

## 副溶血弧菌 VPA1045 和 VPA1049 调节 Hcp2 蛋白转位<sup>\*</sup>

俞盈<sup>1</sup>, 张晏<sup>1</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 杨虹<sup>1</sup>, 宋厚辉<sup>2</sup>, 方维焕<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310058

<sup>2</sup>浙江农林大学动物科技学院, 杭州 311300

**摘要:**【目的】副溶血弧菌通过分泌多种毒力因子引起急性胃肠炎, 其中 VI 型分泌系统 (T6SS1 和 T6SS2) 是近年来新发现的一种毒力因子分泌系统, 但该系统如何受到调控的、如何影响细胞粘附等问题在副溶血弧菌中尚不清楚。本研究的目的是为了阐明副溶血弧菌调控因子 VPA1045 和 VPA1049 对 T6SS2 分泌系统在转录、翻译和翻译后水平的调控作用。【方法】利用同源重组方法构建 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 缺失株, 荧光定量方法检测 T6SS2 转位因子 *hcp2* 的转录水平差异, 免疫印迹分析细菌菌体中 Hcp2 的表达与上清中 Hcp2 的跨膜转位差异。【结果】副溶血弧菌 VPA1045 和 VPA1049 的基因结构中均含有 Che-Y 结构域, 属于二元调控因子的反应调节因子。缺失 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 后, 菌体中的 Hcp2 表达量和基因组中 *hcp2* 的转录水平差异不显著, 细菌上清中的 Hcp2 转位量和对 HeLa 细胞的细胞粘附率与亲本株 HZ 相比显著下降。【结论】二元调控因子 VPA1045 和 VPA1049 通过上调 Hcp2 的转位量从而翻译后上调副溶血弧菌 T6SS2。

**关键词:** 副溶血弧菌, VI 型分泌系统, 二元调控因子

**中图分类号:** Q816      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0954-08

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种嗜盐的革兰氏阴性短杆菌, 广泛存在于海洋环境中, 常引起海鱼、虾蟹、贝类发病或死亡<sup>[1]</sup>。人食用副溶血弧菌污染的海产品后引发急性胃肠炎<sup>[2]</sup>, 多发生于沿海地区, 夏秋季节高发。耐热直接溶血素 (thermostable direct hemolysin, TDH) 和耐热直接溶血相关毒素 (TDH-related hemolysin, TRH) 是副溶血弧菌的主要致病因子, 具有溶血性、肠毒性、细胞毒性等生物学活性<sup>[3–5]</sup>。此外, III 型分泌系统也与副溶血弧菌的致病力密切相关<sup>[6–8]</sup>。

VI 型分泌系统 (Type VI Secretion System, T6SS) 是近年来新发现的一种蛋白分泌系统, 广泛存在于革兰氏阴性菌变形菌门细菌中, 能够增强细

菌对外界环境的适应性, 介导细菌对宿主细胞的致病力<sup>[9–11]</sup>。T6SS 与其它的分泌系统一样, 由一系列元件组成, 包括构成分泌系统的结构蛋白, 形成跨膜管道结构的转位蛋白和分泌蛋白。Lip 是推测的外膜脂蛋白, IcmF 和 DotU 是推测内膜蛋白, 它们共同组成了 T6SS 的内外膜孔道。Hcp 和 VgrG 是 T6SS 的两个转位蛋白, 在 ClpV ATP 酶提供能量时能形成管道结构穿越细胞膜, 输出到菌体细胞外。在大多数的 T6SS 中, ClpV ATP 酶需要与 IcmF 相互作用才能启动能量供应系统<sup>[9–10]</sup>。因此, 缺失结构蛋白基因 *icmF* 的突变株中就检测不到 Hcp 蛋白的转位<sup>[12–15]</sup>。

副溶血弧菌基因组中有两个 T6SS 基因簇, 分

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30571436, 30700605)

<sup>\*</sup> 通信作者。Tel/Fax: + 86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

**作者简介:** 俞盈 (1984–), 女, 浙江人, 博士研究生, 从事分子微生物与食品安全研究。E-mail: yuyingye@zju.edu.cn

**收稿日期:** 2012-02-22; **修回日期:** 2012-04-08

别编码两套独立的 T6SS, 即 T6SS1 和 T6SS2, 分别位于 1 号和 2 号染色体上<sup>[16]</sup>。我们发现, 在体外培养条件下 T6SS1 处于低表达状态, 缺失主要结构基因 *icmF1* 和转位基因 *hcp1* 后, 副溶血弧菌对人结肠癌细胞 Caco-2 的粘附能力下降, 提示 T6SS1 可能与肠道细胞的粘附相关<sup>[17]</sup>。T6SS2 在体外培养条件下是一个活化的系统, 即缺失了副溶血弧菌的结构基因 *icmF2* 会阻止 Hcp2 的转位, 但不影响其表达。缺失 *icmF2* 或 *hcp2* 后, 副溶血弧菌对 HeLa 细胞的粘附能力下降, 说明 T6SS2 参与副溶血弧菌对 HeLa 细胞的细胞粘附<sup>[17]</sup>。

二元调控系统, 也叫组氨酸-天冬氨酸磷酸酶转移系统, 是细菌中普遍存在的一种调控系统, 有利于细菌调节并适应一系列的外界信号与刺激, 包括营养、细胞氧化还原反应, 渗透压的改变等。二元调控因子由组氨酸激酶和反应调节因子组成<sup>[18]</sup>, 组氨酸激酶能使细菌感知内外界环境的变化, 并由反应调节因子做出相应的反应来适应这种变化<sup>[19]</sup>。

*Vpa1045* 和 *Vpa1049* 基因位于 T6SS2 基因簇末端, 分别编码两个未知功能的蛋白。我们通过蛋白同源性分析发现, 该蛋白含有二元调控系统特有的结构域, 提示可能参与调控 T6SS2。本研究以副溶血弧菌临床分离株 HZ 为亲本菌株, 构建 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 基因缺失株, 分析其对 T6SS2 转位因子 Hcp2 转录、翻译、转位以及对 HeLa 细胞粘附能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 本试验所用的菌株和质粒如表 1 所示。副溶血弧菌临床分离株 HZ 来源于浙江省疾病预防控制中心; 大肠杆菌 CC118λpir 由本实验室保存; 质粒 pYAK1 由日本大阪大学 Tetsuya Iida 博士馈赠。大肠杆菌和副溶血弧菌分别用 LB 或添加终浓度为 3% NaCl 的 LB 于 37℃ 培养。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmid

Strain	Description	Reference or source
<i>V. parahaemolyticus</i>		
HZ	Wild type, clinical strain, Cm <sup>r</sup>	[17]
Δ <i>hcp2</i>	HZ, in-frame deletion of <i>hcp2</i>	[17]
Δ <i>Vpa1045</i>	HZ, in-frame deletion of <i>Vpa1045</i>	This study
Δ <i>Vpa1049</i>	HZ, in-frame deletion of <i>Vpa1049</i>	This study
<i>E. coli</i>		
CC118λpir	Δpir lysogen of CC118 Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>phoA20</i> <i>thi-1</i> <i>rpsE</i> <i>rpoB</i> <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i>	[20]
Plasmid		
pYAK1	A suicide vector with ori R6K <i>sacB</i> ; Cm <sup>r</sup>	[8]

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶等购自 Takara 公司; DNA、RNA 和质粒抽提试剂盒购自上海生物工程有限公司; SYBR qPCR Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公司; 二抗 (HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG) 购自上海明睿生物技术有限公司; Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate 购自 Thermo 公司。

1.2 引物设计与合成

引物参考副溶血弧菌临床分离株 RIMD2210633 (GenBank 登录号: BA000032) 基因序列, 采用 PrimerSelect 7.1 软件设计, 并由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列见表 2。

1.3 副溶血弧菌 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 基因缺失株的构建

副溶血弧菌基因缺失株构建采用同源重组方法进行, 所采用的引物见表 2。具体方法参照 Park<sup>[8]</sup>, 以 *Vpa1045* 基因缺失株构建为例: 分别以 VPA1045-A/VPA1045-B 和 VPA1045-C/VPA1045-D 为引物, 以 HZ 基因组 DNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增, 从而产生同源臂 AB 和 CD 片段。再以同源臂 AB 和 CD PCR 扩增片段为模板, VPA1045-A/VPA1045-D 为引物进行第二轮融合 PCR, 从而产生缺失目的基因的同源片段。该片段用 *Bam*HI 和 *Sph*I 进行双酶切后, 连接到 pYAK1 质粒上获得携带同源臂而缺失

表 2 本试验所需引物  
Table 2 Primers in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon/bp
VPA1045-A	AAAGGATCCAACAGTTCTTCACCAATA	551
VPA1045-B	GATCATTTAGTCTATCTTCCTTACTACAGTACA	
VPA1045-C	ATAGACTAAATGATCAACTTCGAATTGCTC	619
VPA1045-D	AAAGCATGCCTAGTTCTTAGTTTCGTCCAT	
VPA1045-E	CTTAGTCAACAAAACGAAGTTATCC	3499
VPA1045-F	GAGCTCGAATGTGCAATCTTATC	1963
VPA1049-A	AAAGCATGCTAGAAGCGCTTCTGTGCATC	575
VPA1049-B	GGAGAGAGTTACGAGTTTAAAAACGTTTCTTAGC	561
VPA1049-C	CTCGTAACTCTCTCCTCAACGCTGGTAG	
VPA1049-D	AAAGGATCCTTTGAACAAGTGTCTGCCC	2533
VPA1049-E	TGGACAACAACCATTTC AAGGAG	
VPA1049-F	GTTTTGCGGTGAATGGTTTGAGTATT	1312
QF- <i>hcp2</i>	GGAGCAGAAGTGTGTTTTTG	129
QR- <i>hcp2</i>	TGATGCGATGATTCTAATACTACTC	156
QF- <i>pvuA</i>	CAAACTCACTCAGACTCCA	
QR- <i>pvuA</i>	CGAACCGATTCAACACG	387
SacB-F	ACGGCACTGTGCGAAACTAT	
SacB-R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT	

靶基因的重组质粒,先转化入大肠杆菌 CC118λpir,再通过结合转移至副溶血弧菌中,用含 10 μg/mL 氯霉素的 TCBS 平板筛选结合子。结合子在含 10% 蔗糖的 LB 培养基中连续传代 14 代后,用引物 VPA1045-E/VPA1045-F 进行 PCR 鉴定是否重组,并用 SacB-F/R 检测副溶血弧菌中的质粒是否丢失。Vpa1049 基因缺失株构建与上述方法类似。

1.4 Real-time PCR 分析 *hcp2* 的转录水平

副溶血弧菌亲本株及其 Δ*Vpa1045*、Δ*Vpa1049* 和 Δ*hcp2* 突变株在含 3% NaCl 的 LB 中,于 37℃ 过夜培养后,1:15 转接到含 3% NaCl 的 LB 中继续培养 14 h。Trizol RNA extraction Kit (上海生工) 抽提细菌总 RNA,进行 RT-PCR 反应,反应体系:4 μL 5 × RT Buffer,0.5 μL RNase 抑制剂,2 μL DTT,2 μL 4 × dNTP,0.5 μL (1 μg) RNA 样品,1 μL Random Primer (9 mer)。荧光定量 PCR 反应体系:10 μL SYBR qPCR Mix (TOYOBO),0.8 μL QF-*hcp2* (终浓度为 400 nmol/L,内参基因用 QF-*pvuA*),0.8 μL QR-*hcp2* (终浓度为 400 nmol/L,内参基因用 QR-*pvuA*),2 μL cDNA,灭菌蒸馏水补至 20 μL。荧光定量反应条件:94℃,10 s;56℃,10 s;72℃,10 s 共 40 个循环。反应前 94℃ 预变性 3 min。

1.5 免疫印迹分析 Hcp2 的翻译和转位的影响

副溶血弧菌亲本株、Δ*Vpa1045*、Δ*VpaPA1049* 和 Δ*hcp2* 在含 3% NaCl 的 LB 中,于 37℃ 过夜培养后,

1:15 转接到 10 mL 3% NaCl 的 LB 中,继续培养 14 h。细菌 12000 × g 离心 5 min,沉淀溶解于 50 mmol/L PBS 中。上清蛋白的制备采用三氯醋酸沉淀法:细菌上清用 10% 的三氯醋酸于 4℃ 1 h 后,15000 × g 离心 30 min,沉淀用 0.1 mmol/L NaOH 40 μL 溶解。细菌上清和沉淀样本加入 5 × SDS-Loading buffer 进行 SDS-PAGE,转膜至 PVDF 膜,用 5% 的脱脂奶粉于 37℃ 封闭 2 h,Hcp2 和 RpoB 多抗<sup>[17]</sup> 作用 1 h,HRP 标记的羊抗兔 IgG 作用 1 h。PVDF 膜加底物 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) 后在成像系统中显影并拍照。

1.6 细胞粘附实验

HeLa 细胞以 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度,用含 10% 新生牛血清的 DMEM 细胞培养液接种到 24 孔板中,每孔 500 μL;于 5% CO<sub>2</sub>,37℃ 条件下培养 12 h。用 DMEM 调整细菌浓度为 OD<sub>600</sub> = 0.2 ± 0.02 (约 4 - 5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL),平板计数。细胞用 PBS (10 mmol/L,pH 7.2) 洗涤两次后,每孔加入 0.5 mL 10 倍稀释后的细菌 (MOI ≈ 100);于 5% CO<sub>2</sub>,37℃ 条件下继续培养 1 h。用 PBS 洗涤两次,洗去未粘附的细菌。用 0.01% Triton-X 100 裂解细胞,进行细菌平板计数。细菌粘附率 (%) = 粘附后的细菌数 / 加入的细菌数 × 100。

1.7 数据分析

荧光定量和细胞粘附试验均重复 3 次,每次 3

个平行。数据用 Mean (SEM 表示, Student's  $t$  检测进行显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 VPA1045 和 VPA1049 结构域分析

我们对 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 在基因组上的位置进行分析发现: 这两个基因位于 T6SS2 基因簇的下

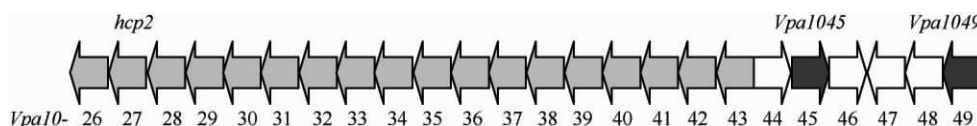


图 1 副溶血弧菌 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 在 T6SS2 基因簇中的结构图

Fig. 1 The structural diagram of *Vpa1045*, *Vpa1049* and T6SS2 cluster in *V. parahaemolyticus*.

### 2.2 $\Delta Vpa1045$ 和 $\Delta Vpa1049$ 突变株构建与鉴定

为了研究 VPA1045 和 VPA1049 是否参与调节 T6SS2, 我们采用同源重组方法对这两个基因进行缺失。我们用 E/F 引物对同源臂的两侧进行 PCR 检测, 缺失目的基因的菌株的片段小于非缺失株。我们对在含 10% 蔗糖的 LB 中传代 14 代后的细菌进行筛选, 共筛选出两个  $\Delta Vpa1045$  突变株 (图 2-A, 8 和 10 泳道) 和一个  $\Delta Vpa1049$  突变株 (图 2-B, 9 泳道)。sacB 是位于质粒 pYAK1 的同源臂外侧的反向选择标记基因。目的基因缺失后, 对 sacB 基因进行 PCR 检测, 若检测不到, 则说明含有同源臂的质粒已经丢失。对突变株进行 sacB 基因的检测发现,  $\Delta Vpa1045$  和  $\Delta Vpa1049$  中的质粒均已丢失 (图 2-

游 (图 1)。通过蛋白同源性分析, 我们发现 VPA1045 和 VPA1049 的 N 端均含有一个趋化因子调节蛋白 Che-Y 的结构域, 而 Che-Y 结构是二元调控因子的反应调节蛋白家族 (response regulator) 的典型特征<sup>[21]</sup>。二元调控因子广泛存在于原核生物中, 通过对靶基因的磷酸化调节其基因的转录, 表达等过程<sup>[21]</sup>。因此, 这提示 VPA1045 和 VPA1049 可能属于二元调控因子, 并可能调控附近的 T6SS2。

C)。对  $\Delta Vpa1045$  突变株和  $\Delta Vpa1049$  突变株对应

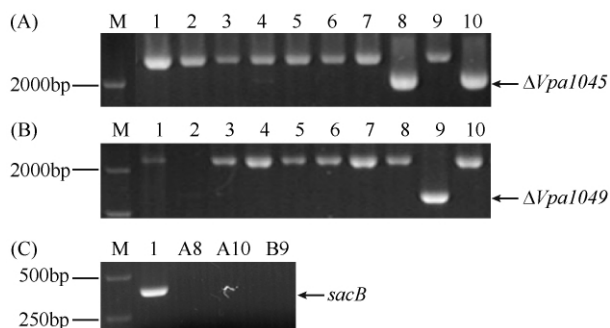


图 2 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 的突变株的鉴定

Fig. 2 Screening of *V. parahaemolyticus* *Vpa1045* and *Vpa1049* deletion mutants and analysis recombination plasmids. A: M. DL2000, 1. WT control, 2 - 10. Screen of  $\Delta Vpa1045$  mutant strain; B: M. DL2000, 1. WT control, 2 ~ 10. Screen of  $\Delta Vpa1049$  mutant strain; C: M. DL2000, 1. pYAK1 control, A8 & A10.  $\Delta Vpa1045$  mutant strains, B9.  $\Delta Vpa1049$  mutant.

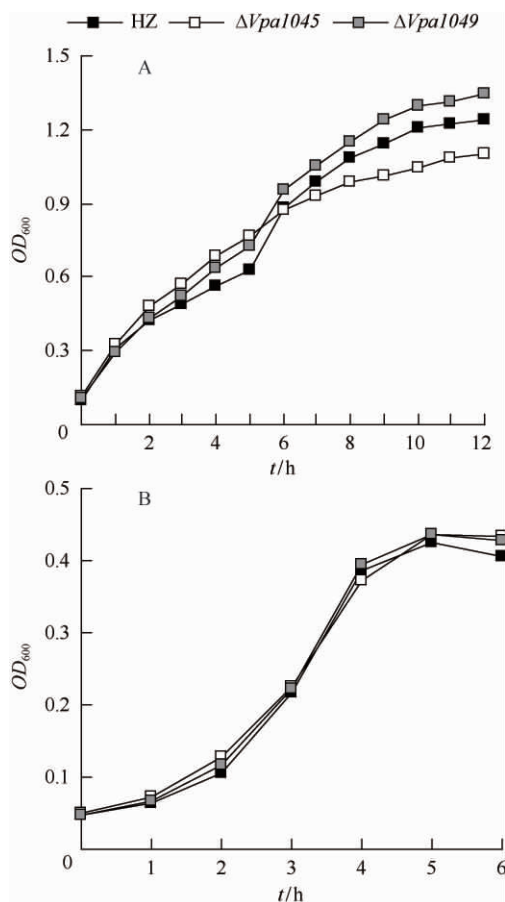


图 3 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 突变株在 LB (A) 和 DMEM (B) 中的生长特性

Fig. 3 Growth of *V. parahaemolyticus* wild-type strain and its *Vpa1045* and *Vpa1049* deletion mutants in LB (A) and DMEM (B).

的 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 基因进行 PCR, 然后进行测序。序列分析表明: *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 已经完全缺失。体外生长试验发现  $\Delta Vpa1045$  和  $\Delta Vpa1049$  突变株在细菌培养基 LB (图 3-A) 或细胞培养基 DMEM (图 3-B) 中的生长, 与亲本株相比无显著差异。

### 2.3 $\Delta Vpa1045$ 和 $\Delta Vpa1049$ 不影响 *hcp2* 的转录水平

Hcp 是 T6SS 跨膜转位蛋白, 也是 T6SS 主要的效应蛋白, 研究 T6SS 的调控, 通常以其转位蛋白为靶蛋白<sup>[22]</sup>。在副溶血弧菌 *hcp2* 位于 T6SS2 基因簇的上游, 而 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 位于下游 (图 1)。作为二元调控蛋白, VPA1045、VPA1049 是否也和 VtrA、VtrB 蛋白一样对位于同一基因簇的基因起到调控作用呢<sup>[23]</sup>? 为此, 我们首先利用实验室建立的 *hcp2* 特异性的荧光定量 PCR 引物 QF/QR-*hcp2*<sup>[17,23]</sup> 检测 *hcp2* 基因在亲本株,  $\Delta Vpa1045$  和  $\Delta Vpa1049$  中的转录水平差异, 同时以 (*hcp2* 为阴性对照。细菌在 LB 中于 37℃ 震荡培养 14 h, 抽提细菌 RNA 后进行荧光定量 PCR 鉴定, 以 *pvuA* 为内参基因。结果表明, 缺失了 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 基因后, *hcp2* 的转录量与亲本株相比差异不显著 (图 4), 说明 VPA1045 和 VPA1049 不影响 *hcp2* 的转录水平, 这一点不同于 VtrA 和 VtrB 二元调控系统<sup>[23]</sup>。

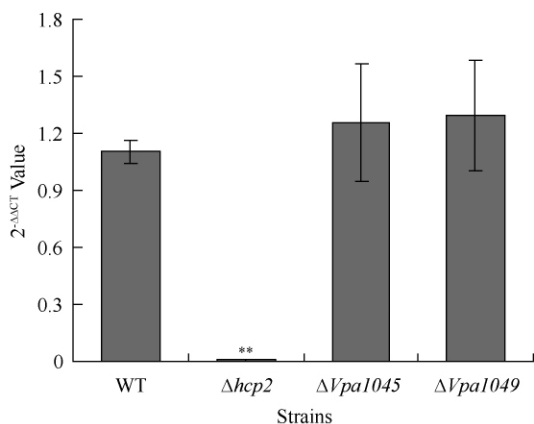


图 4 VPA1045 和 VPA1049 蛋白对 *hcp2* 转录水平的影响

Fig. 4 Transcription of *hcp2* in *V. parahaemolyticus* wild-type (WT) strain and its *Vpa1045* and *Vpa1049* deletion mutants (\*\* $P < 0.05$ ).

### 2.4 Hcp2 的跨膜转位依赖于 VPA1045 和 VPA1049

Hcp2 是 T6SS2 转位蛋白。T6SS 处于非活化状

态时, 转位蛋白 Hcp 以单体形式散在于细胞内, 此时 Hcp 蛋白只能在细菌菌体中被检测到; 而在活化状态下, Hcp 单体会重叠形成管道结构, 穿越细胞膜, 到达外界环境中, 此时 Hcp 能同时在细菌菌体和培养上清中被检测到<sup>[22]</sup>。Hcp 的表达和转位情况是鉴定 T6SS 是否处于被激活状态的一个标志<sup>[22]</sup>。为了证实副溶血弧菌的 Hcp2 在细胞中的表达和细胞膜上的转位依赖 VPA1045 和 VPA1049, 我们对 Hcp2 在细菌菌体和培养上清的情况进行了研究。

副溶血弧菌亲本株、 $\Delta Vpa1045$ 、 $\Delta Vpa1049$  和  $\Delta hcp2$  在 LB 中培养 14h 后, 分别收集 250 倍和 10 倍浓缩的细菌菌体和培养上清, 用 Hcp2 多抗检测其在细菌菌体和培养上清中分布。同时在细菌菌体中以 DNA 聚合酶  $\beta$  亚基蛋白 RpoB 作为内参。缺失了 *Vpa1045* 或 *Vpa1049* 的弧菌, 仅有少量 Hcp2 分泌到培养上清液中 (图 5-A)。而菌体沉淀中的 Hcp2 与亲本相比差异并不显著。这说明, Hcp2 的跨膜转位依赖于 VPA1045 和 VPA1049。

T6SS2 活化后, Hcp2 管道的顶端部分会穿过细菌细胞膜到达外界环境, 因此 Hcp2 蛋白的表达量

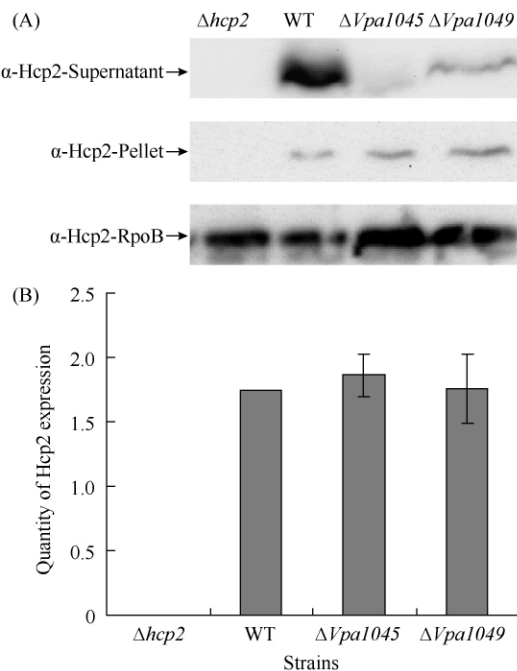


图 5 VPA1045 和 VPA1049 蛋白对 Hcp2 翻译和转位水平的影响

Fig. 5 Effect of VPA1045 and VPA1049 proteins on *hcp2* expression and translocation. A: Western Blot; B: Quantity of Hcp2 expression.

包括菌体沉淀和培养上清中检测到 Hcp2 蛋白。用 Quantity One 软件对 Hcp2 蛋白在细菌菌体和培养上清中的含量进行定量分析,并计算 Hcp2 蛋白表达量 = (Hcp2 上清量 + 25 × Hcp2 沉淀量) / RpoB 含量。如图 5-B 所示,缺失了 *Vpa1045* 或 *Vpa1049* 的细菌,Hcp2 的表达量与亲本株相比差异不显著。说明虽然 VPA1045 和 VPA1049 影响了 Hcp2 的转位,却不调控 Hcp2 蛋白的表达。

## 2.5 VPA1045 和 VPA1049 参与了 T6SS2 介导的对 HeLa 细胞的细胞粘附作用

分泌系统通过其效应蛋白对宿主细胞产生一定的生物学活性,而其结构蛋白的缺失,会影响效应蛋白的转位或分泌<sup>[12,14,17]</sup>。我们前期研究结果表明:T6SS2 结构蛋白基因 *icmF2* 和转位蛋白基因 *hcp2* 缺失后,副溶血弧菌对 HeLa 细胞的细胞粘附力下降<sup>[17]</sup>,*Vpa1045* 和 *Vpa1049* 的缺失又影响 Hcp2 的跨膜转位,而 Hcp2 又是 T6SS2 的效应蛋白,这提示 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 缺失株同样也能影响弧菌的细胞粘附力。为了证明这一推论,我们将副溶血弧菌 HZ、 $\Delta Vpa1045$ 、 $\Delta Vpa1049$  和  $\Delta hcp2$  以 MOI = 100 的感染量感染 HeLa 细胞,然后比较各突变株与亲本细菌对 HeLa 细胞粘附力的差异。结果发现, $\Delta Vpa1045$  和  $\Delta Vpa1049$  突变株对 HeLa 细胞的粘附率与亲本株相比均显著降低,几乎到达了与 T6SS2 转位因子突变株  $\Delta hcp2$  相一致的水平(图 6),这说明 Hcp2 在细胞膜上能否完成跨膜转位,将影响其对细胞的粘附力。

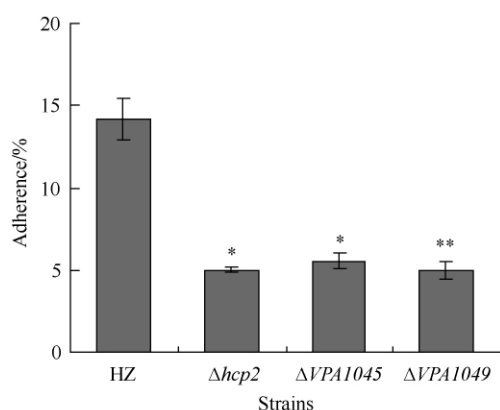


图 6 VPA1045 和 VPA1049 蛋白对 HeLa 细胞粘附的影响

Fig. 6 Effect of VPA1045 and VPA1049 proteins on adherence to HeLa monolayers. \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

T6SS 是近年来新发现的与细菌致病力和适应性密切相关的分泌系统,由一系列的结构蛋白,转位蛋白和分泌蛋白构成<sup>[4,9-10]</sup>。T6SS 的生物学活性通过其转位蛋白和分泌蛋白来实现,因此,转位蛋白和分泌蛋白共同构成了 T6SS 的效应蛋白。副溶血弧菌的 T6SS2 参与了副溶血弧菌对真核细胞的细胞粘附作用<sup>[17]</sup>,但关于 T6SS2 系统如何受到调控的,目前知之甚少。

本文通过生物信息学分析,发现在 T6SS2 基因簇附近存在两个类似二元调控因子家族的基因,其编码的蛋白均含有典型的 Che-Y 结构域。二元调控因子对蛋白,特别是分泌系统相关蛋白的调控分为 3 个阶段,分别是转录,翻译和翻译后。在 T6SS 中,翻译后调控可能与转位蛋白或分泌蛋白的分泌有关。

本试验发现缺失 *Vpa1045* 和 *Vpa1049* 后,*hcp2* 的转录水平无显著变化,提示 VPA1045 和 VPA1049 不影响 *hcp2* 的转录;细菌菌体中的 Hcp2 量变化不明显,而上清中的 Hcp2 显著下降。试验中,细菌菌体沉淀样本与培养上清样本在制备过程中的浓缩倍数分别为 10 倍和 250 倍,因此在计算 Hcp2 的表达量时需将沉淀中浓缩倍数矫正到与上清中的一致。采用 Quantity One 软件对 Hcp2 在菌体沉淀样本和上清样本中的含量的分析,结果显示亲本株、 $\Delta Vpa1045$  和  $\Delta Vpa1049$  中 Hcp2 在菌体和上清中的总含量变化不明显,且 Hcp2 总含量主要由沉淀样本中的含量决定。

VPA1045 和 VPA1049 对 T6SS2 的转位因子 Hcp2 的调控属于翻译后调控,它们不影响 Hcp2 蛋白的转录与翻译,但上调了 Hcp2 的转位,即可能是 Hcp2 单体结构组装成分泌系统管道结构的过程。这一过程还影响了 T6SS2 所介导的对 HeLa 细胞的粘附作用。但其作用机制还有待进一步研究:如这二元调控系统是否直接作用于 Hcp2? 还是通过作用 T6SS 的结构蛋白从而影响 Hcp2 的转位? 如果是直接作用,究竟是何种翻译后修饰方式介导这一调控过程?

## 参考文献

- [1] Austin B. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140 (3-4) :310-317.
- [2] Yeung PS, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1 (2) :74-88.
- [3] Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y, Nishibuchi M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 1990, 58 (11) :3568-3573.
- [4] Honda T, Ni YX, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 1988, 56 (4) :961-965.
- [5] Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 2007, 24 (6) :549-558.
- [6] Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, Gilpin CJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (34) :12497-12502.
- [7] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 2003, 361 (9359) :743-749.
- [8] Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (11) :6659-6665.
- [9] Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Reports*, 2008, 9 (8) :735-741.
- [10] Filloux A. The type VI secretion system: a tubular story. *The EMBO Journal*, 2009, 28 (4) :309-310.
- [11] Li J, Yu Y, Wang H. Advances in bacterial type VI secretion system. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2011, 51 (3) :291-296.
- [12] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordonez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, 312 (5779) :1526-1530.
- [13] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (5) :1528-1533.
- [14] Suarez G, Sierra JC, Sha J, Wang S, Erova TE, Fadl AA, Foltz SM, Horneman AJ, Chopra AK. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44 (4) :344-361.
- [15] Zheng J, Leung KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Molecular Microbiology*, 2007, 66 (5) :1192-1206.
- [16] Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 2009, 10:104.
- [17] Yu Y, Yang H, Li J, Zhang P, Wu B, Zhu B, Fang W. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Archives of Microbiology*, 2012 Apr 26. [Epub ahead of print].
- [18] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69:183-215.
- [19] Mascher T, Helmann JD, Uuden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70 (4) :910-938.
- [20] Wang Q, Liu Q, Ma Y, Rui H, Zhang Y. LuxO controls extracellular protease, haemolytic activities and siderophore production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103 (5) :1525-1534.

- [21] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69:183-215.
- [22] Mougous JD, Gifford CA, Ramsdell TL, Mekalanos JJ. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Cell Biology*, 2007, 9 (7) :797-803.
- [23] Kodama T, Gotoh K, Hiyoshi H, Morita M, Izutsu K, Akeda Y, Park KS, Cantarelli VV, Dryselius R, Iida T, Honda T. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. *PLoS One*, 2010, 5 (1) :e8678.

## VPA1045 and VPA1049 of *Vibrio parahaemolyticus* regulate translocation of Hcp2

Ying Yu<sup>1</sup>, Yan Zhang<sup>1</sup>, Jun Li<sup>1</sup>, Hong Yang<sup>1</sup>, Houhui Song<sup>2</sup>, Weihuan Fang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zhejiang University Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Hangzhou 310058, China

<sup>2</sup>Zhejiang A&F University College of Animal Sciences and Technology, Hangzhou 311300, China

**Abstract:** [Objective] *Vibrio parahaemolyticus* causes acute gastroenteritis by secreting a number of virulence factors including two sets of type VI secretion systems (T6SS1 and T6SS2). However, it remains unknown how T6SS is regulated in the bacterium and what kinds of effects the systems have on adhesion onto and invasion into the host cells. This study was attempted to examine if VPA1045 and VPA1049 regulate T6SS2. [Methods] *Vpa1045* and *Vpa1049* deletion mutants were constructed by homologous recombination. Real-time PCR was performed to examine the transcription level of the translocon protein gene *hcp2* in *V. parahaemolyticus* clinical strain HZ and its mutants. Western blot was used to analyze the levels of expression and translocation of Hcp2. [Results] Both VPA1045 and VPA1049 contain the Che-Y domain, and belong to the two-component regulators. Deletion of either *Vpa1045* or *Vpa1049* did not affect expression and transcription of Hcp2, but decreased translocation of Hcp2 in the supernatant of *V. parahaemolyticus*. Bacterial adherence to the HeLa monolayers was also significantly reduced as compared with their parent strains. [Conclusion] The two-component regulators VPA1045 and VPA1049 regulate T6SS2 of *V. parahaemolyticus* post-translationally by up-regulating Hcp2 translocation.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, type VI secretion system, two-component regulator

(本文责编:王晋芳)