

刘 春,陈晓虹,姜 兰,等. 鲷爱德华氏菌的红色荧光蛋白标记及其应用[J].江苏农业学报,2019,35(3):661-666.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.022

鲷爱德华氏菌的红色荧光蛋白标记及其应用

刘 春¹, 陈晓虹¹, 姜 兰¹, 曹际振^{1,2}, 李凯彬¹, 王英英¹, 常藕琴¹, 王 芳¹,
石存斌¹, 林明辉¹, 王 庆¹

(1.中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业部渔药创制重点实验室/广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380; 2.华南农业大学,广东 广州 510642)

摘要: 为研究鲷爱德华氏菌与宿主的相互作用关系,本研究构建带有红色荧光蛋白基因的 pMDmCherry 表达载体,通过电击转化法将载体成功导入鲷爱德华氏菌 zbl141 菌株中,获得了红色荧光蛋白标记的鲷爱德华氏菌菌株。在倒置荧光显微镜下观察,重组鲷爱德华氏菌显示特异性红色荧光。稳定性检测结果表明,标记菌株传至 28 代,重组质粒稳定率仍为 100%。用标记菌株感染斑马鱼仔鱼后,能在激光共聚焦显微镜下实时观察到细菌在鱼体内的分布情况;标记菌株体外感染小鼠巨噬细胞后,也能观察到病原菌与巨噬细胞的相互作用情况。说明标记菌株具有良好的特异性和可视性,为鲷爱德华氏菌对宿主的致病性研究提供了一种良好的生物材料。

关键词: 鲷爱德华氏菌; 红色荧光蛋白; 斑马鱼; 巨噬细胞

中图分类号: S917.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)03-0661-06

Construction and application of *Edwardsiella ictaluri* strain labelled with mCherry fluorescent protein

LIU Chun¹, CHEN Xiao-hong¹, JIANG Lan¹, CAO Ji-zhen^{1,2}, LI Kai-bin¹, WANG Ying-ying¹,
CHANG Ou-qin¹, WANG Fang¹, SHI Cun-bin¹, LIN Ming-hui¹, WANG qing¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/ Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture/ Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510380, China; 2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To study the interaction between *Edwardsiella ictaluri* and its host, the pMDmCherry expression vector with mCherry fluorescent protein was constructed and transformed into *E. ictaluri* zbl141 strain by electroporation, and the recombinant *E. ictaluri* was obtained. The specific mCherry fluorescent could be observed in recombinant *E. ictaluri* under inverted fluorescence microscope. The results showed that the stability rate of recombinant plasmid was still 100% when the labelled strain was transferred to the 28th generation. The distribution of bacteria in zebrafish larva infected by the labelled

strain could be observed in real time by confocal laser microscopy. After the mouse macrophages was infected by labelled strain *in vitro*, the interaction between pathogens and macrophages could be observed clearly. These results suggest that mCherry-labelled bacteria possess specificity and visibility, providing useful biological material for study of pathogenicity between *E. ictaluri* and the host.

Key words: *Edwardsiella ictaluri*; mCherry fluorescent protein; zebrafish; macrophages

收稿日期:2018-09-27

基金项目:中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2017HY-ZC0406);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46);广东省科技计划项目(2016A030303028,2017A040403008)

作者简介:刘 春(1982-),男,重庆九龙坡人,硕士,助理研究员,主要从事水产动物病害防治研究。(E-mail)lc5173483@163.com

通讯作者:王 庆,(E-mail)sunny_929@163.com

鮠爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*) 隶属肠杆菌科、爱德华氏菌属,是一种兼性的胞内寄生菌,可感染斑点叉尾鮰等多种名特鱼类^[1]。鱼体感染后表现为内脏器官的充血、出血、炎症、变性和坏死,严重的在头部形成开放性的溃疡灶^[2]。自 1979 年, Hawke 首次报道鮠爱德华氏菌感染斑点叉尾鮰以来,该细菌在世界各地迅速蔓延,目前已在澳大利亚、泰国、越南、日本、中国等相继发现鮠爱德华氏菌感染鱼类发病,感染对象包括南方大口鲶、斑点叉尾鮰、黄颡鱼、长吻鮠、鳊鱼和虹鳟等,发病率和死亡率均较高,严重影响水产养殖业的发展^[3-6]。为了有效地预防和控制鮠爱德华氏菌病的发生与传播,研究鮠爱德华氏菌对宿主的致病性及感染途径,深刻认识其致病机理显得尤为重要。

荧光蛋白是部分生物体产生的在特定波长光照射下可激发对应颜色荧光的蛋白质。荧光蛋白激发的荧光具有检测灵敏度高、特异性强和细胞毒性小等优点^[7],大量研究结果显示,荧光蛋白是理想的荧光标记物,利用荧光蛋白标记病原菌,对其进行定位和示踪,可实现细菌在体内的实时监测,研究病原菌入侵的动态过程^[8]。目前在水产养殖领域,已有相关用荧光蛋白标记迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)等致病菌及其对宿主的侵染途径的研究报道^[9-11]。

本研究从患病斑马鱼体内分离出 1 株高致病性的鮠爱德华氏菌,构建带有 *mCherry* 基因的 pMD *mCherry* 载体,通过电击转化到鮠爱德华氏菌中。进一步将 *mCherry* 基因标记的鮠爱德华氏菌感染斑马鱼仔鱼和小鼠巨噬细胞 RAW264.7,利用激光共聚焦显微镜观察标记细菌在鱼体内的扩散分布情况及标记细菌与体外巨噬细胞的相互作用关系。本研究为 *mCherry* 标签进行细菌标记使菌落观察更具可视性和特异性提供数据支持,也为鮠爱德华氏菌对宿主的致病性及感染途径研究提供更加便捷、可行的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鮠爱德华氏菌菌株 zbl141 由本实验室分离保存,含启动子的质粒 PRUAL 和含红色荧光蛋白基因的质粒 pLVX-PAmCherry-C1 由本实验室保存。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自广州市哈蓝生物科技

有限公司,胎牛血清和 DMEM 培养基均购自美国 Gibco 公司,间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)、1-苯基-2-硫脲为 Sigma 公司产品,大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。胶回收试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、DNA Taq 酶、dNTP、DNA 分子 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品,Plasmid Mini Kit I 为 Omega 公司产品,基因组提取试剂盒(细菌)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 重组表达质粒 pMDmCherry 的构建

1.2.1 启动子和 *mCherry* 连接片段的扩增 根据启动子和 *mCherry* 基因序列,利用 Primer5.0 软件设计 2 对扩增引物,由上海生工生物工程有限公司合成。用于扩增启动子基因的上游引物为 PPS:5'-CGC-CTAGGATACGCACACCGTGGAAAC-3',下游引物为 PPA:5'-CCTTGCTCACCATTCTTCCTCCA-3';扩增 *mCherry* 基因的上游引物为 MCS:5'-AG-GAAGAAAAATGGTGAGCAAGGGTGA-3',下游引物为 MCA:5'-GCGTTCGAATTACTACTTGTACAGC-T-3'。

以质粒 PRUAL 为模板,PPS/PPA 为引物,按照常规 PCR 方法扩增启动子基因序列,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以质粒 pLVX-PAmCherry-C1 为模板,MCS/MCA 为引物,PCR 扩增 *mCherry* 基因序列。琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物。

采用融合 PCR 方法,由于设计时 PPA 和 MCS 引物有一段重复序列,因而 PCR 扩增的启动子和 *mCherry* 基因就含有互补片段。以纯化的启动子和 *mCherry* 产物 1:1 混合作为模板,常规 PCR 方法不加引物扩增 10 个循环,结束后直接添加 PPS、MCA 作为上下游引物,PCR 方法扩增 30 个循环。琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒连接、转化与鉴定 将方法 1.2.1 纯化回收的启动子和 *mCherry* 连接片段与 pMD18-T Vector 克隆载体(TaKaRa)16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 h 后,转化至 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性单菌落,送至上海生工生物工程有限公司测序确认,构建好的 pMDmCherry 质粒保存备用。

1.3 重组鮠爱德华氏菌的构建

参照杜以帅等^[9]的方法制备鮠爱德华氏菌电转感受态细胞。分别取 100 ng 构建的 pMDmCherry

质粒和 70 μl 鲷爱德华氏菌感受态细胞于预冷的 1 mm 电转杯中混匀,在 2.1 kV、25 μF 、400 Ω 条件下,快速电脉冲,脉冲时间为 5 ms。电击结束后加入 1 ml BHI 培养液,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 100 r/min 条件下振荡培养 3 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min,弃掉 800 μl 上清液,重悬细菌沉淀,取 200 μl 转化产物涂布于含羧苄青霉素(Amp)抗性的 BHI 琼脂平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

1.4 *mCherry* 标记的鲷爱德华氏菌的筛选与鉴定

1.4.1 荧光检测 取 20 μl 的阳性克隆菌液均匀涂布在载玻片上,用 TI-S 荧光显微镜(Nikon,日本)下观察,同时以野生菌株作为阴性对照,挑选能发出强烈红色荧光信号的菌株。

1.4.2 PCR 鉴定 挑取发红色荧光的菌株,用引物 MCS/MCA 进行 PCR 扩增,反应条件同方法 1.2.1,PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳回收后测序确认。

1.4.3 质粒稳定性试验 参照李静等^[10]的方法并改进,将标记好的细菌在含有 Amp 的 BHI 中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,接种量为 1/1 000(体积比),每 24 h 转接 1 次。同时取 200 μl 涂布于含 Amp 抗性的 BHI 琼脂平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,分别挑取单菌落在荧光显微镜下检测,记录荧光数。质粒稳定率=发红色荧光菌落数/总菌落数 \times 100%。

1.5 标记的鲷爱德华氏菌在感染斑马鱼仔鱼体内的动态分布检测

健康的雌性斑马鱼与雄性斑马鱼进行交配,收集所产的受精卵。受精后 12 h 的受精卵用 0.20 mmol/L 的 1-苯基-2-硫脲浸泡,抑制黑色素生成。取刚孵化出膜的仔鱼,经 0.02% MS-222 麻醉后,显微注射标记鲷爱德华氏菌菌液(1×10^8 CFU/ml),控制显微注射液滴大小使注射体积为 1 nl(即每尾仔鱼 100 CFU),分别在感染后 0 h、12 h、24 h 用激光共聚焦显微镜观察标记细菌在鱼体内的动态分布情况,另外设一个未感染组作为阴性对照。

1.6 标记鲷爱德华氏菌与小鼠巨噬细胞体外的相互作用

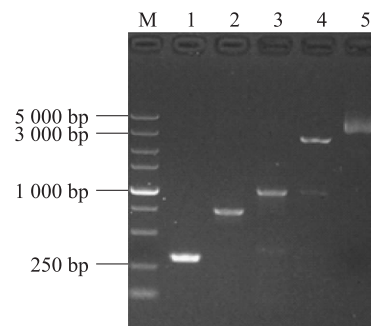
RAW264.7 传代至 8 孔腔室载玻片中,每孔加入 300 μl 新鲜 DMEM 细胞培养液(含 10% 胎牛血清),在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 20 h。为了便于观察,细胞贴壁 50% 左右时,加入 30 μl 经麦氏比浊法稀释的标记鲷爱德华氏菌,终浓度为 1×10^3 CFU/ml,侵染时间分别为 0 h、4 h、24 h、48 h、72 h。

侵染完成后用 FluoView FV1200 激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Japan)进行观察,另外设一个未感染组作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒 pMD*mCherry* 的构建

以质粒 PRUAL 为模板,用特异性引物扩增启动子基因,长度约 300 bp(图 1)。以质粒 pLVX-PAm*mCherry*-C1 为模板,用特异性引物扩增 *mCherry* 基因,长度约 700 bp;2 个片段连接扩增长度为 1 000 bp 左右(图 1)。连接片段克隆至质粒 pMD18-T,重组质粒双酶切后,切出大小约为 1 000 bp 和 2 700 bp 2 条 DNA 片段,分别与 pMD18-T 和连接片段基因大小一致(图 1)。测序结果也显示连接片段碱基没有发生任何突变,即成功构建重组质粒 pMD*mCherry*,构建图谱见图 2。



M:DL5000 DNA marker;1:启动子基因;2:*mCherry* 基因;3:启动子和 *mCherry* 基因连接片段;4:酶切验证;5:pMD*mCherry* 质粒。

图 1 启动子、*mCherry* 基因 PCR 扩增及重组表达质粒 pMD*mCherry* 的构建

Fig.1 PCR amplification of promoter and *mCherry* and construction of plasmid pMD*mCherry*

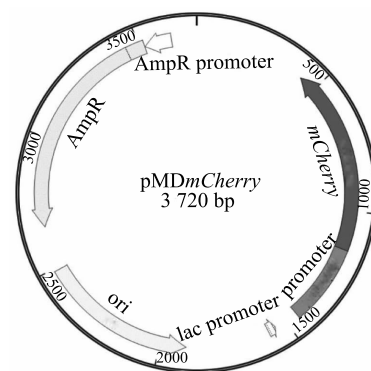
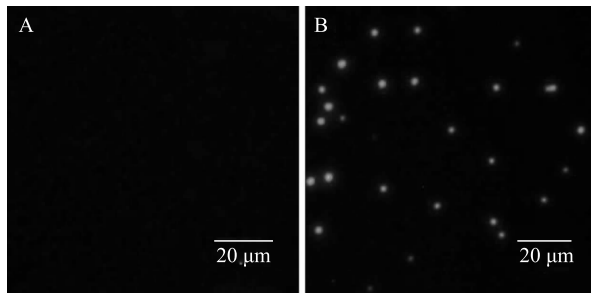


图 2 重组载体 pMD*mCherry* 的构建图谱

Fig.2 Construction of recombinat vector pMD*mCherry*

2.2 *mCherry* 标记的鮡爱德华氏菌的筛选与鉴定

阳性克隆菌用荧光显微镜观察,筛选出了稳定高效表达红色荧光蛋白的菌株(图 3)。以筛选出的重组菌株为模板,用引物 MCS/MCA 进行 PCR 扩增,获得 700 bp 左右的片段,经过测序确认为 *mCherry* 基因片段;目前标记菌株已传至 28 代,所有菌落均发红色荧光,质粒稳定率可达 100%。这些结果表明,重组质粒能够在鮡爱德华氏菌中稳定表达,红色荧光标记鮡爱德华氏菌构建成功。



A: 荧光视野下野生菌株;B: 荧光视野下重组菌株。

图 3 野生和重组鮡爱德华氏菌的荧光显微镜观察

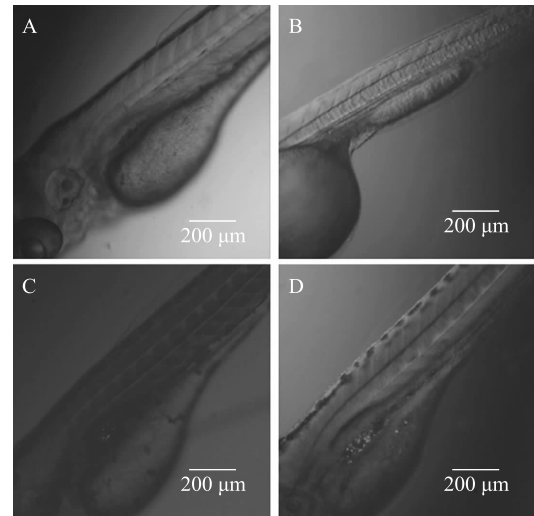
Fig.3 Appearance of wild strain and recombinant *Edwardsiella ictaluri* strain seen under the fluorescent microscope

2.3 标记鮡爱德华氏菌在感染斑马鱼仔鱼体内的动态分布

标记鮡爱德华氏菌显微注射感染斑马鱼仔鱼后,在感染部位及附近血管中呈现红色荧光(图 4B);感染 12 h,红色荧光增多,出现在仔鱼内脏部位(图 4C);感染 24 h,在内脏、肌肉及血液中都有大量红色荧光出现(图 4D)。阴性对照组无荧光(图 4A)。

2.4 标记鮡爱德华氏菌与小鼠巨噬细胞在体外的相互作用

激光共聚焦显微镜观察发现,阴性对照组巨噬细胞贴壁生长,细胞形态呈较规则的圆形或椭圆形(图 5A);感染 0 h 观察到红色标记细菌游离在培养基中,少量贴壁细胞开始变形,出现梭形细胞和多角形(图 5B);感染 4 h,游离红色标记细菌聚集增多,少量巨噬细胞开始吞噬标记细菌(图 5C);感染 24 h 游离标记细菌大量增加,部分巨噬细胞吞噬病原菌(图 5D);感染 48 h,游离标记细菌减少,巨噬细胞内标记细菌大量增殖,有少量细胞破裂死亡(图 5E);感染 72 h,标记细菌明显减少,巨噬细胞大

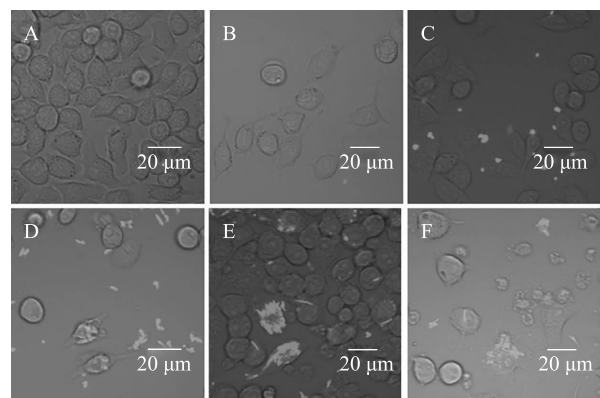


A: 未感染的斑马鱼;B: 感染后 0 h;C: 感染后 12 h;D: 感染后 24 h。

图 4 红色荧光标记鮡爱德华氏菌在斑马鱼仔鱼体内的动态分布

Fig.4 Dynamic distribution of labelled *E. ictaluri* in infected zebrafish larva

量脱落死亡(图 5F)。



A: 未感染的巨噬细胞;B: 感染巨噬细胞后 0 h;C: 感染后 4 h;D: 感染后 24 h;E: 感染后 48 h;F: 感染后 72 h。

图 5 共聚焦显微镜下红色荧光标记鮡爱德华氏菌感染 RAW 264.7 的过程

Fig.5 The process of labelled *E. ictaluri* infecting RAW 264.7 observed by laser scanning confocal microscope

3 讨论

应用现代生物技术对病原进行标记,观察病原侵染轨迹,是研究病原致病过程,了解病原宿主相互作用机理的有效手段^[12]。本研究目的是探讨鮡爱

德华氏菌在宿主体内的动态变化,研究病原菌与宿主的相互作用关系。为了跟踪病原菌活体状态下的致病过程,就需要选择一种既稳定又可靠的标记物。mCherry 是一种来自于蘑菇珊瑚的红色荧光蛋白,相对于其他荧光蛋白,mCherry 具有对光致漂白作用耐受、荧光亮度高、光稳定性卓越、可与绿色荧光蛋白共同标记研究对象等诸多优点,因而得到广泛的应用^[13-15]。本研究利用电转化法将红色荧光蛋白基因 *mCherry* 导入 *zbl141* 菌株,得到的转化菌株保持了和野生型相似的菌落形态,插入基因能稳定遗传,能使 mCherry 蛋白在入侵巨噬细胞及宿主的菌株中表现出高强度表达,使鲷爱德华氏菌致病机理的相关研究变得更加便捷。

合适的质粒载体和启动子是决定 *mCherry* 重组质粒能否在鲷爱德华氏菌中高效稳定表达的关键因素。pMD18-T 是一种广泛应用于高效克隆 PCR 产物的专用载体,这种载体拷贝数高,分子量较小,易于转化,但其自身不带启动子。启动子活性高低在很大程度上影响外源蛋白质的表达,研究结果表明庆大霉素抗性启动子 (Gentamycin-resistance promoter) 能高效启动 GFP 在诺卡氏菌 (*Nocardia brasiliensis*) 中的表达^[16-17]。本试验中使用 pMD18-T 作为载体,利用庆大霉素抗性启动子融合 *mCherry* 基因构建重组表达质粒,转化至鲷爱德华氏菌中。荧光检测结果表明,构建的质粒能在鲷爱德华氏菌中高效表达,且多次传代后,标记细菌依然能够发出较强的红色荧光。

传统的研究病原菌在动物体内侵染的动力学方法,主要是通过病原菌感染动物后,用平板培养活菌计数测定不同器官中病原菌含量,这是一种间接的方法,不能直观反映病原菌的入侵情况,试验动物间个体差异也会影响试验结果的准确性^[9];放射性标记的方法可以定量检测细菌,但是放射性物质对生物体有毒性,且这种方法也不能区分死亡的和活的细菌^[18]。本研究中利用构建的红色荧光标记鲷爱德华氏菌后,通过显微注射感染斑马鱼仔鱼,由于斑马鱼仔鱼身体是透明的,在激光共聚焦显微镜下借助绿色激光,可清晰观察到斑马鱼体内的红色标记细菌,在不处死动物的情况下可对鱼体内病原菌的变化进行连续观察,在同一动物身上能获得一系列的动态试验数据,更为直观、综合地了解整个感染过程,提高研究的效率。

巨噬细胞是天然免疫应答的主要效应细胞,可以有效吞噬和消化外来物质,它是机体抵御外来微生物侵袭的第一道防线^[19-20]。有研究报道鲷爱德华氏菌是一种兼性细胞内寄生菌,它可以在斑点叉尾鲷和南方鲷等鱼类宿主巨噬细胞中生存、繁殖^[6,21],因而了解鲷爱德华氏菌与巨噬细胞的相互作用关系,特别是研究鲷爱德华氏菌在巨噬细胞内入侵、存活及繁殖机制是研究鲷爱德华氏菌致病性的关键。马慧等^[22]将布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*) 体外感染小鼠巨噬细胞后,利用绿色荧光标记的菌株结合红色荧光探针标记的溶酶体、内质网和高尔基体等细胞器,研究测定了侵染细菌与胞内各细胞器结合的时间,为布鲁氏菌在细胞内的生存繁殖及其分子机制提供了理论参考。目前有学者建立了与鲷爱德华氏菌同属的迟缓爱德华氏菌小鼠巨噬细胞感染模型,并用小鼠巨噬细胞进行了病原与宿主互作关系研究,发现了迟缓爱德华氏菌与宿主互作的新机制^[23-24]。

参考文献:

- [1] 耿毅,汪开毓,范方玲,等. 养殖黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 61-67.
- [2] 耿毅,汪开毓,陈德芳,等. 鲷爱德华氏菌与鲷爱德华氏菌病[J]. 水产科技情报, 2009, 36(5): 236-240.
- [3] YE S, LI H, QIAO G, et al. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Aquaculture, 2009, 292(1): 6-10.
- [4] JARBOE H H, BOWSER P R, ROBINETTE H R. Pathology associated with a natural *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) [J]. Journal of Wildlife Diseases, 1984, 20(4): 352-354.
- [5] 肖洋,雷燕,唐绍林,等. 养殖长吻鲈 *Leiostichus longirostris* 鲷爱德华氏菌 *Edwardsiella ictaluri* 的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产学杂志, 2015, 28(1): 39-44.
- [6] 黄小丽,李成伟,耿毅,等. 南方鲷鲷爱德华氏菌感染的病理损伤特征及病原分布研究[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(10): 771-774.
- [7] 吴沛桥,巴晓革,胡海,等. 绿色荧光蛋白 GFP 的研究进展及应用[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(1): 83-86.
- [8] 吴超柱,徐凡,邵炎龙,等. 荧光标记技术在生物学和医学研究中的应用[J]. 重庆理工大学学报(自然科学), 2014, 28(5): 55-62.
- [9] 杜以帅,张丽娜,马晓娜,等. 绿色荧光蛋白标记杀鲑气单胞菌的构建及其初步应用[J]. 海洋科学, 2016, 40(12): 30-35.
- [10] 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.
- [11] 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 Microbiol Lett, 2001, 194(2): 239-243.
- [12] 高会会, 侯立婷, 李槿年, 等. 拟态弧菌的绿色荧光蛋白标记及其在感染草鱼体内的动态分布[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 557-565.
- [13] KNODLER L A, VALLANCE B A, CELLI J, et al. Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(41): 17733-17738.
- [14] LAGENDIJK E L, VALIDOV S, LAMERS G E, et al. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 305(1): 81-90.
- [15] RUSSO P, ITURRIA I, MOHEDANO M L, et al. Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(8): 3479-3490.
- [16] SALINAS-CARMONA M C, ROCHA-PIZANA M R. Construction of a *Nocardia brasiliensis* fluorescent plasmid to study *Actinomyces* pathogenicity[J]. Plasmid, 2011, 65(1): 25-31.
- [17] 孙海烨, 张 梁, 李由然, 等. 利用增强型绿色荧光蛋白研究不同启动子在乳酸克鲁维酵母中的功能[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 197-206.
- [18] CHU W, LU C. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker[J]. Aquaculture, 2008, 277(3): 152-155.
- [19] 罗文涓, 杨 剑, 敖 妙, 等. PRRSV 诱导猪体内肺泡巨噬细胞炎症模型的建立[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1):155-163.
- [20] 倪黎纲, 赵旭庭, 王宵燕, 等. 姜曲海猪肺泡巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23):163-165.
- [21] BOOTH N J, ELKAMEL A, THUNE R L. Intracellular replication of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish macrophages [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2011, 18(2): 101-108.
- [22] 马 慧, 苟亚峰, 刘朋涛, 等. 绵羊布鲁氏菌感染小鼠巨噬细胞的荧光表征与分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2014, 32(5):536-542.
- [23] 倪春山. 重要海洋病原细菌迟钝爱德华氏菌感染小鼠及细胞的研究模型建立[D]. 上海:华东理工大学, 2015.
- [24] CHEN H, YANG D, HAN F, et al. The bacterial T6SS effector EvpP prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the Ca²⁺-dependent MAPK-Jnk Pathway [J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(1): 47-58.

(责任编辑:陈海霞)