



肌醇、唾液酸及岩藻糖代谢途径对嗜水气单胞菌致病性的影响

李首纲, 庞茂达, 董雨豪, 刘锦, 杨媛媛, 陆承平, 刘永杰*

南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】调查肌醇、唾液酸以及岩藻糖代谢途径在嗜水气单胞菌感染宿主过程中对细菌致病性的影响。【方法】采用同源重组技术分别缺失嗜水气单胞菌 NJ-35 株的肌醇代谢相关基因 *iolC*、唾液酸代谢相关基因 *nana* 和岩藻糖代谢相关基因 *fucK*, 测定各缺失株对斑马鱼的半数致死量(LD_{50}); 将野生株与缺失株共感染鲫鱼, 统计野生株和缺失株在不同组织中的细菌载量。【结果】各代谢相关基因的缺失均成功阻断了菌株对相应底物的降解能力。*iolC* 的缺失导致菌株对斑马鱼的 LD_{50} 升高近 12 倍, 而 *nana* 和 *fucK* 的缺失对 LD_{50} 没有明显影响。野生株与 *iolC* 缺失株共感染鲫鱼, 肝脏、脾脏和肾脏中野生株的载量显著高于缺失株, 表现出明显的生长优势; *nana* 和 *fucK* 缺失株与野生株共感染鲫鱼, 野生株和缺失株载量在各组织中均无明显差异。【结论】肌醇代谢途径在嗜水气单胞菌感染致病过程中发挥重要作用, 而唾液酸和岩藻糖代谢途径对细菌无明显影响。

关键词: 嗜水气单胞菌, 肌醇, 唾液酸, 岩藻糖, 代谢, 基因缺失, 致病性

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛分布于水环境中, 可引起鱼类出血性败血症, 也能导致其他哺乳动物甚至人类感染发病。大量研究表明, 该菌致病性与其产生的多种毒力因子如菌体表面蛋白、胞外分泌因子及一些调控系统等有关^[1]。然而, 庞茂达等^[2]研究发现, 许多嗜水气单胞菌流行菌株中并不含有已知的毒力因子如 III 型分泌系统和侧生鞭毛, 部分强毒株中也不含有 VI 型分泌系统, 表明这些毒力因子并不是决定菌株

毒力的关键因素。因此, 嗜水气单胞菌致病机制非常复杂, 值得进一步研究。

近年来, 细菌代谢能力与其致病力之间的关系已引起广泛重视。在对弧菌(*Vibrio*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等的研究中发现, 细菌的代谢基因在细菌感染宿主的过程中与经典的毒力因子同样重要^[3-6]。这些代谢途径的出现可能有利于细菌在不同的生存环境中更加有效地获取营养。对猪链球菌(*Streptococcus suis*)的研究发

基金项目: 国家自然科学基金(31372454); 江苏省农业科技自主创新项目[CX(17)2027]; 江苏省水产三新工程(D2017-3-1)

*通信作者。E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-10-10; 修回日期: 2017-12-18; 网络出版日期: 2018-01-12

现, 丝氨酸/苏氨酸激酶除了参与丝氨酸/苏氨酸的代谢, 还是一种中枢调节因子, 在细胞生长和分裂以及新陈代谢中起重要作用^[7]。本实验室前期研究发现, 嗜水气单胞菌流行菌株 NJ-35 有 3 条分别代谢肌醇、唾液酸和岩藻糖的途径, 并且比较基因组学分析表明, 这 3 条代谢途径只出现在强毒株中^[2]。因此, 推测这 3 条代谢途径的存在可能与嗜水气单胞菌的广泛流行有关。有鉴于此, 本研究采用缺失代谢相关基因的方法分别对肌醇、唾液酸以及岩藻糖代谢途径进行阻断, 研究这 3 条代谢途径在鱼体内对嗜水气单胞菌感染致病的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

嗜水气单胞菌 NJ-35 株、大肠杆菌 SM10, 由本实验室分离保存; 自杀性质粒 pYAK1、pMMB207, 由浙江大学方维焕教授馈赠。

1.2 试剂

PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA Marker、DNA Gel Purification Kit 均为大连 TaKaRa 公司产品; 细菌质粒提取试剂盒为 OMEGA 公司产品; 2×PCR PreMix 为南京诺唯赞公司产品; 肌醇、唾液酸和 L-岩藻糖均为 Sigma 公司产品; 氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kan)、庆大霉素(Gen)均为 Invitrogen 产品。M9 低盐培养基为青岛日水生物技术有限公司产品, 主要成分: Na_2HPO_4 (3.39%)、 KH_2PO_4 (1.50%)、 NaCl (0.25%)、 NH_4Cl (0.50%), 另外添加 3 mmol/L MgSO_4 和 0.12 mmol/L CaCl_2 , 不含葡萄糖。

1.3 试验动物

80 日龄左右的 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*)购自南京夫子庙宠物市场, 体长 2–3 cm, 体质量 3 g 左右。60 日龄左右的异育银鲫由江苏省水产养殖技术推广中心提供, 体长 10–12 cm, 体质量 25 g 左右。

1.4 引物设计

随机选择主路代谢途径相关基因 *iolC*、*fucK* 和 *nanA*, 进行基因缺失株构建, 相关引物信息见表 1。

1.5 基因缺失株构建

本研究中构建的基因缺失株均为缺失目的基因的完整开放阅读框, *iolC*、*nanA* 和 *fucK* 基因片段长度分别为 1878、900 和 1449 bp。参考文献[8]的方法, 以菌株 NJ-35 全基因组为模板, 用引物 p1/p2 和 p3/p4 分别扩增目的基因上、下游同源臂。通过融合 PCR 的方法, 以上、下游同源臂为模板, 使用 P1/P4 引物, 融合上下游同源臂。通过酶切、连接、转化将融合片段连接到 pYAK1 载体(宿主为大肠杆菌 SM10), 测序鉴定。

以含有重组质粒的大肠杆菌 SM10 为供体菌, 以嗜水气单胞菌 NJ-35 为受体菌, 通过接合的方式将重组质粒从大肠杆菌 SM10 转移到 NJ-35 中。具体操作: 供体菌 SM10 和受体菌 NJ-35 分别培养至对数期, 5000×g 离心 5 min 弃去上清, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 将两种菌浓度均调至 1.0×10^8 CFU/mL (OD_{600} 值为 0.2), 将 SM10 与 NJ-35 按照不同的比例(2: 1, 3: 1, 4: 1)充分混匀。将孔径为 0.22 μm 的无菌滤膜平铺在固体 LB 平板上, 取 200 μL 混合菌液点加在滤膜上, 将平板正放于 28 °C 培养箱中培养 16–24 h。

表 1. 本试验中使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Product length/bp	Function
iolC-p1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGGTGGGGGAGATTGAGC	595	Construction of iolC deletion mutant
iolC-p2	GTCGTCTCCAGCATATCACATCAAACCTGCTTT		
iolC-p3	TGTGATATGCTGGAGACGACAATGAGTGTG	574	Detection of iolC gene
iolC-p4	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCAGCAGCAACCCGACCTC		
iolC-p5	GAGGAGTTTCACATTGCGG	768	Detection of iolC gene
iolC-p6	GACCAGGCACTTCACCACA		
nanA-p1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAAAGCGAGCGATCACTAT	585	Construction of nanA deletion mutant
nanA-p2	GA		
nanA-p3	CTTTAGGCTCCGTTTAGATCTCCGTGAAGTA	454	Detection of nanA gene
nanA-p4	GATCTAAACGGAGCCTAAAGACGAAAT		
nanA-p5	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTTCTTCGTCTCCCTTGGCT	329	Detection of nanA gene
nanA-p6	ATGGAAAACTCTCCCGACTG		
fucK-p1	AAGAAGCAAGGACCAATCACC	364	Construction of fucK deletion mutant
fucK-p2	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCACTACCTGGTTTGCTCC		
fucK-p3	TTATGTGCGTAACAGATCCTTACAACGAATC	556	Detection of fucK gene
fucK-p4	AGGATCTGTTACGCACATAACGATATCCGTC		
fucK-p5	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCGCATTCTGCTCGCTACCTG	1246	Detection of fucK gene
fucK-p6	CAACGCTTTCAAGTTTGCTGT		
iolC-F	CACTGTCTGCTGCGGGCTC	1920	Construction of iolC complementation strain
iolC-R	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGGGCCGCGTGCGGTAG		
nanA-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTTATGCGTGTCCGCGCTC	942	Construction of nanA complementation strain
nanA-R	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGGAAAACTCTCCCGAC		
fucK-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCAGCGCTTAACCAAAAA	1491	Construction of fucK complementation strain
fucK-R	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGTCACAAGATGTTGTC		
Kan-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCATAGTGCAAATTCCTTA	855	Introduction of kanamycin resistance gene
Kan-R	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGAGCCATATTCAACGGGA		
Gen-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGAAAACTCATCGAGCATCAA	576	Introduction of gentamicin resistance gene
Gen-R	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGTTACGCAGCAGCAACGAT		
Gen-R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTTAGGTGGCGGTA		

Underlined sequences indicate *Bam*H I restriction sites.

用 1 mL 新鲜的 LB 将滤膜上的菌体吹打至离心管中, 5000×g 离心 5 min, 弃去上清, 用 200 μL LB 重悬后涂布于含有双抗(Amp 100 μg/mL, Cm 34 μg/mL)的 LB 平板上, 倒置于 28 °C 培养箱培养 36–48 h, 挑取单菌落于含有双抗的 LB 液体培养基中培养 8–10 h, 提基因组进行 PCR 验证, 筛选发生第 1 次同源重组的菌株, 即单交换菌株。

将单交换菌株转接至不含 NaCl 的 LB 培养基, 连续传代 2 次, 转接至含有蔗糖(浓度为 20%)的 LB 液体培养基中培养 30 h, 菌液 10 倍比稀释后涂布于含有蔗糖的 LB 固体培养基。培养 24 h

后, 挑取单菌落至普通 LB 液体培养基中培养 6–8 h, 提基因组并进行 PCR 验证, 筛选发生第二次同源重组并且丢失目的基因的菌株, 即基因缺失株。基因缺失株构建流程见图 1。

1.6 基因互补株构建

以 NJ-35 株基因组为模板, 用互补片段引物进行 PCR 扩增获得含有目的基因的 PCR 产物片段, 通过常规酶切、连接、转化将互补片段连接到质粒 pMMB207 (宿主为大肠杆菌 SM10)。以含有互补质粒的大肠杆菌 SM10 为供体菌, 以嗜水

气单胞菌 NJ-35 株基因缺失株为受体菌, 通过细菌接合(方法参考 1.5)将重组质粒转移至缺失株。接合完成后, 取出带菌滤膜, 用 1 mL 新鲜的 LB 将滤膜上的菌体吹打至离心管中, $5000\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用 200 μL 新鲜 LB 重悬后涂布于含有双抗(Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cm 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36–48 h, 挑取单菌落于含有双抗的 LB 液体培养基中培养 8–10 h, 提基因组进行 PCR 验证, 筛选含有互补质粒的菌株, 即基因互补株。

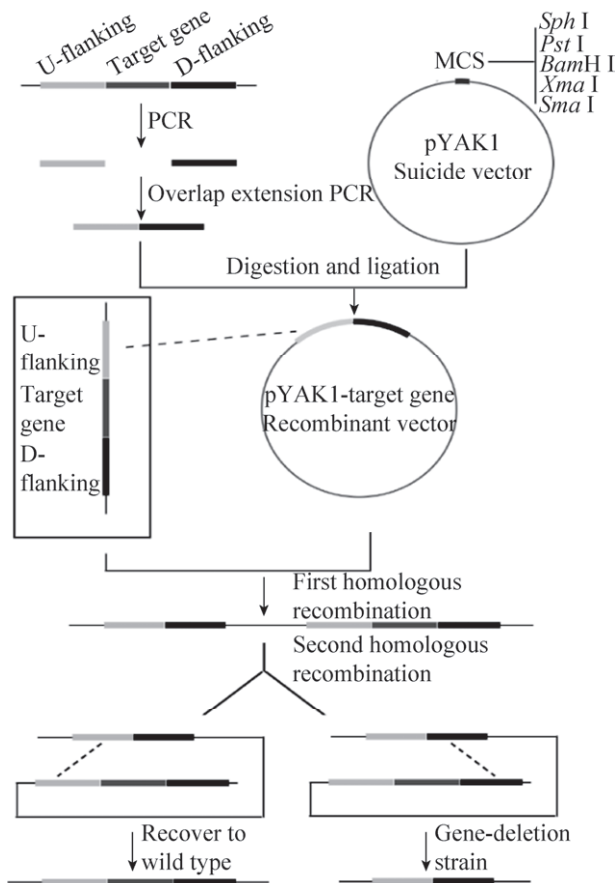


图 1. 基因缺失株构建示意图

Figure 1. Schematic diagram of the construction of gene deletion mutant. U-flanking and D-flanking represent for upstream and downstream flanking DNA sequence, respectively.

1.7 菌株抗性基因的引入

在野生株中引入 Kan 抗性基因, 在所有缺失株中分别引入 Gen 抗性基因。具体步骤如下, 以合成的目的抗性基因序列为模板, 用抗性基因引物进行 PCR 扩增获得含有抗性基因的 PCR 产物片段, 通过酶切、连接、转化将抗性基因连接到质粒 pMMB207 上, 利用含有与插入抗性基因相对应的抗生素(Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Gen 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)LB 平板进行筛选, 确定插入抗性基因有效后进行下一步试验。

分别以携带有重组质粒的大肠杆菌 SM10 为供体菌, 相应的嗜水气单胞菌为受体菌, 通过细菌接合(方法参考 1.5)将重组质粒转移至嗜水气单胞菌。接合完成后, 用无菌镊子取出带菌滤膜, 用 1 mL 新鲜的 LB 将滤膜上的菌体吹打至离心管中, $5000\times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 用 200 μL LB 重悬后涂布于含有双抗(Amp, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Kan, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 Amp, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gen, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36–48 h, 挑取单菌落于含有双抗的 LB 液体培养基中培养, 如果可以生长则菌株抗性基因引入成功。

1.8 菌株代谢能力的检测

分别挑取野生株、缺失株和互补株单菌落于液体 LB 培养基中培养, 待菌液浑浊后转接至新鲜的 LB 培养基中培养至对数期, $4000\times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 用 M9 培养基洗涤 2 次, 将菌浓度调至 5.0×10^8 CFU/mL (OD_{600} 值为 1.0), 混合均匀, 取 200 μL 菌液转接至装有 20 mL 新鲜 M9 培养基(添加代谢底物使其终浓度为 0.1%)的锥形瓶中, 每个样本设置 3 个重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养。每间隔特定的时间取 100 μL 菌液以无菌 PBS 缓冲液 10 倍比稀释, 稀释至合适浓度取 100 μL

稀释液涂布平板, 每个样品涂布 3 个稀释度, 将平板倒置于 28 °C 培养 16 h, 取菌落数为 30–300 的平板进行计数。

1.9 对斑马鱼半数致死量(LD₅₀)的测定

斑马鱼于室内暂养, 观察 1 周, 确认斑马鱼生长状态良好后进行试验。试验期间, 水温控制在 25–28 °C。分别挑取各菌株单菌落于液体 LB 培养基中培养, 待菌液浑浊后转接至新鲜的 LB 培养基中培养至对数期, 4000×g 离心 5 min, 弃去上清, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 依次调整菌液浓度至 5×10⁶、5×10⁵、5×10⁴、5×10³、5×10² CFU/mL。每个浓度设为一组, 腹腔注射斑马鱼, 每尾注射 0.02 mL, 同时以注射 PBS 作为空白对照组, 每组 10 尾。观察 1 周, 记录结果, 按照 Bliss 算法计算细菌 LD₅₀^[9]。

1.10 鲫鱼共感染试验

鲫鱼于室内暂养, 观察 1 周, 确认鲫鱼生长状态良好后进行实验。分别挑取引入抗性基因的野生株和缺失株单菌落于液体 LB 培养基中培养 6 h, 转接至新鲜的 LB 培养基中培养至对数期, 4000×g 离心 5 min, 弃去上清, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 分别将菌液浓度调整为 7×10⁶ CFU/mL, 将野生株与缺失株等体积均匀混合, 腹腔注射鲫鱼, 每组注射 5 尾, 每尾注射 0.1 mL。感染 24 h 后, 处死鲫鱼并在无菌条件下分别取出鲫鱼的心脏、肝脏、脾脏和肾脏, 记录脏器重量。将脏器分别放入含有钢珠的研磨管中, 然后每管加入 900 μL 的 PBS 缓冲液, 将研磨管置于生物样品均质仪 (Bioprep-24) 中, 运行程序将脏器研磨至均匀, 以无菌 PBS 缓冲液 10 倍比稀释, 取 100 μL 相同的组织稀释液分别涂布于含有 Kan (50 μg/mL) 和

Gen (20 μg/mL) 的 LB 平板, 利用不同的抗性平板区分筛选野生株和缺失株, 每个稀释梯度设置 3 个重复。将平板倒置于 28 °C 培养 16 h, 取菌落数为 30–300 的平板进行计数。按照公式(1)计算各脏器的细菌载量

$$CFU = \frac{n \times 10^x}{m} \quad \text{公式(1)}$$

n 为平板菌落数, x 为稀释梯度, m 为脏器重量, 将统计结果以对数(log₁₀)形式表示。

1.11 数据统计分析

应用 Graphpad prism 5 进行组织中细菌载量的统计分析, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著; 采用 χ^2 检验对斑马鱼的死亡率进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 基因缺失株及互补株 PCR 鉴定

重组缺失质粒、互补质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序后, 通过 NCBI 的 BLAST 功能在线比对确认序列正确无误。

分别用目的基因上下游同源臂引物 P1/P4、目的基因内部引物 P5/P6 对缺失株和互补株进行 PCR 验证, 结果显示缺失株中成功敲除了目的基因并且互补株目的基因成功回补, 见图 2。

2.2 菌株代谢能力的检测

在分别添加肌醇、唾液酸和岩藻糖作为唯一碳源的 M9 培养基中培养发现, 野生菌株 NJ-35 可以利用相应底物进行生长。各代谢途径关键基因的缺失均成功阻断了菌株对肌醇(图 3-A)、唾液酸(图 3-B)和岩藻糖(图 3-C)的利用, 各互补株也恢复了对相应底物的利用。

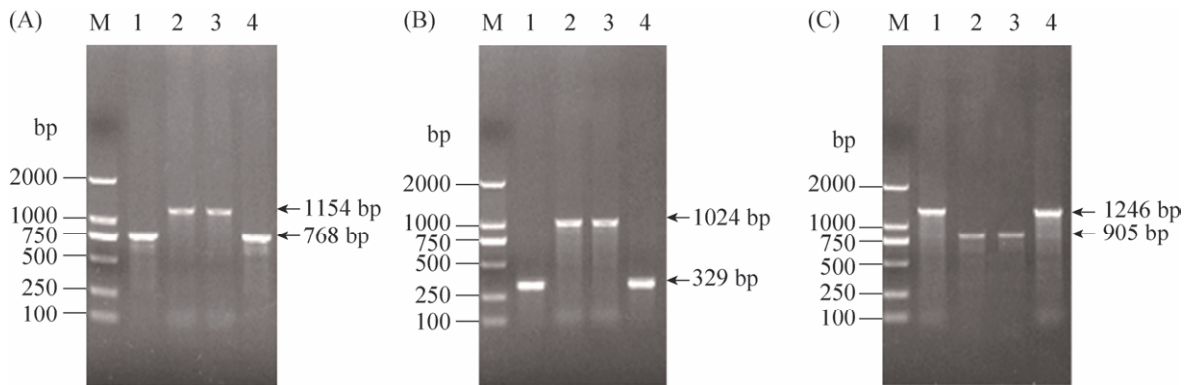


图 2. 基因缺失株及互补株鉴定

Figure 2. Identification of the gene-deleted and gene-complemented strains. M: Marker 2000; 1: wild strain, used p5/p6 as primer; 2: gene deleted strain, used p1/p4 as primer; 3-4: gene complemented strain; 3: used p1/p4 as primer; 4: used p5/p6 as primer. A: PCR identification of inositol metabolism key gene deletion strain $\Delta iolC$ and complementary strain $C\Delta iolC$; B: PCR identification of sialic acid metabolism key gene deletion strain $\Delta nanA$ and complementary strain $C\Delta nanA$; C: PCR identification of L-fucose metabolism key gene deletion strain $\Delta fucK$ and complementary strain $C\Delta fucK$.

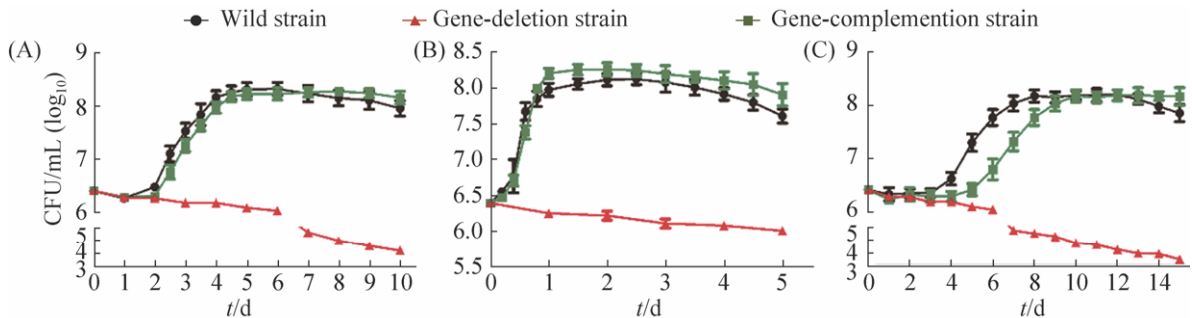


图 3. 基因缺失株及互补株在 M9 培养基中生长曲线

Figure 3. The growth curve of the gene-deleted and gene-complemented strains in M9 medium. A: supplemented with myo-inositol; B: supplemented with sialic acid; C: supplemented with L-fucose. Standard deviations were calculated from three independent experiments.

2.3 对斑马鱼的半数致死量

如表 2 所示,野生株 NJ-35 的 LD_{50} 值约为 2.15×10^2 CFU, 缺失株 $\Delta iolC$ 的 LD_{50} 值约为 2.59×10^3 CFU, 与野生株相比升高了约 12 倍, 然而, 唾液酸和岩藻糖代谢关键基因的缺失对斑马鱼的致病力并无明显影响, 缺失株 $\Delta nanA$ 和 $\Delta fucK$ 的 LD_{50} 分别为 4.39×10^2 CFU 和 3.34×10^2 CFU。

为验证 $iolC$ 缺失所引起的毒力差异是否具有统计学意义, 进一步开展了斑马鱼死亡率测定,

如表 3 所示, 当注射剂量为 2.15×10^2 CFU 时, 野生株和缺失株 $\Delta iolC$ 所致斑马鱼的死亡率分别为 47.6% (20/42) 和 23.8% (10/42), 经卡方分析得出 $\chi^2=5.18$, 查阅卡方值临界表确定在此注射剂量时有 97% 的可信度野生株和缺失株对斑马鱼的致死率有差异; 当注射剂量为 2.59×10^3 CFU 时, 死亡率分别为 71.4% (30/42) 和 45.2% (19/42), $\chi^2=5.92$, 同样确认有 97% 的可信度野生株和缺失株对斑马鱼的致死率有差异, 说明肌醇代谢关键基因 $iolC$ 的缺失减弱了菌株对斑马鱼的致病力。

表 2. 半数致死量统计试验

Table 2. The statistical of half-lethal dose

Dose of challenge CFU/(0.02 mL)	Number of death/total			
	WT	$\Delta iolC$	$\Delta nanA$	$\Delta fucK$
10^1	3/10	2/10	2/10	2/10
10^2	4/10	3/10	3/10	4/10
10^3	6/10	3/10	6/10	5/10
10^4	8/10	6/10	7/10	7/10
10^5	9/10	8/10	10/10	10/10
LD_{50} value	2.15×10^2	2.59×10^3	4.39×10^2	3.34×10^2

表 3. $\Delta iolC$ 对斑马鱼的致死率Table 3. Mortality of $\Delta iolC$ for zebrafish

Dose of challenge CFU/(0.02 mL)	Strains	Death	Survival	Mortality rate/%	χ^2
2.15×10^2	WT	20	22	47.6	5.18
	$\Delta iolC$	10	32	23.8	
2.59×10^3	WT	30	12	71.4	5.92
	$\Delta iolC$	19	23	45.2	

2.4 鲫鱼共感染试验

野生株和肌醇代谢关键基因缺失株 $\Delta iolC$ 共感染 24 h 后, 统计各脏器中的细菌载量, 在肝脏 ($P=0.0327$)、脾脏 ($P=0.0363$) 和肾脏 ($P=0.0421$) 中野生株和缺失株的载量有显著差异 ($P<0.05$), 野生株表现出明显的生长优势, 而在心脏中野生株载量稍高于缺失株载量, 但差异不显著 ($P=0.3588$) (图 4-A)。野生株和唾液酸代谢关键基因缺失株 $\Delta nanA$ 共感染 24 h 后, 分析各脏器中的野生株和缺失株载量发现, 野生株稍高于缺失株载量, 统计学分析差异不显著 ($P>0.05$) (图 4-B)。野生株和岩藻糖代谢途径关键基因缺失株 $\Delta fucK$ 共感染 24 h 后在脏器中没有表现出明显的生长差异 (图 4-C)。

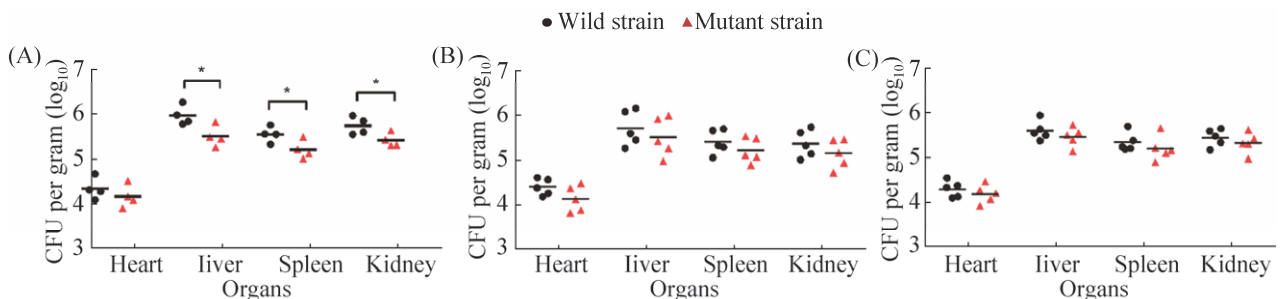


图 4. 各组织脏器中细菌载量

Figure 4. The bacterial loads of different tissues. A: Coinfection of the wild type and $\Delta iolC$ strains; B: Coinfection of the wild type and $\Delta nanA$ strains; C: Coinfection of the wild type and $\Delta fucK$. *: represents significantly statistical difference ($P<0.05$).

3 讨论

研究证实, 病原菌特有的代谢能力有利于其在宿主内的定植, 并能够增强病原菌的致病力^[3-6]。病原菌的特定代谢能力可以被视为一种广义上的毒力因子——营养毒力(nutritional virulence)^[10]。只有在宿主体内成功获得营养物质的细菌才能生存

及增殖, 从而引起机体发病。因此, 将病原菌的代谢能力与传统意义上的毒力因子放在同等重要的地位上去研究, 才能真正阐明病原菌的致病机制。

肌醇是一种水溶性维生素, 通常以磷酸盐的形式存在于自然界中。由于肌醇是机体内脂类代谢的必需维生素, 常添加于鱼、虾和畜禽饲料中。在一些鱼类动物组织内肌醇的含量与日粮中肌醇

的添加量成正相关。Kohler 等^[11]研究证明肌醇代谢有利于中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 在苜蓿中的定植, 基因 *iolA* 不仅参与肌醇的代谢, 同时也是缬氨酸代谢所必需的; Manske 等^[12]在嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*) 中的研究发现, 肌醇代谢途径阻断菌株被亲本株从阿米巴原虫体内竞争排除。此外, 有研究表明, 肌醇代谢在一些真菌如白色念珠菌(*Candida albicans*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*) 感染过程中对毒力的发挥具有重要的作用^[13-15]。*iolC* 编码 2-脱氧-5-脱氢葡萄糖激酶, 负责催化 2-脱氧-5-酮基-D-葡萄糖酸的磷酸化, 是肌醇代谢途径中的一个关键基因。本试验缺失嗜水气单胞菌 NJ-35 的 *iolC* 基因后发现, 缺失株在鲫鱼体内表现出明显的生长劣势, 且对斑马鱼的致病力明显减弱, 推测可能是由于肌醇代谢途径的阻断限制了菌株增殖。当然, 也不能排除 *iolC* 对其他生长或毒力相关基因有调控作用的可能性, 需要进一步研究。另外, 嗜水气单胞菌在不同组织中生长能力不同, 特别是在心脏, *iolC* 缺失株和野生株细菌载量差异并不显著, 可能是由于肌醇在心脏中的含量不高, 导致生长差异不明显所致, 这一推测尚需进一步证实。

唾液酸常以游离态的唾液酸、唾液酸衍生物或同系物的形式广泛分布于动物体内。已有研究表明, 许多菌株都可以利用唾液酸代谢途径降解唾液酸作为能量来源^[16]。唾液酸代谢可以为乳酸杆菌(*Lactobacillus sakei*) 在含有唾液酸的肉质中提供竞争优势^[17]。口服唾液酸酶抑制剂可以抑制大肠杆菌和恶臭拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*) 在肠道内的生长^[18]。L-岩藻糖是黏膜糖类复合物的组成成分, 在人体肠道内作为潜在的肠道微生物结合位点^[19-20]。在空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*) 中

的研究显示^[21-22], 缺失岩藻糖通透酶导致菌株在仔猪肠道中表现出竞争劣势; 而在雏鸡共生模型中却没有表现出生长差异, 但当在雏鸡膳食中补充有岩藻糖时, 野生株则表现出了竞争优势。*nana* 编码 N-乙酰神经氨酸裂解酶, 负责唾液酸代谢的第一步反应, 是唾液酸代谢途径的一个关键基因; *fucK* 编码 L-果糖激酶, 负责催化 L-墨角藻糖的磷酸化, 是 L-岩藻糖代谢途径中的一个关键基因。在本试验中, 菌株 NJ-35 可以利用唾液酸和 L-岩藻糖作为唯一碳源进行生长, 然而动物试验结果显示, 无论是对斑马鱼的半数致死量还是鲫鱼体内共感染后的细菌载量, 缺失株与野生株相比均无明显的生长和毒力差异, 推测这一结果可能是由于体内可利用的唾液酸或岩藻糖在组织内含量过低, 不足以支持菌株在生长上表现出差异; 或者动物组织内营养丰富, 代谢途径多样, 唾液酸或岩藻糖代谢途径的阻断不足以影响细菌对碳源和能量等的摄取。具体原因尚不清楚, 需进一步研究。

另外, 从细菌生长曲线可以看出, 菌株 NJ-35 对这 3 种代谢底物的利用效率明显不同, 推测这一结果可能是由于细菌在长期进化过程中由于所处的营养环境不同, 针对某种碳源形成了一种能量偏嗜^[23-24]。

综上, 肌醇代谢在嗜水气单胞菌 NJ-35 感染宿主的过程中为菌株在体内增殖提供了竞争优势, 而唾液酸和岩藻糖代谢途径作用不明显。目前, 对嗜水气单胞菌体内代谢能力的研究国内外报道较少, 有很多基础数据特别是肌醇、唾液酸和岩藻糖在组织中的含量等并不清楚。未来从代谢适应性的角度揭示嗜水气单胞菌致病机理, 将为该菌感染的防控提供新的思路。

参考文献

- [1] Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiology*, 2012, 2012: Article ID 256261.
- [2] Pang MD, Jiang JW, Xie X, Wu YF, Dong YH, Kwok AHY, Zhang W, Yao HC, Lu CP, Leung FC, Liu YJ. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9833.
- [3] Moravec AR, Siv AW, Hobby CR, Lindsay EN, Norbash LV, Shults DJ, Symes SJK, Giles DK. Exogenous polyunsaturated fatty acids impact membrane remodeling and affect virulence phenotypes among pathogenic *Vibrio* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22): e01415–17.
- [4] Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A, Genah S, Banin E, Visca P, Imperi F. The ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(22): e00472–17.
- [5] Schoen C, Kischkies L, Elias J, Ampattu BJ. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 114.
- [6] Rohmer L, Hocquet D, Miller SI. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 2011, 19(7): 341–348.
- [7] Zhang CY, Sun W, Tan MF, Dong MM, Liu WQ, Gao T, Li L, Xu ZF, Zhou R. The eukaryote-like serine/threonine kinase STK regulates the growth and metabolism of zoonotic *Streptococcus suis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 66.
- [8] Pang MD, Xie X, Dong YH, Du HC, Wang NN, Lu CP, Liu YJ. Identification of novel virulence-related genes in *Aeromonas hydrophila* by screening transposon mutants in a *Tetrahymena* infection model. *Veterinary Microbiology*, 2017, 199: 36–46.
- [9] Hu M, Pan ZH, Lu CP, Liu YJ. Biological characterization of epidemic *Aeromonas hydrophila* strains. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(5): 441–445. (in Chinese)
胡萌, 潘子豪, 陆承平, 刘永杰. 嗜水气单胞菌流行菌株的生物学特性. *中国兽医科学*, 2013, 43(5): 441–445.
- [10] Abu Kwaik Y, Bumann D. Microbial quest for food *in vivo*: ‘nutritional virulence’ as an emerging paradigm. *Cellular Microbiology*, 2013, 15(6): 882–890.
- [11] Kohler PRA, Choong EL, Rossbach S. The RpiR-like repressor IolR regulates inositol catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5155–5163.
- [12] Manske C, Schell U, Hilbi H. Metabolism of *myo*-inositol by *Legionella pneumophila* promotes infection of amoebae and macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(16): 5000–5014.
- [13] Chen YL, Kauffman S, Reynolds TB. *Candida albicans* uses multiple mechanisms to acquire the essential metabolite inositol during infection. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2793–2801.
- [14] Wang Y, Liu TB, Delmas G, Park S, Perlin D, Xue CY. Two major inositol transporters and their role in cryptococcal virulence. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(5): 618–628.
- [15] Xue CY, Liu TB, Chen L, Li WJ, Liu I, Kronstad JW, Seyfang A, Heitman J. Role of an expanded inositol transporter repertoire in *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction and virulence. *mBio*, 2010, 1(1): e00084–10.
- [16] Almagro-Moreno S, Boyd EF. Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9(1): 118.
- [17] Anba-Mondoloni J, Chaillou S, Zagorec M, Champomier-Vergès MC. Catabolism of *N*-acetylneuraminic acid, a fitness function of the food-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*, involves two newly characterized proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(6): 2012–2018.
- [18] Huang YL, Chassard C, Hausmann M, von Itzstein M, Hennet T. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nature Communications*, 2015, 6: 8141.
- [19] Sampson EM, Bobik TA. Microcompartments for B12-dependent 1,2-propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2966–2971.
- [20] Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal*, 2004, 384(2): 307–316.
- [21] Muraoka WT, Zhang QJ. Phenotypic and genotypic evidence for L-fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(5): 1065–1075.
- [22] Stahl M, Friis LM, Nothaft H, Liu X, Li JJ, Szymanski CM, Stintzi A. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(17): 7194–7199.
- [23] Puentes-Téllez PE, van Elsas JD. Sympatric metabolic diversification of experimentally evolved *Escherichia coli* in a complex environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(3): 565–576.
- [24] Houot L, Watnick PI. A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(1): 311–320.

Effects of myo-inositol, sialic acid and L-fucose metabolic pathways on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* strain NJ-35

Shougang Li, Maoda Pang, Yuhao Dong, Jin Liu, Yuanyuan Yang, Chengping Lu, Yongjie Liu*

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the effect of inositol, sialic acid, and L-fucose metabolic pathways on pathogenicity in the process of *Aeromonas hydrophila* infection. [Methods] By homologous recombination technology, the genes associated with myo-inositol, sialic acid and L-fucose metabolism, *iolC*, *fucK* and *nanA*, were inactivated. Then fifty percent lethal doses (LD_{50}) of the deletion mutants were determined in zebrafish and the bacterial loads in different tissues were assayed in crucian carp co-infected with the wild-type and its derivative mutant strains. [Results] The inactivation of all the three metabolic genes successfully blocked the ability of *A. hydrophila* to degrade the corresponding substrates. Deletion of *iolC* resulted in a nearly 12-fold increase in LD_{50} in zebrafish, whereas deletion of *nanA* and *fucK* had no significant effect on LD_{50} . The bacterial loads of the wild strain were significantly higher than that of the *iolC* deletion strain in liver, spleen and kidney after co-infection, indicating an obvious competitive growth advantage of the wild strain. But for *nanA* and *fucK* mutant strains, after co-infection with the wild strain, there was no significant difference in bacterial loads of the wild-type and its derivative mutant strains in different tissues. [Conclusion] The inositol metabolic pathway plays an important role during *A. hydrophila* infection, while sialic acid and L-fucose metabolic pathways have no significant effect on the pathogenicity of this bacterium.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, myo-inositol, sialic acid, L-fucose, metabolism, gene deletion, pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372454), by the Independent Innovation Fund of Agricultural Science and Technology in Jiangsu Province [CX(17)2027] and by the Aquatic Three New Projects in Jiangsu Province (D2017-3-1)

*Corresponding author. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

Received: 10 October 2017; Revised: 18 December 2017; Published online: 12 January 2018