

## 转座子 mini-Tn10 介导的运动突变对溶藻弧菌毒力的影响

覃映雪<sup>1</sup>, 徐晓津<sup>1</sup>, 鄢庆枇<sup>1\*</sup>, 苏永全<sup>2</sup>, 刘力铭<sup>1</sup>, 李学刚<sup>1</sup>

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 采用转座子 mini-Tn10/Km 构建了致病性溶藻弧菌的突变库, 采用半固体双层平板初筛到 73 株运动缺陷突变株, 初筛的突变株纯化及重复筛选后获得运动性缺陷表型稳定的突变株 ND-01MM, Southern 鉴定确定其为单位点插入。野生型菌株 ND-01 和运动缺陷突变株 ND-01MM 对致病性溶藻弧菌的天然宿主大黄鱼粘液的趋化、粘附以及在大黄鱼吞噬细胞内存活能力等生理功能的比较研究发现, 溶藻弧菌运动缺陷后趋化及粘附能力均极显著下降 ( $P < 0.01$ ), 但在吞噬细胞内存活能力则与野生型菌株差异不显著 ( $P > 0.05$ )。采用腹腔注射和浸泡两种方式感染大黄鱼, 结果发现运动缺陷对浸泡感染的影响较为明显, 但对腹腔注射的感染方式影响不大。

**关键词:** 溶藻弧菌; 运动缺陷; 转座子; 毒力

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标志码:** A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是一种广泛分布于世界各地海水及河口的革兰氏阴性嗜盐菌<sup>[1-2]</sup>。该菌寄主范围广, 不仅能够感染多种海洋脊椎动物和无脊椎动物<sup>[3-5]</sup>, 并给世界各国海水养殖业造成巨大的经济损失, 还可感染人类引发皮肤溃疡等疾病<sup>[6]</sup>。现有研究发现, 溶藻弧菌的毒力因子涉及粘附、胞外产物、铁载体及 III 型分泌系统等<sup>[3-4]</sup>, 但溶藻弧菌运动性与其致病性的关系很少报道。

大量研究表明, 细菌的运动性和致病性密切相关<sup>[7-9]</sup>。运动功能在细菌获取营养、逃避毒性物质、在宿主中寻找适宜位点粘附定殖、入侵宿主以及向周围环境播散的过程中起着至关重要的作用, 很多情况下运动是病原菌有效感染宿主的必要条件<sup>[7, 10]</sup>。如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 运动能力缺失后会明显削弱细菌对宿主细胞的侵袭力<sup>[11-12]</sup>。Morooka 等<sup>[13]</sup>用化学诱变剂诱变空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 野生型菌株, 获得了

因鞭毛缺失导致运动性丧失的突变株和鞭毛部分缺失且保留部分运动性的突变株, 结果缺失了运动性的突变株不能在小鼠肠道内定殖, 具有部分运动性的菌株保留一部分定殖能力。对创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 的研究也发现, 运动缺失后细菌对细胞的粘附及形成生物被膜的能力降低, 对小鼠的毒性也明显减弱<sup>[14]</sup>。Ormonde 等<sup>[9]</sup>发现鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 运动缺失突变株对鱼类细胞的入侵能力显著下降。

本实验采用转座子 mini-Tn10/Km 构建溶藻弧菌突变库, 并从突变库中筛选和鉴定运动缺陷表型稳定的菌株, 研究野生型菌株与运动缺陷突变株在趋化、粘附、吞噬细胞内存活等方面的生物学特性, 并采用不同感染方式用野生型菌株与运动缺陷突变株感染其天然宿主大黄鱼, 比较大黄鱼的死亡率, 研究结果对了解溶藻弧菌运动性与毒力的关系, 进一步揭示溶藻弧菌重要的运动相关基因以及这些基因在其致病过程中的作用有重要意义。

收稿日期: 2012-02-15

修回日期: 2012-03-07

资助项目: 国家公益性行业专项(200903029); 福建省杰出青年基金(2011J06014)

通讯作者: 鄢庆枇, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**菌株和质粒** 实验采用的菌株和质粒如表 1 所示, 其中大肠杆菌培养条件为 LB 培养基 37 °C 培养, 溶藻弧菌培养条件为含 2% NaCl 的 TSB(trypic soy broth)或 TSA(trypic soy agar)培养基 28 °C 培养。

**主要试剂** 细菌基因组抽提试剂盒、质粒小量抽提试剂盒为 Omega 公司产品, 地高辛标记检测试剂盒为 Roche 公司产品, 链霉素等抗生素为 Amresco 公司产品, 限制性内切酶、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)等购自大连宝生物公司, 其余试剂均为分析纯。

表 1 菌株和质粒  
Tab. 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 strain or plasmid	特性 characteristic	来源 source
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>		
ND-01	野生型菌株, 分离自患病大黄鱼 (Sm <sup>R</sup> )	[15]
ND-01MM	运动缺陷突变株(Sm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	本实验 this paper
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
SM10	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4-2-Tc::Mu::Km ( $\lambda$ pir)	[16]
质粒 plasmid		
pLOFKm	Ap <sup>R</sup> ; Tn10-based delivery plasmid with Km <sup>R</sup>	[16]

### 1.2 实验方法

**溶藻弧菌突变库的构建** 参照 Herrero 等<sup>[16]</sup>的方法并适当改进, 供体菌 *E.coli* Sm10 (pLOF/Km) 在 LB(Ap 50 µg/mL, Km 100 µg/mL)培养基中 37 °C 震荡培养过夜, 受体菌溶藻弧菌 ND-01 菌株在 TSB(Sm 100 µg/mL)培养基中 28 °C 震荡培养过夜。分别离心收集供体菌和受体菌, 用新鲜培养基洗涤并重悬菌体, 供体菌与受体菌按 1:4 的比例混合均匀, 将混合菌液用 0.22 µm 的微孔滤膜过滤, 取出滤膜置于 TSA 平板(3 mmol/L IPTG, 不含抗生素)上, 28 °C 培养 4 h 后将滤膜取出, 置于含 1 mL LB 的 Eppendorf 管中振荡, 将滤膜上的细菌洗脱。

**运动缺陷突变株的筛选** 取 100 µL 从上述滤膜洗脱的菌液与半固体 TSA 培养基(0.3%琼脂, Sm 100 µg/mL, Km 100 µg/mL)混合后倒入培养皿中, 室温下静置待半固体培养基凝固后再倒入一薄层不含菌液的新鲜半固体培养基, 置 28 °C 培养 48 h, 将在双层半固体培养基中长出的明显小而厚的菌株在 TSA 平板分离纯化后, 穿刺接种于试管中 TSA 半固体培养基(0.3%琼脂, Sm 100 µg/mL, Km 100 µg/mL), 28 °C 培养 48 h, 根据菌株在试管半固体培养基中的生长状态进行反复筛选, 并采用悬滴法在显微镜下观察初筛菌株的运动性, 淘汰运动性恢复的突变株, 最后获得运动缺陷表型

稳定的突变株。

**运动缺陷突变株的 Southern 鉴定** 为进一步验证筛选的突变株是否为转座子插入引起的稳定突变, 对筛选出的菌株基因组 DNA 进行 Southern 鉴定。采用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Pst* I 对野生型菌株和突变株的基因组 DNA 进行酶切, 0.7%琼脂糖凝胶电泳后转至尼龙膜, 以标记地高辛的卡那抗性基因约 176 bp 的片段作为探针, 参照 Rock 等<sup>[17]</sup>的方法进行杂交, 其中质粒 pLOF/Km 为阳性对照, 野生型菌株为阴性对照。

**趋化试验** 参照 Bordas 等<sup>[18]</sup>的方法制大黄鱼表皮粘液、肠粘液和鳃粘液备用, 参照 Larsen 等<sup>[19]</sup>的方法测定溶藻弧菌及其突变株对粘液的趋化作用, 具体方法如下: 将菌株接种于 2% NaCl 的 TSB 中 30 °C 培养至指数期, 6000 × g 离心 5 min 收集菌体, 0.85%无菌生理盐水洗涤 3 次, 趋化缓冲液调整菌浓度。取玻璃毛细管(内径为 0.3 mm)一端吸入 5 µL 粘液物质, 另一端热熔封闭后插入装有 0.3 mL 菌悬液的 1.0 mL 注射器中, 室温下保持水平状态孵育 60 min。取出毛细管, 用灭菌水洗净去外表面的菌液, 将毛细管内溶物吹出, 用平板菌落计数法计数。每个样品做 3 个平行, 以加入趋化缓冲液的玻璃毛细管为对照。

**黏附试验** 参考鄢庆彬等<sup>[20]</sup>的方法进行体

外粘附实验,取 50  $\mu\text{L}$  粘液滴于载玻片(25.4 mm $\times$ 76.2 mm)中央,然后用盖玻片(22 mm $\times$ 22 mm)均匀涂开,与盖玻片大小相同,放置在超净工作台过夜干燥后用甲醇固定 20 min。取菌液( $\text{OD}_{600}=0.3$ )500  $\mu\text{L}$  滴加到固定有粘液的载玻片上,25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h 后用无菌生理盐水荡洗 5 次以洗去未粘附的菌,自然干燥后,用甲醇固定 20 min,显微镜下观察。再用结晶紫染色 3 min,清洗、干燥后在显微镜下随机选取 20 个视野,用数码相机拍照后在电脑上计数,取平均值后换算为单位面积的细胞数(/mm)。每个样品做 3 个平行,以不涂粘液的载玻片为空白对照。

**吞噬细胞内存活试验** 参照 Martin 等<sup>[21]</sup>的方法并稍作改进,具体方法如下:大黄鱼(300 g)用 75%乙醇体表消毒后,尾部取血置于 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷 L-15 细胞培养液(0.1%胎牛血清,100 IU 链霉素/青霉素/mL 和 10IU 肝素/mL)中。另取一支 10 mL 离心管,先加入 1.5 mL 51%的 percoll 液,再加入 1.5 mL 34%的 percoll 液,然后将血细胞悬浮液沿试管壁缓慢加入,4  $^{\circ}\text{C}$  下 350  $\times$  g 离心 15 min,收集交界面处的细胞条带制备浓度约为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的细胞悬液。将细胞悬液加入六孔板中,每孔 1 mL,再将浓度约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的野生菌和突变株菌悬液也分别加入六孔板,每孔各 1 mL(即感染复数 MOI 为 100)。两种悬浮液混合后放入湿盒中 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 30 min,再转移至无菌离心管,28  $^{\circ}\text{C}$  150  $\times$  g 离心 5 min,去除上清后加入庆大霉素杀胞外菌 20 min,28  $^{\circ}\text{C}$  下 110  $\times$  g 离心 5 min,取上清液涂平板,检测胞外杀菌的效果,沉淀则用 PBS 洗涤两次后其中一份直接加 1 mL 的无菌蒸馏水使细胞涨破并稀释涂板,结果作为 0 时刻存活细菌数,另一份加 L-15 细胞培养液重悬并 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 60 min 后裂解计数。每个样品做 3 个平行,并进行 3 次独立的重复实验。

**感染试验** 体质量 50~100 g 的健康大黄鱼分为 6 组,每组 15 尾,分别于体积为 500 L 的塑料水箱中暂养 3 d 后进行攻毒试验。其中 3 组采用腹腔注射的方式感染,分别注射 0.2 mL 野生型溶藻弧菌 ND-01、突变株 ND-01MM 及无菌生理盐水(注射的菌悬液浓度约为  $2 \times 10^7$  CFU/mL);另外 3 组采用浸泡感染的方式,其中两组实验鱼分别放入菌悬液终浓度约为  $2 \times 10^6$  CFU/mL 的野生型溶藻弧菌

ND-01 和突变株 ND-01MM 中浸泡感染 24 h 后去除含菌海水,换上新鲜海水,另一组为不添加菌液浸泡的对照组。每天观察和记录实验鱼的症状和死亡数量,共持续 1 周。采用自动加热棒使整个实验过程的水温控制在 28  $^{\circ}\text{C}$  左右。

**数据的处理** 结果以平均数  $\pm$  标准差表示,用 EXCEL, SPSS 进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 突变株的初步筛选

供体菌与受体菌结合后在双层半固体培养基平板中的生长状态如图 1-a 所示,箭头所指菌落在同样的培养条件下明显小于其他菌落,菌落边缘清晰不弥散,将这些菌落挑出后纯化并穿刺试管中的半固体培养基进一步筛选,采用悬滴法在显微镜下观察初筛菌株的运动性,淘汰运动性恢复的突变株,最后获得运动缺陷表型稳定的突变株。结果从 30 个双层半固体平板约 3 700 多个菌落中共挑出 73 个初筛菌落,经纯化及反复筛选后获得 1 株运动缺陷表型稳定的突变株(图 1-b)。

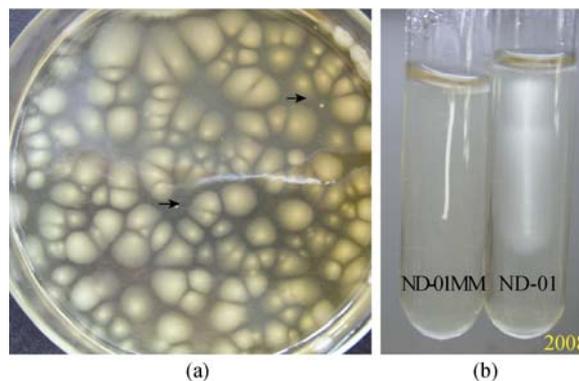


图 1 运动缺陷突变株的筛选

Fig. 1 Screen for mutants with deficiency in motility

### 2.2 突变株的 Southern 鉴定

Southern 杂交结果显示,阳性对照和突变株基因组中均检测到单一的 mini-Tn10 条带,而阴性对照野生型菌株的基因组中未检测到,从而证明突变株 ND-01MM 的运动缺陷突变确为转座子 mini-Tn10 单位点插入引起(图 2)。

### 2.3 突变株对大黄鱼粘液的趋化性

野生型菌株和突变株对其天然宿主大黄鱼各部位粘液的趋化结果显示,野生株对各部位粘液均具有较强的趋化作用,其中对肠粘液的趋化量

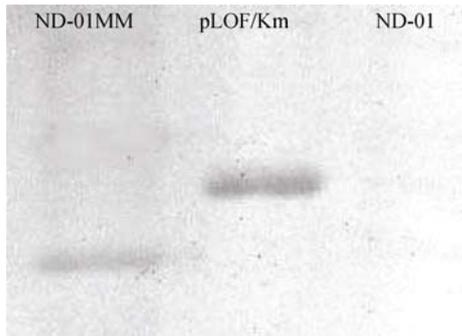


图 2 Southern 杂交  
Fig.2 Southern-bolting analysis

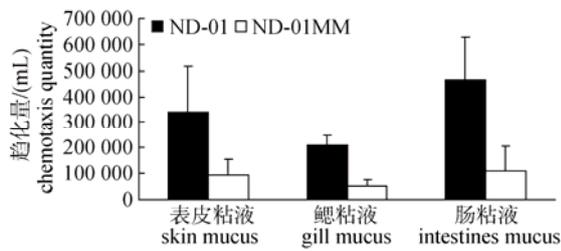


图 3 野生型菌株和突变株对大黄鱼粘液的趋化性  
Fig.3 Chemotaxis of wild type strain and the mutants to mucus of *P. crocea*

最大, 而突变株对各部位粘液的趋化量均极显著低于野生株的趋化量( $P < 0.01$ ), 说明运动性缺陷突变对溶藻弧菌的趋化性有重要影响(图 3)。

2.4 突变株对大黄鱼粘液的粘附

野生型菌株和突变株对大黄鱼各部位粘液均具有粘附作用, 其中对肠粘液的粘附量最大, 且两者对各部位粘液的粘附量均存在极显著差异( $P < 0.01$ )(图 4), 说明细菌的运动突变对粘附的影响显著。

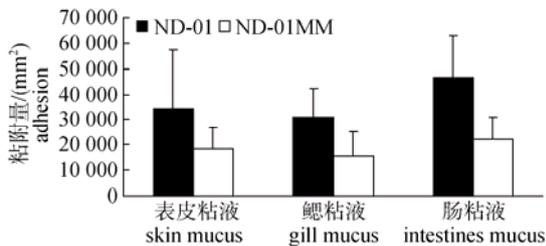


图 4 野生型菌株和突变株对大黄鱼粘液的粘附  
Fig.4 Adhesion of wild type strain and the mutants to mucus of *P. crocea*

2.5 吞噬细胞内存活试验

吞噬细胞内存活试验中胞外菌经庆大霉素处理后取上清液涂平板, 检测胞外杀菌的效果, 结果在平板上均没有细菌生长, 说明胞外杀菌效果良好。野生型菌株和突变株在大黄鱼吞噬细胞内的存

活结果显示, 0 时间的结果表明野生型菌株和突变株均可被大黄鱼吞噬细胞吞噬, 两者被吞噬的数量并不存在显著性差异( $P > 0.05$ ), 60 min 的结果表明两者均可在吞噬细胞内存活而不被吞噬细胞完全消灭, 二者 60 min 的存活量也不存在显著差异( $P > 0.05$ )(图 5), 说明运动性与细菌在吞噬细胞内存活能力并不直接相关。

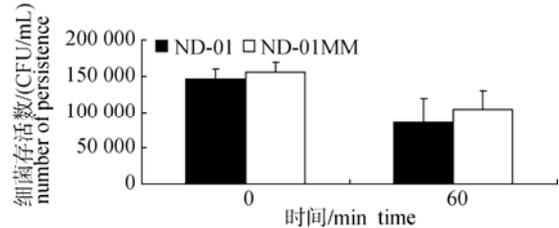


图 5 野生型菌株和突变株在大黄鱼吞噬细胞内存活  
Fig.5 Persistence of wild type strain and the mutants in phagocytes of *P. crocea*

2.6 感染试验

分别采用腹腔注射和浸泡两种方式感染大黄鱼发现, 采用腹腔注射的方式感染野生型和突变株, 结果两组实验大黄鱼的死亡率差别不大(表 2); 而采用浸泡方式感染则感染突变株的实验鱼死亡率明显低于感染野生型菌株的实验组(表 3)。说明运动缺陷对细菌毒力的影响与感染的方式密切相关。

表 2 腹腔注射感染试验结果

Tab. 2 The results of intraperitoneal infection

感染菌株 (strain)	实验鱼数量 (total fish)	累计死亡数量 (total deaths)	死亡率/% (mortality rate)
ND-01	15	12	80
ND-01MM	15	13	86.67
生理盐水 (saline)	15	2	13.3

表 3 浸泡感染试验结果

Tab. 3 The results of immersion infection

感染菌株 (strain)	实验鱼数量 (total fish)	累计死亡数量 (total deaths)	死亡率/% (mortality rate)
ND-01	15	10	66.7
ND-01MM	15	4	26.7
生理盐水 (saline)	15	1	6.7

3 讨论

现有的研究发现, 具有运动能力的病原菌的运动功能在其趋化、粘附和侵袭过程发挥重要作用,

很多情况下运动是病原菌有效感染宿主的必要条件<sup>[7,10]</sup>。例如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、空肠弯曲菌等人类重要的病原菌正常的趋化性运动可保证细菌在宿主体内正确定位和繁殖<sup>[22-23]</sup>,而霍乱弧菌(*V. cholera*)的运动性与其表达的多种毒力决定因子及在肠道内的定殖紧密相关<sup>[8,24]</sup>。还有报道认为,鳗弧菌鞭毛的运动是其在宿主鱼体内传染的必要条件<sup>[25]</sup>,该菌经过转座突变获得的运动缺失突变株以浸泡方式感染宿主,细菌的毒力较野生型菌株下降500倍<sup>[26]</sup>。

本研究发现,致病性溶藻弧菌运动缺陷突变后对其天然宿主大黄鱼各部位粘液的趋化性显著降低,说明趋化性与运动性有着密切的相关性。细菌的趋化性是细菌通过将细胞外的化学信号转化为胞内各种信号控制鞭毛的运动方向,从而产生相对应的趋化性运动<sup>[10]</sup>。这种运动对获取营养、逃避毒性物质、寻找适宜寄主和固着位点及向周围环境播散起到至关重要的作用。如邹文政等<sup>[27]</sup>对河流弧菌的研究表明,河流弧菌运动性增强导致其对趋化管内粘液和海水的趋化量增加;单志英等<sup>[28]</sup>通过研究推测,铜绿假单胞菌基因组中IV型菌毛生物合成基因簇很可能与上游和下游的基因共同组成了铜绿假单胞菌的一个趋化作用信号传导系统,控制IV型菌毛的运动。

粘附作用是细菌感染的第一步,它对细菌侵入宿主细胞并有效发挥毒素作用具有重要意义。病原菌只有先粘附于介质表面,才能进一步侵染机体感染致病,因此对粘液的粘附能力的研究是病原菌毒力研究的一个重要方面。本研究结果显示,溶藻弧菌野生型菌株在运动缺陷突变后对其宿主各部位粘液的粘附量也是极显著降低。有研究表明,细菌的运动能力是决定其粘附性的一个重要因素,其鞭毛运动影响了其粘附的能力<sup>[29]</sup>,如副溶血弧菌极鞭毛运动明显加强了其对介质的粘附作用,而其侧生鞭毛对粘附也有一定的加强作用<sup>[30]</sup>,在溶藻弧菌粘附早期,细菌的极鞭毛在加速泳动速率和粘附于介质表面也起着重要作用,一旦细胞开始吸附,极性鞭毛就会影响随后的粘附<sup>[30]</sup>。

在宿主吞噬细胞内的存活动力也是细菌毒力的一个体现。但本研究结果发现,野生型溶藻弧菌和运动表型缺陷的突变菌株均可被大黄鱼吞噬细胞吞噬,且两者被吞噬的量并不存在显著性差异。

两株菌在被吞噬细胞吞噬后60 min仍然有相当部分存活,但两者在被吞噬60 min后的存活量也不存在显著差异。因此,吞噬细胞内存活试验结果表明,溶藻弧菌的运动性与细菌在吞噬细胞内存活能力并不直接相关。

感染试验结果还发现,运动性对溶藻弧菌以浸泡方式感染有重要影响,感染运动缺陷株的实验组鱼死亡率仅有26.7%,远低于浸泡感染野生型菌株实验组的66.7%。采用腹腔注射感染方式时,感染野生型菌株和感染运动缺陷突变株的实验组鱼死亡率差别不大,说明当细菌以腹腔注射的方式感染时运动性对细菌的毒力并没有明显影响。这一结果与O'Toole等<sup>[26]</sup>的研究结果相吻合。O'Toole等发现极鞭毛和随机的非趋性运动并非鳗弧菌毒力的充分条件,而鞭毛介导的趋化性运动才是鳗弧菌在浸泡感染中所必需的。由此推测,本研究所获得的突变株ND-01MM突变的基因可能既影响细菌鞭毛的形成,也对细菌的趋化和粘附有重要影响,从而影响细菌对宿主的感染和入侵,但并不影响细菌在宿主体内繁殖和产生毒素。有关ND-01MM基因的突变及功能还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Chang C I, Lee C F, Wu C C, *et al.* A selective and differential medium for *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(3): 227-234.
- [2] 李祥云, 文超, 陈炯, 等. 溶藻弧菌外膜蛋白 OmpK 基因表达和间接 ELISA 检测方法的初步建立[J]. *水产学报*, 2010, 34(10): 1559-1565.
- [3] 陈强, 鄢庆彬, 马甦. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. *海洋科学*, 2006, 30(8): 83-89.
- [4] Zhao Z, Chen C, Hu C, *et al.* The type III secretion system of *Vibrio alginolyticus* induces rapid apoptosis, cell rounding and osmotic lysis of fish cells[J]. *Microbiology*, 2010, 156: 2864-2872.
- [5] Campanelli A, Sanchez-Politta S, Saurat J H. Cutaneous ulceration after an octopus bite: infection due to *Vibrio alginolyticus*, an emerging pathogen[J]. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 2008, 135: 225-227.
- [6] Balcázar J L, Gallo-Bueno A, Planas M, *et al.* Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 97(2): 207-210.
- [7] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 291: 605-614.
- [8] Gardel G L, Mekalanos J J. Alterations in *Vibrio chol-*

- erae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(6): 2246–2255.
- [9] Ormonde P, HÖrstedt P, O’toole R, *et al.* Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(8): 2326–2328.
- [10] Lux R, Shi WY. Chemotaxis-guided movements in bacteria[J]. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004, 15(4): 207–220.
- [11] Fleiszig S M J, Arora S K, Van R, *et al.* FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells[J]. *Infection And Immunity*, 2001, 69(8): 4931–4937.
- [12] Tomich M, Herfst C A, Golden J W, *et al.* Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(4): 1799–1806.
- [13] Morooka T, Umeda A, Amako K. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1985, 131: 1930–1980.
- [14] Lee J, Rho J B, Park K, *et al.* Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(8): 4905–4910.
- [15] 鄢庆枇, 王军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2002 ( 3 ), 21: 225–230.
- [16] Herrero M, Lorenzo V, Timmis K N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 6557–6567.
- [17] Rock J L, Nelson D R. Identification and characterization of a hemolysin gene cluster in *Vibrio anguillarum*[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74 ( 5 ) : 2777–2786.
- [18] Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I, *et al.* Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3650–3654.
- [19] Larsen M H, Larsen J L, Olsen J F. Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 38: 77–80.
- [20] 鄢庆枇, 陈强, 邹文政, 等. 不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠粘液的影响[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 254–259.
- [21] Martin D W, Mohr C D. Invasion and Intracellular survival of *Burkholderia cepacia*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68 ( 1 ) : 24–29.
- [22] Nakazawa T. Growth cycle of *Helicobacter pylori* in gastric mucous layer[J]. *The Keio Journal of Medicine*, 2002, 51 (Suppl 2): 15–19.
- [23] Hugdahl M B, Beery J T, Doyle M P. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56 ( 6 ) : 1560–1566.
- [24] Liang W, Pascual-Montano A, Anisia J S, *et al.* The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*[J]. *Microbiology*, 2007, 153: 2964–2975.
- [25] Marianne H L, Henriette T B. Role of flagellum and chemotactic motility of *Vibrio anguillarum* for phagocytosis by and intracellular survival in fish macrophages [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203(2): 149–152.
- [26] O’Toole R, Milton D L, Wolf-Watz H. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(3): 625–637.
- [27] 邹文政, 纪荣兴, 义家波, 等. 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用[J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 318–324.
- [28] 单志英, 徐海津, 施兴启, 等. 铜绿假单胞菌蹭行运动相关基因的研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(3): 319–323.
- [29] Meron D, Efrony R, Johnson W R, *et al.* Role of flagella in virulence of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5704–5707.
- [30] Belas M R, Colwell R R. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*[J]. *Journal Bacteriology*, 1982, 151: 1568–1580.

## Effect of transposon-induced motility defect on virulence of *Vibrio alginolyticus*

QIN Ying-xue<sup>1</sup>, XU Xiao-jin<sup>1</sup>, YAN Qing-pi<sup>1\*</sup>, SU Yong-quan<sup>2</sup>, LIU Li-ming<sup>1</sup>, LI Xue-gang<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea of Ministry of Agriculture, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Motility is thought to contribute to the virulence of many pathogenic bacteria. Infection studies in many motile pathogens found that in many cases normal motility was required for efficient infection. However, there are few reports on the direct correlation between motility and virulence in *Vibrio*. In order to understand the role of motility of *Vibrio alginolyticus* in virulence, the mini-Tn10/Km transposon-induced mutant bank was constructed and 73 motility defective mutants were screened out by double semi-soft agar medium. After purification and repeated screening the mutant ND-01MM with stable motility defect was obtained and identified by Southern blot. The chemotaxis and adhesion of wild-type strain ND-01 and the mutant ND-01MM to mucus of the natural host *Pseudosciaena crocea* and their persistence in phagocytes of *P. crocea* were tested. The results showed that the chemotaxis and adhesion of the mutant was highly significantly impaired ( $P < 0.01$ ) when compared with the wild-type strain, however there was no significant difference in their ability of persistence in phagocytes ( $P > 0.05$ ). The results of infection test showed that the virulence of the mutant was decreased by immersion infection, but not different from the wild-type strain by intraperitoneal injection.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; motility defect; transposon; virulence

**Corresponding author:** YAN Qing-pi. E-mail: yanqp@jmu.edu.cn