

GFP 标记的迟缓爱德华菌感染诸氏鲮虾虎鱼后组织分布研究

余露军, 李建军, 魏远征, 蔡 磊, 苗宗余, 黄 韧

(广东省实验动物监测所 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663)

摘要: 为探讨迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)入侵途径, 建立感染模型, 作者通过电转化法构建 GFP 标记的迟缓爱德华菌 EtMc1512(质粒 PMDpp-EGFP), 实验设立浸泡组、腹腔注射组和肌肉注射组, 感染后采集各组实验诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)血液、鳃、肝脏、肠、肌肉, 培养法统计分析各组织中的荧光细菌数; 浸泡组取样时间为 0、2、4、6、8、12、24 h, 腹腔注射组和肌肉注射组取样时间为 6、12、24、48、72、96 h。结果显示, 构建的 EtMc1512-GFP 具有较强荧光, GFP 标记前后菌株毒力基因(*citC*、*mukF*、*esrB*、*katB*、*fimA*、*gadB*)检测结果均为阳性。浸泡感染后实验鱼各组织内的荧光菌随时间表现为先升后降的趋势, 最高菌量出现在肠道(2.51×10^6 CFU/g), 其次为鳃(4.19×10^4 CFU/g)、血液(1.65×10^4 CFU/g), 肠道荧光菌显著高于其他组织($P < 0.05$); 腹腔注射感染后肝脏(4.55×10^6 CFU/g)和血液(4.65×10^6 CFU/g)菌量最高; 肌肉注射感染后肌肉在 48h 首先检出荧光菌, 血液(2.93×10^4 CFU/g)菌量最高。结果表明, 肠道、肝脏和肌肉分别是迟缓爱德华菌浸泡感染、腹腔注射感染和肌肉注射感染诸氏鲮虾虎鱼的主要组织器官, 在自然条件下迟缓爱德华菌经口感染诸氏鲮虾虎鱼风险较高。

关键词: 诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*); 迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*); 绿色荧光蛋白; 入侵途径; 组织分布

中图分类号: S941.42 文献标识码: A
DOI: 10.11759/hyxx20180315001

文章编号: 1000-3096(2018)06-0057-06

迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)是水产养殖中重要的病原菌之一, 在世界范围内广泛分布, 能感染多种海、淡水鱼类, 给养殖业造成严重危害^[1]。同时, 迟缓爱德华菌具有广泛宿主范围, 可以感染包括人类在内的多种高等动物, 是一种人兽共患病病原^[2-3]。迟缓爱德华菌属于条件致病菌, 其致病作用受多种因子协调作用^[3-5], 且其胞内寄生的特点使其可逃避宿主免疫防御屏障, 为该病的治疗带来了困难, 因此其致病机理一直受到广泛关注。

诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)属于鲈形目(Perciformes)、虾虎鱼亚目(Gobioidei)、虾虎鱼科(Gobiidae)、鲮虾虎鱼属(*Mugilogobius*), 为暖水性小型海洋鱼类, 具有胚胎及早期仔鱼透明、体形小、繁殖量大等特点, 作为一种潜在的海洋模式鱼类, 具有良好的应用前景。迟缓爱德华菌是诸氏鲮虾虎鱼养殖过程中最为严重的病原之一, 可引起诸氏鲮虾虎鱼全身充血、肝脏部位溃烂穿孔等症状, 造成大量死亡。本研究通过浸泡、腹腔注射、肌肉注射 3 种不同方式进行感染试验, 探讨不同途径下迟缓爱德华菌感染诸氏鲮虾虎鱼的组织动态分布, 为迟缓爱

德华菌入侵机制和诸氏鲮虾虎鱼感染模型研究提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验鱼

实验鱼为本实验室培育的诸氏鲮虾虎鱼封闭群, 体长 2.5~3.0 cm, 养殖水温 26℃, 海水盐度 15‰, 每天早晚各投喂卤虫(*Artemia*)1 次, 每天更换 1/3 体积的养殖水。

1.2 EtMc1512-GFP 构建

迟缓爱德华菌为本实验室从诸氏鲮虾虎鱼分离

收稿日期: 2018-03-15; 修回日期: 2018-04-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05); 广东省科技计划项目(2017B030314171, 2017A070702001)

[Foundation: National Key Technology Support Program, No.2015BAI09B05; Science and Technology Program of Guangdong Province, No.2017B030314171, 2017A070702001]

作者简介: 余露军(1982-), 男, 湖南岳阳人, 工程师, 硕士, 主要从事水生实验动物微生物学研究, 电话 020-84106815, E-mail: ljyu1212@163.com; 黄韧, 通信作者, E-mail: labking@sohu.com

的菌株 EtMc1512。PMDpp-EGFP 质粒由中国水产科学研究院珠江水产研究所李凯彬研究员赠送, 通过电转化法将质粒转入菌株 EtMc1512^[6], 荧光显微镜下筛选阳性克隆。

1.3 EtMc1512-GFP 质粒稳定性检测

将 EtMc1512-GFP 接种于脑心浸液(BHI)液体培养基(含氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 24 h, 再将菌液按 1:1000(体积比)接种于不含氨苄青霉素的 BHI 液体培养基, 每 24 h 转接 1 次, 转接的同时将菌液按一定比例稀释后涂布于含氨苄青霉素的 BHI 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 荧光显微镜下观察菌落并计数。质粒稳定性=绿色荧光菌落数/总菌落数 \times 100%。

1.4 EtMc1512-GFP 毒力检测

EtMc1512 菌株接种于 BHI 液体培养基, EtMc1512-GFP 菌株接种于 BHI 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下振荡培养 24 h, 无菌生理盐水洗涤后重悬, 采用麦氏比浊法稀释到 1.5×10^5 、 3×10^4 、 6×10^3 、 1.2×10^3 、 2.4×10^2 CFU/mL 5 个浓度梯度, 腹腔注射诸氏鲮虾虎鱼, 每尾注射 0.02 mL, 对照组注射生理盐水, 每个浓度组注射 10 尾。试验期间不投喂, 连续观察 10 d, 统计各浓度组死亡数, spss17.0 计算 LD₅₀。参照江云等^[7]的方法对迟缓爱德华菌 6 个毒力基因(*citC*、*mukF*、*esrB*、*katB*、*fimA*、*gadB*)进行检测。

1.5 不同感染方式下迟缓爱德华菌在诸氏鲮虾虎鱼组织内的分布

1.5.1 浸泡感染

在水温 28 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度 15 条件下, 用 EtMc1512-

GFP(终浓度 1.0×10^7 CFU/mL)浸泡感染诸氏鲮虾虎鱼(共 30 尾), 浸泡 1 h 后洁净水冲洗 3 次, 转入洁净水中养殖。根据预实验结果, 24h 后各组织菌量均已下降至最小值, 故浸泡感染后分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 取实验鱼血液、鳃、肝脏、肠道、肌肉。血液从心脏部位采血, 鳃经无菌生理盐水冲洗 3 次除杂菌, 肝脏和肠道分别取全部肝脏和全肠, 肌肉取自背部两侧肌肉。每个时间点随机取 3 尾实验鱼的组织样品混合、称质量, 按每 0.01g 添加 100 μL 无菌生理盐水匀浆, 梯度稀释后涂布于 BHI 平板(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素), 每个样品设 3 个平行。28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 36 h 后, 在荧光显微镜下观察计数绿色菌落数量。采用 SPSS17.0 进行方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 表示差异显著, 试验结果以平均值 \pm 标准差表示。

1.5.2 腹腔注射和肌肉注射感染

新鲜培养的 EtMc1512-GFP 用生理盐水稀释至 2.1×10^3 CFU/mL, 分别腹腔注射和背部肌肉注射感染诸氏鲮虾虎鱼(0.02 mL/尾, 各 30 尾), 感染后置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度 15 的洁净水中养殖。根据预实验结果, 分别于感染后 6、12、24、48、72、96 h 取实验鱼血液、鳃、肝脏、肠、肌肉。取样、细菌培养、菌落观察计数以及数据分析方法同浸泡感染。

2 结果

2.1 EtMc1512-GFP 菌株观察

通过电转化法将 GFP 质粒转入 EtMc1512 菌株, 成功构建 EtMc1512-GFP 菌株, 在荧光显微镜下其单菌落和菌体呈较强的绿色荧光(图 1)。

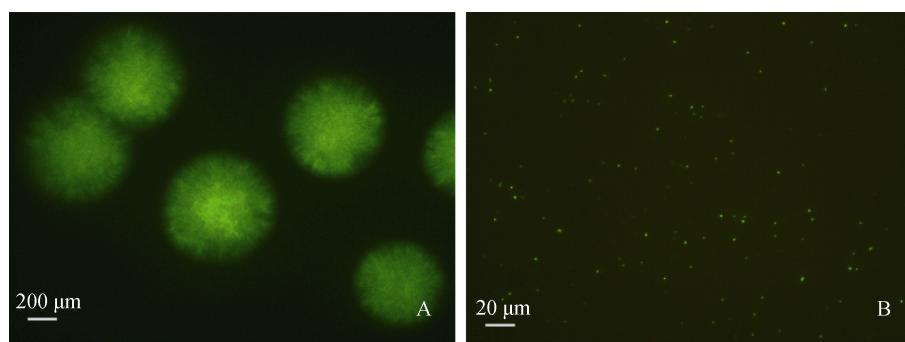


图 1 荧光显微镜下 EtMc1512-GFP 细菌形态观察

Fig. 1 Morphology of EtMc1512-GFP with fluorescent microscope

A. EtMc1512-GFP 菌落形态(40 \times); B. EtMc1512-GFP 细菌形态(400 \times)

A. Colonial morphology of EtMc1512-GFP(40 \times); B. Mycelial mophology of EtMc1512-GFP(400 \times)

2.2 EtMc1512-GFP 菌株稳定性

EtMc1512-GFP 菌株在 BHI 液体培养基中传代培养, 至第 16 代 GFP 质粒稳定性仍为 100%, 到第 20 代 GFP 质粒稳定性降为 82%(表 1)。

表 1 EtMc1512-GFP 菌株质粒稳定性检测结果
Tab. 1 Stability experiments of EtMc1512-GFP

传代数	稳定性/%	传代数	稳定性/%	传代数	稳定性/%
1	100	8	100	15	100
2	100	9	100	16	100
3	100	10	100	17	94
4	100	11	100	18	90
5	100	12	100	19	84
6	100	13	100	20	82
7	100	14	100		

2.3 EtMc1512-GFP 菌株对诸氏鲮虾虎鱼的毒力检测

腹腔注射感染条件下, EtMc1512-GFP 菌株对诸氏鲮虾虎鱼的半数致死量 LD₅₀ 为 21 CFU/尾, EtMc1512 野生株对诸氏鲮虾虎鱼的半数致死量 LD₅₀ 为 19 CFU/尾, 两者毒力无明显差别; 毒力基因

表 2 EtMc1512-GFP 菌株和 EtMc1512 野生株毒力检测
Tab. 2 Characteristics of the EtMc1512-GFP strain and the EtMc1512 native strain

菌株	半致死浓度/ (CFU/尾)	毒力基因					
		<i>citC</i>	<i>mukF</i>	<i>esrB</i>	<i>katB</i>	<i>fimA</i>	<i>gadB</i>
EtMc1512	1.9×10 ¹	+	+	+	+	+	+
EtMc1512-GFP	2.1×10 ¹	+	+	+	+	+	+

诸氏鲮虾虎鱼肌肉注射感染 EtMc1512-GFP 72 h 后, 鱼体注射部位可见红肿溃烂症状。不同组织细菌计数结果见图 4, 最高菌量为 72 h 的血液(2.93×10⁴ CFU/g), 其次为 72 h 的鳃(0.5×10⁴ CFU/g)、48 h 的肌肉(2.1×10³ CFU/g)、72 h 的肝(1.1×10³ CFU/g), 肠道未检出目标细菌。不同组织最高菌量排序为: 血液>鳃>肌肉>肝>肠道, 各组织检出目标细菌的时间顺序为: 肌肉(48 h)>血液=鳃=肝(72 h)。

3 讨论

GFP 荧光标记技术是研究病原入侵途径的理想方法, 与传统微生物分离^[8]、同位素标记^[9]、扫描电镜^[10]及荧光定量 PCR^[11]等方法相比, 该方法能有效排除其他细菌和死亡细菌的干扰, 只需简单的技术操作即可直观观察和辨别细菌在宿主体内的感染和

检测结果显示, EtMc1512-GFP 菌株和 EtMc1512 野生株 6 个毒力基因检测结果均为阳性(表 2)。

2.4 EtMc1512-GFP 感染诸氏鲮虾虎鱼的组织分布

诸氏鲮虾虎鱼浸泡感染 EtMc1512-GFP 后不同组织细菌计数结果见图 2, 各组织菌量随时间表现为先升后降的趋势。肠道最高菌量出现在第 6 小时(2.51×10⁶ CFU/g), 鳃组织最高菌量出现在第 4 小时(4.19×10⁴ CFU/g), 血液最高菌量出现在第 12 小时(1.65×10⁴ CFU/g), 肝和肌肉菌量极低, 肠道菌量显著高于其他组织(P<0.05)。不同组织最高菌量排序为: 肠道>鳃>血液>肝>肌肉。

诸氏鲮虾虎鱼腹腔注射感染 EtMc1512-GFP 72 h 后, 鱼体腹部可见明显红肿症状, 严重者肝脏部位溃烂穿孔。不同组织细菌计数结果见图 3, 各组织最高菌量均出现在第 96 小时, 不同组织最高菌量排序为: 血液(4.65×10⁶ CFU/g)>肝(4.55×10⁶ CFU/g)>肌肉(3.44×10⁶ CFU/g)>肠道(1.70×10⁶ CFU/g)>鳃(0.66×10⁶ CFU/g)。腹腔注射感染后血液和肝最先检出目标细菌(12 h), 其次为鳃(48 h), 最后为肠道和肌肉(72 h), 血液菌量远高于同时间点其他组织菌量(P<0.05)。

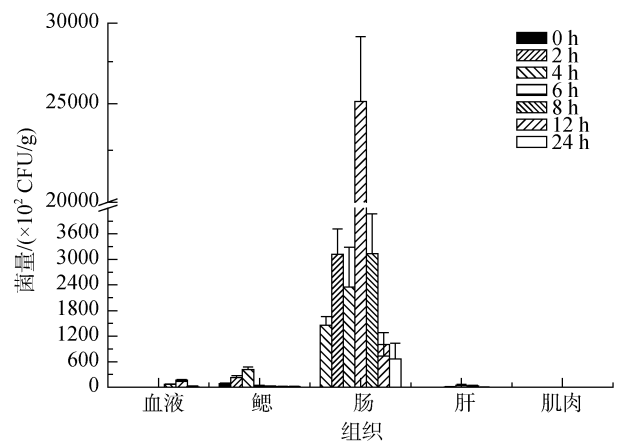


图 2 浸泡感染后不同时间诸氏鲮虾虎鱼各组织中的 EtMc1512-GFP 菌量

Fig. 2 The number of EtMc1512-GFP in *M. chulae* tissue samples after immersion challenge

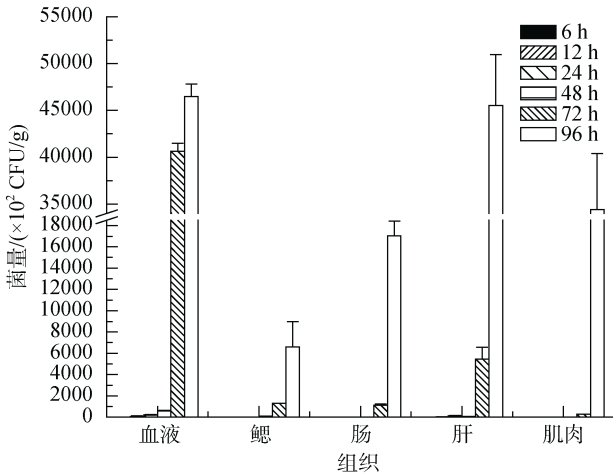


图3 腹腔注射感染后不同时间诸氏鲮虾虎鱼各组织中的 EtMc1512-GFP 菌量

Fig. 3 The number of EtMc1512-GFP in *M. chulae* tissue samples after intraperitoneal challenge

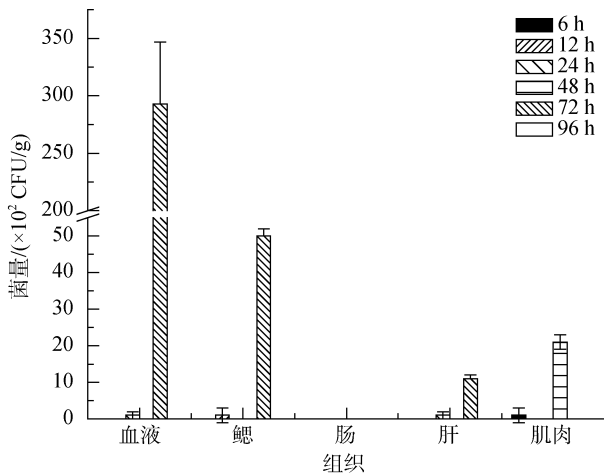


图4 肌肉注射感染后不同时间诸氏鲮虾虎鱼各组织中的 EtMc1512-GFP 菌量

Fig. 4 The number of EtMc1512-GFP in *M. chulae* tissue samples after intramuscular challenge

转移过程。近年,已有较多鱼类病原成功应用该方法开展相关研究^[12-13]。本研究 GFP 荧光标记的迟缓爱德华菌荧光信号强,且具有氨苄青霉素抗性,通过简单的培养操作即可监测病原在诸氏鲮虾虎鱼体内各组织的分布,进一步证明利用荧光标记的病原菌是研究其感染动力学行之有效的方法。值得注意的是, GFP 荧光标记的菌株质粒稳定性是其应用的重要基础。Wang 等^[14]荧光标记的迟缓爱德华菌 SM 菌株(pFPV25.1 质粒)传代 7 次质粒稳定性为 100%,而杜以帅等^[15]构建的杀鲑气单胞菌绿色荧光蛋白 C4 菌株(pGFPuv 质粒)传代至第 7 代质粒稳定性开始下

降(95%),李静等^[16]构建的嗜水气单胞菌绿色荧光蛋白 AhJ-1 强毒株(pWSK129 质粒)传代至第 10 代质粒稳定性急剧下降,弱毒株 Ah4332 株传代至 70 代质粒依然稳定,表明菌种或菌株、质粒、转化方式均可能对质粒稳定性产生影响。本研究通过电转化构建的 EtMc1512-GFP 菌株,连续传代至 16 代质粒稳定性仍可达 100%,且其毒性与野生株基本保持一致,能很好地应用于急、慢性感染动力学研究。

鱼类的鳃和皮肤直接接触水环境,易受到病原的侵袭,大量研究证实鱼类鳃和受损伤的皮肤是细菌入侵的主要部位^[17-18]。Rekecki 等^[19]研究表明,在浸泡感染条件下鳃弧菌首先在欧洲鲈鱼肠道中黏附,透射电镜显示肠道为主要感染部位;Otoole 等^[20]利用鳃弧菌浸泡感染斑马鱼,发现肠道和体表是其主要感染部位;Ling 等^[21]、Farto 等^[22]研究结果也显示,鳃、体表皮肤和肠道是病原菌感染鱼类的主要部位。而在本实验中,迟缓爱德华菌浸泡感染诸氏鲮虾虎鱼后,肠道菌量显著高于鳃组织菌量(100 倍)。与淡水鱼类相比,诸氏鲮虾虎鱼肠道含菌量较高,这可能与海水鱼需要“饮水”来维持渗透压平衡^[23],从而经口吞入大量水环境中的细菌有关。本研究结果表明,经口感染是迟缓爱德华菌入侵诸氏鲮虾虎鱼的重要途径,诸氏鲮虾虎鱼肠道可作为迟缓爱德华菌浸泡感染模型重要评价部位。在诸氏鲮虾虎鱼养殖过程中,水环境中的病原菌经口感染风险较高,需要严格加以控制。

在感染模型研究中,注射部位、注射剂量都是决定宿主细菌感染的重要因素^[24],因此病原与宿主间的相互作用机制、宿主适应性免疫反应等研究常采用肌肉和腹腔注射感染方式。在本试验中,肌肉注射和腹腔注射感染后血液中的含菌量较高,与鳃鱼腹腔注射感染布鲁氏耶尔森氏菌 YRNC10-gfp 结果一致^[25];且感染后可引起诸氏鲮虾虎鱼全身红肿、出血症状,与迟缓爱德华菌出血性败血症特征相符^[26]。诸氏鲮虾虎鱼腹腔注射感染后,肝脏和血液最先检出病原,且菌量最高,表明肝脏是诸氏鲮虾虎鱼腹腔感染模型重要评价部位,而血液可能是迟缓爱德华菌在诸氏鲮虾虎鱼体内传播的重要媒介。

参考文献:

[1] Park S B, Aoki T, Jung T S, et al. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 67.

- [2] Xie H X, Lu J, Zhou Y, et al. Identification and functional characterization of the novel *Edwardsiella tarda* effector EseJ[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(4): 1650-1660.
- [3] Gao D, Li Y, Xu Z, et al. The role of regulator Eha in *Edwardsiella tarda* pathogenesis and virulence gene transcription[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 95: 216-223.
- [4] Xu T, Zhang X. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2014, 431: 129-135.
- [5] Castro N, Osorio C R, Bujan N, et al. Insights into the virulence-related genes of *Edwardsiella tarda* isolated from turbot in Europe: genetic homogeneity and evidence for vibrioferrin production[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(5): 565-576.
- [6] 李宁求, 余露军, 付小哲, 等. 鳎源迟缓爱德华氏菌菌蜕的构建及制备条件优化[J]. *水产学报*, 2012, 36(11): 1754-1762.
Li Ningqiu, Yu Lujun, Fu Xiaozhe, et al. Construction of *Edwardsiella tarda* ghosts from eel and their optimization of preparation conditions[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(11): 1754-1762.
- [7] 江云, 李寿崧, 王寿昆, 等. 致病性迟钝爱德华氏菌毒力基因的 PCR 检测[J]. *中国食品学报*, 2008, 4: 123-129.
Jiang Yun, Li Shousong, Wang Shoukun, et al. Detection of the virulence genes of pathogenic *Edwardsiella tarda* by PCR assay[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 4: 123-129.
- [8] Amaro C, Biosca E G, Fouz B, et al. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 infections to eels[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1133-1137.
- [9] Svendsen Y S, Dalmo R A, Bogwald J, et al. Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmosalar L.*, following experimental challenge[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, 22(2): 125-131.
- [10] 苏友禄, 冯娟, 郭志勋, 等. 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种感染卵形鲳鲹的病理学观察[J]. *海洋科学*, 2012, 36(2): 75-81.
Su Youlu, Feng Juan, Guo Zhixun, et al. Histopathological analysis of golden pompano *Trachinotus ovatus* infected with *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(2): 75-81.
- [11] 闫云锋, 苏友禄, 郭志勋, 等. 鱼类神经坏死病毒对军曹鱼仔鱼的致病性[J]. *海洋科学*, 2010, 34(4): 6-10.
Yan Yunfeng, Su Youlu, Guo Zhixun, et al. The research on pathogenicity of fish nervous necrosis virus to *Rachycentron canadum* juvenile[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(4): 6-10.
- [12] Liu Y J, Lu C P. Role of *Ichthyophthirius multifiliis* in the Infection of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 2004, 51(5): 222-224.
- [13] Harmache A, Leberre M, Droineau S, et al. Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for *Novirhabdo* virus[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3655-3659.
- [14] Wang X P, Yan M C, Hu W L, et al. Visualization of *Sparus macrocephalus* infection by GFP-labeled *Edwardsiella tarda*[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2012, 64(7): 1-7.
- [15] 杜以帅, 张丽娜, 马晓娜, 等. 绿色荧光蛋白标记嗜水气单胞菌的构建及其初步应用[J]. *海洋科学*, 2016, 40(12): 30-35.
Du Yishuai, Zhang Lina, Ma Xiaona, et al. Construction and application of green fluorescent protein for *Aeromonas salmonicida* strain[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(12): 30-35.
- [16] 李静, 张晓露, 刘永杰, 等. 绿色荧光蛋白基因标记嗜水气单胞菌的研究[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(3): 1-4.
Li Jing, Zhang Xiaolu, Liu Yongjie, et al. Genetically marking of *Aeromonas hydrophila* strains with green fluorescent proteingene[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 41(3): 1-4.
- [17] Chu Weihua, Lu Chengping. In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker[J]. *Aquaculture*, 2008, 277: 152-155.
- [18] 陆春云, 谢骏, 习丙文, 等. 嗜水气单胞菌在浸泡感染团头鲂的组织动态分布[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 1068-1074.
Lu Chunyun, Xie Jun, Xi Bingwen, et al. Infection kinetics of *Aeromonas hydrophila* in the blunt-snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1068-1074.
- [19] Rekecki A, Gunasekara R, Dierckens K, et al. Bacterial host interaction of GFP-labelled *Vibrio anguillarum* HI-610 with gnotobiotic sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), larvae[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(4): 265-273.
- [20] Otoole R, Von Hofsten J, Rosqvist R, et al. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 37(1): 41-46.
- [21] Ling S H, Wang X H, Lim T M, et al. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2001, 194(2): 239-243.
- [22] Farto R, Milton D L, Bermudez M B, et al. Colonization

- of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains during infection[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 95(2): 167-173.
- [23] Guo Z, Gao N, Wu Y, et al. The simultaneous uptake of dietary and waterborne Cd in gastrointestinal tracts of marine yellowstripe goby *Mugilogobius chulae*[J]. Environmental Pollution, 2017, 223: 31-41.
- [24] Li Y, Hu B. Establishment of multi-site infection model in zebrafish Larvae for studying *Staphylococcus aureus* infectious disease[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39(9): 521-534.
- [25] Welch T J, Wiens G D. Construction of a virulent, green fluorescent protein-tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2005, 67(3): 267-272.
- [26] Rao P S, Lim T M, Leung K Y, et al. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(3): 1343-1351.

Infection kinetics of GFP-Labeled *Edwardsiella tarda* in *Mugilogobius chulae*

YU Lu-jun, LI Jian-jun, WEI Yuan-zheng, CAI Lei, MIAO Zong-yu, HUANG Ren

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute; Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Received: Mar. 15, 2018

Key words: *Mugilogobius chulae*; *Edwardsiella tarda*; green fluorescent protein (GFP); invasion pathway; tissue distribution

Abstract: *Edwardsiella tarda* is an important fish pathogen that causes septicemia in many marine and freshwater fish. In order to study the invasion pathway of *E. tarda* in *Mugilogobius chulae* and provide basic data on pathogenesis of *E. tarda*. The infection kinetics of *E. tarda* were investigated in vivo in *M. chulae* using a virulent strain, *E. tarda* EtMc1512, that was transformed with a plasmid encoding green fluorescent protein (PMDpp-EGFP) by electroporation. Fish were divided into three groups: bacteria bath-challenged fish, bacteria intraperitoneally-challenged fish, bacteria intramuscularly-challenged fish. The number of bacteria from blood, gills, liver, intestine and muscle were detected at 0, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h after immersion challenge, which were also detected at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after intraperitoneal and intramuscular challenge. The results showed that EtMc1512-GFP strain had the similar virulence characteristics as the parent strain and could be easily identified as bright green fluorescing colonies. The virulence-related genes (*citC*, *mukF*, *esrB*, *katB*, *fimA*, *gadB*) have been detected simultaneity in strain EtMc1512 and EtMc1512-GFP. High numbers of bacteria were observed in the intestine (2.51×10^6 CFU/g), followed by the gills (4.19×10^4 CFU/g) and blood (1.65×10^4 CFU/g) of fish after immersion challenge. The number of bacteria was significantly higher in the intestine than other tissues ($P < 0.05$). The highest numbers of bacteria were observed in the blood (4.65×10^6 CFU/g) and liver (4.55×10^6 CFU/g) of fish after intraperitoneal challenge. Bacteria was first detected in muscle (48 h) and the highest numbers of bacteria were observed in the blood (2.93×10^4 CFU/g) of fish after intramuscular challenge. These results indicate that the intestine, liver and muscle serve as an important infectious route of *E. tarda* in *M. chulae* after immersion, intraperitoneal and intramuscular challenge respectively. It would be high infection risk through the ingestion of contaminated food and water for *M. chulae* under natural conditions.

(本文编辑: 谭雪静)