

mfpA 突变对副溶血性弧菌运动性和生物被膜形成的影响

朱黄琛之^{1#}, 韩周愈^{1#}, 孙宇¹, 莫秋芬¹, 陈刚¹, 杨梦华², 许光治^{1*}

1 浙江农林大学 食品与健康学院, 浙江 杭州

2 浙江农林大学 动物科技学院·动物医学院, 浙江 杭州

朱黄琛之, 韩周愈, 孙宇, 莫秋芬, 陈刚, 杨梦华, 许光治. *mfpA* 突变对副溶血性弧菌运动性和生物被膜形成的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3075-3088.

ZHU Huangchenzhi, HAN Zhouyu, SUN Yu, MO Qiufen, CHEN Gang, YANG Menghua, XU Guangzhi. Influences of *mfpA* mutation on the motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 3075-3088.

摘要: 膜融合蛋白(membrane fusion protein, MFP) *vpa1443-vpa1445* 基因簇(*mfpABC*)推测可能参与副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)生物被膜的形成, 其中 *mfpA* (*vpa1445*)编码一种含 RTX 毒素样结构域的 Ca^{2+} 结合膜外蛋白, 但其功能尚未明确。【目的】探究 *mfpA* 突变对 Vp 生物被膜形成和运动性的影响。【方法】分别构建 *mfpABC* 基因簇中 3 个基因的单突变菌株, 比较 3 个突变株运动性的变化; 在此基础上, 重点分析 *mfpA* 对细菌运动能力和生物被膜形成能力的影响, 通过 RT-qPCR 分析相关基因的表达, 并探究其对 HeLa 细胞毒性的影响。【结果】*mfpA* 突变可显著降低 Vp 的浮游(swimming)和群聚(swarming)运动能力; 结晶紫染色和扫描电镜试验表明, $\Delta mfpA$ 突变可提高菌株生物被膜的形成能力, 并增加突变株胞外多糖和胞外蛋白的含量; RT-qPCR 证实, $\Delta mfpA$ 突变株中鞭毛相关基因的表达量下降, 而胞外多糖合成相关基因的表达量上升; 此外, $\Delta mfpA$ 突变株可显著减弱 Vp 的细胞毒性。【结论】*mfpA* 突变可通过影响鞭毛和胞外多糖相关基因的表达, 降低 Vp 的运动能力, 提高生物被膜的形成能力, 削弱其细胞毒性。

关键词: *mfpA*; 浮游运动; 群聚运动; 生物被膜形成; 细胞毒性

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY17C200019)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY17C200019).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: guangzhi@zafu.edu.cn

Received: 2024-12-28; Accepted: 2025-02-12; Published online: 2025-04-17

Influences of *mfpA* mutation on the motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHU Huangchenzhi^{1#}, HAN Zhouyu^{1#}, SUN Yu¹, MO Qiufen¹, CHEN Gang¹, YANG Menghua², XU Guangzhi^{1*}

¹ College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

² College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

Abstract: The *vpal443–vpal445* gene cluster (*mfpABC*) encoding the membrane fusion protein (MFP) is hypothesized to be involved in the biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp). The gene *mfpA* (*vpal445*) encodes a Ca^{2+} -binding extracellular protein containing a repeats-in-toxin (RTX) domain, while its function is still under exploration. **[Objective]** To study the influences of *mfpA* mutation on the biofilm formation and motility of Vp. **[Methods]** The single mutants of three genes in the *mfpABC* gene cluster were constructed, and the Vp motility was compared between the three mutants and the wild type. Furthermore, the influences of *mfpA* mutation on bacterial motility and biofilm formation were analyzed in detail, and the expression of related genes was analyzed by RT-qPCR. Moreover, the cytotoxicity of $\Delta mfpA$ to HeLa cells was investigated. **[Results]** The mutation of *mfpA* significantly reduced the swimming and swarming motility of Vp. Crystal violet staining and scanning electron microscopy results showed that the mutation of *mfpA* enhanced the biofilm formation and increased the content of extracellular polysaccharides and proteins. RT-qPCR confirmed that the expression levels of flagellar genes were downregulated, while those of extracellular polysaccharide synthesis-related genes were upregulated in $\Delta mfpA$. The cytotoxicity of $\Delta mfpA$ significantly decreased compared with that of wild type. **[Conclusion]** The mutation of *mfpA* can affect the expression of genes associated with flagella and extracellular polysaccharides to reduce the motility, enhance the biofilm formation, and attenuate the cytotoxicity of Vp.

Keywords: *mfpA*; swimming motility; swarming motility; biofilm formation; cytotoxicity

副溶血性弧菌是一种革兰氏阴性食源性致病菌，主要分布于海水中，极易污染海产品，食用生的或未煮熟的海产品会引起疾病^[1]或食物中毒^[2]。副溶血性弧菌引起的食源性疾病最早在日本发现^[3]。随着食品供应链的延伸和全球气候变暖，由其引起的食物中毒案例不断增加。国家食源性疾病暴发监测系统显示，2010–2020年共上报副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发事件1 772起，累计发病27 212人^[4]，该菌已成为

我国引发食源性疾病的重要病原菌之一。

在自然界中，副溶血性弧菌会遇到营养不足、低温、高压、紫外线等多种恶劣环境^[5]。当其受到胁迫时，生物被膜和运动性是其适应环境的重要手段^[6–7]。生物被膜(biofilm)是一种由细胞外聚合物形成的结构复杂的生物群落^[8]，可直接影响病原菌与宿主细胞的黏附、定殖和侵入^[5]。生物被膜通常在抑菌剂、营养缺乏等不利环境中形成^[9]，是许多持续性细菌感染的根本原

因^[10]。浮游运动 (swimming) 和群聚运动 (swarming) 是细菌依靠鞭毛运动的 2 种主要表现形式^[11], 与病原菌的抗逆性和致病性密切相关^[7]。研究表明, 副溶血性弧菌“运动”和“定殖”的转换主要通过黏附蛋白、鞭毛等细胞膜外蛋白感应化学或物理信号^[12]。膜外蛋白可以直接参与生物被膜形成或驱动其在固体表面的运动^[13], 但大多数膜外蛋白在副溶血性弧菌“运动”和“定殖”转换中的作用还有待鉴定。

副溶血性弧菌的 *mfpABC* (*vpa1443-vpa1445*) 基因簇推测编码膜融合蛋白(membrane fusion protein, MFP), 组成一个操纵子^[14]。其中, *mfpA* (*vpa1445*) 编码一种含 RTX (repeats in toxin) 毒素样^[15]结构域的 Ca^{2+} 结合膜外蛋白, 而 *mfpB* (*vpa1444*) 和 *mfpC* (*vpa1443*) 分别编码 ABC 转运蛋白和膜融合蛋白, 组成 I 型蛋白分泌系统, 推测其负责将 MfpA 蛋白运输到胞外^[16]。虽然已有报道显示, *mfpC* 突变可显著降低副溶血性弧菌的生物被膜形成能力^[14], 但 *mfpA* 的功能尚未见报道。Moreira 等^[17]研究发现, 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的 *mfpABC* 基因簇由 *expE1*、*expD1* 和 *expD2* 编码组成一个操纵子, 其中 *expE1* 编码 RTX 结构域 Ca^{2+} 结合分泌蛋白, *expE1* 突变会导致苜蓿中华根瘤菌抑制胞外多糖合成, 影响生物被膜形成。

为全面分析副溶血性弧菌 *mfpABC* 的功能, 本研究构建了 *mfpA*、*mfpB* 和 *mfpC* 缺失突变株, 比较了各突变株对群聚运动的影响, 发现 *mfpA* 是影响副溶血性弧菌群聚运动的关键基因, 在此基础上进一步探究了 *mfpA* 影响副溶血性弧菌运动性和生物被膜形成能力的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本研究所用菌株和质粒见表 1。大肠杆菌和副溶血性弧菌菌株分别培养于 LB 培养基和含有 2% NaCl 的 LB 培养基 (LBS) 或脑心浸液肉汤培养基 (brain-heart infusion broth, BHI) 中。菌株筛选所使用的各种抗生素终浓度为: 链霉素 (streptomycin, Sm) 20 $\mu\text{g/mL}$; 卡那霉素 (kanamycin, Km) 20 $\mu\text{g/mL}$; 氯霉素 (chloramphenicol, Cm) 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 *mfpA* 序列多重比对

使用 BLAST 工具在 NCBI 蛋白质数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *mfpA* 蛋白氨基酸序列进行检索和同源性分析, 并将其与来自溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的 F0254_04995 以及苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的 *ExpE1* (SM11_pD0707) 等多个蛋白质序列用

表1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in the study

菌株和质粒 Strain and plasmid	相关特征 Relevant characteristics	来源 Source
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 Sm	Streptomycin resistance	Laboratory collection
$\Delta mfpA$	<i>mfpA</i> deletion of WT; streptomycin resistance	This study
$C\Delta mfpA$	$\Delta mfpA$ complementary strain; streptomycin resistance; chloramphenicol resistance	This study
$\Delta mfpC$	<i>mfpC</i> deletion of WT; streptomycin resistance	This study
$\Delta mfpB$	<i>mfpB</i> deletion of WT; streptomycin resistance	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 α λ pir	No resistance	Laboratory collection
<i>E. coli</i> HB101-pRK2013	Kanamycin resistance	Laboratory collection
<i>E. coli</i> pDS132	Chloramphenicol resistance	Laboratory collection
<i>E. coli</i> pBAD24	Chloramphenicol resistance	Laboratory collection

ClustalX 进行多序列比对, 再用 ESPrit 3.0 在线软件 (<http://espritch.ibcp.fr/ESPrich/cgi-bin/ESPrich.cgi>) 进行作图。

1.3 基因突变株和补偿株的构建

以副溶血性弧菌野生型 (WT) 菌株 *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633Sm 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目标基因上游和下游长度为 500–1 000 bp 的片段, 通过 Over-lap PCR

拼接上下游片段(表 2)。将拼接片段无缝克隆到质粒 pDS132 中, 转化至大肠杆菌 DH5α λpir, 再在辅助质粒 pRK2013 的帮助下通过三亲接合转化到副溶血性弧菌野生型中^[18]。用双抗(Cm 和 Sm) LBS 平板筛选后, 在 10% 蔗糖 LBS 平板划线, 以 mfpC-up-F 和 mfpC-down-R 引物鉴定突变体, 突变株分别命名为 $\Delta mfpA$ 、 $\Delta mfpB$ 和 $\Delta mfpC$ 。

以野生型为模板, 参考突变株的方法构建

表2 突变株和补偿株引物

Table 2 Information of primers for mutation and complement

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	NCBI 基因号 NCBI ID	备注 Note
mfpC-up-F	<u>ATGTGATGGGTAAAAAGGATCGATGCCGTTACCTAAACCG</u> AAAG	VP_RS22070 (vpa1443)	Upstream mutant primers of <i>mfpC</i> , the fragment length was 776 bp
mfpC-up-R	CAGTGGCTTACGACTGGCTGCTGATTGCTC		
mfpC-down-F	CAGCCAGTCGTAAGCCACTGACAGAAAGCA		Downstream mutant primers of <i>mfpC</i> , the fragment length was 995 bp
mfpC-down-R	<u>TCGCATGCGGTACCTCTAGAAGCAGAGGTAAATAAGGCAA</u> CTAA		
mfpB-up-F	<u>ATGTGATGGGTAAAAAGGATCGAGTGAAAAATAGGACGC</u> AAGCCACA	VP_RS22075 (vpa1444)	Upstream mutant primers of <i>mfpB</i> , the fragment length was 972 bp
mfpB-up-R	CCATCAAACGAAACCTGCAAGCGTGCATAG		
mfpB-down-F	TTGCAGGTTTCGTTTGATGGGTGAGGACAG		Downstream mutant primers of <i>mfpB</i> , the fragment length was 946 bp
mfpB-down-R	<u>TCGCATGCGGTACCTCTAGAAGAGCCACCACATCTTGAGC</u> AG		
mfpA-up-F	<u>ATGTGATGGGTAAAAAGGATCGAAAGCCTGAAATCCTAA</u> TGCTC	VP_RS22080 (vpa1445)	Upstream mutant primers of <i>mfpA</i> , the fragment length was 890 bp
mfpA-up-R	GTCGCCGAGATTTGCGCCTGCATCGCCTAG		
mfpA-down-F	CAGGCGCAAATCTCGGCGACAATAAAGTGA		Downstream mutant primers of <i>mfpA</i> , the fragment length was 993 bp
mfpA-down-R	<u>TCGCATGCGGTACCTCTAGAAGGTGTCGCTAACTCTGCAC</u> TA		
mfpAHB-1	<u>GGCTAGCAGGAGGAATTCACCATGGCTGCATGTAATTAAA</u> AGAAAAC		Back primers of <i>mfpA</i> , the fragment length was 779 bp
mfpAHB-2	<u>CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTAACAAATAAATCGG</u> CAC		
mfpA-IF	ATGAGCACAAGTGACAATGACA		Identification primer of <i>mfpA</i> , the fragment length was 1 659 bp
mfpA-IR	TTCTGCACGATTACTTCCAC		
pDS132-F	CTTCTAGAGGTACCGCATGCGA		PCR primers of mutant plasmid
pDS132-R	CGATCCTTTTAAACCATCACAT		
pBAD24-F	AAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAG		PCR primers of compensated plasmid
pBAD24-R	GGTACCATGGTGAATTCCTCTGCT		

下划线表示无缝克隆片段。

Seamlessly clone fragments are underlined.

补偿株 *Pbad24::mfpA* 质粒, 并通过三亲接合转移到 $\Delta mfpA$ 中。用双抗(Cm 和 Sm) LBS 平板筛选, 用引物 *mfpA*-IF 和 *mfpA*-IR 进行 PCR 验证回补, 回补成功命名为 $C\Delta mfpA$ 。

1.4 运动性测定

对 *mfpABC* 基因突变株进行运动能力初步测定。参照 Zhang 等^[19]的方法进行运动性测定, 并进行略微修改。浮游运动在含有 0.5% 琼脂的 BHI 培养基上进行, 群集运动在含有 1.0% 琼脂的 BHI 培养基上进行。3 个突变株和野生型在 LBS 液体培养基 37 °C、150 r/min 培养过夜, 培养物用 LBS 稀释至 OD_{600} 值为 0.5, 用灭菌牙签点样相应的 BHI 平板, 放置于 30 °C 培养 6 h 和 8 h 后分别测量浮游运动和群集运动的菌落直径。

对 *mfpA* 基因突变株和补偿株进行运动能力测定。将 WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 的培养过夜物用 LBS 稀释至 OD_{600} 值为 0.5, 用灭菌牙签点样至相应的 BHI 平板, 将平板在 30 °C 下培养 6 h 和 8 h 分别测量菌落的直径。

1.5 生长曲线的测定

将培养过夜的 WT、 $\Delta mfpA$ 及 $C\Delta mfpA$ 菌株转接到 LBS 液体培养基中, 稀释至 OD_{600} 值为 0.1, 于 37 °C、150 r/min 振荡培养。每隔 1 h 测定 1 次 OD_{600} 值, 连续测定 12 h, 绘制生长曲线。

1.6 结晶紫染色观察生物被膜

参照 Fan 等^[20]、Zhang 等^[21]的方法进行结晶紫染色观察生物被膜。WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 菌株于 37 °C、150 r/min 培养 12 h, 培养物稀释至 OD_{600} 值为 0.1, 加入 96 孔板中, 在 30 °C、80 r/min 下孵育 8 h。弃去培养物, 用去离子水小心清洗附着在表面的细胞 3 次, 于 50 °C 烘箱中干燥 30 min, 用 0.1% 的结晶紫染色 15 min, 然后用去离子水小心清洗 3 次, 自然干燥后, 将结合在每个孔中的结晶紫溶解于 33% 乙酸中, 用酶标仪测量 OD_{570} 。

1.7 扫描电镜观察生物被膜

参照 Wang 等^[22]的方法进行生物被膜的扫描电镜观察。WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 菌株于 37 °C、150 r/min 培养 12 h, 将培养物稀释至 OD_{600} 值为 0.1, 加入 24 孔板中(24 孔板底部置入无菌爬片), 在 30 °C、80 r/min 下孵育 8 h。用 2.5% 戊二醛固定过夜, 弃去培养物上清, 依次用 50%、70%、80%、90% 乙醇溶液脱水, 每次脱水 15 min, 再用 100% 乙醇溶液脱水 2 次, 每次脱水 30 min。最后将干燥的爬片喷金 (Hitachi) 处理, 用扫描电镜 (牛津) 观察生物被膜。

1.8 胞外聚合物测定

胞外聚合物测定参照 Zhu 等^[23]的方法进行。WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 菌株培养过夜后, 将培养物稀释至 OD_{600} 值为 0.1, 取 2 mL 菌液加入含有无菌爬片($\phi=14$ mm)的 24 孔板中, 在 30 °C 下静置 24 h 形成生物膜。采用超声波法提取胞外聚合物: 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 清洗 2 次, 再用 1 mL 预冷的 0.01 mol/L 氯化钾溶液重悬, 置于冰上低温保存, 20 kHz 间断超声 5 min, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。

苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量。取 2 mL 上清液至离心管中, 加入 1 mL 的 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸混匀, 50 °C 水浴 15 min 后迅速置于冰上, 用酶标仪测定 OD_{490} , 得到对应的胞外多糖含量。

考马斯亮蓝法测定胞外蛋白含量。取 1 mL 上清液与 5 mL 考马斯亮蓝染液混匀, 用酶标仪测定 OD_{595} , 计算胞外蛋白含量。

1.9 *mfpA* 鞭毛和生物被膜转录水平验证

通过 RT-qPCR 检测 $\Delta mfpA$ 基因突变对副溶血性弧菌生物被膜和鞭毛相关基因转录水平的影响。WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 菌株于 37 °C、150 r/min 培养 12 h, 取 1 mL 菌液用 TRIzol 法提取总 RNA (Vazyme 公司)。使用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒

(Vazyme 公司)进行 cDNA 合成。根据表 3 的引物,以 *gyrB* 为内参基因,使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Vazyme 公司),在 StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific 公司)中进行 RT-qPCR 检测目的基因 mRNA 水平。

1.10 细胞毒性试验

HeLa 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞毒性测定按照 Chimalapati 等^[24]、Marie 等^[25]的方法进行。简而言之,将 HeLa 细胞接种于 96 孔板中,培养过夜至 80%–90% 覆盖率,然后将细菌加入预热的含有 1% 胎牛血清的无酚红 DMEM 中,制备成感染溶液。用 PBS 洗涤预培养的 HeLa 细胞,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10 加入感染溶液,将细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别孵育 2 h 和

4 h。感染后,用 LDH (lactate dehydrogenase)细胞毒性检测试剂盒定量乳酸脱氢酶释放至培养基中的量。最后,用酶标仪读取 OD₄₉₀,测量 LDH 浓度。实验重复 6 次,取其平均值。

1.11 数据分析

所有实验均至少重复 3 次,数据以平均值±标准差表示,星号表示 *P* 值,*:*P*≤0.05;**:*P*≤0.01;***:*P*≤0.001;****:*P*≤0.000 1。使用 GraphPad Prism 9 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),分析 WT、Δ*mfpA* 和 CΔ*mfpA* 菌株之间的差异。

2 结果与分析

2.1 *mfpA* 突变降低副溶血性弧菌浮游运动和群集运动能力

为分析 *mfpABC* 对副溶血性弧菌运动性的影响,构建了 *mfpABC* 基因单突变株。分别以 *mfpC*-up-F/*mfpC*-down-R、*mfpB*-up-F/*mfpB*-down-R 和 *mfpA*-IF/*mfpA*-IR 为引物(表 2),通过 PCR 鉴定突变株。如图 1 所示,野生型和突变株中扩增片段的大小与理论值基本一致,表明 Δ*mfpC*、Δ*mfpB* 和 Δ*mfpA* 突变株构建成功。

Δ*mfpA*、Δ*mfpB* 和 Δ*mfpC* 突变株对运动性的影响如图 2 所示,与野生型相比,Δ*mfpA* 突变株的浮游运动和群集运动能力均显著下降,而 Δ*mfpC* 和 Δ*mfpB* 则无明显变化,表明 *mfpA* 基因突变显著减弱了副溶血性弧菌的运动性。因此本研究重点围绕 *mfpA* 的功能展开了后续研究。

2.2 MfpA 氨基酸序列分析

MfpA 蛋白编码了 196 个氨基酸残基,其中包含多个 GGXGXDXUX 重复序列(其中 U 是任何疏水氨基酸) (RTX)^[15],且重复的基序呈现出平行的 β-折叠结构。将 MfpA 蛋白与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的 F0254_04995 以及苜蓿中华根瘤菌的 *ExpE1* 两个推定的 Ca²⁺结合蛋白进

表3 RT-qPCR引物

Table 3 Information of primers used in RT-qPCR

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>gyrB</i> -RT-F	TGACAGCCGTTGTTTCGGTA
<i>gyrB</i> -RT-R	AGTCTGCAAGTTTGCCTGGT
vp0790-RT-F	ACATCAACGGTCAAACAGA
vp0790-RT-R	AATGACACTTCGCCTTCTA
vpa1403-RT-F	CAAAGGACTAATTCGTTTC
vpa1403-RT-R	AACAATGAACATTTGCTC
vp1473-RT-F	TGATGATGACGCAAATGT
vp1473-RT-R	GCGGTGGAATGTTACTCT
vp1406-RT-F	CAAAGTGGTGCGACAGAC
vp1406-RT-R	GGCGATAAACCCATTCTT
vp1468-RT-F	GGACAGATGCTCAGGCTAT
vp1468-RT-R	CAGGCTTTCGCTAACTCG
vp2259-RT-F	AAATCGGTGCTGATAACG
vp2259-RT-R	AGGCCAAGTTCACCAGAC
vp2224-RT-F	ACGCGGATAAAGAAGTGC
vp2224-RT-R	CGAATCATCGGAAGGTTG

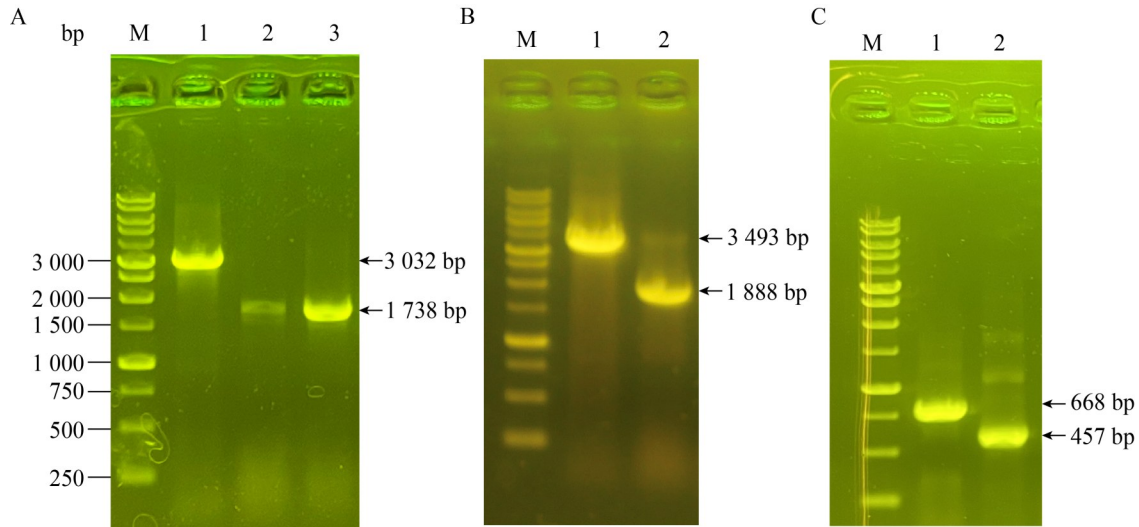


图1 $\Delta mfpA$ 、 $\Delta mfpB$ 和 $\Delta mfpC$ 突变PCR鉴定

Figure 1 Identification of $\Delta mfpA$ – $\Delta mfpC$. A: $\Delta mfpC$; B: $\Delta mfpB$; C: $\Delta mfpA$. Lane M: DNA marker; Lane 1: WT; Lanes 2, 3: Mutant strains.

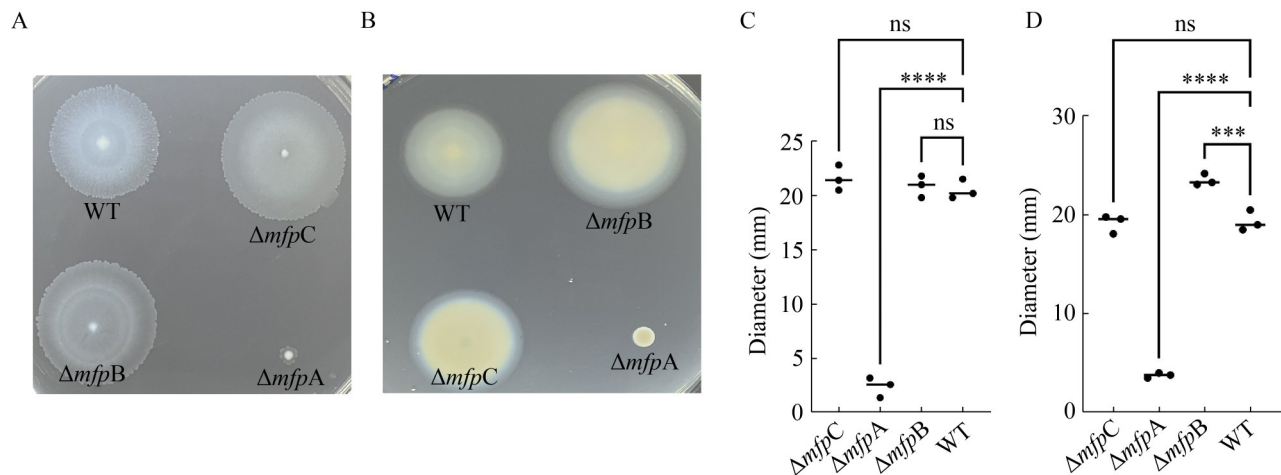


图2 $\Delta mfpA$ 、 $\Delta mfpB$ 和 $\Delta mfpC$ 突变株运动性能力比较。A: 浮游运动平板; B: 群集运动平板; C: 浮游运动菌落直径; D: 群集运动菌落直径。

Figure 2 Comparison of the motility ability of mutant strains. A: Swimming plate; B: Swarming plate; C: Motility zone diameter measured on swimming patterns; D: Motility zone diameter measured on swarming patterns. ns: No significance; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

行多重比对。如图3所示, MfpA蛋白与其他2个推定的 Ca^{2+} 结合蛋白具有多个高度保守的 GGXGXDXUX 重复序列, 这种特殊的序列结构被推测为 Ca^{2+} 的特定结合区域^[26]。

2.3 $mfpA$ 突变株和补偿株运动能力测定

为进一步分析 $mfpA$ 基因的功能, 本研究构建了 $mfpA$ 的补偿株。使用引物 $mfpA$ -IF/ $mfpA$ -IR,

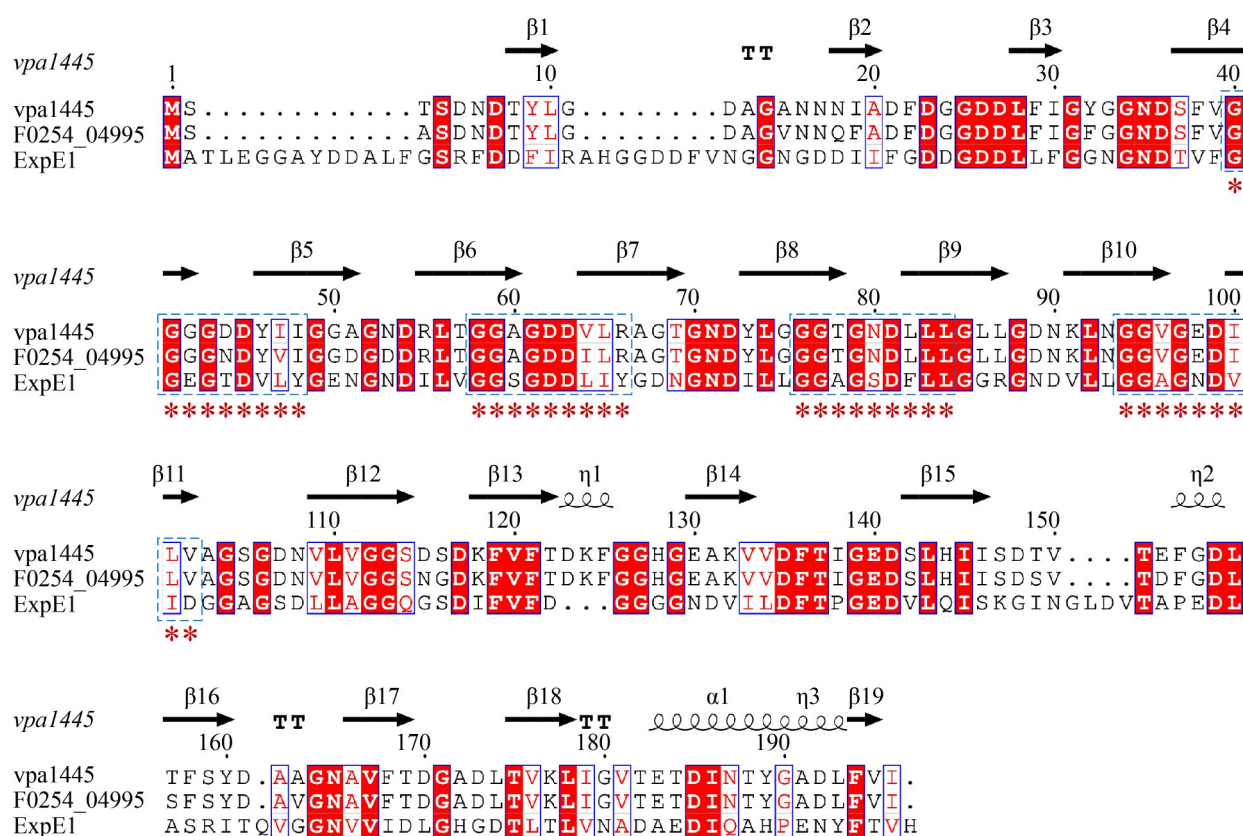


图3 MfpA序列多重比对

Figure 3 MfpA multiple sequence alignment. *: GGXGXDXUX: Repetitive sequences.

通过 PCR 鉴定补偿菌株(表 2)。如图 4A 所示, 补偿株片段大小恢复至野生型水平, 表明 $C\Delta mfpA$ 构建成功。

如图 4B 所示, 突变株 $\Delta mfpA$ 和补偿株 $C\Delta mfpA$ 的生长速度与野生株 WT 相比无显著性差异, 表明 $mfpA$ 基因的突变对副溶血性弧菌的生长并无影响。

$mfpA$ 基因的突变显著降低了浮游运动和群集运动能力。如图 5 所示, $\Delta mfpA$ 的浮游运动直径和群集运动直径分别比 WT 下降了 96.8% 和 86.1%, 而 $C\Delta mfpA$ 则分别回升了 43.5% 和 33.3%, 由此可知 $\Delta mfpA$ 的浮游运动和群集运动能力显著减弱, 而 $C\Delta mfpA$ 的浮游运动和群集运动能力虽未完全恢复至野生型水平, 但也表现出明显的回补趋势。上述结果说明, $mfpA$ 突

变株运动能力的减弱是由于 $mfpA$ 基因突变所致。

2.4 $mfpA$ 突变增加生物被膜形成能力

采用结晶紫染色法研究 $mfpA$ 基因是否影响副溶血性弧菌生物被膜的形成。如图 6 所示, $\Delta mfpA$ 的结晶紫染色显著增强, 而 $C\Delta mfpA$ 的结晶紫染色恢复至 WT 水平。结果表明, $mfpA$ 基因的突变增加了副溶血性弧菌的生物被膜形成能力。

扫描电镜进一步观察生物被膜, 以验证 $mfpA$ 基因对副溶血性弧菌生物被膜的影响。如图 6C 所示, 与 WT 相比, $\Delta mfpA$ 突变株的细胞数量显著增加, 而 $C\Delta mfpA$ 的细胞数量则恢复至野生型水平。这进一步验证了 $mfpA$ 基因的突变显著影响副溶血性弧菌生物被膜的形成。

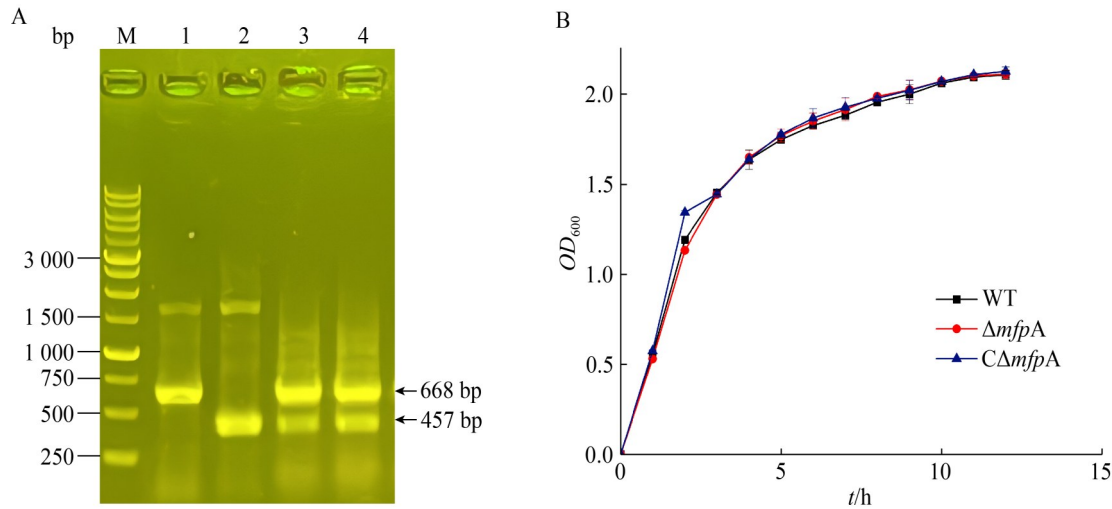


图4 $C\Delta mfpA$ 的鉴定(A)和生长曲线测定(B)

Figure 4 Identification of $C\Delta mfpA$ (A) and growth curves determination (B). M: DNA marker; 1: WT; 2: $\Delta mfpA$; 3, 4: $C\Delta mfpA$.

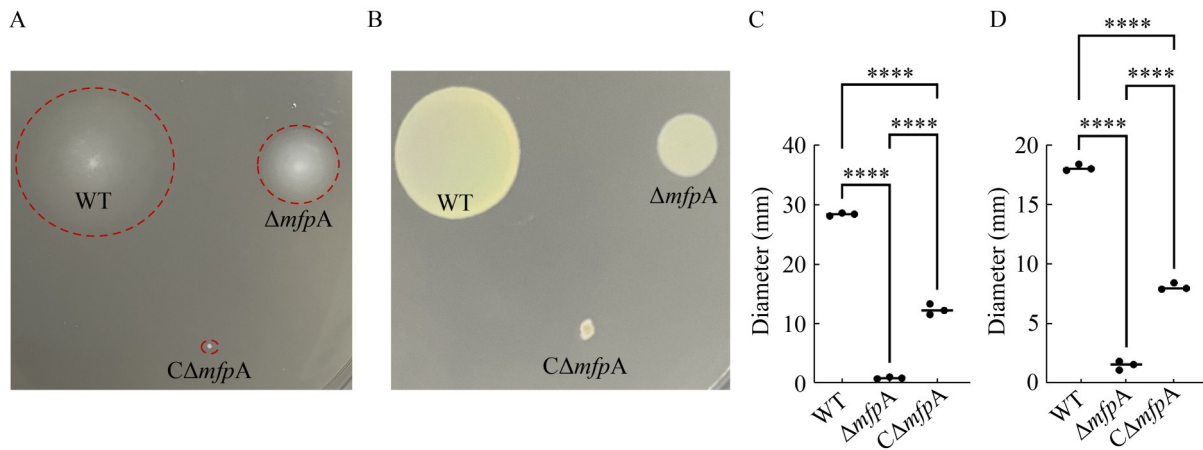


图5 WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 运动能力比较。A: 浮游运动平板; B: 群集运动平板; C: 浮游运动菌落直径; D: 群集运动菌落直径。

Figure 5 Comparison of the motility ability of WT, $\Delta mfpA$, and $C\Delta mfpA$. A: Swimming plate; B: Swarming plate; C: Motility zone diameter measured on swimming patterns; D: Motility zone diameter measured on swarming patterns. ****: $P \leq 0.0001$.

2.5 $mfpA$ 基因突变增加 EPS 形成

通过鉴定副溶血性弧菌生物被膜中胞外多糖和胞外蛋白的含量, 验证 $mfpA$ 基因缺失是否影响胞外多糖(extracellular polymeric substances, EPS)的形成。如图 7 所示, 与 WT 相比,

$\Delta mfpA$ 的胞外多糖和胞外蛋白成分含量分别增加了 134.73% 和 219.56%, 而 $C\Delta mfpA$ 的胞外多糖和胞外蛋白成分含量则恢复至野生型水平。结果表明, $mfpA$ 基因缺失能够显著提高生物被膜中 EPS 的形成。

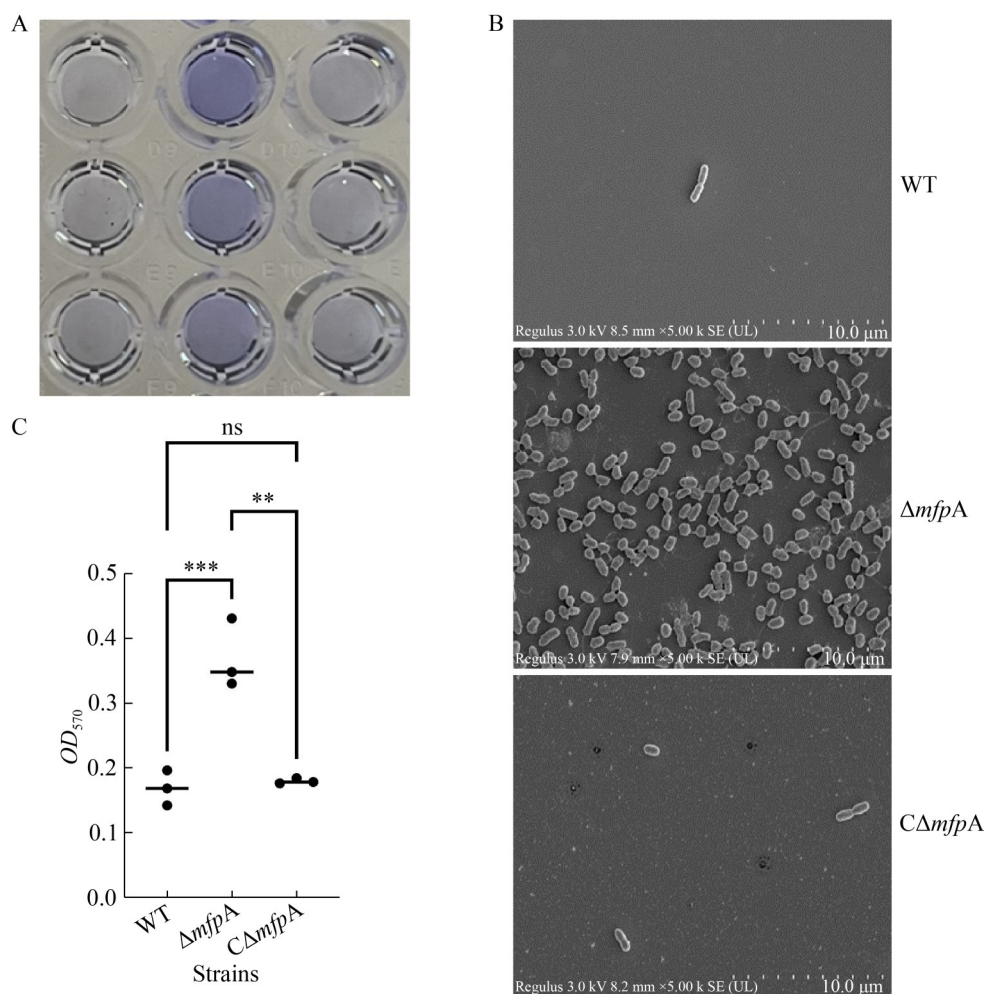


图6 WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 生物被膜形成能力比较。A: 结晶紫染色情况; B: OD_{570} 测量生物被膜形成能力; C: 扫描电镜观察生物被膜形成情况。

Figure 6 Comparison of biofilm formation ability among WT, $\Delta mfpA$, and $C\Delta mfpA$. A: Crystal violet staining; B: OD_{570} measures the ability of biofilm formation; C: Scanning electron microscopy observation of biofilm formation. ns: No significance; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

2.6 鞭毛和生物被膜转录水平验证

通过 RT-qPCR 检测 WT、 $\Delta mfpA$ 、 $C\Delta mfpA$ 3 个菌株的基因转录表达情况, 结果如图 8 所示。与 WT 相比, $\Delta mfpA$ 菌株中极性鞭毛相关基因^[27]*vp0790*、*vp2224* 和 *vp2259* 的 mRNA 转录水平显著下调, 而在 $C\Delta mfpA$ 菌株中则恢复至野生型水平。相反, $\Delta mfpA$ 菌株中 EPS 相关基因^[28]*vp1403*、*vp1406*、*vp1468*、*vp1473* 的 mRNA 水平显著上调, 其中 *vp1473* 上调最为显

著, 而在 $C\Delta mfpA$ 菌株中则表现出明显的回补趋势。这些结果再次表明, *mfpA* 基因影响副溶血性弧菌极性鞭毛合成和生物被膜形成相关基因的转录。

2.7 *mfpA* 缺失降低了细胞毒性

通过测定宿主细胞 LDH 的释放, 验证 *mfpA* 基因突变是否影响副溶血性弧菌对 HeLa 细胞的细胞毒性。结果如图 9 所示, 与 WT 相比, $\Delta mfpA$ 在 2 h 和 4 h 的细胞毒性分别降低了

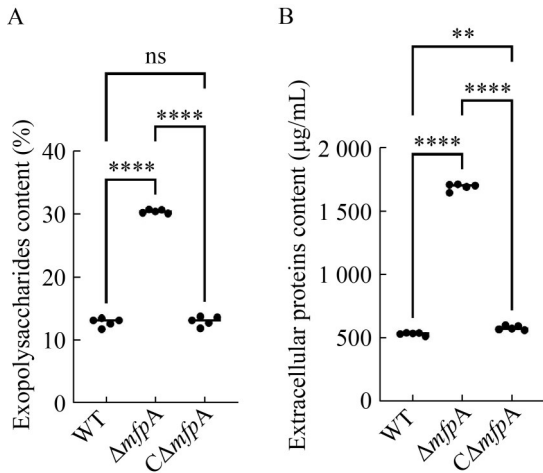


图7 WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 生物被膜的胞外多糖(A)和胞外蛋白(B)含量

Figure 7 The content of extracellular polysaccharides (A) and extracellular proteins (B) in the biofilms of WT, $\Delta mfpA$, and $C\Delta mfpA$. ns: No significance; **: $P \leq 0.01$; ****: $P \leq 0.0001$.

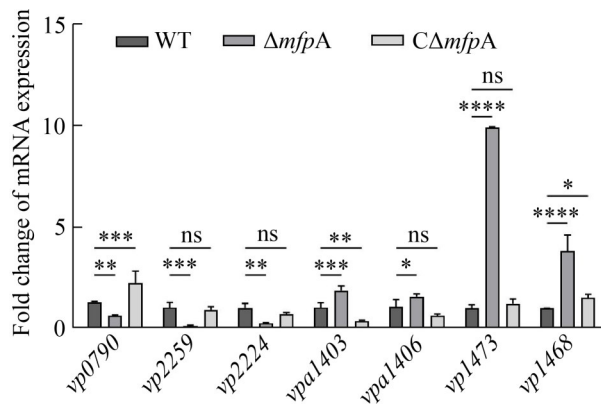


图8 *mfpA*基因对鞭毛和胞外多糖相关基因转录的影响

Figure 8 The impact of *mfpA* on the transcription of flagella and EPS. ns: No significance; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$; ****: $P \leq 0.0001$.

81.56% 和 87.93%。然而, $C\Delta mfpA$ 在 2 h 与野生型相比并无显著差异, 在 4 h 时仅比野生型仅降低了 27.59%。这表明 *mfpA* 基因突变显著降低了副溶血性弧菌对 HeLa 细胞的细胞毒性。

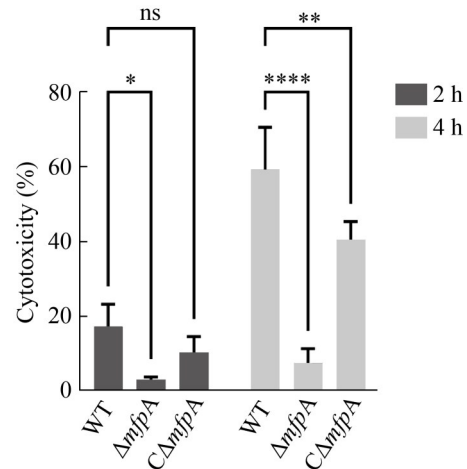


图9 WT、 $\Delta mfpA$ 和 $C\Delta mfpA$ 对HeLa细胞的毒性测定结果

Figure 9 Comparison of cytotoxic effects of WT, $\Delta mfpA$, and $C\Delta mfpA$. ns: No significance; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ****: $P \leq 0.0001$.

3 讨论与结论

副溶血性弧菌可通过浮游运动、群集运动以及在固体表面形成生物被膜等^[7,29-30]多种方式释放多种毒力因子, 从而导致细菌性食源性疾病, 严重时可导致死亡^[31]。*mfpA* 编码一种潜在的钙结合蛋白, 含有 Ca^{2+} 特定结合区域^[26,32], 可能在跨膜易位后的分子折叠中起作用^[26], 或导致蛋白质构象改变从而有利于细胞膜结合^[33]。因此, *mfpA* 的突变可能导致细胞稳定性下降, 进而影响其生物被膜的形成。与 *mfpA* 功能相似的基因 *expE1* 已被证实是中华根瘤菌生物被膜和胞外多糖合成所必需的^[17], 但 *mfpA* 的功能尚未深入研究。因此, 研究 *mfpA* 对副溶血性弧菌生物被膜和运动性的影响可为研究其环境适应性提供新的思路。

研究表明, 细菌的运动性可增加细菌细胞间的物质交换、环境适应性和抗生素耐药性^[34-35], 并与致病性密切相关^[36]。副溶血性弧菌的双鞭毛系统在其运动性和宿主定殖中起着至关重要的作用^[37-38]。本研究通过突变 *mfpABC*

基因簇来研究其对运动性的影响, 结果表明, 与野生型(WT)相比, $\Delta mfpC$ 和 $\Delta mfpB$ 的运动能力并无显著差异, 而 $\Delta mfpA$ 的浮游运动和群集运动能力显著下降(图 2)。进一步构建 $mfpA$ 基因补偿株后发现, $C\Delta mfpA$ 表现出明显的回补趋势(图 5)。这表明 $mfpA$ 基因突变显著影响副溶血性弧菌的运动性。RTX 蛋白通过 ABC 转运蛋白和膜融合蛋白形成的组装体运送到胞外从而产生活性^[15], 因此推测 $\Delta mfpC$ 和 $\Delta mfpB$ 运动能力与 WT 无显著差异的原因可能是 $mfpA$ 可通过其他 I 型分泌系统运送到胞外。RT-qPCR 分析显示, $\Delta mfpA$ 中鞭毛相关基因 *vp0790*、*vp2259* 和 *vp2224* 的 mRNA 水平显著下调, 而细菌运动性与鞭毛基因表达密切相关^[39], 这进一步证实了 $mfpA$ 基因对副溶血性弧菌浮游运动和群集运动的显著影响。

生物被膜是一种黏附于介质表面的生物群落^[8], 可增强细菌对外界不利环境^[40]和宿主免疫系统的抵抗力^[41]。本研究对 $mfpA$ 基因的生物被膜形成能力进行了研究。结晶紫定量分析表明, $mfpA$ 基因突变显著增强了副溶血性弧菌的生物被膜形成能力(图 6)。扫描电镜观察也发现, $mfpA$ 基因突变使细胞数量显著增加, 这进一步证实了 $mfpA$ 对生物被膜形成的显著影响。EPS 是成熟生物被膜的主要成分之一^[42], 可增强生物被膜的稳定性^[43], 在生物被膜形成中起关键作用^[16]。EPS 含量测定结果显示, 与野生型相比, $\Delta mfpA$ 的胞外多糖和胞外蛋白成分含量显著增加(图 7)。RT-qPCR 分析也显示, EPS 相关基因 *vpa1406*、*vpa1403*、*vpl473*、*vpl468* 的 mRNA 水平显著上调, 说明 $mfpA$ 基因突变增加了 EPS 含量, 从而显著影响了生物被膜的形成。研究表明, 副溶血性弧菌群集运动的减少会导致生物被膜形成增强^[44-45], 这与 $\Delta mfpA$ 的表型一致。因此, $mfpA$ 基因突变可能通过导致细胞稳定性下降、c-di-GMP 和群体感应等信号失调, 进而打破生物被膜形成与扩散的平衡, 导致群集运动减少和生物被膜增强, 其具体作用机制

尚需进一步探究。

副溶血性弧菌作为一种食源性致病菌, 其对宿主细胞的作用与其在宿主体内的定殖和侵袭能力密切相关^[46]。为探究 $mfpA$ 基因是否影响副溶血性弧菌的定殖和侵袭能力, 本研究进行了细胞毒性试验。结果表明, $mfpA$ 基因突变显著降低了副溶血性弧菌的细胞毒性(图 9), 而 $C\Delta mfpA$ 的细胞毒性则表现出明显的回补趋势。Isenberg 等^[47]研究表明, 细菌生物被膜的增加会减弱其扩散和定殖能力。因此 $mfpA$ 可能通过影响生物被膜的形成, 进而减弱了细胞毒性。

综上所述, 本研究通过对 $mfpA$ 基因的生物特性和细胞毒性分析发现, $mfpA$ 基因突变并不影响细菌的生长特性, 但显著减弱了其运动能力和细胞毒性, 同时显著增强了生物被膜形成能力和胞外多糖及胞外蛋白的含量, 表明 $mfpA$ 作为膜融合蛋白基因簇中的一个基因, 可能通过影响生物被膜形成与扩散的平衡, 进而影响细菌的运动性和细胞毒性, 其具体作用机制和分子机制尚需要进一步研究。

作者贡献声明

朱黄琛之: 研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改; 韩周愈: 研究构思和设计、数据收集和处理、协助实验操作; 孙宇: 协助实验操作、参与论文讨论; 莫秋芬: 参与论文讨论、提供技术支持; 陈刚: 参与论文讨论、提供技术支持; 杨梦华: 研究构思和设计、提供技术支持、参与论文讨论; 许光治: 研究构思和设计、论文撰写和修改、提供技术支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HLADY WG, KLONTZ KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1996, 173(5): 1176–1183.

- [2] LI MZ, XU HY, TIAN YQ, ZHANG YK, JIAO XN, GU D. Comparative genomic analysis reveals the potential transmission of *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater food to humans[J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104277.
- [3] PARANJPYE R, HAMEL OS, STOJANOVSKI A, LIERMANN M. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(24): 8631-8638.
- [4] 吴鹏, 刘继开, 戴月, 陈莉莉, 黄峥, 梁骏华, 付萍, 马洁, 郭云昌, 李宁. 2010–2020年中国副溶血性弧菌引发食源性疾病暴发调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 73-78.
WU P, LIU JK, DAI Y, CHEN LL, HUANG Z, LIANG JH, FU P, MA J, GUO YC, LI N. Investigation of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* in China's Mainland from 2010 to 2020[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(1): 73-78 (in Chinese).
- [5] YIN W, WANG YT, LIU L, HE J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3423.
- [6] ASHRAFUDOUILLA M, MIZAN MFR, HA AJ, PARK SH, HA SD. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103500.
- [7] WADHWA N, BERG HC. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(3): 161-173.
- [8] HAN N, MIZAN MFR, JAHID IK, HA SD. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature[J]. Food Control, 2016, 70: 161-166.
- [9] LIU M, ZHU XY, ZHANG C, ZHAO Z. LuxQ-LuxU-LuxO pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiological Research, 2021, 250: 126791.
- [10] CHEN BW, HUANG JM, LI HH, ZENG QH, WANG JJ, LIU HQ, PAN YJ, ZHAO Y. Eradication of planktonic *Vibrio parahaemolyticus* and its sessile biofilm by curcumin-mediated photodynamic inactivation[J]. Food Control, 2020, 113: 107181.
- [11] KEARNS DB. A field guide to bacterial swarming motility[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 634-644.
- [12] SHANGGUAN W, XIE T, ZHANG R, LU C, HAN X, ZHONG Q. Anti-biofilm potential of kefir-derived *Lactobacillus paracasei* L10 against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(6): 750-758.
- [13] BAE N, PARK HJ, PARK H, KIM M, HAN SW. Deciphering the functions of the outer membrane porin OprBXo involved in virulence, motility, exopolysaccharide production, biofilm formation and stress tolerance in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(12): 2527-2542.
- [14] ZHOU DS, YAN XJ, QU F, WANG L, ZHANG YQ, HOU J, HU Y, LI J, XIN SJ, QIU JF, YANG RF, MAO PY. Quorum sensing modulates transcription of *cpsQ-mfpABC* and *mfpABC* in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(3): 458-463.
- [15] LINHARTOVÁ I, BUMBA L, MAŠÍN J, BASLER M, OSIČKA R, KAMANOVÁ J, PROCHÁZKOVÁ K, ADKINS I, HEJNOVÁ-HOLUBOVÁ J, SADÍLKOVÁ L, MOROVÁ J, SEBO P. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(6): 1076-1112.
- [16] ENOS-BERLAGE JL, GUVENER ZT, KEENAN CE, McCARTER LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(4): 1160-1182.
- [17] MOREIRA LM, BECKER JD, PÜHLER A, BECKER A. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan[J]. Microbiology, 2000, 146(Pt 9): 2237-2248.
- [18] 姚宁, 鲁重, 王菲, 钟孝俊, 杨梦华. 双组分系统 EnvZ/OmpR 促进副溶血弧菌抵抗碱胁迫的作用机制[J]. 微生物学报, 2022, 62(12): 5043-5055.
YAO N, LU Z, WANG F, ZHONG XJ, YANG MH. The two-component system EnvZ/OmpR mediates alkaline stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(12): 5043-5055 (in Chinese).
- [19] ZHANG YB, LIU HH, GU D, LU XX, ZHOU XH, XIA XD. Transcriptomic analysis of PhoR reveals its role in regulation of swarming motility and T3SS expression in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiological Research, 2020, 235: 126448.
- [20] FAN QX, YUAN YH, ZHANG T, SONG W, SHENG QL, YUE TL. Inhibitory effects of lactobionic acid on *Vibrio parahaemolyticus* planktonic cells and biofilms[J]. Food Microbiology, 2022, 103: 103963.
- [21] ZHANG MM, XUE XF, LI X, WU QM, ZHANG TT, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. QsvR and OpaR coordinately repress biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1079653.
- [22] WANG JJ, HE TT, CHEN L, XU GZ, DONG SL, ZHAO Y, ZHENG HM, LIU Y, ZENG QH. Antibacterial efficiency of the curcumin-mediated photodynamic inactivation coupled with L-arginine against *Vibrio parahaemolyticus* and its application on shrimp[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 411: 110539.
- [23] ZHU WX, LIU JX, ZHANG YY, ZHAO DY, LI SG, DOU HZ, WANG HS, XIA XD. The role of *rcpA* gene in regulating biofilm formation and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 418: 110714.
- [24] CHIMALAPATI S, LAFRANCE AE, CHEN LM, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus*: basic techniques for growth,

- genetic manipulation, and analysis of virulence factors[J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2020, 59(1): e131.
- [25] MARIE YEUNG PS, WIEDMANN M, BOOR KJ. Evaluation of a tissue culture-based approach for differentiating between virulent and avirulent *Vibrio parahaemolyticus* strains based on cytotoxicity[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(2): 348-354.
- [26] BAUMANN U, WU S, FLAHERTY KM, McKAY DB. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif[J]. *The EMBO Journal*, 1993, 12(9): 3357-3364.
- [27] McCARTER LL. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 7(1/2): 18-29.
- [28] CHEN L, ZHANG MM, LI X, WU QM, XUE XF, ZHANG TT, LU RF, ZHANG YQ. *AphA* directly activates the transcription of polysaccharide biosynthesis gene *scvE* in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Gene*, 2023, 851: 146980.
- [29] STEWART BJ, McCARTER LL. Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(15): 4508-4518.
- [30] MIZAN MFR, JAHD IK, KIM M, LEE KH, KIM TJ, HA SD. Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation[J]. *Biofouling*, 2016, 32(4): 497-509.
- [31] MARIE YEUNG PS, BOOR KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(2): 74-88.
- [32] BINET R, LÉTOFFÉ S, GHIGO JM, DELEPELAIRE P, WANDERSMAN C. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters: a review[J]. *Gene*, 1997, 192(1): 7-11.
- [33] BAKÁS L, VEIGA MP, SOLOAGA A, OSTOLAZA H, GOÑI FM. Calcium-dependent conformation of *E. coli* alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1368(2): 225-234.
- [34] BHATTACHARYYA S, WALKER DM, HARSHEY RM. Dead cells release a 'necrosignal' that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4157.
- [35] FREITAS C, GLATTER T, RINGGAARD S. The release of a distinct cell type from swarm colonies facilitates dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* in the environment[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(1): 230-244.
- [36] RAMAN V, van DESSEL N, O'CONNOR OM, FORBES NS. The motility regulator *flhDC* drives intracellular accumulation and tumor colonization of *Salmonella*[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 44.
- [37] KHAN F, TABASSUM N, ANAND R, KIM YM. Motility of *Vibrio* spp.: regulation and controlling strategies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(19): 8187-8208.
- [38] ZHANG P, JI L, YAN W, CHEN LP, ZHU XH, LU ZH, DONG FF. Whole-genome sequencing and transcriptome-characterized mechanism of streptomycin resistance in *Vibrio parahaemolyticus* O10:K4[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2024, 117: 105540.
- [39] KIM YK, McCARTER LL. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(13): 3693-3704.
- [40] ARUNKUMAR M, Lewis OSCAR F, THAJUDDIN N, PUGAZHENDHI A, NITHYA C. *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* spp.: a significant threat in aquaculture[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 213-223.
- [41] RICCIARDI BF, MUTHUKRISHNAN G, MASTERS E, NINOMIYA M, LEE CC, SCHWARZ EM. *Staphylococcus aureus* evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: biofilm and beyond[J]. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 2018, 11(3): 389-400.
- [42] KUMAR CG, ANAND SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 42(1/2): 9-27.
- [43] GONZÁLEZ-RIVAS F, RIPOLLES-AVILA C, FONTECHA-UMAÑA F, RÍOS-CASTILLO AG, RODRÍGUEZ-JEREZ JJ. Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(5): 1261-1276.
- [44] YILDIZ FH, VISICK KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109-118.
- [45] ZHANG YQ, QIU Y, GAO H, SUN JF, LI X, ZHANG MM, XUE XF, YANG WH, NI B, HU LF, YIN Z, LU RF, ZHOU DS. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676436.
- [46] NAVARRE WW, SCHNEEWIND O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 174-229.
- [47] ISENBERG RY, CHRISTENSEN DG, VISICK KL, MANDEL MJ. High levels of cyclic diguanylate interfere with beneficial bacterial colonization[J]. *mBio*, 2022, 13(4): e0167122.