretion DNase effectors are utilized for interbacterial competition in the fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 869278.
- [12] KHLEBNIKOV A, RISA O, SKAUG T, CARRIER TA, KEASLING JD. Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(24): 7029-7034.
- [13] KHETRAPAL V, MEHERSHAHI K, RAFEE S, CHEN SY, LIM CL, CHEN SL. A set of powerful negative selection systems for unmodified *Enterobacteriaceae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(13): e83.
- [14] MILTON DL, O'TOOLE R, HORSTEDT P, WOLF-WATZ H. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1310-1319.
- [15] GRIFFIN MJ, WARE C, QUINIQU SM, STEADMAN JM, GAUNT PS, KHOO LH, SOTO E. *Edwardsiella piscicida* identified in the Southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 108(1): 23-35.
- [16] SAKAI T, IIDA T, OSATOMI K, KANAI K. Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR[J]. *Fish Pathology*, 2007, 42(2): 115-117.
- [17] 邹文政, 余建明, 蔡鸿娇, 李忠琴, 林茂, 王泽楠. 迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型构建及病理分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4686-4697.
- ZOU WZ, YU JM, CAI HJ, LI ZQ, LIN M, WANG ZN. Construction and pathological analysis of a zebrafish model infected with *Edwardsiella tarda*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4686-4697 (in Chinese).
- [18] HU YH, LI YX, SUN L. *Edwardsiella tarda* Hfq: impact on host infection and global protein expression[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45(1): 23.
- [19] JIN MR, HE JJ, LI J, HU YH, SUN DM, GU HJ. *Edwardsiella piscicida* YccA: a novel virulence factor essential to membrane integrity, mobility, host infection, and host immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 126: 318-326.
- [20] LEE EG, KWAK JS, KIM KH. CRISPR/Cas9-mediated generation of auxotrophic *Edwardsiella piscicida* mutants and immunization in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 122: 98-105.
- [21] NADARAJAPILLAI K, JUNG S, SELLATHURAI S, GANESHALINGAM S, KIM MJ, LEE J. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *tnf-α1* in zebrafish reduces disease resistance after *Edwardsiella piscicida* bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 144: 109249.
- [22] ZHOU P, BIBEK GC, HU B, WU CG. Development of SacB-based counterselection for efficient allelic exchange in *Fusobacterium nucleatum*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2025, 13(1): e0206624.
- [23] JOST BH, HOMCHAMPA P, STRUGNELL RA, ADLER B. The *sacB* gene cannot be used as a counterselectable marker in *Pasteurella multocida*[J]. *Molecular Biotechnology*, 1997, 8(2): 189-191.
- [24] WANG HL, BIAN XY, XIA LQ, DING XZ, MÜLLER R, ZHANG YM, FU J, STEWART AF. Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for counterselection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(5): e37.
- [25] METS T, KASVANDIK S, SAARMA M, MAIVÄLI Ü, TENSON T, KALDALU N. Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR[J]. *Biochimie*, 2019, 156: 79-91.
- [26] LUO P, HE XY, LIU QT, HU CQ. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, *vmi480*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144465.
- [27] LAZARUS JE, WARR AR, KUEHL CJ, GIORGIO RT, DAVIS BM, WALDOR MK. A new suite of allelic-exchange vectors for the scarless modification of proteobacterial genomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(16): e00990-19.
- [28] SIEGELE DA, HU JC. Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(15): 8168-8172.
- [29] ZHANG Y, SHANG XL, LAI SJ, ZHANG GQ, LIANG Y, WEN TY. Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5831-5838.
- [30] WEGERER A, SUN TQ, ALTENBUCHNER J. Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations[J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 8: 2.