



主持人: 郭志强

不同培养温度的鱼源海豚链球菌转录组分析

贾新蕾^{1,2}, 黄增朝¹, 杨林狄¹, 吕静¹, 李妍萍¹, 简纪常¹, 黄郁葱^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院/广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东湛江 524088;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东湛江 524006)

摘要: 为鉴定海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)在不同温度的转录水平差异, 通过生长曲线测定和人工感染试验分析该菌在 25 °C 和 35 °C 下的生长情况和致病性, 采用链特异性转录组测序(Strand-specific RNA-seq)技术对 25 °C 和 35 °C 培养的海豚链球菌 *Tozj-1* 菌株进行测序分析, 筛选差异表达基因, 通过 GO(Gene Ontology)数据库和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对差异表达基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 然后利用 VFDB(Virulence factor database)数据库筛选差异表达的重要毒力基因并使用实时荧光定量 PCR 进行验证。结果显示, 海豚链球菌在 35 °C 条件下有更快的生长速度和更强的毒力; 转录组共筛选获得 927 个显著差异表达基因($P < 0.05$), 其中包括 820 个上调基因和 107 个下调基因; GO 功能富集分析发现, 差异基因主要富集在代谢、细胞、催化及结合过程; KEGG 富集分析发现, 差异基因主要富集在核糖体通路、ABC 转运通路、群体感应等信号通路。以上结果表明温度调控海豚链球菌基因的转录表达及相关通路的富集, 为后续海豚链球菌致病机理的研究提供数据支持。

关键词: 海豚链球菌; 转录组测序; 温度; 毒力因子; qRT-PCR

中图分类号: Q819 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2024)01-0109-13

贾新蕾, 黄增朝, 杨林狄, 等. 不同培养温度的鱼源海豚链球菌转录组分析 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 109-121. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230027

海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是一种重要的水生动物致病菌, 1976年 Pier等^[1]从亚马逊江豚(*Inia geoffrensis*)中首次分离获得, 之后陆续发现它可感染除南极洲以外的所有鱼类^[2]。我国也有海豚链球菌感染卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[3-4]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[5-6]、鲟鱼(*Acipenser sinensis*)^[7-8]、银鼓鱼(*Selenotoca multifasciata*)^[9]、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)^[10]、黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)^[11]等发病的相关报道。海豚链球菌具有感染宿主范围广、传染性强、导致死亡率高等特点, 给养殖业造成巨大的经济损失, 并受到了国内外水产行业工作者的高度关注。

海豚链球菌病的暴发除了与病原菌本身的毒力有关, 一些环境因子在疾病发生发展过程中亦发挥重要作用, 如温度、pH值等^[12], 尤其是养殖的环境温度与该病的发生呈现比较明显的相关性, 发病时水温通常在 27 °C 以上^[13]。祝璟琳等^[14]开展的流行病学研究表明, 在 32 °C 以上的温度下罗非鱼更容易爆发链球菌病, 罗非鱼免疫力在高温条件下受到明显的抑制^[15], 链球菌对宿主的粘附、定植、入侵和抵抗免疫清除能力明显增强^[16-17]。同时, 较高温度时海豚链球菌产生的胞外产物中可能含有较多致病因子, 从而影响细菌毒力^[18], 尼罗罗非鱼在感染海豚链球菌后其肝脏、肾脏在高温时病理损伤更严重^[19]。以上研究均表明在较高

收稿日期: 2023-03-03

修回日期: 2023-03-22

基金项目: 湛江市科技计划项目(2021A05196); 国家重点研发计划项目(2022YFD2401200); 广东省重点领域研发计划项目(2021B0202040002); 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)资助项目(ZJW-2019-06)

第一作者: 贾新蕾(1997-), 女, 广东海洋大学水产学院 2020 级硕士研究生。E-mail: 2112001130@stu.gdou.edu.cn

通信作者: 黄郁葱(1978-), 男, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 水产动物病害防控与健康养殖。E-mail: huangyc@gdou.edu.cn

的温度下病原链球菌的毒力显著增强,从而引起链球菌病的爆发。

转录组测序(RNA-Seq)技术是一项能够检测有机体整体转录水平的新兴技术手段,目前已有学者利用转录组技术研究细菌的毒力调控。如:Li等^[20]利用RNA-seq技术分析了提高温度和营养成分对副溶血性弧菌毒力的影响,结果发现温度和营养成分的提高可显著提高副溶血性弧菌的毒力;王松艳^[21]对不同温度下培养的无乳链球菌进行转录组测序,筛选出7个毒力相关基因;师若萍^[22]运用高通量RNA测序和非靶向代谢组学的研究方法,探究大肠杆菌在不同温度下的生长及其在转录和代谢水平的变化,了解其对于不同温度的生理调节机制,以上研究结果表明温度可广泛影响细菌毒力和基因的表达。但目前尚未见温度对海豚链球菌致病性的影响以及其基因转录表达的研究报道。卵形鲳鲹是我国海水养殖鱼类中产量位居第二的优良品种,高温期易暴发海豚链球菌病^[3-4]。本研究以卵形鲳鲹源海豚链球菌*Tozj-1*为研究对象,选用RNA-Seq技术对不同温度(25℃和35℃)培养的海豚链球菌进行高通量测序分析,筛选差异表达基因,对差异表达基因进行GO功能和KEGG通路富集分析,探究温度对海豚链球菌基因转录表达的影响及富集的功能和信号通路,以为揭示温度与海豚链球菌致病性积累基础数据,为后续进一步研究海豚链球菌的致病机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究测序和试验用菌株*Tozj-1*来源于广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室。*Tozj-1*为实验室于2020年8月从广东省湛江市某深海网箱养殖的患病卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)分离获得。分离的菌株经16S rRNA测序、生理生化鉴定为海豚链球菌(*S. iniae*),通过人工感染卵形鲳鲹确认其为病原菌,并保存于广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线测定 将*Tozj-1*菌株划线接种于BHI固体培养皿上,置于28℃恒温培养箱中培养24h。用无菌接种环挑取单个菌落接种于新鲜的无菌BHI液体培养基,于28℃,120 r·min⁻¹下

振荡过夜扩大培养。将上述菌液以1:50(V/V)的比例接种到无菌的BHI培养基,分别置于25℃和35℃恒温摇床,150 r·min⁻¹振荡培养,每个温度下设置3个重复。每隔1h取样,测定菌液的吸光值(*OD*₆₀₀),并绘制不同温度下的海豚链球菌生长曲线。

1.2.2 人工回归感染试验 为了探究不同温度对卵形鲳鲹源海豚链球菌毒力的影响,本研究使用卵形鲳鲹进行体内攻毒试验。实验前,将28℃扩大培养的海豚链球菌以1:50(V/V)的比例接种到新鲜BHI培养基中,分别置于25、35℃恒温摇床中培养至对数生长期(*OD*₆₀₀=0.9~1.1),收集菌体,用无菌PBS缓冲液将菌液稀释至1.0×10⁷ CFU·mL⁻¹备用。

将360尾健康的卵形鲳鲹[体质量(50±6)g·尾]随机分为4组(2个实验组和2个对照组),每组设3个重复,每个重复30尾鱼。25℃实验组于水温25℃饲养,每尾腹腔注射25℃体外培养的*Tozj-1*菌悬液,对照组注射无菌PBS;35℃实验组于水温35℃饲养,每尾腹腔注射35℃体外培养的*Tozj-1*菌悬液,对照组注射等量无菌PBS。观察攻毒后14d内试验鱼的发病情况,记录并统计死亡鱼数量,通过解剖濒死鱼并进行病原分离鉴定,以确定感染病原,鉴定方法同1.1。

1.2.3 总RNA提取、cDNA文库构建和高通量测序 将28℃下培养的菌株*Tozj-1*以1:50(V/V)的比例稀释于新鲜BHI肉汤中,分别于35℃和25℃条件下培养至对数生长期(*OD*₆₀₀=0.9~1.1)。每个温度设置3个生物学重复。其中,以25℃培养的海豚链球菌作为对照组,标记为CK-1、CK-2、CK-3;以35℃培养的海豚链球菌作为实验组,标记为Test-1、Test-2、Test-3。每个样品取1mL菌液,12000 r·min⁻¹离心2min,弃去上清,加入100μL溶菌酶,混匀,置于37℃裂解15min,按照Trizol试剂盒操作说明进行菌体的总RNA抽提,使用Agilent 2100生物分析仪评估RNA质量并通过RNase free琼脂糖凝胶电泳进行检测,经质量检测合格后纯化总RNA,cDNA文库构建和转录组测序工作委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。

1.2.4 原始数据质控与差异表达基因分析 原始数据的存储采用FASTQ格式,通过fastp^[23](<https://>

github.com/OpenGene/fastp)对下机数据进行质量检测和数据过滤,去除原始数据中质量低、接头污染、全部都是 A 碱基以及未知碱基 N 含量过高的 Reads 后最终获得 Clean reads。利用工具 Bowtie 2^[24]建立参考基因组索引,将质控分析后的高质量测序数据比对到海豚链球菌参考基因组 SF1 (GenBank 登录号 CP005941.1)上。采用 FPKM 法计算每个注释基因的表达水平,使用 FDR 与 \log_2FC 来筛选差异基因,筛选条件为 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 。

1.2.5 聚类分析 根据每组筛选的差异表达基因,使用 R 语言 Pheatmap 软件包对差异基因进行双向聚类分析。首先,得到的差异表达基因在 GO (The Gene Ontology) 数据库中的各个项目进行映射,然后通过 GO 功能显著性富集分析^[25],在宏观上了解该物种的基因功能分布特征。然后,基于 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Geno-

mes) 数据库,对每个 KEGG pathway 不同层次上存在的差异表达基因数量进行统计,确定这些差异表达基因的主要代谢路径和信号通路^[26],进一步了解基因的生物功能。最后,利用超几何学方法,以 $Qvalue \leq 0.1$ 的 Pathway 作为在差异表达基因中显著富集的 Pathway。

1.2.6 差异表达目标基因的 qRT-PCR 验证 为了验证海豚链球菌转录组数据的可靠性,将差异表达基因与毒力因子数据库 (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB) 进行比对,筛选出 22 个与毒力相关的差异表达基因,使用 primer 5.0 软件设计特异性定量引物(基因名称和引物序列见表 1),引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。根据 cDNA 反转录试剂盒的使用说明书将质检合格的总 RNA 反转录为 cDNA,应用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 技术对其进行转录水平的验证,qPCR 反应

表 1 检测海豚链球菌毒力基因的 qRT-PCR 特异性引物

功能分类	引物名称	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
内参基因	16S rRNA	CCAAGGCGACGATACATAG	TTGCCGAAGATTCCCTACT
ABC转运蛋白	srtF	GGAGCAGGAAAGTCAACG	TGGATAGATCGCAGGATT
	oppF	AAACCACTGTTGGTCGTGC	TCTTTGCGGAAATCTCGTA
	oppA	GGAAGTAATCTATTGCGTGTC	TACTGCCATCAGACCATT
双组份系统	ciaR	AATGCGTATCAAGCCCTCT	AATGGTAGTGTCTCCGACT
	ciaH	TGCTTTGAAATACACGGACTC	AACACGATAGAAGCGGTCA
	phoR	AGGCTAAACAACCTCCACTT	TCATCGGTGTACCTAACAG
	phoP	ACAGCAACAGATGGCAGAT	AGACCTCAATACCGTCCAA
溶血素	sagI	ATGTCATTGTTATGCCAACT	GTAAGGGCCTGCACTCAA
CAMP因子	camp	TGCCTCAACATCAAACAG	ATGGCTTGAACAGCATCA
酶	htrA	TCAGGTTCAAATGGAGGAG	AAGGCAGGACGAATCACT
	danK	CAGTTCGTCGTGCCCTTTC	TTGGCTCTTACCAGTTTCAG
	clpE	GTCCCTCACAACTCCAGC	CTCTTCAAATTGACCACGA
	nanA	GCCGTAACCGCTCACCCT	TTTCAATCCCGTCAAGTCC
	hylB	AACCCTGCTTCAACACTCT	CCAATCTCATAATCCCACC
C5α肽酶	scpB	GGGTTGAGTGTCCGTAATT	CTGACGCATCATCATCTGC
分泌系统	essC	GCCGTC AACGCCTCTTCTC	GGCATTGGCTCTGTCACTT
	secA2	AGCTGGAATTGAATACGC	AGATAATGAGCCCGAAGG
	secY2	GCATTA AACAGGACAAGC	GATATTACCGCCACCAGAA
	secY	ATAGCAGCTCAACAAACCC	ATGCCTTCAATACCAGTCCG
转录调节因子	cysB	CGAAATCCTAAGGGCATCA	CGTTCCTCAACAAAGAG
	galR	GAGGCTGGTACTACTGTTC	GCAGTAGTTCCCATTTCT
生物膜	glgA	TAGCGTTTGCTCTTGATGT	TAAGCCTGACTTGCCGTAT

程序为 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共计 40 个循环结束, 60 °C 读取熔解曲线。以 16S rRNA 基因为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析计算各毒力基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 不同温度下海豚链球菌的生长曲线

海豚链球菌在本试验的 2 个培养温度下, 35 °C 生长速度明显快于 25 °C, 能够快速进入生长对数期, 35 °C 在 3 h 左右即达到对数生长期, 25 °C 在 9 h 左右才达到对数生长期。到达生长平台期后, 35 °C 的吸光值略高于 25 °C 的吸光值。当吸光值 OD_{600} 在 1.0 左右时, 2 个培养温度的海豚链球菌均处于对数生长期(图 1)。

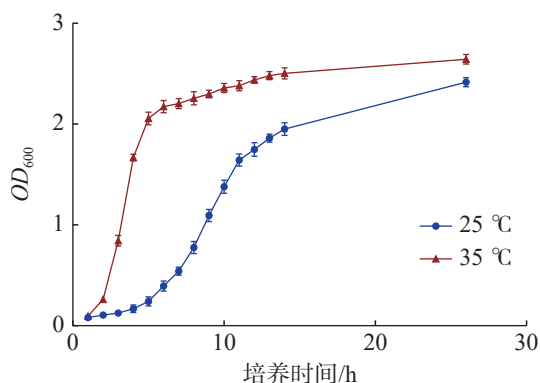


图 1 海豚链球菌在不同培养温度下的生长曲线

2.2 人工感染试验结果

不同温度人工感染结果显示(图 2), 35 °C 时, 在感染后 1~3 d 卵形鲳鲹即出现大量死亡, 之后死亡量逐渐趋于稳定, 第

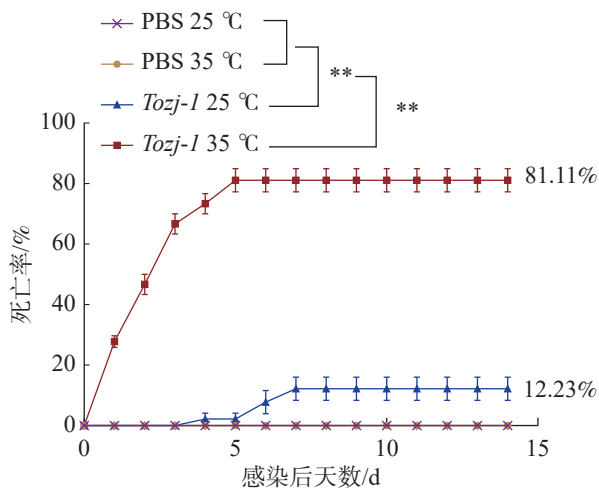


图 2 环境温度对卵形鲳鲹海豚链球菌病死亡率的影响

*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极其显著 ($P < 0.01$)

5 天停止死亡, 患病卵形鲳鲹死亡前出现游泳异常、眼球突出、鳍条基部充血等症状, 病原菌经分离培养, 16S rRNA 鉴定为海豚链球菌。25 °C 时, 卵形鲳鲹在感染后 3 天内未出现死亡, 第 4 天开始出现少量死亡, 死亡率较低, 第 7 天停止死亡。海豚链球菌在水温 35 °C 和 25 °C 造成的卵形鲳鲹的累积死亡率分别为 81.11% 和 12.23%, PBS 对照组均未出现死亡。

2.3 总 RNA 的提取

提取培养至对数生长期 ($OD_{600} = 0.9 \sim 1.1$) 的海豚链球菌的总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示, 28 S 和 18 S 的条带清晰无弥散, RNA 完整性好, 无降解。核酸蛋白检测仪测定结果显示样品的 A_{260}/A_{280} 比值在 2.0 左右, 浓度为 $400 \sim 700 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, RNA 质量符合转录组测序的要求。

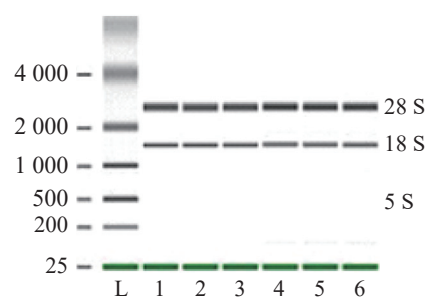


图 3 1% 琼脂糖凝胶电泳检测海豚链球菌 *Toxj-1* 株总 RNA

L 为 DNA marker, 1~3 为 25 °C 培养下细菌总 RNA, 4~6 为 35 °C 培养下细菌总 RNA

2.4 样品相关性分析

本试验中每个温度设有 3 个生物学重复, 其中 CK-1、CK-2、CK-3 分别表示 25 °C 的 3 个平行样品, Test-1、Test-2、Test-3 分别表示 35 °C 的 3 个平行样品。如图 4 所示,

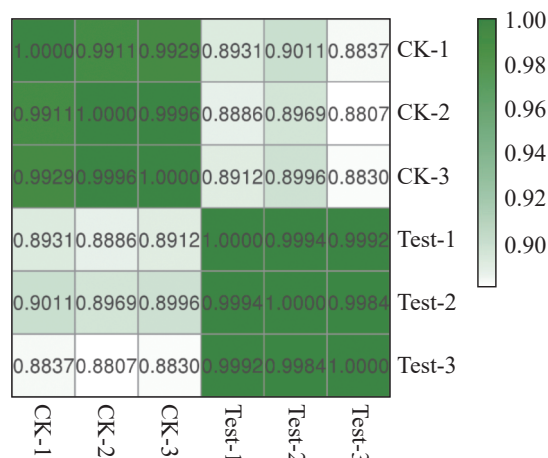


图 4 样品相关性分析热图

同一温度的 3 个平行样品相关性系数在 0.998 0 以上, 表明来自 3 个重复性试验的转录组数据具有高度可重复性, 可用于后续分析。

2.5 数据过滤与质量评估 Illumina 测序得到的数据经过质量检测和数据过滤, 最终获得 Clean reads, 各样品的 Clean reads 与 Raw reads 的 Q20 和 Q30 分别达到了 97% 和 93% 以上, GC 含量在各样本中较为一致, 为 40.19%~41.22%(表 2)。以上数据均表明转录组测序的数据良好, 可以用

于后续进一步分析。

2.6 差异表达基因的分析 使用 Bowtie 2 软件将 6 个转录组数据映射到海豚链球菌 SF1 基因组, 结果显示, 所有样品数据皆可映射到基因组上, 并且这些样本的映射率均在 98% 以上(表 3)。说明该转录组数据可靠, 可以用于后续的试验分析。差异表达基因结果如图 5 所示, 共筛选到 927 个显著差异表达基因, 其中 820 个上调表达, 107 个下调表达。

表 2 过滤前后碱基信息统计

样品	过滤前				过滤后			
	Raw Data/bp	Q20/%	Q30/%	GC含量/%	Raw Data/bp	Q20/%	Q30/%	GC含量/%
CK-1	3283961700	98.06	93.98	40.78	3202330021	98.11	94.08	40.49
CK-2	2481964500	98.20	94.34	41.20	2397726314	98.27	94.47	40.83
CK-3	2190706200	98.03	93.95	41.22	2118495261	98.11	94.09	40.85
Test-1	2753256900	98.03	93.97	40.76	2655059882	98.11	94.12	40.35
Test-2	2777076900	97.89	93.63	40.60	2677608106	97.98	93.80	40.19
Test-3	2516073000	97.77	93.33	41.10	2415735833	97.88	93.53	40.66

表 3 原始数据比对到基因组

样品	总reads数	匹配上的reads数	匹配比例/%
CK-1	18162776	17938781	98.77
CK-2	13888834	13717694	98.77
CK-3	12276544	12129610	98.80
Test-1	16739444	16498781	98.56
Test-2	17315536	17063899	98.55
Test-3	14858622	14630754	98.47

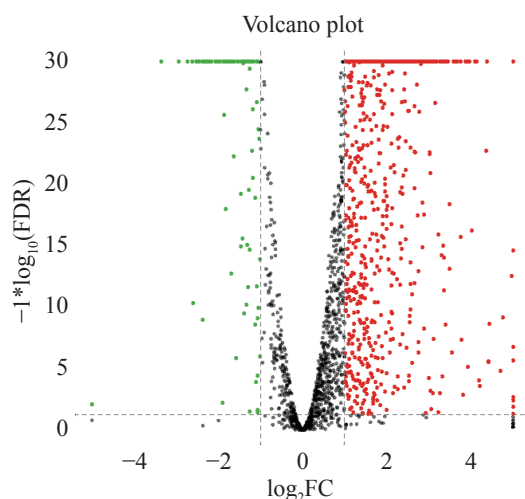


图 5 差异基因统计火山图

红色表示上调表达的基因, 绿色表示下调表达的基因, 黑色表示非显著差异表达基因。

2.7 差异表达基因的 GO 功能富集分析 对获得的差异表达基因进行 GO 注释分析, 共得到 1 611 个 GO 功能注释, 其中生物学过程(biological process)959 个、细胞组分 (cellular component) 446 个和分子功能(molecular function)570 个。如图 6 所示, 差异基因注释在生物学过程有关的 GO terms 数量最多, 共计 12 个, 主要有代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process) 和单一有机过程 (single-organism process) 等; 其次是与分子功能有关的 terms, 共计 8 个, 主要有催化活性 (catalytic activity)、结合 (binding) 等; 与细胞组分有关的 terms 最少, 为 7 个, 主要有细胞 (cell)、细胞成分 (cell part) 和膜 (membrane) 等。海豚链球菌代谢过程、细胞过程、单一有机过程、结合过程和催化活性这几个亚类包含的差异基因比较多, 它们均受温度调控。

2.8 差异表达基因的 KEGG 富集分析 将 2 个样本的差异基因进行 KEGG 富集分析, 结果显示, 820 个上调表达基因中有 289 个基因可以富集到 KEGG 的 98 条 pathways, 其中显著富集的 pathways 有 5 个。这些显著上调的基因主要与信号转导、跨膜转运和毒力因子表达有关, 包括 ABC 转运、

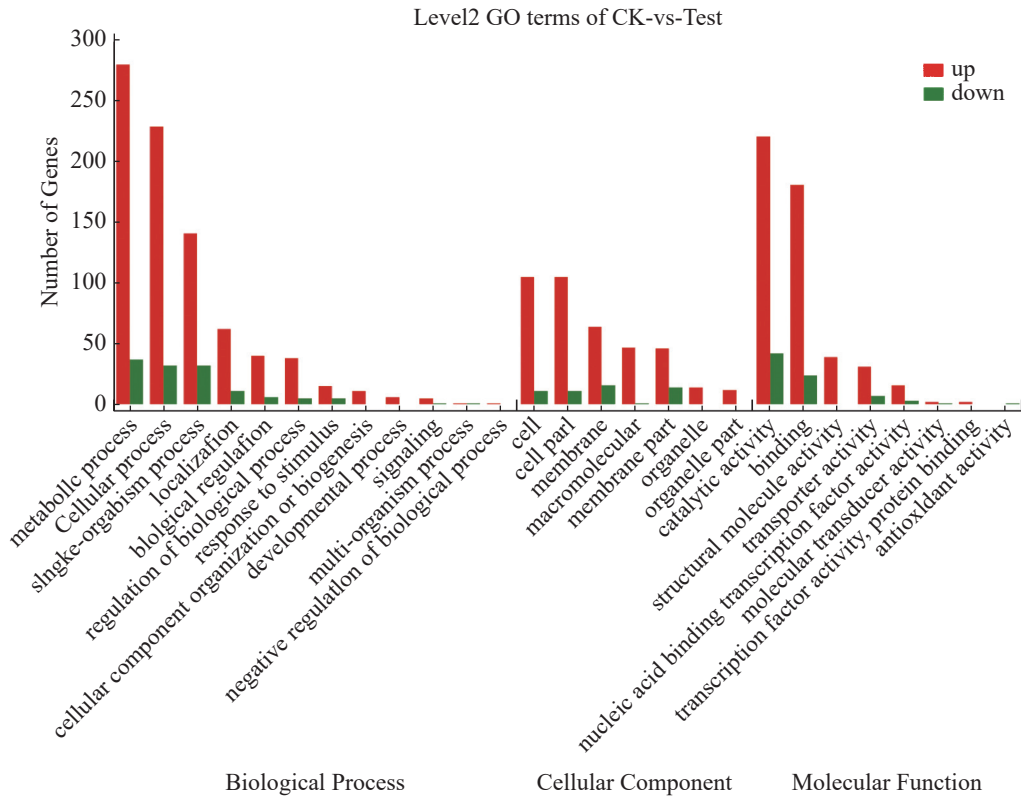


图 6 CK 与 Test 差异基因 GO 分类

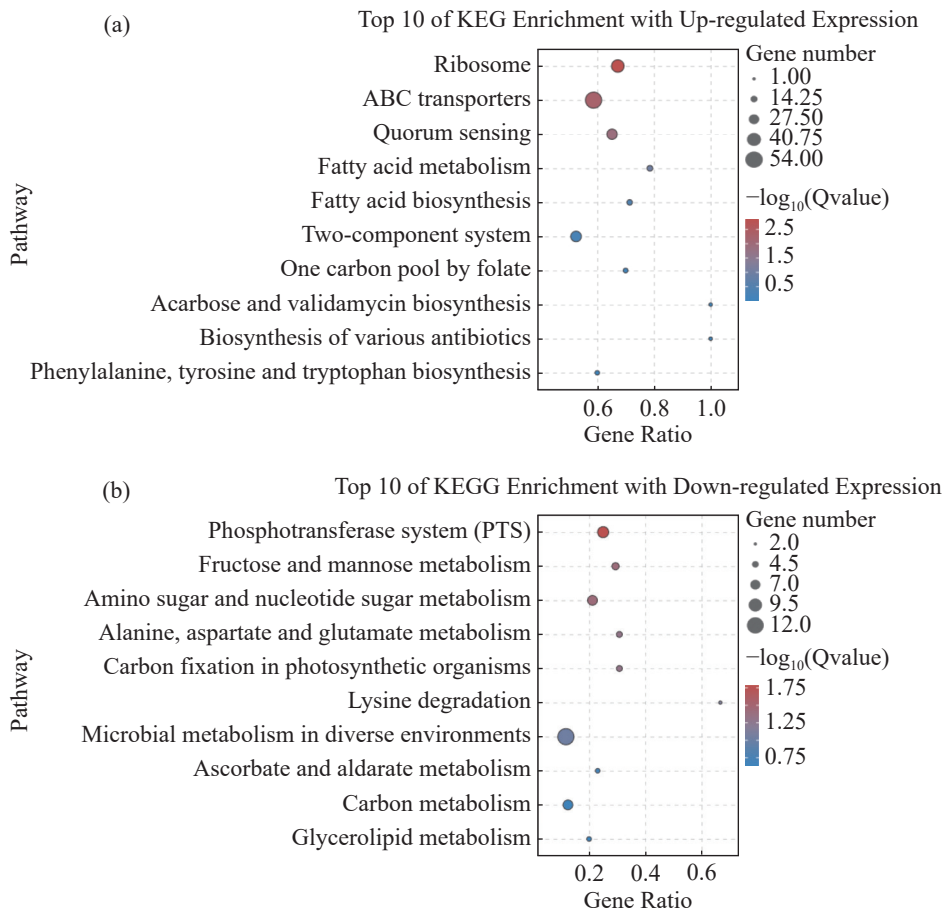


图 7 差异表达基因的 KEGG 富集分析(35 °C 相对于 25 °C)

a. 表达量上调基因的 KEGG 富集分析; b. 表达量下调基因的 KEGG 富集分析

核糖体通路、群体感应、脂肪酸代谢和合成通路(图 7-a)。除此之外,还包括少量与叶酸和淀粉蔗糖代谢的相关基因。值得注意的是,这些显著上

调的 pathways 中有许多重复出现的基因(表 4),特别是 *srtF* 基因(K710_0263)在 ABC 转运、群体感应系统和双组份调控通路中均上调表达。

表 4 同时参与多条通路的上调表达基因

基因编号	基因	log ₂ FC	P 值	信号通路
K710_0263	<i>srtF</i>	3.545569062	4.87E-07	ABC、QS、TCS
K710_0976	<i>pstS1</i>	1.033494031	3.50E-21	
K710_1395	<i>pstS2</i>	1.95493017	0.000493456	ABC、TCS
K710_0264	--	1.435244618	0.033047506	
K710_0434	<i>aliA</i>	1.773511395	4.04E-88	
K710_0435	<i>amiC</i>	2.144477475	2.01E-147	
K710_0436	<i>amiD</i>	1.999414258	2.79E-108	
K710_0437	<i>amiE</i>	2.644802657	2.2E-135	
K710_0438	<i>oppF</i>	1.546252336	5.51E-34	ABC、QS
K710_1372	<i>oppA</i>	2.841219614	9.87E-36	
K710_1541	<i>livF</i>	3.018078137	7.12E-24	
K710_1542	<i>livG</i>	2.774570548	3.04E-27	
K710_1543	<i>braE</i>	3.172328349	5.42E-46	
K710_1544	<i>livH</i>	2.123233661	6.80E-14	
K710_1545	<i>braC</i>	1.739006903	4.55E-08	
K710_1899	<i>oppF</i>	1.465280432	2.26E-60	
K710_1900	<i>oppD</i>	1.390808961	2.33E-58	
K710_1901	<i>oppC</i>	1.860690382	5.27E-90	
K710_1902	<i>oppB</i>	1.838812786	3.31E-75	
K710_0983	<i>ciaR</i>	1.254553	2.19E-23	
K710_0984	<i>ciaH</i>	2.680568694	2.45E-103	
K710_1962	--	1.18165149	4.63E-08	
K710_1963	--	1.490948251	1.20E-14	QS、TCS
K710_1964	--	1.597587531	1.1E-20	
K710_0266	<i>spaR</i>	1.788729367	7.42E-07	
K710_0267	<i>spaK</i>	1.534275087	2.29E-06	
K710_0700	<i>lcfB</i>	1.690794566	4.46E-27	
K710_1743	<i>accA</i>	1.562040684	3.24E-57	
K710_1744	<i>accD</i>	2.053546645	5.86E-106	
K710_1745	<i>accC1</i>	2.160376735	1.45E-128	
K710_1746	<i>fabZ</i>	1.80677952	8.39E-86	
K710_1747	<i>accB</i>	2.817952264	2.85E-41	FAM、FAB
K710_1748	<i>fabF</i>	1.760435914	1.04E-111	
K710_1749	<i>CLKR27</i>	1.345256763	7.69E-51	
K710_1750	<i>fabD</i>	2.368803207	9.24E-116	
K710_1751	<i>PA1024</i>	1.624187665	5.32E-40	

注: ABC指ABC转运通路; QS指群体感应通路; TCS指双组份系统; FAM指脂肪酸代谢通路; FAB指脂肪酸合成通路; log₂FC为相对表达倍数。

35 °C 相对于 25 °C 共有 45 个基因下调表达, 总计可以映射到 KEGG 的 38 条 pathways, 按照阈值过滤后筛选到 5 个显著富集的 pathways, 这些显著下调的基因几乎都与各种糖类和碳类的获取和代谢相关, 包括磷酸转移酶系统、果糖和蔗糖代谢、氨基糖和核糖代谢等通路(图 7-b), 另外还包括 33 条不显著富集的 pathways。

2.9 转录组数据的 qRT-PCR 验证 为了评估转录组数据的可靠性, 随机筛选 22 个差异表达的重

要毒力基因, 采用实时荧光定量 PCR 的方法检测毒力基因的转录水平, 每个基因设置 3 次生物学重复, 以保证数据的准确性, 结果如图 8 所示。2 种检测方法经 SPSS 软件的相关性分析, 相关系数达到了 0.824, 相关极显著($P < 0.001$), 说明 qRT-PCR 验证结果与 RNA-Seq 数据具有较好的一致性, 并且基因表达变化的趋势基本相同, 进一步验证了转录组数据的可靠性。

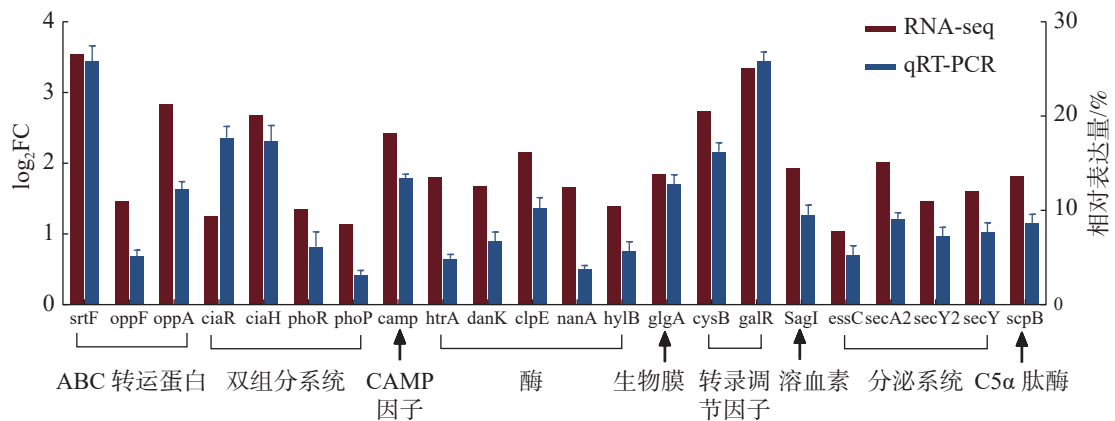


图 8 海豚链球菌在 25 °C 和 35 °C 条件下毒力相关基因的相对表达量

2.10 温度与毒力因子基因表达的相关性 根据文献^[27-28]以及 VFDB 数据库的筛选, 发现约 58 个当前已知或预测的海豚链球菌毒力因子。由表 5 可知, 上调表达的毒力因子有 46 个, 特别是溶血素 (SagI)、黏附素 (fap1)、转录调节因子

(cysB、galR) 和 C5 α 肽酶 (scpB) 等重要的毒力因子, 在 35 °C 培养条件下毒力因子基因的表达量与 25 °C 培养条件下相比明显升高 ($\log_2FC > 1.6$); 下调表达的毒力因子基因相对较少, 仅有 12 个 (表 6), 其中包含海豚链球菌毒力标志基因 *simA*。

表 5 上调表达的细菌毒力因子

基因编号	基因	功能注释	\log_2FC	<i>P</i> 值	致病性
K710_0202	<i>adcA</i>	zinc ABC transporter solute-binding protein	0.880109591	4.58E-07	
K710_1317	<i>adcA</i>	ABC transporter, substrate-binding protein	0.700787773	0.000713	
K710_0463	<i>fap1</i>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein	2.813413469	6.74E-158	
K710_0464	--	cell wall-anchored protein, partial	3.049435798	7.41E-62	
K710_0465	--	liver stage antigen 3	3.180292852	1.65E-112	黏附
K710_0466	<i>fap1</i>	accessory Sec-dependent serine-rich glycoprotein adhesin	1.86831671	2.47E-45	
K710_0469	--	accessory Sec-dependent serine-rich glycoprotein adhesin	2.140592405	1.16E-84	
K710_1067	<i>strA</i>	sortase	0.88369926168	1.36E-19	
K710_1757	<i>dnak</i>	molecular chaperone DnaK	1.67489208905		
K710_1013	<i>ypIQ</i>	hemolysin III family protein	1.695832888	1.03E-62	
K710_1282	--	SagI	1.930380188	1E-24	
K710_1283	--	SagI	1.63917186	5.55E-37	
K710_0589	--	ISSag7 transposase	3.804604311	0.000922	链球菌溶血素S
K710_1286	--	SagF	1.48053786	1.87E-18	
K710_1289	--	streptolysin associated protein SagC	0.646170474	2.38E-05	
K710_1290	--	SagB/ThcOx family dehydrogenase	0.13695252	0.3274135	

续表 5

基因编号	基因	功能注释	log ₂ FC	P 值	致病性
K710_0950	--	CAMP factor family pore-forming toxin	2.420733487	5.35E-78	CAMP 因子
K710_1575	<i>scpB</i>	segregation/condensation protein B	1.822257336	7.87E-24	C5a 肽酶
K710_0833	<i>cpsB</i>	cpsB	0.541827357	2.13E-06	
K710_0834	<i>cpsC</i>	cpsC	0.54955598	4.33E-08	荚膜多糖
K710_0835	<i>cpsD</i>	tyrosine-protein kinase	0.65100143348	8.62E-10	
K710_1854	<i>essC</i>	type VII secretion protein EssC	1.036654657	4.94E-37	
K710_1857	--	type VII secretion protein EssA	1.792524646	7.30E-06	
K710_1858	<i>esaA</i>	type VII secretion protein EsaA	1.555802255	3.85E-51	
K710_0099	<i>secY</i>	preprotein translocase subunit SecY	1.61255272	1.13E-91	分泌系统
K710_0471	<i>secY2</i>	accessory Sec system protein translocase subunit SecY2	1.470711097	3.92E-15	
K710_0475	<i>secA2</i>	SecA2	2.013221387	2.85E-80	
K710_0153	--	type II secretion system protein	4.212993723	0.0001727	
K710_0831	<i>cysB</i>	LysR family transcriptional regulator	2.737240401	9.72E-171	
K710_0832	<i>tagU</i>	SAK_1262 - regulatory protein CpsX	0.411128745	2.42E-05	
K710_0293	<i>galR</i>	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	3.35070055	4.01E-216	
K710_0307	<i>BCE_2019</i>	MarR family transcriptional regulator	1.172169347	1.77E-15	
K710_0113	--	TetR family transcriptional regulator	1.396816216	0.0127906	
K710_0142	<i>adcR</i>	MarR family transcriptional regulator	0.601342176	6.69E-05	
K710_0159	<i>MJ0272</i>	helix-turn-helix transcriptional regulator	2.609316032	3.61E-12	
K710_0190	<i>yciT</i>	DeoR/GlpR transcriptional regulator	2.072378929	3E-96	
K710_0216	<i>endR</i>	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	1.007490952	7.92E-15	转录调节因子
K710_0221	<i>yvfU</i>	response regulator transcription factor	0.526432544	0.0436715	
K710_0223	<i>ydfL</i>	MerR family transcriptional regulator	0.879891334	8.93E-06	
K710_0252	<i>rgg</i>	Rgg/GadR/MutR family transcriptional regulator	0.554807421	0.1430867	
K710_0266	<i>spaR</i>	response regulator transcription factor	1.788729367	7.42E-07	
K710_0307	<i>BCE_2019</i>	MarR family transcriptional regulator	1.172169347	1.77E-15	
K710_0983	<i>ciaR</i>	response regulator transcription factor	1.254553	2.19E-23	
K710_0984	<i>ciaH</i>	HAMP domain-containing histidine kinase	2.680568694	2.45E-103	
K710_1396	<i>phoR</i>	two-component sensor histidine kinase	1.349739342	8.62E-40	
K710_1397	<i>phoP</i>	response regulator transcription factor	1.144507733	5.47E-17	

表 6 下调表达的细菌毒力因子

基因编号	基因	功能注释	log ₂ FC	P 值	致病性
K710_0182	--	simA - SiM protein / LPXTG cell wall anchor domain-containing protein	-0.886343218	0.0550742	SiM 蛋白
K710_0298	--	preprotein translocase subunit YajC	-0.527790103	5.45E-07	分泌系统
K710_0255	--	ISSag8, transposase	-0.381375332	0.065939	
K710_1553	--	ISSag8, transposase	-1.000831387	4.81E-15	链球菌
K710_1011	--	ISSag8, transposase	-1.202452481	4.88E-24	溶血素 S
K710_1641	--	ISSag7 transposase	-1.993544978	0.138188	
K710_0249	<i>hssR</i>	response regulator transcription factor	-0.092622415	0.551351	
K710_0288	<i>lrp</i>	PucR family transcriptional regulator	-0.452055279	0.003169	
K710_0486	<i>lacR</i>	AraC family transcriptional regulator	-1.038713833	5.09E-11	转录调节因子
K710_0744	<i>purR</i>	LacI family transcriptional regulator	-0.816241597	1.03E-13	
K710_1606	<i>arlR</i>	response regulator transcription factor	-0.566354947	1.75E-08	
K710_1905	<i>glnR</i>	MerR family transcriptional regulator	-0.402293774	5.01E-06	

3 讨论

温度是影响细菌毒力的重要环境因子。由病原菌引发的鱼类疾病的暴发往往与水温有着极为紧密的关联性。郭富强等^[29]的研究结果表明,随着水温的不断升高罗非鱼感染无乳链球菌的累积死亡率也随之升高,在 33 °C 死亡率最高;刘志刚等^[17]发现无乳链球菌感染罗非鱼在 37 °C 死亡率最高;Zamri-Saad 等^[30]认为链球菌水温在 32 ~ 37 °C 时易出现高发病率和死亡率,而水温 26 °C 以下时较少发病。在本研究中,人工回归感染试验结果表明,卵形鲳鲹感染海豚链球菌后在 35 °C 下的死亡率高达 81.11%,而在 25 °C 下的死亡率仅为 12.23%,2 个温度的 PBS 对照组均未出现死亡,说明海豚链球菌在 35 °C 时毒力更强,导致宿主死亡率更高,发病症状更为明显。同时,本课题组在卵形鲳鲹链球菌病的流行病学调查研究中发现,卵形鲳鲹在 25 °C 以下几乎不感染发病,在 30 ~ 35 °C 时死亡率较高。因此,本研究设置 25 °C 培养的海豚链球菌作为对照组,35 °C 培养的海豚链球菌为实验组,探究其在不同温度下基因转录水平上的差异表达,揭示温度对海豚链球菌毒力基因的影响。

在本研究中,当设置 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 时,与 25 °C 培养的海豚链球菌相比,35 °C 培养的海豚链球菌显著上调的基因有 820 个,而显著下调的基因只有 107 个。从整体来看,在较高的培养温度下(35 °C)菌株大多数基因处于上调状态,菌株表现为更加“活跃”的状态,而在较低的温度下(25 °C)菌株大多数基因则显著下调,菌株显得相对不那么“活跃”,具体表现为与糖类、碳类的代谢相关的基因显著下调,而与细菌毒力相关的基因则显著上调。Mereghetti^[31]等在研究无乳链球菌全基因转录组测序时也有类似的发现,编码毒力的相关基因在 40 °C 时上调表达,而处于生长稳定期的大量的新陈代谢相关基因在 30 °C 时上调表达。

ABC 转运蛋白是已知的最大蛋白家族之一,并在细菌中广泛存在,其将 ATP 水解与各种底物(例如蛋白质、脂质、肽、固醇、糖、离子及药物)的主动运输结合在一起^[32-33],这将导致细胞质膜两侧的物质频繁交换。在本研究中,海豚链球菌在 35 °C 时 ABC 转运通路相关的基因显著上调,说

明 35 °C 海豚链球菌可能涉及各种物质参与的能量交换,以及物质的合成与代谢。群体感应是一种协同调节系统,它以一种被称为 AIP(autoinducing peptide)的自诱导肽作为信号分子,通过感知菌群密度和环境因子的变化,并把周围的环境信息传递到双组份系统当中,再由双组份系统对相关基因进行表达调控^[34]。一些 AIP 的前体肽在核糖体中合成,但是 AIP 无法自由地穿透细胞壁,因此必须通过 ABC 运输系统或其他膜通道蛋白进入胞外发挥作用。因此部分上调表达的基因同时参与了 ABC 转运通路、双组份信号系统通路、群体感应通路、脂肪酸代谢和合成通路当中的 2 ~ 3 个通路,特别是显著上调的 *srtF*(K710_0263)基因同时参与了 3 个通路的表达调控,具有重要的研究意义。研究发现,*srtF* 属于 C 类 sortase 家族,主要作用是在细菌表面形成菌毛并将其固定在细胞壁上,与细胞黏附、定植、生物膜形成等环境过程相互作用^[35]。

在下调表达基因中比较典型的是双组份系统中编码柠檬酸合酶(Citrate lyase)相关的基因(K710_0369、K710_0374、K710_0375、K710_0379 和 K710_1345),由此表明,在 35 °C 时,*Tozj-1* 菌株的三羧酸循环被抑制,对葡萄糖的代谢能力明显降低,而在 25 °C 相对较低的环境温度中,其对葡萄糖的代谢能力表现良好。这与胡文婷^[16]研究的无乳链球菌和刘韬^[36]研究的鲁氏耶尔森菌结论一致,低温更有利于病原菌葡萄糖的代谢。并且在 35 °C 时,与磷酸转移酶系统、果糖和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢相关的基因显著下调,这证明糖类、碳类的代谢更适合在较低温度下进行。

病原菌的致病过程与毒力因子的共同介导作用密切相关。海豚链球菌几种重要的毒力因子包括 M 蛋白、磷酸葡萄糖苷酶(*pgmA*)、溶血素 S、C5 α 肽酶、脱乙酰基酶、CAMP 因子。M 蛋白^[37]是一种可以通过荚膜延伸到菌体表面形成菌毛的蛋白,它在细菌粘附、感染、抵御吞噬等方面起关键作用;磷酸葡萄糖苷酶(*pgmA*)^[38]促进细胞壁和荚膜的生物合成,并能抵抗正电性抗菌肽;溶血素 S^[39-40]能破坏宿主红细胞、单核细胞和粒细胞,有可能对脑血管造成损伤;C5 α 肽酶能水解中性粒细胞化学诱导物补体因子 C5 α ,从而破坏宿主细胞的抗侵袭能力;脱乙酰基酶^[41]能够提高病原菌对溶

菌酶的耐受性, 逃避宿主免疫, 黏附并入侵宿主的上皮细胞; CAMP 因子^[42] 通过与 FC 区域的免疫球蛋白结合, 从而有助于拦截抗体向补体呈递抗原。这些毒力因子相互作用协助 *S.iniae* 侵入宿主, 逃避宿主的免疫防御。在本研究中, 不同温度下培养的海豚链球菌, 其毒力因子呈差异表达, 在 35 °C 时, 除了溶血素、黏附素、转录调节因子等毒力因子转录上调之外, 抗逆因子和一些酶类基因的转录表达量也大幅上升, 只有少量的毒力因子下调表达。刘志刚等^[17]、王松艳^[21] 和郭富强^[29] 对无乳链球菌的研究亦发现类似的结果。以上相关研究结果均表明, 高温有助于海豚链球菌毒力相关基因表达, 导致其毒力增强, 有助于其黏附、定植、入侵、胞内存活和扩散等致病过程, 引起宿主发病。

本研究结果初步证实温度能够广泛影响海豚链球菌基因的转录水平, 进而调控海豚链球菌的致病性, 为进一步研究海豚链球菌的致病机理提供理论依据, 但其调控机制仍需要进一步研究加以阐明。

参考文献:

- PIER G B, MADIN S H. *Streptococcus iniae* sp. nov. a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis* [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1976, 26(4): 545 – 553.
- YOUNG E J, BANNISTER J, BULLER N B, et al. *Streptococcus iniae* associated mass marine fish kill off Western Australia [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2020, 142: 197 – 201.
- XIONG X, PENG Y, CHEN R, et al. Efficacy and transcriptome analysis of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) immunized with a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 134: 108489.
- 武沛文, 宋大伟, 郭丹玲, 等. 湛江卵形鲳鲹致病链球菌的分离、鉴定及药敏实验 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(12): 5403 – 5411.
- HECKMAN T I, SHAHIN K, HENDERSON E E, et al. Development and efficacy of *Streptococcus iniae* live-attenuated vaccines in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 152 – 162.
- AL-HARBI A H. Whole-genome sequence of *Streptococcus iniae* strain AH1, isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2022, 11(6): e0008722.
- FENG Y, BAI M, GENG Y, et al. The potential risk of antibiotic resistance of *Streptococcus iniae* in sturgeon cultivation in Sichuan, China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(48): 171 – 180.
- MUGETTI D, COLUSSI S, PASTORINO P, et al. Episode of mortality associated with isolation of *Streptococcus iniae* in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836) reared in Northern Italy [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(6): 939 – 942.
- 杨林狄, 贾新蕾, 黄增朝, 等. 银鼓鱼海豚链球菌的分离、鉴定及毒力基因检测 [J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(2): 1 – 9.
- 徐伟, 施慧, 汪玮, 等. 小黄鱼海豚链球菌的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(7): 725 – 730.
- 王汉清, 黄郁葱, 林潮峰, 等. 黄鳍鲷海豚链球菌的分离、鉴定及药敏试验 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(21): 100 – 102.
- ZHOU K, CUI T T, LI P L, et al. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(6): 1956 – 1965.
- MAULU S, HASIMUNA O J, MPHANDE J, et al. Prevention and control of streptococcosis in Tilapia culture: a systematic review [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2021, 33(3): 162 – 177.
- 祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 海南养殖罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验 [J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(4): 590 – 596.
- 陈家长, 臧学磊, 瞿建宏, 等. 温度胁迫下罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*) 机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(9): 1896 – 1901.
- 胡文婷. 基于代谢组学的温度对罗非鱼链球菌病的影响和调控方法研究 [D]. 海口: 海南大学, 2017.
- 刘志刚, 可小丽, 卢迈新, 等. 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响 [J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1733 – 1741.
- 刘海波, 绳秀珍, 唐小千, 等. 培养条件对海豚链球菌的生长及其胞外产物蛋白组成的影响 [J]. *中国动物检疫*, 2016, 33(5): 85 – 89.
- 柴壮林, 祝璟琳, 杨弘, 等. 不同温度下罗非鱼人工感染海豚链球菌后血液生化指标及组织病理 [J]. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(4): 34 – 41.
- LI L, LU J, ZHAN P, et al. RNA-seq analysis unveils temperature and nutrient adaptation mechanisms relevant for pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Aquaculture*, 2022, 558: 738397.
- 王松艳. 鱼源无乳链球菌转录组分析及其毒力相关基因筛选和 sRNA 预测 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.
- 师若萍. 大肠杆菌 NCM3722 在不同温度中的转录组和代谢组的研究 [D]. 深圳: 深圳大学, 2019.
- CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast

- all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884 – i890.
- [24] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357 – 379.
- [25] GOLKAR-NARENJI A, ANTOSIK P, NOLIN S, et al. Gene ontology groups and signaling pathways regulating the process of avian satellite cell differentiation[J]. *Genes*, 2022, 13(2): 242.
- [26] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D353 – D361.
- [27] COLUSSI S, PASTORINO P, MUGETTI D, et al. Isolation and genetic characterization of *Streptococcus iniae* virulence factors in adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*)[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 883.
- [28] BAIANO J C F, BARNES A C. Towards control of *Streptococcus iniae*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(12): 1891 – 1896.
- [29] 郭富强. 温度对罗非鱼无乳链球菌致病机制影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [30] ZAMRI-SAAD M, AMAL M N A, SITI-ZAHRAH A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2010, 143(2/3): 227 – 229.
- [31] MEREGHETTI L, SITKIEWICZ I, GREEN N M, et al. Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2785.
- [32] BENDA M, SCHULZ L M, STÜLKE J, et al. Influence of the ABC transporter YtrBCDEF of *Bacillus subtilis* on competence, biofilm formation and cell wall thickness[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 587035.
- [33] MALLICK S, KUMAR A, DODIA H, et al. Biochemical characterization of an *E. coli* cell division factor FtsE shows ATPase cycles similar to the NBDs of ABC-transporters[J]. *Bioscience Reports*, 2021, 41(1): BSR20203034.
- [34] 饶贤才, 胡福泉. 分子微生物学前沿[J]. *农药学学报*, 2013, 15(4): 444.
- [35] FAULDS-PAIN A, SHAW H A, TERRA V S, et al. The *Streptococcus suis* sortases SrtB and SrtF are essential for disease in pigs[J]. *Microbiology*, 2019, 165(2): 163 – 173.
- [36] 刘韬, 魏文燕, 刘家星, 等. 不同温度条件下鲁氏耶尔森氏菌的链特异性转录组分析[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(5): 969 – 976.
- [37] KIM D, BECK B R, LEE S M, et al. Pellet feed adsorbed with the recombinant *Lactococcus lactis* BFE920 expressing SiMA antigen induced strong recall vaccine effects against *Streptococcus iniae* infection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 374 – 383.
- [38] 马丽, 吴金英, 高淞泽, 等. 海豚链球菌 *simA* 和 *pgmA* 真核表达质粒对尼罗罗非鱼免疫保护的研究[J]. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 38 – 46.
- [39] ETHICA S N, DARMAWATI S, DEWI S S, et al. Streptolysin encoding genes *sagC* and *sagD* as biomarkers of fish pathogen *Streptococcus iniae*: an in silico study[J]. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 2020, 15(1): 21 – 39.
- [40] LIU C, HU X, CAO Z, et al. Construction and characterization of a DNA vaccine encoding the SagH against *Streptococcus iniae*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 71 – 75.
- [41] 白明焕, 耿毅, 赵若璇, 等. 四川鲟源海豚链球菌的毒力基因谱及分子分型[J]. *华南农业大学学报*, 2020, 41(5): 36 – 42.
- [42] SHENG X, GAO J, LIU H, et al. Recombinant phosphoglucosyltransferase and CAMP factor as potential subunit vaccine antigens induced high protection against *Streptococcus iniae* infection in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(4): 997 – 1007.

Transcriptome analysis of *Streptococcus iniae* from fish at different culture temperatures

JIA Xinlei^{1,2}, HUANG Zengchao¹, YANG Lindi¹, LYU Jing¹,

LI Yanping¹, JIAN Jichang¹, HUANG Yucong^{1,2}

(1. Fisheries College of Guangdong Ocean University & Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Aquaculture, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory(Zhanjiang), Zhanjiang, Guangdong 524006, China)

Abstract: To identify the differences in transcription level of *Streptococcus iniae* at different temperatures, the growth and pathogenicity of *S. iniae* cultured at 25 °C and 35 °C were analyzed by using growth curve and artificial infection test, and strand-specific RNA-seq technology was used for sequencing analysis of *S. iniae* Tozj-1 strain cultured at 25 °C and 35 °C. The differentially expressed genes (DEGs) were screened and their GO function and KEGG pathway enrichment were analyzed based on the GO (Gene Ontology) database and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database. The key differentially expressed virulence genes were filtrated using virulence factor database (VFDB) and verified by real-time quantitative PCR. The results showed that *S. iniae* grew faster with a higher virulence at 35 °C. A total of 927 significantly differentially expressed genes were screened ($P < 0.05$), including 820 up-regulated genes and 107 down-regulated genes. GO functional enrichment analysis showed that the DEGs were mainly enriched in metabolic process, cellular process, binding process and catalytic activity. KEGG enrichment analysis revealed that the DEGs were mainly enriched in ribosome, quorum sensing, ABC transporters and other signaling pathways. These results indicated that temperature regulated the transcription and expression of *S. iniae* genes and the enrichment of related pathways, which provided data support for further research in the pathogenesis of *S. iniae*.

Keywords: *Streptococcus iniae*; transcriptome sequencing; temperature; virulence factor; qRT-PCR

(责任编辑:叶 静)