

文章编号: 1674-7054(2021)02-0154-07



# 维氏气单胞菌 $\Delta exsA1$ 减毒株对宿主免疫原性研究

盛强龙, 徐一轲, 刘超伦, 李宏, 马香, 唐燕琼, 刘柱

(海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228)

**摘要:** 维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 是一种人鱼共患的革兰氏阴性病原菌。在革兰氏阴性菌中, ExsA 能激活 III 型分泌系统 (Type III secretion systems, T3SS), 对宿主产生毒害作用。前期分析基因组研究结果表明, 维氏气单胞菌有 2 个拷贝的 *exsA* 基因, 推测其毒力调控可能由 *exsA* 基因介导。利用同源重组双交换技术构建了维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株, 采用腹腔注射的方式进行攻毒实验, 结果表明, *exsA1* 缺失后维氏气单胞菌毒力显著下降。将  $\Delta exsA1$  减毒株和野生株分别接种罗非鱼, 发现鱼体内血清中免疫球蛋白 M (IgM) 积累水平上升, 在第 4 天达到峰值; 在致死剂量维氏气单胞菌野生株感染下, 接种  $\Delta exsA1$  减毒株对罗非鱼的免疫保护率为 70%。 $\Delta exsA1$  减毒株可为进一步开发维氏气单胞菌减毒活疫苗奠定基础。

**关键词:** 维氏气单胞菌; 毒力; 免疫球蛋白 M; 免疫保护率

**中图分类号:** Q 939.91      **文献标志码:** A

**引用格式:** 盛强龙, 徐一轲, 刘超伦, 等. 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  减毒株对宿主免疫原性研究 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(2): 154-160. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2021.02.003

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 是一种人鱼共患的革兰氏阴性病原菌<sup>[1]</sup>, 其分布广泛、致病性较强, 给水产养殖带来巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。人感染后会出现菌血症、脑膜炎等症状, 甚至有死亡的危险<sup>[3]</sup>。在革兰氏阴性菌中, III 型分泌系统 (Type III secretion systems, T3SS) 通过分泌胞外蛋白和毒力蛋白介导毒力作用的发挥<sup>[4]</sup>, 是细菌向宿主细胞分泌毒力因子的重要途径, 如铜绿假单胞菌、沙门氏菌及福氏志贺菌对宿主的毒害作用皆由 T3SS 介导<sup>[5]</sup>。在急性感染期间, 铜绿假单胞菌中 T3SS 特别活跃, 感染者的死亡率增加<sup>[6-7]</sup>。T3SS 在细菌病原体中十分保守, 其表达由 exoenzyme S transcriptional regulator ExsA 激活<sup>[8]</sup>。在副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 中, HlyU 正调控 *exsA* 基因启动子, 激活 T3SS 的表达<sup>[9]</sup>; 在铜绿假单胞菌中, ExsA 可调控细胞外金属蛋白酶 ImpA 的表达, 后者通过 T3SS 分泌到宿主体内后, 可以裂解巨噬细胞表面蛋白 CD44, 以抑制巨噬细胞对细菌细胞的吞噬作用<sup>[10]</sup>。免疫球蛋白 M (IgM) 是一种普遍存在于脊椎动物中, 由效应 B 淋巴细胞特异性分泌的免疫球蛋白<sup>[11-12]</sup>。根据 Ig 重链 (heavy chain, H) 恒定区的差异, 硬骨鱼类被划分为 IgM、IgD、IgZ/T、IgM 和 IgZ<sup>[13]</sup> 等类型。在硬骨鱼中, IgM 较其他类型的免疫球蛋白在含量上占绝对优势<sup>[14-15]</sup>, 检测 IgM 成为判断特异性免疫形成的标志之一。

疫苗主要分为传统疫苗和基因工程疫苗。传统疫苗分为灭活疫苗和减毒活疫苗 (live attenuated vaccine, LAV), 基因工程疫苗分为 DNA 疫苗、重组亚单位疫苗及活载体疫苗<sup>[16]</sup>。传统疫苗制备简易、成本较低、免疫效果优异, 是市场主流。灭活疫苗较减毒活疫苗更加安全, 且便于保存; 减毒活疫苗接种量更小, 但免疫持续时间长, 也有一定的开发优势。常规灭活疫苗虽然激发了显著的抗体水平, 但因为抗体不能有效进入感染细胞杀灭病原菌, 无法提供有效保护; 而减毒活疫苗进入宿主体内后, 到达靶器官的方

收稿日期: 2020-12-28

修回日期: 2021-02-19

基金项目: 海南自然科学基金青年基金项目 (319QN161); 国家自然科学基金项目 (31772887; 32060153)

第一作者: 盛强龙 (1996-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2018 级硕士研究生. E-mail: 1165549469@qq.com

通信作者: 刘柱 (1976-), 男, 教授, 博士. 研究方向: 病原微生物. E-mail: liuzhuabel@163.com

式与自然感染途径类似,且持续表达抗原,能有效刺激宿主细胞免疫应答,提高宿主清除感染细胞的能力,是该菌疫苗发展的重要方向<sup>[17]</sup>。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是重要的经济养殖鱼类,海南是我国主要的罗非鱼养殖地,曾发生过以维氏气单胞菌为主要病原菌的爆发疾病案例<sup>[18]</sup>。目前针对维氏气单胞菌的疫苗相对空白,并且现有的嗜水气单胞菌疫苗和杀鲑气单胞菌疫苗对维氏气单胞菌的免疫效果不佳,制备维氏气单胞菌特异性疫苗迫在眉睫。为了展开针对维氏气单胞菌疫苗的研发,本实验构建了维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株,检测了其毒力表达与免疫原性,为维氏气单胞菌疫苗的制备奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒 维氏气单胞菌野生株及  $\Delta exsA1$  敲除株、大肠杆菌 WM3064,具体见表 1。

表 1 实验菌株及质粒  
Tab. 1 Bacterial strains and plasmids used for test

菌株或质粒 Strain or plasmid	基因型或表型 Genotype or phenotype	来源 Source
维氏气单胞菌野生株	野生型,分离自发病鱼体	实验室保存
维氏气单胞菌 $\Delta exsA1$ 敲除株	<i>exsA1</i> 基因缺失菌株	本研究构建
大肠杆菌 WM3064	野生型,用于感受态制备	实验室保存
质粒 Plasmid		
自杀质粒 pRE112	穿梭质粒,含 <i>sacB</i> 基因,氯霉素(Cm)抗性	实验室保存

1.2 实验动物 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼苗购自海南宝路水产科技有限公司文笔峰养殖基地,养殖至实验用大小,规格为(10±1)g 和(50±1)g。

1.3 主要试剂 限制性核酸内切酶及其 Buffer 缓冲液购自 NEB 公司;T4 DNA Ligase 及其 Buffer 缓冲液购自 Monad 公司;Rapid Taq Master Mix (2×)、Phanta Max Master Mix、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 等皆购自 Vazyme 公司;罗非鱼免疫球蛋白 M(IgM)酶联免疫分析试剂盒测定购自江苏酶免实业有限公司。培养基(酵母提取粉、胰蛋白胨、琼脂糖、琼脂粉)购自 Oxoid 公司;二氨基庚二酸(Dap)购自 Sigma 公司;氯霉素购自北京索莱宝科技有限公司;各种无机盐等购自西陇科学股份有限公司;氨苄青霉素(Amp)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.4 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  基因敲除株的构建 分析 *exsA1* 基因及其上下游基因,选择上下游同源臂并设计其敲除扩增引物 *exsA1-F<sup>1</sup>/R<sup>1</sup>*、*exsA1-F<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>* 和敲除验证引物 *exsA1-F<sup>0</sup>/R<sup>0</sup>*;在敲除扩增引物中添加内切酶 BstXI 酶切位点,并在该位点中间添加限制性内切酶 KpnI 和 SacI 的识别序列,两同源臂之间添加 EcoR I 的酶切位点(表 2)。提取维氏气单胞菌基因组,用敲除引物扩增上下游同源臂并纯化回收。将上下游同源臂片段用 BstXI 和 EcoR I 酶切,pRE112 质粒用 KpnI 和 SacI 酶切,并连接得到重组质粒,再将连接产物电转进入大肠杆菌 WM3064 感受态细胞中复苏培养,菌落 PCR 验证,筛选出阳性菌株。将筛选到的阳性菌株和维氏气单胞菌野生株分别培养至对数期,再按照(1:2)、(1:3)和(3:1)的比例混合为 1 mL,6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min 后,留 30  $\mu$ L 菌液滴入无抗的 Dap 的 LB 平板上,30  $^{\circ}$ C 培养 30 h,将重组质粒利用双亲接合的方式转入维氏气单胞菌野生株中。取 50  $\mu$ L 接合后,将菌液涂布于 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 氨苄青霉素、50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 氯霉素的 LB 平板上,30  $^{\circ}$ C 培养过夜。菌落 PCR 验证是否是维氏气单胞菌、是否有重组质粒。将阳性菌株通过 8% 蔗糖筛选,挑取筛选后的单菌落,使用敲除验证引物 *exsA1-F<sub>0</sub>/R<sub>0</sub>* 菌落 PCR 验证,对得到的阳性菌株用敲除引物进行 PCR 扩增,对产物进行了切胶回收后送样测序。

1.5 细菌生长曲线测定 分别挑取维氏气单胞菌野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株单菌落,置于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中,30  $^{\circ}$ C、200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养。紫外分光光度计中测定其  $OD_{600}$  值,然后将各菌株菌液

表2 敲除株构建引物

Tab. 2 Nucleotide sequences of primers used for construction of deletion mutants

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequences
<i>A.veronii</i> C4-F	ATGGTCGCAGAGCTTGTC
<i>A.veronii</i> C4-R	CAGCACAATAGAACACCAGAC
<i>exsA1</i> -F <sup>1</sup>	CTGCAGAACCAGGTACCTGGCACACCATTAAGTCTGAGTC
<i>exsA1</i> -R <sup>1</sup>	CTGCAGAACCAGAATTCTGGGAATCTGCGTGTAGTACCAG
<i>exsA1</i> -F <sup>2</sup>	CTGCAGAACCAGAATTCTGGCCAGGTCGAGCGGTTGCAAC
<i>exsA1</i> -R <sup>2</sup>	CTGCAGAACCAGAGCTCTGGCTGTGCCGTGTCGGGCACGG
<i>exsA1</i> -F <sup>0</sup>	CTGCTTGTGACTGTTGTAGG
<i>exsA1</i> -R <sup>0</sup>	GCTATGCCTTGCTCATCTTG
pRE112-F	ACATAGCCCCACTGTTCGT
pRE112-R	TTTTTCGTCTCAGCCAATCC

稀释至  $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 分别吸取 100  $\mu$ L 稀释液于 96 孔板相应位置, 无菌新鲜的 LB 液体培养基作为对照。将 96 孔板置于多功能酶标仪中, 设置程序: 温度恒定 30  $^{\circ}$ C, 持续振板, 共测定 36 h, 每 30 min 测定 1 次  $OD_{600}$  值。

**1.6 罗非鱼的感染** 将维氏气单胞菌野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 30  $^{\circ}$ C、200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养, 紫外分光光度计中测定其  $OD_{600}$  值后, 取  $OD_{600}=1$  的菌液, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min 后去上清, 用无菌的 0.9% 生理盐水重悬, 定容至  $2 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 即为感染液。感染方法: 将罗非鱼养殖到 (10 $\pm$ 1) g 后, 每组平均分 20 条。接种感染液, 按照 10  $\mu$ L·g<sup>-1</sup> 体质量的注射量对罗非鱼进行腹腔注射攻毒。持续观察 1 周, 统计各组每天的死亡数。

**1.7 血清 IgM 含量检测** 选取长势和大小相近 (50 $\pm$ 1) g 的罗非鱼, 平均分为 3 组, 即空白对照组、野生株感染组和  $\Delta exsA1$  敲除株感染组, 并适应性饲养 1 周。将维氏气单胞菌野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株单菌落接种于 LB 液体培养基过夜培养后, 配置成上述感染液并稀释 10 倍, 得  $2 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 菌液。对罗非鱼进行腹腔注射攻毒实验, 无菌 0.9% 生理盐水为对照。9 天后再次攻毒同一组罗非鱼, 分别在攻毒后第 2 天、第 4 天和第 6 天抽取罗非鱼血液。将血液室温静置 30 min, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 吸取上清 (罗非鱼血清) 装入干净 1.5 mL EP 管中, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。采用罗非鱼免疫球蛋白 M (IgM) 酶联免疫分析试剂盒测定罗非鱼血清中 IgM 含量。试剂盒应用双抗原夹心法测定标本中 IgM 水平。固相抗原先与 IgM 结合, 再与 HRP 标记的抗原结合, 形成抗原-抗体-酶标抗原复合物, 最后加底物 TMB 显色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 ( $OD$  值), 通过标准曲线计算样品中 IgM 浓度。

**1.8 减毒株对罗非鱼的免疫保护率测定** 将罗非鱼养殖到 (10 $\pm$ 1) g 后, 分为攻毒对照组、减毒株接种组和接种对照组, 每组 40 条。培养维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株, 配置成浓度为  $2 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 的注射液。按照 10  $\mu$ L·g<sup>-1</sup> 体质量的注射量对罗非鱼进行腹腔注射, 接种对照组注射无菌 0.9% 生理盐水。9 d 后重复上述接种步骤。2 次免疫注射结束后, 用  $2 \times 10^9$  CFU·mL<sup>-1</sup> 的野生菌株攻毒减毒株接种组和接种对照组, 同等接种量的无菌生理盐水接种攻毒对照组, 记录各组罗非鱼每天的死亡个数, 计算累计死亡率。

## 2 结果与分析

**2.1 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株的构建** 通过同源双交换法, 设计特异性引物、重组载体构建以及细菌接合和筛选, 成功构建维氏气单胞菌 *exsA1* 敲除株, 使用敲除验证引物 *exsA*-F<sup>0</sup>/R<sup>0</sup> 进行对敲除菌株进

行 PCR 验证(图 1), 由图 1 可见, 野生菌株使用  $exsA$ -F<sup>0</sup>/R<sup>0</sup> 引物进行克隆时, PCR 产物大小为 1 100 bp; 由于在维菌中存在 2 个拷贝的  $exsA$ ,  $\Delta exsA1$  缺失突变体的 PCR 产物除了有 600 bp 的  $exsA1$  缺失片段外, 还有 1 100 bp 的野生型克隆产物。将敲除片段切胶回收后, 送样品至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果显示  $exsA1$  已成功缺失。因此, 将该菌株命名为维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除菌株。

**2.2 维氏气单胞菌野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株生长曲线** 测定维氏气单胞菌 C4 野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株丰富培养下的生长曲线并作图(图 2), 由图 2 可见, 在 LB 液体培养基中, 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株与 C4 野生株在潜伏期时无差异, 在对数期和稳定期敲除株的生长量略微低于野生株, 但整体相比生长速度不存在显著差异。这说明  $exsA1$  基因对维氏气单胞菌的生长没有明显影响。

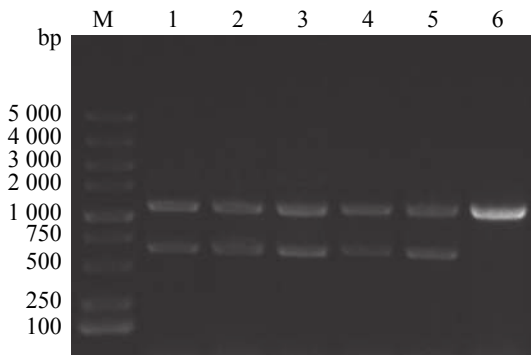


图 1 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除株 PCR 验证

M: DL 5000 DNA marker; 1, 2, 3, 4, 5:  $\Delta exsA1$  敲除株; 6: 野生株。

Fig. 1 PCR verification of *Aeromonas veronii*  $\Delta exsA1$  mutant strains

M: DL 5000 DNA Marker; Lanes 1, 2, 3, 4, 5:  $\Delta exsA1$  mutant strains; Lanes 6: Wild strains.

**2.3  $exsA1$  基因影响维氏气单胞菌毒力** 采用腹腔注射的方法对罗非鱼进行攻毒, 统计结果见图 3。由图 3 可知,  $\Delta exsA1$  敲除株的感染能力相对于野生株的感染能力更弱。敲除株感染后罗非鱼在第 1 天的死亡率为 25%, 7 天内的死亡率为 30%; 而野生株感染后罗非鱼的第 1 天时, 死亡率就已达到 65%, 而第 3 天的死亡率达到 85%; 空白对照组在观察期内未出现死亡情况。这说明  $exsA1$  基因敲除后, 维氏气单胞菌的毒力减弱了, 即为维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  减毒株。

#### 2.4 罗非鱼接种维氏气单胞菌 $\Delta exsA1$ 减毒株后的 IgM 检测

采用非致死剂量的维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  减毒株, 对罗非鱼进行腹腔注射, 以验证  $\Delta exsA1$  减毒株对罗非鱼的免疫原性。罗非鱼 IgM 的标准曲线见图 4-A, 结果表明, 接种  $\Delta exsA1$  减毒株后, 罗非鱼体内的 IgM 得到累积。第 4 天时, IgM 的浓度达到  $3.81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 与野生株感染组的 IgM 累积量没有显著差异(图 4-B)。上述结果表明, 维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  减毒株可以在不致死的情况下, 诱导尼罗罗非鱼产生与野生型相同水平的免疫反应, 具有免疫原性。

**2.5 减毒株对罗非鱼的免疫保护率测定** 第 2 次接种疫苗的 9 d 后, 用高浓度的维氏气单胞菌野生型菌株( $2 \times 10^9$  CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ )攻毒, 测定其对罗非鱼鱼苗的免疫保护能力, 以验证维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  减毒株对罗非鱼的免疫保护效应。结果(图 5)表明, 对照组在攻毒后第 1 天的死亡率高达 95%, 并且在第 2 天全

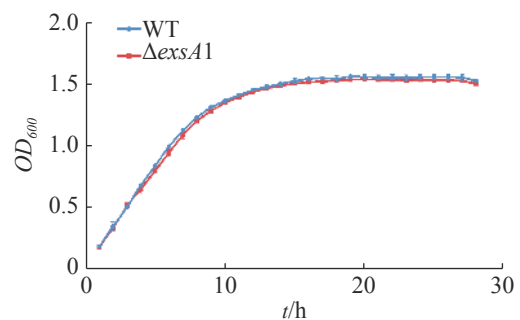


图 2 维氏气单胞菌野生株和  $\Delta exsA1$  敲除株生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *Aeromonas veronii* wild strains and  $\Delta exsA1$  mutant strains

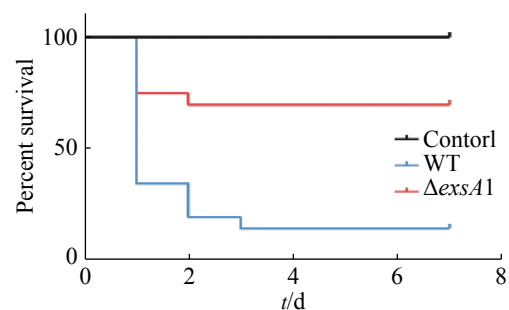


图 3 罗非鱼感染维氏气单胞菌野生株和敲除株后的生存情况

Fig. 3 Survival of tilapia infected with *Aeromonas veronii* wild strains and mutant strains



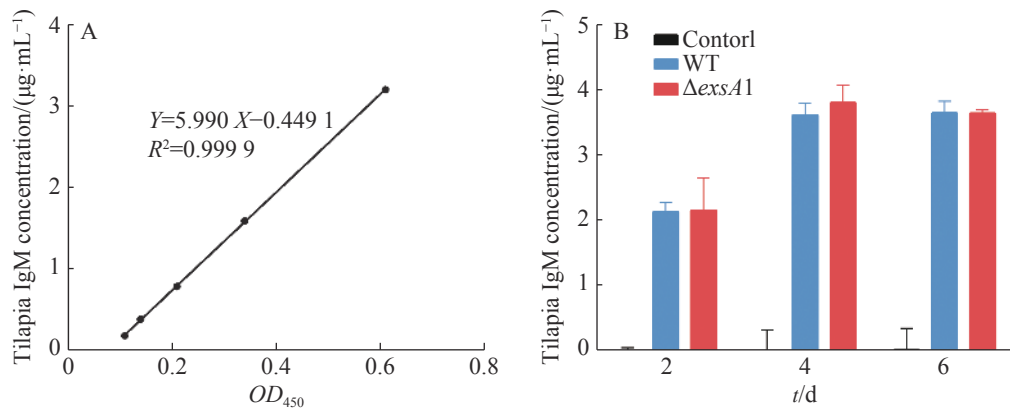


图4 罗非鱼接种 *exsA1* 减毒株后的免疫检测

A: 罗非鱼 IgM 标准曲线; B: 罗非鱼血清中 IgM 浓度。

Fig. 4 Immunoassay of tilapia inoculated with the  $\Delta exsA1$  attenuated strains

A: IgM standard curve of Tilapia; B: IgM concentration in tilapia serum.

部死亡; 减毒株接种组第4天的死亡率为30%, 整体下降了70%。这说明  $\Delta exsA1$  减毒株有开发成疫苗的潜力。

### 3 讨论

气单胞菌(*Aeromonas*)是革兰氏阴性菌, 是人、鱼、兽共患病原菌, 其广泛存在于包括海水在内的各种水域环境甚至土壤环境中<sup>[19]</sup>, 给国内渔业生产造成了巨大的经济损失。维氏气单胞菌引起淡水渔类的病例在逐年增加<sup>[20]</sup>, 但是一直没有得到足够的重视。

随着人们物质生活水平的不断提高, 对优质水产品的需求量快速增长, 导致渔业规模迅速扩大, 水产品产量得到迅速增加。不少养殖户为了追求经济利益, 增加水产品的放养密度, 导致养殖水质恶化, 造成水体的严重污染, 水产养殖病害大量爆发, 对水产养殖产生了巨大的影响<sup>[21]</sup>。防治水产病害的方法主要是生态防治、药物防治以及疫苗防治<sup>[22]</sup>。其中, 生态防治对养殖环境要求很高, 这会提高水产养殖的成本, 我国目前的养殖环境还难以达到。药物防治多以使用抗生素, 初期效果十分显著, 长期使用会导致出现多重耐药的水产病原菌, 使得药效越来越差, 水产病害越来越难以治疗。我国获得商品化生产的鱼用疫苗也已有7种, 但是我国水产养殖区域广, 而且水产病害种类繁多, 这些疫苗对不同病原菌的防治效果不一, 水产疫苗的种类是远远不够的, 所以针对各种水产病原菌的疫苗研发非常重要, 尤其维氏气单胞菌疫苗的研发更是如此。

本研究用同源重组双交换的方法, 构建维氏气单胞菌  $\Delta exsA1$  敲除型菌株, 并测定其生长曲线, 发现 *exsA1* 基因不会影响维氏气单胞菌的生长。罗非鱼腹腔注射感染实验, 证实  $\Delta exsA1$  敲除株的毒力确实下降。罗非鱼攻毒后 IgM 浓度检测, 证明维氏气单胞菌 *exsA1* 减毒株可以在非致死情况下引发罗非鱼的免疫反应, 并在体内产生较高浓度的特异性免疫因子 IgM 的累积。在高浓度野生株感染下,  $\Delta exsA1$  减毒株对罗非鱼的免疫保护率能达到70%, 结果表明,  $\Delta exsA1$  减毒株具有制备成疫苗的潜力。

一直以来, 对维氏气单胞菌感染的水产病害没有有效的治疗手段, 面对这种多重耐药的菌种, 制备有效的疫苗刻不容缓。本研究成功构建了具有良好宿主免疫原性的  $\Delta exsA1$  减毒株, 为制备维氏气单胞菌减毒活疫苗提供了可行的实践依据。

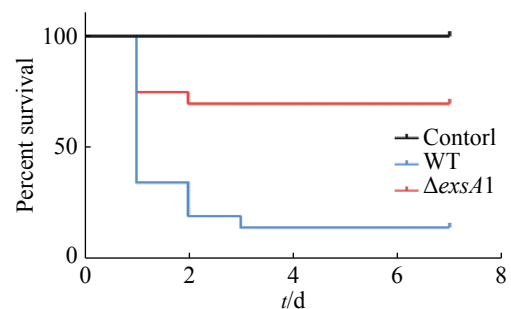


图5 维氏气单胞菌 *exsA1* 减毒株对罗非鱼的免疫保护率

Fig. 5 Immune protection rate of *Aeromonas veronii*  $\Delta exsA1$  attenuated strains against tilapia

## 参考文献:

- [1] 康元环, 张冬星, 杨滨僮, 等. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 452 – 459.
- [2] LIN D, GENG Y, WANG K, et al. *Aeromonas veronii* infection in cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in Southwest China [J]. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 2016, 68: 1 – 8.
- [3] ANAND T, BERA B C, VIRMANI N, et al. Isolation and characterization of a novel, T7-like phage against *Aeromonas veronii* [J]. *Virus Genes*, 2017, 54(1): 160 – 164.
- [4] 岑雪, 丁雪燕, 娄昆鹏, 等. 细菌分泌系统研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(3): 317 – 322+327.
- [5] COBURN B, SEKIROV I, FINLAY B B. Type III secretion systems and disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 535 – 549.
- [6] HAUSER AR, COBB E, BODI M, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Critical Care Medicine*, 2002, 30: 521 – 528.
- [7] ROY B A, SAVEL R H, RACINE S, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183: 1767 – 1774.
- [8] YU H Z, SHAW J G. Cross-talk between the *Aeromonas hydrophila* Type III secretion system and lateral flagella system [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1434.
- [9] GETZ L J, THOMAS N A. The Transcriptional regulator HlyU positively regulates expression of *exsA*, leading to Type III secretion system 1 activation in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00653 – 17.
- [10] TIAN Z Y, CHENG S, XIA B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ExsA regulates a metalloprotease, ImpA, that inhibits phagocytosis of macrophages [J]. *Infection & Immunity*, 2019, 87(12): 1 – 17.
- [11] S. S. S. DE S. J, KARIM H, APPUDURAI A, et al Genome sequencing and annotation of *Aeromonas veronii* strain Ae52, a multidrug-resistant isolate from septicemic gold fish (*Carassius auratus*) in Sri Lanka [J]. *Genomics Data*, 2017, 11: 46 – 48.
- [12] FLAJNIK M F, MILLER K, DU P L. *Fundamental Immunology*[M]. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003: 59 – 70.
- [13] 李春涛, 张其中, 曾伯平. 黄颡鱼 IgM 基因的个体发生和抗体的代间传递[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 638 – 643.
- [14] HANSEN J D, LANDIS E D, PHILLIPS R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(19): 6919 – 6924.
- [15] WILSON M, BENGTON E, MILLER N W, et al. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(9): 4593 – 4597.
- [16] 孙恒昌, 陈庭金, 黄艳, 等. 鱼用疫苗研究进展[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(12): 1651 – 1656.
- [17] 霍建强, 赵玲敏, 覃映雪, 等. 变形假单胞菌灭活疫苗研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2017, 22(4): 12 – 19.
- [18] 张永政, 李聪, 王世锋, 等. 海南罗非鱼源维氏气单胞菌的分离、毒力基因检测及 ERIC-PCR 分型[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2017, 35(3): 273 – 281.
- [19] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35 – 73.
- [20] 刘小芳, 任燕, 张德锋, 等. 鱼源气单胞菌的毒力基因检测、分型及致病力研究[J]. 水产学报, 2021, 45(3): 462 – 471.
- [21] 胡军娜, 马娟, 余炜. 水产养殖病害特点及防治技术[J]. 河南水产, 2019(4): 13 – 15.
- [22] 陈昌福. 为什么养殖鱼类的疾病越来越难以防控?[J]. 当代水产, 2020, 45(5): 67 – 68+70.

## Immunogenicity of *Aeromonas veronii* $\Delta$ *exsA1* Attenuated Strains

SHENG Qianglong, XU Yike, LIU Chaolun, LI Hong, MA Xiang, TANG Yanqiong, LIU Zhu

(School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** *Aeromonas veronii* is a gram-negative pathogen that infects humans terrestrial and aquatic animals. In gram-negative bacteria, *ExsA* can activate the type III secretion system and mediate cytotoxicity to the hosts. Our previous genomic analysis showed that *A. veronii* had two copies of *exsA* gene, suggesting that its virulence regulation might be mediated by *exsA* gene. In this study, the homologous recombination double exchange technology was applied to construct the *Aeromonas veronii*  $\Delta$ *exsA1* mutant strains, and the challenge experiment was carried out by means of intraperitoneal injection. The results showed that the virulence of *A. veronii* without *exsA1* was decreased significantly. After tilapia fish was inoculated with the  $\Delta$ *exsA1* attenuated strains and the wild strains, respectively, the accumulation level of immunoglobulin M (IgM) in the serum of fish was increased and reached its peak at the 4th day. The immune protection rate of  $\Delta$ *exsA1* attenuated strains against tilapia was 70% under the lethal dose of *A. veronii* wild strains. These results indicated that  $\Delta$ *exsA1* attenuated strains could induce the immune response of tilapia, which may lay a foundation for the further development of *A. veronii* as a live attenuated vaccine.

**Keywords:** *Aeromonas veronii*; virulence; immunoglobulin M; Immune protection rate

(责任编辑: 罗启香 责任编辑: 钟云芳)