

拟态弧菌的绿色荧光蛋白标记及其 在感染草鱼体内的动态分布

高会会, 侯立婷, 李瑾年*, 黄安宁

(安徽农业大学动物科技学院, 人兽共患病重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为了示踪研究拟态弧菌感染草鱼的动态过程, 将增强型绿色荧光蛋白编码基因 *EGFP* 克隆至质粒 pBAD24, 并转化到拟态弧菌 04-14 菌株构建荧光标记重组菌。重组菌经阿拉伯糖诱导后, 能高效表达 *EGFP* 蛋白; 荧光显微镜观察和流式细胞仪检测均发现重组菌能够发出明显的绿色荧光信号, 且传至 30 代后质粒稳定率仍为 100%; 生物学特性检测结果显示, 与野生株相比, 重组菌的形态、生长特性和细胞黏附性均未发生明显改变。用标记重组菌浸泡感染草鱼, 定点采集鳃、肠道、肌肉、头肾、脾脏和肝脏, 借助荧光信号检测 4 d 内细菌在不同组织脏器中的动态分布。结果发现感染 4 h 后即可在肠道和鳃中检测到绿色荧光信号, 标记菌检出量分别为 3.60×10^8 和 2.36×10^6 CFU/g, 直至 10 h, 其含量无明显变化, 12 h 后含菌量逐渐下降, 但持续存在直至鱼死亡。标记菌在肌肉、头肾、脾脏和肝脏中呈现相似的动力学, 感染 24 h 后才检测到荧光信号, 24 ~ 85 h 时间段含菌量呈现先增加后下降的变化, 48 h 达到峰值, 检出量分别为 9.58×10^4 (肌肉)、 8.75×10^4 (头肾)、 1.50×10^4 (脾脏) 和 4.50×10^4 CFU/g (肝脏), 但均低于肠道中的检出量, 结果表明肠道是拟态弧菌黏附定植与繁殖的主要靶器官。

关键词: 草鱼; 拟态弧菌; 增强型绿色荧光蛋白; 动态分布

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

自 Thune 等^[1]首次报道拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 造成养殖克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 大量死亡以来, 国内外学者对其致病性进行了广泛研究, 明确该菌是人和水生动物共患病病原菌, 不仅可以引起多种水产养殖动物的腹水病暴发流行, 给水产养殖业带来经济损失, 而且可通过水产品导致人类食物中毒^[2-4]。为了有效地预防和控制腹水病的发生与传播, 研究拟态弧菌在感染鱼体内的动态分布规律, 深刻认识其致病机理显得尤为重要。

细菌标记技术使用标记物标记细菌, 以实现目标细菌的识别, 从而达到对其定位及示踪的目的。目前该技术广泛应用于细菌移位、细菌感染宿主的动态过程以及细菌与宿主相互作用等研究领域^[5-7]。1962 年 Shimomura^[8]首次在维多利亚

亚多管发光水母 (*Aequorea victoria*) 中发现一种在蓝紫光激发下发出绿色荧光的蛋白质 (green fluorescent protein, GFP), 该蛋白具有基因小、构象稳定、直接肉眼检测荧光、对细胞无毒性等优点。增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 是 GFP 的优良改造品, 所产生的荧光强度较 GFP 提高 35 倍, 荧光更加稳定持久。大量研究资料显示, GFP 和 EGFP 均是理想的荧光标记物, 可实现在体内实时检测细菌, 跟踪病原菌感染的动态过程^[9], 已被用于嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和嗜齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*) 等水产养殖动物病原菌的研究^[10-15]。

收稿日期: 2014-12-03 修回日期: 2015-01-08

资助项目: 国家自然科学基金 (31272696); 安徽农业大学学科学位点建设专项 (XKXWD2013006)

通信作者: 李瑾年, E-mail: lijinnian2000@163.com

近年来,本实验室一直开展拟态弧菌病原学研究。明确该菌的致病性是黏附素、肠毒素、溶血素等多种毒力因子共同作用的结果;探明外膜蛋白 U(OmpU)是该菌的重要黏附素,通过介导细菌黏附参与致病作用^[16-17]。但是拟态弧菌在感染鱼体内的主要黏附定植与繁殖器官以及 OmpU 的互作蛋白仍不清楚。对此,本研究在使用增强型绿色荧光蛋白标记拟态弧菌的基础上,通过绿色荧光信号示踪拟态弧菌在感染草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 体内的动态分布情况,确定其主要黏附定植与繁殖器官,为进一步研究 OmpU 的互作蛋白,阐明拟态弧菌对草鱼的感染机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

拟态弧菌 04-14 菌株由本实验室从患腹水病草鱼体内分离、鉴定并保存;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 Top10、质粒提取纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和 LB 培养基均购自北京天根生化科技有限公司; pBAD24 和 pEGFP-N1 载体由本实验室保存;鲤 (*Cyprinus carpio*) 上皮瘤细胞 (EPC) 购自上海海洋大学农业部渔业动植物病原库;草鱼 (50 ± 5) g/尾购自安徽肥东县某渔场。

1.2 重组表达质粒 pBAD24-EGFP 的构建

以质粒 pEGFP-N1 为模板,用 *EGFP* 基因的特异性引物 (F1: 5'-CGGGAATTCATGGTGAG-CAAGGGCG-3'; R1: 5'-CGCCTGCAGTTACTTG-TACAGCTCGTCCA-3'; 下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切位点,预期扩增片段长度为 720 bp) 按常规 PCR 方法扩增 *EGFP* 基因。PCR 纯化产物和表达载体 pBAD24 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后,用 T_4 连接酶连接过夜,将连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞,经氨苄抗性筛选,挑取阳性单菌落,提取重组表达质粒 pBAD24-EGFP 并进行双酶切和测序鉴定。

1.3 拟态弧菌的转化

参照吴海珍等^[18]的方法提取重组表达质粒和制备拟态弧菌 04-14 菌株的电转感受态细胞。分别取 3 μL 重组表达质粒 pBAD24-EGFP 和 50 μL 感受态细胞于预冷的电击杯中。按 2.5 kV、25 μF、400 Ω 条件,快速电脉冲,脉冲时间为 5

ms。电击后迅速将细菌加入 30 °C 预热的 1 mL LB 培养液中,30 °C,100 r/min 振荡培养 4 h。4 °C,5 000 r/min 离心 10 min,重悬细菌沉淀,取 250 μL 转化产物涂布于含 100 μg/mL Amp 的 LB 琼脂平板上,30 °C 培养直至长出菌落。

1.4 EGFP 标记的拟态弧菌的筛选与鉴定

重组拟态弧菌的表达与 SDS-PAGE 分析

随机挑取 LB 琼脂平板 (含 100 μg/mL Amp) 上的重组拟态弧菌单菌落,接种于 3 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养液中,30 °C 振荡活化培养过夜。将活化菌按 1% 接种于含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,30 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 在 0.5 左右,加入终浓度为 0.2 mg/mL 的 L-阿拉伯糖诱导表达 9 h,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,超声裂解后取上清液和沉淀进行常规 SDS-PAGE 分析 (浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 13.5%)。

细菌荧光信号的显微观察 取 20 μL 诱导后的重组菌液均匀涂布在载玻片上,荧光显微镜下观察是否发出绿色荧光,同时以未转化任何质粒的野生菌株作为阴性对照。

流式细胞术检测细菌荧光信号 取诱导后的重组菌株和野生菌株的菌液各 1 mL,200 目筛网过滤,3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,PBS 洗 3 次,PBS 重悬并调整菌体浓度为 5×10^7 CFU/mL,将细菌悬液转移至流式上样管,流式细胞仪检测是否有绿色荧光蛋白信号。

重组质粒的稳定性检测 将重组菌接种至 LB 培养液,30 °C 培养 24 h,然后每 24 h 传代 1 次,目前已传至 30 代。取每代培养液做 1:1 000 倍稀释后,取 100 μL 涂布于含 0.2 mg/mL L-阿拉伯糖的 LB 琼脂平板。荧光显微镜下对菌落总数 (发绿色荧光菌落和不发绿色荧光菌落) 进行计数,计算重组质粒的稳定率。计算公式:

$$\text{稳定率}(\%) = \frac{\text{绿色荧光菌落数}}{\text{菌落总数}} \times 100\%$$

1.5 荧光标记的重组菌的生物学特性测定

形态染色特性测定 在相同条件下培养重组菌株和野生菌株,取菌悬液进行涂片、革兰氏染色,油镜下观察菌体形态与染色特性。

生长特性测定 分别挑取重组菌株和野生菌株的单菌落接种 LB 培养液,30 °C 过夜培养后,按 1:100 转接 LB 培养液,30 °C 振荡培养 24 h,每

隔 1 h 测定菌液 OD₆₀₀ 值,重复实验 3 次,绘制细菌生长曲线。

细胞黏附性测定 用 24 孔细胞培养板(预先放置细胞爬片)于 28 ℃,5% (V/V)CO₂ 条件下培养 EPC 细胞,待细胞长满至 80% 丰度,PBS 漂洗 3 次,分别加入 500 μL 浓度为 10⁷ CFU/mL 的重组菌株和野生菌株的菌悬液(每组设置 3 个重复),28 ℃ 孵育 60 min,弃菌液,PBS 漂洗 3 次,用甲醇/冰乙酸固定细胞 5 min,干燥后取出细胞爬片,结晶紫染色 5 min,水洗、封片,油镜下随机选择 30 个细胞,逐个计数黏附菌数,计算每个细胞上的平均黏附菌数。*t* 检验分析 2 组细菌间平均黏附菌数的差异性,以 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

1.6 标记的拟态弧菌在感染草鱼体内的动态分布检测

实验鱼的分组与饲养 60 尾实验草鱼(50 ± 5) g/尾经氯化钠溶液消毒后,随机分成实验组和对照组,每组各 30 尾,分别在 2 个水族箱(50 cm × 30 cm × 44 cm)中适应性饲养 10 d 后用于实验。养殖用水为循环水(经检测无发荧光的细菌),水温(25 ± 1) ℃,空气湿度为 50% ~ 60%,实验期间水族箱保持充气,每天早晚各投饵 1 次。

细菌培养 挑取标记菌株单菌落接种于含 Amp 的 LB 液体培养基,30 ℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右,加入终浓度为 0.2 mg/mL 的 L-阿拉伯糖诱导表达 9 h,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,生理盐水重悬,采用麦氏比浊法计算并调整菌液浓度为 5 × 10⁷ CFU/mL,备用。

浸泡感染 用镊子揭去实验草鱼尾部少许鳞片,根据预实验结果,用浓度为 5 × 10⁷ CFU/mL 的菌液(保证鱼有一定临床症状,且最小存活时间不低于 72 h)浸泡实验组草鱼 5 h,对照组草鱼则在培养基稀释液中浸泡 5 h,然后 2 组草鱼分别转入饲养水体中喂养,观察鱼是否出现临床症状,并分别在感染后 4、6、8、10、12、24、48、72 和 85 h 随机剖杀实验组及对照组草鱼各 3 尾,无菌采集鳃、肝、脾、头肾、肠和肌肉组织并称重。一半重量的组织样品直接置荧光显微镜下观察是否发荧光;另一半重量的组织样品加 1 mL 无菌生理盐水进行匀浆,将匀浆液做 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 6 个梯度稀释,取匀浆液原液和各稀释液 100 μL 均匀涂布于含 0.2 mg/mL L-阿拉伯

糖的 LB 琼脂平板,30 ℃ 培养 24 h,荧光显微镜下计数发绿色荧光的菌落,计算每克脏器中拟态弧菌平均菌落数。同时对发光菌落进行涂片和革兰氏染色,光学显微镜下观察细菌的形态和染色特性。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pBAD24-EGFP 的构建

以质粒 pEGFP-N1 为模板,用特异性引物扩增 *EGFP* 基因到长度约 720 bp(图 1,泳道 1)。将 *EGFP* 基因克隆至质粒 pBAD24,重组表达质粒双酶切后,切出大小约为 4 500/720 bp 的 2 条 DNA 片段,分别与 pBAD24 和 *EGFP* 基因大小一致(图 1,泳道 2)。DNA 测序结果亦显示 *EGFP* 基因未发生任何突变,已被正确克隆,即重组质粒 pBAD24-EGFP 构建成功。

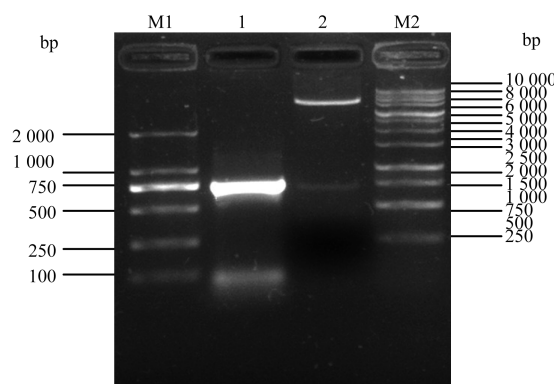


图 1 *EGFP* 基因的 PCR 扩增和重组表达质粒 pBAD24-EGFP 的双酶切鉴定

M1、M2. DNA 分子量标准; 1. PCR 产物; 2. 双酶切产物

Fig. 1 PCR amplification of *EGFP* gene and enzyme digestion of recombinant plasmid pBAD24-EGFP

M1. DNA molecular size marker of 100 to 2 000 bp; M2. DNA molecular size marker of 250 to 10 000 bp; 1. PCR product of *EGFP* gene; 2. pBAD24-EGFP digested with *EcoR* I and *Pst* I

2.2 EGFP 在拟态弧菌中的表达

重组菌经诱导表达,菌体超声裂解后分别取上清液部分(肉眼可见发绿色荧光)和沉淀部分做 SDS-PAGE 分析,电泳结果显示沉淀部分无表达蛋白,上清液部分在分子量约为 27.0 ku 处出现 1 条浓染蛋白带(图 2,泳道 3),与预期的 *EGFP* 理论值一致。同时发现未诱导的重组菌上清液和诱导的含空质粒重组菌上清液在相应位置

也出现了较细的蛋白条带(图2,泳道1、2),但是这些上清液无论肉眼观察还是在荧光显微镜下观察均无绿色荧光,说明这条细带是与目的蛋白分子量相近的杂带。重组菌株在荧光视野下发出明显的绿色荧光,在明视野下有菌体形态(图3-c, d);而野生菌株未发出绿色荧光,仅在明视野下有相同的菌体形态(图3-a, b)。流式细胞仪检测结果显示,经诱导表达后的重组菌株能够发出强烈的绿色荧光信号,而野生菌株无绿色荧光信号(图4)。此外,重组菌株在LB液体培养基中连续传30代后重组质粒仍能很好表达,所有菌落均发绿色荧光,质粒稳定率为100%。这些结果表明,重组质粒 pBAD24-EGFP 能够在拟态弧菌中稳定表达,EGFP 标记的拟态弧菌构建成功。

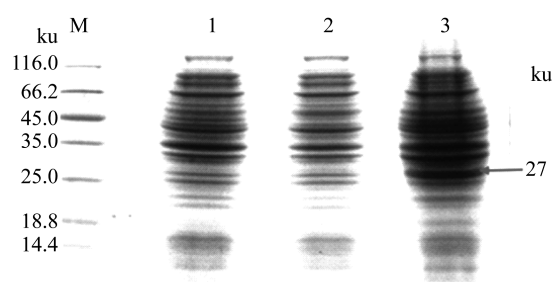


图2 重组质粒 pBAD24-EGFP 在拟态弧菌中表达后的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准; 1. pBAD24-EGFP 未诱导; 2. pBAD24 诱导; 3. pBAD24-EGFP 诱导

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the EGFP expressed in *Vm* strain 04-14

M. protein molecular standard; 1. uninduced pBAD24-EGFP; 2. induced pBAD24; 3. pBAD24-EGFP induced with L-arabinose

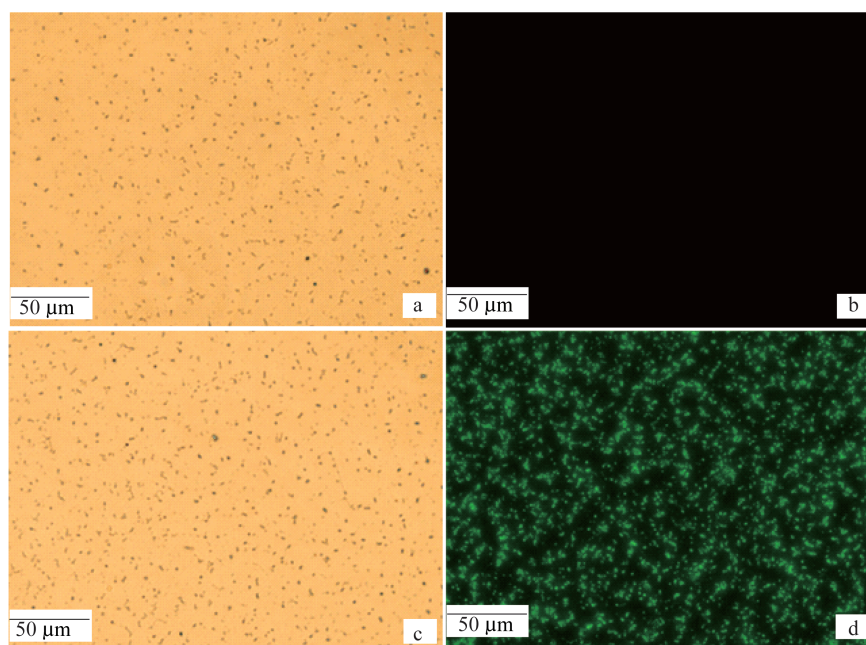


图3 重组菌株和野生菌株的荧光显微镜观察

a. 明视野下野生菌株; b. 荧光视野下野生菌株; c. 明视野下重组菌株; d. 荧光视野下重组菌株

Fig. 3 Appearance of recombinant *Vm* strain and wild strain seen under the fluorescent microscope

a. bright-field images of wild strain 04-14; b. fluorescence images of wild strain 04-14; c. bright-field images of recombinant *Vm* strain 04-14(EGFP); d. fluorescence images of recombinant *Vm* strain 04-14(EGFP)

2.3 标记的重组菌株与野生菌株的生物学特性比较

光学显微镜下观察发现重组的标记菌株与野生菌株均为短弧形或逗点状的革兰氏阴性菌。在相同培养条件下标记菌株与野生菌株的生长曲线

变化趋势大致相同;标记菌株与野生菌株对 EPC 细胞的平均黏附数分别为 (23.5 ± 4.2) 和 (24.0 ± 4.5) 个,均为黏附阳性菌,二者间黏附力无明显差异 ($P > 0.05$),而培养液对照组的 EPC 细胞形态完好,无细菌黏附(图5,图6)。

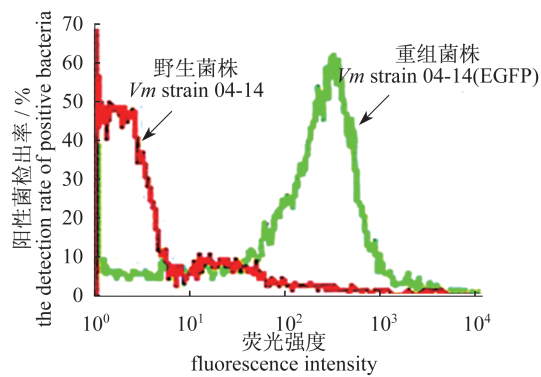


图4 流式细胞仪检测重组菌株和野生菌株的荧光强度

Fig. 4 The fluorescence intensity of recombinant *Vm* strain 04-14 (EGFP) and *Vm* strain 04-14 determined by flow cytometry

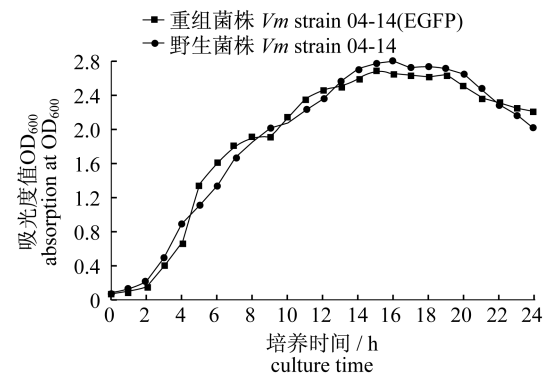


图5 野生菌株和重组菌株的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of *Vm* strain 04-14 and *Vm* strain 04-14 (EGFP)

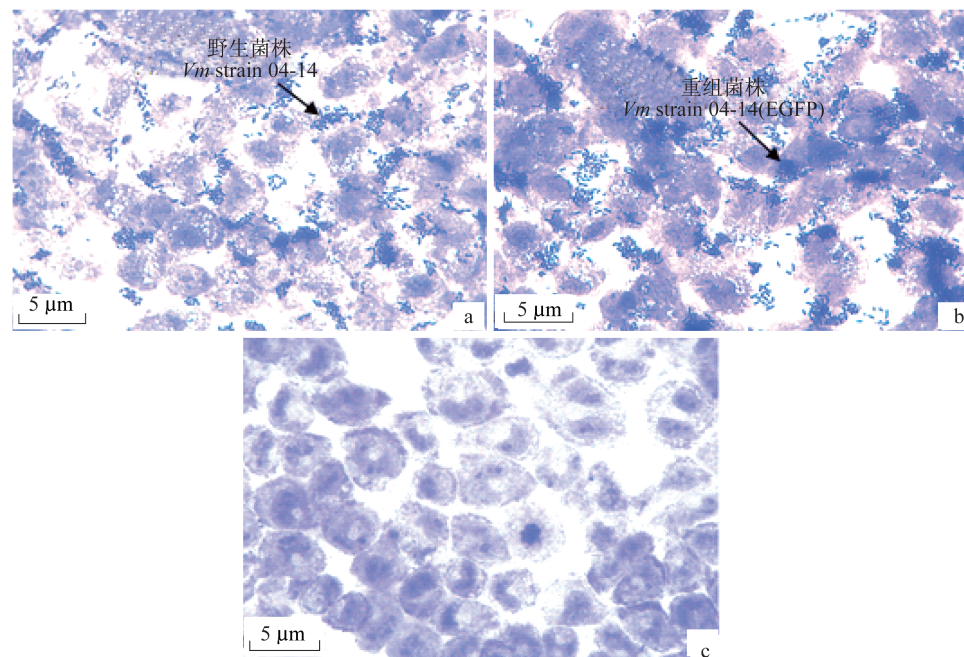


图6 野生菌株和重组菌株对EPC细胞的黏附

a. 野生菌株对EPC细胞的黏附; b. 重组菌株对EPC细胞的黏附; c. 细胞对照

Fig. 6 Adhesion of *Vm* strain 04-14 and *Vm* strain 04-14 (EGFP) to EPC cells

a. *Vm* strain 04-14 adhesion to EPC cells; b. *Vm* strain 04-14 (EGFP) adhesion to EPC cells; c. EPC cells contrast

2.4 拟态弧菌在感染草鱼体内的动态分布

浸泡感染后12 h内,实验鱼分散于水体中正常游动,无明显异常。24~72 h陆续出现不同程度的临床症状,主要表现为食欲减退,反应迟钝,长时间静止于水面或水底,而对照组鱼未见任何异常。实验组鱼73 h开始死亡,85 h全部死亡,死亡鱼体色加深,尾部揭鳞片处皮肤轻度溃疡,腹部明显肿胀,剖检后可见严重腹水,肠道内充满大量黄色液体、肠内壁充血和出血,肝、脾和头肾轻

微出血。从脏器中分离到的菌落全部为发绿色荧光菌落,光镜下均呈现典型的拟态弧菌形态特征。感染4 h后即从肠道和鳃中检测到绿色荧光信号,而对照组相应组织无任何荧光信号,标记菌株的检出量分别为 3.60×10^8 和 2.36×10^6 CFU/g,直至10 h,其含量无明显变化,12 h后含菌量逐渐下降,但在死亡鱼肠道内仍能检出(表1)。细菌在肌肉、头肾、脾脏和肝脏中呈现相似的动力学,感染24 h后才检测到绿色荧光信号,48 h达

到峰值,检出量分别为 9.58×10^4 、 8.75×10^4 、 1.50×10^4 和 4.50×10^4 CFU/g,但均低于肠道中的检出量,在 24 ~ 85 h,含菌量呈现先增加后下降的变化。

表 1 *Vm* 04-14 (EGFP) 菌株在感染草鱼体内的动态分布
Tab.1 Dynamic distribution of *Vm* strain 04-14 (EGFP) in *C. idella* after immersion infection

时间/h time	不同组织脏器中 <i>Vm</i> 04-14 (EGFP) 菌株的平均菌落数/(CFU/g) the average colony number of <i>Vm</i> strain 04-14 (EGFP) in different tissues and organs					
	肠 intestine	鳃 gill	肌肉 muscle	头肾 head kidney	脾 spleen	肝 liver
4	3.60×10^8	2.36×10^6				
6	4.20×10^8	2.80×10^6				
8	4.72×10^8	3.50×10^6				
10	5.00×10^8	3.10×10^6				
12	2.50×10^6	2.10×10^5				
24	4.80×10^5	1.50×10^5	4.50×10^4	3.40×10^4	4.00×10^3	2.60×10^3
48	4.50×10^5	1.50×10^5	9.58×10^4	8.75×10^4	1.50×10^4	4.50×10^4
72	3.15×10^5	1.30×10^5	3.50×10^4	4.50×10^4	1.30×10^4	3.89×10^4
85	2.50×10^5	1.21×10^5	2.30×10^4	3.96×10^4	1.20×10^4	3.14×10^4

3 讨论

应用现代生物技术对病原菌进行标记,是研究病原菌与宿主关系、跟踪细菌致病过程的有效手段。本研究目的是探讨拟态弧菌在感染草鱼体内的动态分布,明确其黏附定植与繁殖的主要靶器官。为了证实从组织脏器中分离的细菌与浸泡感染的细菌是同一种细菌,就需要选择一种既稳定又可靠的标记物。已有文献报道的使用有机荧光染料或放射性核素标记病原菌均存在一些问题^[19],如染料分子分布不均匀、易渗漏、随细胞分裂被稀释,以及光漂白后的产物对细胞有毒性;将放射性核素探针引入病原菌基因组作为报告物必须在分析前对组织进行处理,这样就阻止了感染的继续进行。新型标记物增强型绿色荧光蛋白能有效克服上述不足,其最大优势是在蓝光或近紫外光的照射下,无需加入任何反应底物或酶,即可发射出绿色荧光,而且荧光性质十分稳定,无光漂白现象发生,组织细胞材料也无需进行前处理,即可进行活体检测。因此,本实验选择将带有 *EGFP* 基因的质粒转移到拟态弧菌中,利用 *EGFP* 标记信号研究该菌在感染鱼体内的动态分布。

选择合适的质粒载体和启动子是决定 *EGFP* 重组质粒能否在拟态弧菌中高效、稳定表达的关键因素。在最初的构建过程中,曾尝试使用带有 T7 启动子的 pET32a 质粒构建了 *EGFP* 表达载体,结果 *EGFP* 基因在拟态弧菌中未得到表达。

本实验研究中则改用含有阿拉伯糖启动子的 pBAD24 构建了 *EGFP* 重组质粒,转化至拟态弧菌 04-14 菌株,经 30 代无抗生素压力培养,细菌依然能够发出较强的绿色荧光,即成功得到具有稳定发光表型的重组拟态弧菌。分析其原因,一方面可能是阿拉伯糖启动子较 T7 启动子的启动强度偏弱,转录速度较慢,有利于 pBAD24-*EGFP* 表达载体在拟态弧菌中以适中速度表达,*EGFP* 蛋白能够正常折叠而具有荧光功能;另一方面可能是诱导剂阿拉伯糖较 IPTG 对拟态弧菌细胞的毒性小,并且阿拉伯糖在拟态弧菌中稳定,不随时间延长而降解。一般来说,*EGFP* 的高效表达会对被标记菌株造成额外的代谢负荷,这种代谢负荷有可能会影响细菌的生物学特性^[20]。对此,实验比较检测了野生菌株和标记菌株的形态、生长特性和细胞黏附性,结果发现标记细菌的这些生物学特性并未受到标记基因的影响,表明所构建的标记拟态弧菌能够满足感染示踪研究的要求。

04-14 菌株是从患腹水病草鱼体内分离到的一株毒力较强的拟态弧菌。预实验中以腹腔注射方式感染实验鱼,结果发现腹腔感染发病急,病原还未散布全身时鱼已经死亡(24 h 内全部死亡),虽然可以通过调整菌液浓度或剂量实现跟踪,但是在自然环境中,病原菌不能直接进入鱼的腹腔,而浸泡方式不同于注射方式,浸泡方式模拟了鱼类在自然条件下的发病环境,通过提高水体中病原菌浓度,让其感染,重现了自然条件下鱼的发病

过程,使实验结果更为准确。因此,本实验采用浸泡方式感染草鱼,由于进入鱼体内的细菌数量相对较少,病程较长,为细菌全身性的扩散提供了充分时间,从而顺利探究了细菌在不同组织脏器中的动态分布情况。目前已有一些报道认为病原菌浸泡感染鱼后,首先感染的部位是鳃和肠道^[21-22],本实验结果与这些报道一致。标记的拟态弧菌感染草鱼 4 h 后即在肠道和鳃中检测到绿色荧光信号,肠道内标记的拟态弧菌检出量明显高于鳃中检出量(经形态学检查发光菌落均为典型的拟态弧菌形态),并且在整个实验过程中,肠道一直都保持着很高的带菌状态,证明肠道是该菌黏附定植与繁殖的主要靶器官,这也解释了病死鱼出现严重腹水,肠道积液,肠壁充血和出血的病理机制,至于为何首先在肠道内检测到大量重组菌,有待于进一步研究。同时发现,在感染 24 h 后,肝脏、脾脏、头肾和肌肉中才有标记细菌检出,可能是标记细菌未直接从鳃和尾部揭鳞片处皮肤进入血液,而是在肠道内繁殖后进入血液,进而散布于机体各组织器官,造成全身感染。

参考文献:

- [1] Thune R L, Hawke J P, Sibeling R J. Vibriosis in the red swamp crawfish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1991, 3 (3): 97 - 101.
- [2] Shen J Y, Yin W L, Qian D, et al. Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7 (3): 89 - 92. [沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究. 中国水产科学, 2000, 7 (3): 89 - 92.]
- [3] Wang G L, Zheng T L, Jin S, et al. Preliminary studies on pathogen of ascites disease of cultured *Sparus macrocephalus* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23 (1): 33 - 35. [王国良, 郑天伦, 金珊, 等. 黑鲷幼鱼腹水病病原菌. 中国兽医学报, 2003, 23 (1): 33 - 35.]
- [4] Chitov T, Kirikaew P, Yungyune P, et al. An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus* [J]. European Journal of Clinical Microbiology, 2009, 28 (4): 421 - 424.
- [5] Jonas R, Charlotte K, Evgenia P, et al. A simple, versatile method for GFP-based single molecule localization microscopy [J]. Biophysical Journal, 2012, 102 (3 Suppl 1): 419a.
- [6] Baker S M, Buckheit R W, Falk M M. Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: Tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes [J]. BMC Cell Biology, 2010, 11 (1): 1 - 10.
- [7] Ramsden R, Arms L, Davis T N, et al. An intein with genetically selectable markers provides a new approach to internally label proteins with GFP [J]. BMC Biotechnology, 2011, 11 (1): 71 - 81.
- [8] Shimomura O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein [J]. FEBS Letters, 1979, 104 (2): 220 - 222.
- [9] Yu T T, Skinner D Z, Liang G H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene [J]. Hereditas, 2004, 133 (3): 229 - 233.
- [10] Chu W H, Lu C P. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker [J]. Aquaculture, 2008, 277 (3 - 4): 152 - 155.
- [11] Aki N, Nobuhiro M, Hitomi H, et al. Localization analysis of fluorescent-labeled *Aeromonas veronii* in the intestinal tract of carp using an *in vivo* imaging system [J]. Fish Pathology, 2012, 47 (1): 7 - 11.
- [12] O' Toole R, Von H J, Rosqvist R, et al. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum* [J]. Microbial Pathogenesis, 2004, 37 (1): 41 - 46.
- [13] Ling S H, Wang X H, Xie L, et al. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* *in vivo* and *in vitro* fish models [J]. Microbiology, 2000, 146 (1): 7 - 19.
- [14] Tomblini R, Unge A, Davey M E, et al. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 22 (1): 17 - 28.
- [15] Rebecca M, Nicholas D, Patricia L F, et al. Comparison of an *espB* gene fecal polymerase chain reaction assay with bacteriologic isolation for detection of *Citrobacter rodentium* infection in mice [J]. Comparative Medicine, 2002, 52 (5): 439 - 444.
- [16] Li Y Y, Li J N, Yu W Y. Research progress in molecular biology of virulence factors of *Vibrio mimicus* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24 (2): 22 - 24. [李玉英, 李槿年, 余为一. 拟态弧菌毒力因子的分子生物学研究进展. 动物医学进展, 2003, 24 (2): 22 - 24.]

- [17] Wang W, Hu D D, Li J N, *et al.* Construction and characterization of the OmpU gene deletion mutant of *Vibrio mimicus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 731 - 740. [王薇, 胡丹丹, 李瑾年, 等. 拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能及所介导的致病作用. *水产学报*, 2014, 38(5): 731 - 740.]
- [18] Wu H Z, Zhang H Z, Liang N, *et al.* Optimization of technical condition for transformation of *Vibro anguillarum* MVM425sh strain by electroporation [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2007, 20(8): 600 - 602. [吴海珍, 张惠展, 梁娜, 等. 鳃弧菌 *Vibro anguillarum* MVM425sh 高效电转化条件的优化. *中国生物制品学*, 2007, 20(8): 600 - 602.]
- [19] Wu C Z, Xu F, Gao Y L, *et al.* Application of fluorescent labeling technique in the research of biology and medicine [J]. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science Edition*, 2014, 28(5): 55 - 62. [吴超柱, 徐凡, 郜炎龙, 等. 荧光标记技术在生物学和医学研究中的应用. *重庆理工大学学报: 自然科学版*, 2014, 28(5): 55 - 62.]
- [20] Feng Y J, Song W. Characteristics and label loss dynamics of *Pantoea agglomerans*, predominant endophytic bacteria isolated from rice plant [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(1): 85 - 91. [冯永君, 宋未. 水稻内生优势成团泛菌 GFP 标记菌株的性质与标记丢失动力学. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(1): 85 - 91.]
- [21] Chen Q, Yan Q, Wang K, *et al.* Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 80(3): 181 - 188.
- [22] Smith P A, Rojas M E, Guajardo A, *et al.* Experimental infection of Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 61(1-2): 53 - 57.

EGFP marker of *Vibrio mimicus* and its dynamic distribution in infected *Ctenopharyngodon idella*

GAO Huihui, HOU Liting, LI Jinnian*, HUANG Anning

(Key Laboratory of Zoonoses, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To detect *Vibrio mimicus*' dynamic distribution in infected *C. idella*, the gene encoding enhanced green fluorescent protein(EGFP) was cloned into the expression plasmid pBAD24 and transformed into the host cells *V. mimicus* strain 04-14 by electroporation to generate recombinant *V. mimicus*. The recombinant EGFP was highly expressed under induction with arabinose. The EGFP on the cell surface was also confirmed by fluorescence microscopy and flow cytometric analysis. Under nonselective condition, the stability of recombinant plasmid was 100% in EGFP-labeled *V. mimicus* after 30-generation time, and there was no significant difference between EGFP-labeled strain and wild strain in morphology, growth characteristics and adhesion ability to EPC cells. *C. idella* were immersed in water containing EGFP-labeled *V. mimicus* at the concentration of 5×10^7 CFU/mL. At least three fish per group were sacrificed at different time post infection, and in different tissues and organs, such as gill, intestine, muscle, head kidney, spleen and liver were sampled separately. EGFP-labeled *V. mimicus* in different tissues and organs was examined by the signal of fluorescence and the method of plate culture count within 4 days after infection. The green fluorescent signals appeared firstly in the intestine and gill at 4 h after infection, and the number of bacteria reached up to 3.60×10^8 and 2.36×10^6 CFU/g, respectively. The number of bacteria in the intestine and gill had no obvious changes from 4 to 10 h post infection, then declined gradually after 12 h, but continued to exist until fish death. Dynamics of bacteria in muscle, head kidney, spleen and liver were similar, the green fluorescent signals in these tissues and organs were found 24 h later after infection, and the number of bacteria increased at first but later decreased from 24 to 85 h. The number of bacteria in muscle, head kidney, spleen and liver reached their peaks 48 h post infection, being 9.58×10^4 , 8.75×10^4 , 1.50×10^4 and 4.50×10^4 CFU/g, respectively, but the number of bacteria which was detected in them was lower than that in the intestine. These results suggest that the intestine is the primary target organ for the adhesion, colonization and reproduction of *V. mimicus*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Vibrio mimicus*; enhanced green fluorescent protein; dynamic distribution

Corresponding author: LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com