

文章编号: 1674-7054(2021)02-0161-06



# 维氏气单胞菌 *flrB* 基因敲除株构建及其生物特性鉴定

王祖成, 马香, 李宏, 王丹, 唐鸿倩, 唐燕琼, 刘柱

(海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228)

**摘要:** 维氏气单胞菌是一种常见的人鱼共患致病菌, 为研究维氏气单胞菌中的 *flrB* 基因的功能, 笔者通过扩增 *flrB* 基因上下游同源臂连接至 pRE112 质粒中, 电击转化重组质粒至大肠杆菌 WM3064, 接合转入野生型维氏气单胞菌, 在蔗糖压力下筛选、PCR 和测序验证敲除菌株。结果表明, 敲除 *flrB* 基因后降低生物膜的形成, 但不影响维氏气单胞菌的生长。*flrB* 基因能促进其生物膜的形成, 这为进一步揭示该基因的功能和作用机制奠定了基础。

**关键词:** 基因敲除; *flrB*; 生物膜; 维氏气单胞菌

**中图分类号:** Q 78      **文献标志码:** A

**引用格式:** 王祖成, 马香, 李宏, 等. 维氏气单胞菌 *flrB* 基因敲除株构建及其生物特性鉴定 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(2): 161-166. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2021.02.004

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是一类杆状的革兰氏阴性菌, 具有极强的适应性, 并广泛存在于水环境中的常见致病菌。维氏气单胞菌于 1983 年首次从病患机体中分离出来并命名<sup>[1]</sup>, 此后该菌株不断在鱼类、水体环境以及食物中被分离鉴定出来, 是一类重要的食源型致病菌<sup>[2]</sup>。维氏气单胞菌对人、鱼以及陆生哺乳动物均具有极强的致病性。鱼类感染维氏气单胞菌后会体表充血红肿甚至溃烂、内脏出血、腹水等症状<sup>[3-4]</sup>; 人类感染维氏气单胞菌后会引起严重的肠胃感染以及败血症, 免疫力低下的人群甚至会引发更严重的脑膜炎以及尿路感染<sup>[5]</sup>; 有案例表明维氏气单胞菌可感染一些哺乳动物, 引发肠胃炎, 并导致肝脏受损<sup>[6]</sup>。近年来, 由维氏气单胞菌引发的感染案例越来越多, 这对鱼类养殖业以及人类的生命安全构成了严重的威胁。因此, 解构维氏气单胞菌感染和致病机理将对维氏气单胞菌的防治具有重要意义。

双组分系统广泛存在于细菌中, 通过感知外界信号、信号转导进而调控细菌内基因的表达, 帮助细菌快速适应变化的环境。此外, 有研究表明双组分系统也与细菌致病性相关, 荧光假单胞菌可通过 RstA/RstB 双组分系统激活外排泵增加耐药性<sup>[7]</sup>, 野油菜黄单胞菌通过 RavA/RavR 双组分系统调控鞭毛合成使其更容易侵染宿主<sup>[8]</sup>。FlrB/FlrC 被鉴定为调控细菌鞭毛合成的双组分系统<sup>[9]</sup>, FlrB 作为传感器激酶具有自磷酸化和传递磷酸基团至受体调节器的作用, 进而调控下游鞭毛基因的表达, 霍乱弧菌鞭毛合成受该双组分系统调节<sup>[10]</sup>。FlrB 作为感受器激酶是双组分系统中不可或缺的因子, 对鞭毛系统的合成至关重要, 并且鞭毛是细菌成分中影响生物膜形成的主要因子<sup>[11-12]</sup>。研究表明在溶藻弧菌中敲除 *flrB* 基因后细菌的运动性和生物膜形成显著降低<sup>[13]</sup>, 在霍乱弧菌中 FlrC 的磷酸化依赖于同源 FlrB, 磷酸化的 FlrC 能提高细菌的运动和定植能力<sup>[14]</sup>。实验室前期对维氏气单胞菌进行全基因组测序分析, 发现 FlrB/FlrC 双组分系统存在于维氏气单胞菌中。虽然 *flrB* 基因被报道与致病性性状相关, 但在维氏气单胞菌中的作用机理尚未见报道。因此, 本研究旨在构建 *flrB* 基因敲除株, 揭示维氏气单胞菌中 *flrB* 基因的生物学作用, 进一步阐明维氏气单胞菌的致病机理, 为维氏气单胞菌的治疗和防治提供理论基础。

收稿日期: 2020-12-28      修回日期: 2021-01-28

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(31772887)

第一作者: 王祖成(1996-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2018 级硕士研究生. E-mail: wangzucheng123456@163.com

通信作者: 唐艳琼(1968-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 植物病原细菌真菌的遗传机理及生物防控技术. E-mail: 990804@hainu.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

**1.1 实验材料、仪器** 维氏气单胞 C4 菌株、大肠杆菌 WM3064、pRE112 质粒均为本实验室自存。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、产物纯化回收试剂盒、2×PCR MIX 购自诺维赞生物科技有限公司;限制性内切为酶(KpnI、XbaI)以及 T4 连接酶购自 NEB 公司;氨苄青霉素(水溶,母液浓度 50 g·L<sup>-1</sup>,工作浓度 50 μg·mL<sup>-1</sup>, -20 °C 保存)、氯霉素(乙醇溶,母液浓度 25 g·L<sup>-1</sup>,工作浓度 25 μg·mL<sup>-1</sup>, -20 °C 保存)、二氨基庚二酸(水溶,母液浓度 50 g·L<sup>-1</sup>,工作浓度 50 μg·mL<sup>-1</sup>, -20 °C 保存)、LB 培养基(1% NaCl、1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物)购自索莱宝有限公司。PBS 缓冲液(100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 8.1 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mmol·L<sup>-1</sup> KCL, PH 7.4), 结晶紫染料、冰醋酸等均为国产分析纯,购自海南正恒科技有限公司。Eppendorf Centrifuge 5418 高速台式离心机(Eppendorf 中国有限公司)、Life ECO-PCR 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司)、Bio-Rad MicroPulser 电穿孔仪(美国 Bio-Rad 公司)、HZQ-F100 振荡培养箱(哈尔滨市东联生化仪器有限公司)、ME204E 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。本研究所用的 *flrB* 上下游同源臂扩增引物、*flrB* 敲除验证引物、pRE112 载体验证引物均合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,序列见表 1。

表 1 基因敲除所用引物序列  
Tab. 1 Primer sequence for gene knockout

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	注释 Annotation
<i>flrB</i> -F1	GGGGTACCCATTGAGACGCCGCCGCTGCGTG	扩增 <i>flrB</i> 基因上游同源臂
<i>flrB</i> -R1	AGCCTGCACTGTCATAAACCTGACCTCAAAC	
<i>flrB</i> -F2	GGTTTATGACAGTGCAGGCTGGTGCCGAGG	扩增 <i>flrB</i> 基因下游同源臂
<i>flrB</i> -R2	CGTCTAGAGTTGGCGTAGGCCGGTCATCAGC	
<i>flrB</i> -F0	GTTTGTTCGACCGGGTCCGGTGG	敲除 <i>flrB</i> 基因验证引物
<i>flrB</i> -R0	CGTAGCGGCTGACCTGATTAAG	
pRE-112-F	ACATAGCCCCACTGTTCGT	pRE112载体验证引物
pRE-112-R	TTTTCGTCTCAGCCAATCC	

**1.2 扩增 *flrB* 基因上下游同源臂片段** 以细菌总 DNA 为模板,分别用 *flrB*-F1/*flrB*-R1 和 *flrB*-F2/*flrB*-R2 进行 PCR 扩增目的片段。30 μL PCR 体系: 2×PCR MIX 15 μL, 基因组 DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 12 μL, 上下游同源臂引物各 1 μL。反应程序: 95 °C 10 min, 95 °C 30 S, 58 °C 30 S, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min 4 °C 停止反应。使用产物纯化试剂盒纯化回收扩增的 DNA 片段并保存于 4 °C 冰箱待用,同时使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带大小是否正确。

**1.3 pRE112-Δ*flrB* 载体构建** 使用 Overlap PCR 连接上下游同源臂。Overlap PCR 体系(50 μL): 2×PCR MIX 25 μL, 引物 *flrB*-F1 1 μL, 引物 *flrB*-R2 1 μL, 上游扩增同源臂 1 μL, 下游扩增同源臂 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 21 μL; PCR 程序为: 95 °C 10 min, 95 °C 30 S, 58 °C 30 S, 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min 4 °C 停止反应。回收 PCR 产物至 1.5 mL 离心管中,加入 30 μL 6×DNA 上样缓冲液混匀并加入到 1% 琼脂糖凝胶孔中, 120 V 恒流电泳 25 min。使用凝胶成像仪观测并切胶回收正确条带,使用产物纯化试剂盒回收凝胶中的 DNA 片段并检测浓度。以 KpnI 和 XbaI 酶切 pRE112 质粒和上下游同源臂连接片段,酶切体系 50 μL(5 μL Cutsmart mix, KpnI 和 XbaI 各 1 μL, pRE112 质粒和上下游同源臂连接片段 1500 ng,加水补齐至 50 μL), 37 °C 酶切 4 h。用产物纯化试剂盒纯化回收酶切后产物。用 T4 连接酶进行连接酶切后的质粒与片段,连接摩尔比质粒(片段为 1 : 5,连接体系为: 1 μL T4 连接酶, 1 μL T4 连接酶 buffer, 酶切 pRE112 质粒 100 ng, 酶切片段 50 ng,加水补齐至 10 μL), 16 °C 连接 1 h。使用电击转化法,将连接产物转化进入大肠杆菌 WM3064 感受态细胞中,转化细胞在 37 °C 孵育 1 h 后涂布于氯霉素、二

氨基庚二酸平板上过夜培养; 挑取单菌落, 使用 pRE112 引物进行验证, 成功重组载体送测序, 作进一步验证。

**1.4 双亲接合及敲除菌株筛选** 接种野生型维氏气单胞菌 C4 和携带有 pRE112- $\Delta flrB$  的大肠杆菌 WM3064, 分别于 30 °C 和 37 °C 过夜培养, 以  $2 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 为起始菌量转接并培养至 OD 值为 0.4 ~ 0.6; 将维氏气单胞菌和大肠杆菌以 (1 : 1)、(1 : 4)、(2 : 3)、(3 : 2)、(4 : 1) 的比例混合至 1 mL, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min 去上清, 使用 10  $\mu$ L 新鲜培养基重悬菌体并点于 DAP 平板上, 置于 30 °C 恒温培养箱中培养 24 h 以上。向培养后的接合平板上加 1 mL 新鲜培养基, 用涂布棒刮下菌体于培养基中, 取 20  $\mu$ L 刮下的菌液稀释 10 倍后涂布于氯霉素和氨苄青霉素双抗平板上, 于 30 °C 恒温培养箱中过夜培养, 挑取单菌落验证接合。挑选成功接合的单菌落接种于添加有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 °C 恒温培养过夜使其充分发生重组。取过夜培养的菌液依次稀释 10、20、30 倍, 取 200  $\mu$ L 各稀释梯度的菌液涂布于 8% 蔗糖和氨苄青霉素平板上, 30 °C 恒温倒置过夜培养。挑选生长出的单菌落用 F0/R0 引物进行 PCR 验证敲除菌株。

**1.5 生长曲线测定** 挑取野生型和敲除 *flrB* 基因的单菌落接种过夜活化, 以  $2 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 起始菌量转接至添加有氨苄青霉素的 200 mL 新鲜 LB 培养基中, 150 r·min<sup>-1</sup>, 30 °C 恒温培养 24 h, 每 1 h 取菌检测 OD 值。每组样品设置 3 个生物学重复, 统计测量数据并绘制随时间变化的生长曲线, 观察其生长情况。

**1.6 生物膜形成测定** 采用 96 孔板微量法检测生物膜形成, 挑取野生型和敲除 *flrB* 基因的单菌落接种于加氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基中过夜活化, 以  $2 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 为起始菌量转接至添加有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 吸取 200  $\mu$ L 菌液于无菌 96 孔板中置于 30 °C 静置培养 36 h。吸出菌液并用 PBS 缓冲液清洗至澄清, 常温晾干 96 孔板, 加入 200  $\mu$ L 1% 结晶紫染料在常温下染色 10 min, 用无菌水清洗板孔至澄清状态, 55 °C 烘干 96 孔板, 加入 200  $\mu$ L 33% 冰乙酸于 37 °C 下静置 30 min 充分溶解附着的结晶紫染料, 酶标仪检测 595 nm 处吸光度值。每组样品设 5 个生物学重复并统计数据计算差异性。

**1.7 数据统计分析** 所有数据均采用 Graphpad 6.02 统计软件进行分析, (ANOVA) 显著性水平设定为  $P < 0.05$ <sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 pRE112- $\Delta flrB$  载体构建** 使用维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA 为模板扩增上下游同源片段, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增 DNA 大小与纯度。由图 1-A 可知, 第 1、2 泳道分别为 *flrB* 基因上游同源臂片段、*flrB* 基因下游同源臂片段, 条带单一明亮且大小正确, 适合作为模板进行 Overlap PCR 连接该上下游片段。将提取的 pRE112 质粒和 Overlap PCR 连接的 *flrB* 基因上下游同源臂片段进行双酶切, 纯化回收酶切片段并连接过夜, 通过电转至大肠杆菌 WM3064 中并涂布于氯霉素和二氨基庚二酸平板上进行筛选, 使用 pRE112 载体引物进行验证, 以空载 pRE112 作为阴性对照。从图 1-B 可知, 泳道 1~6 条带大小与阴性对照一致, 说明未成功构建, 泳道 7、8 条带单一且大小位于 1 500 ~ 2 000 bp 之间, 大于阴性对照条带, 并且该条带符合插入目的片段后应具有的大小, 说明 7、8 为成功连接载体, 提取质粒测序进一步验证。测序结果表明, 本实验成功构建了 pRE112- $\Delta flrB$  载体。

**2.2 双亲接合及筛选敲除菌株** 使用接合的方法将大肠杆菌 WM3064 中的重组 pRE112- $\Delta flrB$  载体传递到维氏气单胞菌中, 通过抗性平板筛选并进行 PCR 验证成功接合菌落。从图 2-A 可知, 泳道 1、2、4、5 条带大小为 2 000 bp, 与预期大小一致, 表明 pRE112- $\Delta flrB$  载体成功导入野生型维氏气单胞菌中。为筛选发生同源双交换的基因敲除菌株, 将成功接合的菌落接种培养并涂布于 8% 蔗糖平板上筛选, 使用 PCR 验证敲除菌株。从图 2-B 可知, 泳道 3 为阴性对照, 条带大小为 2 100 bp, 泳道 1、2 的 PCR 条带大小为 1 500 bp, 减少的片段大小为预期敲除的部分, 挑选到 2 个成功敲除菌株, 为验证敲除的准确性, 使用 F0/R0 引物扩增并送生工测序, 测序结果表明, 这 2 个菌株为成功敲除菌株。

**2.3 检测 *flrB* 基因敲除菌株的生长情况** 通过测定在 LB 培养基中野生型和 *flrB* 基因敲除菌株的生长曲线来研究 *flrB* 基因是否会影响维氏气单胞菌 C4 的生长。由图 3 可知, 野生型菌株和敲除 *flrB* 菌株

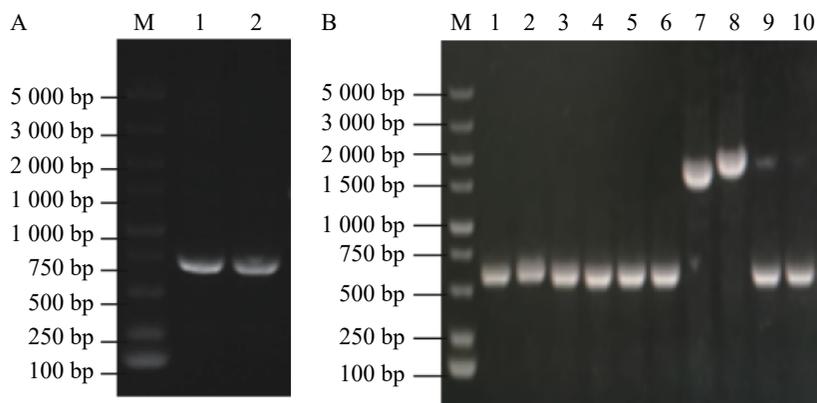


图1 pRE112- $\Delta flrB$  载体构建

M: DL5000DNA Maker。A. *flrB* 基因上下游同源臂扩增结果(1: *flrB* 基因上游同源臂扩增; 2: *flrB* 基因下游同源臂扩增); B. pRE112- $\Delta flrB$  重组载体验证(1~9: 使用载体引物验证 pRE112- $\Delta flrB$  的扩增片段; 10: 以空载体为模板的阴性对照)。

Fig. 1 pRE112- $\Delta flrB$  vector construction

M: DL5000DNA Marker. A. *flrB* gene upstream and downstream homology arms amplification results (1: *flrB* gene upstream homology arm amplification; 2: *flrB* gene downstream homology arm amplification); B. pRE112- $\Delta flrB$  recombinant vector verification (1-9: Vector primers used to verify the amplified fragment of pRE112- $\Delta flrB$ ; 10: Negative control with empty vector as template pRE112- $\Delta flrB$ ).

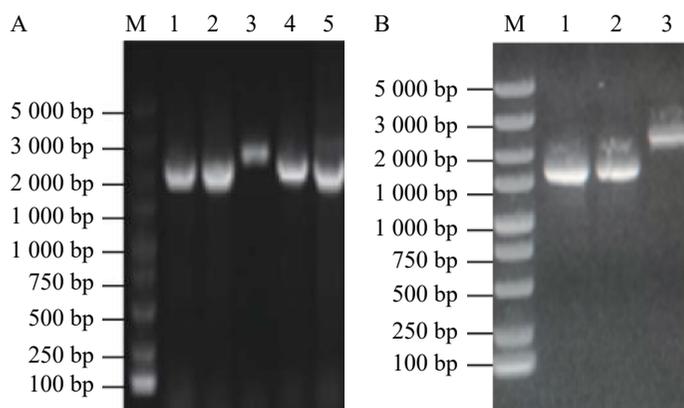


图2 接合及筛选敲除菌株

A. 接合验证(M: DL5000DNA Maker; 1~5: 载体引物验证片段); B. 敲除验证(M: DL5000DNA Maker; 1~2: 使用基因组引物验证敲除菌落; 3: 以基因组为模板的阴性对照)。

Fig. 2 Conjugation and screening of knockout strains

A. Joint verification (M: DL5000DNA Marker; 1-5: Vector primer verification fragment); B. Knockout verification (M: DL5000DNA Marker; 1-2: Genome primers used to verify knockout colonies; 3: Negative control with genome as template).

生长速率一致,说明敲除 *flrB* 后对维氏气单胞菌的生长无影响。

**2.4 检测 *flrB* 基因敲除菌株的生物膜形成** 定量接种野生型维氏气单胞菌和 *flrB* 敲除菌株并在 30 °C 培养箱内培养 36 h, 吸出菌液使用 PBS 缓冲液清洗干净, 加入结晶紫染色, 洗去多余的染料, 用 33% 乙酸进行溶解脱色后, 使用酶标仪检测  $OD_{595}$  的吸光度值。结晶紫染料可以特异性地染色生物膜, 由图 4-A 可知, 敲除 *flrB* 后附着在孔壁上的生物膜变少, 染色后颜色较浅, 而野生型菌株生物膜形成较多, 染色较深; 使用冰乙酸溶解结晶紫进

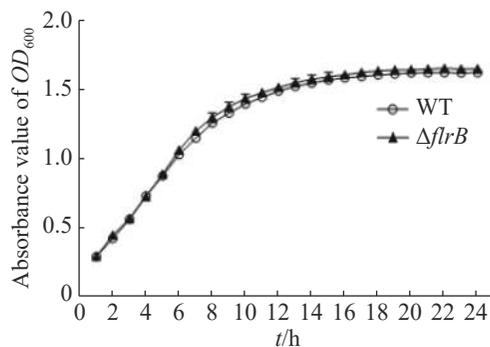


图3 野生型维氏气单胞菌和 *flrB* 敲除株生长曲线的测定  
Fig. 3 Determination of the growth curve of wild-type *Aeromonas veronii* and *flrB* knockout strain

行定量分析,由图 4-B 可知,敲除 *flrB* 后生物膜形成显著降低。说明敲除 *flrB* 后生物膜的形成显著降低,在维氏气单胞菌 C4 中 *flrB* 基因能促进生物膜的形成。

### 3 讨论

维氏气单胞菌是一种广泛存在的人鱼共患致病菌,已对鱼类养殖和人类健康造成了巨大的威胁<sup>[15]</sup>,但目前大多数相关研究仅局限于病原菌的分离,未研究其致病机理,这不利于对病原菌的防治。研究维氏气单胞菌的致病机制将有利于防治病原菌,减少维氏气单胞菌在养殖业上造成的损失。基因敲除是探究生物表型与基因功能的重要方法,通过敲除候选基因观察病原菌的致病性有利于研究发掘潜在致病机制。使用同源双交换进行基因敲除已在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中广泛应用,在纳塔葡萄糖酸杆菌、环己氨降解菌、金黄色葡萄球菌中都已通过同源双交换成功进行基因操作<sup>[16-18]</sup>。

笔者在本研究中采用同源双交换在维氏气单胞菌中进行分子操作,研究靶标基因发挥的生物学功能,进而解析维氏气单胞菌的致病机理。

笔者以维氏气单胞菌中鉴定出的 FlrB/FlrC 双组分系统为靶标,重点研究 *flrB* 基因发挥的功能。FlrB 是双组分系统 FlrB/FlrC 中的传感器激酶,主要功能为感受信号并自磷酸化将磷酸基团传递至同源反应调节器上,从而启动下游一系列基因的表达,进而影响生物学功能。FlrB/FlrC 负责调控细菌鞭毛合成的 3 级基因的转录<sup>[19]</sup>。*flrB* 的缺失会导致其同源效应调节器不能磷酸化而失去激活下游基因表达的能力,进而影响鞭毛的合成进而影响鞭毛相关的致病表现,如运动性、细胞侵袭、生物膜形成。因此研究 *flrB* 基因在维氏气单胞菌的功能对于解析维氏气单胞菌的致病机制具有重要的意义。

本研究还鉴定了维氏气单胞菌中 *flrB* 基因对生长和生物膜形成的影响。研究结果表明,敲除 *flrB* 基因后并不影响维氏气单胞菌的生长,*flrB* 基因主要调控细菌鞭毛合成,主要影响细菌的运动以及粘附,因此敲除 *flrB* 基因不影响生长,该结果与空肠弯曲菌中鞭毛合成系统缺失但不影响生长特性的研究结果一致<sup>[20]</sup>。敲除 *flrB* 基因后生物膜形成显著降低,说明在维氏气单胞菌中 *flrB* 具有促进生物膜形成的功能,该结果与溶藻弧菌中 *flrB* 基因敲除表型的研究结果一致<sup>[13]</sup>。本研究可为解析维氏气单胞菌的致病机制提供新的研究思路与作用靶标。

### 参考文献:

- [1] ISHIHAMA M A. Isolation of *Aeromonas* spp. from food products: Emerging *Aeromonas* infections and their significance in public health [J]. *Journal of AOAC International*, 2015, 98(4): 927 - 929.
- [2] HICKMAN-BRENNER F W, MACDONALD K L, STEIGERRWALT A G, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(5): 900 - 906.
- [3] 刘慧敏,陈富超,李春雷,等. 痰热清注射液联合阿奇霉素序贯疗法治疗小儿肺炎支原体肺炎的疗效与安全性的 Meta 分析[J]. *中医药导报*, 2014, 20(9): 45 - 50.
- [4] MALLIK S K, JOSHI N, SHAHI N, et al. Characterization and pathogenicity of *Aeromonas veronii* associated with mortality in cage farmed grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) from the central Himalayan region of India [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2020, 113(12): 2063 - 2076.
- [5] 曾范利,单晓枫. 不同动物源性维氏气单胞菌气溶素基因的克隆及比较分析[J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48(8): 6 - 10.

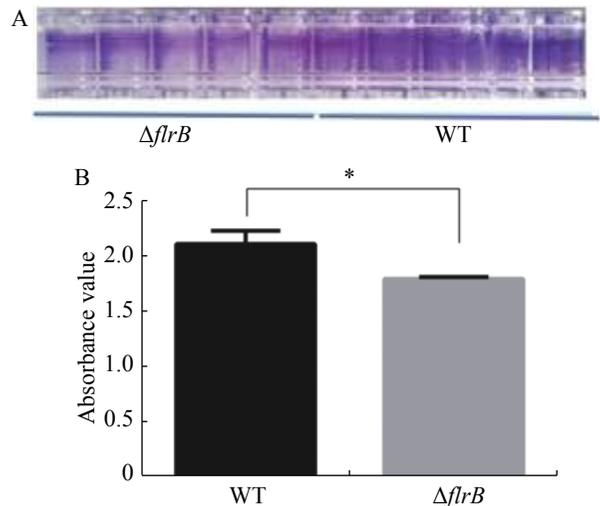


图 4 野生型维氏气单胞菌和 *flrB* 敲除菌株生物膜形成测定  
A. 96 孔板生物膜形成染色结果; B. 使用酶标仪进行测定生物膜形成定量结果。

Fig. 4 Determination of the biofilm formation of wild-type *Aeromonas veronii* C4 and *flrB* knockout strain

A. 96-well plate biofilm formation staining results; B. Quantitation of biofilm formation on microplate reader.

- [6] 李伟杰, 赵耘, 刘燕, 等. 狐狸源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(4): 289 – 292.
- [7] 李谛音. 双组分系统 RstA/RstB 激活外排泵并调节荧光假单胞菌多重耐药性[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [8] 王慧琦. 野油菜黄单胞菌  $\beta$ -半乳糖苷酶缺失菌株的构建及双组分系统 RavA/RavR 调控鞭毛合成通路的初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2019.
- [9] KLIOSE K E, MEKALANOS J J. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle [J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(3): 501 – 520.
- [10] KLIOSE K E, MEKALANOS J J. Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(2): 303 – 316.
- [11] 石苗苗. *Shewanella oneidensis* 鞭毛系统的二级调控及鞭毛突变株影响菌落形态的分子机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [12] [12] LI M Y, ZHANG J, LU P, et al. Evaluation of biological characteristics of bacteria contributing to biofilm formation [J]. *Pedosphere*, 2009, 19(5): 554 – 561.
- [13] LUO G, HUANG L, SU Y Q, et al. flrA, flrB and flrC regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5(8): e85.
- [14] CORREA N E, LAURIANO C M, MCGEE R, et al. Phosphorylation of the flagellar regulatory protein *FlrC* is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(4): 743 – 755.
- [15] LI Y, ZHOU J Y, HAO D L, YANG S Y, et al. Arabidopsis under ammonium over-supply: Characteristics of ammonium toxicity in relation to the activity of ammonium transporters [J]. *Pedosphere*, 2020, 30(3): 314 – 325.
- [16] 谢文平, 鲍素敏, 刘权, 等. 细菌纤维素合成菌纳塔葡萄糖醋杆菌遗传操作方法的建立[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(11): 1 – 6.
- [17] 谭利, 王轶男, 陈江, 等. 金黄色葡萄球菌 RNA III 敲除株对  $\gamma$ -溶血素表达调控的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(1): 45 – 49.
- [18] 毛灵琪. 环己胺降解菌 NyZ12 胺氧化酶基因敲除突变体的构建及特性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016.
- [19] SHI M M, GAO T, JU L L, et al. Effects of *FlrBC* on flagellar biosynthesis of *Shewanella oneidensis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(6): 1269 – 1283.
- [20] 任方哲. 空肠弯曲菌 FlhF 调节鞭毛合成分子机制及其对细菌毒力的影响分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.

## Construction of a C4 *flrB* Knockout Strain of *Aeromonas veronii* and its Biological Characteristics

WANG Zucheng, MA Xiang, LI Hong, WANG Dan, TANG Hongqian, TANG Yanqiong, LIU Zhu  
(School of Life Science and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** *Aeromonas veronii* is a common merman comorbid pathogen. To study the function of the *flrB* gene in *Aeromonas veronii*, the upstream and downstream homology arms of the *flrB* gene were amplified and integrated to the pRE112 plasmid, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* WM3064 by electroporation, and then was conjugated into the wild-type *A. veronii*. After screened under sucrose pressure, the knockout strains were verified by PCR and sequencing. The *flrB* gene knockout strain is tested for growth curve and biofilm formation. The biofilm test showed that the knockout of *flrB* reduced the formation of biofilm, but did not affect the growth of *A. veronii*. This revealed that the *flrB* gene could promote biofilm formation of *A. veronii*, which lays a foundation for further revealing the function and mechanism of this gene.

**Keywords:** gene knockout; *flrB*; biofilm; *Aeromonas veronii*

(责任编辑: 罗启香 责任编辑: 钟云芳)