



# 群体感应系统核心调控子对副溶血弧菌 *mshH* 基因的调控研究

韩海霞<sup>1#</sup>, 孙君芳<sup>1#</sup>, 张凌宇<sup>2</sup>, 张苗苗<sup>3</sup>, 薛星帆<sup>3</sup>, 吴齐敏<sup>1</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 陆仁飞<sup>1\*</sup>, 张义全<sup>1,3\*</sup>

1 南通大学附属第三人民医院检验科, 江苏 南通 226006

2 南京大学医院, 江苏 南京 210000

3 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013

韩海霞, 孙君芳, 张凌宇, 张苗苗, 薛星帆, 吴齐敏, 李雪, 陆仁飞, 张义全. 群体感应系统核心调控子对副溶血弧菌 *mshH* 基因的调控研究. 微生物学报, 2022, 62(5): 1795–1804.

Han Haixia, Sun Junfang, Zhang Lingyu, Zhang Miaomiao, Xue Xingfan, Wu Qimin, Li Xue, Lu Renfei, Zhang Yiquan. Regulation of *mshH* gene by the quorum sensing master regulators in *Vibrio parahaemolyticus*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(5): 1795–1804.

**摘要:** 【目的】探究副溶血弧菌群体感应(quorum sensing, QS)系统核心调控子 AphA 和 OpaR 对 *mshH* 基因的转录调控。【方法】提取特定条件下副溶血弧菌野生株(wild-type, WT)和调控子基因突变株( $\Delta$ *aphA* 和  $\Delta$ *opaR*)的总 RNA, 采用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)研究 AphA 和 OpaR 对 *mshH* 基因的转录调控关系以及 *mshH* 基因的时相依赖性表达特性; 将 *mshH* 启动子区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的上游, 构建 LacZ 重组质粒, 并将其转入 WT、 $\Delta$ *aphA* 和  $\Delta$ *opaR* 中, 获得 LacZ 实验菌株, 再通过 LacZ 报告基因融合实验研究 AphA 和 OpaR 对 *mshH* 基因的调控关系以及 *mshH* 基因的时相依赖性表达特性; PCR 扩增 *mshH* 上游启动子区 DNA 序列, 并纯化 His-AphA 和 His-OpaR 蛋白, 通过凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和 DNase I 足迹实验, 研究体外条件下 His-AphA 和 His-OpaR 对靶基因启动子区 DNA 片段是否具有直接的结合作用以及具体的结合位点。【结果】*mshH* 基因的表达水平随着培养时间的延长而升高; 低细菌密度时, AphA 抑制 *mshH* 基因的转录, 但 His-AphA 对 *mshH* 启动子区 DNA 序列没有结合活性; 高细菌密度时, OpaR 对 *mshH* 基因的转录具有激活作用, His-OpaR

**基金项目:** 江苏省博士后科研资助计划(2020Z102)

Supported by the Postdoctoral Science Foundation Funded Project of Jiangsu Province (2020Z102)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: ZHANG Yiquan, zhangyiquanq@163.com; LU Renfei, rainman78@163.com

Received: 21 September 2021; Revised: 8 December 2021; Published online: 30 December 2021

对位于 *mshH* 基因的翻译起始位点上游-160 至-80 bp 和-58 至-19 bp 之间的 DNA 序列具有结合活性。【结论】低细菌密度时, AphA 可能是通过间接方式抑制 *mshH* 基因的转录; 高细菌密度时, OpaR 直接结合到 *mshH* 调控区 DNA 片段上, 并激活其转录。

关键词: 副溶血弧菌; 群体感应; 调控; AphA; OpaR; *mshH*

## Regulation of *mshH* by the quorum sensing master regulators in *Vibrio parahaemolyticus*

HAN Haixia<sup>1#</sup>, SUN Junfang<sup>1#</sup>, ZHANG Lingyu<sup>2</sup>, ZHANG Miaomiao<sup>3</sup>, XUE Xingfan<sup>3</sup>, WU Qimin<sup>1</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, LU Renfei<sup>1\*</sup>, ZHANG Yiquan<sup>1,3\*</sup>

1 Department of Clinical Laboratory, Nantong Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu, China

2 Nanjing University Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu, China

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

**Abstract:** [Objective] To investigate the transcriptional regulation of *mshH* gene by the master quorum sensing (QS) regulators AphA and OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] Total RNAs were extracted from the wild-type (WT) strain and the regulatory gene mutants ( $\Delta aphA$  and  $\Delta opaR$ ). Quantitative real-time PCR (qPCR) was employed to compare the transcriptional variation of *mshH* gene between WT and  $\Delta aphA$  (or  $\Delta opaR$ ) and to detect the growth phase-dependent transcription of *mshH* gene. The promoter region of *mshH* was cloned into the upstream region of the promoterless *LacZ* reporter gene in pHRP309. The recombinant plasmid was respectively transferred into WT,  $\Delta aphA$ , and  $\Delta opaR$ , and the  $\beta$ -galactosidase activities in the extracts of the recombinant strains were determined via a  $\beta$ -galactosidase enzyme assay system (Promega). Thus, the expression levels of *mshH* gene between different strains or different growth phases can be compared based on the results of *LacZ* fusion. The promoter-proximal DNA region of *mshH* was amplified by PCR, and the over-expressed His-AphA and His-OpaR were purified simultaneously under native conditions. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was adopted to detect the DNA-binding activity of His-AphA or His-OpaR, and the DNase I footprinting assay was further employed to detect the DNA-binding sites of the His-recombinant proteins within the target DNA. [Results] *mshH* gene expression manifested in a growth phase-dependent manner, and the high expression level occurred at high cell density (HCD). At low cell density (LCD), AphA inhibited the transcription of *mshH* gene, while His-AphA had no binding activity to the promoter-proximal DNA fragment of *mshH*. At HCD, OpaR activated the transcription of *mshH* gene. His-OpaR protected two DNA regions located from -160 bp to -80 bp and -58 bp to -19 bp upstream of *mshH* gene. [Conclusion] AphA indirectly inhibited the transcription of *mshH* gene at LCD, whereas OpaR activated the transcription of *mshH* gene in a direct manner at HCD.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; quorum sensing; regulation; AphA; OpaR; *mshH*

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种海产品相关食源性致病菌, 广泛地分布于海水、海底沉积物和海洋生物中<sup>[1]</sup>。作为海洋性细菌, 副溶血弧菌具有较强的生物膜形成能力<sup>[2]</sup>。所谓生物膜是指细菌在固体表面形成的、具有一定三维立体结构的膜状菌落集体, 是细菌抗逆性的一种重要机制。生物膜形成是一个被紧密调控的过程, 探究生物膜形成的调控机制, 有利于人们理解细菌的环境适应机制。

成熟生物膜的形成需要诸如菌毛、胞外多糖等结构的参与<sup>[2]</sup>。其中, IV型菌毛是粘附因子, 能增强细菌生物膜形成<sup>[2]</sup>。副溶血弧菌能表达 2 种类型的 IV 型菌毛, 即由 *mshHIJKLMNEGF* (VP2708-2699) 和 *mshBACDOPQ* (VP2698-2692) 编码的甘露糖敏感性凝集素 (mannose-sensitive hemagglutinin, MSHA) 和由 *pilABCD* (VP2523-2526) 编码的几丁质调节菌毛 (chitin-regulated pilus, ChiRP)<sup>[3]</sup>。MSHA 的突变株对固体表面的附着能力和生物膜形成能力均显著下降, 但是随着培养时间的延长, 仍可形成三维立体结构的成熟生物膜<sup>[3-4]</sup>。相比之下, ChiRP 主要在生物膜形成过程中的细菌凝集中起关键作用<sup>[4]</sup>。

群体感应 (quorum sensing, QS) 是一种细菌浓度依赖性的信号传递机制, 可调控基因表达和细菌生物学行为<sup>[5]</sup>。QS 系统通常通过其下游核心调控子调控基因转录<sup>[5]</sup>。在副溶血弧菌中, AphA 和 OpaR 分别代表 QS 系统在低细菌密度和高细菌密度下的核心调控子<sup>[6-7]</sup>, 二者共同或者单独调控众多细胞途径, 包括毒力因子表达、运动性和生物膜形成<sup>[8-12]</sup>。然而, 有关 QS 系统对副溶血弧菌生物膜形成的调控机制, 还需要进一步深入研究。近期的研究结果显示, AphA 间接抑制 *mshBACDOPQ* 的转录, 而 OpaR 直接激活其转录, 导致 *mshBACDOPQ* 在高密

度时表达水平高<sup>[13]</sup>。此外, OpaR 对 *pilABCD* 也具有直接的激活作用<sup>[14]</sup>。本研究发现 *mshH* 基因 (*mshHIJKLMNEGF* 操纵子首基因) 的表达随着培养时间的延长而升高; 低细菌密度时, AphA 对 *mshHIJKLMNEGF* 基因转录可能具有间接的抑制作用; 高细菌密度时, OpaR 能直接结合到 *mshH* 基因调控区 DNA 序列上, 并激活其转录。这样, 副溶血弧菌 OpaR 对编码 IV 型菌毛的基因启动子区均具有直接的结合活性, 说明 QS 系统是通过 OpaR 来调控 IV 型菌毛的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

副溶血弧菌 RIMD2210633 (wild-type, WT) 及其 *aphA* 和 *opaR* 非极性单基因突变株 (分别记为  $\Delta aphA$  和  $\Delta opaR$ )<sup>[6-7]</sup>、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) 和 HI 肉汤培养基 (2.50% Bacto heart infusion) 购自 BD Bioscience; TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; Primer Extension System、 $\beta$ -Galactosidase Enzyme Assay System 和 Optimized RQ1 RNase-Free DNase I 为 Promega 产品; AccuPower & Top DNA Sequencing Kit 为 Bioneer 产品;  $2\times Taq$  PCR Mastermix、SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 (SYBR Green)、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂等购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

### 1.2 细菌培养方法

取 10  $\mu$ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 M 肉汤中, 置 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。培养产物用无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 稀释 40 倍, 取 150  $\mu$ L 均匀涂布于直径为

5 cm 的 HI 平板(2.5% Bacto heart infusion 和 1.5% Bacto Agar)上, 置 37 °C 静置培养, 在所需要的时间点收集菌体, 供后续的分子生化实验用。若需使用庆大霉素, 其终浓度为 100 µg/mL。

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

采用 TRIzol 法提取副溶血弧菌的总 RNA, 而后利用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒的说明书操作步骤将其逆转录成 cDNA, 最后用 SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版试剂盒进行 qPCR 分析。以 16S rRNA 基因的表达量为内参, 采用标准曲线法对靶基因的转录水平进行相对定量<sup>[15]</sup>。引物如表 1 所示。

### 1.4 *LacZ* 报告基因融合实验(*LacZ* fusion)

将 *mshH* 基因上游调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中无启动子的 β-半乳糖苷酶基因上游, 构建 *LacZ* 重组质粒。将该重组质粒转入副溶血弧菌菌株中, 获得 *LacZ* 菌株。*LacZ* 菌株经特定方法培养(如按 1.2 的方法培养)后, 可采用 β-Galactosidase Enzyme Assay System 检测菌体裂解上清中的 β-半乳糖苷酶活性(miller units), 通过比较 miller units 数值大小来判断靶基因启动子区在不同培养条件下或者在不同菌

株中的活性差异<sup>[6]</sup>。

### 1.5 凝胶阻滞实验(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

用 T4 多聚核苷酸激酶和 [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (5 000 Ci/mmol)对 *mshH* 基因上游调控区 DNA 片段 5'-末端进行放射性标记, 制备 EMSA 用 DNA 探针<sup>[16]</sup>。表达纯化 His-AphA<sup>[6]</sup>和 His-OpaR<sup>[7]</sup>重组蛋白, 并将不同浓度的 His-AphA 或 His-OpaR 与 DNA 探针在 10 µL 结合反应体系 (1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L DTT、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl/pH 7.5、0.05 mg/mL salmon sperm DNA 和 DNA 探针)中室温孵育 20 min 后, 进行 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, -20 °C 放射自显影后分析结果<sup>[16]</sup>。也可将未被 <sup>32</sup>P 标记的 DNA 片段直接在 10 µL 结合反应体系中室温孵育 20 min 后, 进行 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。凝胶经溴化乙锭染色后, 置成像仪中成像观察结果<sup>[17]</sup>。

### 1.6 DNase I 足迹实验(DNase I footprinting assay)

利用 T4 多聚核苷酸激酶和 [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (5 000 Ci/mmol)对靶基因 DNase I 足迹实验的上、下游引物分别进行标记<sup>[16]</sup>。以 WT 基因组

表 1 本研究所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Genes	Primer sequences (forward/reverse, 5'→3')
qPCR	
<i>mshH</i>	AAAGCCATCCCTCCTTACTTAG/ATCATTCTTCCTCGCTCTTCC
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC
<i>LacZ</i> fusion	
<i>mshH</i>	GCGCGTCGACGGCTCAGCAGCAATACAATG/GCGCTCTAGAACGATCATGGTGACAAAAGC
EMSA	
<i>mshH</i>	GGCTCAGCAGCAATACAATG/ACGATCATGGTGACAAAAGC
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC
DNase I footprinting	
<i>mshH</i>	GCTATGTTTGAATCGAAAAGG/TAGCTTAAGAGTTGGGGTATAC

DNA 为模板, 用被标记的引物和未标记的配对引物进行 PCR 扩增, 产物回收后可作为 DNase I 足迹实验的探针。探针和不同浓度的 His-重组蛋白在结合体系(同 EMSA)中孵育 30 min 后, 用 Optimized RQ1 RNase-Free DNase I 消化处理, 消化产物经回收后配伍 Sanger 测序条带 (AccuPower & Top DNA Sequencing Kit) 进行 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 经  $-20^{\circ}\text{C}$  放射自显影后分析结果。

### 1.7 统计学分析方法

qPCR 和 *LacZ* 报告基因融合实验至少重复 3 次, 每次 3 个生物学重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差(standard deviation, SD)表示, 利用双尾成对 *t* 检验进行统计学分析, 当  $P < 0.01$  时, 认为具有统计学差异。EMSA 和 DNase I 足迹实验至少重复 2 次, 并获得相似的结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *mshH* 基因的时相依赖性表达

利用 HI 平板培养 WT 株, 分别提取不同生长时相下的总 RNA, 并逆转录成 cDNA, 采用 qPCR 实验研究 *mshH* 基因的时相依赖性转录特

征, 如图 1A 所示: 从第 4.5 h 至第 7 h, *mshH* 基因的 mRNA 水平随着培养时间的延长而梯度增加, 这表明 *mshH* 基因在高细菌密度下转录水平高。进一步采用 *LacZ* 报告基因融合实验研究 *mshH* 基因在不同生长时相下的表达情况, 如图 1B 所示: *mshH* 基因的启动子活性随着培养时间的延长而增加, 这进一步表明 *mshH* 基因在高细菌密度时表达水平高。总之, *mshH* 基因的表达具有时相依赖性的特征。

### 2.2 AphA 间接负调控 *mshH* 基因的转录

时相依赖性表达特征表明 *mshH* 基因的转录可能受 QS 系统的调控。AphA 和 OpaR 分别是副溶血弧菌 QS 系统在低细菌密度和高细菌密度的核心调控子<sup>[6-7]</sup>。当按 1.2 的方法培养副溶血弧菌时, AphA 在培养后的第 4.5 h 时转录水平最高, 而 OpaR 在第 6 至 7 h 时转录水平最高<sup>[9]</sup>。因此, 本研究分别在培养后的第 4.5 h 和第 6-7 h 时, 收集菌体来模拟低细菌密度和高细菌密度的生长条件, 探究 AphA 和 OpaR 对 *mshH* 基因的转录调控机制。首先采用 qPCR 实验研究了 AphA 对 *mshH* 基因的调控关系, 如图 2A 所示: 在  $\Delta\text{aphA}$  中检测到的 *mshH* mRNA 水平显著

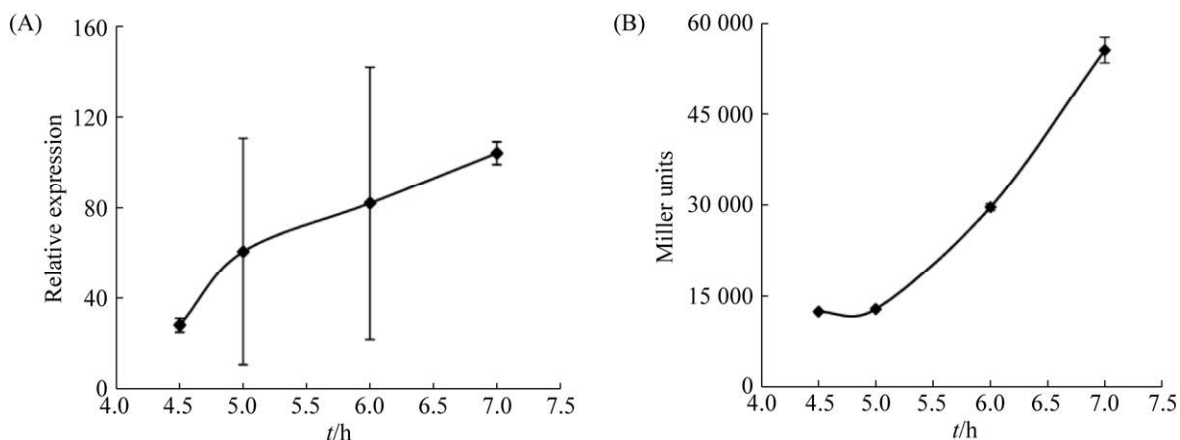


图 1 *mshH* 基因的时相依赖性表达

Figure 1 Cell density-dependent expression of *mshH* gene. A: qPCR; B: *LacZ* fusion. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of *mshH* gene, respectively.

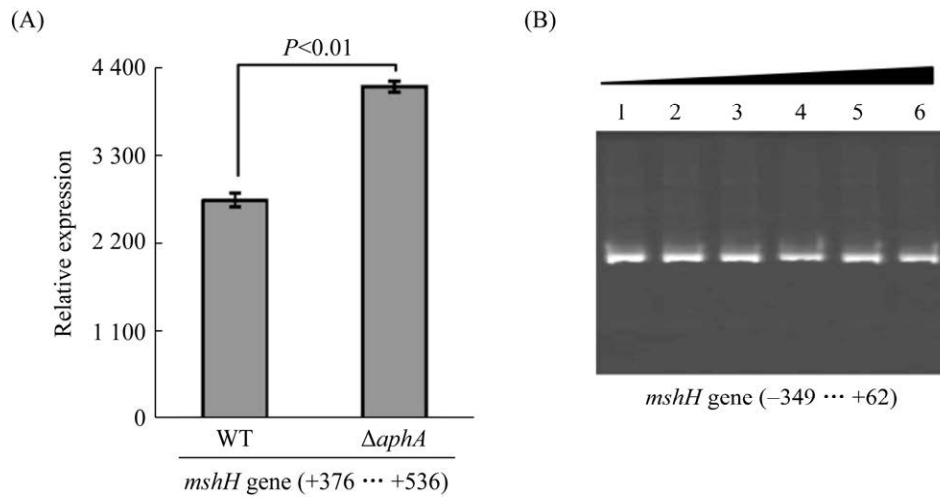


图 2 AphA 间接负调控 *mshH* 基因的转录

Figure 2 AphA represses *mshH* gene transcription in an indirect manner. A: qPCR; B: EMSA. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of *mshH* gene, respectively. Lanes 1, 2, 3, 4, 5 and 6 contained 0, 19.5, 29.3, 39, 40.2 and 50 pmol of His-AphA, respectively.

高于在 WT 中检测到的( $P < 0.01$ ); PCR 扩增 *mshH* 基因的上游调控区 DNA 序列, 并纯化 His-AphA 重组蛋白, 采用 EMSA 实验研究二者能否直接相互作用, 如图 2B 所示: His-AphA 不能特异性地结合到 *mshH* 基因的上游调控区 DNA 序列上。总之, AphA 不能直接和 *mshH* 基因调控区直接结合, 对其转录的影响可能是通过间接方式。

### 2.3 OpaR 直接激活 *mshH* 基因的转录

首先, 采用 qPCR 实验探究 OpaR 对 *mshH* 基因的调控关系, 如图 3A 所示: 在  $\Delta opaR$  中检测到的靶基因 mRNA 水平显著低于在 WT 中检测到的( $P < 0.01$ ), 这说明 OpaR 正调控 *mshH* 基因的转录; 将 *mshH* 基因的调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 中  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的上游, 并将重组质粒分别转入 WT 和  $\Delta opaR$  中, 采用 *LacZ* 报告基因融合实验进一步研究 OpaR 对 *mshH* 基因的调控关系, 结果如图 3B 所示: 在  $\Delta opaR$  中检测到的 miller units (代表  $\beta$ -半乳糖苷酶活性)数值大小显著低于在 WT 中检测到的

( $P < 0.01$ ), 这说明 OpaR 正调控 *mshH* 基因的启动子转录活性; 进一步采用 EMSA 实验探究体外条件下 His-OpaR 能否与 *mshH* 基因的上游 DNA 序列相互作用, 如图 3C 所示: His-OpaR 能结合到 *mshH* 基因调控区 DNA 序列上, 且结合强度与 His-OpaR 的使用量成正比(泳道 1–4); 当提前向第 5 泳道加入 2 pmol 未标记的 *mshH* 基因调控区 DNA 片段作为竞争性冷探针(cold probe)时, 阻滞带消失; 当向反应体系中加入鼠疫菌 F1 抗原(un-related protein, 6 泳道)蛋白替代 His-OpaR 时, 也不能出现阻滞条带; 最后, 采用 DNase I 足迹实验研究 His-OpaR 对 *mshH* 基因调控区 DNA 片段的结合位点, 如图 3D 所示: His-OpaR 对 *mshH* 基因调控区 DNA 序列有 2 个特异性结合位点, 分别位于 *mshH* 基因(翻译起始密码子第一个碱基被定义为 +1)上游 -160 至 -80 bp 和 -58 至 -19 bp 之间的碱基序列上。总之, 上述结果表明, OpaR 能结合到 *mshH* 基因调控区 DNA 序列上并激活其转录。

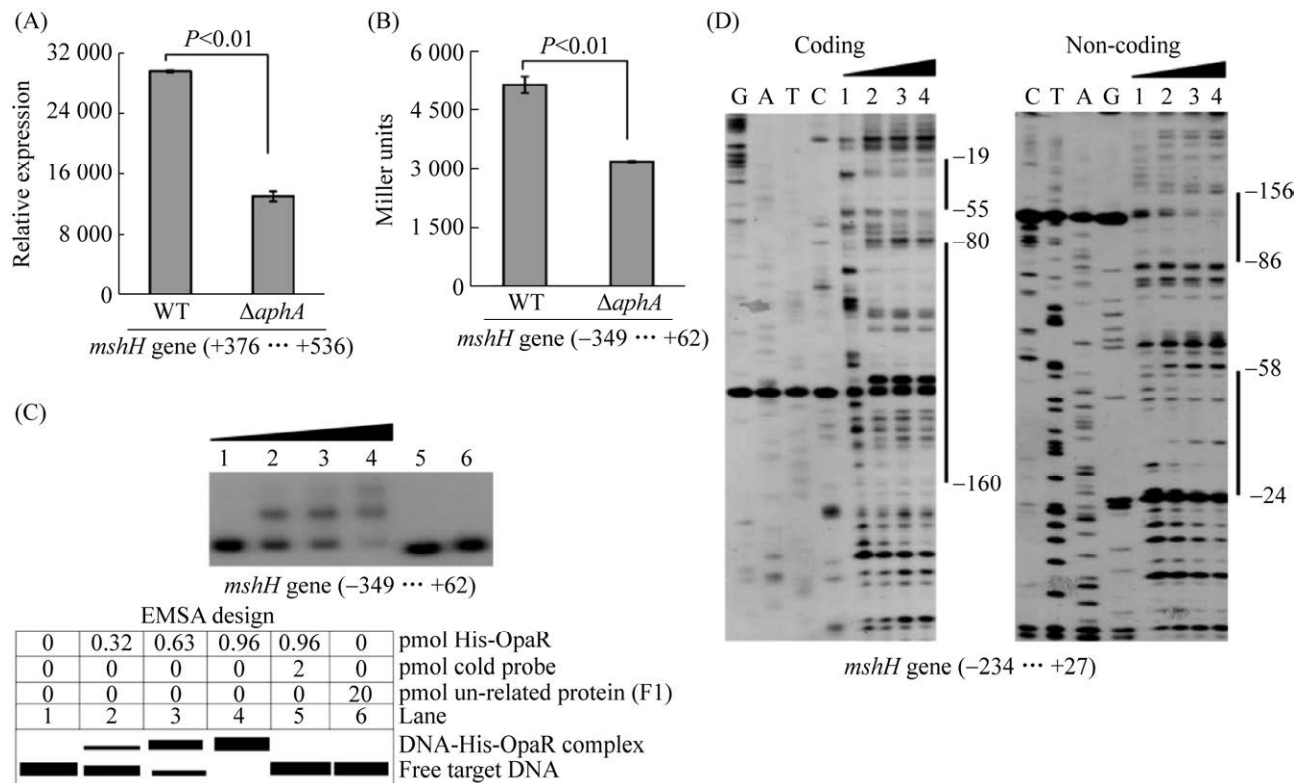


图3 OpaR 直接激活 *mshH* 基因的转录

Figure 3 OpaR activates *mshH* gene transcription in a direct manner. A: qPCR; B: LacZ fusion; C: EMSA; D: DNase I footprinting. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of *mshH* gene, respectively. Lanes G, A, T and C represent the Sanger sequencing reactions. Lanes 1, 2, 3 and 4 in Figure 3D contained 0, 3, 6 and 9 pmol of His-OpaR, respectively. The protected regions by His-OpaR are indicated on the right-hand side of the DNase I footprinting pictures with vertical bars.

### 3 讨论与结论

IV 型菌毛广泛存在于弧菌属细菌中, 其表达受许多因素紧密调控。在创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中, 缺氧可降低 IV 型菌毛的表达<sup>[18]</sup>, 且临床分离株表达 IV 型菌毛的能力要强于环境分离株<sup>[19]</sup>。在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中, 毒力调控子 ToxT 可结合到 MSHA 相关基因的启动子区 DNA 序列上而抑制其转录<sup>[20]</sup>。第二信使 c-di-GMP 与 ATP 酶 MshE 结合后, 可直接调节 MSHA 菌毛的生理活性<sup>[21]</sup>。肽酶 TcpJ 可在翻译后水平上降解 MSHA 菌毛蛋白<sup>[22]</sup>。此外,

几丁质和几丁质寡糖能以 ChiS 依赖性方式上调霍乱弧菌 ChiRP 的表达<sup>[23]</sup>。在副溶血弧菌中, 已有研究表明几丁质可以诱导 ChiRP 的表达<sup>[24-25]</sup>。QS 系统核心调控子 OpaR 可以结合到操纵子 *mshBACDOPQ* 和 *pilABCD* 启动子区 DNA 序列上激活它们的转录, 从而调控 MSHA 和 ChiRP 的表达<sup>[13-14]</sup>。MSHA 基因位点含有 2 个大的操纵子, 即 *mshBACDOPQ* 和 *mshHIJKLMNEGF*<sup>[3]</sup>。QS 系统核心调控子是否对操纵子 *mshHIJKLMNEGF* 也有直接的调控作用, 还有待于进一步验证。本研究发现: *mshH* 基因(*mshHIJKLMNEGF* 操纵子首基因)的表达具有时相依赖性特征, 高细

菌密度时表达水平高; QS 系统在低细菌密度下的核心调控子 AphA 对 *mshH* 基因的转录具有间接的抑制作用, 而高细菌密度下的核心调控子 OpaR 对其具有直接的激活作用。可见, 编码副溶血弧菌 IV 型菌毛的 3 个操纵子均受 QS 系统的直接调控(通过 OpaR 介导)。值得注意的是, OpaR 对副溶血弧菌 BB22OP 株 IV 型菌毛相关基因的转录起负调控作用<sup>[26]</sup>, 而本文及我们前期的研究表明, OpaR 对副溶血弧菌 RIMD2210633 株 IV 型菌毛相关基因的转录具有激活作用<sup>[13-14]</sup>, 这可能和两株菌的基因组之间具有较大差异有关<sup>[27]</sup>。

由于引物延伸<sup>[7]</sup>和 5'RACE<sup>[28]</sup>实验均未检测到 *mshH* 基因的转录起始位点, 因此利用在线工具 Softberry (<http://linux1.softberry.com>)预

测了 *mshH* 基因的转录起始位点, 结果发现 A (-39) (起始密码子第一个碱基定义为+1)很可能是其转录起始位点, 该位点具有较保守的-10和-35 区 (图 4)。通过汇总翻译起始位点、Shine-Dalgarno (SD)序列、OpaR 结合位点等, 构建了如图 4 所示的 OpaR 依赖的 *mshH* 启动子区结构。His-OpaR 与 *mshH* 的启动子 DNA 序列有 2 个结合位点, 即 OpaR site 1 和 site 2, 其中 OpaR site 1 位于-35 区上游, 而 OpaR site 2 覆盖-10 区和预测的转录起始位点。调控子蛋白的这种结合位置且是正调控关系, 在原核生物中并不常见, 很可能存在一些未知的调控子可以抑制 *mshH* 基因的转录, 而 OpaR 的结合恰好干扰了这些负调控子对 *mshH* 启动子的结合, 然而是否存在这类调控子, 还有待于研究发掘。

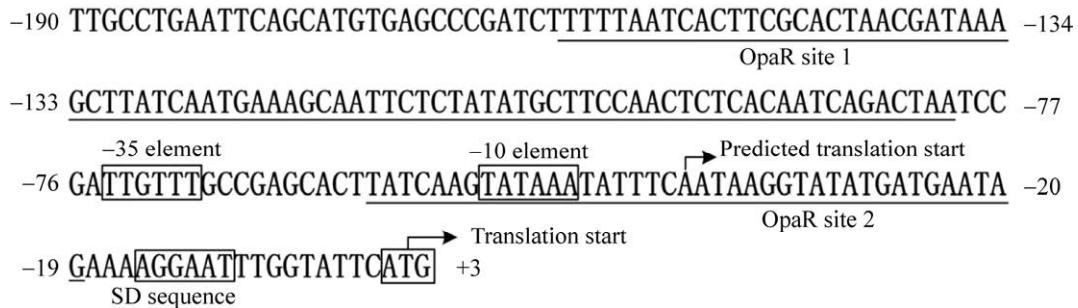


图 4 *mshH* 基因启动子区序列

Figure 4 Promoter organization of *mshH* gene. The DNA sequence was derived from *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633. The predicted transcription start site was indicated by bent arrow. The SD sequence, translation start site and -10/-35 elements were enclosed in boxes. The OpaR binding sites were underlined with solid lines.

## 参考文献

- [1] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [2] Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109-118.
- [3] Aagesen AM, Häse CC. Sequence analyses of type IV pili from *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Microbial Ecology*, 2012, 64(2): 509-524.
- [4] Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1160-1182.
- [5] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197-222.



- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Lu RF, Sun JF, Qiu Y, Zhang MM, Xue XF, Li X, Yang WH, Zhou DS, Hu LF, Zhang YQ. The quorum sensing regulator OpaR is a repressor of polar flagellum genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(7): 651–657.
- [9] Lu RF, Tang H, Qiu Y, Yang WH, Yang HY, Zhou DS, Huang XX, Hu LF, Zhang YQ. Quorum sensing regulates the transcription of lateral flagellar genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Future Microbiology*, 2019, 14: 1043–1053.
- [10] Wang L, Ling Y, Jiang HW, Qiu YF, Qiu JF, Chen HP, Yang RF, Zhou DS. AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 245–251.
- [11] Zhang YQ, Hu LH, Qiu Y, Osei-Adjei G, Tang H, Zhang Y, Zhang R, Sheng XM, Xu SG, Yang WH, Yang HY, Yin Z, Yang RF, Huang XX, Zhou DS. QsvR integrates into quorum sensing circuit to control *Vibrio parahaemolyticus* virulence. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(3): 1054–1067.
- [12] 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*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676436.
- [13] Sun JF, Li X, Qiu Y, Xue XF, Zhang MM, Yang WH, Zhou DS, Hu LF, Lu RF, Zhang YQ. Quorum sensing regulates transcription of the pilin gene *mshA1* of MSHA pilus in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene*, 2022, 807: 145961.
- [14] 陆仁飞, 孙君芳, 薛星帆, 张苗苗, 李雪, 吴齐敏, 张义全. OpaR 对副溶血弧菌 *pilABCD* 操纵子的调控研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2021, 51(12): 906–911.
- Lu RF, Sun JF, Xue XF, Zhang MM, Li X, Wu QM, Zhang YQ. Transcriptional regulation of *pilABCD* by OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2021, 51(12): 906–911. (in Chinese)
- [15] 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.
- [16] 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)
- [17] 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.
- [18] Phippen BL, Oliver JD. Role of anaerobiosis in capsule production and biofilm formation in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*, 2015, 83(2): 551–559.
- [19] Phippen BL, Oliver JD. Clinical and environmental genotypes of *Vibrio vulnificus* display distinct, quorum-sensing-mediated, chitin detachment dynamics. *Pathogens and Disease*, 2015, 73(8): ftv072.
- [20] Hsiao A, Xu X, Kan B, Kulkarni RV, Zhu J. Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization *Pilus* expression. *Infection and Immunity*, 2009, 77(4): 1383–1388.
- [21] Floyd KA, Lee CK, Xian WJ, Nametalla M, Valentine A, Crair B, Zhu SW, Hughes HQ, Chlebek JL, Wu DC, Hwan Park J, Farhat AM, Lomba CJ, Ellison CK, Brun YV, Campos-Gomez J, Dalia AB, Liu J, Biais N, Wong GCL, Yildiz FH. C-di-GMP modulates type IV MSHA pilus retraction and surface attachment in *Vibrio cholerae*. *Nature Communications*, 2020, 11: 1549.
- [22] Hsiao A, Toscano K, Zhu J. Post-transcriptional cross-talk between pro- and anti-colonization pili biosynthesis systems in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(4): 849–860.

- [23] Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *PNAS*, 2004, 101(8): 2524–2529.
- [24] Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park KS, Kodama T, Honda T. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1): 89–97.
- [25] Thompson FL, Neto AA, Santos EDO, Izutsu K, Iida T. Effect of N-acetyl-D-glucosamine on gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbes and Environments*, 2011, 26(1): 61–66.
- [26] Kernell Burke A, Guthrie LT, Modise T, Cormier G, Jensen RV, McCarter LL, Stevens AM. OpaR controls a network of downstream transcription factors in *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121863.
- [27] Jensen RV, Depasquale SM, Harbolick EA, Hong T, Kernell AL, Kruchko DH, Modise T, Smith CE, McCarter LL, Stevens AM. Complete genome sequence of prepandemic *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *Genome Announcements*, 2013, 1(1): e00002–e00012.
- [28] 李杰, 张义全, 高鹤, 王丽, 胡小许, 周冬生. 利用优化的 5'-RACE 实验定位副溶血弧菌基因的转录起始位点. *生物技术通讯*, 2014, 25(3): 328–332.
- Li J, Zhang YQ, Gao H, Wang L, Hu XX, Zhou DS. Use of optimized 5'-RACE method to determine gene transcription start sites in *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Biotechnology*, 2014, 25(3): 328–332. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)