

嗜水气单胞菌 *tolA* 基因生物学功能研究

陈甜梦[#], 王亚平[#], 任凤娟, 李沐伟, 张梓萌, 鞠建松, 赵宝华*, 刘东*

河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄

陈甜梦, 王亚平, 任凤娟, 李沐伟, 张梓萌, 鞠建松, 赵宝华, 刘东. 嗜水气单胞菌 *tolA* 基因生物学功能研究[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2111-2127.

CHEN Tianmeng, WANG Yaping, REN Fengjuan, LI Muwei, ZHANG Zimeng, JU Jiansong, ZHAO Baohua, LIU Dong. Biological functions of *tolA* in *Aeromonas hydrophila*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2111-2127.

摘要: 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种既能感染鱼类, 又能感染包括人在内的哺乳动物的病原体。【目的】构建 *A. hydrophila* ATCC 7966 的 *tolA* 基因缺失株, 以探究 *tolA* 基因的生物学功能。【方法】通过同源重组技术构建 *tolA* 基因缺失菌株 *AhΔtolA*, 并对 *AhΔtolA* 的生理表型进行测定和分析, 利用转录组测序技术探究 *tolA* 缺失导致的相关基因表达变化。【结果】嗜水气单胞菌 *tolA* 缺失菌株的细胞形态发生了明显改变, 其对脱氧胆酸钠的敏感度显著增强, 氧化应激反应也明显加剧。该缺失菌株的生物被膜形成能力以及多种毒力基因的表达水平显著降低, 而外膜囊泡的产量增多。转录组测序及比较分析发现, WT/*AhΔtolA* 比较组共筛选到 300 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 其中上调 171 个, 下调 129 个。GO 功能富集分析发现差异表达基因主要富集在氧化还原过程、能量代谢过程、细胞外膜组成和氧化还原酶活性等途径。KEGG 富集分析发现, 差异表达基因主要富集在次生代谢物生物合成、不同环境下的微生物代谢、辅助因子的生物合成以及氨基酸生物合成等途径。【结论】本研究阐明了 *tolA* 基因在嗜水气单胞菌中的重要生理功能, 并探讨了 *tolA* 基因可能参与和影响的多种代谢途径。研究结果为嗜水气单胞菌的防治提供了理论支持。

关键词: 嗜水气单胞菌; *tolA*; 生物被膜; 外膜囊泡; 转录组

资助项目: 河北省自然科学基金(C2019205044); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2018070); 河北省教育厅优秀青年基金(YQ2014026); 河北师范大学重点基金(L2016Z03); 河北师范大学研究生创新资助项目(XCXZZSS202436)

This work was supported by the Hebei Natural Science Foundation (C2019205044), the Hebei Provincial Higher Education Science and Technology Research Project (ZD2018070), the Outstanding Youth Fund of Hebei Provincial Department of Education (YQ2014026), the Key Fund of Hebei Normal University (L2016Z03), and the Hebei Normal University Graduate Student Innovation Funding Project (XCXZZSS202436).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Baohua, baohua515@163.com; LIU Dong, pqw1234@163.com

Received: 2024-11-07; Accepted: 2024-12-22; Published online: 2025-03-26

Biological functions of *tolA* in *Aeromonas hydrophila*

CHEN Tianmeng[#], WANG Yaping[#], REN Fengjuan, LI Muwei, ZHANG Zimeng, JU Jiansong, ZHAO Baohua^{*}, LIU Dong^{*}

College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei, China

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is a pathogen that can infect both fish and mammals, including humans. **[Objective]** To construct the *tolA*-deleted strain of *A. hydrophila* ATCC 7966 and use this strain to explore the biological functions of *tolA*. **[Methods]** We constructed the *tolA*-deleted strain Ah Δ *tolA* by homologous recombination and characterized the physiological phenotype of Ah Δ *tolA*. Transcriptome sequencing was performed to compare the gene expression between the wild type (WT) and Ah Δ *tolA*. **[Results]** The cell morphology of Ah Δ *tolA* was changed. The deletion of *tolA* significantly enhanced the sensitivity to sodium deoxycholate and oxidative stress, while significantly reducing the biofilm formation and the expression levels of several virulence genes. The yield of outer membrane vesicles was significantly increased in Ah Δ *tolA*. Transcriptomic analysis data showed that a total of 300 differentially expressed genes (DEGs) were screened between WT and Ah Δ *tolA*, including 171 genes with up-regulated expression and 129 genes with down-regulated expression. GO enrichment analysis showed that the DEGs were mainly enriched in the oxidation-reduction process, metabolic process, outer membrane, and oxidoreductase activity. KEGG pathway enrichment analysis showed that the DEGs were mainly enriched in the biosynthesis of secondary metabolites, microbial metabolism in diverse environments, biosynthesis of cofactors, and biosynthesis of amino acids. **[Conclusion]** This study gives an insight into the roles of *tolA* in *A. hydrophila* and provides information about the metabolic pathways involving *tolA*. These results provide a theoretical reference for the prevention and control of *A. hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; *tolA*; biofilm; outer membrane vesicles; transcriptome

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种典型的人-兽-鱼共患病病原菌,广泛分布于自然界水体中,它造成的运动性气单胞菌败血症(motile *Aeromonas* septicemia, MAS)给全球水产养殖业带来了巨大的经济损失^[1-2]。目前,治疗嗜水气单胞菌感染的主要方式是使用抗生素,但长期使用抗生素会导致耐药菌的增加和快速传播。因此,加强嗜水气单胞菌的致病机制研究已迫在眉睫^[3-4]。

革兰氏阴性菌的 Tol-Pal 系统由 TolA、TolB、TolQ、TolR 和 Pal 蛋白组成,这些蛋白横跨外膜、周质间隙和内膜,其中 TolQ、TolR

和 TolA 在细胞内膜形成复合物,而周质蛋白 TolB 与固定在外膜上的 Pal 蛋白相互作用^[5]。Tol-Pal 系统在维持细胞形态^[6]、外膜稳定性^[5,7]、对胆盐的敏感性以及细胞毒力^[8]等方面发挥着重要作用。该系统最初在大肠杆菌中发现^[7],随后在铜绿假单胞菌^[9]、霍乱弧菌^[10]、恶臭假单胞菌^[11]、鼠伤寒沙门菌^[12]、菊欧文氏菌^[6]和伤寒沙门菌^[8]等其他菌属中也有报道。某些致病菌的 *tolA* 基因发生突变或缺失后,会导致菌体形态改变、外膜破损和致病力下降。例如,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)敲除 *tolA* 基因后,其外膜完整性受损,对胆汁

和血清的敏感性增强, 进而致病力减弱^[13]。

外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是革兰氏阴性菌中广泛存在的一种纳米级双层膜囊泡状结构, 包含了外膜蛋白、磷脂、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、DNA, 以及在形成过程中被外膜包裹的周质成分等多种生物学活性物质^[14-15]。由于 OMVs 无法复制且携带大量保持天然构象的外膜抗原, 因此它们能够有效激活宿主的免疫系统, 显著提升抗原的免疫原性, 从而在防控细菌性疾病方面展现出巨大潜力^[16]。研究人员发现 *tol-pal* 基因的缺失会对外膜完整性产生负面影响, 导致外膜囊泡产量增加^[17-18]。Mitra 等^[19]研究发现, 志贺氏菌(*Shigella boydii*) *tolA* 基因缺失菌的 OMVs 释放量相较于野生型增加了 60%, 且这些 OMVs 具有良好的免疫保护作用。大肠杆菌 *tolA* 基因缺失菌株的 OMVs 蛋白质组学分析结果表明, 缺失 *tolA* 基因可能会减少细胞内膜和外膜之间的联系, 从而导致膜的损伤及 OMVs 的增加^[20]。目前, *tolA* 基因在嗜水气单胞菌中的生理作用仍不明确, 需要进一步探索。

为探究 *tolA* 基因在嗜水气单胞菌中的生物学功能, 本研究利用同源重组技术构建嗜水气单胞菌 *tolA* 基因缺失株 *AhΔtolA*, 以野生菌株(wild type, WT)为对照, 测定 *AhΔtolA* 的生长特性、细菌形态、生物被膜形成能力以及 OMVs

产量等生物学特性, 并利用转录组测序技术比较野生型与 *AhΔtolA* 菌株的基因表达差异, 分析 *tolA* 基因参与和影响的代谢途径。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) ATCC 7966 (WT), 购自宁波明舟生物科技有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* S17-1 λ pir, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。自杀载体 pRE112 用于 *tolA* 基因的敲除, 广宿主克隆载体 pBBR1MCS-1 用于 *tolA* 缺失菌株的回补菌株 *CΔtolA* 构建, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。本研究所用到的引物序列如表 1 所示, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 主要试剂

LB 培养基购自赛默飞世尔科技公司; 大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)购自北京索莱宝科技有限公司; T4 DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; Green Taq Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取、DNA 片段回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

抗生素使用的终质量浓度: 氨苄青霉素(Amp)为 100 μ g/mL, 氯霉素(Chl)为 50 μ g/mL。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
<i>tolA</i> up-F	<u>CCATATG</u> TCCAGGAGGGTTCGGTG	1 010
<i>tolA</i> up-R	G <u>G</u> CATGCGCCTGGGTAAGGTAAATCG	
<i>tolA</i> down-F	GGCATGCCTCCGTCAGTTCACCGGA	831
<i>tolA</i> down-R	CTCTAGACGGTGATGGACGGTACTTACC	
<i>tolA</i> -F	TTGGAGACCACTCCGCGATG	1 856
<i>tolA</i> -R	GTGGCCGAGATCAACGTGGTT	
<i>CtolA</i> -F	<u>CGAGCTC</u> TTAGATGCTCGGTTCCAACCTT	1 164
<i>CtolA</i> -R	CTCTAGAATGGATGTGAAGCGTGGT	

*: The underlined bases are the restriction sites.

1.3 *tolA* 缺失菌株和回补菌株的构建

取 *A. hydrophila* 菌株接种于 LB 培养基, 以 30 °C、200 r/min 培养至对数生长期。使用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 分别使用引物 *CtolA*-F/R 扩增获得 *tolA* 基因(1 164 bp)。PCR 反应体系(50 μ L): 2 $\times$ Green Taq Mix 25 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环。经琼脂糖凝胶电泳验证正确后, 对目标条带进行回收纯化。将两条同源臂用 T4 DNA 连接酶与经过(*Xba* I 和 *Nde* I)双酶切的 pRE112 进行连接得到重组自杀质粒 pAFR。将携带 pAFR 的 *E. coli* S17-1 λ pir 与 *A. hydrophila* 按比例在尼龙膜上结合培养, 进行第 1 次同源重组。然后将筛选到的单交换菌株接种于含有 15% 蔗糖的新鲜无抗 LB 培养基中培养 16 h, 适当稀释后涂布于含有 12% 蔗糖的 LB 平板。选取在含有氯霉素的 LB 平板上不生长的阳性克隆, 使用 *tolA*-F/R 引物进行 PCR 扩增后送苏州金唯智生物科技有限公司测序验证, 得到基因缺失菌株(Ah Δ *tolA*)。通过稳定遗传, 将测序正确的缺失菌株保存于-80 °C。

回补菌株的构建方法: 利用引物 *CtolA*-F/R 获得 *tolA* 基因, 将 *tolA* 片段与经过(*Sac* I 和 *Xba* I)双酶切的 pBBR1MCS-1 进行连接得到重组质粒 pBBA。将重组质粒 pBBA 电转化至 Ah Δ *tolA* 感受态细胞中, 并筛选出阳性克隆菌株, 获得 Ah Δ *tolA* 回补菌株。

1.4 细菌生长曲线测定

细菌生长曲线测定方法参照文献[21]进行。挑取 *A. hydrophila* WT 菌株和缺失突变体 Ah Δ *tolA* 单菌落至 LB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.6, 以 1% 的接种量转接至 LB 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 恒温摇床中

培养, 每隔 1 h 连续测量其 OD_{600} 值, 每个样品重复 3 次。以时间为横坐标、菌液 OD_{600} 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.5 形态特征观察

1.5.1 革兰氏染色观察

对 WT 和 Ah Δ *tolA* 进行革兰氏染色, 并在 10 $\times$ 100 倍镜下进行观察。

1.5.2 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察

透射电镜样品制备方法参照文献[22]进行。将 WT 和 Ah Δ *tolA* 菌液及提取的 OMVs 样品分别覆盖在碳涂层铜网上, 接着用 1% 乙酸铀酰水溶液对样品染色。最后使用透射电子显微镜(日立公司)以 80 kV 的加速电压进行观察。

1.6 脱氧胆酸钠敏感性与氧化应激能力测定

挑取 WT 和 Ah Δ *tolA* 单菌落至 LB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至相同 OD_{600} 值, 收集菌体分别用 0.5% 的脱氧胆酸钠和 PBS 缓冲液重悬, 并在 30 °C 孵育 2 h。梯度稀释至 10^{-1} – 10^{-4} 的细菌悬液分别取 100 μ L 涂布在 LB 平板上, 30 °C、200 r/min 培养 18–20 h 后统计菌落数并计算相应活菌数, 存活率按公式(1)计算。

菌株存活率=

$$\frac{\text{CFU}_{\text{脱氧胆酸钠处理}}}{\text{CFU}_{\text{PBS处理}}} \times 100\% \quad (1)$$

采用 Kirby-Bauer 纸片法评估细菌的氧化应激能力。将浸有 1 mmol/L H₂O₂ 溶液的滤纸片(6 mm)贴于涂有 WT 和 Ah Δ *tolA* 菌液的 LB 平板上, 30 °C 培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径, 每个样品重复 3 次。

1.7 生物被膜实验

生物被膜形成能力测定方法参照文献[23]进行。将过夜活化的 WT 与缺失菌 Ah Δ *tolA* 菌液稀释至 OD_{600} 值为 0.1, 接着向无菌 48 孔板中加入 500 μ L 的菌液, 30 °C 静置培养 36 h, 以液体 LB 培养基作为空白对照。将孔内菌液吸出, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次后加入甲醇固定 30 min,

50 °C干燥 30 min。加入质量分数为 1% 的结晶紫染液染色 10 min 后用 PBS 缓冲液清洗 2 次, 50 °C干燥 30 min。加入体积分数为 33% 的冰醋酸, 37 °C静置 30 min, 使用酶标仪在 OD_{595} 处测定吸光值, 每株菌重复 5 次。

1.8 荧光显微镜观察

荧光显微镜观察参照文献[24]进行。细菌生物被膜形态观察方法: 将无菌盖玻片置于无菌 6 孔板中, 每孔加入 5 mL OD_{600} 值为 0.8 的 WT 和 $Ah\Delta tolA$ 培养液, 在 30 °C静置培养 24 h 和 48 h。取出玻片用 PBS 缓冲液清洗后加入甲醇固定 30 min, 再用 PBS 缓冲液清洗 2 次。加入质量分数为 0.01% 的吖啶橙, 避光孵育 15 min 后置于 3D 全视野荧光显微镜(Leica 公司)下, 使用波长为 488–530 nm 的激发光通道进行观察。

1.9 OMVs 提取、纯化

1.9.1 OMVs 提取

OMVs 的提取参照文献[25]方法进行。将 WT 和 $Ah\Delta tolA$ 的过夜培养物涂布于 TSA 平板上, 30 °C培养 24 h 后收集菌体。将菌体悬浮在 PBS 缓冲液中, 10 000×g 离心 30 min 收集上清液, 并通过 0.45 μ m 滤膜除去残留菌体。取过滤后的样品涂布在 TSA 平板上, 30 °C培养 24 h 以确认无菌体残留。将无菌上清液在 4 °C、100 000×g 离心 3 h 收集沉淀, 将沉淀用 PBS 缓冲液清洗 2 次后悬浮于 1 mL PBS 缓冲液中得到粗提 OMVs 样品, 最后测定其总蛋白浓度。

1.9.2 OMVs 纯化

OMVs 的纯化参照文献[26]进行。将碘克沙醇密度梯度离心液 OptiPrep™ 用无菌 PBS 缓冲液稀释成终浓度分别为 10%、15%、20%、25% 和 30% 的梯度液。通过密度梯度离心纯化粗提的 OMVs 样品, 并将得到的 OMVs 样品保存于 -80 °C。

1.10 RNA 提取及 RT-qPCR

按照细菌总 RNA 提取试剂盒说明书提取各

菌株的总 RNA, 使用 NanoDrop 2000 (赛默飞世尔科技公司)测定 RNA 浓度及纯度。纯度符合要求后, 使用逆转录试剂盒将所提取的细菌总 RNA 进一步逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 RT-qPCR 仪(Thorne 公司)扩增并分析菌株中 *tolA* 的表达量。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, Primer-F/R (10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 °C预变性 10 min; 95 °C变性 30 s, 55 °C退火 30 s, 72 °C延伸 30 s, 45 个循环。以 16S rRNA 基因作为内参, 对 C_t 值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

为探究 *tolA* 缺失对嗜水气单胞菌致病性的影响, 选取嗜水气单胞菌的 14 个重要毒力基因, 检测 2 种菌株基因表达水平的差异。RT-qPCR 引物序列如表 2 所示。

1.11 转录组分析

提取 WT 和 $Ah\Delta tolA$ 的总 RNA, 使用 RNA Nano 6000 检测试剂盒检测总 RNA 完整性。符合要求后, 按照制造商的说明, 以片段化的 mRNA 为模板, 随机寡核苷酸为引物合成双链 cDNA。测序文库采用聚合酶链反应扩增构建, 使用 Agilent 2100 系统定量, 并使用 Illumina HiSeq 平台(安捷伦科技有限公司)进行测序。所有分析均由北京诺禾致源科技股份有限公司的云平台完成。利用 DESeq 和 edgeR 软件计算基因表达量, 比较分析样本间基因的表达差异。显著差异的阈值 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且 $P_{\text{adjust}} \leq 0.05$, 将显著差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 挖掘 WT 与 *tolA* 基因缺失后相关基因表达量的变化情况。

1.12 数据验证

选取 4 个上调基因(*tolQ*、*tolR*、*alr-2*、*pilQ*)和 6 个下调基因(*rbsK*、*rbsC*、*aroB*、*ppiD*、*ribB*、*lptD*), 设计 RT-qPCR 引物进行基因表达量分析, 相关引物序列见表 2。

表2 RT-qPCR引物

Table 2 Primers designed for RT-qPCR

Gene	Name	Sequences (5'→3')	Gene	Name	Sequences (5'→3')
16S rRNA	16S-F	GGGGAGTACGGTCGCAAGAT	<i>degQ</i>	De-F	CACCGAGCTTACCTCCGAAAT
	16S-R	CGCTGGCAAACAAGGATAAGG		De-R	CCGCCTTCTTCAGCGTGAC
<i>tolA</i>	Ta-F	TGCTCGGTTCCAACCTTGAGG	<i>flgE</i>	Fe-F	CCCCTCAGACATTGGAGAT
	Ta-R	ACTATCGGCGTACGTCTTGC		Fe-R	GTCGCATTGCTGTAGGTCGC
<i>acuC</i>	Ac-F	AGGACGATGCCTACCTCACC	<i>flgL</i>	Fl-F	GCCCCAGAACAACAACATCC
	Ac-R	GCGTTTGTTCGCCTCTTCA		Fl-R	GCCGCATCCTCTTTTGACA
<i>cblA</i>	Ad-F	CCGAGGCGTTCTATGTGCA	<i>alr-2</i>	Al-F	CTCGATACGGGATGAACCG
	Ad-R	TTGGTCAGGTAGCCGGTGAT		Al-R	GGTCATGAGATGGAACGGCT
<i>aerA</i>	Ae-F	GGTCTGTGGCGACAAGTATCG	<i>tolQ</i>	Tq-F	GGACTCCTGGTAGAGACGGT
	Ae-R	AGAGCAGACAGAGTCGGTATTTCTC		Tq-R	GCTGATCATCCAGCGTTCCA
<i>ascV</i>	As-F	GGGTATTCACCTGCGTTTCA	<i>tolR</i>	Tr-F	CATGGCCTTCTCGGTGATGT
	As-R	GATGTTCAATTAGCGACCCACA		Tr-R	CACCGAAGGCGAGTATGTCA
<i>hlyA</i>	HI-F	CCGCCCAGTCCTTCATCTAT	<i>pilQ</i>	Pq-F	ACTCGGTATAAAGCGGTGCC
	HI-R	AGGGTCCGTAGGCTCACATT		Pq-R	GCGGTTGGACAACAACATCC
<i>ompA</i>	Om-F	CTCACGATCTGGGTGACTTTG	<i>rbsK</i>	Rk-F	ATCAAGTTGTACCCGGTGGC
	Om-R	CGCCGTTGATGGACTTGA		Rk-R	GTCTTCATCTGGTGGCCGAT
<i>ompTS</i>	Pr-F	AATGGCTCCTTCCCTGATCG	<i>rbsC</i>	Rc-F	CCGTTTACCTGTTCCGGTCTG
	Pr-R	TGGCACCCCTGGTTCTCGTAA		Rc-R	CCGAGGGCATAGATGTAGCG
<i>vash</i>	Va-F	AAACTGGCACGGGGAAAGAG	<i>aroB</i>	Ab-F	ATCGATCACGACGTGTCTGG
	Va-R	GCTTGTAAGGTGAGCGGCATAT		Ab-R	CTCCCAGGTTGATTCTCCG
<i>traA</i>	Tr-F	GTGATGGTCGTCGCCTTTCT	<i>ppiD</i>	Pd-F	GCAGTCCACCGGTTACTTCA
	Tr-R	GATAACCTTCTCCGCATTTTCC		Pd-R	GATCACGTCGGAGTTGGTGT
<i>pilB</i>	Pi-F	CTAATGCGAATGCAGCACGTA	<i>ribB</i>	Rb-F	CGATGATGATCCGCGAGTGT
	Pi-R	CGCTTCAACAGTTCCAACCA		Rb-R	AGGCGGTCTGATAATGGCTG
<i>rfaF</i>	Rf-F	TACCTGGCACTGGCCTATCC	<i>lptD</i>	Ld-F	CGAATTTCGTTTCATCACCGGC
	Rf-R	CTCGTCGAGGTGCTTTTGTG		Ld-R	ACTACAGCCTGTTCAGCGAC

1.13 统计分析

采用 GraphPad Prism version 8.0 软件进行数据处理和绘图，采用 *t* 检验(*t*-test)进行统计学分析，*P*<0.05 表示具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 *tolA* 基因缺失不影响嗜水气单胞菌 ATCC 7966 生长

本研究通过测定 *A. hydrophila* ATCC 7966、*tolA* 缺失菌株 AhΔ*tolA* 及其回补菌株 CΔ*tolA* 的

生长趋势，判定 *tolA* 基因缺失是否影响菌体生长。结果表明，WT、AhΔ*tolA* 及 CΔ*tolA* 的倍增时间均为 16 h，到达稳定期的 *OD*₆₀₀ 值均在 1.9 左右，三者无明显差异。AhΔ*tolA* 的生长趋势与 WT 基本一致，缺失 *tolA* 不影响细菌的生长，如图 1A 所示。

本研究使用 RT-qPCR 验证了 WT、AhΔ*tolA* 及其回补菌株 CΔ*tolA* 中的 *tolA* 表达情况。如图 1B 所示，AhΔ*tolA* 的 *tolA* 相对表达量为 0.2 左右，而 CΔ*tolA* 菌株的 *tolA* 相对表达量显著上升，达到 WT 的 2.1 倍。

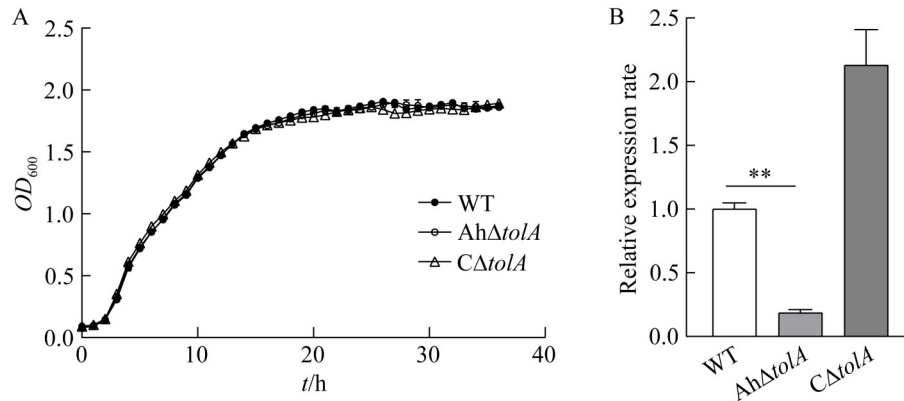


图1 WT、AhΔtolA和CΔtolA的生长差异对比(A)及tolA基因表达量的测定(B)

Figure 1 Comparison of cellular growth of WT, AhΔtolA and CΔtolA (A) and the RT-qPCR detection of tolA expression level (B). **: $P < 0.01$.

2.2 tolA 基因缺失对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 菌体形态的影响

革兰氏染色结果显示, WT 菌体呈革兰氏阴性, 为单个短杆状, 常 2 个相连; 而缺失菌株 AhΔtolA 菌体聚集成团, 细胞多形成链状(图 2)。

2.3 tolA 基因缺失对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 外膜稳定性的影响

脱氧胆酸钠敏感度检测结果显示, WT 和 AhΔtolA 在脱氧胆酸钠中的存活率分别为 33.6% 和 16.1%。AhΔtolA 的存活率显著低于 WT, 表明 AhΔtolA 对脱氧胆酸钠更敏感, 其细胞外膜

屏障功能可能受损(图 3A)。过氧化氢胁迫结果显示, 与野生型相比, AhΔtolA 的抑菌圈直径更大, 表明 AhΔtolA 对 H₂O₂ 更加敏感(图 3B)。这些结果表明 tolA 基因可能参与维持细胞外膜的稳定性。

2.4 tolA 基因缺失对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 生物被膜形成的影响

生物被膜测定结果表明, 与 WT 相比, AhΔtolA 的生物被膜形成能力显著降低约 35% (图 4A、4B)。为进一步探究菌株的生物被膜形态, 利用荧光显微镜观察了 WT 与 AhΔtolA 的生物被膜形态特征。静置培养 24 h 时, WT 菌

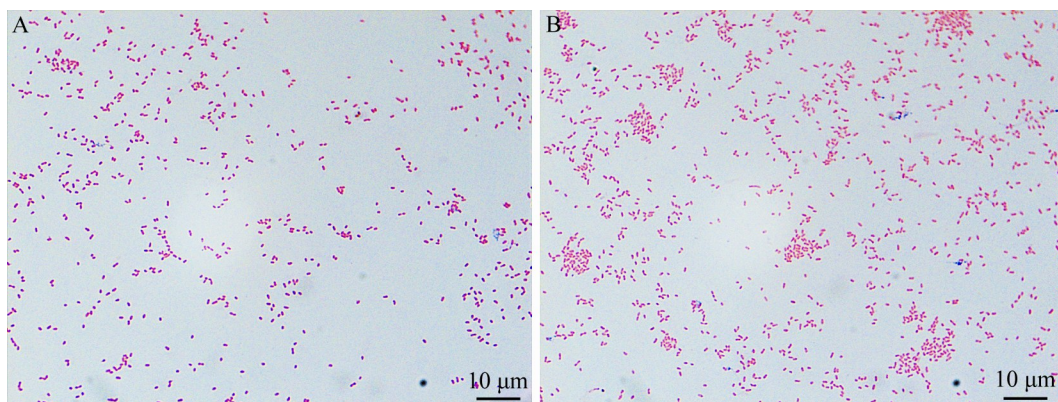


图2 WT (A)和AhΔtolA (B)的革兰氏染色结果

Figure 2 The Gram staining results of WT (A) and AhΔtolA (B).

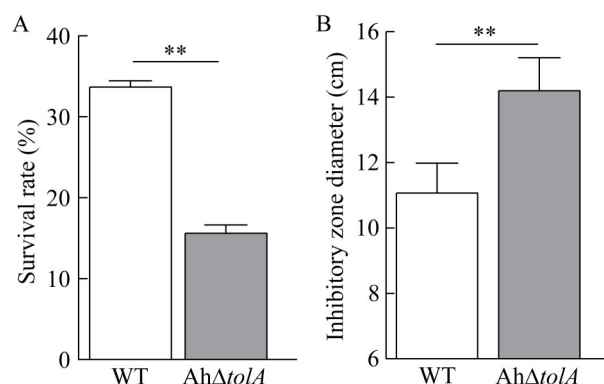


图3 WT与AhΔtolA的脱氧胆酸钠敏感性(A)和氧化应激敏感度测定(B)

Figure 3 Survival rate of sodium deoxycholate (A) and H_2O_2 sensitivity (B) of WT and AhΔtolA. **: $P < 0.01$.

体细胞相互连接,并聚集成团,团块随时间增加逐渐变大;而 AhΔtolA 的玻片上仅有少量细胞相互连接,大多数细胞处于分散状态。静置培养 48 h 时,WT 菌体较大且聚集连接,细胞层数较厚,形成成熟的生物被膜。相比之下, AhΔtolA 菌体连接分散,形成的生物被膜分布不均匀、细胞层数少,生物被膜不完整(图 4C)。使用 ImageJ 软件(version 1.45)对荧光强度进行分析,结果表明无论在 24 h 还是 48 h,WT 生物被膜的荧光强度均大于 AhΔtolA (图 4D)。上述研究结果证实 *tolA* 缺失显著抑制嗜水气单胞菌的生物被膜形成能力, *tolA* 在生物被膜发育中起着至关重要的作用。

2.5 *tolA* 基因缺失对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 OMVs 产量的影响

为了探究 *tolA* 缺失是否影响嗜水气单胞菌 OMVs 的产生,提取并纯化了 WT 与 AhΔtolA 的 OMVs。经超速离心后发现,WT 菌株的沉淀显著少于 AhΔtolA 的沉淀。利用 BCA 法测定蛋白浓度以评价 OMVs 的产量,结果表明, AhΔtolA 产生的 OMVs 的蛋白浓度为 1 000 ng/μL,显著高于 WT 的 800 ng/μL (图 5)。这一结果表明 AhΔtolA 产生的 OMVs 显著多于 WT 菌株产

生的 OMVs。

2.6 透射电镜观察

为进一步观察 2 种菌株的形态变化,经过负染后置于透射电镜下观察。结果显示,WT 菌体呈杆状,具有鞭毛,细胞表面光滑,细胞周围分布有双层膜囊泡状结构(图 6A,黑色箭头所示)。选取 50 个 WT 细胞测量其平均长度为 $(1.50 \pm 0.06) \mu m$ (图 6A)。与 WT 不同, AhΔtolA 的菌体长度显著变短,平均长度为 $(1.10 \pm 0.05) \mu m$,细胞同样具有鞭毛,细胞周围分布大量囊泡状结构(图 6B,黑色箭头所示),与 WT 的外膜囊泡相比,许多囊泡形态不规则,大小悬殊(图 6B 黄色箭头)。同时, AhΔtolA 细胞还分泌大量更小的囊泡吸附在细胞表面,聚集在一起。

OMVs 形态观察发现,WT 和 AhΔtolA 的 OMVs 均为脂质双分子层、大小不等的球状囊泡结构,含有大量鞭毛。WT 产生的 OMVs 粒径大小在 200 nm 左右,背景干净,形态典型(图 6C,黑色箭头所示)。与 WT 相比, AhΔtolA 产生的 OMVs 含有更多形状不规则、大小不均一的囊泡结构,并且数量增多(图 6D,黄色箭头所示)。以上结果表明 *tolA* 基因对 OMVs 的产生具有重要作用。

2.7 *tolA* 基因缺失对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 毒力基因表达的影响

通过 RT-qPCR 对 14 个毒力基因在 2 种菌株中的表达水平差异进行测定。结果如图 7 所示,除调控鞭毛合成基因 *flgL* 表达量升高外,其余 13 个毒力基因的表达量均显著下降。

2.8 转录组数据分析

原始数据经过过滤、测序错误率检查、G+C 含量分布等检查后,各样品 clean reads 数均在 7 485 266 条以上,两端 Q20 (99% 碱基正确率)均在 97.78% 以上,两端 Q30 为 93.88% 以上,说明本研究中的 RNA-seq 数据质量良好。

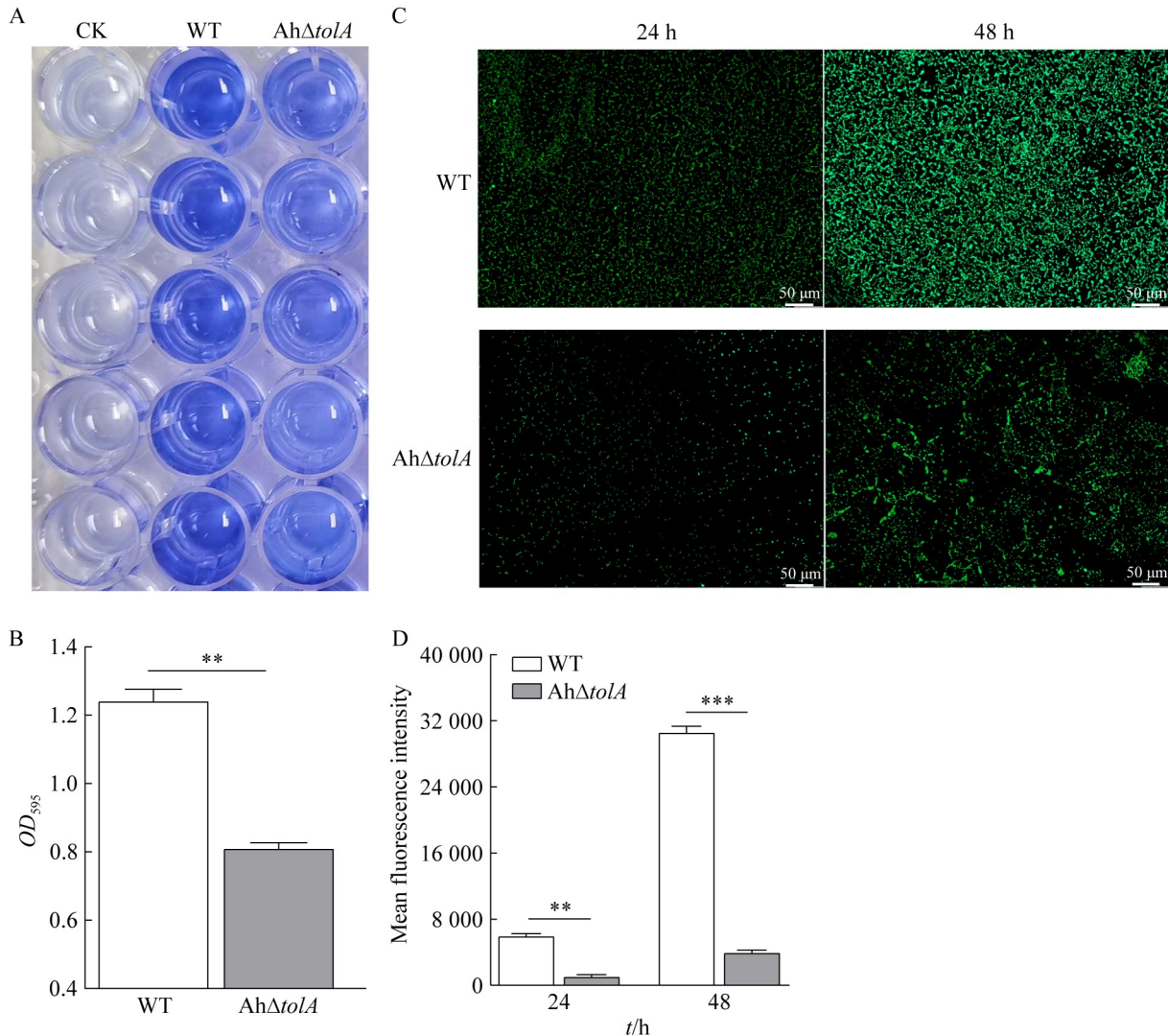


图4 WT和*AhΔtolA*的生物被膜形成能力检测。A–B: WT和*AhΔtolA*的生物被膜形成能力检测; C: WT和*AhΔtolA*的生物被膜形态观察; D: 荧光强度分析。

Figure 4 The biofilm formation capacity of WT and *AhΔtolA*. A–B: Detection of biofilm formation capacity; C: Microscopic analysis of biofilm architecture; D: Analysis of fluorescence intensity. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

各重复样本的相关系数因子 R^2 均在 0.95–1.00 之间, 说明样本的重复性较高。

2.8.1 差异表达基因分析

测序数据中显著差异表达基因 [$|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 及 $P_{\text{adjust}} \leq 0.05$] 的筛选结果如图 8 所示, WT 和 *AhΔtolA* 之间共有 300 个差异表达基因, 其中显著上调的基因有 171 个, 显著下调的基因有 129 个。

2.8.2 GO 功能注释分析

对 300 个差异表达基因进行 GO 功能分析的结果显示: 有 114 个显著差异基因注释到生物学过程, 44 个显著差异基因注释到细胞组分, 155 个显著差异基因注释到分子功能, 结果如图 9A 所示。生物学过程主要涉及氧化还原过程 (oxidation-reduction process) 和能量代谢过程 (metabolic process); 细胞组分主要以外膜 (outer

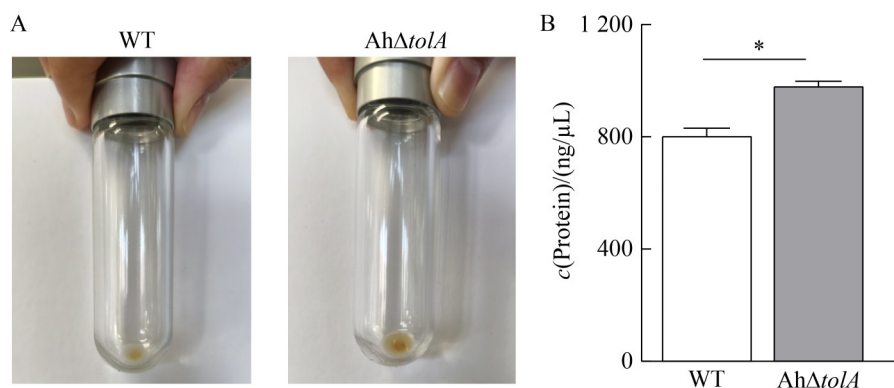


图5 WT和AhΔtolA的OMVs纯化(A)与蛋白浓度检测(B)

Figure 5 Purification (A) and protein concentrations (B) of OMVs from WT and AhΔtolA. *: $P < 0.05$.

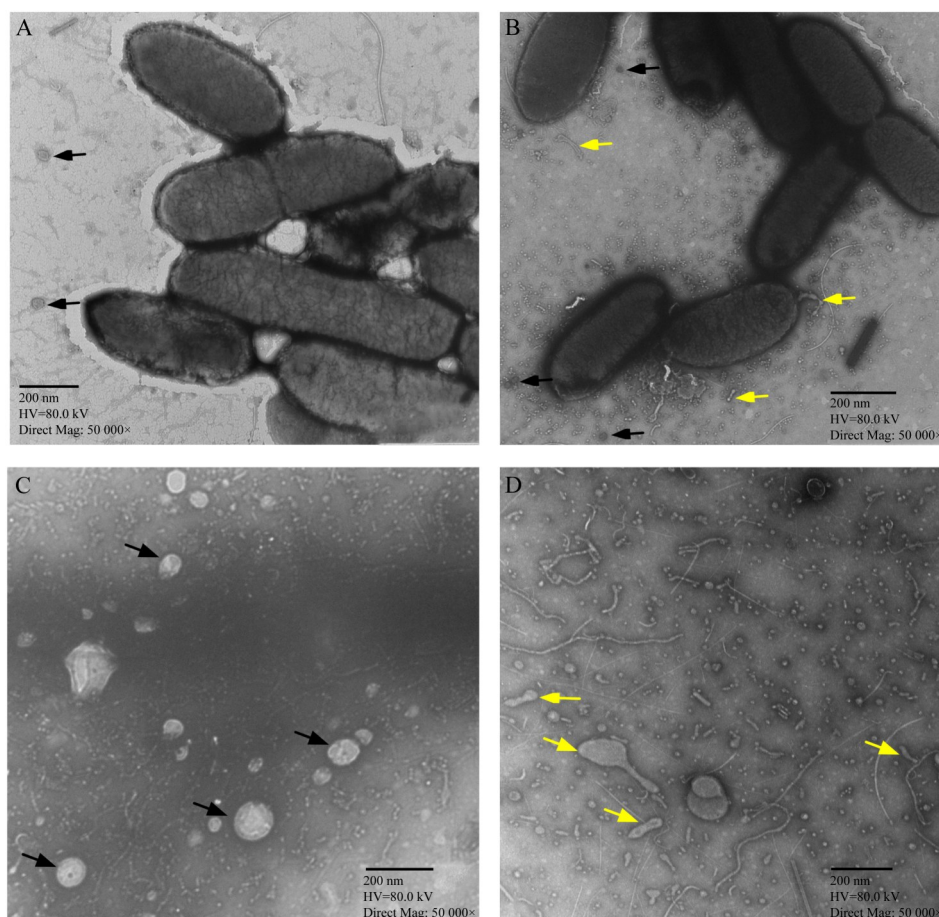


图6 WT和AhΔtolA 的细胞与OMVs形态的透射电镜观察

Figure 6 Transmission electron microscopy (TEM) observation of cell and OMVs morphology of WT and AhΔtolA. Cell morphological characterization of WT (A) and AhΔtolA (B) were observed by TEM. OMVs derived from WT (C) and AhΔtolA (D) were evaluated by TEM. Black arrows and yellow arrows indicated the normal and abnormal morphology of OMVs, respectively.

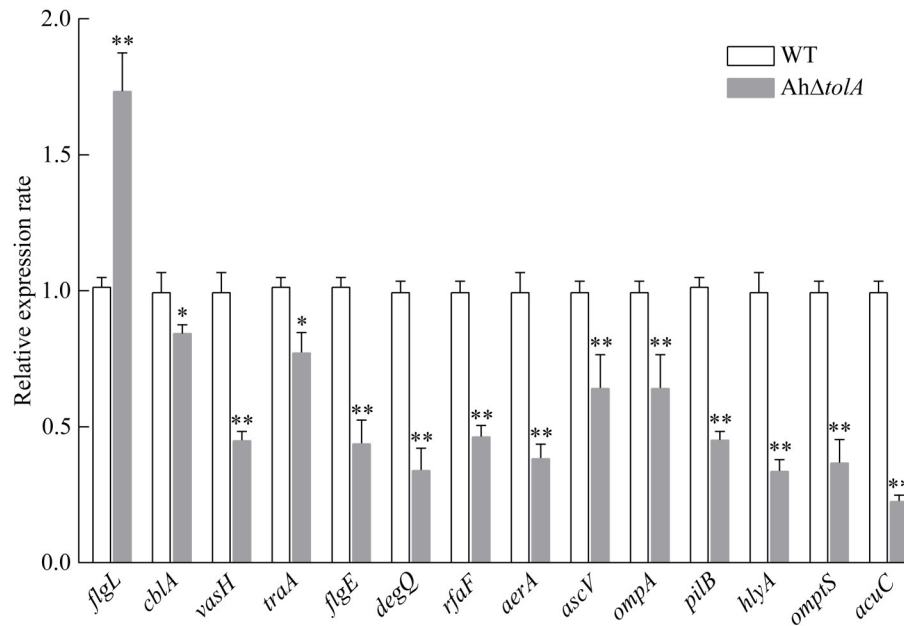


图7 WT和AhΔtolA的毒力基因表达谱

Figure 7 The virulence gene expression levels between WT and AhΔtolA. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

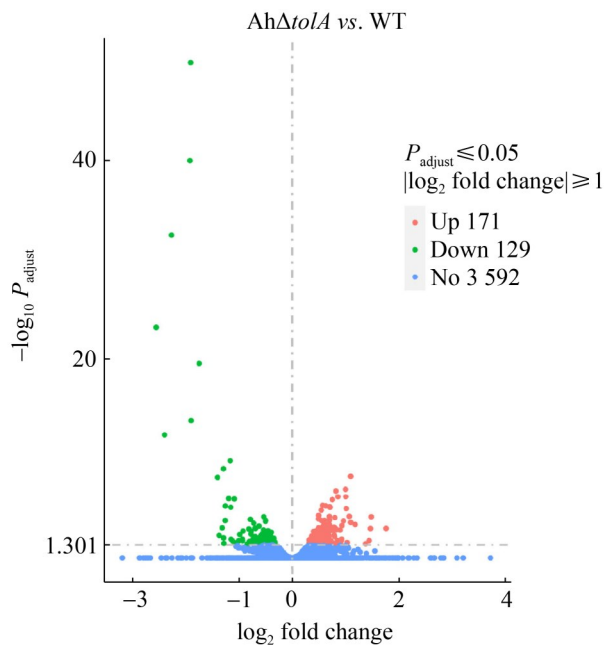
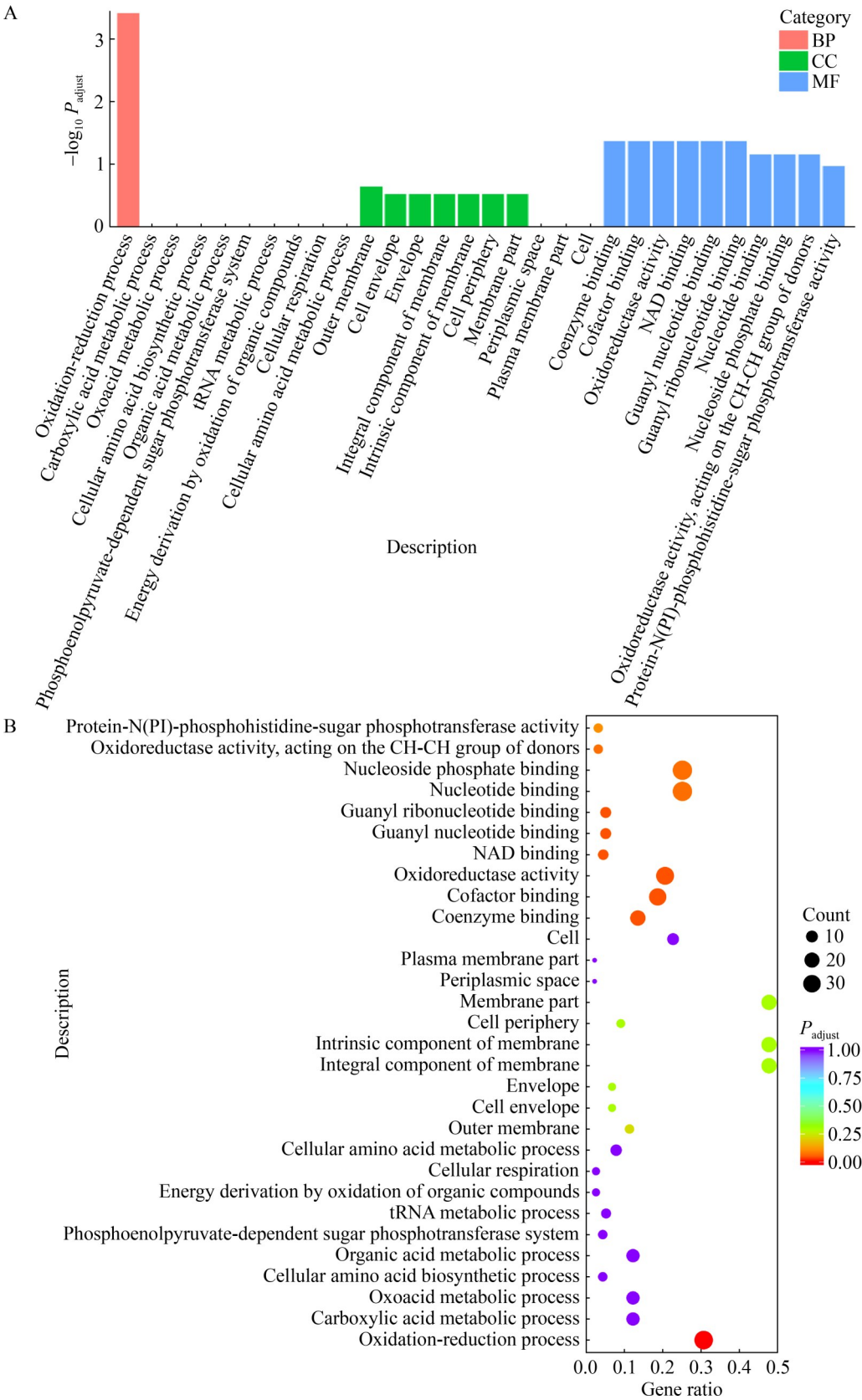


图8 WT和AhΔtolA的差异表达基因火山图

Figure 8 Volcano map of differentially expressed genes between WT and AhΔtolA.

membrane)、细胞包膜 (cell envelope)、包膜 (envelope)、膜的组成成分 (integral component of membrane)、膜的固有成分 (intrinsic component of membrane) 为主; 分子功能主要涉及核苷磷酸结合 (nucleoside phosphate binding)、核苷酸结合 (nucleotide binding)、氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)、辅因子结合 (cofactor binding) 和辅酶结合 (coenzyme binding)。在 *tolA* 基因缺失菌株中, 氧化还原过程、能量代谢过程、细胞外膜和氧化还原酶活性等调控过程中差异基因富集较为显著。结果表明, *tolA* 基因与细胞的氧化还原能力、代谢、外膜完整性和核糖体生物合成密切相关。利用 STRING 数据库对 *rnpA*、*tyrS*、*dusB*、*glyQ*、*gltX*、*pth*、*AHA_RS02775*、*hemA*、*pheS* 等核糖体生物合成相关基因的蛋白互作进行了分析, 结果表明这些基因具有密切的联系 (图 9C)。上述结果表明, 敲除 *tolA* 基因对细胞的生物学过程及分子功能产生了重要影响, 尤其是对细胞外膜稳定性的影响, 进而影响细胞的代谢途径。



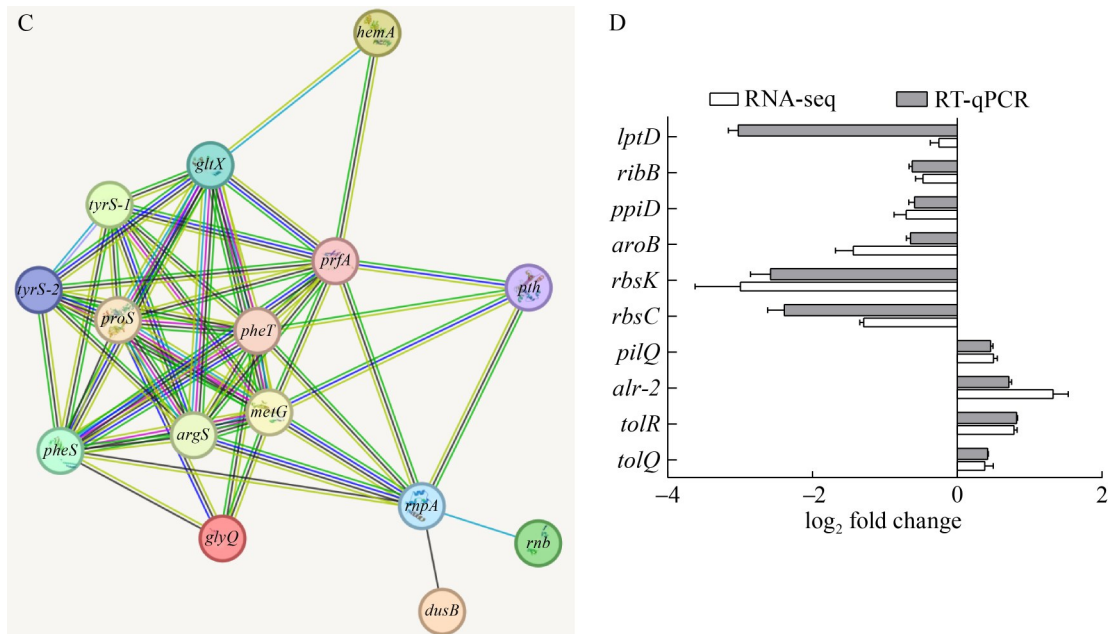


图9 WT和AhΔ*tolA*的转录组分析结果及RT-qPCR验证。A: GO富集分类图; B: 核糖体相关基因蛋白质互作网络分析结果; C: KEGG富集分析图; D: RT-qPCR验证。

Figure 9 The transcriptome analysis results of WT and AhΔ*tolA* and RT-qPCR validation. A: GO enrichment classification bar chart; B: Results of ribosome related gene protein interaction network analysis; C: KEGG enrichment analysis chart; D: RT-qPCR validation.

2.8.3 KEGG 代谢通路分析

为进一步分析 *tolA* 基因缺失对代谢途径的影响, 通过 KEGG 对 300 个差异基因进行代谢通路分析, 结果如图 9B 和表 3 所示。显著下调表达的基因主要富集在次生代谢物生物合成、不同环境下的微生物代谢、辅助因子的生物合成、氨基酸生物合成、氨基糖和核苷酸糖代谢等代谢通路。下调最显著的 15 个基因包括 ABC 转运蛋白(*rbsC*、*rbsB*、*rbsA*)、参与氧化还原途径的基因(*AHA_RS12635*、*AHA_RS12630*、*AHA_RS12645*、*AHA_RS12600*)、参与生物合成途径的核糖激酶(*rbsK*、*AHA_RS11695*)以及与细菌磷酸转移酶系统(PTS)相关的蛋白(*fruA*、*pfkB*、*fruB*、*fruR*)。显著下调的基因主要与细菌所需营养物质的合成与运输相关, 这些营养物质对细菌的聚集和在宿主体内的生存具有重要作用。细菌的磷酸转移酶系统(PTS)是连接糖

吸收和信号转导的全局调节网络。PTS 系统中 *fruRBA* 操纵子表达水平的下调会导致细菌可利用的碳水化合物急剧减少, 进而影响细菌的黏附、生物被膜形成、毒力因子合成等, 最终降低细菌的致病力。

显著上调表达的基因主要富集在次生代谢物生物合成、不同环境下的微生物代谢、碳代谢、丙酮酸代谢、双组分系统、氨基酸代谢等代谢通路。在上调最显著的 15 个基因中, 包括参与氧化还原途径的基因(*AHA_RS05325*、*AHA_RS10535*、*AHA_RS07520*)、具有氧化还原酶活性的基因(*AHA_RS10540*、*AHA_RS14490*)、参与微生物代谢和碳代谢的基因(*AHA_RS10550*、*arcC*、*AHA_RS16915*)、参与氨基酸代谢的基因(*hutI*、*AHA_RS20910*)、参与丙酸盐代谢的基因(*prpB*)、双组分系统的基因(*AHA_RS16180*)、参与核苷酸结合的基因(*AHA_RS17705*)以及参与跨

表3 KEGG富集分析部分结果

Table 3 Display of partial results from KEGG enrichment analysis

Pathways ID	Pathways	Number of DEGs	
		Up-regulated	Down-regulated
aha01110	Biosynthesis of secondary metabolites	20	16
aha01120	Microbial metabolism in diverse environments	17	11
aha01200	Carbon metabolism	15	4
aha01230	Biosynthesis of amino acids	7	8
aha01240	Biosynthesis of cofactors	2	12
aha00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	4	6
aha00620	Pyruvate metabolism	9	1
aha02020	Two-component system	8	1
aha00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4	4
aha00010	Glycolysis/Gluconeogenesis	6	2
aha00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	7	0
aha00640	Propanoate metabolism	6	1
aha02010	ABC transporters	1	6
aha00910	Nitrogen metabolism	3	3
aha02060	Phosphotransferase system (PTS)	1	5
aha00230	Purine metabolism	3	3

膜运输的基因(*AHA_RS07405* 和 *tolR*)。显著上调的基因主要涉及组氨酸、谷氨酸、精氨酸等氨基酸的代谢与运输。丙酸代谢关键基因 *prpB* 的上调表明细菌细胞中丙酸盐出现过度积累, 而丙酸盐的过度积累会对细胞造成毒性。上述结果表明, *tolA* 基因的缺失显著干扰了细菌的氧化还原、能量代谢和物质合成等多种代谢途径。

2.9 RT-qPCR 验证结果

根据 GO 及 KEGG 转录组数据的差异基因富集分析, 并结合相关代谢途径, 选取差异表达上调和下调的 10 个基因进行 RT-qPCR 验证, 结果如图 9D 所示。所选基因的表达水平变化趋势与 RNA-Seq 的基因表达水平变化趋势一致。

3 讨论与结论

嗜水气单胞菌导致的运动性气单胞菌败血症(MAS)给全球水产养殖业造成巨大的经济损失。Tol-Pal 系统相关基因在维持细菌外膜完整性和参与 OMVs 的生物发生和释放中发挥重要

作用。目前关于嗜水气单胞菌 *tolA* 基因的研究尚未见报道, 本研究以嗜水气单胞菌 ATCC 7966 为研究对象, 成功敲除了 *tolA* 基因, 并对其生理特性进行了测定。

在本研究中, *AhΔtolA* 在 LB 培养基中的生长速度未发生明显变化。多项研究表明, *tolA* 基因的缺失通常不会影响细菌的生长。在鼠伤寒沙门氏菌和鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 中, *tolA* 基因的缺失对细菌生长的影响较小^[27-28]。然而, 菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 的 TolA、TolQ、TolB 和 Pal 突变体细胞形态和分裂严重受损, 在 LB 培养基上生长缓慢, 需要添加抗渗透剂才能生存^[6]。此外, 猪霍乱沙门氏菌的 *tolA* 基因突变体在对数期的生长较野生型明显降低^[22]。

tol-pal 基因对于维持革兰氏阴性菌的外膜完整性是必要的^[29]。本研究发现, 突变株 *AhΔtolA* 的细胞形态发生改变, 对脱氧胆酸钠和氧化应激的敏感度增强, 且较 WT 在菌体周围分泌更

多的外膜囊泡。上述结果表明, *tolA* 基因的缺失可能对菌体的形态和外膜稳定性造成了影响。前期研究发现, 大肠杆菌和沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*) 的 *tolA* 基因缺失突变体表现出细胞排列成链状、释放大量的外膜囊泡以及对抗生素和变性剂敏感性增强等外膜完整性损伤的表型^[22,30]。Masilamani 等研究表明, 鼠伤寒沙门氏菌的 Tol-Pal 系统介导的磷脂酰甘油运输机制可能会影响细菌外膜的稳定性^[7]。

生物被膜是 *A. hydrophila* 的关键毒力因子, 使细菌能够在宿主体内持续存在并抵抗抗菌处理^[31]。本研究发现, *tolA* 基因的缺失显著抑制了嗜水气单胞菌生物被膜的形成。国外课题组研究显示 Tol-Pal 系统的 *tolA* 基因缺失会影响细菌生物被膜的形成。Su 等^[32]发现, *tolA* 基因的缺失显著减少了禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*) E058 生物被膜的形成, 并显著降低了其毒力。Hirakawa 等^[16]发现泌尿道致病性大肠杆菌 (uropathogenic *E. coli*) 的 *tolA* 基因缺失突变体的生物被膜形成能力显著降低。*tolA* 基因影响生物被膜形成的机制尚未明确。Su 等^[32]认为 Tol-Pal 系统与细胞壁以及各种包膜成分如脂多糖 (LPS)、外膜蛋白 (OmpF 和 OmpC) 或外膜受体 (PhoE 和 LamB) 相互作用, 潜在地影响细菌的附着和生物被膜的形成。

OMVs 介导细菌细胞之间的大分子转移, 并与生物被膜形成和发病机制有关^[33]。Tol-Pal 系统通过与细胞壁相互作用参与外膜囊泡 (OMVs) 的发生与释放, *tol-pal* 基因的缺失会影响 OMVs 的产生^[34]。本研究表明, *tolA* 基因敲除后, 嗜水气单胞菌的 OMVs 产量显著增加; 透射电镜观察到细胞表面及周围出现大量外膜囊泡。*tolA* 基因参与 OMVs 的生物发生, 是 OMVs 生物发生过程中的重要蛋白。多项研究发现, *tolA* 基因缺失会导致 OMVs 产量的增加。王楚等^[27]发现, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) γ 3761 的 *tolA* 基因突变体菌

体周围有许多 OMVs 分泌且产量显著增加。同样地, 猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*) 的 *tolA* 基因突变体的 OMVs 产量也显著增多^[22]。值得注意的是, Avila-Calderón 等^[25]利用蛋白质组学分析了嗜水气单胞菌的 OMVs, 发现 OMVs 中存在 TolB、TolQ 和 Pal 蛋白, 但未发现 TolA 和 TolQ 蛋白。这表明 *tolA* 基因仅在 OMVs 产生过程中发挥了某种作用, 但并未成为其组成成分, 其具体机制仍有待深入研究。

A. hydrophila WT 和 Δ *tolA* 的转录组测序分析结果表明, WT 和 Δ *tolA* 共有 300 个差异表达基因 (上调 171 个, 下调 129 个)。与 *tolA* 同属 Tol-Pal 系统的 *tolQ*、*tolR* 基因表达量上调, 而 *tolB* 和 *pal* 的表达量未见变化。多项研究表明, TolA 是 Tol-Pal 系统的中心枢纽, 一方面, TolA 与 TolQ 和 TolR 形成位于内膜的 TolQ-TolR-TolA 复合物; 另一方面, TolA 与外膜蛋白 Pal 存在相互作用, 起到稳定外膜与内膜结构的重要作用。推测 *tolQ*、*tolR* 基因的上调是为了补偿 *tolA* 基因缺失造成的功能缺失。*alr* 基因编码丙氨酸消旋酶, 多项研究证明, 丙氨酸消旋酶对 *A. hydrophila* 保持细胞外膜完整性、维系细胞生理功能和致病性发挥着重要作用^[35-36]。*alr* 基因的上调可能是对 *tolA* 缺失造成的细胞外膜缺陷的补救。转录组测序结果还发现了大量氧化还原过程和氧化还原酶相关基因的上调, 例如大肠杆菌在细胞膜完整性受到损伤时会产生氧化应激, 为了抵抗和减少活性氧带来的损伤, 氧化还原过程和氧化还原酶相关基因会发生上调^[37]。

GO 富集分析表明, 表达显著下调的基因大多与核糖体表达和细菌毒力相关, 表明 Δ *tolA* 的核糖体生物合成以及蛋白质翻译和毒力下降。我们发现与 Tol-Pal 系统密切相关的 *ybgC* 基因显著下调。*ybgC* 基因编码一种酰基辅酶 A 硫酯酶, 参与物种特异性磷脂的生物合成^[38]。Qin 等^[39]研究表明, YbgC、TolA 和 TolQ 是革兰氏

阴性菌 Tol-Pal 系统维持细胞膜稳定性的 3 种压力感应蛋白, 三者存在密切相互作用, *ybgC* 的缺失会下调 *tolR*、*tolA* 的表达量, 进而影响整个 Tol-Pal 系统的稳定性。

综上所述, 本研究表明嗜水气单胞菌的 *tolA* 基因对菌体形态、外膜稳定性、生物被膜的产生均有明显的调控作用, 此外, 也证实了 *tolA* 基因参与了 OMVs 的生物发生。本研究为进一步研究 Tol-Pal 系统在嗜水气单胞菌的致病机制中奠定了基础, 同时为嗜水气单胞菌 OMVs 的疫苗开发提供了理论参考。

作者贡献声明

陈甜梦、王亚平: 实验操作、论文撰写和修改; 任凤娟: 转录组测序, 参与论文讨论; 李沐伟、张梓萌: 回补菌株的构建与突变体特性分析; 鞠建松: 数据收集和处理; 赵宝华、刘东: 本研究的构思和设计以及论文修改。

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] SEMWAL A, KUMAR A, KUMAR N. A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture[J]. *Heliyon*, 2023, 9(3): e14088.
- [2] CHEN K, QIN T, PAN LK, BING XW, XI BW, XIE J. Effects of glycyrrhetic acid β on growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1043838.
- [3] ZHANG MY, ZHANG T, HE Y, CUI HJ, LI H, XU ZH, WANG X, LIU YL, LI HP, ZHAO XH, CHENG HL, XU JH, CHEN XN, DING ZJ. Immunogenicity and protective efficacy of OmpA subunit vaccine against *Aeromonas hydrophila* infection in *Megalobrama amblycephala*: an effective alternative to the inactivated vaccine[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1133742.
- [4] FENG C, LIU XF, HU NW, TANG YY, FENG MZ, ZHOU ZJ. *Aeromonas hydrophila* Ssp1: a secretory serine protease that disrupts tight junction integrity and is essential for host infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 127: 530-541.
- [5] LAZZARONI JC, GERMON P, RAY MC, VIANNEY A. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 177(2): 191-197.
- [6] DUBUISSON JF, VIANNEY A, HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, LAZZARONI JC. Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 10): 3337-3347.
- [7] MASILAMANI R, CIAN MB, DALEBROUX ZD. *Salmonella* Tol-Pal reduces outer membrane glycerophospholipid levels for envelope homeostasis and survival during bacteremia[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(7): e00173-18.
- [8] LAHIRI A, ANANTHALAKSHMI TK, NAGARAJAN AG, RAY S, CHAKRAVORTY D. TolA mediates the differential detergent resistance pattern between the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhi and Typhimurium[J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 5): 1402-1415.
- [9] DENNIS JJ, LAFONTAINE ER, SOKOL PA. Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7059-7068.
- [10] HEILPERN AJ, WALDOR MK. CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(6): 1739-1747.
- [11] LLAMAS MA, RAMOS JL, RODRÍGUEZ-HERVA JJ. Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4764-4772.
- [12] PROUTY AM, van VELKINBURGH JC, GUNN JS. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the *tolQRA* cluster[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(5): 1270-1276.
- [13] PATERSON GK, NORTEN H, CONE DB, WILLERS C, PETERS SE, MASKELL DJ. Deletion of *tolA* in *Salmonella* Typhimurium generates an attenuated strain with vaccine potential[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 1): 220-228.
- [14] KUEHN MJ, KESTY NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction[J]. *Genes & Development*, 2005, 19(22): 2645-2655.
- [15] ELLIS TN, KUEHN MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(1): 81-94.
- [16] HIRAKAWA H, SUZUE K, KURABAYASHI K, TOMITA H. The Tol-Pal system of uropathogenic *Escherichia coli* is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1827.
- [17] TAKAKI K, TAHARA YO, NAKAMICHI N, HASEGAWA Y, SHINTANI M, OHKUMA M, MIYATA M, FUTAMATA H, TASHIRO Y. Multilamellar and multivesicular outer membrane vesicles produced by a *Buttiauxella agrestis tolB* mutant[J]. *Applied and*

- Environmental Microbiology, 2020, 86(20): e01131-20.
- [18] FORDJOUR E, BAI ZH, LI SH, LI SJ, SACKKEY I, YANG YK, LIU CL. Improved membrane permeability via hypervesiculation for *in situ* recovery of lycopene in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(9): 2725-2739.
- [19] MITRA S, SINHA R, MITOBE J, KOLEY H. Development of a cost-effective vaccine candidate with outer membrane vesicles of a *tolA*-disrupted *Shigella boydii* strain[J]. Vaccine, 2016, 34(15): 1839-1846.
- [20] LIN L, WANG YQ, SRINIVASAN R, ZHANG LS, SONG HH, SONG QL, WANG GB, LIN XM. Quantitative proteomics reveals that the protein components of outer membrane vesicles (OMVs) in *Aeromonas hydrophila* play protective roles in antibiotic resistance[J]. Journal of Proteome Research, 2022, 21(7): 1707-1717.
- [21] ZHAO Y, LIU YY, LI N, MUHAMMAD M, GONG SY, JU JS, CAI TX, WANG JL, ZHAO BH, LIU D. Significance of broad-spectrum racemases for the viability and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. Future Microbiology, 2022, 17: 251-265.
- [22] LI Q, LI Z, FEI X, TIAN YC, ZHOU GD, HU YH, WANG SF, SHI HY. The role of TolA, TolB, and TolR in cell morphology, OMVs production, and virulence of *Salmonella Choleraesuis*[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 5.
- [23] JAYARAMAN S, RAJENDHRAN N, KANNAN MA, RAMASAMY T. Quercetin disrupts biofilm formation and attenuates virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(7): 326.
- [24] CONWAY GE, HE ZL, HUTANU AL, CRIBARO GP, MANALOTO E, CASEY A, TRAYNOR D, MILOSAVLJEVIC V, HOWE O, BARCIA C, MURRAY JT, CULLEN PJ, CURTIN JF. Cold Atmospheric Plasma induces accumulation of lysosomes and caspase-independent cell death in U373MG glioblastoma multiforme cells[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12891.
- [25] AVILA-CALDERÓN ED, OTERO-OLARRA JE, FLORES-ROMO L, PERALTA H, AGUILERA-ARREOLA MG, MORALES-GARCÍA MR, CALDERÓN-AMADOR J, MEDINA-CHÁVEZ O, DONIS-MATURANO L, RUIZ-PALMA MDS, CONTRERAS-RODRÍGUEZ A. The outer membrane vesicles of *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966™: a proteomic analysis and effect on host cells[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2765.
- [26] SEIKE S, KOBAYASHI H, UEDA M, TAKAHASHI E, OKAMOTO K, YAMANAKA H. Outer membrane vesicles released from *Aeromonas* strains are involved in the biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 613650.
- [27] 王楚, 屠润妍, 费霞, 田一辰, 李权, 石火英. 鼠伤寒沙门菌 *tolA* 缺失株的构建及生物学功能研究[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(12): 92-98.
- WANG C, TU RY, FEI X, TIAN YC, LI Q, SHI HY. Construction and biological function analysis of *tolA* mutation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(12): 92-98 (in Chinese).
- [28] HUBLOHER JJ, van der SANDE L, SCHAUDINN C, MÜLLER V, AVERHOFF B. The Tol-Pal system of *Acinetobacter baumannii* is important for cell morphology, antibiotic resistance and virulence[J]. International Microbiology, 2023, 26(3): 543-550.
- [29] HIRAKAWA H, SUZUE K, TOMITA H. Roles of the *tol/pal* system in bacterial pathogenesis and its application to antibacterial therapy[J]. Vaccines, 2022, 10(3): 422.
- [30] HALE CA, PERSONS L, de BOER PAJ. Recruitment of the TolA protein to cell constriction sites in *Escherichia coli* via three separate mechanisms, and a critical role for FtsWI activity in recruitment of both TolA and TolQ[J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(1): e0046421.
- [31] YIN HM, YAN QH, CHENG GQ, ZHANG L, LI MQ, HU TT, GAO SH, CHEN YH, TANG HQ, LUO J. The antivirulence activity, transcriptomics of EGCG and its protective effects on zebrafish infected by *Aeromonas hydrophila*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2023, 13: 1271448.
- [32] SU SY, LI ZL, SUN YY, GAO S, GAO QQ. The multifaceted role of TolA protein in promoting survival, biofilm formation and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Poultry Science, 2024, 103(10): 104142.
- [33] SZCZEPANIAK J, PRESS C, KLEANTHOUS C. The multifarious roles of *tol-pal* in Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(4): 490-506.
- [34] AJAM-HOSSEINI M, AKHOONDI F, PARVINI F, FAHIMI H. Gram-negative bacterial sRNAs encapsulated in OMVs: an emerging class of therapeutic targets in diseases[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 13: 1305510.
- [35] LIU D, ZHANG L, XUE W, WANG YP, JU JS, ZHAO BH. Knockout of the alanine racemase gene in *Aeromonas hydrophila* HBNUAh01 results in cell wall damage and enhanced membrane permeability[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(13): fnv089.
- [36] LIU D, ZHANG T, WANG YP, MUHAMMAD M, XUE W, JU JS, ZHAO BH. Knockout of alanine racemase gene attenuates the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 72.
- [37] XIE QQ, LI L, DONG HR, LI R, TIAN R, CHEN J. Influence of several crucial groundwater components on the toxicity of nanoscale zero-valent iron towards *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions[J]. Chemosphere, 2021, 285: 131453.
- [38] QIN XJ, DONG R, HE SK, ZHOU XJ, ZHANG ZF, CUI Y, SHI CL, LIU YH, SHI XM. Characterization of the role of *ybgC* in lysozyme resistance of *Salmonella* Enteritidis[J]. Food Control, 2020, 109: 106732.
- [39] QIN XJ, HE SK, ZHOU XJ, CHENG X, HUANG XZ, WANG YY, WANG SY, CUI Y, SHI CL, SHI XM. Quantitative proteomics reveals the crucial role of YbgC for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis survival in egg white[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 289: 115-126.