



CalR 激活副溶血弧菌VI型分泌系统 1 相关基因的转录

陆仁飞¹, 李雪¹, 薛星帆², 张苗苗², 孙君芳¹, 高鹤³, 周冬生⁴, 张义全^{1,2*}

1 南通大学附属第三人民医院检验科, 江苏 南通 212001

2 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013

3 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

4 北京微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全重点实验室, 北京 100071

陆仁飞, 李雪, 薛星帆, 张苗苗, 孙君芳, 高鹤, 周冬生, 张义全. CalR 激活副溶血弧菌VI型分泌系统 1 相关基因的转录. 微生物学报, 2022, 62(2): 715–726.

Lu Renfei, Li Xue, Xue Xingfan, Zhang Miaomiao, Sun Junfang, Gao He, Zhou Dongsheng, Zhang Yiquan. CalR activates the transcription of type VI secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 715–726.

摘要:【目的】研究副溶血弧菌群体感应(quorum sensing, QS)系统核心调控子 AphA 和 OpaR 对 *calR* 基因以及 CalR 对 VI 型分泌系统 1 (type VI secretion system 1, T6SS1; *vp1386–1420*)相关基因的转录调控关系。【方法】提取副溶血弧菌野生株(wild-type, WT)和调控子基因突变株的总 RNA, 采用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)研究调控子对靶基因的转录调控关系; 采用引物延伸实验研究靶基因的转录起始位点, 并根据产物的丰度判断调控子对靶基因的调控关系; 将靶基因的启动子区克隆入 pHRP309 质粒的 β -半乳糖苷酶基因上游, 构建 *LacZ* 重组质粒, 并将该重组质粒转入 WT 和调控子基因突变株中, 获得 *LacZ* 菌株, 通过 *LacZ* 报告基因融合实验进一步研究调控子对靶基因的调控关系。PCR 扩增靶基因的上游调控区 DNA 序列, 并纯化 His-重组调控子蛋白, 通过凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)研究 His-重组蛋白对靶基因调控区 DNA 序列是否具有直接的结合作用, 若有结合作用, 则进一步采用 DNase I 足迹实验研究具体的结合位点。【结果】在细菌生长密度(OD_{600})从 0.05 依次增加到 1.20 时, CalR 的表达水平呈梯度升高特征; QS 系统在低细胞密度下的核心调控子 AphA 对 *calR* 基因的转录没有调控作用, 而高细胞密度下的核心调控子 OpaR 对 *calR* 基因的转录具有间接的激活作用。此外, 在非诱导条件下, CalR 直接结合到 *vp1388–1390*、*vp1393–1406*、*vp1400–1406* 和 *vp1409–1407* 启动子区 DNA 序列上促进它们

基金项目: 国家自然科学基金(82072239); 江苏省博士后科学基金(2020Z102); 江苏省自然科学基金(BK20160505)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82072239), by the Postdoctoral Science Foundation Funded Project of Jiangsu Province (2020Z102) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20160505)

*Corresponding author. Tel: +86-513-89093910; E-mail: zhangyiquan@163.com

Received: 2 June 2021; Revised: 11 September 2021; Published online: 5 December 2021

的转录。【结论】OpaR 间接激活 CalR 的表达，而 CalR 是非诱导条件下维持 T6SS1 基础表达所必需的调控子。

关键词：副溶血弧菌；群体感应；调控；T6SS1；CalR

CalR activates the transcription of type VI secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus*

LU Renfei¹, LI Xue¹, XUE Xingfan², ZHANG Miaomiao², SUN Junfang¹, GAO He³, ZHOU Dongsheng⁴, ZHANG Yiquan^{1,2*}

¹ Department of Clinical Laboratory, Nantong Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 212001, Jiangsu, China

² School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

³ National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

⁴ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] To study the transcriptional regulation of *calR* gene by the master quorum sensing (QS) regulators AphA and OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*, and to investigate the regulatory actions of CalR on the transcription of type VI secretion system 1 (T6SS1) genes. [Methods] Total RNAs were extracted from the wild-type (WT) strain and the regulatory gene mutants. Quantitative real-time PCR was carried out to calculate the transcriptional variation of each target gene between WT and the mutants. Primer extension assay was employed to detect the transcription start site and the expression variation of each target gene between WT and the mutants. The promoter region of each target gene was cloned into the restriction endonuclease sites of pHRP309, which harbors a gentamicin resistance gene and a promoterless *lacZ* reporter gene. Thereafter, each recombinant pHRP309 plasmid was transferred into WT and the mutants. The transformants were cultured and then lysed, and a β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) was used for quantifying the β -galactosidase activity in cell lysates. The over-expressed His-recombinant regulatory proteins were purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and DNase I footprinting were adopted to analyze the binding activity of each His-recombinant protein to its target promoter DNA region *in vitro*. [Results] The expression level of *calR* gene was up-regulated gradiently with the increase in OD_{600} value from 0.05 to 1.20. AphA operating at a low cell density had no regulatory activity on *calR* gene transcription, whereas OpaR operating at a high cell density indirectly activated the transcription of *calR* gene. Moreover, CalR bound to the promoter regions of the T6SS1 operons *vp1388–1390*, *vp1393–1406*, *vp1400–1406*, and *vp1409–1407* to activate their transcription under the non-inducing growth condition. [Conclusion] The transcription of *calR* gene was indirectly activated by OpaR. CalR was required for the basal transcription of T6SS1 genes under the non-inducing growth condition.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; quorum sensing; regulation; T6SS1; CalR

VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是普遍存在于革兰阴性菌中的噬菌体样蛋白注射装置,可将效应子蛋白注入真核或原核细胞内而发挥生物学效应^[1-3]。T6SS功能多样,已证实与细菌致病性、生物膜形成、金属离子转运、细菌间相互作用等生命活动直接相关^[4-12]。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种海产品相关食源性致病菌,广泛地分布于海洋生态系统中^[13]。该菌通常含有大、小两个染色体,每个染色体中均可能含有一套T6SS基因位点,分别称为T6SS1(*vp1386-1420*)和T6SS2(*vpa1024-1046*)^[14]。T6SS1存在于副溶血弧菌临床分离株和引起虾急性肝胰腺坏死病的菌株中,主要具有细胞粘附活性和抑菌活性^[8-9,15]。T6SS2存在于所有副溶血弧菌菌株中,主要具有细胞粘附活性^[9,15]。因此,T6SS1主要与该菌的环境适应性相关,而T6SS2可能与其毒力有关。

T6SS1相关基因在模拟海洋生存条件下(2% NaCl和23–30 °C)表达水平高,而T6SS2相关基因在模拟宿主体内环境的培养条件(0.5% NaCl和37 °C)下表达水平高^[9]。除环境因素外,T6SS相关基因的表达还受多种调控蛋白的调控。拟核结构蛋白H-NS对T6SS1和T6SS2相关基因的表达均具有抑制作用^[16-18]。群体感应(quorum sensing, QS)系统对T6SS1和T6SS2相关基因的转录也具有紧密地调控作用^[19-21]。AphA和OpaR是QS系统的2个核心调控子,分别在低密度和高密度下发挥调控作用^[22-23]。低密度时,AphA间接抑制*vpa1027-1024*、*vpa1043-1028*和*vpa1044-1046*的转录;高密度时,OpaR直接激活它们的转录,从而导致T6SS2相关基因在高密度时表达水平高^[19]。此外,ToxR、AphA和OpaR对T6SS1相关操纵子*vp1388-1390*、*vp1393-1406*、*vp1400-1406*和*vp1409-1407*的转

录具有协同抑制作用^[21]。值得注意的是,AphA和ToxR在 $OD_{600}=0.05-0.20$ 时表达水平高,OpaR在 $OD_{600}=0.4-0.6$ 时表达水平高,而T6SS1相关基因在 $OD_{600}=0.6-0.8$ 时表达水平高^[21]。因此,在 OD_{600} 值高于0.6时,很可能存在其他未知的调控子可以促进T6SS1的表达。

CalR (calcium-regulated regulator)是LysR家族的转录调控子,对T6SS1相关基因的转录和细菌群集性爬动能力均具有抑制作用^[24-25],并对溶血活性和*tdh2*基因的转录也具有抑制作用^[26]。此外,CalR对T6SS2相关基因和*mfpABC*基因的转录具有直接的激活作用^[27-28]。可见,CalR是副溶血弧菌中的一个全局性调控子,调控着众多细胞通路。本研究旨在探究CalR是否参与调控T6SS1相关基因的转录。结果表明,在细菌生长密度(OD_{600})从0.05依次增加到1.20时,CalR的表达水平呈梯度升高特征,但是AphA对*calR*基因的转录没有调控作用,而OpaR对其转录具有间接的激活作用。此外,在非诱导条件下,CalR能直接结合到*vp1388-1390*、*vp1393-1406*、*vp1400-1406*和*vp1409-1407*上游调控区DNA序列上,并促进它们的转录。因此,CalR是非诱导条件下维持T6SS1基础表达所必需的调控子。本研究结果将有利于我们理解T6SS1的表达调控网络,并为解析副溶血弧菌的环境适应机制提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验所用的副溶血弧菌菌株RIMD2210633(野生型,WT)及其*calR*、*opaR*和*aphA*非极性单基因突变株(分别称为 $\Delta calR$ 、 $\Delta opaR$ 和 $\Delta aphA$)^[22-23,27]、His-重组蛋白表达菌等由南通大学附属第三人民医院检验科保存。

1.1.2 主要试剂

M 肉汤培养基(3.74% Difco marine broth 2216)购自 BD Bioscience; TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; Primer Extension System、fmol[®] DNA Cycle Sequencing System 和 β -Galactosidase Enzyme Assay System 为 Promega 产品; Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购自 Fermentas 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂购自天根生化科技(北京)有限公司; LightCycler[®] 480 SYBR Green Master 购自 Roche 公司。

1.2 细菌培养方法

取 15 μ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 M 肉汤中, 30 °C、200 r/min 培养 12–14 h。按 1: 50 稀释接种至 10 mL 新鲜的 M 肉汤中, 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600}=1.0$, 再按 1: 1 000 稀释接种至 10 mL 新鲜的 M 肉汤中, 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600}=1.0$, 收集菌体。若需使用抗生素, 庆大霉素终浓度为 50 μ g/mL, 氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL。

1.3 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)

采用 TRIzol 法提取 WT 和调控子基因突变株($\Delta aphA$ 、 $\Delta opaR$ 和 $\Delta calR$)的总 RNA^[26–27], 利用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂将其逆转录成 cDNA, 最后用 Roche 的 LightCycler system 进行 qPCR 分析。以 16S rRNA 的表达量为内参, 采用标准曲线法对靶基因的表达水平进行相对定量^[29]。本研究所用引物如表 1 所示。

1.4 引物延伸(primer extension)实验

采用 TRIzol 法提取 WT 和调控子基因突变株($\Delta aphA$ 和 $\Delta opaR$)的总 RNA, 并将与靶基因 mRNA 互补的特异性引物(表 1)5'-末端用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP (5 000 Ci/mmol)进行放射性标记^[30]。分别以

WT 和调控子基因突变株的总 RNA 为模板(总 RNA 的量保持一致), 利用 Primer Extension System 试剂盒进行引物延伸实验^[23,25]。引物延伸产物配伍测序条带[fmol[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega)]进行 6%聚丙烯酰胺变性胶电泳, 放射自显影后分析结果。

1.5 LacZ 报告基因融合实验

将靶基因启动子区 DNA 片段克隆入 pHRP309 质粒中 β -半乳糖苷酶基因(无启动子区)的上游, 构建 LacZ 重组质粒, 并将其转入 WT 和调控子基因突变株中, 获得 LacZ 实验用菌株。LacZ 菌株按 1.2 的方法培养后, 收集菌体, 采用 β -Galactosidase Enzyme Assay System 检测不同菌株中的 β -半乳糖苷酶活性(miller units), 通过比较 miller units 数值大小来判断调控子对靶基因的调控关系^[25–27]。

1.6 凝胶阻滞(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验

PCR 扩增 16S rRNA 基因编码区 DNA 序列和靶基因启动子区 DNA 序列(引物见表 1), 产物经纯化回收后, 用 T4 多聚核苷酸激酶对 DNA 片段 5'-末端进行标记, 制备 DNA 探针^[30]。表达纯化 His-重组蛋白^[22–23,27], 将不同浓度的 His-重组蛋白与 DNA 探针在 10 μ L 结合反应体系中共同孵育, 室温 20 min 后, 进行 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, -20 °C 放射自显影后分析结果。也可将未标记的 DNA 片段与 His-重组蛋白共孵育, 经 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用 ethidium bromide (EB)染色的方法观察重组蛋白是否能与 DNA 结合^[26–27]。

1.7 DNase I 足迹(DNase I footprinting)实验

利用靶基因的 DNase I footprinting 引物对进行 PCR 扩增, 回收后作为模板, 用不同的引

物对标记探针: M13F-FAM 和靶基因 DNase I footprinting 反向引物(reverse)配对扩增,用于制备 5'-FAM 标记的编码链(coding);靶基因 DNase I footprinting 正向引物(forward)和 M13R-HXE 配对扩增,用于制备 5'-HEX 标记的模板链(non-coding)。PCR 产物回收后,与不同浓度的

His-重组蛋白在室温下孵育 30 min 后,用合适浓度的 DNase I 消化适当的时间(30–60 s)。消化后的 DNA 样品用 Beaver Beads™ PCR 纯化试剂盒(Beaver)进行回收。使用 ABI 3500XL DNA 测序仪和 GeneMarker 软件 2.2 分析消化产物和配伍的测序结果^[25–26]。

表 1 本文所用引物汇总

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Targets	Primer sequences (5'→3')
qPCR	
<i>vp1388</i>	CGTCCTTACACCTGATGAG/TGTCGAATAGCCGTTAG
<i>hcp1</i>	GGTCAACCTACTGGTCAACG/TAGTGCTCTTGCTTGCCTTG
<i>vp1400</i>	GTATTAGACACGTTGCCATC/ATCTGCTTGCCATTCG
<i>vp1409</i>	TTCTGTGCTCGACTTGTG/TTCAGTGTACTCAACCATCC
<i>calR</i>	ATGTAAAAAGAAAACCGTACA/AACACAGCAGAATGACCGTG
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC
Primer extension	
<i>calR</i>	GCAAAATATCGGTACTTCA
LacZ fusion	
<i>calR</i>	ATGTAAAAAGAAAACCGTACA/AACACAGCAGAATGACCGTG
<i>vp1388</i>	AAAGTCGACCAATGGTGAATATGCCGTG/AAGGTACCGATAGCTCGTTGGAGGAAAG
<i>hcp1</i>	GCGCGTCGACGCTATCGGGTGTAGACGCTG/GCGCGAATTCGAGTTTCACCGTTGATAGAC
<i>vp1400</i>	GAGGTCGACTTTTGCCGAAGAAATAC/TATAGAATTCGCCAATCTTTGCTCGTTCAG
<i>vp1409</i>	ATATGTCGACAACACATGGCATAAATGAGTCC/CCCGAATTCTTCTTGTGAAGTCGCTGAA
EMSA	
<i>vp1388</i>	CAATGGTGAATATGCCGTG/GATAGCTCGTTGGAGGAAAG
<i>hcp1</i>	GCTATCGGGTGTAGACGCTG/GAGTTTCACCGTTGATAGAC
<i>vp1400</i>	TTTTGCCGAAGAAATAC/GCCAATCTTTGCTCGTTCAG
<i>vp1409</i>	AACACATGGCATAAATGAGTCC/TCTTCTTGTGAAGTCGCTGAA
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC
DNase I footprinting	
<i>vp1388</i>	GTAAAACGACGGCCAGTTTGAATTTGTAACTTCTG/CAGGAAACAGCTATGACTGTAAGG ACGTAGGATAG
<i>hcp1</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCTATCGGGTGTAGACGCTG/CAGGAAACAGCTATGACGAGTTT CACCGTTGATAGAC
<i>vp1400</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTATCAACGAGTTATG/CAGGAAACAGCTATGACCTGAAACA TCCTTGTTTC
<i>vp1409</i>	GTAAAACGACGGCCAGTAGGACGATATCAATTACAC/CAGGAAACAGCTATGACCCAAATG ACATGCAATGC
M13F-FAM	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R-HEX	CAGGAAACAGCTATGAC

1.8 统计学分析方法

qPCR 和 LacZ 实验至少重复 3 次, 每次至少 3 个生物学重复, 结果用平均值 \pm 标准差 (standard deviation, SD) 表示, 利用双尾 t 检验进行统计学差异分析, $P < 0.01$ 被认为具有统计学差异。EMSA、引物延伸和 DNase I 足迹实验至少重复 2 次, 并获得相同的结果。

2 结果与分析

2.1 *calR* 基因的密度依赖性表达

将 *calR* 基因的 LacZ 重组质粒转化入 WT 中, 采用 LacZ 报告基因融合实验研究 CalR 在不同菌密度下的表达水平差异, 结果如图 1 所示: *calR* 基因的启动子活性随着细胞密度的增加而梯度增加, 且在低细胞密度时, 仍可检测到较高的 *calR* 基因启动子活性, 这表明 CalR 可在整个生长周期中发挥调控作用。

2.2 QS 系统的核心调控子 OpaR 间接激活 *calR* 基因的转录

CalR 的密度依赖性表达结果提示 *calR* 的转录可能受 QS 系统的调控。AphA 和 OpaR 是副溶血弧菌 QS 系统的 2 个核心调控子, 分别

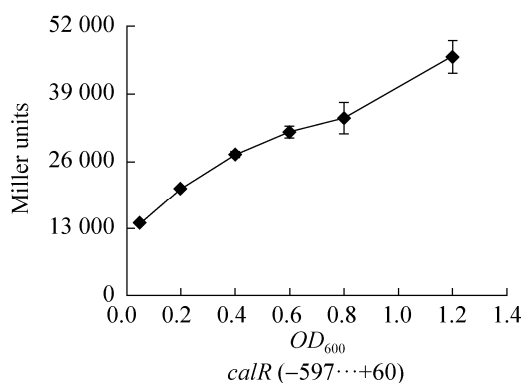


图 1 CalR 的密度依赖性表达特征

Figure 1 Cell density-dependent expression of CalR. The negative and positive numbers in the brackets indicate the nucleotide positions upstream and downstream of *calR* gene, respectively.

在低密度和高密度下高水平表达^[31]。本研究分别收取 $OD_{600}=0.15$ 和 $0.4-0.6$ 的细菌培养产物, 模拟低密度和高密度条件, 探究 AphA 和 OpaR 对 *calR* 的转录调控机制^[21]。qPCR 和引物延伸结果表明, 在 $\Delta opaR$ 中检测到的 *calR* mRNA 水平显著性低于 WT 中的, 但 $\Delta aphA$ 和 WT 之间没有显著性差异 (图 2A 和 2B)。LacZ 报告基因融合实验结果表明, 在 $\Delta opaR$ 中检测到的 *calR* 启动子活性显著性弱于 WT 中, 但在 $\Delta aphA$ 和 WT 中检测到的 *calR* 启动子区活性无显著性差异 (图 2C)。EMSA 结果显示, His-AphA 和 His-OpaR 均不能特异性地结合到 *calR* 启动子区的 DNA 序列上 (图 2D), 但更低的蛋白量却可以特异性地结合到其他基因 (如它们自身编码基因) 的上游启动子区 DNA 序列上^[22-23]。上述结果表明, 低细胞密度时, AphA 对 *calR* 转录没有调控作用, 而在高细胞密度时, OpaR 可以间接激活 *calR* 的转录。

2.3 CalR 正调控 T6SS1 相关基因的转录

已有研究表明 CalR 可以直接结合激活 T6SS2 相关基因的转录^[28]。本研究进一步探究 CalR 是否调控 T6SS1 相关基因的转录。T6SS1 基因位点含有 34 个结构基因, 构成至少 7 个推定的操纵子, 即 *vp1386-1387*、*vp1388-1390*、*vp1392-1391*、*vp1393-1406*、*vp1400-1406*、*vp1409-1407* 和 *vp1410-1420*^[14]。本研究选取 *vp1388-1390*、*vp1393-1406*、*vp1400-1406* 和 *vp1409-1407* 的首基因作为研究靶标, 收集 OD_{600} 为 1.0 时的细菌培养物, 探究 CalR 对它们的转录调控机制。qPCR 的结果显示, 在 WT 中检测到的 *vp1388*、*hcp1*(*vp1393*)、*vp1400* 和 *vp1409* 的 mRNA 丰度显著性高于 $\Delta calR$ 中的 ($P < 0.01$) (图 3A), 这说明 CalR 正调控它们的转录; 进一步采用 LacZ 报告基因实验研究 CalR 对上述基因的转录调控关系, 结果如图 3B 所示, 在

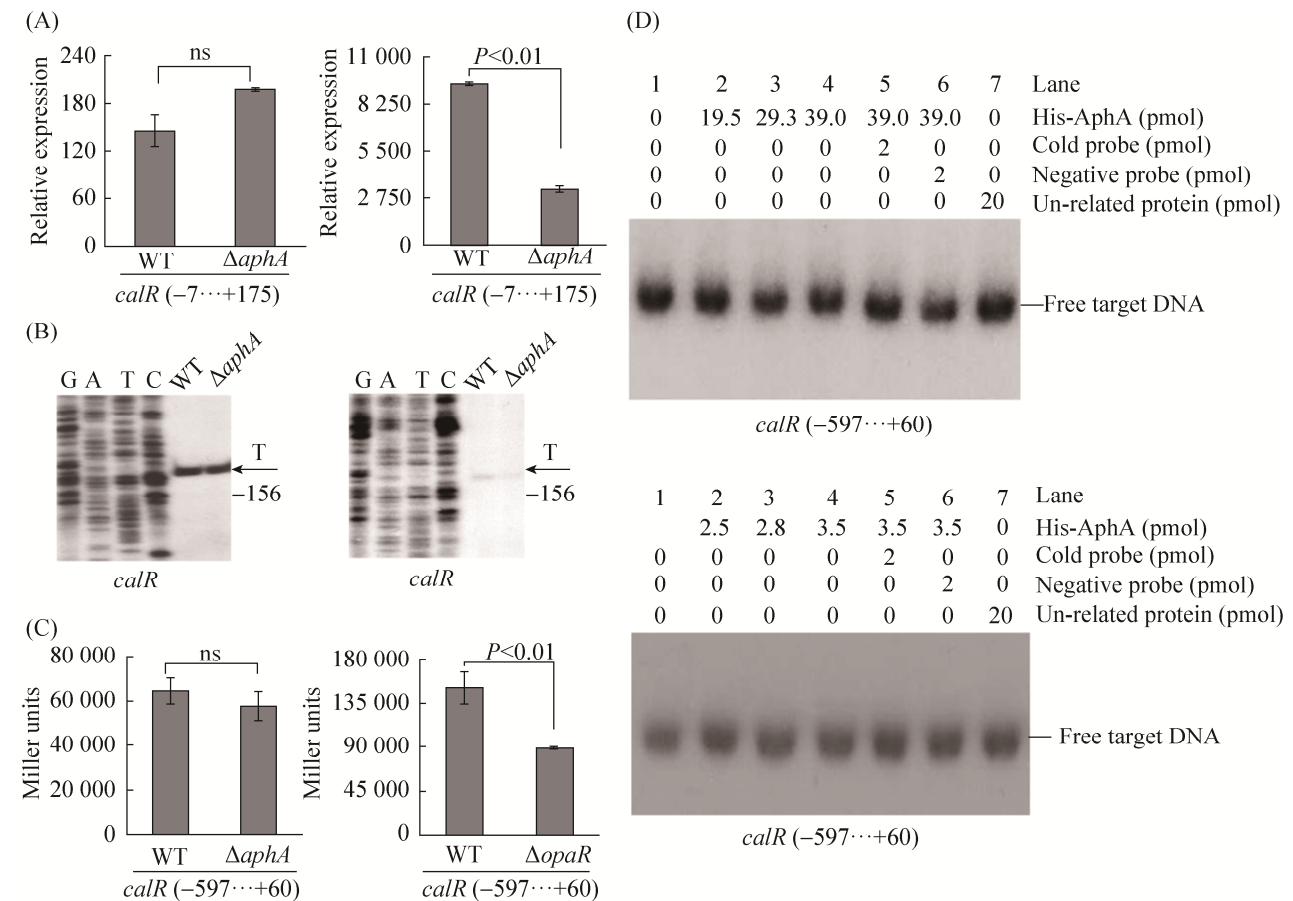


图2 AphA和OpaR对*calR*的转录调控

Figure 2 Regulation of *calR* by AphA and OpaR. A: qPCR; B: primer extension; C: *LacZ* fusion; D: EMSA. Lanes C, T, A, and G represent Sanger sequencing reactions. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of each target gene, respectively. The transcription start site was indicated by the arrow with nucleotide and position.

WT 中检测到的受 *vp1388*、*hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 启动子控制的 β -半乳糖苷酶表达水平平均显著高于 $\Delta calR$ 中的, 这进一步说明 CalR 可激活 T6SS1 相关基因的转录。总之, 上述结果表明 CalR 正调控 T6SS1 相关基因的转录。

2.4 His-CalR 能直接结合到 T6SS1 相关基因的调控序列区

PCR 扩增基因 *vp1388*、*hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 上游启动子区 DNA 序列, 采用 EMSA 实验研究 His-CalR 能否与这些 DNA 序列相互作用, 结果如图 4A 所示, His-CalR 可以结合到基因 *vp1388*、*hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 的启动子区

DNA 序列上, 且结合强度与 His-CalR 的使用量成正比, 无论何种浓度下, His-CalR 对阴性对照 16S rRNA 基因的 DNA 序列无结合作用。随后的 DNase I 足迹实验结果(图 4B)显示, His-CalR 对 *vp1388* 的启动子区 DNA 序列有 2 个结合位点, 分别位于基因上游-170 至-117 bp 和-90 至-20 bp 之间的碱基序列上(翻译起始位点为+1); His-CalR 对基因 *hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 上游调控序列均只有 1 个结合位点, 分别位于基因上游-342 至-275 bp、-193 至-121 bp 以及-341 至-232 bp 之间的碱基序列上。总之, CalR 直接激活基因 *vp1388*、*hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 的转录。

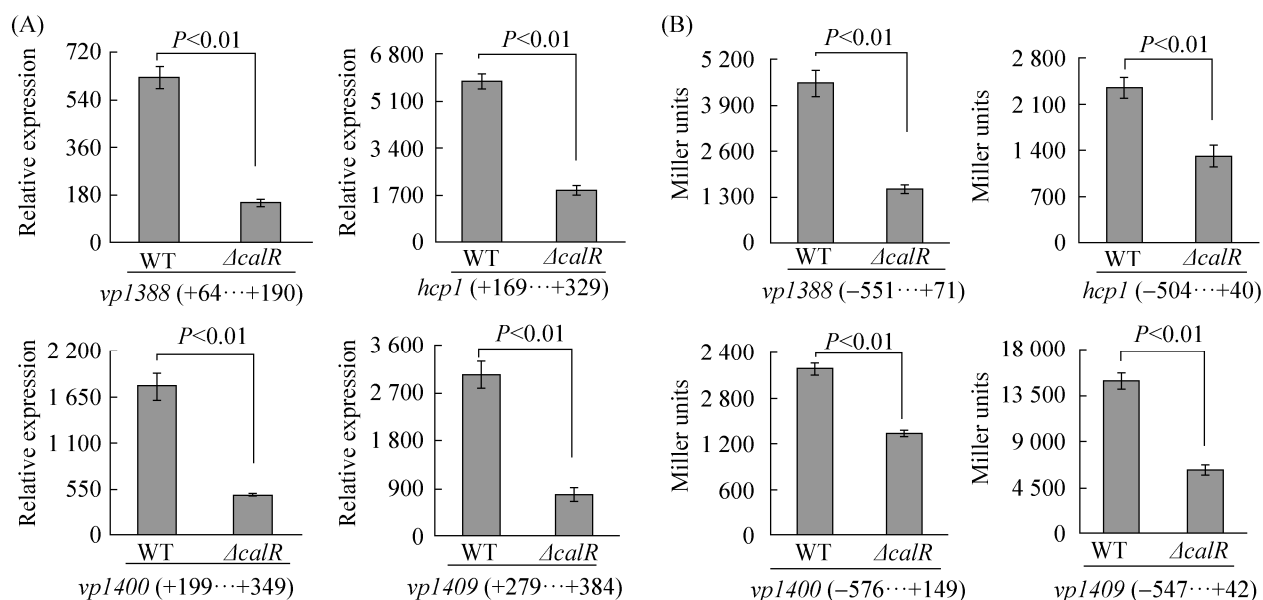


图3 CalR 激活 T6SS1 相关基因的转录

Figure 3 CalR activates the transcription of T6SS1 genes. A: qPCR; B: *LacZ* fusion. The negative and positive numbers represent the nucleotide position upstream and downstream of each target gene, respectively.

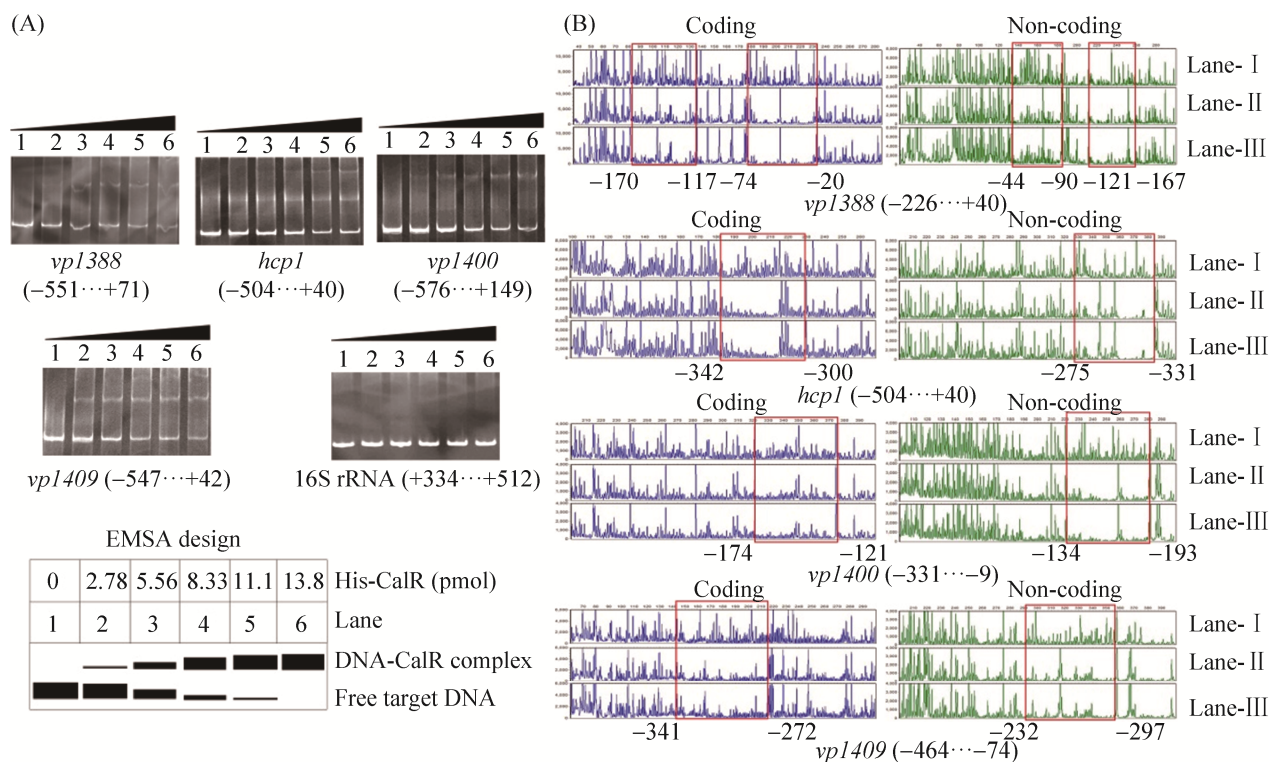


图4 His-CalR 对 T6SS1 相关基因启动子区 DNA 序列的结合活性分析

Figure 4 Binding of His-CalR to the target promoters. A: EMSA; B: DNase I footprinting. The negative and positive numbers represent the nucleotide position upstream and downstream of each target gene, respectively. The footprint regions were boxed and marked with positions. L-I, II, and III contains 0, 5.52, and 11.04 pmol His-CalR, respectively.

3 讨论与结论

本研究发现随着细胞密度的增加, 调节蛋白 CalR 的表达水平呈梯度增加模式, 且在低细胞密度时仍可检测到较高水平的 *calR* 启动子活性, 表明 CalR 可能在整个生长周期中均能发挥不同程度的调控作用。CalR 的细胞密度依赖性表达特征提示 *calR* 的转录可能与 QS 系统的调节存在联系。副溶血弧菌的 QS 系统通常通过其下游核心调控子 AphA 和 OpaR 调控基因转录, 二者分别在低细胞密度时和高细胞密度时发挥调控作用^[22-23]。然而, 在低细胞密度时 AphA 对 *calR* 的转录没有调控作用, 在高细胞密度时 OpaR 间接激活 *calR* 的转录。之前的一项研究表明, ToxR 可以直接结合到 *calR* 的启动子 DNA 序列上以激活其转录, 而 CalR 负反馈抑制 ToxR 及其自身基因的转录^[25]。由于在 M 肉汤培养基中, ToxR 也是在低细胞密度时表达水平最高^[21]。因此, ToxR 和 OpaR 对 *calR* 协同激活作用, 可能是导致 CalR 的表达水平随细胞密度的增高而增高的原因。

T6SS1 主要和副溶血弧菌的抑菌活性有关^[16,25], 其表达过程是受多种调控因子紧密调控的。T6SS1 基因座位内编码 2 个调控子蛋白, 即 VP1391 和 VP1407, 二者均可激活 T6SS1 相关基因的表达^[16]。由 *vp1028* 编码的 TfoY 也可激活 T6SS1 相关基因的表达^[32-33]。在低盐和无表面感应激活的情况下, 拟核结构蛋白 H-NS 负调控 T6SS1 相关基因的转录^[16]。此外, 在非诱导条件下, QS 核心调控子 AphA、OpaR 及 ToxR 可以协同抑制 T6SS1 相关基因的转录, 导致 T6SS1 相关基因在对数生长中期表达水平最高^[21]。本研究发现, CalR 可以直接结合到 T6SS1 相关操纵子 *vp1388-1390*、*vp1393-1406*、*vp1400-1406* 和 *vp1409-1407* 的调控区 DNA 序列上, 并激活它

们的转录。然而, 前期研究结果表明, 除非向液体培养基中添加抑制剂(如甲磺酸酯)抑制副溶血弧菌的运动性, 否则在液体环境中 T6SS1 相关基因的表达和分泌均是受限制的, 也即没有生物学活性^[9]。由于本研究使用的是 M 肉汤液体培养基、并且未向培养基中添加任何抑制剂, 因此在该条件下 T6SS1 相关基因的表达和分泌应是受限制的。然而, 敲除 *calR* 可以显著降低 T6SS1 相关基因的转录水平和启动子活性, 表明 CalR 应是非诱导条件下维持 T6SS1 基础表达所必需的调控子之一。

收集基因 *vp1388*、*hcp1*、*vp1400* 和 *vp1409* 的转录起始位点^[21]、翻译起始位点、-10 和 -35 区、CalR/ToxR^[25]/OpaR^[21]结合位点、Shine-Dalgarno (SD)等, 归纳如图 5 所示的启动子区 DNA 序列结构图。可以看出, CalR 对基因 *vp1388* 的启动子区 DNA 序列的 2 个结合位点均与 OpaR 的结合位点部分重叠, 且其中一个 CalR 结合位点覆盖转录起始位点和 -10 元件。因此, CalR 可能拮抗 OpaR 对 *vp1388* 的转录抑制作用。CalR 对 *hcp1* 启动子区 DNA 序列的结合位点位于 -10 和 -35 区的上游, 故而 CalR 对 *hcp1* 的转录正调控作用可能属于第 I 类转录激活机制^[34]。CalR 对 *vp1400* 启动子区 DNA 序列的结合位点位于 -10 区的上游, 但覆盖 -35 区和部分 ToxR 的结合位点, 因而 CalR 可能通过阻滞 ToxR 的结合而解除 ToxR 对 *vp1400* 的转录抑制作用, 也可能是通过与 RNA 聚合酶 σ 亚基羧基末端结构域相互作用而激活 *vp1400* 的转录^[35]。CalR 对 *vp1409* 启动子区 DNA 序列的结合位点覆盖 -10/-35 区和转录起始位点, 这是一种不常见的转录激活模式。CalR 是抑制子 H-NS 的拮抗因子^[27], 且 H-NS 可以直接抑制 T6SS1 相关基因(如 *hcp1*)的转录^[16,18]。因此, 推测 CalR 可能拮抗 H-NS 或其他未知调控子对 *vp1409* 转录的抑制作用。



图 5 T6SS1 相关基因启动子区结构

Figure 5 Organization of the promoters of T6SS1 genes. A: *vp1388*; B: *hsp1*; C: *vp1400*; D: *vp1409*. The DNA sequence was derived from *V. parahaemolyticus* strain RIMD 221063. The transcription start sites were indicated by bent arrows^[25]. SD sequence and -10/-35 elements were enclosed in boxes. The OpaR^[25], ToxR^[25] and CalR binding sites were underlined with solid lines, dotted lines and shadow lines, respectively.

总之, 本研究发现 *calR* 的表达具有密度依赖性表达特性, 在 OD_{600} 值从 0.05 增加到 1.20 时, 其表达水平逐渐增高。此外, 在非诱导条件下, *CalR* 能直接结合到 T6SS1 相关操纵子 *vp1388–1390*、*vp1393–1406*、*vp1400–1406* 和 *vp1409–1407* 上游调控区 DNA 序列上而促进它们的转录。本研究的结果有利于我们理解副溶血弧菌 T6SS1 的表达调控网络。

参考文献

- [1] Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 453–472.
- [2] Gallique M, Bouteiller M, Merieau A. The type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication? *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1454.
- [3] Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39): 15508–15513.
- [4] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez 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.
- [5] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528–1533.
- [6] Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MG, Orange N, Merieau A. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170770.
- [7] Coulthurst SJ. The type VI secretion system—a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology*, 2013, 164(6): 640–654.
- [8] Li P, Kinch LN, Ray A, Dalia AB, Cong Q, Nunan LM, Camilli A, Grishin NV, Salomon D, Orth K. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00737–e00717.
- [9] Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086.
- [10] Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, Lam LH, Jacobson A, Baylot V, Durand E, Journet L, Cascales E, Monack DM. *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(34): E5044–E5051.
- [11] Wang TT, Si MR, Song YH, Zhu WH, Gao F, Wang Y, Zhang L, Zhang WP, Wei GH, Luo ZQ, Shen XH. Type VI secretion system transports Zn^{2+} to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020.
- [12] Lin JS, Zhang WP, Cheng JL, Yang X, Zhu KX, Wang Y, Wei GH, Qian PY, Luo ZQ, Shen XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [13] Lovell CR. Ecological fitness and virulence features of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 1781–1794.
- [14] 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.
- [15] Yu Y, Yang H, Li J, Zhang PP, Wu BB, Zhu BL, Zhang Y, Fang WH. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(10): 827–835.
- [16] Salomon D, Klimko JA, Orth K. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 9): 1867–1873.
- [17] Sun FJ, Zhang YQ, Qiu YF, Yang HY, Yang WH, Yin Z,

- Wang J, Yang RF, Xia PY, Zhou DS. H-NS is a repressor of major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 675.
- [18] 王洁, 董新波, 高丽晓, 周冬生, 殷喆, 张义全. H-NS 蛋白对副溶血弧菌 *hcp1* 的转录调控. *微生物学报*, 2016, 56(1): 143–149.
- Wang J, Dong XB, Gao LX, Zhou DS, Yin Z, Zhang YQ. Transcriptional regulation of *hcp1* by H-NS in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 143–149. (in Chinese)
- [19] Wang L, Zhou DS, Mao PY, Zhang YQ, Hou J, Hu Y, Li J, Hou SJ, Yang RF, Wang RH, Qiu JF. Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73363.
- [20] Ma LZ, Zhang YQ, Yan XJ, Guo LP, Wang L, Qiu JF, Yang RF, Zhou DS. Expression of the type VI secretion system 1 component Hcp1 is indirectly repressed by OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific World Journal*, 2012, 2012: 982140.
- [21] Zhang YQ, Gao H, Osei-Adjei G, Yang WH, Yang HY, Yin Z, Huang XX, Zhou DS. Transcriptional regulation of the type VI secretion system 1 genes by quorum sensing and ToxR in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2005.
- [22] Sun FJ, Zhang YQ, Wang L, Yan XJ, Tan YF, Guo ZB, Qiu JF, Yang RF, Xia PY, Zhou DS. Molecular characterization of direct target genes and cis-acting consensus recognized by quorum-sensing regulator AphA in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44210.
- [23] Zhang YQ, Qiu YF, Tan YF, Guo ZB, Yang RF, Zhou DS. Transcriptional regulation of *opaR*, *qrr2-4* and *aphA* by the master quorum-sensing regulator OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34622.
- [24] Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(22): 6025–6038.
- [25] Osei-Adjei G, Gao H, Zhang Y, Zhang LY, Yang WH, Yang HY, Yin Z, Huang XX, Zhang YQ, Zhou DS. Regulatory actions of ToxR and CalR on their own genes and type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65809–65822.
- [26] Zhang YQ, Zhang Y, Gao H, Zhang LY, Yin Z, Huang XX, Zhou DS, Yang HY, Yang WH, Wang L. *Vibrio parahaemolyticus* CalR down regulates the thermostable direct hemolysin (TDH) gene transcription and thereby inhibits hemolytic activity. *Gene*, 2017, 613: 39–44.
- [27] Zhang LY, Osei-Adjei G, Zhang Y, Gao H, Yang WH, Zhou DS, Huang XX, Yang HY, Zhang YQ. CalR is required for the expression of T6SS2 and the adhesion of *Vibrio parahaemolyticus* to HeLa cells. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(6): 931–938.
- [28] Gao H, Zhang LY, Osei-Adjei G, Yang WH, Zhou DS, Huang XX, Yang HY, Yin Z, Zhang YQ. Transcriptional regulation of *cpsQ*-*mfpABC* and *mfpABC* by CalR in *Vibrio parahaemolyticus*. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(4): e00470.
- [29] Gao H, Zhang YQ, Yang L, Liu X, Guo ZB, Tan YF, Han YP, Huang XX, Zhou DS, Yang RF. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 40.
- [30] 张义全, 高鹤, 王丽, 罗张, 谭亚芳, 郭兆彪, 杨瑞馥, 周冬生. 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析. *微生物学报*, 2011, 51(5): 615–621.
- Zhang YQ, Gao H, Wang L, Luo Z, Tan YF, Guo ZB, Yang RF, Zhou DS. Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 615–621. (in Chinese)
- [31] Lu RF, Osei-Adjei G, Huang XX, Zhang YQ. Role and regulation of the orphan AphA protein of quorum sensing in pathogenic *Vibrios*. *Future Microbiology*, 2018, 13: 383–391.
- [32] Metzger LC, Matthey N, Stoudmann C, Collas EJ, Blokesch M. Ecological implications of gene regulation by TfoX and TfoY among diverse *Vibrio* species. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(7): 2231–2247.
- [33] Ben-Yaakov R, Salomon D. The regulatory network of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(7): 2248–2260.
- [34] Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 499–518.
- [35] Niu W, Kim Y, Tau G, Heyduk T, Ebright RH. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*, 1996, 87(6): 1123–1134.

(本文责编 李磊)