

杀香鱼假单胞菌 3 株毒力相关基因缺失突变株的构建及其生物学特性

贾婷婷, 池宇, 李珊珊, 陈吉刚, 毛芝娟*

浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波

贾婷婷, 池宇, 李珊珊, 陈吉刚, 毛芝娟. 杀香鱼假单胞菌 3 株毒力相关基因缺失突变株的构建及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3643-3656.

JIA Tingting, CHI Yu, LI Shanshan, CHEN Jigang, MAO Zhijuan. Construction and biological characterization of three virulence-related gene deletion mutants of *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3643-3656.

摘要: 杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)是大黄鱼内脏白点病的致病菌, 目前对该菌的致病机制已有一定了解, 并筛选出部分有效疫苗, 但尚无商品化疫苗问世。【目的】深入研究该菌的致病机制, 开发高效的杀香鱼假单胞菌弱毒活疫苗。【方法】以亲本株杀香鱼假单胞菌 NB2011 为基础, 采用双同源重组法, 选择与群体感应系统(quorum sensing, QS)相关的 *luxR* 基因、 σ 因子 *rpoE* 基因进行敲除, 构建缺失突变株; 同时构建主要毒力因子六型分泌系统(T6SSI)与 *luxR* 基因联合缺失株 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 。对缺失突变株进行生物学特征检测、毒力特性分析及对金鱼的免疫保护率评估。【结果】成功构建缺失突变菌株 $\Delta luxR$ 、 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 及 $\Delta rpoE$ 。与野生株相比, 3 株缺失突变株的生长速度、泳动能力以及游泳能力未表现出显著差异; $\Delta luxR$ 、 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 两突变株的生物膜形成能力显著降低。观察不同菌株对小鼠巨噬细胞 J774A.1 的内化、吸附和胞内增殖现象, 发现 3 株缺失突变株均能在巨噬细胞中存活, 但增殖能力明显低于野生株。以 1.0×10^7 cells/mL 的浓度腹腔注射人工感染草金鱼, 与野生株相比, 2 株单突变株对鱼体的毒力表现了明显的降低; 相同剂量的双突变株 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 攻击草金鱼未表现出毒力, 其对草金鱼的 $LD_{50} > 10^8$ cells/mL。选择双突变株 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 注射接种草金鱼, 28 d 后用野生株进行人工攻击, 免疫保护率为 78.60%, 达到有效保护水平。【结论】本研究成功构建了 3 株毒力基因缺失突变株, 突变株的毒力明显下降, 其中 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 株有望作为开发杀香鱼假单胞菌弱毒活疫苗的候选株。

关键词: 杀香鱼假单胞菌; 双同源重组; 缺失突变; 生物学特性; 毒力分析; 免疫保护率

资助项目: 宁波市公益性科技计划重点项目(2023S005)

This work was supported by the Ningbo Key Projects of Public Welfare Science and Technology Plan (2023S005).

*Corresponding author. E-mail: mzzjjane@hotmail.com

Received: 2025-01-20; Accepted: 2025-03-20; Published online: 2025-05-29

Construction and biological characterization of three virulence-related gene deletion mutants of *Pseudomonas plecoglossicida*

JIA Tingting, CHI Yu, LI Shanshan, CHEN Jigang, MAO Zhijuan*

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: *Pseudomonas plecoglossicida* is the pathogen of visceral white spot disease in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). At present, the pathogenic mechanism of *P. plecoglossicida* has been partially understood, and some effective vaccines have been screened, whereas no commercial vaccine has been developed. **[Objective]** To deepen the understanding about the pathogenic mechanism and develop efficient attenuated live vaccines of *P. plecoglossicida*. **[Methods]** We targeted *luxR* and the RNA polymerase σ factor gene *rpoE* associated with quorum sensing to construct deletion mutants of *P. plecoglossicida* NB2011 by double homologous recombination. In addition, the strain $\Delta T6SS1\Delta luxR$ with deletion of both the type VI secretion system 1 (T6SS1) gene and *luxR* was constructed. The biological characteristics and virulence of the mutants were analyzed. The relative percent of survival of fish after vaccination with the double deletion mutant was investigated. **[Results]** We successfully constructed $\Delta luxR$, $\Delta T6SS1\Delta luxR$, and $\Delta rpoE$. Compared with the wild type, none of the three mutants showed significant changes in the growth rate, swarming ability or swimming ability, while $\Delta luxR$ and $\Delta T6SS1\Delta luxR$ showed significant decreases in biofilm formation. The internalization, adsorption, and intracellular proliferation of the mutants in mouse macrophages were observed. All the three mutants could survive in J774A.1 macrophages and showed lower proliferation capacities than the wild type. Compared with the wild type, the two single mutants showed significantly reduced virulence to goldfish (*Carassius auratus*) after intraperitoneal injection at a concentration of 1.0×10^7 cells/mL. The double deletion mutant $\Delta T6SS1\Delta luxR$ showed no virulence when challenging goldfish at the same dose, with the $LD_{50} > 10^8$ cells/mL. In the immune protection experiment, the goldfish was vaccinated with $\Delta T6SS1\Delta luxR$, and the fish was artificially challenged with the wild type 28 days later. The relative percent of survival reached 78.60%, which indicated effective protection. **[Conclusion]** In this study, three gene deletion mutants were successfully constructed, and the virulence of the mutants was significantly decreased. Among them, $\Delta T6SS1\Delta luxR$ is expected to be a candidate strain for the development of the attenuated live vaccine against *P. plecoglossicida* infection.

Keywords: *Pseudomonas plecoglossicida*; double homologous recombination; deletion mutation; biological characteristics; virulence assay; relative percent of survival

杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)是养殖大黄鱼和斜带石斑等海水鱼类内脏白点病的致病菌^[1]。目前,关于该菌的致病机制已有

一定了解。该菌通常在低温条件下感染鱼类导致发病,其主要毒力因子包括六型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)、三型分泌系统

(type III secretion system, T3SS)、铁载体和多套鞭毛等;致病基因包括编码冷休克蛋白家族成员(CspA1)的基因、 σ 因子 E (rpoE)、锌运输系统的成员(ZnuCBA、ZnuA、ZnuC)、转录调控编码基因(RK21-RS10325)等^[2]。研究者先后观察到了该菌在感染鱼巨噬细胞中胞内增殖的现象,并提出该菌具有兼性胞内寄生菌的特性^[3]。疫苗保护性研究表明,灭活疫苗对该菌感染的保护效果较弱,而多种通过缺失毒力因子/基因构建的弱毒活疫苗(live attenuated vaccine, LAV)获得了相对理想的保护效果,包括 $\Delta TssD$ 、 $\Delta T6SSI\Delta 4885$ 、 $\Delta rpoS$ 等^[4-6]。利用基因沉默技术获得的 *cspA1*、*rpoE* 基因敲低株免疫斜带石斑鱼后,也激发了有效保护^[7-8]。这种结果与该菌兼性胞内寄生菌的生物学特性是一致的:弱毒活疫苗能够模拟病原自然感染进入宿主体内的过程,有效激活宿主的细胞免疫和体液免疫,从而在后续感染中全面清除体内的病原菌。目前,弱毒活疫苗已成为该菌疫苗研制的主要方向。

本研究参考杀香鱼假单胞菌弱毒活疫苗的前期研究思路,选择与毒力因子或重要生物学通路相关的基因作为靶基因构建缺失突变株。*LuxR* 是细菌密度依赖的群体感应系统(quorum sensing, QS)中的转录调控蛋白,在调节菌体密度相关表型中起到关键作用,推测其与菌体致病性存在密切关联^[9]。*RpoE* 是一种细胞外功能 σ 因子,可以响应环境刺激(如温度)调节基因表达^[10];该因子在一些细菌病原体的转录水平上参与毒力调节,可能在 *P. plecoglossicida* 的发病机制中起重要作用^[11]。研究者已验证 T6SS1 是该菌的重要毒力因子^[4,12]。因此,本研究选择 *luxR*、*rpoE* 作为靶基因构建缺失突变株,并对突变株的生物学表型、毒力特性及免疫原性进行了检测与分析,旨在为开发杀香鱼假单胞菌弱毒活疫苗提供更多的候选菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与细胞

P. plecoglossicida NB2011 野生株(WT)从浙江省象山港养殖网箱的患病大黄鱼脾脏中分离,经鉴定后由本实验室保存^[13], $\Delta T6SSI$ 突变株由本课题组前期构建并保存^[12]。*Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* WM3064 [2,6-二氨基庚二酸(2,6-diaminopimelic acid, DAP)营养缺陷型]感受态细胞和自杀质粒 pK18mobsacB-Ery 均由实验室保存。小鼠巨噬细胞 J774A.1 购自海星生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

假单胞菌显色培养基(科玛嘉)购自 CHROMagar 公司;酵母粉、蛋白胨购自 Oxoid 公司;DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自 Corning 公司;胰酶购自 Gibco 公司;割胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司;DAP 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;结晶紫、卡那霉素、氨苄青霉素、庆大霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,各抗生素的使用浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$;限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;2 $\times$ Taq MasterMix 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;氯化钠等常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司,试剂均为分析纯。

1.1.3 实验动物

实验动物为平均体重(10 $\pm$ 5) g 的健康草金鱼,购自宁波某花鸟市场。本研究所有动物实验均获得浙江万里学院实验动物伦理委员会的伦理审查批准,批准号为 20250417001。

1.1.4 引物设计

根据 *P. plecoglossicida* NB2011 全基因组序列(NCBI 登录号为 ASJX000000000),按照同源重组的原理,利用 SnapGene 软件设计构建 *luxR*、*rpoE* 基因缺失株的引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size (bp)
luxR-MF1	GCTCTAGAAGGGTCAGGAAGCCGAAT	529
luxR-MR1	GGAATGGCTGTCAGATCAGCATCCGTTACTCCCTTGGT	
luxR-MF2	ACCAAGGGAGTAACGGATGCTGATCTGACAGCCATTCC	585
luxR-MR2	CCCAAGCTTGTACTTCTCCAGCAGGTC	
rpoE-MF1	GCTCTAGAGCCTCTTCATTGCACAGG	686
rpoE-MR1	GCTGTCTCAGGTTTCCTGCTGGGTTAGCATGAACAC	
rpoE-MF2	GTGTTTCATGCTAACCAGCAGGAAACCTGAGACAGC	480
rpoE-MR2	AAAACCTGCAGGTTGCTCACTGCTCTCAC	
luxR-wS	CACCGAATACACCAGCTTGAT	714/1 410
luxR-wA	GGTACGCGATTCTACAGCG	
luxR-dS	CCGCAAGCTGAACAGGTT	914/1 610
luxR-dA	CTTCTTCTGAGCCAGCGA	
rpoE-wS	CAGGTGGAACCTCGAAACC	897/1 539
rpoE-wA	CGACGCAATTCCAATTCTG	
rpoE-dS	CTGCGTATCCGAAACCTG	957/1 479
rpoE-dA	CCCTGGTAACTCTGCTTT	
M13F(-47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13R(-48)	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	

MF1/MR1、MF2/MR2分别为上、下游同源片段的克隆引物；wS/wA、dS/dA分别为缺失突变株和插入突变株的检测引物；M13F(-47)/M13R(-48)为重组克隆子的鉴定引物；下划线表示限制性内切酶识别位点。

MF1/MR1, MF2/MR2 were the cloning primers for the upstream and downstream homologous fragments, respectively; wS/wA, dS/dA were used as the detection primers for the deletion and insertion mutants, respectively; M13F(-47)/M13R(-48) were used as the identification primers for the recombinant clone; Underscores indicate restriction enzyme recognition sites.

1.2 基因缺失突变菌株的构建

为清晰阐述实验方法，本研究以 $\Delta rpoE$ 缺失突变株为例，详细描述整个构建过程。单个基因缺失突变株构建的亲本株为野生株 *P. plecoglossicida* NB2011，*T6SSI/luxR* 双基因缺失突变株则以 $\Delta T6SSI$ ^[12]为出发菌株，构建方法与 $\Delta luxR$ 相同。

1.2.1 *P. plecoglossicida* NB2011 基因组提取

取甘油保藏的 *P. plecoglossicida* NB2011 菌株在科玛嘉显色培养基上划线活化，28 °C培养至单菌落长出。之后用无菌枪头挑取单菌落至装有 50 μ L 无菌水的 PCR 管中，金属浴 105 °C 处理 15 min。

1.2.2 *pK18mobSacB-rpoE* 重组自杀质粒的构建及转化

以 *P. plecoglossicida* NB2011 基因组为模板，采用引物 rpoE-MF1/rpoE-MR1、rpoE-MF2/rpoE-MR2 分别扩增，得到 *rpoE* 上游同源臂 A 片段和下游同源臂 B 片段，并采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化；以 A、B 片段为模板，采用引物 rpoE-MF1/rpoE-MR2 扩增，获得 *rpoE* 的融合 AB 片段，并用纯化试剂盒进行纯化。PCR 反应体系(50 μ L)：*ExTaq* (5 U/ μ L) 0.25 μ L，10 $\times$ *ExTaq* buffer 5 μ L，dNTP Mixture 4 μ L，上、下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L，DNA 模板 1 μ L，ddH₂O 37.75 μ L。PCR 反应条件：95 °C预变性 5 min，

95 °C变性 45 s, 57.6 °C退火 1 min, 72 °C延伸 30 s, 5 个循环; 95 °C变性 45 s, 68 °C退火 1 min, 72 °C延伸 2 min 30 s, 30 个循环; 72 °C终延伸 10 min, 10 °C保温。

将 AB 纯化片段与自杀质粒 pK18*mob*sacB-Ery 分别置于 37 °C, 用 *Xba* I 和 *Pst* I 进行双酶切。片段纯化后在 16 °C低温连接过夜, 将连接的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。待菌落长好, 用 M13F(-47)/M13R(-48)引物筛选 AB 插入的重组克隆, 并将鉴定成功的阳性克隆子进行测序。测序完成并比对后, 挑选出序列完全一致、无突变的阳性克隆子用于后续实验并进行菌种保藏, 同时提取重组质粒 pK18*mob*sacB-*rpoE* (简称 pK18-*rpoE*), 将提取的质粒转化至 DAP 营养缺陷型 *E. coli* WM3064 中, 得到供体菌 WM3064 (pK18*mob*sacB-*rpoE*)。

采用相同方法构建得到 pK18*mob*SacB-*luxR* 重组自杀质粒并转化培养后保藏。

1.2.3 插入突变株的构建

将供体菌 *E. coli* WM3064 (pK18-*rpoE*)与受体菌 *P. plecoglossicida* NB2011 按一定比例混合, 将混合后的菌悬液在固体 LB (DAP=0.3 mmol/L) 上 28 °C接合 24 h。之后, 取重悬菌液进行 10 倍梯度稀释后涂布于 LB (卡那霉素为 50 μ g/mL)平板。28 °C培养过夜后, 挑取纯化后的单克隆在 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} =0.6, 分别采用引物 *rpoE*-wS/*rpoE*-wA、*rpoE*-dS/*rpoE*-dA 对克隆进行 PCR 检测, 以野生型 NB2011 作为阴性对照。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 $\times$ Taq 酶 (0.1 U/ μ L) 25 μ L, 鉴定引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 4 μ L, ddH₂O 24 μ L。PCR 反应条件: 95 °C预变性 5 min; 95 °C变性 45 s, 47.5 °C退火 1 min, 30 个循环; 72 °C延伸 3 min 30 s, 10 °C保温。

1.2.4 缺失突变株的构建

挑取阳性克隆子接种于液体 LB 中, 28 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} =0.6。取重悬菌液进行 10 倍梯度稀释后涂布在含 20% 蔗糖的 LB 平

板上, 28 °C培养过夜。挑取平板上的克隆, 采用与插入突变株相同的检测方法对其进行 PCR 检测, 以野生型作为阴性对照。

1.3 突变株生物学特性分析

1.3.1 细菌生长曲线检测

分别挑取新鲜活化的 NB2011、 Δ *luxR*、 Δ *rpoE* 和 Δ T6SS1 Δ *luxR* 菌株, 接种至 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 培养过夜。取过夜培养物, 调整菌液浓度至 OD_{600} =0.6, 按照 1:100 的比例转接至 100 mL LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 培养。以转接时刻为 0 h, 3 h 后开始检测, 每间隔 1 h 分别测定 3–13 h 时刻的 OD_{600} 值。绘制横坐标为培养时间, 纵坐标为菌液 OD_{600} 值的生长曲线图, 每组设 3 个平行。

1.3.2 细菌泳动能力检测

分别挑取新鲜活化的 NB2011、 Δ *luxR*、 Δ *rpoE* 和 Δ T6SS1 Δ *luxR* 单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜。调整培养菌液至 OD_{600} =0.6, 吸取 2 μ L 菌液点种于新鲜配制的 LB 固体培养基中心, 分别培养 24 h 和 72 h 后, 用游标卡尺测量细菌泳动圈直径, 每组设 3 个平行。

1.3.3 细菌游泳能力检测

分别挑取新鲜活化的 NB2011、 Δ *luxR*、 Δ *rpoE* 和 Δ T6SS1 Δ *luxR* 菌株, 接种至 5 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜。调整培养菌液至 OD_{600} =0.6, 吸取 2 μ L 菌液穿刺于半固体培养基中心 (0.5% 琼脂浓度), 分别培养 24 h 和 72 h 后, 用游标卡尺测量细菌游泳圈直径, 每组设 3 个平行。

1.3.4 细菌生物膜形成测定

细菌生物膜形成能力参照文献[14]进行。吸取 100 μ L 调整好的菌液加入 96 孔微量板, 28 °C静置孵育 24 h。弃去孔中上清, 用无菌 PBS 缓冲液清洗后加入甲醇固定, 固定结束后加入 2% 结晶紫溶液, 室温下染色 15–20 min, 用无菌水冲洗直至无紫色水流出, 除去孔中残

余水后常温晾干；加入 33% 冰乙酸溶液以溶解结晶紫。在 590 nm 条件下，测定培养孔中溶液的 OD 值。每次试验每菌株做 3 个孔的重复，试验数值取 3 次平均值(D 值)；以未接种菌的培养液作为阴性对照，阴性值的 2 倍作为界限值(D_c)。根据 D 值，将菌株分类为：强生物被膜形成株(D 值大于 2 倍 D_c)、弱生物被膜形成株(D 值在 D_c 与 2 倍 D_c 之间)、无生物被膜形成株(D 值小于或等于 D_c)。

1.4 突变株毒力检测

1.4.1 突变株对巨噬细胞的黏附、内化和增殖特性观察

突变株对巨噬细胞的黏附、内化和增殖特性观察方法依照文献[12]进行。将培养 3 代后状态良好的鼠巨噬细胞 J774A.1 以 10^6 cells/孔的密度接种于 24 孔板中，在 37 °C、5% CO_2 的培养箱中生长过夜。根据巨噬细胞的计数结果，将用 PBS 调整好的 NB2011 和突变株按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10:1 在 DMEM 完全培养基中感染细胞。置于 30 °C、含 5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h，PBS 清洗细胞 3 次，用 1% Triton X-100 裂解细胞，涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的平板上检测活菌数，最终数值代表黏附值。其余的 24 孔板中以 PBS 清洗后，向孔中加入添加了 200 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基进行 2 h 孵育，杀死胞外细菌，用于检测内化的细菌数量。之后用 PBS 清洗细胞，除去庆大霉素，裂解细胞后，涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的平板上并计数活菌数量。其余的孔中，用 PBS 清洗将庆大霉素除去，以 DMEM 培养基继续培养，并以此时作为 0 h，每隔 4 h 用 PBS 清洗细胞，加入 1% Triton X-100 裂解细胞，进行活菌计数，检测细菌在巨噬细胞内的增殖情况。

1.4.2 突变株对草金鱼的毒力试验

分别挑取新鲜活化的 NB2011、 $\Delta luxR$ 、 $\Delta rpoE$ 和 $\Delta T6SS1\Delta luxR$ 单菌落接种至 5 mL LB

液体培养基中，28 °C、180 r/min 培养过夜(OD_{600} =1.0)，经血细胞计数板取样计数后，用无菌 PBS 洗涤并将菌液稀释至 1.0×10^7 cells/mL 的菌悬液浓度，备用。

杀香鱼假单胞菌对鲫鱼也表现出致病力^[15]。本研究选取同批次、平均体重(10 ± 5) g 的健康草金鱼，先在养殖室以充气水暂养适应 1 周以上。每组设 20 尾，分别经腹腔注射 0.1 mL 不同浓度的菌悬液，对照组注射相同剂量的 PBS。观察注射后 7 d 内的发病情况，统计死亡率。实验期间水温控制在(20 ± 1) °C。

1.5 突变株对草金鱼的免疫保护力

本研究选取同批次、平均体重(10 ± 5) g 的健康草金鱼，先在养殖室以充气水暂养适应 1 周以上。将鱼随机分为 4 组，每组 30 尾。根据毒力试验结果，选择毒力显著降低的突变株进行免疫保护试验。第 1 组和第 2 组为免疫组，经腹腔注射 0.1 mL 1.0×10^7 cells/mL 的菌悬液(菌悬液的注射浓度依据 LD_{50})；第 3、4 组为对照组，注射相同剂量的灭菌生理盐水。

接种 28 d 后，免疫试验组与对照组分别抽取 30 尾鱼，经腹腔注射 0.1 mL 1.0×10^8 cells/mL 的野生株 *P. plecoglossicida* NB2011 菌悬液进行人工攻击，随后记录感染鱼的症状和死亡情况。对病鱼进行解剖和观察，以确定死亡原因。试验结束后使用公式(1)^[16]计算相对免疫保护率(relative percent survival, RPS)。

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 基因缺失菌株的构建

2.1.1 重组自杀质粒的构建及转化

经过 PCR 扩增分别获得 *rpoE* 的上游同源臂 A 片段(686 bp)、下游同源臂 B 片段(480 bp)及融合 AB 片段(1 166 bp)(图 1)，与预期大小一致并进行割胶回收纯化。

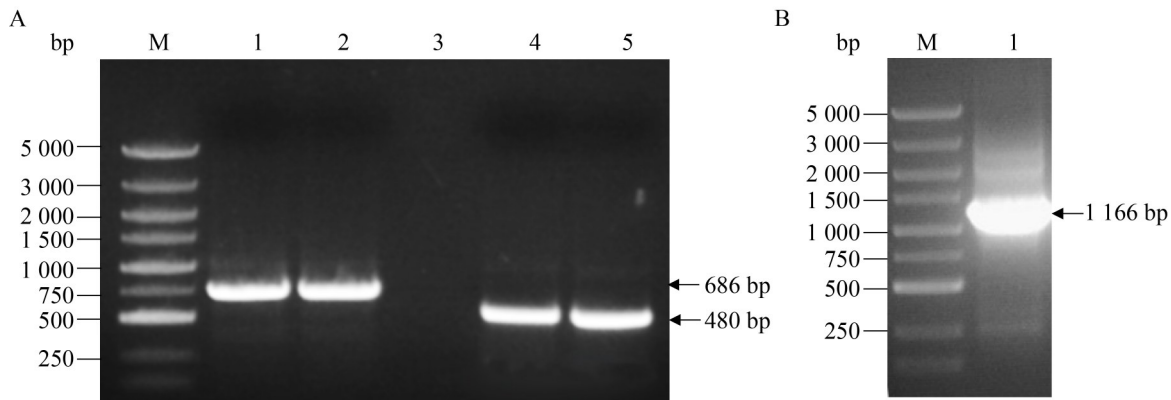


图1 *rpoE*基因上下游片段的扩增与融合。A: *rpoE*上下游片段的扩增(泳道1、2: A片段; 泳道4、5: B片段); B: *rpoE*上、下游片段的融合(泳道1: AB融合片段; 泳道M: DL5000 DNA marker)。

Figure 1 Amplification and fusion of upstream and downstream fragments of the *rpoE* gene. A: Amplification of the upstream and downstream fragments of *rpoE* (Lane 1, 2: A fragment; Lane 4, 5: B fragment); B: Fusion of the upstream and downstream fragments of *rpoE* (Lane 1: Fusion AB fragment; Lane M: DL5000 DNA marker).

2.1.2 插入突变株的构建

挑取纯化后的阳性克隆子转接至液体培养基培养, 分别用引物 *rpoE*-wS/*rpoE*-wA、*rpoE*-dS/*rpoE*-dA 进行检测, 以野生型和空白作为对照。野生株扩增片段分别为 1 479 bp、1 539 bp, 插入突变形成 5'端重组: 采用引物 *rpoE*-wS/*rpoE*-wA 扩增片段为 897 bp, 采用引物 *rpoE*-dS/*rpoE*-dA 扩增片段为 1 539 bp; 3'端重组: 采用引物 *rpoE*-wS/*rpoE*-wA 扩增片段为 1 479 bp, 采用引物 *rpoE*-dS/*rpoE*-dA 扩增片段为 957 bp。结果如图 2 所示, 1、3、4、6、7、8、9、10 均为阳性克隆子, 可以判断 1、3、4、7 克隆子为 3'端重组, 6、8、9、10 克隆子为 5'端重组。

2.1.3 缺失突变株的构建

挑取在含 20% 蔗糖的 LB 平板上长出的克隆子, 分别以 *rpoE*-wS/*rpoE*-wA、*rpoE*-dS/*rpoE*-dA 引物进行 PCR 检测, 以野生型和空白作为对照。正确的缺失突变克隆扩增产生 897、957 bp 片段, 野生型扩增片段为 1 479、1 539 bp。结果如图 3 所示, 克隆纯化后, 再次扩增验证, 并递交 PCR 产物测序, 测序结果证实缺失突变株构建成功。

同样采用上述方法, 成功构建了 $\Delta luxR$ 单

基因缺失突变株以及双基因突变株; 以 VI 型分泌系统缺失突变株 $\Delta T6SSI^{[12]}$ 作为受体菌, 构建了双突变株 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 。

2.2 突变株生物学特性分析

2.2.1 细菌的生长曲线

以转接时刻为 0 h, 3 h 后每隔 1 h 检测 1 次 OD_{600} , 分别测定 3–13 h 时刻的 OD_{600} 值。如图 4 所示, 与野生株相比, $\Delta luxR$ 、 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 两突变株的生长速度无明显变化, $\Delta rpoE$ 突变株的生长量在 0–5 h 期间与野生株相近, 5 h 后其生长量持续低于野生株, 但在统计学上差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2.2 细菌的泳动能力

所有菌株分别培养 24 h 和 72 h 后, 用游标卡尺测量细菌泳动圈直径。根据测量结果绘制柱状图与分析, 如图 5 所示。野生菌株 NB2011 与 3 株突变株在 24 h 和 72 h 的泳动能力均无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.2.3 细菌的游泳能力

吸取 2 μ L 菌液穿刺于半固体培养基中心 (0.5% 琼脂浓度), 28 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h 和 72 h 后, 用游标卡尺测量细菌游泳圈直径。根据实

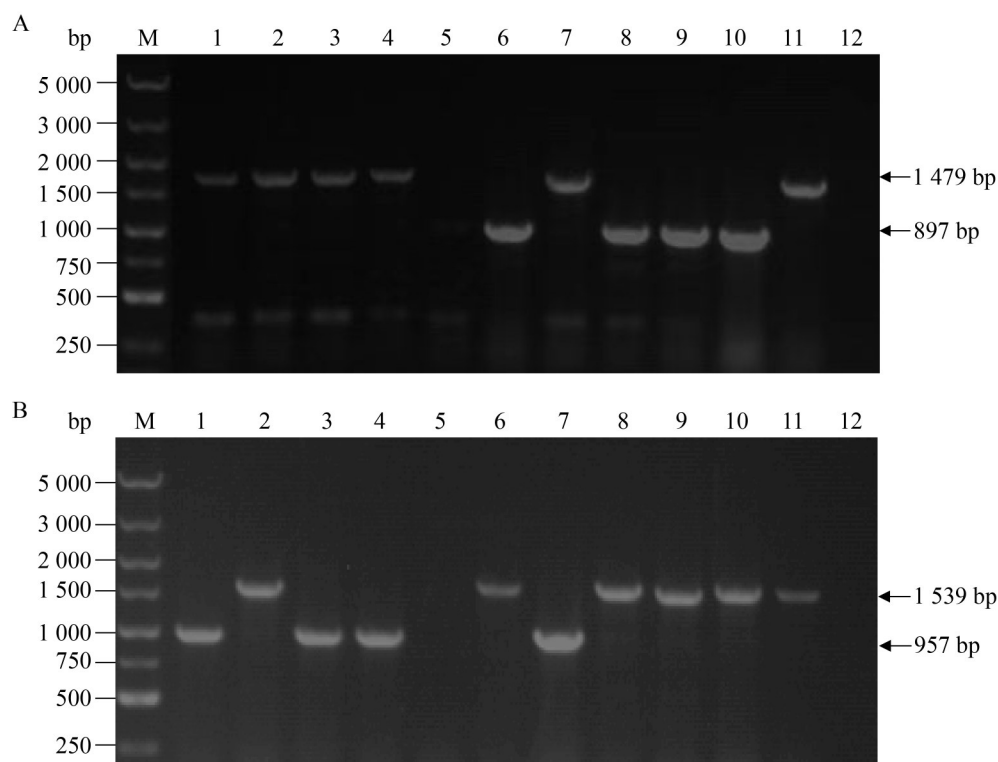


图2 *rpoE*插入突变株检测。A: 采用引物rpoE-wS/rpoE-wA检测结果; B: 采用引物rpoE-dS/rpoE-dA检测结果。泳道1、3、4、6、7、8、9、10: 阳性克隆; 泳道11: 以NB2011为阴性对照; 泳道12: 空白对照; 泳道M: DL5000 DNA marker。

Figure 2 Detection of *rpoE* insertion mutants. A: Primers rpoE-wS/rpoE-wA assay; B: Primers rpoE-dS/rpoE-dA assay. Lanes 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10: Positive clones; Lane 11: NB2011 was used as a negative control; Lane 12: Blank control; Lane M: DL5000 DNA marker.

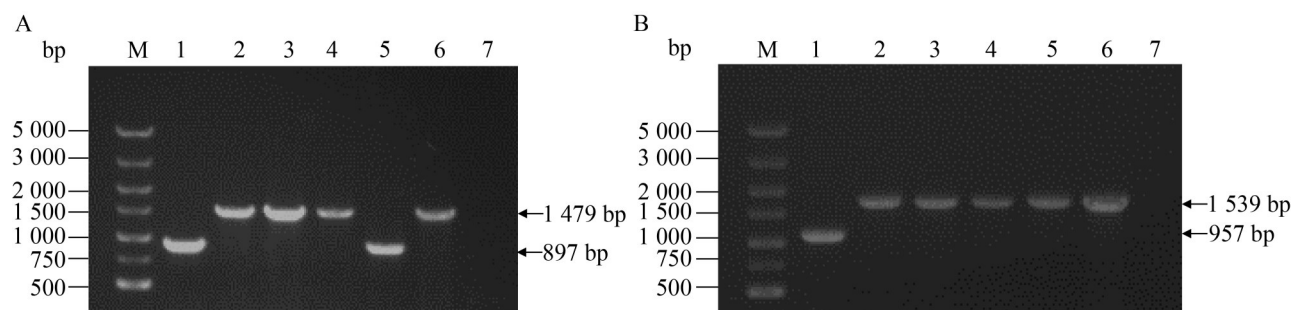


图3 *rpoE*缺失突变株检测。A: 采用引物rpoE-wS/rpoE-wA检测结果; B: 采用引物rpoE-dS/rpoE-dA检测结果。泳道1: 阳性克隆; 泳道2-5: 阴性克隆; 泳道6: 以NB2011为阴性对照; 泳道7: 空白对照; 泳道M: DL5000 DNA marker。

Figure 3 Detection of *rpoE* deletion mutant. A: Primers rpoE-wS/rpoE-wA assay; B: Primers rpoE-dS/rpoE-dA assay. Lane 1: Positive clone; Lanes 2-5: Negative clones; Lane 6: NB2011 was used as a negative control; Lane 7: Blank control; Lane M: Lane DL5000 DNA marker.

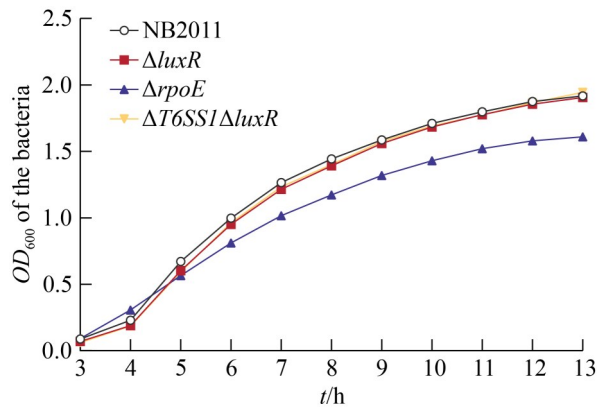


图4 野生株和突变株的生长曲线

Figure 4 Bacterial growth curves of wild type and mutant strains.

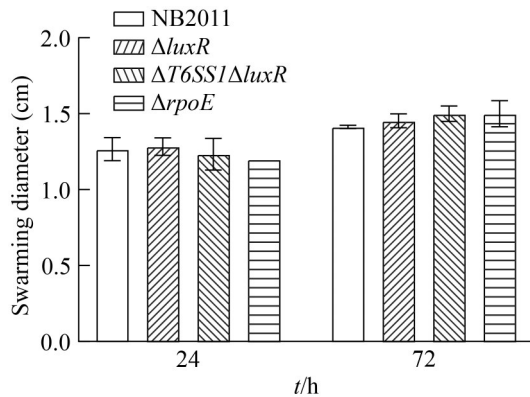


图5 野生株与突变株泳动能力检测。数据以3次试验的均值±标准差表示。

Figure 5 Detection of swarming ability of wild type and mutant strains. Data are expressed as mean±SD of three trials.

验结果绘制柱状图进行分析, 如图 6 所示。与野生株相比, 在 24 h 时 $\Delta luxR$ 、 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 、 $\Delta rpoE$ 的游泳能力均无显著性差异($P>0.05$); 在 72 h 时, 虽然 3 株突变株的游泳能力低于野生株, 但在统计学上差异不显著($P>0.05$)。

2.2.4 细菌的生物膜形成能力

各菌株的生物被膜形成能力数据绘制柱状图, 如图 7 所示。基于 D 值与 D_c 值判断, NB2011 菌株与突变株 $\Delta rpoE$ 均为强生物被膜形

成株, $\Delta luxR$ 介于强弱之间。3 株突变株的生物膜形成能力均弱于野生株, 与野生株相比, 突变株 $\Delta luxR$ 、 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 的差异显著($P<0.01$)。

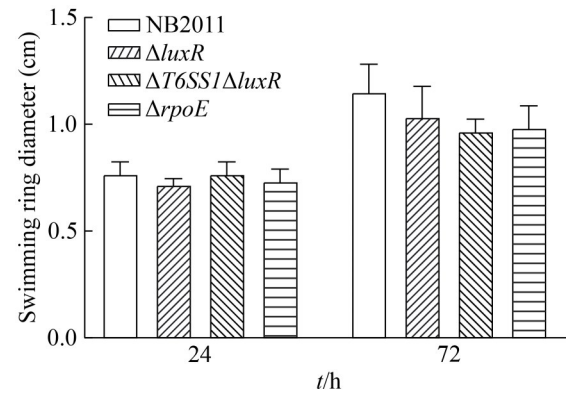


图6 野生株与突变株游泳能力检测。数据以3次试验的均值±标准差表示。

Figure 6 Swimming ability test for wild type and mutant strains. Data are expressed as mean±SD of three trials.

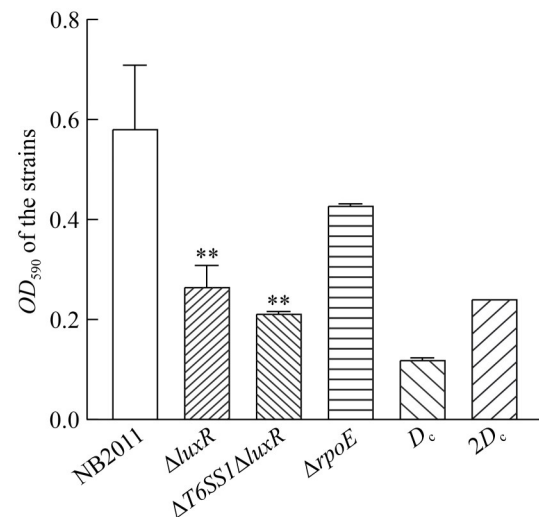
图7 野生株与突变株的生物膜形成能力。 D_c 为阴性值的2倍; 数据以3次试验的均值±标准差表示; **表示差异极显著($P<0.01$)。

Figure 7 Detection of biofilm-forming capacity in wild type and mutant strains. D_c indicates negative control value; Data are expressed as mean±SD of three trials. **: Highly significant difference ($P<0.01$).

2.3 突变株的毒力特性

2.3.1 突变株对巨噬细胞的黏附、内化和增殖特性

以小鼠巨噬细胞 J774A.1 作为细胞模型,统计了野生株与突变株对巨噬细胞的黏附及被细胞内化后在胞内增殖的情况,如图 8 所示。突变株对巨噬细胞的黏附性与野生株相似,内化率也非常接近,自内化 4 h 后,所有菌株开始相似的快速增殖。到内化后 8 h,各菌株的增殖速率出现了分化:野生株仍然较快增殖,一直持续到 24 h;突变株 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 和 $\Delta rpoE$ 较缓慢地增殖, $\Delta luxR$ 在 8–16 h 时间段基本未增殖,但在 16–24 h 出现了爆发性增殖。到 24 h 观察结束时,各菌株增殖速率接近,但突变株的菌体数量均低于野生株。该结果表明,靶基因与该菌的胞内增殖和持续存活有关,相应的缺失突变降低了菌体在巨噬细胞内的增殖能力。

2.3.2 突变株对草金鱼的毒力

三株突变株以相同浓度腹腔注射人工感染草金鱼,观察 7 d 内鱼体发病情况,并统计死亡率。如表 2 所示,与野生株相比, $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 突变株的毒力显著减弱,在实验过程中未发生死亡,在 $1.0\times 10^6\text{--}1.0\times 10^8\text{ cells/mL}$ 的浓度范围内未表现出对草金鱼的毒力, $LD_{50}>10^8\text{ cells/mL}$;突变株 $\Delta luxR$ 、 $\Delta rpoE$ 的毒力也明显减弱,但仍

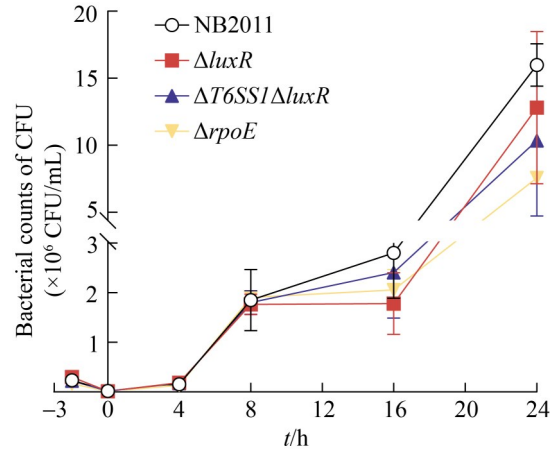


图8 J774A.1中野生株与突变株的黏附、内化与增殖

Figure 8 Adhesion, internalization and replication of the wild type and mutants in J774A.1.

具有一定的致病性。

2.4 突变株对草金鱼的免疫保护力

根据毒力分析结果,选择 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 突变株免疫草金鱼,并在接种 28 d 后进行人工攻击,随后观察症状,记录死亡数量,计算突变株对草金鱼的免疫保护率,结果如图 9 所示。对照组在感染 2 d 后陆续出现死亡现象,解剖后观察发现脾脏组织中出现白色结节(图 10);免疫组出现死亡的时间推迟,在感染第 5 天后才出

表2 突变株对草金鱼毒力试验

Table 2 Virulence test of the mutant strains against *Carassius auratus*

菌株 Strains	菌液浓度 Bacterial concentration (cells/mL)	样本数 Sample (pcs)	试验鱼的每日死亡数 Daily mortality rate of experimental fish							死亡率 Mortality (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
$\Delta rpoE$	1.0×10^7	20	0	0	0	0	3	0	0	15
$\Delta luxR$	1.0×10^7	20	0	0	1	0	4	2	0	35
$\Delta T6SSI\Delta luxR$	1.0×10^5	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10^6	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10^7	20	0	0	0	0		0	0	0
	1.0×10^8	20	0	0		0	0	0	0	0
NB2011	1.0×10^7	20	0	3	2	2	2	3	3	75
Control	PBS	20	0	0	0	0	0	0	0	–

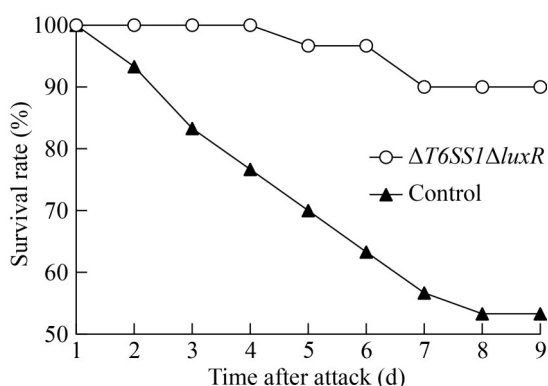


图9 突变株免疫实验鱼对人工攻击的保护率

Figure 9 Survival rate of *Carassius auratus* after challenge with the wild type NB2011.

现少量死亡。免疫实验组的死亡率为 10.00%，而对照组在攻击后的死亡率为 46.67%。 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 突变株免疫在人工攻击中的免疫保护率为 78.60%，提供了有效保护。

3 讨论与结论

本研究使用的自杀质粒 pK18mobsacB-Ery 是由 Wang 等在基因敲除载体 pK18mobsacB 的 *Bam*H I/*Eco*R I 位点插入红霉素耐药基因后构建

的衍生载体，改良的 pK18mobsacB 载体在假交替单胞菌中具有自杀性^[17]。pK18mobsacB-Ery 含有枯草芽孢杆菌修饰的 *sacB* 基因和质粒 RP4 的广泛宿主转移机制^[18]。*sacB* 基因编码的果聚糖酶能够水解蔗糖生成葡萄糖和果糖，并进一步促使果糖分子聚合形成高分子量的果聚糖。这种酶的作用对大多数革兰氏阴性细菌是致命的，因此 *sacB* 可以作为这些细菌的反向筛选标记基因^[19]。本研究通过双同源重组法成功构建了 3 株 *P. plecoglossicida* NB2011 基因缺失突变株，表明该自杀质粒适用于杀香鱼假单胞菌，为后续突变株的构建提供了可靠的平台。

本研究构建的 3 株突变株中， $\Delta luxR$ 和 $\Delta T6SSI\Delta luxR$ 的生长未受明显影响，提示相关基因未直接作用于基础代谢过程，这与前期报道一致^[12,14]； $\Delta rpoE$ 的生长速度在对数期后弱于野生株，提示 RpoE 在一定生长时相参与代谢相关基因的调控，类似现象在伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhi) 中也曾观察到^[20]。运动能力分析表明，与野生株相比，3 株突变株的泳动和游泳能力并无明显变化；细菌的游泳、泳动运动主要依赖鞭毛的旋转^[21]，相

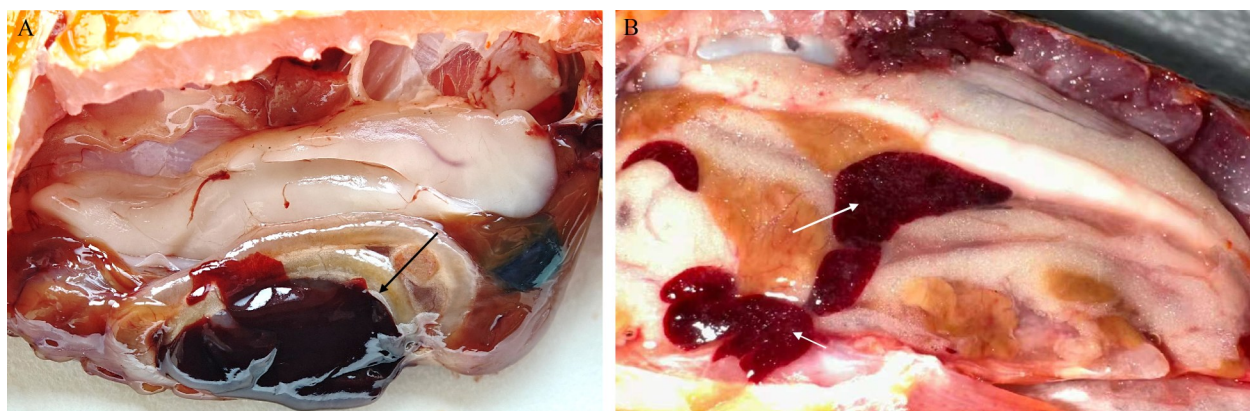


图10 草金鱼内脏解剖图。A：健康鱼组织解剖图(图中黑色箭头指示健康脾脏)；B：患病鱼组织解剖图(图中白色箭头指示脾脏白点)。

Figure 10 Anatomy of the internal organs of *Carassius auratus*. A: Tissue anatomy of a healthy fish (The black arrow indicates the healthy spleen); B: Tissue anatomy of diseased fish (The white arrow indicates white nodules in the spleen).

靶基因的缺失基本未影响菌体的运动能力,提示这些基因可能未直接参与鞭毛表达及运动的调控。在本研究中, $\Delta rpoE$ 突变株的运动能力与野生株相比基本无变化,这与 Huang 等报道的 $rpoE$ 沉默株的结果不同,沉默株 $rpoE$ -RNAi 的运动能力急剧下降^[8],具体原因需进一步研究。在生物膜形成实验中,3株突变株的生物膜形成能力均明显下降,提示相关靶基因直接或间接参与了生物膜的生成过程,生物膜形成能力通常与毒性和致病力密切相关^[22],这也部分解释了突变株在巨噬细胞内增殖能力的下降及对草金鱼毒力的减弱。

Mao 等^[3]研究发现, *P. plecoglossicida* NB2011 进入大黄鱼体内后被脾和肾中的巨噬细胞吞噬,部分菌体在巨噬细胞内持续存活和复制,提示该菌可能是一种兼性胞内寄生菌;Huang 等^[23]、Shu 等^[24]也观察到了类似的现象。本研究中突变株对鼠巨噬细胞黏附、内化和增殖特性观察结果进一步验证了这一点:菌体被巨噬细胞内化 4 h 后,所有菌株均出现了明显增殖,且增殖趋势一直持续到内化后 24 h;但在 8–24 h 期间,3株突变株的菌体数量和增殖速率明显低于野生株,说明靶基因的缺失影响了菌体的胞内增殖和存活过程。在内化后 16–24 h 期间,3株突变株的增殖速率上升,推测这主要是由于细胞老化和死亡所致;而在鱼体感染中,健康鱼可以调动自身免疫系统有效清除病原菌,从而控制感染^[12]。

杀香鱼假单胞菌可以自然感染大黄鱼和斜带石斑等海水鱼类导致内脏白点病^[2];人工感染中,尖吻鲈易感性好,症状明确,可能作为一种比较理想的模式鱼^[25]。Yan 等^[15]报道了杀香鱼假单胞菌对鲫鱼的致病性,表明该菌也能感染鲤科鱼类。本课题组在前期检测了草金鱼对杀香鱼假单胞菌的易感性,其 LD_{50} 为 1.47×10^7 cells/mL,虽然杀香鱼假单胞菌对金鱼的毒力弱于大黄鱼^[26],但感染后内脏白点症状相似,病程相仿。结合草金鱼廉价易得、养殖方便的特点,且鲤

科鱼类与石首鱼科等拥有基本相同的硬骨鱼类免疫系统^[27],其免疫应答机制应该大同小异,提示草金鱼可以作为杀香鱼假单胞菌的感染和免疫模型。

在毒力实验中, $luxR$ 基因缺失株感染草金鱼的死亡率仍有 35%,与野生株相比毒力稍有减弱,但仍然出现鱼体批量死亡的情况,提示作为一个转录调控蛋白, $LuxR$ 可能参与了部分毒力机制的调控,但该株尚不适合作为弱毒活疫苗候选株。同时, $rpoE$ 单基因缺失株毒力也显著降低,相对死亡率为 15%,提示该基因与毒力相关,这与 Huang 等构建的基因沉默株 $rpoE$ -RNAi 的毒力显著下降的结果一致,该沉默株免疫斜带石斑后试验鱼获得了有效保护^[8]。结合本研究结果,可以推测 $rpoE$ 可能作为弱毒活疫苗构建的靶基因,但 $\Delta rpoE$ 需要进一步减毒后方能安全使用;可以构建 $rpoE$ 与其他毒力因子联合缺失的突变株,可能获得更理想的候选株。当观察联合突变株 $\Delta T6SS1\Delta luxR$ 时,试验鱼未发生死亡现象,解剖后内脏也未观察到白点症状,提示该株的毒力急剧下降;由于 $luxR$ 单基因缺失株仅使 *P. plecoglossicida* 毒力部分下降,可以推测 $\Delta T6SS1\Delta luxR$ 毒力的急剧减弱主要归因于 T6SS1 的功能缺失,这与 Jin 等^[12]研究结果一致。在免疫保护实验中,该突变株一次性腹腔注射接种金鱼 28 d 后的 RPS 为 78.60%,提供了有效保护。结合生物学特性以及毒力分析结果, $\Delta T6SS1\Delta luxR$ 毒力显著下降,免疫后能提供显著的保护,可作为杀香鱼假单胞菌弱毒活疫苗的候选株。进一步研究中需开展更多的草金鱼免疫相关指标检测与分析,如抗体效价、免疫相关基因的表达水平等,为免疫应答机制提供更深层的解释。

本研究成功构建了 3 株杀香鱼假单胞菌基因缺失突变菌株,对突变株进行了生物学和毒力特性分析,并在草金鱼中验证了双突变株的免疫保护性,为后续 LAV 开发奠定了基础。

作者贡献声明

贾婷婷：实验方案设计、数据处理、实验操作、初稿写作；池宇：实验操作、数据处理；李珊珊：数据管理、实验操作；陈吉刚：监督指导、审查；毛芝娟：方案设计、项目管理、监督指导、审查和编辑写作。

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] 陈宇. 宁德市三都湾养殖大黄鱼内脏白点病发生规律初探[J]. 海峡科学, 2019(6): 41-43.
CHEN Y. Preliminary study on the occurrence law of visceral white spot disease of cultured *Pseudosciaena crocea* in Sanduwan, Ningde City[J]. Straits Science, 2019(6): 41-43 (in Chinese).
- [2] MAO ZJ, LI SS, LI YY, JIA TT. The bacterial pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*, its epidemiology, virulence factors, vaccine development, and host-pathogen interactions[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2024, 36(2): 181-191.
- [3] MAO ZJ, YE J, LI MF, XU HY, CHEN JG. Vaccination efficiency of surface antigens and killed whole cell of *Pseudomonas putida* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 375-381.
- [4] TAO ZH, XU Y, ZHOU SM, QIAN D, LIU MH, LI WY, XU WJ, YAN XJ. Acquisition of a type VI secretion system is critical for *Pseudomonas plecoglossicida* induced granulomas in fish internal organs[J]. Aquaculture, 2020, 516: 734629.
- [5] LI YY, CHI Y, LI SS, JIA TT, MAO ZJ. Characterization of 4 deletion mutants of *Pseudomonas plecoglossicida* and their potential for live attenuated vaccines in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 127: 264-270.
- [6] 康佳乐. 大黄鱼变形假单胞菌减毒活疫苗 $\Delta\text{OmpR}\Delta\text{rpoS}$ 的生物学特性分析及其免疫保护效果研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2023.
KANG JL. Analysis of biological characteristics and immunoprotective analysis of *Pseudomonas plecoglossicida* mutant $\Delta\text{OmpR}\Delta\text{rpoS}$ as a live attenuated vaccine against visceral white nodules disease in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2023 (in Chinese).
- [7] QI WL, XU W, ZHAO LM, XU XJ, LUO ZH, HUANG LX, YAN QP. Protection against *Pseudomonas plecoglossicida* in *Epinephelus coioides* immunized with a cspA1-knock-down live attenuated vaccine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 498-504.
- [8] HUANG LX, ZHANG YY, HE R, ZUO ZH, LUO ZH, XU W, YAN QP. Phenotypic characterization, virulence, and immunogenicity of *Pseudomonas plecoglossicida* rpoE knock-down strain[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 772-777.
- [9] 刘丽. 蜂房哈夫尼菌 *luxI*、*luxR* 基因对群体感应调节机制的初步研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
LIU L. A preliminary research for the effect of *luxI*, *luxR* gene on quorum-sensing in *Hafnia alvei*[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018 (in Chinese).
- [10] GU D, GUO M, YANG M, ZHANG Y, ZHOU X, WANG Q. A σE -mediated temperature gauge controls a switch from LuxR-mediated virulence gene expression to thermal stress adaptation in *Vibrio alginolyticus*[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(6): e1005645.
- [11] DOU Y, RUTANHIRA H, CHEN X, MISHRA A, WANG C, FLETCHER HM. Role of extracytoplasmic function sigma factor PG1660 (RpoE) in the oxidative stress resistance regulatory network of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Molecular Oral Microbiology, 2018, 33(1): 89-104.
- [12] JIN JM, LI YY, HUANG MX, LI SS, MAO ZJ. Preliminary studies on the different roles of T6SSs in pathogenicity of *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011[J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(11): 1669-1679.
- [13] MAO Z, LI MF, CHEN JG. Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00586-13.
- [14] LI SS, JIA TT, CHI Y, CHEN J, MAO Z. Identification and characterization of LuxR solo homolog PplR in pathogenic *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1458976.
- [15] YAN L, JIN D, YANG S, LI X, LI H, HU S, SUN Y, YI G, WANG P, RANG J, XIA LQ. Pathogenicity of fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* and preparation of its inactivated vaccine[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 166: 105488.
- [16] VERCH T, TRAUSCH JJ, SHANK-RETZLAFF M. Principles of vaccine potency assays[J]. Bioanalysis, 2018, 10(3): 163-180.
- [17] WANG PX, YU ZC, LI BY, CAI XS, ZENG ZS, CHEN XL, WANG XX. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 11.
- [18] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G, PÜHLER A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Gene, 1994, 145(1): 69-73.
- [19] PELICIC V, REYRAT JM, GICQUEL B. Expression of

- the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(4): 1197-1199.
- [20] 周惠琴, 谢小芳, 倪斌, 王敏, 杜鸿. 高渗条件下 RpoE 与 RpoS 调节因子共同影响伤寒沙门菌生长代谢[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(3): 265-269.
- ZHOU HQ, XIE XF, NI B, WANG M, DU H. Metabolism of *Salmonella enterica* serovar typhi influenced by RpoE and RpoS under hyperosmosis[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2013, 47(3): 265-269 (in Chinese).
- [21] 张晨曦, 刘鼎阔. 细菌群集运动特性的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3188-3203.
- ZHANG CX, LIU DK. Characterization of bacterial swarming motility: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3188-3203 (in Chinese).
- [22] WANG YS, BIAN ZR, WANG Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19/20): 6365-6381.
- [23] HUANG L, ZUO Y, QIN Y, ZHAO L, LIN M, YAN Q. The zinc nutritional immunity of *Epinephelus coioides* contributes to the importance of *znuC* during *Pseudomonas plecoglossicida* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 678699.
- [24] SHU FL, JIN LY, LIU H, TAO Z, YIN F, XIE JS, ZHOU SM. The *galU* gene is required for *in vivo* survival of *Pseudomonas plecoglossicida* in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2023, 46(03): 229-238.
- [25] SUN Y, ZHU Z, WENG S, HE J, DONG C. Characterization of a highly lethal barramundi (*Lates calcarifer*) model of *Pseudomonas plecoglossicida* infection[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104516.
- [26] 邱杨玉, 郑磊, 毛芝娟, 陈孝焯. 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 内脏白点病的病原分离和组织病理学观察[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(3): 361-370.
- QIU YY, ZHENG L, MAO ZJ, CHEN XX. Isolation and identification of the causative agent and histopathology observation of white-spots disease in internal organs of *Larimichthys crocea*[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(3): 361-370 (in Chinese).
- [27] SMITH NC, RISE ML, CHRISTIAN SL. A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2292.