



## QseB 在嗜水气单胞菌响应去甲肾上腺素中的作用

秦婷<sup>1,2</sup>, 习丙文<sup>1,2,3\*</sup>, 谢骏<sup>1,2,3</sup>, 潘良坤<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 为探明嗜水气单胞菌 QseB 在病原菌对鱼体应激激素去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 的识别和响应过程中的作用, 实验采用同源重组方法构建了嗜水气单胞菌 NJ-35 的 *qseB* 缺失突变株 ( $\Delta qseB$ ), 比较分析了 NE 诱导后, 野生株和突变株之间其生物膜形成能力、溶血活性和运动能力等与细菌毒力有关的生物学功能的变化, 以及对鱼体致病力的变化。结果显示, *qseB* 的缺失显著降低了 NE 对嗜水气单胞菌的生长、生物膜形成、溶血活性的促进作用, 减弱了嗜水气单胞菌对奥利亚罗非鱼的致死率, 而对细菌运动能力和脂肪酶活性无显著影响。研究表明, NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 生物膜形成和溶血活性的增强作用可能依赖于 QseB, 表明 QseB 在病原菌与宿主相互作用中发挥着重要作用。本研究进一步揭示了嗜水气单胞菌的致病机理, 并为细菌与宿主相互作用的研究提供了新的理论基础。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; QseB; 去甲肾上腺素; 毒力

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

近年来养殖水产动物应激问题在学术研究和实际生产中受到广泛重视。应激被认为是条件性致病细菌感染致病非常重要的诱发因素。养殖过程中长期或高强度的环境因素变化(如溶解氧、水温、pH、氨氮等)或人为操作(捕捞、运输等)超出养殖动物机体自身缓冲调节范围, 从而造成不良的应激反应, 严重影响机体的神经内分泌、能量代谢和免疫力等。应激状态的水产动物分泌大量的肾上腺素 (epinephrine, Epi) 和去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 等儿茶酚胺类激素, 抑制机体免疫系统, 使得机体极易受到水体中病原菌的侵袭。研究发现, 病原菌能识别响应宿主机体的 Epi/NE 以及组织损伤等信号, 调控自身生长和毒力, 导

致感染和死亡率增加<sup>[1-2]</sup>。在革兰氏阴性菌中, 由组氨酸激酶 (histidine protein kinases, HK) QseC 和反应调控蛋白 (response regulator, RR) QseB 组成的 QseBC 双组份调控系统能够感应环境中的信号分子, 调控细菌毒力。其中, 位于细胞膜上的 QseC 可以感应宿主分泌的 Epi、NE 和细菌分泌的群体感应信号分子自体诱导物-3 (autoinducer-3, AI-3), 激活胞浆内的 QseB, 调控细菌运动、生物膜形成和毒力相关基因的表达, 实现细菌与宿主之间的信息交流<sup>[3-7]</sup>。

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 广泛分布于水环境中, 可引起鱼类、两栖类、爬行类、鸟类以及哺乳类动物的全身性败血症和人类肠胃

收稿日期: 2021-06-22 修回日期: 2021-08-17

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45); 国家重点研发计划 (2020YFD0900300)

第一作者: 秦婷 (照片), 从事水产动物病害与防治研究, E-mail: qint@ffrc.cn

通信作者: 习丙文, 从事水产病害防治方面研究, E-mail: xibw@ffrc.cn



炎<sup>[8]</sup>, 是养殖环境常见的条件致病菌。在夏季高温时期, 当养殖环境恶化时最易暴发运动性气单胞菌败血症 (motile aeromonad septicemia, MAS) 疾病, 导致草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲫 (*Carassius auratus*)、鳊 (*Parabramis pekinensis*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 等主要养殖鱼类的大量死亡, 给水产养殖业造成巨大的经济损失。有研究报道, 嗜水气单胞菌能够感应宿主应激激素 NE, 促进细菌生长, 增强细菌致病力<sup>[9-10]</sup>。在此过程中, QseC 可通过感应 NE 来促进嗜水气单胞菌的生长, 提高生物膜形成能力和溶血活性<sup>[11]</sup>, 但下游 QseB 是否参与该调控过程还不明确。

实验通过构建 *qseB* 缺失突变株 ( $\Delta qseB$ ), 分析 QseB 在嗜水气单胞菌响应应激激素 NE 过程中对细菌生长、生物膜形成、运动等毒力相关因子的调控, 以及对鱼体致病力的影响, 初步探讨 QseB 在鱼体应激时对嗜水气单胞菌的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验所用嗜水气单胞菌 NJ-35 分离自养殖患病鱼, 属于当前养殖中主要流行的 ST251 类群<sup>[1]</sup>, 由南京农业大学刘永杰教授馈赠。缺失突变株  $\Delta qseB$  和互补株 *qseC+* (*qseBC* 共互补, 即扩增 *qseBC* 开放阅读框及其上游 236 bp 的碱基序列)<sup>[12]</sup> 由本实验室构建和保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 Top10 和 *E. coli* S17-1 ( $\lambda$ pir)、自杀质粒 pRE112 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。大肠杆菌均用 LB 培养基 37 °C 振荡或者琼脂平板培养; 嗜水气单胞菌如无特殊说明也均用 LB 培养基 28 °C 振荡或者琼脂平板培养, 并根据实验需求加入适宜浓度的抗生素 [氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 100  $\mu$ g/mL, 氯霉素 (chloramphenicol, Cm) 34  $\mu$ g/mL]。Serum-SAPI 培养基用于研究 NE 对嗜水气单胞菌体外毒力的调控实验, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 将 NE 配制成 10 mmol/L 的母液, -20 °C 储存待用。

### 1.2 试剂

DNA 聚合酶 *Ex Taq* 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 限制性内切酶 *Xba* I、

*Sph* I 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB (北京) 有限公司; 重酒石酸去甲肾上腺素 (norepinephrine bitartrate) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他化学试剂除特别标注外, 均为国产分析纯。

### 1.3 突变株 $\Delta qseB$ 的构建

**自杀质粒的构建** 根据目的基因 *qseB* (基因编号: 64359761) 及其上下游序列分别设计 2 对引物 *qseB*-AF 和 *qseB*-AR, *qseB*-BF 和 *qseB*-BR, 以嗜水气单胞菌 NJ-35 基因组为模板进行 PCR 扩增, 分别获得 *qseB* 的上下游片段; 再以这 2 个片段为模板, 用引物 *qseB*-AF 和 *qseB*-BR 进行重叠延伸 PCR (overlap PCR), 获得目的基因 *qseB* 缺失片段; 将该片段和质粒 pRE112 同时进行 *Xba* I 和 *Sph* I 双酶切, 经 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化入大肠杆菌感受态细胞 Top10, 经培养后挑取单克隆进行 PCR 检测和测序, 提取阳性克隆的质粒, 即为自杀质粒 pRE-del*qseB*, 转化至感受态细胞 S17-1 ( $\lambda$ pir), 获得接合菌株 S17-1 (pRE-del*qseB*) (表 1)。

**接合转移** 将嗜水气单胞菌野生株 NJ-35 作为受体菌, 阳性重组子大肠杆菌 S17-1 (pRE-del*qseB*) 作为供体菌, 进行接合转移。受体菌和供体菌分别于 28 °C 和 37 °C 振荡培养至对数生长期 (OD<sub>600</sub>=0.5), 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体; 无抗 LB 清洗 3 次, 按照 1:1 (体积比) 比例制成混合菌液。将无菌硝酸纤维素膜 (NC 膜) 铺于无抗 LB 平板中央, 取 100  $\mu$ L 混合菌液至 NC 膜, 28 °C 静置培养 24 h 后, 用无抗 LB 冲洗 NC 膜, 连续 10 倍梯度稀释菌液, 各取 100  $\mu$ L 稀释液涂布 LB (Amp+Cm) 双抗平板, 28 °C 静置培养 24 h。此时, 双抗平板中长出的克隆发生了第 1 次同源重组, pRE-del*qseB* 已经整合到野生株 NJ-35 基因组上。

**突变株  $\Delta qseB$  的筛选** 挑取双抗平板中的克隆, 接种至无抗 LB 培养液中, 28 °C 振荡培养至对数生长期, 使菌株进行第 2 次交换。将菌液梯度稀释涂布于 LB (10% 蔗糖) 平板, 28 °C 培养, 挑取单克隆同时划线 LB (Amp+Cm) 和 LB (Amp) 2 类平板, 选择只在 LB (Amp) 平板中生长的单克隆, 分别用内引物对 *qseB*-inner F 和 *qseB*-inner R, 外引物对 *qseB*-outer F 和 *qseB*-outer R, 进行 PCR

表1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')
<i>qseB</i> -AF	CTAGTCTAGACGGCTACAGCGTCTATTG
<i>qseB</i> -AR	CGCGGATATTGCGGATGAGATCCACATCATCTTCCACCAACAGG
<i>qseB</i> -BF	CCTGTTGGTGGAAAGATGATGTGGATCTCATCCGCAATATCCGGC
<i>qseB</i> -BR	ACATGCATGCCGATGAGGTTGCTGAACA
<i>qseB</i> -inner F	CGCTCATTCTGGATCTCAA
<i>qseB</i> -inner R	TGCAGCAGCTTGTATTCC
<i>qseB</i> -outer F	ATGCGGATCCTGTTGGTGGAAAGA
<i>qseB</i> -outer R	TCATGCCCGGTGGTCCCGGCGCT

注：本表中引物序列的下划线部分为人工引入的限制性酶切位点*Xba* I和*Sph* I

Notes: The underlined sequences represent the restriction sites (*Xba* I and *Sph* I)

检测，阳性对照为野生株 NJ-35 基因组，获得突变株  $\Delta qseB$ 。

#### 1.4 生长曲线的测定

嗜水气单胞菌体外生长曲线的测定参考 Gao 等<sup>[10]</sup>方法，当 NE 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时，对细菌的促生长作用最好，而当细菌的初始接种浓度大于  $1 \times 10^3$  CFU/mL 时，NE 的促生长作用不显著。因此，本研究以  $1 \times 10^2$  CFU/mL 的初始接种量测量细菌的生长情况，而在其他实验中，菌液浓度均大于  $1 \times 10^3$  CFU/mL，排除 NE 对细菌促生长作用带来的干扰。分别挑取野生株 NJ-35 和突变株  $\Delta qseB$  单克隆至 LB 培养基中，28  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜，收集菌体，PBS 连续清洗 3 次后，调整为  $1 \times 10^4$  CFU/mL 的菌悬液。按照 1 : 100 (体积比) 比例将菌悬液接种至新鲜的 LB 培养基中，至菌液终浓度为  $1 \times 10^2$  CFU/mL，28  $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min 培养 24 h，每 1 h 取样测 OD<sub>600</sub> 值；同时，按照上述接种量将菌悬液接种至 serum-SAPI 培养基中，实验组加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  的 NE，对照组加入等体积的 PBS，28  $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min 培养 72 h，每 2 h 取样测 OD<sub>600</sub> 值。每个样品 3 个平行，实验独立重复 3 次。

#### 1.5 生物膜形成能力的测定

将野生株 NJ-35、突变株  $\Delta qseB$  和互补株 *qseC*<sup>[11]</sup> 用 LB 培养基培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6，收集菌体，PBS 清洗 3 次；用含有 100  $\mu\text{mol/L}$  NE 的 serum-SAPI 培养基调整菌液至  $1 \times 10^6$  CFU/mL 作为实验组，用加入等体积 PBS 的 serum-SAPI 培养基调整菌株至相同浓度作为对照组。分别取 200  $\mu\text{L}$  菌悬液加入 96 孔板，每个样品 6 个重复，

28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 48 h；除去培养基，每孔用 PBS 清洗 3 次，去除浮游细菌；甲醛固定 15 min，室温干燥；取 200  $\mu\text{L}$  1% 结晶紫溶液 (质量体积比) 染色 15 min，PBS 清洗 5 次去除未结合的染料，干燥后，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇溶解结晶紫染色，测 OD<sub>570</sub> 值。

#### 1.6 运动能力的测定

参考 Khajanchi 等<sup>[13]</sup>的方法，略作改动。配制 0.3% 和 0.5% 琼脂的 serum-SAPI 平板分别测定细菌的泳动和群集能力，实验组加入终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的 NE，对照组加入等体积的 PBS。取  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液 5  $\mu\text{L}$  点在平板中央，28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h，测量菌落的直径。

#### 1.7 溶血活性的测定

**血平板溶血圈测定** 配制血平板：在含有 1.5% 琼脂的 serum-SAPI 培养基中加入 5% (体积分数) 绵羊血细胞，实验组加入 NE 至终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ ，对照组加入等体积 PBS。取  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液 5  $\mu\text{L}$  点在平板上，28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h，测量溶血圈直径。

**血细胞溶血活性测定** 制备细菌胞外蛋白 (extracellular proteins, ECP)。将各菌株分别接种至 serum-SAPI 培养基 (含 100  $\mu\text{mol/L}$  NE 或等体积 PBS)，至初始培养基中菌液浓度为  $1 \times 10^2$  CFU/mL，28  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6，4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 5 min，取上清液，过滤除菌 (Millex<sup>®</sup> GP filter unit, 0.22  $\mu\text{m}$ )，所得上清液即为细菌分泌的胞外蛋白。用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 清洗绵羊红细胞，4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min，收集红细胞。取无



菌的 2 mL 离心管, 实验组加入 245  $\mu\text{L}$  ECP, 阴性对照加入等体积 PBS, 阳性对照加入 1% 曲拉通 X-100, 每管加入 5  $\mu\text{L}$  红细胞, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 离心后取 200  $\mu\text{L}$  上清液至酶标板中, 测 OD<sub>540</sub> 值。溶血百分比 = (样品 OD<sub>540</sub> - 阴性对照 OD<sub>540</sub>) / 阳性对照 OD<sub>540</sub>。

### 1.8 脂肪酶活性的测定

配制含有 1% 吐温的 serum-SAPI 平板, 实验组加入 NE 至终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组加入等体积 PBS。取  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液 5  $\mu\text{L}$  点在平板中央, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 测量菌落和白色沉淀环的直径, 用白色沉淀环与菌落直径的比值反应细菌脂肪酶活性。

### 1.9 人工感染实验

实验用鱼来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉实验基地, 选择规格整齐、体质量 (11.1 $\pm$ 0.5) g 的奥利亚罗非鱼 (*O. oaureus*), 在循环水养殖系统暂养 1 周后, 随机分配至 15 个玻璃缸中, 每缸 30 尾鱼, 每 6 个鱼缸分为 1 组, 剩下 3 个鱼缸为阴性对照组, 不做任何处理, 水温保持 25  $^{\circ}\text{C}$ 。根据实验室测得的野生株 NJ-35 的半数致死浓度 (lethal concentration 50, LC<sub>50</sub>)  $6.5 \times 10^6$  CFU/mL, 将细菌感染浓度设为  $5 \times 10^6$  CFU/mL, 2 组鱼缸中分别腹腔注射 100  $\mu\text{L}$  野生株 NJ-35 和突变株  $\Delta qseB$ , 4 h 后每组随机选择 3 个鱼缸再分别腹腔注射 100  $\mu\text{L}$  NE (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和等体积的 PBS, 观察并记录 7 d 内鱼体活动和死亡情况。

### 1.10 数据处理

采用 Excel 2017 和 GraphPad Prism 5 软件处理数据和绘图, 使用 SPSS19.0 软件对所有数据进行统计分析, 2 组间比较采用 Student *t* 检验, 多组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  表示显著差异,  $P < 0.01$  表示极显著差异, 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 突变株 $\Delta qseB$ 的筛选与鉴定

经 LB (Amp+Cm) 和 LB (Amp) 两类平板筛选共获得 4 株待检测菌株, 编号为 12、69、173 和 245, 4 株菌可能发生了 *qseB* 缺失, 也可能回复成野生型, 需要经过 PCR 进一步鉴定。结果显示, 4 株待检测菌株经内引物检测无条带, 外引物检

测扩增片段比野生株小, 约 500 bp (图 1), 经测序比对, 缺失片段是定向敲除的 *qseB* 基因片段, 表明这 4 株菌的 *qseB* 已被定向敲除。

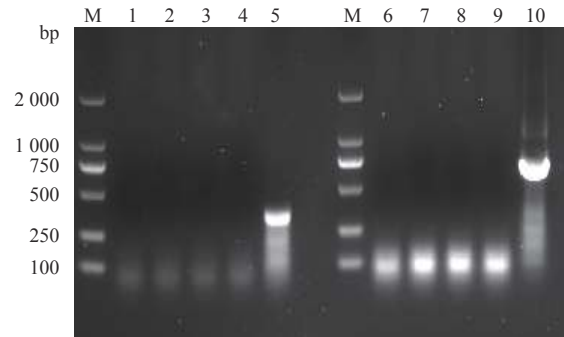


图 1 PCR 鉴定嗜水气单胞菌突变株  $\Delta qseB$

M. Marker DL2000; 1~5 为内引物对扩增产物, 其中, 1~4 为 4 株待检测菌株, 5 为阳性对照嗜水气单胞菌 NJ-35; 6~10 为外引物对扩增产物, 其中, 6~9 为 4 株待检测菌株, 10 为阳性对照嗜水气单胞菌 NJ-35

### Fig. 1 Identification of *A. hydrophila* mutant $\Delta qseB$ by PCR

M. marker DL2000; 1-5 are the products of PCR amplification using inner primers, 1-4 are the strains to be detected, and 5 is the wild type *A. hydrophila* NJ-35 as positive control; 6-10 are the products of PCR amplification using outer primers, 6-9 are the strains to be detected, and 10 is the wild type *A. hydrophila* NJ-35 as positive control

### 2.2 QseB 对 NE 促生长作用的影响

在 LB 培养基中, 野生株 NJ-35、突变株  $\Delta qseB$  的生长无显著差异 (图 2-a)。在 serum-SAPI 培养基中, 各菌株在生长延迟期 (0~12 h) 时, 实验组和对照组均无显著变化; 培养 24 h 后, 与对照组相比, NE 均能促进各菌株的生长; 在实验组中, 野生株 NJ-35 的生长速率显著高于突变株  $\Delta qseB$  ( $P < 0.05$ ), 而在 PBS 对照组中 2 株菌的生长无显著变化 (图 2-b)。结果表明, *qseB* 的敲除可能抑制了 NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 的促生长作用。

### 2.3 NE 诱导下 QseB 对嗜水气单胞菌生物膜形成能力的影响

在对照组中, 野生株 NJ-35、突变株  $\Delta qseB$  和互补株 *qseC+* 的生物膜形成能力无显著差异 ( $P > 0.05$ )。经 NE 诱导后, 野生株 NJ-35 的生物膜形成能力比  $\Delta qseB$  显著增强 ( $P < 0.05$ ), 而 *qseC+* 与野生株无明显差异; 此外, 与对照组比较, 野生株 NJ-35 和互补株 *qseC+* 的生物膜形成能力显著提高 ( $P < 0.05$ ), 而  $\Delta qseB$  则无明显变化 (图 3)。结果表明, 正常情况下, QseB 并不影响嗜水气单胞菌生物膜的形成, 但在 NE 诱导下, 该菌生物膜的

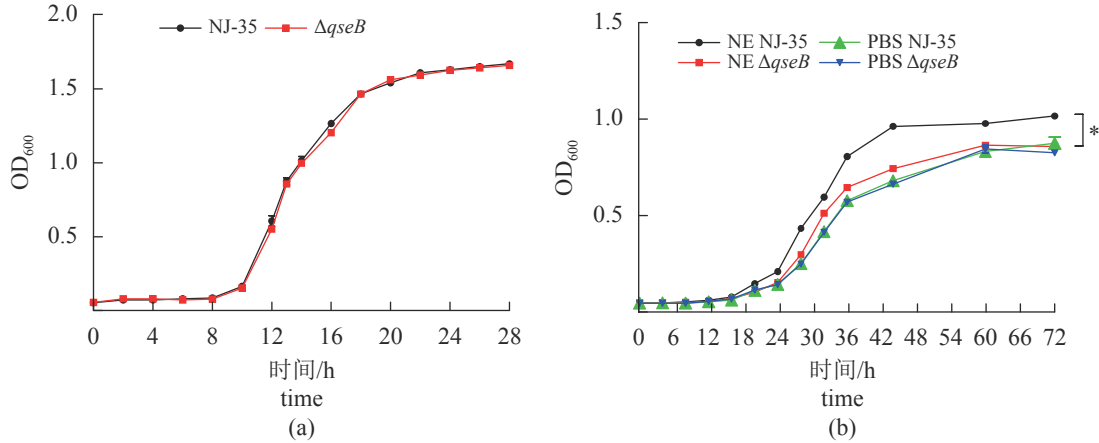


图 2 嗜水气单胞菌野生株 NJ-35 和突变株 ΔqseB 的生长曲线

(a) LB 培养基, (b) serum-SAPI 培养基; \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

Fig. 2 The growth curves of *A. hydrophila* strains(wild type NJ-35 and ΔqseB)

(a) LB medium, (b) serum-SAPI medium; \* denotes significant difference ( $P < 0.05$ ); the same below

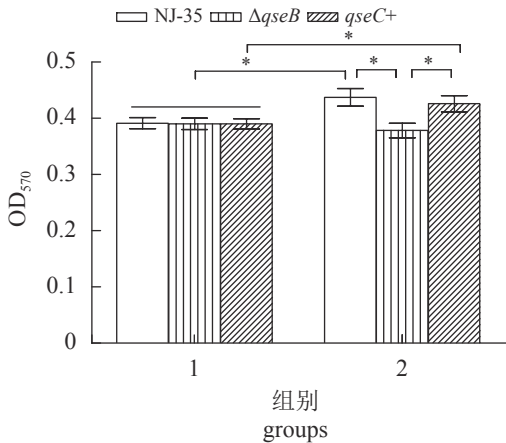


图 3 嗜水气单胞菌经 NE 诱导后的生物膜形成

1. 对照组, 2. NE 处理组; 下同

Fig. 3 Biofilm formation assay of *A. hydrophila* in the presence of NE

1. control group, 2. NE-treated group; the same below

形成可能依赖于 QseB。

### 2.4 NE 诱导下 QseB 对嗜水气单胞菌运动能力的影响

各菌株的泳动能力在 NE 诱导前后均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 经 NE 诱导后, 各菌株的群集能力与泳动能力相似, 无显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 4)。结果表明, NE 不影响嗜水气单胞菌 NJ-35 的运动, 无论是否有 NE 存在, QseB 均不参与调控嗜水气单胞菌 NJ-35 的运动。

### 2.5 NE 诱导下 QseB 对嗜水气单胞菌溶血活性的影响

对照组野生株 NJ-35、突变株 ΔqseB 和互补

株 qseC+在血平板中形成的溶血圈无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 经 NE 诱导后, 与对照组比较, 野生株 NJ-35 和互补株 qseC+形成的溶血圈均显著增大 ( $P < 0.05$ ), 而 ΔqseB 无明显变化 (图 5-a)。在对绵羊血细胞的溶血毒性实验中, 对照组结果与血平板相似, 菌株之间的溶血活性无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 但经 NE 诱导后, 突变株 ΔqseB 对绵羊血细胞的溶血活性极显著低于野生株 NJ-35 和互补株 qseC+ ( $P < 0.01$ ), 而与对照组比较, 无明显变化 (图 5-b)。结果表明, 在 NE 诱导下, qseB 的缺失可能抑制了嗜水气单胞菌的溶血活性, NE 介导的嗜水气单胞菌溶血活性可能依赖于 QseB。

### 2.6 NE 诱导下 QseB 对嗜水气单胞菌脂肪酶活性的影响

通过白色沉淀环直径与菌落直径的比值, 结果显示, 无论是否有 NE 诱导, 野生株 NJ-35、突变株 ΔqseB 和互补株 qseC+的脂肪酶活性均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 6), 表明 NE 不影响嗜水气单胞菌脂肪酶的活性, QseB 也不影响 NE 诱导下的嗜水气单胞菌脂肪酶的分泌。

### 2.7 人工感染实验结果

在注射 PBS 对照组中, 鱼体感染野生株 NJ-35 和突变株 ΔqseB 后 7 d 死亡量非常少, 存活率没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。感染 4 h 后注射 NE 组中, 鱼体感染野生株 NJ-35 和突变株 ΔqseB 的存活率分别下降至 53.33% 和 83.33%, 存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。结果表明, NE 能够显著增强嗜水气单胞菌 NJ-35 野生株和突变株对罗非鱼的致

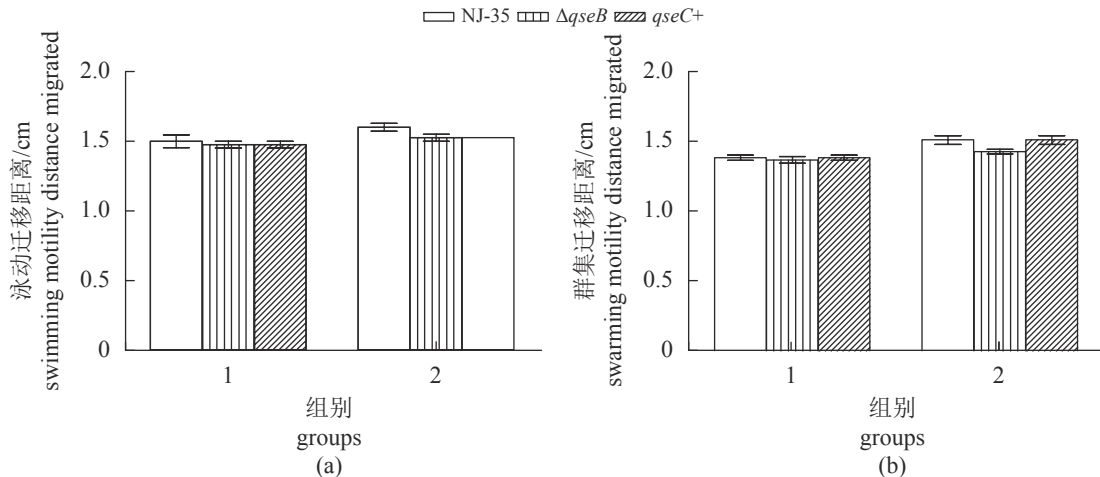


图 4 嗜水气单胞菌经 NE 诱导后的泳动能力 (a) 和群集能力 (b)

Fig. 4 Swimming (a) and swarming (b) motility of *A. hydrophila* in the presence of NE

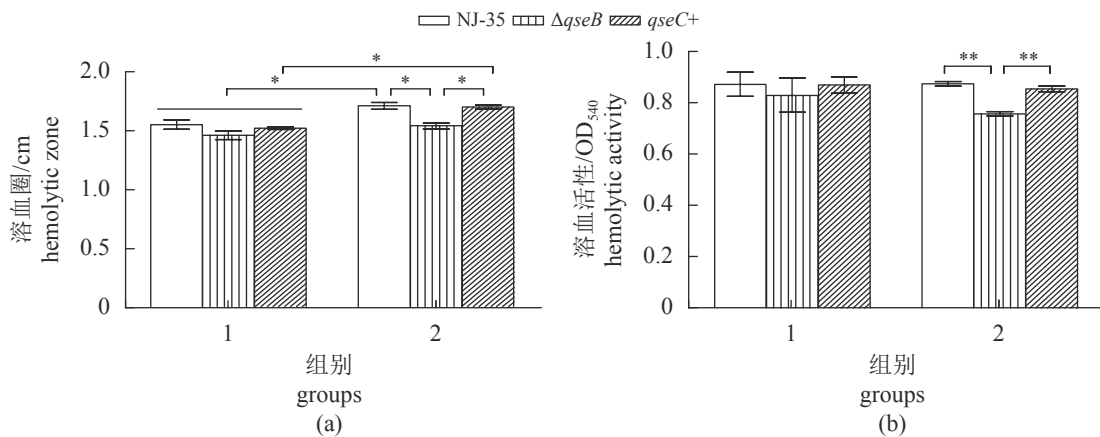


图 5 嗜水气单胞菌经 NE 诱导后的溶血活性

(a) 嗜水气单胞菌在绵羊血平板中形成的溶血圈直径, (b) 嗜水气单胞菌胞外蛋白对绵羊血细胞的溶血活性; \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 5 Hemolytic activity of *A. hydrophila* in the presence of NE

(a) the diameter of the hemolysis circle formed by *A. hydrophila* in the sheep blood plate, (b) the hemolytic activity of the extracellular protein secreted by *A. hydrophila* on the sheep blood cells; \*\* denotes extremely significant difference ( $P < 0.01$ )

死亡率; 敲除 *qseB* 后, 突变株对鱼体的致死率显著低于野生株。由此推测, QseB 可能在 NE 调控嗜水气单胞菌毒力的过程中发挥着重要作用。

### 3 讨论

应激是水生动植物细菌病暴发的重要诱发因素<sup>[14]</sup>。细菌能够感应宿主分泌的儿茶酚胺类激素, 提高细菌生长、运动和致病力<sup>[15]</sup>, 如胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)<sup>[16]</sup>、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)<sup>[17]</sup>、弧菌 (*Vibrio* spp.)<sup>[18]</sup> 等。在自然界中, 细菌普遍生存在低铁条件下, NE 可以促进细菌从宿主结合蛋白中攫取铁来刺激生长<sup>[19-21]</sup>。在铁限制培养基 serum-

SAPI 中, NE 可以显著促进嗜水气单胞菌 NJ-35、AH196 的生长和毒力<sup>[9-10]</sup>, 而 *qseB* 的缺失则降低了 NE 的促生长作用 (图 1), 这与 *qseC* 缺失对细菌生长影响的结果相似<sup>[12]</sup>, 由此推测 QseBC 双组分调控系统在 NE 促生长中发挥着重要作用。

生物膜的形成能力是细菌传播和致病的重要毒力因子, 细菌形成的生物膜能够经受各种化学和物理刺激, 比单独生存或浮游状态的细菌更易抵抗宿主防御<sup>[22-25]</sup>。儿茶酚胺类激素可以促进细菌的黏附和生物膜形成<sup>[9,13,17,26-31]</sup>。本研究发现, *qseB* 的缺失显著抑制了 NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 生物膜形成能力的增强作用, 推测 NE 对 NJ-35 生物膜形成的促进作用可能依赖于 QseB, 与

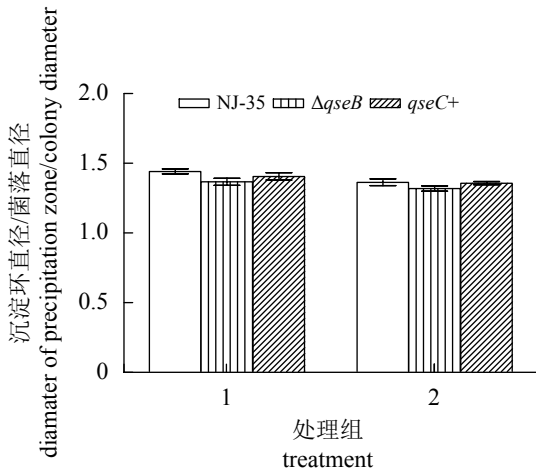


图6 嗜水气单胞菌经 NE 诱导后的脂肪酶活性

Fig. 6 Lipase activity of *A. hydrophila* in the presence of NE

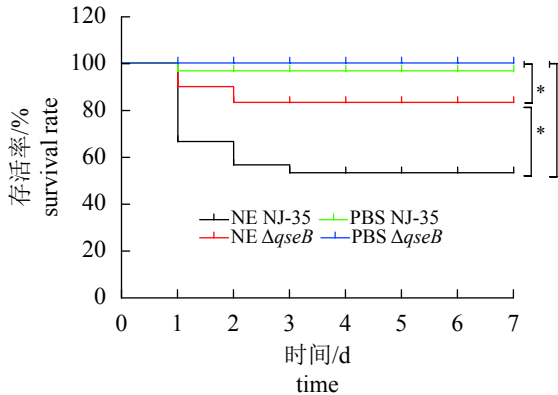


图7 嗜水气单胞菌经 NE 诱导后对  
奥利亚罗非鱼的致病力

Fig. 7 Pathogenicity of *A. hydrophila* to  
*O. aureus* induced by NE

QseC 的作用相似<sup>[12]</sup>；与之相反，在嗜水气单胞菌 SSU 中，*qseB* 的缺失反而增强了生物膜的形成<sup>[13]</sup>。此外，*qseB* 的缺失也降低了鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、土拉杆菌 (*Francisella novicida*) 生物膜的形成<sup>[31-32]</sup>；而对大肠杆菌的生物膜形成没有显著影响<sup>[33]</sup>，这可能是由于不同细菌的特异性靶基因和调控机制存在着很大差异。

细菌的运动有助于生物膜的形成和对宿主的黏附，儿茶酚胺类激素可以增强许多病原菌的运动，提高致病力<sup>[2,5,27-30]</sup>。在大肠杆菌 EHEC 中，QseB 可以直接结合鞭毛主调节器 FlhDC 启动子来调控细菌鞭毛和运动<sup>[34]</sup>；在 AI-3 介导下，QseB 具有双重调控功能，根据其磷酸化状态与靶启动子中的不同位点结合，抑制或促进靶基因的表达

达<sup>[35]</sup>。大肠杆菌 EHEC 和鼠伤寒沙门氏菌经 AI-3/NE 诱导，*qseB* 的缺失不会影响细菌的运动，但 *qseC* 的缺失会显著抑制细菌的运动，主要由于 QseB 的过表达或者未磷酸化 QseB 的富集抑制了鞭毛相关基因的表达，从而导致对细菌运动的负调控<sup>[36]</sup>。在迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 中，*qseB* 和 *qseC* 的缺失均降低了细菌的运动能力，但可以通过互补恢复<sup>[7]</sup>。但是，在嗜水气单胞菌 NJ-35 中，无论是否经 NE 诱导，*qseB* 和 *qseC*<sup>[12]</sup> 的缺失均未影响细菌的泳动和群集运动。与之相反，在 LB 培养基中，*qseB* 的缺失均显著降低了嗜水气单胞菌 SSU 的泳动和群集能力<sup>[13]</sup>，这可能是因为培养基的不同或细菌的靶位点存在差异。

嗜水气单胞菌 NJ-35 的溶血活性受到 NE 的调控。与孟雨潇等<sup>[12]</sup>的结果联合分析发现，在无 NE 诱导时，*qseB* 的缺失对 NJ-35 的溶血活性无显著影响，但 *qseC* 的缺失却抑制了 NJ-35 的溶血活性，而互补株 *qseC+* (*qseBC* 共互补) 则恢复到野生菌的水平；经 NE 诱导后，与对照组 (PBS) 比较，野生株 NJ-35、 $\Delta qseC$ 、*qseC+* 的溶血活性均显著上调，但  $\Delta qseB$  无显著变化，导致与野生株的溶血活性存在显著差异，推测 NE 对 NJ-35 溶血活性的增强作用可能依赖于 QseB，未磷酸化的 QseB 可能是溶血活性的阻遏蛋白，而 QseC 调控着 QseB 抑制因子的活性， $\Delta qseC$  溶血活性的增强可能是 NE 通过调控其他非 QseC 途径激活了 QseB 的磷酸化，而互补株与野生株相比无变化，可能是因为 QseB 和 QseC 处于一种平衡状态，这一推测还需进一步研究证实。而由于菌株的差异，Gao 等<sup>[10]</sup>发现 NE 并不影响嗜水气单胞菌 AH196 的溶血活性。此外，在无 NE 诱导的 LB 培养基中，*qseB* 的缺失显著降低了嗜水气单胞菌 SSU 的溶血活性<sup>[13]</sup>。

儿茶酚胺类激素可以显著增强细菌的致病力，包括鲁氏耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*)、鼠伤寒沙门氏菌、嗜水气单胞菌等<sup>[9-10,29,37]</sup>。在鼠伤寒沙门氏菌中，经 NE 介导，与野生株相比， $\Delta qseC$  在猪胃肠道中的竞争能力降低<sup>[5,38]</sup>，在猪粪便中的定殖能力也降低，而  $\Delta qseBC$  的表型与野生株相似，表明 QseB 是  $\Delta qseC$  毒力减弱的必要条件<sup>[19]</sup>；与之相比，在小鼠 (*Mus musculus*) 中，鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta qseC$  在宿主脾脏和肝脏的定殖没有减弱，而  $\Delta qseBC$  则降低了定殖的竞争能力，对雌性 BALB/c 小鼠的死亡率延迟了 2 d<sup>[6]</sup>。在迟缓爱德华



华氏菌中,  $\Delta qseB$  和  $\Delta qseC$  均延缓了斑马鱼 (*Danio rerio*) 的死亡率, 减弱了对宿主的感染能力<sup>[31]</sup>。在本研究中,  $qseB$  的缺失显著降低了罗非鱼的死亡率, 抑制了 NE 对嗜水气单胞菌毒力的增强作用, 这一现象与  $qseC$  缺失相似<sup>[12]</sup>, 结果表明 QseBC 双组份调控系统在嗜水气单胞菌响应 NE、增强毒力的过程中发挥着重要作用。

综上所述,  $qseB$  在嗜水气单胞菌识别响应应激激素 NE 过程中发挥作用, 调控细菌生长、生物膜形成和溶血活性, 增强病原菌对奥利亚罗非鱼的致死率。研究结果进一步丰富了应激引起的养殖鱼类细菌性败血症暴发机制以及病原菌与宿主相互作用的相关研究内容。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Sperandio V, Torres A G, Jarvis B, *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(15): 8951-8956.
- [2] Freestone P P E, Sandrini S M, Haigh R D, *et al.* Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(2): 55-64.
- [3] Rasko D A, Moreira C G, Li D R, *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development[J]. *Science*, 2008, 321(5892): 1078-1080.
- [4] Sperandio V, Torres A G, Kaper J B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(3): 809-821.
- [5] Bearson B L, Bearson S M D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44(4): 271-278.
- [6] Merighi M, Septer A N, Carroll-Portillo A, *et al.* Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 42.
- [7] Wang X, Wang Q Y, Yang M J, *et al.* QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 944-953.
- [8] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. *水产学报*, 1992, 16(3): 282-288.
- Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282-288 (in Chinese).
- [9] Dong Y H, Liu J, Pang M D, *et al.* Catecholamine-stimulated growth of *Aeromonas hydrophila* requires the TonB2 energy transduction system but is independent of the amonabactin siderophore[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 183.
- [10] Gao J W, Xi B W, Chen K, *et al.* The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(4): e00664.
- [11] Pang M D, Jiang J W, Xie X, *et al.* Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9833.
- [12] 孟雨潇, 秦婷, 习丙文, 等等. 嗜水气单胞菌 QseC 在响应去甲肾上腺素中的作用[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(2): 250-259.
- Meng Y X, Qin T, Xi B W, *et al.* Role of sensor histidine kinase QseC of *Aeromonas hydrophila* in response to norepinephrine[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 250-259 (in Chinese).
- [13] Khajanchi B K, Kozlova E V, Sha J, *et al.* The two-component QseBC signalling system regulates *in vitro* and *in vivo* virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 259-271.
- [14] Braithwaite V A, Ebbesson L O E. Pain and stress responses in farmed fish[J]. *Revue Scientifique et Technique*, 2014, 33(1): 245-253.
- [15] Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria[J]. *Life Sciences*, 1992, 50(3): 203-212.
- [16] Li L, Chen Z H, Bei W C, *et al.* Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121887.
- [17] Lyte M, Freestone P P, Neal C P, *et al.* Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9352): 130-135.



- [18] Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, *et al.* Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44(6): 649-653.
- [19] Burton C L, Chhabra S R, Swift S, *et al.* The growth response of *Escherichia coli* to neurotransmitters and related catecholamine drugs requires a functional enterobactin biosynthesis and uptake system[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(11): 5913-5923.
- [20] Anderson M T, Armstrong S K. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(11): 3940-3947.
- [21] Freestone P P E, Lyte M, Neal C P, *et al.* The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(21): 6091-6098.
- [22] Huq A, Whitehouse C A, Grim C J, *et al.* Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 244-247.
- [23] Oggioni M R, Trappetti C, Kadioglu A, *et al.* Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1196-1210.
- [24] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [25] Singh R, Paul D, Jain R K. Biofilms: Implications in bioremediation[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(9): 389-397.
- [26] Yang K, Meng J, Huang Y C, *et al.* The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 70(1): 391-398.
- [27] Bansal T, Englert D, Lee J, *et al.* Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157: H7 chemotaxis, colonization, and gene expression[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(9): 4597-4607.
- [28] Yang Q, Anh N D Q, Bossier P, *et al.* Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 584.
- [29] Delshad S T, Soltanian S, Sharifiyazdi H, *et al.* Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation in rainbow trout[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(4): 477-487.
- [30] Cambronel M, Tortuel D, Biaggini K, *et al.* Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 20203.
- [31] Ji Y, Li W L, Zhang Y, *et al.* QseB mediates biofilm formation and invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhi[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 104: 6-11.
- [32] Durham-Colleran M W, Verhoeven A B, van Hoek M L. *Francisella novicida* forms *in vitro* biofilms mediated by an orphan response regulator[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(3): 457-465.
- [33] Gou Y, Liu W Q, Wang J J, *et al.* CRISPR-Cas9 knock-out of *qseB* induced asynchrony between motility and biofilm formation in *Escherichia coli*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(9): 691-702.
- [34] Clarke M B, Sperandio V. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and  $\sigma^{28}$  (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(6): 1734-1749.
- [35] Hughes D T, Clarke M B, Yamamoto K, *et al.* The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(8): e1000553.
- [36] Bearson B L, Bearson S M D, Lee I S, *et al.* The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium QseB response regulator negatively regulates bacterial motility and swine colonization in the absence of the QseC sensor kinase[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48(6): 214-219.
- [37] Pande G S J, Suong N T, Bossier P, *et al.* The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio campbellii*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(3): 761-769.
- [38] Pullinger G D, van Diemen P M, Carnell S C, *et al.* 6-hydroxydopamine-mediated release of norepinephrine increases faecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in pigs[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(5): 68.

## QseB regulates *in vitro* and *in vivo* virulence of *Aeromonas hydrophila* in response to norepinephrine

QIN Ting<sup>1,2</sup>, XI Bingwen<sup>1,2,3\*</sup>, XIE Jun<sup>1,2,3</sup>, PAN Liangkun<sup>1,2</sup>

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Stress is unavoidable in the aquaculture environment. Upon exposure to stress, the host stress hormones profoundly affect the pathogenicity of bacteria. It has been demonstrated that the inter-kingdom communication between bacteria and their hosts is mediated by catecholamines hormones epinephrine (Epi)/ norepinephrine (NE), and transduced by QseBC two-component system (TCS). In bacteria, QseBC TCS is a widely used signal transduction mechanism that facilitates in eliciting an adaptive response to various environmental stimuli. It consists of a membrane-associated sensor histidine kinase (HK) QseC and a cytoplasmic response regulator (RR) QseB. In most cases, QseC senses and recognizes environmental signals, following activation via self-phosphorylation at a conserved histidine residue. The phosphoryl group is then transferred to a conserved aspartate residue of QseB. The activated response regulator then exerts its regulation on bacterial virulence. *Aeromonas hydrophila* is a common aquatic bacterium and can cause motile Aeromonad septicemia (MAS) in aquatic animals especially fish. Recently, QseC has been reported to regulate the virulence of *A. hydrophila* in response to NE. However, the specific role of QseB in NE-enhanced virulence of *A. hydrophila* remains poorly understood. In this study, we constructed a *qseB* gene deletion mutant of *A. hydrophila* NJ-35 ( $\Delta qseB$ ) and examined the virulence both *in vitro* and *in vivo* in the presence or absence of NE (100  $\mu\text{mol/L}$ ). The results showed that the deletion of *qseB* gene significantly reduced the growth-promoting effect of NE on *A. hydrophila* compared to the wild type strain NJ-35. Meanwhile, the biofilm formation ability of the  $\Delta qseB$  mutant was remarkably lower than that of the wild type strain NJ-35 in the presence of NE, while no significant difference was observed when bacteria were cultured without NE. Also, the hemolytic activities of  $\Delta qseB$  exhibited significant decrease compared to the wild type strain NJ-35 with NE treatment. However, there were no significant differences in the motility and lipase activity between the  $\Delta qseB$  mutant and wild type strain NJ-35 with or without NE. Additionally, the  $\Delta qseB$  mutant displayed a dramatically decreased virulence in the experimental infection of *Oreochromis aureus*. In conclusion, our data suggest that the biofilm formation and hemolytic activity enhanced by NE may be dependent on the phosphorylated QseB in *A. hydrophila* NJ-35, indicating that QseB plays an important role in the outbreak of hemorrhagic septicemia disease induced by fish stress. Our study further reveals the pathogenesis of *A. hydrophila* in response to NE and may provide a new theoretical basis for the research on communication between bacteria and their hosts.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; QseB; norepinephrine; virulence

**Corresponding author:** XI Bingwen. E-mail: xibw@ffrc.cn

**Funding projects:** China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45); National Key R&D Program of China (2020YFD0900300)