

组氨酸激酶 EnvZ 调节副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的作用机制

袁艺萱, 吴文婷, 陆倩, 姚宁, 周秀娟, 钟孝俊*, 杨梦华*

浙江农林大学 动物科技学院·动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 动物健康互联网检测技术浙江省工程实验室, 浙江 杭州

袁艺萱, 吴文婷, 陆倩, 姚宁, 周秀娟, 钟孝俊, 杨梦华. 组氨酸激酶 EnvZ 调节副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的作用机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2049-2060.

YUAN Yixuan, WU Wenting, LU Qian, YAO Ning, ZHOU Xiujuan, ZHONG Xiaojun, YANG Menghua. The histidine kinase EnvZ regulates the swarming motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 2049-2060.

摘要: 【目的】探究组氨酸激酶 EnvZ 调控副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的作用机制。【方法】利用含有诱导型启动子的 pBAD24 与 pMal 质粒, 构建相应基因的过表达质粒, 并将其导入野生株和 *envZ* 基因缺失株中, 通过运动性培养基比较各菌株的群集性爬动能力, 采用结晶紫染色法检测各菌株的生物被膜形成能力, 并结合 RT-qPCR 与荧光报告系统检测下游基因的表达水平, 以探究 EnvZ 调节副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的分子机制。【结果】 $\Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力显著低于野生株, 而导入 pBAD24-*envZ* 回补质粒的 $\Delta envZ$ 菌株能够恢复其群集性爬动能力。这些菌株的群集性爬动能力与侧生鞭毛相关基因的表达水平呈正相关。在 *envZ* 基因缺失的菌株中, Scr 系统启动子的转录活性显著低于野生株和 $\Delta ompR$ 菌株。在 *envZ* 基因缺失的菌株中过表达 Scr 系统, 可以显著恢复其群集性爬动; 然而, 在 *scrABC* 基因缺失的菌株中过表达 EnvZ, 并不能改变其群集性爬动能力。 $\Delta envZ$ 菌株的生物被膜形成能力显著低于野生株, 而 pMal-*envZ* 质粒能够使 $\Delta envZ$ 菌株的生物被膜厚度恢复至野生株水平, 但 pMal-*scrABC* 重组质粒则无此功能。在 $\Delta envZ$ 菌株中, 胞外多糖操纵子(*epsA-J*)的启动子活性与关键基因的转录水平均显著低于野生株。【结论】组氨酸激酶 EnvZ 可通过调控 Scr 系统的表达来增强副溶血弧菌的群集性爬动能力, 同时也可通过调控胞外多糖的表达来促进该菌的生物被膜形成。

关键词: 副溶血弧菌; 组氨酸激酶; EnvZ/OmpR; 群集性爬动; 生物被膜

资助项目: 国家自然科学基金(32170174, 32202804); 浙江省自然科学基金(LQ22C180002); 浙江农林大学科研发展启动基金(2013FR012, 2020FR042)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170174, 32202804), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22C180002), and the Science Development Foundation of Zhejiang A&F University (2013FR012, 2020FR042).

*Corresponding authors. E-mail: ZHONG Xiaojun, xjzhong@zafu.edu.cn; YANG Menghua, yangmh@zafu.edu.cn

Received: 2024-11-06; Accepted: 2025-01-16; Published online: 2025-03-06

The histidine kinase EnvZ regulates the swarming motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*

YUAN Yixuan, WU Wenting, LU Qian, YAO Ning, ZHOU Xiujuan, ZHONG Xiaojun*,
YANG Menghua*

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection & Internet Technology, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Vibrio parahaemolyticus* is a major foodborne pathogen that causes acute gastroenteritis in humans. Here, we aim to decipher the mechanisms by which the histidine kinase EnvZ regulates the swarming motility and biofilm formation of *V. parahaemolyticus*. [Methods] The plasmids pBAD24 and pMal carrying inducible promoters were used to construct the plasmids carrying target genes for overexpression. The recombinant plasmids were introduced into the wild-type strain (WT) and *envZ*-deleted strain ($\Delta envZ$) of *V. parahaemolyticus*. Swarming plates were prepared to measure swarming motility, while biofilm formation was detected by crystal violet staining. The RT-qPCR and bioluminescence reporter assays were employed to explore the mechanisms by which EnvZ regulated the expression of downstream genes. [Results] The swarming motility of $\Delta envZ$ was significantly lower than that of WT, while the introduction of the pBAD24-*envZ* plasmid into $\Delta envZ$ restored its swarming ability. The transcription levels of the lateral flagellar genes were positively correlated with the swarming motility. The promoter activities of P_{scrABC} -*lux* in $\Delta envZ$ and $\Delta envZ \Delta ompR$ were lower than those in WT and $\Delta ompR$. The swarming ability of $\Delta envZ$ was significantly increased when the Scr system was overexpressed via the pMal-*scrABC* plasmid, while the overexpression of EnvZ in the strain without *scrABC* did not change the swarming motility. In addition, $\Delta envZ$ exhibited a significant decrease in biofilm formation compared with WT. The pMal-*envZ* plasmid restored the biofilm formation of $\Delta envZ$ to the level of WT, whereas the pMal-*scrABC* plasmid did not have this effect. The promoter activity of the extracellular polysaccharide operon (*epsA-J*) and the transcription levels of the extracellular polysaccharide genes in $\Delta envZ$ were both significantly lower than those in WT. [Conclusion] The histidine kinase EnvZ enhances the swarming motility of *V. parahaemolyticus* by regulating the expression of the Scr system and promotes the biofilm formation by regulating the expression of extracellular polysaccharides.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; histidine kinase; EnvZ/OmpR; swarming motility; biofilm

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌,广泛存在于海水和海产品中,是我国沿海地区常见的食物源性病原菌^[1-2]。副溶血弧菌能感染多种海产品,如虾、蟹、贝

类等,给水产养殖带来巨大经济损失;该病原菌也可通过这些受污染的食物传播给人类,引发以腹痛、腹泻、发热、呕吐和脱水等为特征的急性肠胃炎^[1]。副溶血弧菌具有强大的环境适

应能力。众多研究报道显示,除海产品外,该病原菌还可在畜禽肉类、淡水鱼和小龙虾中被检测出^[3-4]。因此,副溶血弧菌及其感染已构成较为严重的公共卫生安全问题。

副溶血弧菌需应对各种生物和非生物因素的胁迫,如渗透压、酸碱度、氧含量变化及营养物质匮乏等。为应对外部环境变化,该病原菌采取了一系列策略,其中包括控制鞭毛运动和产生生物被膜等^[5-6]。副溶血弧菌表面具有细长弯曲的鞭毛结构,通常分为极生鞭毛和侧生鞭毛^[5]。极生鞭毛负责在液体环境中的游动(swimming motility),而侧生鞭毛则负责在固体表面或黏性环境中的群集性爬动(swarming motility)^[5]。当副溶血弧菌通过鞭毛运动到达新的有机或无机表面后,其将从孤立的浮游态生存方式过渡为群体的生物被膜态的生存方式^[5]。生物被膜是副溶血弧菌在自然界中的重要存在形式之一,其结构主要包括多糖、蛋白质和胞外核酸,能在恶劣环境中有效保护细菌群体^[6-7]。目前,关于副溶血弧菌调控运动性和生物被膜形成的机制尚待深入探究。

典型的双组分系统(two-component system)由组氨酸激酶(histidine kinase)和响应调节蛋白(response regulator)组成^[8]。组氨酸激酶负责感应外部环境变化,而响应调节蛋白则调控菌体基因表达,从而提高细菌对外部环境的适应能力^[8]。副溶血弧菌具有大小 2 条染色体,至少编码 50 对双组分系统。目前,已有多对双组分系统被鉴定参与副溶血弧菌的多种生理过程。例如, VbrK/VbrR 可感应 β -内酰胺类抗生素,增强副溶血弧菌对该类抗生素的抵抗力^[9];在铁限制条件下, PeuRS 与细胞外碱性 pH 和肠杆菌素协同作用,诱导负责肠杆菌素利用的 PeuA 蛋白表达^[10]; TtrRS 可感应外部信号分子连四硫酸盐,促进副溶血弧菌对含硫化合物的代谢,从而增强其在宿主肠道的定殖能力^[11]。双组分系统 EnvZ/OmpR 由组氨酸激酶 EnvZ 和响应调节蛋白 OmpR 组成,参与调节多种细菌对外部渗

透压的适应能力^[12-14]。姚宁等^[15]研究报道,双组分系统 EnvZ/OmpR 通过调控孔道蛋白的表达,增强副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。同时,还发现组氨酸激酶 *envZ* 基因缺失影响了副溶血弧菌的群集性爬动^[16],但具体机制尚不清楚。

本研究首先通过构建回补质粒,确认了组氨酸激酶 EnvZ 参与副溶血弧菌的群集性爬动,随后探究了 EnvZ 对副溶血弧菌生物被膜形成的作用,并重点分析了 EnvZ 调控副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的作用机制。本研究有助于进一步理解副溶血弧菌在接触物体表面后如何调控鞭毛运动和生物被膜形成,并为探究副溶血弧菌的综合防治策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血弧菌野生株 RMID 2210633 (WT)和 *envZ* 基因缺失株 ($\Delta envZ$),质粒 pDS132、pBAD24、pMal 和 pBBR-*lux*,以及大肠杆菌 DH5 α - λ pir 均为实验室自备。其中,副溶血弧菌具有链霉素抗性,而所有质粒均携带氯霉素抗性基因。

1.1.2 主要试剂和仪器

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、蔗糖、阿拉伯糖,生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化/胶回收试剂盒,上海莱枫生物科技有限公司;限制性核酸内切酶,NEB 公司。

pH 计, Sartorius 公司;PCR 仪、小型台式高速离心机, Eppendorf 公司;核酸电泳仪,北京六一仪器厂;高压灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;恒温振荡培养箱,太仓市科教器材厂;多功能酶标仪, Bio-Tek 公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母提取

物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 去离子水定容到 1.0 L; 121 °C 灭菌 15 min。

MLB 液体培养基(g/L): NaCl 30.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 去离子水定容到 1.0 L; 121 °C 灭菌 15 min。

群集性爬动培养基(g/L): NaCl 30.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂粉 12.0, 去离子水定容到 1.0 L; 121 °C 灭菌 15 min。

1.2 重组质粒的构建

利用 pBAD24 或 pMal 空质粒构建过表达 EnvZ 或 ScrABC 的重组质粒, 使用 Clone Manager 软件设计用于构建重组质粒的各对引物(表 1)。其中, pBAD24 质粒含有阿拉伯糖诱导型启动子, 而 pMal 质粒含有 IPTG 诱导型启动子。以副溶血弧菌全基因组为模板进行 PCR, 扩增 *envZ* 或 *scrABC* 基因的开放阅读框, 并对 DNA 片段进行纯化回收。利用特异性的限制性内切酶对 DNA 片段和上述空质粒进行过夜酶切, 再利用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物电转至大肠杆菌 DH5 α - λ pir 感受态细胞中, 并涂布至 LB 平板(含 20 μ g/mL 氯霉素), 置于 37 °C 培养过夜。对平板上的单菌落进行 PCR 验证, 并将 PCR 阳性的克隆菌株进行测序验证(杭州有康生物科技有限公司)。

1.3 副溶血弧菌基因缺失株的构建

利用本实验室保存的 pDS132-*ompR* 与 pDS132-*scrABC* 重组质粒, 构建 $\Delta envZ \Delta ompR$

和 $\Delta scrABC \Delta envZ$ 多基因缺失株^[15,17]。通过三亲结合的方式^[18], 分别将上述质粒导入 $\Delta envZ$ 菌株中, 以进行基因同源重组。将含有 pDS132-*ompR* 或 pDS132-*scrABC* 的 DH5 α - λ pir、辅助菌 pRK2013-HB101 以及 $\Delta envZ$ 菌株, 在 LB 或 MLB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 培养过夜后, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 将 3 种菌体混合, 并在无抗生素的 LB 固体培养基上接合 6 h; 收集菌落, 涂布到含有链霉素(0.1 mg/mL)和氯霉素(0.02 mg/mL)的 MLB 固体培养基上。将单菌落依次在含双抗的 MLB 平板、含 0.1 mg/mL 链霉素的 MLB 平板, 以及含有 20% 的蔗糖 LB 平板上划线传代, 以筛选相应的缺失株。

1.4 副溶血弧菌群集性爬动能力的检测

将副溶血弧菌野生株 WT、 $\Delta envZ$ 以及含质粒的大肠杆菌从-80 °C 冰箱中取出, 分别接种至含链霉素的 MLB 液体培养基或含氯霉素的 LB 液体培养基中, 并置于 37 °C、120 r/min 振荡培养过夜。其中, 大肠杆菌含有空质粒(pBAD24 或 pMal)或重组质粒(pBAD24-*envZ* 或 pMal-*scrABC*)。以三亲接合的方法将空质粒或重组质粒导入副溶血弧菌中^[18]。用牙签轻轻挑取大小均匀的副溶血弧菌单菌落, 并轻轻点在群集性爬动培养基(含 0.02% 阿拉伯糖或 0.01 mmol/L IPTG)上。将该平板置于 37 °C 培养箱中静置培养 16-24 h, 观察细菌的运动半径并拍照记录。

表1 构建重组质粒所需引物列表

Table 1 Primers used for the recombinant plasmid

Primers name	Primer sequences (5'→3')
pBAD24- <i>envZ</i> -F	CGGGGTACCAGGATCATTAGGAAATTTCCATGCG
pBAD24- <i>envZ</i> -R	CCCAAGCTTTTATTTGGTCGGGAAACTGATTTG
pMal- <i>scrABC</i> -F	CAACAAGGACCATAGCATATGTATGGCTAATTTCCGACAAGGAT
pMal- <i>scrABC</i> -R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTACTTATCATCATCATCCTTATAATCTGACCAAGTAGG TTGGTTTAGAAGTT
pMal- <i>envZ</i> -F	CAACAAGGACCATAGCATATGCTCTTACTCGCTTAACCGGCA
pMal- <i>envZ</i> -R	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTTATTTGGTCGGGAAACTGATTT

1.5 副溶血弧菌总 RNA 提取和 RT-qPCR

将各菌株接种到群集性爬动培养基上, 37 °C 静置培养 16–24 h; 或在 10 mL MLB 液体培养基中, 37 °C 静置培养约 11 h, 随后 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收菌。采用 TRIzol 法提取菌体总 RNA^[17]。利用反转录试剂盒去除基因组 DNA 并生成 cDNA。RT-qPCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 2)。使用实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR, 荧光定量 PCR 体系与反应程序参考文献[15]。以 *16S rRNA* 作为内参基因^[17], 并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的转录水平。

1.6 利用荧光报告系统检测目的基因启动子活性

本实验室已成功构建含有 Scr 系统启动子区域的重组荧光质粒 $P_{scrABC-lux}$ 和含有胞外多糖操纵子 *epsA-J* 启动子区域的重组荧光质粒 $P_{eps-lux}$ ^[17-18]。通过三亲接合的方法将这 2 个重组荧光质粒分别导入副溶血弧菌各菌株中。其中, $P_{scrABC-lux}$ 质粒分别导入 WT、 $\Delta envZ$ 、 $\Delta ompR$ 和 $\Delta envZ\Delta ompR$ 菌株中, $P_{eps-lux}$ 质粒分别导入 WT 和 $\Delta envZ$ 菌株中; 将生长良好的菌株按 1:100 的比例转接至 MLB 液体培养基中, 置于 37 °C 培养

箱中静置培养 3 h。随后, 各取 200 μ L 菌液分别加入到 96 孔培养板和荧光板中。各菌株静置培养 9–11 h 后, 测量各菌株的 OD_{600} 值和 Lux 荧光值。各菌最终的荧光强度= Lux/OD_{600} 。每种菌株至少进行 3 个生物学重复。

1.7 副溶血弧菌生物被膜的测定

利用三亲接合的方法将 pMal 空质粒以及 pMal-*envZ* 和 pMal-*scrABC* 重组质粒分别导入副溶血弧菌 WT 和 $\Delta envZ$ 菌株中。将生长良好的菌液按 1:100 的比例转接至 1 mL 含有 100 μ g/mL 链霉素、5 μ g/mL 氯霉素和 0.01 mmol/L IPTG 的 MLB 液体培养基中。取已灭菌的玻璃小管, 每管中加入 300 μ L 菌液, 每种菌株做 3 个重复。将玻璃小管封口, 置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 24 h。随后, 用移液枪将菌液吸出, 用 1 $\times$ PBS 轻洗 3 遍, 加入 300 μ L 浓度为 0.5% 的结晶紫溶液, 静置染色 20 min。将染液吸出, 用 1 $\times$ PBS 洗去多余的结晶紫溶液, 直至加入 1 $\times$ PBS 呈透明清澈状态。对玻璃小管进行拍照, 再用 500 μ L 无水乙醇对生物被膜进行溶解, 使用多功能酶标仪测定其 OD_{595} 数值。

1.8 数据分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Student's *t*-test 统计学方法对数据进行分析并作图(ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 组氨酸激酶 EnvZ 促进副溶血弧菌的群集性爬动

实验室前期研究发现, 组氨酸激酶 *envZ* 基因缺失会导致副溶血弧菌的群集性爬动能力显著减弱^[16]。为进一步验证这一结果, 本研究利用含有阿拉伯糖诱导型启动子的 pBAD24 质粒, 构建了 *envZ* 基因的回补质粒 pBAD24-*envZ*。将该质粒导入 *envZ* 基因缺失株($\Delta envZ$), 同时将

表2 RT-qPCR所需引物列表

Table 2 Primers used in RT-qPCR assay

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>flgB</i> ^L -F	GTACATCCAGAGGCACTCAAT
<i>flgB</i> ^L -R	AACTTAGGTCTTTTCGCCAAGTA
<i>lafA</i> ^L -F	ATAAAGACCGCGCAGCAATG
<i>lafA</i> ^L -R	AGATGCGTCTACGTCTAGAG
<i>epsC</i> -F	AATTGGCCTAGCTCTGCTAC
<i>epsC</i> -R	CCCGTAAACTTGCACTGAAATAG
<i>epsE</i> -F	GAGTCACATGCTCAAACGTAAAC
<i>epsE</i> -R	TCTGCCATCCAGAAAGGTAAAG
<i>epsG</i> -F	TCCACTCCTTGCGAGCTATTAC
<i>epsG</i> -R	GGCGATTAAGCCAACAGAAAG
<i>16S rRNA</i> -F	ACCGCCTGGGGAGTACGGTC
<i>16S rRNA</i> -R	TTGCGCTCGTTGCGGGACTT

pBAD24 空质粒分别导入 $\Delta envZ$ 和野生株作为对照。通过在含有 0.02% 阿拉伯糖的群集性爬动培养基表面检测这些菌株的群集性爬动能力,发现与 WT 相比, $\Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力显著减弱(图 1A、1B)。此外,与回补 pBAD24 $\Delta envZ$ 菌株相比,回补 pBAD24- $envZ$ 质粒的 $\Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力显著增强(图 1A、1B)。由于侧生鞭毛负责调控副溶血弧菌的群集性爬动,因此本研究通过 RT-qPCR 检测了这些菌株在群集性爬动培养基上侧生鞭毛基因的转录水平。结果如图 1C 所示, $\Delta envZ$ 菌株中侧生鞭毛基因 *flgB^L* 和 *lafA^L* 的转录水平显著低于 WT 菌株,而含有 pBAD24- $envZ$ 回补质粒的 $\Delta envZ$ 菌株中这些基因的表达水平明显恢复。这些结果说明组氨酸激酶 EnvZ 能够调控副溶血弧菌的群集性爬动。

2.2 EnvZ 调控副溶血弧菌 Scr 系统的表达

Scr 系统由 *scrABC* 操纵子编码的 3 个蛋白构成,该系统通过调节环二鸟苷酸(c-di-GMP)信号分子的合成,进而影响副溶血弧菌的群集性

爬动能力^[19]。为了探究 EnvZ 调控副溶血弧菌群集性爬动的分子机制,本研究将含有 *scrABC* 操纵子启动子区域的重组荧光质粒 $P_{scrABC-lux}$ 分别导入 WT、 $\Delta envZ$ 、 $\Delta ompR$ 和 $\Delta envZ\Delta ompR$ 中,通过检测荧光强度分析了双组分系统 EnvZ 和 OmpR 对 *scrABC* 操纵子是否存在转录调控。结果如图 2 所示, $\Delta envZ$ 和 $\Delta envZ\Delta ompR$ 菌株中 $P_{scrABC-lux}$ 的荧光强度均显著低于 WT 菌株;然而, $\Delta ompR$ 菌株的 $P_{scrABC-lux}$ 荧光强度与 WT 菌株无显著差异。结果表明组氨酸激酶 EnvZ 独立于 OmpR 调控 Scr 系统的表达。

2.3 Scr 系统介入 EnvZ 调控副溶血弧菌的群集性爬动过程

为了探究 Scr 系统是否影响 EnvZ 对副溶血弧菌群集性爬动的调控过程,本研究构建了表达 *scrABC* 基因的重组质粒 pMal-*scrABC*,并将该质粒导入 WT 菌株中。通过比较分别含有 2 种质粒的 WT 菌株的群集性爬动表型发现,含有 pMal-*scrABC* 重组质粒的 WT 菌株的群集性爬动能力显著强于含有 pMal 空质粒的 WT 菌株(图 3A、3B)。这说明 pMal-*scrABC* 重组质粒能够表达具有

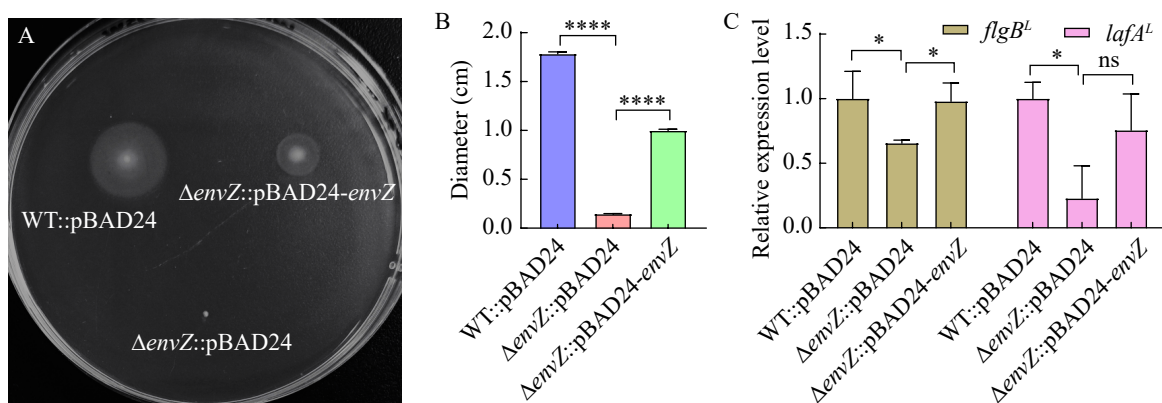


图1 EnvZ调控副溶血弧菌的群集性爬动。A: 副溶血弧菌各菌株群集性爬动能力比较; B: 使用ImageJ软件测量各菌株的运动直径; C: 通过RT-qPCR检测各菌株侧生鞭毛基因的转录水平。

Figure 1 EnvZ regulates the swarming motility of *Vibrio parahaemolyticus*. A: Comparison of the swarming motility of the *V. parahaemolyticus* strains; B: The migration diameter of the swarming colonies was measured by using ImageJ software; C: The transcription levels of the lateral flagellar genes in *V. parahaemolyticus* strains were measured by RT-qPCR. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; ****: $P<0.0001$.

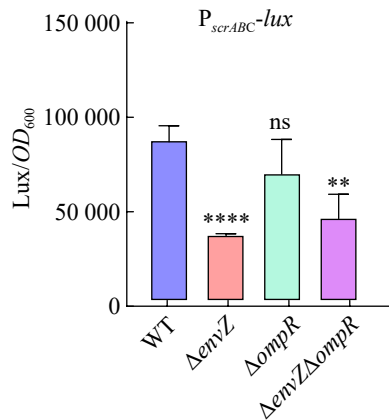


图2 EnvZ调控scrABC操纵子的启动子活性

Figure 2 EnvZ regulates the promoter activity of the *scrABC* operon. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

活性的 Scr 系统。因此, 进一步将该质粒导入 $\Delta envZ$ 菌株中, 并检测了该质粒对 $\Delta envZ$ 菌株群集性爬动能力的影响。如图 3 所示, 含有 pMal-

scrABC 重组质粒的 $\Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力显著强于含有 pMal 空质粒的 $\Delta envZ$ 菌株。通过比较 $\Delta scrABC$ 和 $\Delta scrABC \Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力发现, 这 2 个缺失株均丧失了群集性爬动能力, 说明在 ScrABC 缺失的背景下, EnvZ 无法再促进副溶血弧菌的群集性爬动能力。然而, $\Delta scrABC \Delta envZ$ 菌株的爬动能力比 $\Delta envZ$ 菌株更弱, 表明在 EnvZ 不起作用的情况下, ScrABC 仍然在一定程度上能够促进副溶血弧菌在固体表面爬动。此外, 本研究还发现 $\Delta scrABC$ 和 $\Delta scrABC \Delta envZ$ 菌株的群集性爬动能力均显著低于 WT 菌株, 而通过回补 pMal-*scrABC* 重组质粒可以在一定程度上恢复这些菌株的群集性爬动能力, 但回补 pMal-*envZ* 的重组质粒则无此效果(图 3A、3B)。这些结果提示 Scr 系统位于 EnvZ 的调控通路下游, 并参与了 EnvZ 对副溶血弧菌群集性爬动的调控过程。

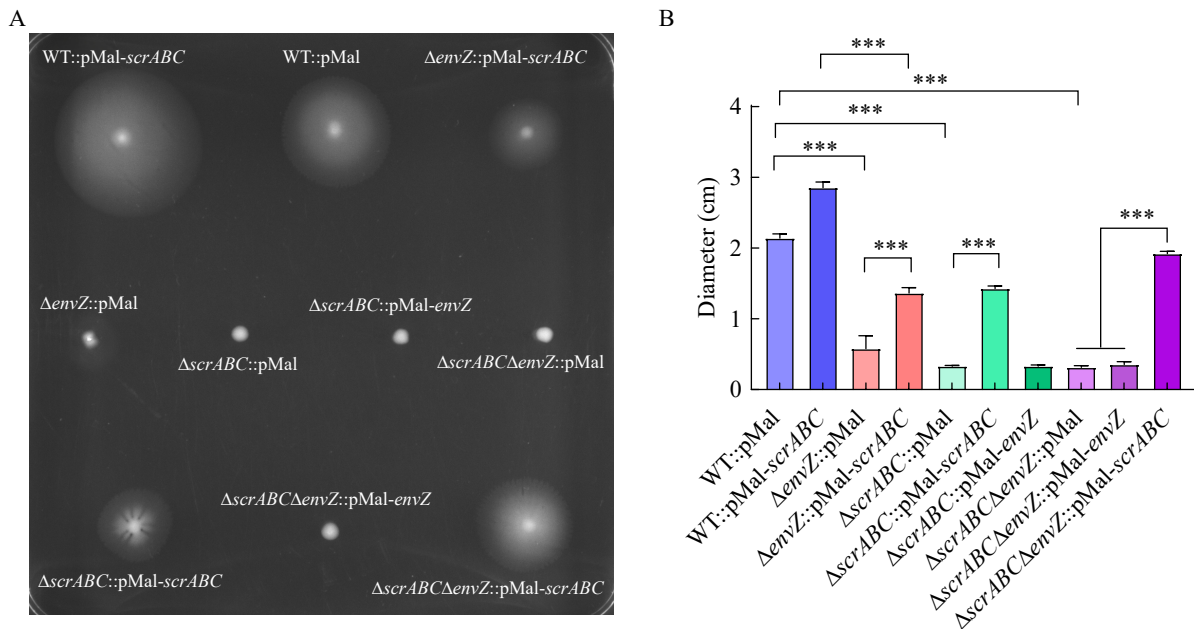


图3 过表达Scr系统影响副溶血弧菌的群集性爬动能力。A: 副溶血弧菌各菌株群集性爬动能力比较; B: 使用ImageJ软件测量各菌株的运动直径(***: $P < 0.001$)。

Figure 3 Overexpression of the Scr system affects the swarming motility of *Vibrio parahaemolyticus*. A: Comparison of the swarming motility of the *V. parahaemolyticus* strains; B: The migration diameter of the swarming colonies was measured using ImageJ software (***: $P < 0.001$).

2.4 EnvZ 独立于 Scr 系统调控副溶血弧菌的生物被膜形成

生物被膜是副溶血弧菌的一种重要生物表型，且与细菌的运动性密切相关^[20]。因此，本研究采用结晶紫染色法检测了各菌株的生物被膜形成能力。如图 4 所示， $\Delta envZ$ 菌株的生物被膜形成能力显著低于 WT 菌株。为验证该表型确实由 *envZ* 基因缺失导致，利用 pMal 质粒构建了 *envZ* 基因的回补质粒 pMal-*envZ*，并将该质粒导入 $\Delta envZ$ 菌株中。结果显示，含有 pMal-*envZ* 回补质粒的 $\Delta envZ$ 菌株的生物被膜形成能力显著高于含有 pMal 空质粒的 $\Delta envZ$ 菌株(图 4A、4B)。同时，本研究还检测了含有 pMal-*scrABC* 重组质粒的 $\Delta envZ$ 菌株的生物被膜形成能力，结果显示该菌株的生物被膜形成能力与含有 pMal 空质粒的 $\Delta envZ$ 菌株无显著差异，并且明

显低于含有 pMal-*envZ* 回补质粒的 $\Delta envZ$ 菌株(图 4A、4B)。结果表明 EnvZ 能够促进副溶血弧菌的生物被膜形成，且该过程不依赖于 Scr 系统。因此，EnvZ 与 Scr 系统可能通过不同的作用机制来调控副溶血弧菌的生物被膜形成。

2.5 EnvZ 促进胞外多糖基因操纵子的表达

胞外多糖作为细菌生物被膜的主要成分，在生物被膜形成过程中发挥了关键作用^[20]。在副溶血弧菌中，胞外多糖主要由 *epsA-J* 操纵子编码表达。为了探究 EnvZ 是否通过调控胞外多糖的表达来影响副溶血弧菌的生物被膜形成，本研究利用实验室已成功构建的重组荧光质粒 *P_{eps}-lux*^[18]，将其分别导入 WT 和 $\Delta envZ$ 菌株中，通过检测荧光强度来评估 *epsA-J* 启动子的活性。如图 5A 所示，在 $\Delta envZ$ 菌株中 *epsA-J* 启动子

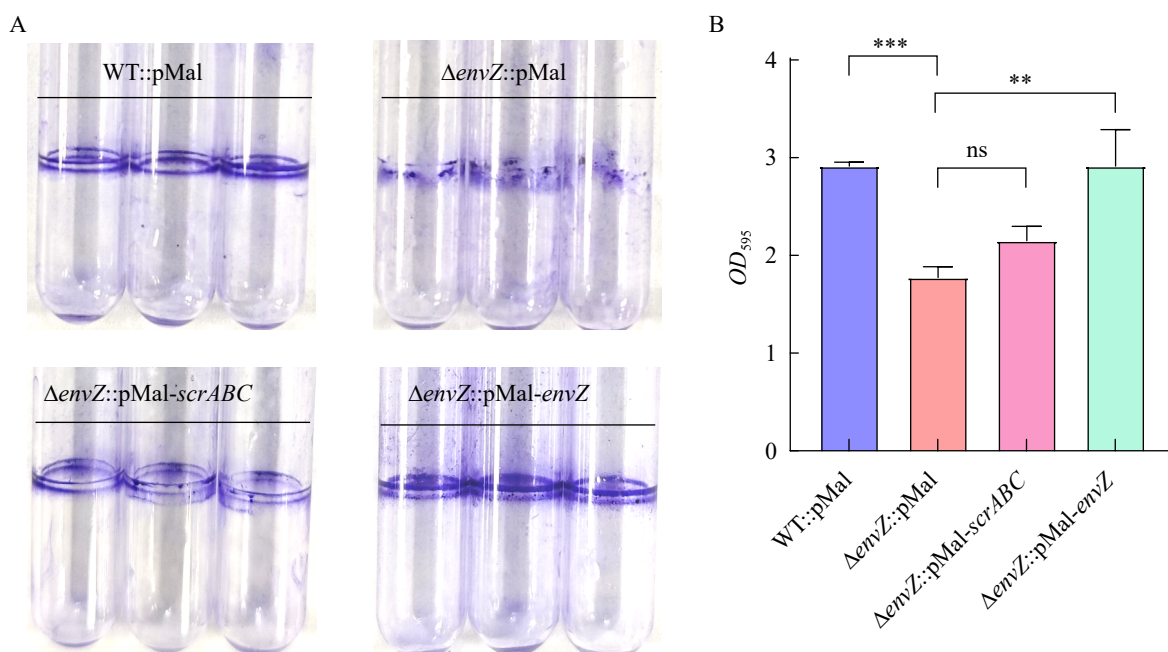


图4 各菌株的生物被膜形成能力比较。A：结晶紫染色法观察生物被膜形成；B：吸光度值(OD_{595})检测生物被膜形成量(ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)。

Figure 4 Comparison of the biofilm formation of the *Vibrio parahaemolyticus* strains. A: Biofilm formation was measured by using crystal violet staining; B: Biofilm formation was quantified by measuring OD_{595} (ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

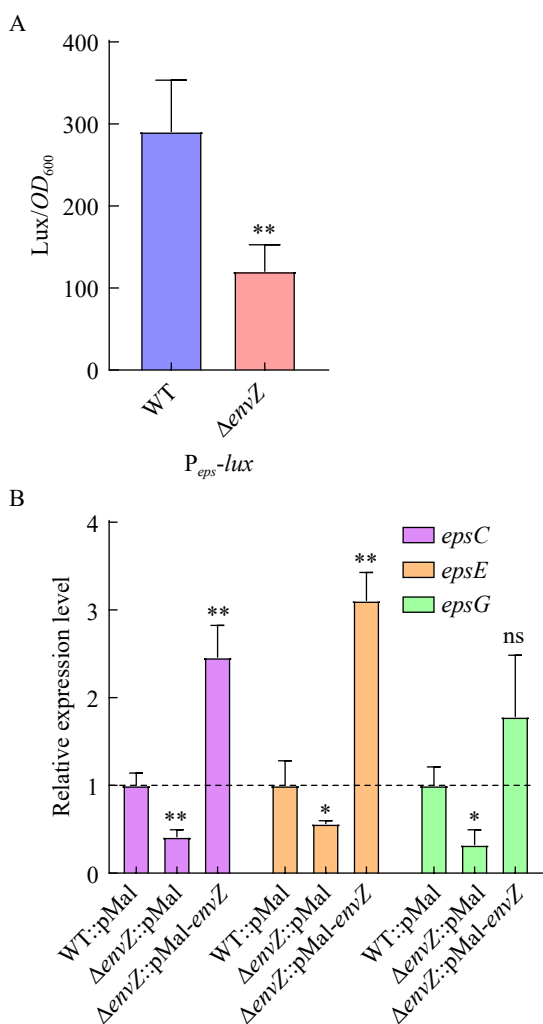


图5 EnvZ调控胞外多糖基因的表达。A: EnvZ调控*epsA-J*操纵子的启动子活性; B: 通过RT-qPCR检测副溶血弧菌各菌株中胞外多糖基因的转录水平。

Figure 5 EnvZ regulates the expression of exopolysaccharides genes. A: EnvZ regulates the promoter activity of the *epsA-J* operon; B: The transcription levels of the exopolysaccharide genes in *Vibrio parahaemolyticus* strains were measured by RT-qPCR. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

荧光质粒的荧光强度显著低于 WT 菌株, 表明在 *envZ* 基因缺失后, 胞外多糖的表达水平明显降低。此外, 通过 RT-qPCR 试验发现, $\Delta envZ$ 菌株中 *eps* 相关基因的转录水平也显著低于 WT

菌株, 而含有 pMal-*envZ* 回补质粒的 $\Delta envZ$ 菌株中 *eps* 相关基因的表达量则明显高于 WT 菌株 (图 5B)。这些结果说明 EnvZ 能够促进副溶血弧菌胞外多糖的表达。

3 讨论与结论

副溶血弧菌可以适应复杂多变的体内外环境, 这依赖于各种信号调节系统, 其中主要包括双组分系统^[11,21-22]。本实验室前期发现双组分系统 EnvZ/OmpR 中的响应调节蛋白 OmpR 可通过调控因子 AphB 促进部分孔道蛋白的表达, 从而增强副溶血弧菌对碱胁迫的抵抗力; 然而, 组氨酸激酶 EnvZ 并未影响副溶血弧菌对碱胁迫的抵抗力^[15]。在本研究中, 我们发现相较于 WT 菌株, *envZ* 基因缺失株的群集性爬动能力显著减弱, 而该菌株在回补 pBAD24-*envZ* 质粒后群集性爬动能力显著增强 (图 1)。尽管回补株的群集性爬动能力未达到 WT 菌株的水平, 这可能与该菌株内回补质粒的拷贝量与稳定性有关, 但本研究结果已可说明 EnvZ 能够促进副溶血弧菌的群集性爬动; 然而, 我们也发现 OmpR 蛋白并无此功能^[16]。这些结果进一步说明 EnvZ 与 OmpR 蛋白之间的信号传递存在不专一性。越来越多的研究表明不同双组分系统之间可能存在串扰 (crosstalk), 例如 NarX/NarL 和 NarQ/NarP 存在交叉磷酸化^[23-24]。在大肠杆菌中, 研究人员发现 EnvZ/OmpR 可接受 ArcB 蛋白的磷酸基团^[25]。这提示在副溶血弧菌中 EnvZ/OmpR 与其他双组分系统之间也可能存在串扰, 导致两者具有不同的靶基因。本研究结果也佐证了这一点, 我们发现 EnvZ 可以调控 Scr 系统表达, 而 OmpR 无此功能 (图 2)。因此, 组氨酸激酶 EnvZ 和响应调节蛋白 OmpR 在副溶血弧菌中可分别调控不同的生物表型。

Scr 系统是副溶血弧菌重要的表面感应调节系统, 其主要由 *scrABC* 操纵子编码的 3 种蛋白组成, 即氨基转移酶 ScrA、胞外溶质结合蛋白 ScrB 和 c-di-GMP 代谢酶 ScrC^[26-27]。在高细胞

密度下, Scr 系统主要通过调节 ScrC 蛋白发挥磷酸二酯酶活性, 从而导致菌体中 c-di-GMP 浓度下降^[27]。已有研究表明, 在副溶血弧菌中, 高 c-di-GMP 浓度可抑制细菌群集性爬动能力, 并促进其生物被膜形成^[18,28]。本研究发现组氨酸激酶 EnvZ 可增强 Scr 系统的转录表达(图 2), 提示 *envZ* 基因缺失可导致副溶血弧菌菌体内 c-di-GMP 浓度增加。在 *envZ* 基因缺失株中过表达了 Scr 系统并检测其群集性爬动能力, 研究结果说明 EnvZ 通过调控 Scr 系统表达促进副溶血弧菌的群集性爬动(图 3), 提示 c-di-GMP 分子可能参与了 EnvZ 介导的群集性爬动过程。然而, 本研究同时发现 EnvZ 可促进副溶血弧菌生物被膜合成, 这似乎不符合其菌体内高 c-di-GMP 分子浓度的特征。值得注意的是, 在 *envZ* 基因缺失株中过表达 Scr 系统也并未恢复该菌株的生物被膜形成能力。这提示 EnvZ 可能不是通过调控菌体内的 c-di-GMP 分子浓度来调控副溶血弧菌的生物被膜形成, 因此过表达 Scr 系统对 *envZ* 缺失株的生物被膜表型并无作用。

在初始阶段, 细菌的鞭毛运动可促进生物被膜的形成^[20,29]。当细菌通过运动抵达并附着在物体表面时, 菌落的生长和生物被膜的形成均依赖于鞭毛运动。在霍乱弧菌中, 鞭毛基因的缺失通常会导致细菌对物体表面的附着能力降低^[30-31]。在创伤弧菌和费氏弧菌中, 鞭毛介导的运动也促进了生物被膜的形成^[20]。有文献报道, 在副溶血弧菌中, 依赖于极性鞭毛的泳动能力会促进该菌生物被膜的形成^[32]; 然而, 依赖于侧生鞭毛的群集性爬动能力并不影响其生物被膜的形成^[33]。本研究发现 *envZ* 基因缺失可导致副溶血弧菌的群集性爬动和生物被膜形成能力均显著减弱(图 1、图 4)。因此, EnvZ 很可能通过不同的信号通路分别调控副溶血弧菌群集性爬动与形成生物被膜这 2 种生理功能。此外, 本研究发现 EnvZ 可调控副溶血弧菌胞外多糖操纵子(*epsA-J*)的表达(图 5)。胞外多糖是生物被膜最重要的化学成分之一, 不仅可为生物

被膜提供结构稳定性, 还影响其与外界理化因子的交互作用, 使细菌与其他被膜组分黏附在一起, 为嵌入的细菌提供全面的保护作用^[7,20]。因此, EnvZ 可通过促进胞外多糖表达, 进而促进副溶血弧菌生物被膜的形成。

本研究通过分析组氨酸激酶 EnvZ 对副溶血弧菌群集性爬动和生物被膜形成的调控机制, 发现 EnvZ 可调控 Scr 系统的表达以促进细菌的群集性爬动, 同时可调控胞外多糖基因的表达以影响生物被膜的形成。该研究为进一步探究副溶血弧菌通过调控群集性爬动和生物被膜形成以适应外部环境的机制提供了理论基础。

作者贡献声明

袁艺萱: 实验操作、数据收集和处理; 吴文婷: 协助实验操作、数据收集; 陆倩: 协助实验操作、数据处理; 姚宁: 协助实验操作; 周秀娟: 论文讨论; 钟孝俊: 数据处理、论文撰写和修改; 杨梦华: 实验设计、论文讨论和修改。

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] LIU ZS, ZHOU Y, WANG HY, LIU CC, WANG LX. Recent advances in understanding the fitness and survival mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 417: 110691.
- [2] ZHONG XJ, PAN ZH, MU YJ, ZHU YC, ZHANG Y, MA JL, YANG MH, YAO HC. Characterization and epidemiological analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different marine products in East China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 380: 109867.
- [3] WU K, ZOU DZ, LONG YY, XUE L, SHUAI SF, TIAN FY, LI M, FAN GY, ZHENG YY, SUN XR, WANG W, WANG L, NI XS, ZHANG XL, FAN YB, LI H. Contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in crayfish for sale[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1388658.
- [4] CHEN HH, DONG SL, YAN Y, ZHAN L, ZHANG JY, CHEN JC, ZHANG Z, ZHANG YY, MEI LL. Prevalence

- and population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from freshwater fish in Zhejiang Province, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(2): 139-146.
- [5] 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.
- [6] BAI X, CHEN XL, ZHANG DF, LIU XF, LI JR. Targeted phytochemical compounds against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2025, 65(9): 1761-1772.
- [7] SU LM, HUANG RT, HSIAO HI. Biofilm formation comparison of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and polypropylene while minimizing environmental impacts and transfer to grouper fish fillets[J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 426: 110913.
- [8] BUSCHIAZZO A, TRAJTENBERG F. Two-component sensing and regulation: how do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level? [J]. Annual Review of Microbiology, 2019, 73: 507-528.
- [9] HACHANI A, WOOD TE, FILLOUX A. Type VI secretion and anti-host effectors[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 29: 81-93.
- [10] TANABE T, KATO A, SHIUCHI K, MIYAMOTO K, TSUJIBO H, MAKI J, YAMAMOTO S, FUNAHASHI T. Regulation of the expression of the *Vibrio parahaemolyticus* *peuA* gene encoding an alternative ferric enterobactin receptor[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105749.
- [11] ZHONG XJ, LIU FW, LIANG TQ, LU RR, SHI MT, ZHOU XJ, YANG MH. The two-component system TtrRS boosts *Vibrio parahaemolyticus* colonization by exploiting sulfur compounds in host gut[J]. PLoS Pathogens, 2024, 20(7): e1012410.
- [12] CHAKRABORTY S, KENNEY LJ. A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2656.
- [13] JI XM, SHI AY, WANG J, ZHANG BW, HU YZ, LV H, WU J, SUN Y, LIU JM, ZHANG Y, WANG S. EnvZ/OmpR controls protein expression and modifications in *Cronobacter sakazakii* for virulence and environmental resilience[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(33): 18697-18707.
- [14] GERKEN H, SHETTY D, KERN B, KENNEY LJ, MISRA R. Effects of pleiotropic *ompR* and *envZ* alleles of *Escherichia coli* on envelope stress and antibiotic sensitivity[J]. Journal of Bacteriology, 2024, 206(6): e0017224.
- [15] 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).
- [16] 姚宁. 副溶血性弧菌双组分系统 EnvZ/OmpR 功能鉴定及其调节细菌耐碱机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2022.
- YAO N. Identification of the function of the two-component system EnvZ/OmpR and its role in regulating alkaline stress tolerance in *Vibrio parahaemolyticus*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2022 (in Chinese).
- [17] LIU FW, WANG F, YUAN YX, LI XR, ZHONG XJ, YANG MH. Quorum sensing signal synthases enhance *Vibrio parahaemolyticus* swarming motility[J]. Molecular Microbiology, 2023, 120(2): 241-257.
- [18] ZHONG XJ, LU Z, WANG F, YAO N, SHI MT, YANG MH. Characterization of GefA, a GGEEF domain-containing protein that modulates *Vibrio parahaemolyticus* motility, biofilm formation, and virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e0223921.
- [19] GE Q, GAO M, LI XR, ZHONG XJ, ZHANG XF, ZHOU XJ, YANG MH. *Vibrio parahaemolyticus* down-regulates the intracellular c-di-GMP level to promote swarming motility by sensing surface[J]. Current Microbiology, 2024, 82(1): 32.
- [20] YILDIZ FH, VISICK KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(3): 109-118.
- [21] MENG YY, PENG JH, QIAN J, FEI FL, GUO YY, PAN YJ, ZHAO Y, LIU HQ. The two-component system expression patterns and immune regulatory mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* with different genotypes at the early stage of infection in THP-1 cells[J]. mSystems, 2023, 8(4): e0023723.
- [22] LI L, WANG QY, ZHANG H, YANG MJ, KHAN MI, ZHOU XH. Sensor histidine kinase is a β -lactam receptor and induces resistance to β -lactam antibiotics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(6): 1648-1653.
- [23] BROSSE A, BOUDRY P, WALBURGER A, MAGALON A, GUILLIER M. Synthesis of the NarP response regulator of nitrate respiration in *Escherichia coli* is regulated at multiple levels by Hfq and small RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(12): 6753-6768.
- [24] HUYNH TN, CHEN LL, STEWART V. Sensor-response regulator interactions in a cross-regulated signal transduction network[J]. Microbiology, 2015, 161(7): 1504-1515.
- [25] MATSUBARA M, KITAOKA SI, TAKEDA SI, MIZUNO T. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by his-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*[J]. Genes to Cells, 2000, 5(7): 555-569.
- [26] KIMBROUGH JH, McCARTER LL. Identification of three new GGDEF and EAL domain-containing proteins participating in the scr surface colonization regulatory network in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of

- Bacteriology, 2021, 203(4): e00409-20.
- [27] KIMBROUGH JH, THOMAS CRIBBS J, McCARTER LL. Homologous c-di-GMP-binding scr transcription factors orchestrate biofilm development in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(6): e00723-19.
- [28] YU ZQ, ZHANG W, YANG H, CHOU SH, GALPERIN MY, HE J. Gas and light: triggers of c-di-GMP-mediated regulation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2023, 47(4): fuad034.
- [29] JUNG YC, LEE MA, LEE KH. Role of flagellin-homologous proteins in biofilm formation by pathogenic *Vibrio* species[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01793-19.
- [30] TESCHLER JK, ZAMORANO-SÁNCHEZ D, UTADA AS, WARNER CJA, WONG GCL, LININGTON RG, YILDIZ FH. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 255-268.
- [31] TESCHLER JK, NADELL CD, DRESCHER K, YILDIZ FH. Mechanisms underlying *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersion[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2022, 76: 503-532.
- [32] 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.
- [33] FERREIRARBR, ANTUNESLCM, PETERGREENBERG E, McCARTER LL. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 851-860.