

溶藻弧菌 *tatD* 基因功能初步分析

叶家成子[#], 谢珍玉, 龙 昊*

(海南大学 海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228 中国)

摘要: 溶藻弧菌是一种海洋常见革兰氏阴性细菌, 广泛存在于水产养殖环境中, 它对养殖鱼类、贝类和对虾都具有极强的侵染性和致病性, 其导致的弧菌病给养殖业造成了巨大的经济损失。*tatD* 基因编码具有核酸酶活性的蛋白, 其功能与细菌生物被膜形成及毒力调控相关。本研究利用基因敲除技术研究了溶藻弧菌 HN08155 菌株的 *tatD* 基因在菌体生长与生物被膜形成过程中的功能。研究表明, 溶藻弧菌 HN08155 菌株含有 3 个 *tatD* 基因, 在正常营养条件下 *tatD* 基因不影响细菌生长, 在低营养条件下对细菌的生长具有调节作用; 分泌到胞外的 TatD 蛋白具有核酸酶活性, 野生株培养物上清液降解 DNA 的能力高于 *tatD* 基因缺失菌株; 在 0.1% Triton X-100 的诱导下, *tatD* 基因缺失株自溶率显著高于野生株; *tatD* 基因缺失后, 溶藻弧菌生物被膜量与厚度显著增加。

关键词: 溶藻弧菌; *tatD* 基因; 基因敲除; 生物被膜; 自溶

中图分类号: S565.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2026)02-0255-10

叶家成子, 谢珍玉, 龙昊. 溶藻弧菌 *tatD* 基因功能初步分析[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026,

17(2): 255–264. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.20240159 CSTR: 32425.14.j.cnki.rds wxb.20240159



溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是一种海洋中常见的细菌, 属于弧菌科 (Vibrionaceae) 弧菌属 (*Vibrio*) 一类不产荚膜与芽孢的革兰氏阴性细菌, 外形呈杆棒状, 具有端生鞭毛与周生鞭毛, 耐盐性极强^[1-4]。溶藻弧菌对水产养殖中的鱼类、贝类和对虾都具有极强的侵染性和致病性, 其导致的弧菌病给养殖业带来了严重的经济损失^[5-7]。溶藻弧菌的致病性主要由宿主、致病环境与细菌本身 3 个要素构成。对宿主进行黏附与侵袭、在宿主体内进行大量增殖、产生毒素等是细菌致病的基本过程, 而其中生物被膜 (bacterial biofilm, BF) 是由细菌本身分泌的多糖、蛋白、eDNA 等物质与细胞聚集体结合而成的胞外共生聚合物, 是病原菌在宿主中持续反复感染的关键, 可以增强细菌的毒力^[8-9]。生物被膜成熟后细菌的新陈代谢速率会降低, 从而形成休眠体, 此时在被膜中的耐药基因被激活, 产生胞外酶, 进而使细菌产生耐药性, 同时也增强对于不良环境的抵抗力^[10-11]。生物被膜功

能大多数与细菌产生的胞外聚物质有关, eDNA 分子在生物被膜的骨架结构中发挥着至关重要的作用。对 eDNA 具有降解作用的 DNase, 同样可以有效抑制与清除生物被膜。研究表明, 肺炎球菌与金黄色葡萄球菌可以分泌一些脱氧核糖核酸酶以促进毒力的表达, 这些核酸酶可以水解宿主中性粒细胞为抑制病原菌所产生的 DNA 骨架结构, 从而增强其毒力^[12]; 但也有着发挥解聚酶作用的 DNase, 如细菌的 TatD 蛋白。TatD 蛋白是一种在原核生物与真核生物中都存在的蛋白质, 大多数只具有 1 个与 TIM-桶状折叠相似的 DNase 结构域^[13-15]。然而, 真核生物恶性疟原虫 TatD 蛋白具有与常见 TatD 蛋白有所区别的特殊结构, 其 TatD 蛋白具有 1 个长为 24~26 个氨基酸分子的信号肽, 氨基酸序列表明该蛋白能够被分泌到细胞外部^[16-17]。在 TatD 蛋白的探究初期, 人们对模式生物大肠杆菌的 TatD 蛋白进行了深入分析, 解析其晶体结构并模拟了该蛋白与



收稿日期: 2024-10-21

修回日期: 2025-02-24

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目(海南) (U23A20254); 海南省虾产业技术体系岗位项目(HNARS-10-G03)

***第一作者:** 叶家成子(1996—), 男, 海南大学海洋与生物水产学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 492345952@qq.com

***通信作者:** 龙昊(1980—), 男, 副研究员。研究方向: 水产致病菌毒力机制研究。E-mail: longhao@hainanu.edu.cn

DNA 分子之间结合作用的机制^[18]。研究者通过解析大肠杆菌中的 TatD 蛋白,辅助多种方式确定了其晶体构造, TatD 蛋白 TIM 桶状结构具有 DNA 酶的性质,与 DNA 分子的结合模式依赖于金属离子。而与金属离子结合的区域为 TIM 桶状上方的 Loop 结构,该结构类似于酸性布袋,经过 X 射线衍射,表明其由 α 螺旋与 8 个 β 折叠共同形成,与核酸内切酶 Endo IV 结构相似^[19-20]。本研究构建了 *tatD* 基因缺失突变菌株,通过探究 *tatD* 基因在溶藻弧菌生长与生物被膜形成上的功能,可为溶藻弧菌病害防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 实验所用溶藻弧菌由海南大学南海微生物资源开发与利用课题组提供,菌株编号为 HN08155(WT),分离自 1 只患病石斑鱼。实验所用具有氯霉素与苄青霉素抗性的自杀质粒 pDM4 由海南大学微生物资源开发与利用课题组保藏,所用 DH5 α 、Top10 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 培养基 1) LB 培养基:胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母膏 5 g·L⁻¹,氯化钠 20 g·L⁻¹; 2) LBS 培养基:胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母膏 5 g·L⁻¹,氯化钠 30 g·L⁻¹; 3) 2216E 培养基:胰蛋白胨 1.5 g·L⁻¹, 酵母膏 0.3

g·L⁻¹,氯化钠 6 g·L⁻¹,磷酸铁 0.01 g·L⁻¹; 4) M9 培养基: M9 药品 11.4 g·L⁻¹,葡萄糖 4 g·L⁻¹,氯化钠 19.5 g·L⁻¹。

1.1.3 实验所用试剂 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技北京有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 生物技术公司,限制性内切酶、DNA 聚合酶和 T4 连接酶与 PCR 相关试剂均由 TaKaRa 公司提供,引物合成与测序分别由上海生工生物工程股份有限公司与华大基因科技股份有限公司完成。实验所用其他试剂均为常规试剂。

1.2 *tatD* 基因克隆与系列分析 实验前期已对溶藻弧菌 HN08155 进行全基因组测序分析。从溶藻弧菌全基因组 DNA(美吉生信云: <https://www.majorbio.com>)中挑选全部 *tatD* 基因进行基因信息比对,将 *tatD* 基因序列翻译为氨基酸序列,使用 Uniprot 蛋白数据库,进行蛋白信息查询比对,以验证 *tatD* 基因翻译后的氨基酸序列。此外,利用 NCBI 进行 TatD 蛋白的结构域分析,同时通过蛋白质数据库 Pfam 进行结构域的预测验证。应用 ProtParam tool 预测 TatD 蛋白的理化性质,包括分子质量、等电点等重要参数。溶藻弧菌 DNA 利用天根生化科技北京有限公司 DNA 提取试剂盒进行提取,以提取 DNA 为模板,利用 *tatD* 基因相关引物(表 1)扩增 *tatD* 基因 ORF 框,PCR 产物经过切胶、纯化后,由华大基因科技股份有限公司进行测序。

表 1 PCR 扩增所使用的引物

Tab. 1 Primers used in PCR

引物 Primer	序列 Sequence
<i>tatD1</i> -T-F	ATGAAGCTCTTTGATACCCA
<i>tatD1</i> -T-R	TTATTCACATATCGAGAAAG
<i>tatD1</i> -UF	GAAGATCTTCAGAACCAAGCAAACCTTAGCA
<i>tatD1</i> -UR	CCATAACTGAGAGGCAATCGAAGTCACCTTGGAAATACATC
<i>tatD1</i> -DF	GATGTATTCCAAGGTGACTTCGATTGCCTCTCAGTTATGG
<i>tatD1</i> -DR	CCCTCGAGGGACCGTAGTTGATAACGTTAG
<i>tatD1</i> -TF	GCATTAACGTTGCAACTGCG
<i>tatD1</i> -TR	GAATGCGAAGATGAAACCGC
<i>tatD2</i> -T-F	ATGTTCTGATGATTTCTCATTG
<i>tatD2</i> -T-R	TCATCGCAAAAAAAGATTTC
<i>tatD2</i> -UF	GAAGATCTTCAACTGAATATGGGCTCTCCG

续表 1 Tab. 1 Continued

引物 Primer	序列 Sequence
<i>tatD2</i> -UR	GCACGATTTGAGTTGCGCAATCCACATTGATGTGGAGATC
<i>tatD2</i> -DF	GATCTCCACATCAATGTGGATTGCGCAACTCAAATCGTGC
<i>tatD2</i> -DR	CCCTCGAGGGGTAGCCTAAAGGTTAGCACC
<i>tatD2</i> -TF	TTACCCACAATCAGGAGCGT
<i>tatD2</i> -TR	CTGATACTGGAAGCATCAGC
<i>tatD3</i> -T-F	ATGATCGATACCCACGCGCA
<i>tatD3</i> -T-R	TTAAATATTAACAGCTTTT
<i>tatD3</i> -UF	GAAGATCTTCCGATTGCTGGAACGCCTAGA
<i>tatD3</i> -UR	AGTTGCGACATCGACATCACTACTTCATCGCGGTCGTT
<i>tatD3</i> -DF	AACGACCGCGATGAAGTAGTGTGATGTCGATGTCGCAACT
<i>tatD3</i> -DR	CCCTCGAGGGGACGTAACCACACTTTGTGC
<i>tatD3</i> -TF	TCTTCATCGATGATGCCGTC
<i>tatD3</i> -TR	GCCATTCGGATGTGCTTACT
pDM4-TF	CACAGGAACACTTAACGGCT
pDM4-TR	TCCTGTTCAGCTACTGACGG

1.3 *tatD* 基因敲除验证 使用 DNA 提取试剂盒 TIANGEN 提取溶藻弧菌 HN08155 基因组 DNA。利用软件 SnapGene viewer 以测序获得的 HN08155 全基因组序列中的 *tatD* 基因为模板设计上游/下游同源臂 PCR 引物(*tatD*-U、*tatD*-D, 表 1)。利用引物 *tatD*-UF+UR、*tatD*-DF+DR 分别扩增 *tatD* 基因上下游片段, 将扩增上下游片段纯化回收后作为模板, 利用 *tatD*-UF+DR 引物扩增 *tatD* 基因框内缺失片段, PCR 产物经过纯化回收与自杀质粒 PDM4 进行双酶切后连接, 构建重组载体 PDM4-*tatD* 载体, 将重组载体转化至溶藻弧菌(WT)。自杀质粒在宿主内无法正常进行复制, 要么会被识别为外源 DNA 而被清除, 要么整合到宿主染色体上, 与其一同复制。自杀质粒 PDM4 含有蔗糖致死基因, 当同源性 DNA 片段发生重组时, 在蔗糖培养条件下, 无法进行正常的复制, 从而筛选出 *tatD* 基因缺失株。利用 *tatD*-TF+TR(表 1)引物分别进行验证, 在构建成功的单基因缺失菌株上重复上述步骤, 从而构建双基因缺失株与三基因缺失株。

1.4 基因缺失菌株表型分析

1.4.1 生长特性测定 将保藏的菌株进行活化,

挑选单菌落到液体培养基中 30 °C、180 r·min⁻¹ 培养 12 h, 将菌液按百分之一的接种量转接到无菌液体培养基中, 相同条件下培养至对数生长期。按上述接种方式与接种量将菌液接种至新鲜液体培养基中, 混匀后按每孔 200 μL 培养液转入 96 孔板, 重复 6 次, 酶标仪测定菌液 OD₆₀₀ 数值, 连续监测 48 h, 通过 OD₆₀₀ 数值反映菌株的生长情况。LB 培养基为富营养条件, M9 为低营养条件。

1.4.2 菌株培养上清液降解 DNA 能力分析 将菌株活化后选择单菌落转接至新鲜液体培养基中培养过夜, 培养后的菌液按上述菌种量转接至液体培养基中培养至菌株生长对数期, 将培养液在 4 °C、5 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min, 弃沉淀取上清液。将从北京索莱宝科技有限公司购来的小牛胸腺 DNA 溶于无菌 ddH₂O 中, 移液枪吸取 10×反应缓冲液(MgCl₂)1 μL 与小牛胸腺 DNA 1 μL 配制降解反应体系, 加入各菌株上清液 4 μL, 添加无酶 ddH₂O 至 10 μL 反应体系; EDTA 具有螯合金属离子的作用, 添加 DNase I 酶与 EDTA 作为对照, 将反应体系在 30 °C 下反应 30 min, 使用琼脂糖凝胶电泳测定菌液上清液对 DNA 的降解

能力。

1.4.3 Triton X-100 诱导下自溶性分析 将菌株在 LB 液体培养基中活化培养, 30 °C 振荡培养至对数生长期, 在 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 8 min, 收集菌体, 用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 洗涤 2 次, 重复 3 次重悬在 Triton X-100 (体积百分数为 0.1%) 缓冲液中, 测定其 OD₆₀₀ 值, 随后在 30 °C、180 r·min⁻¹ 下振荡培养。每隔 1 h 测定菌株 OD₆₀₀ 值。细菌的自溶率可以通过以下公式得出:

$$\text{自溶率}(\%) = \frac{\text{即时吸光度}}{\text{初始吸光度}} \times 100,$$

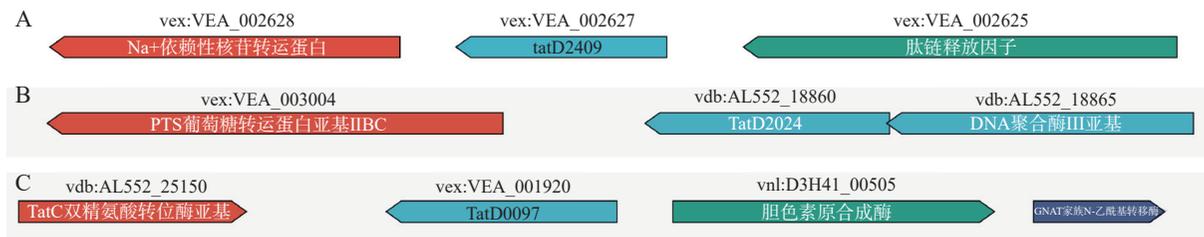
其中, 即时吸光度表示细菌每间隔 1 h 后的 OD₆₀₀ 值, 初始吸光度表示初始重悬后菌液的 OD₆₀₀ 值。

1.4.4 菌株生物被膜形成量测定 将菌种活化后挑选单菌落在 5 mL LBS 液体培养基培养 14 h, 按 1:100 (L:μL) 接种量将菌液转入新鲜 LB 培养基中振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6, 将所有菌株菌液 OD₆₀₀ 值调整至相等, 按上述接种方式与接种量将菌液接种至新鲜 LB 液培养基中, 混匀后按每孔 200 μL 培养液转入 96 孔板, 重复 5 次。孔板置

于 30 °C 培养箱中培养, 在 4、8、16、20、24 h 后分别取出孔板, 弃上清, 用 1×PBS (pH7.4) 洗脱放置 55 °C 条件下烘干 15 min, 加入 0.1% 结晶紫溶液 (CV) 220 μL, 30 min 后, 弃 CV 溶液, 用 1×PBS (pH7.4) 进行 3 次洗脱, 将孔板放置 55 °C 条件下烘干 15 min, 每孔加 200 μL 95% 乙醇进行 30 min 再溶, 酶标仪测定孔板 OD₅₇₀ 值, 以时间为横坐标, 以 OD₅₇₀ 值为纵坐标绘制生物被膜形成量曲线。

2 结果与分析

2.1 目的基因克隆与分析 通过全基因组系列分析发现溶藻弧菌 HN08155 含有 3 个 *tatD* 基因, 分别对其命名为 *tatD1* (*tatD2409*)、*tatD2* (*tatD2024*)、*tatD3* (*tatD0097*), 通过 PCR 扩增与生物信息学分析发现其碱基对 *tatD1* 全长为 774bp, *tatD2* 为 768 bp, *tatD3* 为 762 bp (美吉: MJ20211021082, 图 1)。Pafm 分析工具分析发现 3 个同源蛋白都带有 TIM-桶状的 TatD 结构域, 该结构域具有 Mg²⁺ 依赖金属水解酶与 3'-5' ssDNA/RNA 核酸外切酶特性。



A. *tatD1*; B. *tatD2*; C. *tatD3*.

A. *tatD1*; B. *tatD2*; C. *tatD3*.

图 1 溶藻弧菌 *tatD* 基因示意图

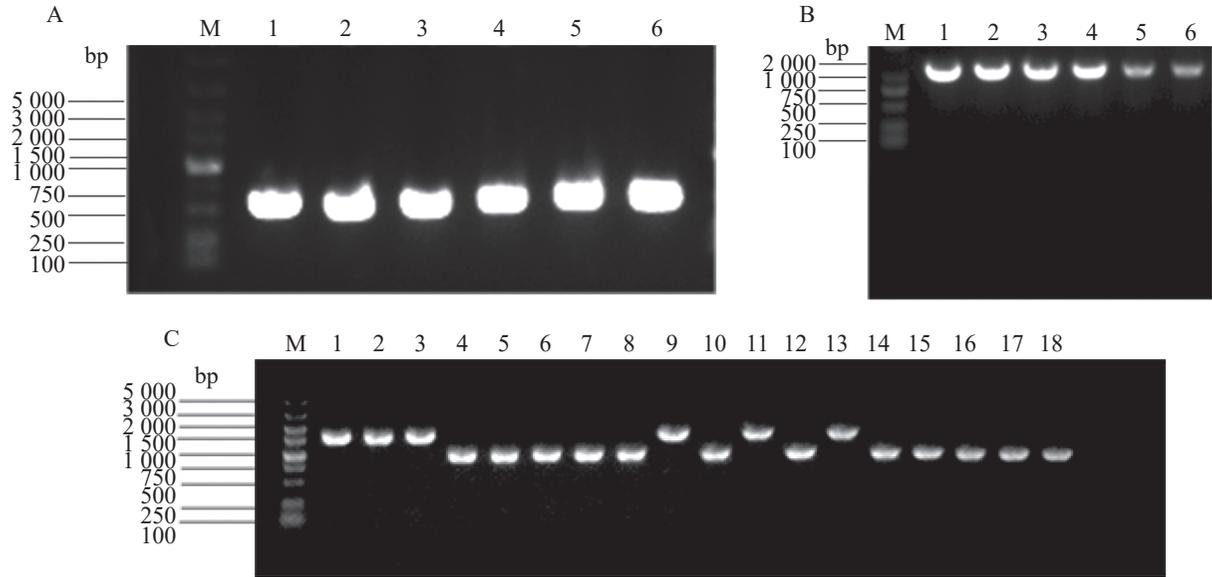
Fig. 1 Illustration of *Vibrio alginolyticus* *tatD* Gene

2.2 *tatD* 基因敲除与验证 PCR 扩增 *tatD* 基因上下游片段条带清晰 (图 2-A), 目的基因与自杀质粒经双切后连接构建重组载体, 利用 *tatD*-T-F+T-R 引物验证条带清晰 (图 2-B)。将重组载体 PDM4-*tatD* 转化至溶藻弧菌 HN08155, 通过自杀质粒的特点构建 *tatD* 基因缺失型菌株, 利用 *tatD1*-TF+TR、*tatD2*-TF+TR、*tatD3*-TF+TR 引物筛选并验证目的基因缺失菌株。结果表明, HN08155 菌株中的完整条带在 2 000 bp 左右, *tatD* 基因缺失菌株条带在 1 100 bp 左右 (图 2-C), 将 PCR 产物纯化回收送测, 测序结果证明正确。构建成功的基因缺失菌株分别命名为 Δ *tatD1*、 Δ *tatD2*、 Δ *tatD3*、

Δ *tatD12*、 Δ *tatD13*、 Δ *tatD23*、 Δ *tatD123*。

2.3 基因缺失菌株表型分析

2.3.1 生长特性测定 溶藻弧菌 HN08155 (WT) 与 *tatD* 基因缺失株在正常营养条件下, 48 h 内的生长曲线如图 3-A 所示, 溶藻弧菌野生株与 *tatD* 基因的缺失株生长趋势相似。最初各种菌株都处于生长延迟期, 在这个时期内, 各菌株生长速度较为缓慢; 在对数生长期时, 细菌生长迅速, 并且细菌数量呈指数级增加, 在各菌株进入了生长平台期后, 细菌增长稳定, 生长曲线基本上趋于一致。结果表明, 单独缺失 *tatD* 任何一个基因, 或者缺失两个基因, 以及三者同时缺失, 均未对溶藻弧菌

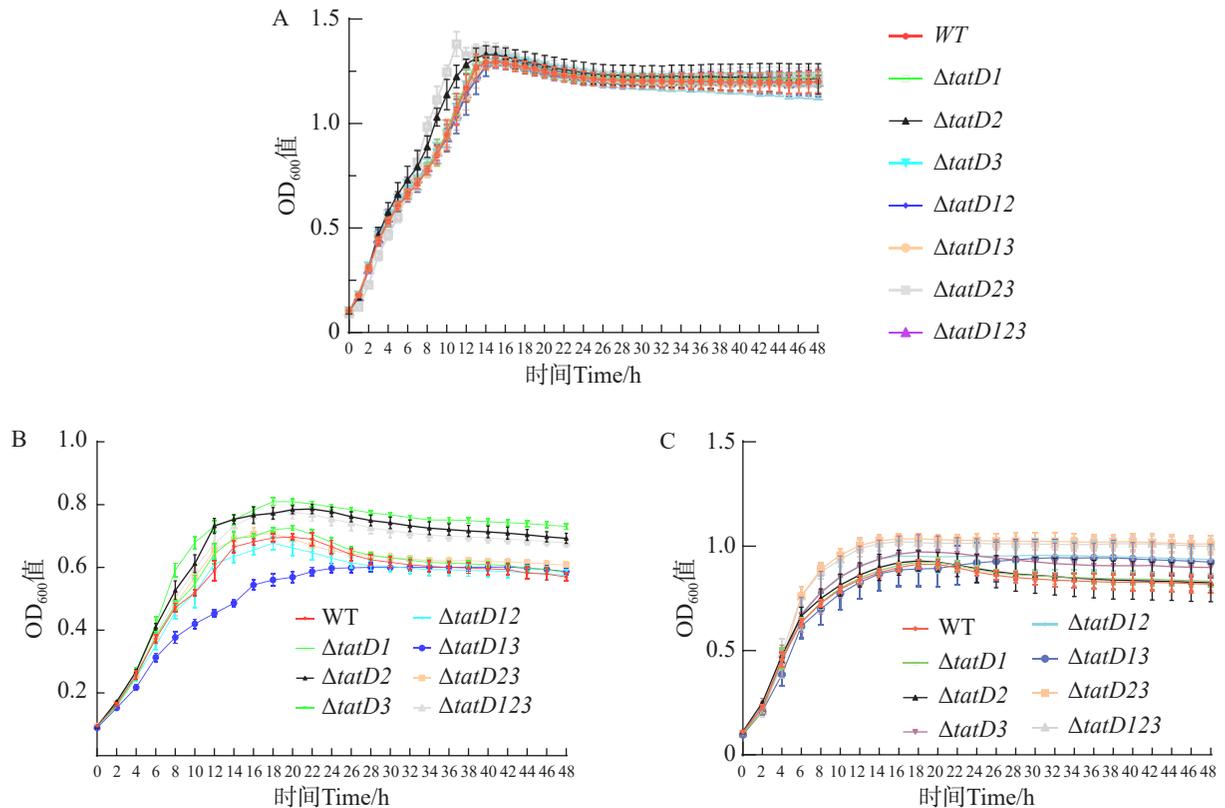


A. *tatD* 基因的上游和下游片段(M, 5000 bp; 泳道 1~2, *tatD1*; 泳道 3~4, *tatD2*; 泳道 5~6, *tatD3*); B. 重组载体的构建(M, 2 000 bp Marker; 泳道 1~2, *tatD1*; 泳道 3~4, *tatD2*; 泳道 5~6, *tatD3*); C. *tatD* 基因缺失菌株(M, 5 000 bp Marker; 泳道 1~3, 野生型(WT); 泳道 4~6, Δ *tatD1*, Δ *tatD2*, Δ *tatD3*; 泳道 7~9, Δ *tatD12*; 泳道 10~12, Δ *tatD13; 泳道 13~15, Δ *tatD23; 泳道 16~18, Δ *tatD123*; 泳道 1, 4, 7, 10, 13, 16, 使用 *tatD1* 引物扩增; 泳道 2, 5, 8, 11, 14, 17, 使用 *tatD2* 引物扩增; 泳道 3, 6, 9, 12, 15, 18, 使用 *tatD3* 引物扩增)。**

A. Upstream and downstream fragments of the *tatD* gene (M, 5 000 bp marker; Lanes 1-2, *tatD1*; Lanes 3-4, *tatD2*; Lanes 5-6, *tatD3*); B. Construction of the recombinant vector (M, 2000 bp marker; Lanes 1-2, *tatD1*; Lanes 3-4, *tatD2*; Lanes 5-6, *tatD3*); C. *tatD* gene deletion strains (M, 5 000 bp marker; Lanes 1-3, WT; Lanes 4-6, Δ *tatD1*, Δ *tatD2, Δ *tatD3*; Lanes 7-9, Δ *tatD12*; Lanes 10-12, Δ *tatD13; Lanes 13-15, Δ *tatD23; Lanes 16-18, Δ *tatD123; Lanes 1, 4, 7, 10, 13, 16, *tatD1* primers; Lanes 2, 5, 8, 11, 14, 17, *tatD2* primers; Lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18, *tatD3* primers).****

图 2 溶藻弧菌 *tatD* 基因克隆与 *tatD* 基因缺失菌株筛选

Fig. 2 Cloning of *tatD* gene from *Vibrio alginolyticus* and screening of *tatD* gene deletion strains.



A. LB 培养基; B. M9 培养基; C. 含 Fe²⁺ 的 M9 培养基。

A. LB medium; B. M9 medium; C. M9 medium supplemented with Fe²⁺.

图 3 HN08155 野生菌株和 *tatD* 基因缺失菌株生长能力测定

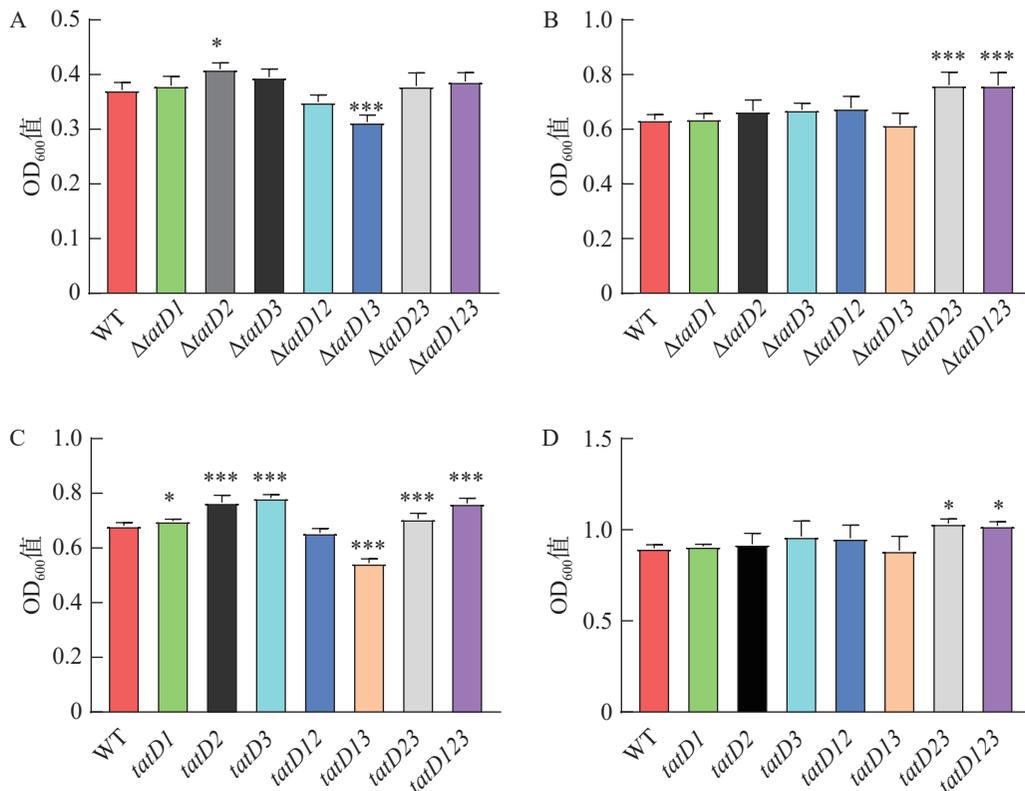
Fig. 3 Determination of the growth capabilities of wild-type strain HN08155 and *tatD* gene deletion strains

HN08155 的生长特性产生明显影响。在营养条件较低的 M9 培养基中, 各 *tatD* 基因缺失菌株的生长能力明显高于野生株。其中 $\Delta tatD123$ 、 $\Delta tatD2$ 与 $\Delta tatD3$ 菌株生长趋势显著上升 ($P < 0.0001$) (图 3-B), 在培养 48 h 后, *tatD* 基因缺失株菌体浓度均高于野生株。同时, 在不添加 Fe^{2+} 时, 野生菌株与缺失菌株生长差异明显, 而在添加 Fe^{2+} 后, 各菌株生长差异不显著, 菌株生长趋势与菌体浓度差异缩小 (图 3-C)。这表明溶藻弧菌 *tatD* 基因在不同营养条件下表现出了不一样的功能。

2.3.2 菌株培养上清液降解 DNA 能力分析 溶藻弧菌野生株与 *tatD* 基因缺失株上清液对 DNA 的降解能力结果见图 4、图 5, 野生株上清液的降解 DNA 效果明显高于缺失株, 而三基因缺失株的降解效果显著下降。 $\Delta tatD12$ 菌株上清液的降解能力比其他双基因缺失株要弱。在单一基因缺失菌株中, $\Delta tatD3$ 菌株的上清液降解能力明显高于

其他单基因缺失株。此外, 在添加 EDTA 后, 无论是野生株还是基因缺失菌株, 均失去降解 DNA 的能力。结果表明, 溶藻弧菌 *tatD* 基因的表达提升了其核酸酶活性, 表现出对金属离子的需求, 与 DNase I 酶发挥作用时表现相似。其中, *tatD2* 基因降解 DNA 分子的能力最高。

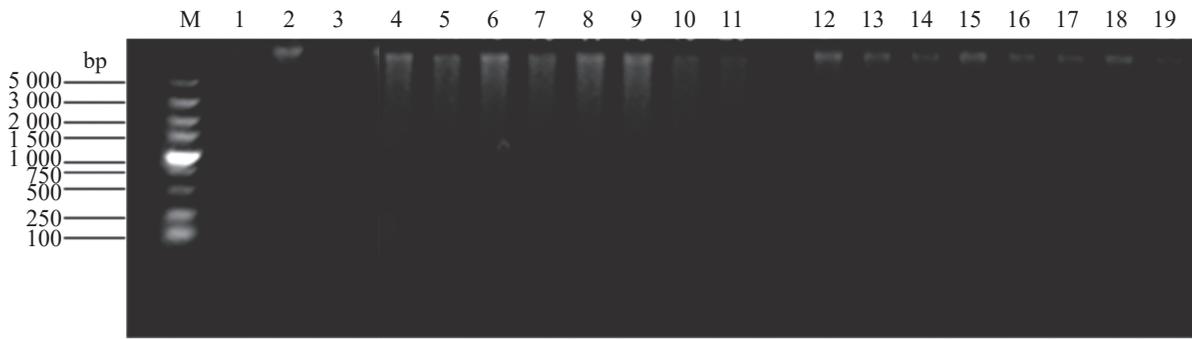
2.3.3 Triton X-100 诱导下自溶性分析 在 Triton X-100 (体积浓度为 0.1%) 的诱导下。对溶藻弧菌 HN08155 (WT) 及其 *tatD* 缺失菌株进行的自溶活性分析结果如图 6 所示。图 7 显示了在 6 和 12 h, 测定的野生菌株与 *tatD* 缺失菌株的自溶率。在 0~6 h 内, 野生株和 *tatD* 基因缺失株的自溶活性曲线呈现缓慢下降趋势, 在 6 h 的时候, 两者自溶率之间尚无显著性差异, 而在 6~12 h, 野生株和 *tatD* 基因缺失株的自溶活性曲线下速度加快, 12 h 的时候, *tatD* 基因缺失株自溶率显著高于野生株。结果表明, 与野生型菌株相比, *tatD* 基因缺失株的自溶活性显著降低。



A、C组. M9培养基; B、D组. 含 Fe^{2+} 的M9培养基。
A, C. M9 medium; B, D. M9 medium containing Fe^{2+} .

图 4 HN08155 野生菌株和 *tatD* 基因缺失菌株在 M9 培养基中培养 6 h 和 8 h 的菌体浓度
Fig. 4 Bacterial cell density of the wild-type strain HN08155 and the *tatD* gene knockout strain in M9 medium containing Fe^{2+} after 6 hours and 8 hours

注: “*”表示 $P < 0.05$, 指野生型菌株与敲除菌株自溶能力存在显著差异; “***”表示 $P < 0.0001$, 指野生型菌株与敲除菌株自溶能力存在极显著差异。
Note: “*” indicates $P < 0.05$, denoting a significant difference in autolytic capacity between the wild-type strain and the knockout strain. “***” indicates $P < 0.001$, denoting a highly significant difference in autolytic capacity between the wild-type strain and the knockout strain.



泳道 1. DNA 分子量标准(5000 bp); 泳道 2. 未添加 DNase I 酶; 泳道 3. 添加 DNase I 酶; 泳道 4 ~ 11、12 ~ 19. $\Delta tatD123$ 、 $\Delta tatD13$ 、 $\Delta tatD12$ 、 $\Delta tatD23$ 、 $\Delta tatD1$ 、 $\Delta tatD2$ 、 $\Delta tatD3$ 及野生型(WT)菌株上清液; 泳道 12 ~ 19 中均添加 EDTA。

Lane 1. DNA Marker 5000; Lane 2. Without DNase I enzyme; Lane 3. With DNase I enzyme; Lanes 4–11, 12–19. Supernatants from $\Delta tatD123$, $\Delta tatD13$, $\Delta tatD12$, $\Delta tatD23$, $\Delta tatD1$, $\Delta tatD2$, $\Delta tatD3$, and WT; EDTA was added to Lanes 12–19.

图 5 培养物上清液降解 DNA 能力琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 5 Analysis of DNA degradation using agarose gel electrophoresis

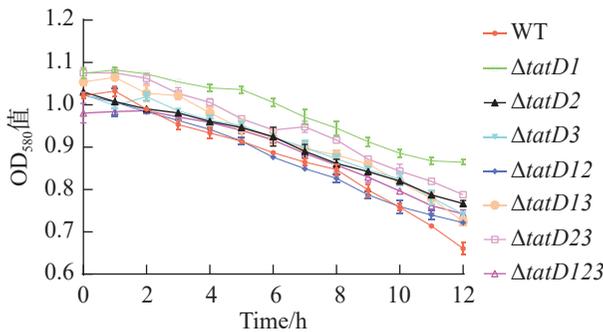


图 6 HN08155 和 *tatD* 基因敲除菌株的自溶能力曲线图

Fig. 6 Self-lysis curve of HN08155 and *tatD* gene knockout strains

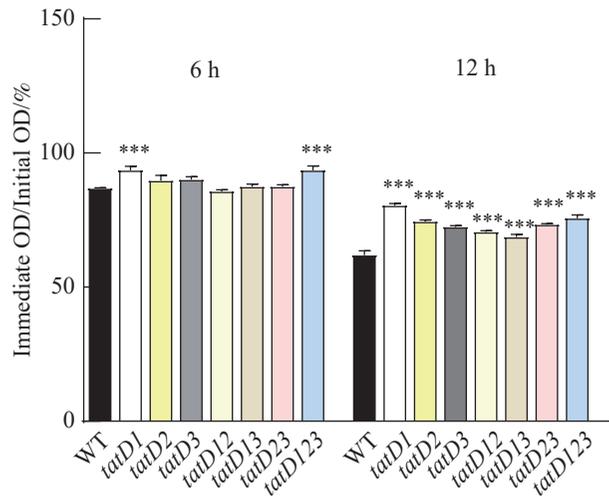


图 7 HN08155 和 *tatD* 基因敲除菌株的自溶能力对比
Fig. 7 Comparison of autolysis ability between HN08155 and *tatD* gene knockout strains

注: “***”表示 $P < 0.001$, 野生株与缺失株自溶能力对比差异极显著。
Note: “***” indicates $P < 0.001$, denoting a highly significant difference in autolytic capacity between the wild-type strain and the knockout strain.

2.3.4 菌株生物被膜形成量测定 本实验测定了野生株和 *tatD* 基因缺失株在 24 h 内生物被膜形成量(图 8)。图 9 显示了在 8 h 时野生型和 *tatD* 基因缺失株的生物被膜形成量。实验显示 *tatD* 基因缺失株生物被膜形成量与生物被膜形成趋势均高于野生株。在这一阶段, 各菌株的生物被膜量快速增加, 在经过 8 h 后, 除了 $\Delta tatD13$ 基因双缺失株和 $\Delta tatD123$ 三基因缺失株外, 其他所有菌株都已达到了其生物被膜形成量的峰值。其中溶藻弧菌 $\Delta tatD13$ 菌株的生物被膜形成量最多; 在 8 ~ 16 h 时, 除了 $\Delta tatD13$ 基因双缺失株 $\Delta tatD123$ 三基因缺失株之外, 其他菌株的生物被膜逐渐出现溶解下降的趋势。而在 16 ~ 20 h 的时间段内, 所有菌株的生物被膜形成量都呈现了先上升后下降的波动。这种波动趋势的出现可能是后期菌体聚集所造成的, 进而导致生物膜形成量曲线出现异常上升现象。在 8 h 时, $\Delta tatD2$ 、 $\Delta tatD12$ 、 $\Delta tatD123$ 菌株形成的生物被膜量与厚度、密度均高于野生株。研究结果表明, 溶藻弧菌

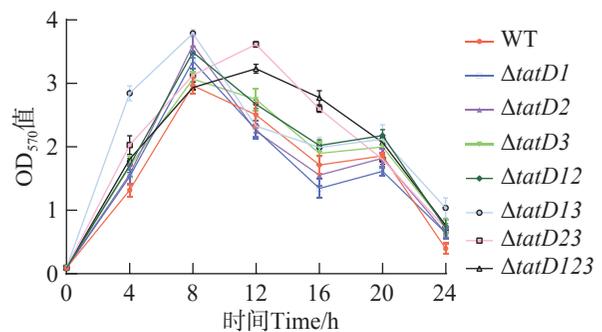
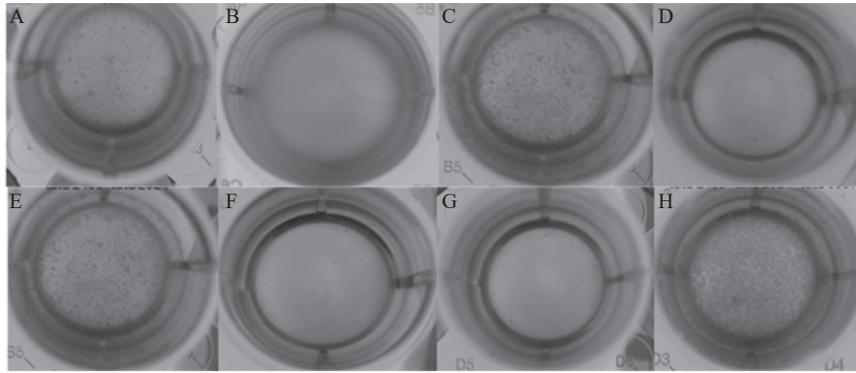


图 8 野生株与 *tatD* 基因缺失株生物被膜形成量
Fig. 8 Biofilm formation of wild-type (WT) strain and *tatD* gene deletion mutant

在缺失 *tatD* 基因后, 其生物被膜形成量增加, 而降解生物被膜的能力减弱。这证实了 *tatD* 基因具有调控生物被膜形成和抑制生物被膜形成的能力。



A. WT 菌株; B. Δ tatD1 菌株; C. Δ tatD2 菌株; D. Δ tatD3 菌株; E. Δ tatD12 菌株; F. Δ tatD13 菌株; G. Δ tatD23 菌株; H. Δ tatD123 菌株。
A. WT strain; B. Δ tatD1 strain; C. Δ tatD2 strain; D. Δ tatD3 strain; E. Δ tatD12 strain; F. Δ tatD13 strain; G. Δ tatD23 strain; H. Δ tatD123 strain.

图 9 8 h 时野生株与 *tatD* 基因缺失株生物被膜形成量

Fig. 9 Biofilm formation of the wild-type (WT) strain and a *tatD* gene deletion mutant after 8 hours

3 讨论

为了深入研究溶藻弧菌 HN08155 菌株中 *tatD* 基因的功能和作用机制,本研究构建了 *tatD* 基因缺失突变株,并对其进行生物学特性分析。实验结果显示,在正常营养条件下,*tatD* 基因的缺失对溶藻弧菌的生长能力没有影响。一些类似研究结果也表明,*tatD* 基因不参与细菌生长调控,如单增李氏特菌、化脓性隐球菌、肺炎链球菌和迟缓型艾德华氏菌在失去 *tatD* 基因后,其生长能力并未受到影响^[21]。不过,进一步的实验表明,在营养较为匮乏的环境下,*tatD* 基因敲除菌株相较于野生型菌株表现出了更好的生长能力,各缺失株与野生株相比具有明显的生长趋势上的差异,在添加 Fe^{2+} 后,各菌株生长差异会显著降低。这种差异可能是由于 *tatD* 基因缺失菌株能够形成较野生株更多的生物膜,膜中细菌生长缓慢及被膜的保护能力增强了 *tatD* 基因缺失株的生长能力;也有研究表明,*tatD* 是铁硫蛋白质控制中心组成成分之一,对于蛋白的输出至关重要^[22],在 M9 培养条件下可能影响了离子相关蛋白的输出,进而影响了菌株的生长;以上实验结果证明了 *tatD* 基因并非溶藻弧菌生长核心基因,在正常营养条件下缺失了 *tatD* 基因并不会影响溶藻细菌的生长。而在不利的环境条件下,溶藻弧菌可能通过 *tatD* 基因调控形成生物被膜,或影响了离子相关蛋白的输出,进而影响了菌株的生长。

在应对不利的环境条件及维持群体稳态中,生物被膜发挥着至关重要的作用。研究发现 *tatD* 基因缺失后缺失株生物被膜生成量均高于野生株,其中, Δ *tatD13* 缺失株形成的生物被膜最多,

以上实验结果说明 *tatD* 基因参与了生物被膜形成的调控。生物被膜保护性取决于其胞外聚合物(EPS)的组成,由于不同细菌能够产生多种多样的 EPS。在这个复杂的过程中,胞外多糖和胞外蛋白差异显得尤为关键^[23]。与胞外多糖、蛋白不同,eDNA 是生物被膜网状分子结构的组成成分。本研究团队在上清液降解小牛胸腺 DNA 的实验中,分析野生株与缺失株对于 DNA 分子的降解能力,结果发现,*tatD* 基因的存在增强溶藻弧菌对于 DNA 分子的降解能力,同时对于金属离子的需求,与 DNase I 酶发挥作用时表现出了相似性。

eDNA 从细胞内部释放到胞外的方式之一就是自溶。在深入研究 *tatD* 基因时,发现 *tatD* DNases 参与多种微生物的程序性凋亡^[24-26],推测 *tatD* 可能参与了细菌自溶,从而释放 eDNA。对此,本研究开展了溶藻弧菌自溶性分析实验,结果表明,溶藻弧菌在缺失 *tatD* 基因后自身自溶活性受到了影响,自溶能力下降。*tatD* 基因参与了细菌自溶,但仍没有直接证据表明溶藻弧菌通过菌体自溶释放 eDNA 进而促进细菌生物被膜的形成。

4 结论

本研究通过构建 *tatD* 基因缺失菌株,初步探究了 *tatD* 基因在溶藻弧菌生长与生物被膜形成等方面的功能,结果表明,在正常营养条件下缺失 *tatD* 基因不会影响细菌的生长,在营养贫瘠的条件下,*tatD* 基因可能参与了细菌的生长调节。同时,*tatD* 基因也参与溶藻弧菌生物被膜形成与细菌自溶性的调节,缺失 *tatD* 基因,生物被膜形成量增加;自溶性下降。这些结果为研究 *tatD* 基因在弧菌致病

机制中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 赵伟, 王雷, 刘梅, 等. 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性和基因表达的影响 [J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1261–1270. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2017.16221>
- [2] Park M Y, Kim H J, Choi S T, et al. Pathogenic factors of *Vibrio* spp. isolated from seawater of gwangan beach in Busan [J]. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2002, 5(3): 178–182. <https://doi.org/10.5657/fas.2002.5.3.178>
- [3] Sakuma M, Nishikawa S, Inaba S, et al. Structure of the periplasmic domain of SflA involved in spatial regulation of the flagellar biogenesis of *Vibrio* reveals a TPR/SLR-like fold [J]. *The Journal of Biochemistry*, 2019, 166(2): 197–204. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz027>
- [4] Ono H, Takashima A, Hirata H, et al. The MinD homolog FlhG regulates the synthesis of the single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(1): 130–141. <https://doi.org/10.1111/mmi.13109>
- [5] Hormansdorfer S, Wentges H, Neugebauer-Buchler K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2000, 203(2): 169–175. [https://doi.org/10.1078/S1438-4639\(04\)70024-3](https://doi.org/10.1078/S1438-4639(04)70024-3)
- [6] Xie J S, Bu L F, Jin S, et al. Outbreak of vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China [J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735168>
- [7] Liang H Y, Xia L Q, Wu Z H, et al. Expression, purification and antibody preparation of flagellin *FlaA* from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901 [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(2): 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02768.x>
- [8] 权太淑, 李薇, 杨喜玲. 自腹泻患者中分离溶藻性弧菌及其病原性的探讨 [J]. *中国公共卫生*, 1985, 4(5): 15–18.
- [9] Balebona M C, Andreu M J, Bordas M A, et al. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4269–4275.
- [10] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 35(4): 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- [11] Battin T J, Kaplan L A, Denis Newbold J, et al. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms [J]. *Nature*, 2003, 426(6965): 439–442. <https://doi.org/10.1038/nature02152>
- [12] Jhelum H, Sori H, Sehgal D. A novel extracellular vesicle-associated endodeoxyribonuclease helps *Streptococcus pneumoniae* evade neutrophil extracellular traps and is required for full virulence [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7985. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25865-z>
- [13] Zhao Y X, Xiang X, Liu X P, et al. The biochemical characterization of a TatD nuclease from *Thermus thermophilus* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2024, 223: 106557. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106557>
- [14] Yu T, Sun Z, Cao X Y, et al. Identification and characterization of TatD DNase in planarian *Dugesia japonica* and its antibiofilm effect [J]. *Environmental Research*, 2024, 251: 118534. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118534>
- [15] Wexler M, Sargent F, Jack R L, et al. TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity: no requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(22): 16717–16722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000800200>
- [16] Chang Z G, Jiang N, Zhang Y Y, et al. The TatD-like DNase of *Plasmodium* is a virulence factor and a potential malaria vaccine candidate [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11537. <https://doi.org/10.1038/ncomms11537>
- [17] Nag S, Banerjee C, Goyal M, et al. *Plasmodium falciparum* Alba6 exhibits DNase activity and participates in stress response [J]. *iScience*, 2024, 27(4): 109467. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109467>
- [18] Chen L L, Shen D Y, Sun N N, et al. *Phytophthora sojae* TatD nuclease positively regulates sporulation and negatively regulates pathogenesis [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(10): 1070–1080. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0153-R>
- [19] Lovett S T. The DNA exonucleases of *Escherichia coli* [J]. *EcoSal Plus*, 2011, 4(2): 19–25. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.4.4.7>
- [20] Lee K Y, Cheon S H, Kim D G, et al. A structural study of TatD from *Staphylococcus aureus* elucidates a putative DNA-binding mode of a Mg²⁺-dependent nuclease [J]. *IUCrJ*, 2020, 7(3): 509–521. <https://doi.org/10.1107/S2052252520003917>
- [21] Matos C F R O, Di Cola A, Robinson C. TatD is a central component of a tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli* [J]. *Embo Reports*, 2009, 10(5): 474–479. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.34>
- [22] Lyu P C, Li H Q, Xue J Y, et al. Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44(2): 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.01.013>
- [23] Li J P, Chen Y X, Qi J, et al. Characterization of EPS subfractions from a mixed culture predominated by partial-denitrification functional bacteria [J]. *Water Re-*

- search X, 2024, 24: 100250. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2024.100250>
- [24] Wang Q, Liu Q, Ma Y, et al. LuxO controls extracellular protease, haemolytic activities and siderophore production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1525–1534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03380.x>
- [25] Bosedasgupta S, Das B B, Sengupta S, et al. The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2008, 15(10): 1629–1640. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.85>
- [26] Gannavaram S, Debrabant A. Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(5): 926–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07978.x>

Preliminary functional analysis of the *tatD* gene in *Vibriosis parahaemolyticus*

Ye Jiachengzi[#], Xie ZhenYu, Long Hao^{*}

(School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* is a common marine Gram-negative bacterium widely found in aquaculture environments. It exhibits strong infectivity and pathogenicity toward cultured fish, shellfish, and shrimp, causing significant economic losses in the aquaculture industry due to vibriosis. The *tatD* gene encodes a protein with nuclease activity, which is related to the formation of bacterial biofilms and the regulation of virulence. An attempt was made to investigate the role of *tatD* gene in the growth and biofilm formation of *V. alginolyticus* strain HN08155 by utilizing gene knockout technology. The results indicate that the strain HN08155 contains three *tatD* genes. Under normal nutrient conditions, the *tatD* gene does not affect bacterial growth, whereas it plays a regulatory role in bacterial growth under low-nutrient conditions. The extracellular *tatD* protein demonstrates nuclease activity, with the wild-type strain showing a greater capacity for DNA degradation in the culture supernatant compared to the *tatD* knockout strain. Induction with 0.1% Triton X-100 significantly increased the autolysis rate of the *tatD* knockout strain compared to the wild-type strain. Additionally, the absence of the *tatD* gene resulted in a significant increase in both the quantity and thickness of the biofilm formed by *V. alginolyticus*.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; *tatD* gene; gene knockout; bacterial biofilm; autolysis

(责任编辑:钟云芳)