



肽酶 PepT 参与副溶血弧菌的浮游运动和生物被膜形成

齐瑜¹, 刘鹏选^{1,2}, 张小芸¹, 白雪瑞³, 王权¹, 方维焕⁴, 蒋蔚^{1*}

- 1 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241
- 2 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095
- 3 上海市农业学校动物科学技术系, 上海 201600
- 4 浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

齐瑜, 刘鹏选, 张小芸, 白雪瑞, 王权, 方维焕, 蒋蔚. 肽酶 PepT 参与副溶血弧菌的浮游运动和生物被膜形成. 微生物学报, 2022, 62(9): 3646–3657.

Qi Yu, Liu Pengxuan, Zhang Xiaoyun, Bai Xuerui, Wang Quan, Fang Weihuan, Jiang Wei. Peptidase T is related to swimming motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3646–3657.

摘要: *pepT* 基因编码一种金属依赖性肽酶 T (peptidase T, PepT), 能特异性催化三肽 N 端氨基酸, 因此也称为氨肽酶 T。研究发现大多数氨肽酶参与细菌蛋白质新陈代谢和调节三肽活性, 但关于 PepT 在细菌毒力及致病性方面的报道较少。【目的】本文选取 PepT 为研究对象, 研究其对副溶血弧菌生物学特性及致病性的影响。【方法】通过构建缺失株 $\Delta pepT$ 和回补株 $C\Delta pepT$, 比较菌株在运动性、生物被膜、环境耐受、细胞毒性等方面的差异。【结果】与野生株相比, $\Delta pepT$ 缺失株的极性鞭毛转录水平极显著下降, 浮游运动能力降低; 同时生物被膜形成能力减弱, 而细菌群集运动及环境耐受能力无显著差异。此外, 缺失 *pepT* 基因会导致副溶血弧菌的细胞毒性和小鼠毒力作用显著下降。【结论】*pepT* 基因与副溶血弧菌浮游运动和生物被膜形成能力相关, 并且影响其致病性。

关键词: 副溶血弧菌; 金属依赖性肽酶; 生物被膜; 运动性; 致病性

基金项目: 上海市自然科学基金(21ZR1477000); 国家自然科学基金(31702277); 上海科学委员会项目(21N31901000); 新疆建设兵团财政科技计划(2020AB025-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020JB07)

Supported by the Shanghai Natural Science Foundation of China (21ZR1477000), by the National Natural Science Foundation of China (31702277), by the Shanghai Science and Technology Commission Research Project (21N31901000), by the Key Scientific and Technological Project of Xinjiang Production & Construction Corps (2020AB025-03) and by the Basic Foundation for Scientific Research of State-level Public Welfare Institutes of China (2020JB07)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34293397; E-mail: jiangweijw99@163.com

Received: 3 February 2022; Revised: 17 March 2022; Published online: 19 May 2022

Peptidase T is related to swimming motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*

QI Yu¹, LIU Pengxuan^{1,2}, ZHANG Xiaoyun¹, BAI Xuerui³, WANG Quan¹, FANG Weihuan⁴, JIANG Wei^{1*}

1 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 Department of Animal Science and Technology, Shanghai College of Agriculture, Shanghai 201600, China

4 College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

Abstract: The *pepT* gene of *Vibrio parahaemolyticus* encodes a metal dependent peptidase T (PepT) that catalyzes the N-terminal amino acid of tripeptides with high specificity, and thus it is also called aminopeptidase T. Studies have found that most aminopeptidases are involved in protein metabolism of bacteria and regulating the activity of tripeptides, but little is known about PepT in bacterial virulence and pathogenicity. **[Objective]** In this study, PepT was chosen to explore the effect of gene deletion on the biological characteristics and pathogenicity of *V. parahaemolyticus*. **[Methods]** The *pepT* gene deletion mutant $\Delta pepT$ and the complementary strain $C\Delta pepT$ were generated and their differences of various strains in motility, biofilm, environmental tolerance and cytotoxicity were compared. **[Results]** Compared with the wild-type strain, $\Delta pepT$ had significantly decreased transcription level of polar flagella and reduced swimming mobility. Furthermore, the biofilm formation ability of $\Delta pepT$ was weakened, but there were not statistically significant in the swarming mobility and environmental tolerance. In addition, the *pepT* gene deletion resulted in remarkably lowered cytotoxicity and virulence of *V. parahaemolyticus* in mice. **[Conclusion]** The *pepT* gene deletion affects the swimming motility and biofilm formation ability as well as the pathogenicity of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; metal dependent peptidase T; biofilm; motility; pathogenicity

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐微生物,可引起鱼和对虾早期死亡综合征及急性肝胰腺坏死病,严重威胁国内外水产养殖业的健康发展^[1-2]。副溶血弧菌还是一种重要的食源性肠道致病菌,食用受污染或未煮熟的海鲜,不仅能引发急性胃肠炎,还可通过伤口感染导致败血症^[3-4]。从最初在日本“夏季腹泻”病例中分离出副溶血弧菌后,其引起的食物中毒病例不断增加^[5],已成为威胁人类健康的主要食源性疾病之一^[6]。目前,副溶血弧菌毒力因子研究较多的主要包括溶血毒素、黏附素、III型(T3SSs)和VI型(T6SSs)分泌系

统等^[7-8],而对氨肽酶在其致病过程中发挥的作用知之甚少。

微生物中的氨肽酶 PepT 最先从大肠杆菌^[9-10]和鼠伤寒沙门菌^[11]中分离出来,能特异性催化三肽 N 端释放出游离氨基酸^[12]。PepT 是金属肽酶 M20 家族成员,其亚基中包含一个金属结合域和一个介导二聚化的第二结构域^[13-14]。M20 家族氨肽酶成员的生物学功能受到广泛关注:例如,在大肠杆菌中发现的 PepN 参与了整个胞浆蛋白的降解^[15];乳酸杆菌的氨基肽酶 PepV 参与氨基酸利用^[16];乳酸杆菌作为食品工业上主要的发酵剂,利用氨肽酶将牛

奶中酪蛋白降解成细菌新陈代谢所需的氨基酸成分^[17],才能在牛奶中生长,并将牛奶发酵成奶酪。最近,氨基肽酶参与发病机制的研究也引起广泛关注。研究表明,氨基肽酶 PepN 在感染鼠伤寒沙门氏菌小鼠模型的全身感染过程中发挥重要作用^[18]。在牛羊肝片吸虫中,氨基肽酶是入侵、获取营养物质和逃避宿主免疫反应的必需酶^[19]。在猪链球菌中通过差异蛋白质组学与弱毒株对比,强毒株中亮氨酸氨基肽酶和氨基肽酶 T 两种氨基肽酶表达上调^[20]。以上研究表明氨基肽酶功能极其多样化,因此,氨基肽酶 PepT 的研究具有巨大的生物技术应用潜力。

研究表明,PepT 等氨基肽酶通过影响关键蛋白的生物活性参与细菌应激反应和毒力,证明了氨基肽酶在金黄色葡萄球菌发病机制中的重要性^[21],但其在副溶血弧菌致病机制过程中发挥的作用研究较少。本研究选取副溶血弧菌 *pepT* 基因,通过构建缺失株和回补株,研究其在副溶血弧菌生物学特性及致病性中的作用,为治疗副溶血弧菌引发的感染提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒

副溶血弧菌 SH112 (GenBank 登录号: JACYGZ000000000.1)野生型菌株(wild-type, WT)、同源重组质粒 pYAK1、辅助菌 pRK2013-HB101、pMMB-207 载体,以及 HeLa 细胞均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(上海)有限公司;限制性内切酶和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒购自 Promega

公司;DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司;细胞培养相关耗材购自美国 Corning 公司;硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)购自广东环凯微生物公司;结晶紫染色液购自于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 *pepT* 基因缺失株和回补株的构建

使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),以副溶血弧菌 SH112 的 DNA 为模板,利用引物对 *pepT*-A/B 和 *pepT*-C/D,扩增出具有重叠 15 bp 同源臂的片段,以 *pepT*-A/D 引物对扩增 *pepT* 基因组位点侧翼序列的 PCR 片段,利用 *Pst* I 和 *Sma* I 双酶切 PCR 片段,将其连接到具有相同限制性酶切位点的 pYAK1 载体。将重组质粒热激转化到感受态细胞 CC118 λ pir 中,涂布于氯霉素(10 μ g/mL)抗性的 LB 平板,挑取长出的单菌落增菌后提取 DNA,利用引物 *pepT*-A/D 进行 PCR 鉴定,鉴定正确的重组质粒命名为 *pepT*-pYAK1。在辅助菌 pRK2013-HB101 的作用下,与副溶血弧菌 SH112 进行接合转移,分别在 10 μ g/mL 氯霉素的 TCBS 平板和含 20%蔗糖 LB 固体培养基上进行传代筛选,利用表 1 所列的一系列特异性引物,对可疑的双交叉突变株进行了 PCR 和 qRT-PCR 验证,将成功缺失 *pepT* 的菌株命名为 $\Delta pepT$ 。利用 *pepT*-pMMB-F/R 引物,从 SH112 基因组中扩增含有 *pepT* 的整个阅读框(ORF)的 1 077 bp 片段,利用限制性内切酶对 pMMB-207 质粒和目的片段进行酶切,通过 T4 连接酶连接后转化到大肠杆菌 CC118 λ pir 中。将该互补载体经过上述方法,接合转导至相应的缺失突变株中,在氯霉素抗性的 TCBS 平板上进行抗性筛选,利用引物 *pepT*-E/F 和 *pepT*-pMMB-F/R 进行 PCR 鉴定,鉴定正确的互补株菌株命名为 $C\Delta pepT$ 。

表 1 本研究中所用引物名称及序列

Table 1 Primers used in this study

Primers	Primer pairs sequences (5'→3')	Restriction enzyme
<i>pepT</i> -A/B	GCGCTGCAGAAAGCGGGAGTTTCAAGAC/ TTGGGTGTCTCTTCTTTTGGGGTTCGA	<i>Pst</i> I
<i>pepT</i> -C/D	GAAAGAGACACCCAACCTCACTCAAATATTT/ TATCCCGGGTGTATGCCGTGTTAGGGTC	<i>Sma</i> I
<i>pepT</i> -E/F	TTGTTCAATGCCTTGGCTGTC/ CAGTTACTGCCGTGCCTC	
<i>pepT</i> -pMMB-F/R	CGCGGATCCATGACACAAATTAATCAAGA/ TAGCTGCAGCTACTTCACCAAAAAATGCT	<i>Bam</i> H I <i>Pst</i> I
<i>sacB</i> -F/R	ACGGCACTGTCGAAACTAT/ TTCCGTCACCGTCAAAGAT	

Restriction enzyme sites are underlined.

1.3 生长曲线测定

将野生株 SH112、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 在 3% NaCl 固体 LB 培养基上划线涂板, 次日挑取单克隆进行培养, 菌液 $OD_{600}=0.2\pm 0.02$ 后, 以 1:100 (V/V) 接种于新鲜的 3% NaCl-LB 液体培养基中, 37 °C 振荡连续培养 12 h, 每隔 1 h 吸取 100 μ L 菌液, 重复 3 孔, 测定 OD_{600} 值, 该实验重复 3 次。

1.4 环境压力耐受因子检测

将各菌株 37 °C 过夜培养, 转接 100 μ L 至 5 mL 3% NaCl-LB 培养基至对数生长期, 即 $OD_{600}=0.2\pm 0.02$ 后, 分别以 1:100 倍稀释至 pH

为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的 3% NaCl-LB 液体培养基、含 1%、3%、5%、7%、9% 和 11% NaCl 的 LB 培养基中混匀, 再加入到 96 孔板中 (200 μ L/孔), 重复 4 次, 静置培养于 37 °C 温箱, 每隔 1 h 测定其 OD_{600} 值, 绘制不同环境条件下的生长曲线。

1.5 qRT-PCR 检测基因转录水平

使用 TRIzol 法提取 SH112、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 菌株的 RNA, 用 DNase I 处理, 排除基因组 DNA 污染。根据制造商说明书, 使用 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行 cDNA 合成。根据表 2 特异性引物, 以 *gap* 基因作为内

表 2 荧光定量 PCR 鉴定基因 mRNA 转录水平引物

Table 2 Primers used in real-time PCR

Primers	Primer pairs sequences (5'→3')
<i>pepT</i> -RT-F	GAGCTGTCACATGGATACGGTAACG
<i>pepT</i> -RT-R	ATAGTGTTCCTTTTCGAGCGGATG
<i>flaA</i> -RT-F	ATCAGCAACCTAGACAACATA
<i>flaA</i> -RT-R	TTAGCCCAACAAGCTTAGCGC
<i>fliD</i> -RT-F	ATTTCGTACGCGAGAGAAAAGT
<i>fliD</i> -RT-R	TTAACCTAACGCACTCATAAG
<i>flgE</i> -RT-F	TGGGGTGAATCAAACAAAGGC
<i>flgE</i> -RT-R	TTATCTAATCTGCAGGATATT
<i>flgM</i> -RT-F	AGCCAACAAAGTAAAGCCGTC
<i>flgM</i> -RT-R	TTAGCTTTTGCCTTGCAATTC
<i>fliF</i> -RT-F	GAAACCAGCCTAATTGGTAGC
<i>fliF</i> -RT-R	TTAGCCATTTTCGTTTCATCCA
<i>gap</i> -RT-F	TTTGAAGAGCGTCCGTTGGTG
<i>gap</i> -RT-R	TTAAGCCAACACAACGTTACG

参, 通过 qRT-PCR 检测目的基因 mRNA 水平。使用 SYBR Premix Ex Taq kit (TaKaRa) 试剂盒进行 SYBR Green PCR, 反应体系为: cDNA 模板 2 μL , 上游引物 0.4 μL , 下游引物 0.4 μL , 2 \times ChamQ Universal SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL , 去离子水 7.2 μL , 总体积 20 μL 。使用 ABI 7500 RT-PCR 系统进行相对定量 RT-PCR, 设置反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; PCR 反应阶段: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。采用比较周期阈值法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法)分析基因表达水平。

1.6 群集和浮游运动

将野生株 SH112、 ΔpepT 和 $\text{C}\Delta\text{pepT}$ 过夜活化后, 按 1:100 转接培养至对数生长期。用新鲜的 3% NaCl-LB 液体培养将各组菌液浓度调整一致。将菌液 2 μL 垂直点样于浮游运动培养板(含 0.3% 琼脂、3% NaCl-LB 的 LB)上, 浮游平板正置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 4 h; 将菌液 2 μL 垂直点样于群集平板(含 1.5% 琼脂、3% NaCl-LB 的 BHI)上, 群集平板 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱正置培养 24 h。拍照记录 2 种平板上菌株运动情况, 并测量直径。

1.7 ICR 小鼠感染实验

将雌性 ICR 小鼠(3–4 周龄)分成 4 组, 每组 10 只。将 SH112、 ΔpepT 和 $\text{C}\Delta\text{pepT}$ 这 3 种菌株培养至对数生长期, 收集沉淀后用 PBS 清洗 3 遍, 以 5×10^7 CFU/只攻毒, 腹腔注射实验组小鼠, 同时空白对照组小鼠注射同体积生理盐水, 连续 48 h 观察小鼠精神状态, 记录小鼠的死亡时间及数量, 最终根据所得数据绘制小鼠存活曲线图。

1.8 各菌株生物被膜形成能力的测定

将野生株 SH112、 ΔpepT 和 $\text{C}\Delta\text{pepT}$ 菌株过夜活化后, 划线涂布于 3% NaCl-LB 固体培养基, 次日在平板上挑取单菌落, 接种到液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、6 180 r/min 培养至对数生长期,

以 1:100 比例稀释混匀, 在 96 孔板中每孔添加 200 μL , 每种菌株重复 8 个孔, 以空白培养基为对照组, 然后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中静置培养 48 h。培养完成后, 每孔加 250 μL 的无菌 PBS 清洗 3 次。然后用 200 μL 的无水甲醇室温下固定 15 min, 弃去甲醇后, 室温静置干燥。再用 200 μL 结晶紫染色 15 min 后回收结晶紫, 用 PBS 冲洗, 将平板室温晾干, 加 200 μL 的 95% 乙醇溶解结晶紫, 最后用酶标仪测定 OD_{590} 值。实验独立重复 3 次。

1.9 细胞毒性试验

参考文献[22]实验方法, 将 HeLa 细胞铺于 96 孔细胞板中, 过夜培养长至 80%–90% 覆盖率, 用 PBS 清洗 2 遍后, 每个试验孔加入 50 μL 无酚红 DMEM 待用。将 SH112、 ΔpepT 和 $\text{C}\Delta\text{pepT}$ 培养至对数生长期, 用无酚红 DMEM 清洗 3 遍后, 按照 MOI=100:1 倍比稀释后, 试验孔加入 50 μL 菌液感染 HeLa 细胞, 重复 6 个孔; 将细胞板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中感染 2 h。根据 CytoTox 96 试剂盒说明书操作, 检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的释放, 通过计算试验组 LDH 释放百分比, 比较不同菌株对 HeLa 细胞毒性。

1.10 数据统计分析

数据采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA), 用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。星号表示 P 值, ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 PepT 生物信息学分析结果

使用 pepT -pMMB-F/R 引物扩增, PCR 扩增 SH112 株的基因组, 将目的条带纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 利用 DNASTar 软件将核苷酸序列翻译为氨基酸序

列。通过 NCBI 的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库对氨基酸序列进行同源性比对, 并使用 MEGA 软件绘制进化树; 通过 NCBI 的 CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对 PepT 蛋白的功能结构域进行

预测。结果发现, *pepT* 基因共包含 1 107 个核苷酸(GenBank: OM307225), 编码 368 个氨基酸残基。通过 MEGA 软件绘制进化关系(图 1), 结果表明, PepT 序列在副溶血弧菌分离株中高度保守, 同源性达 99%以上。

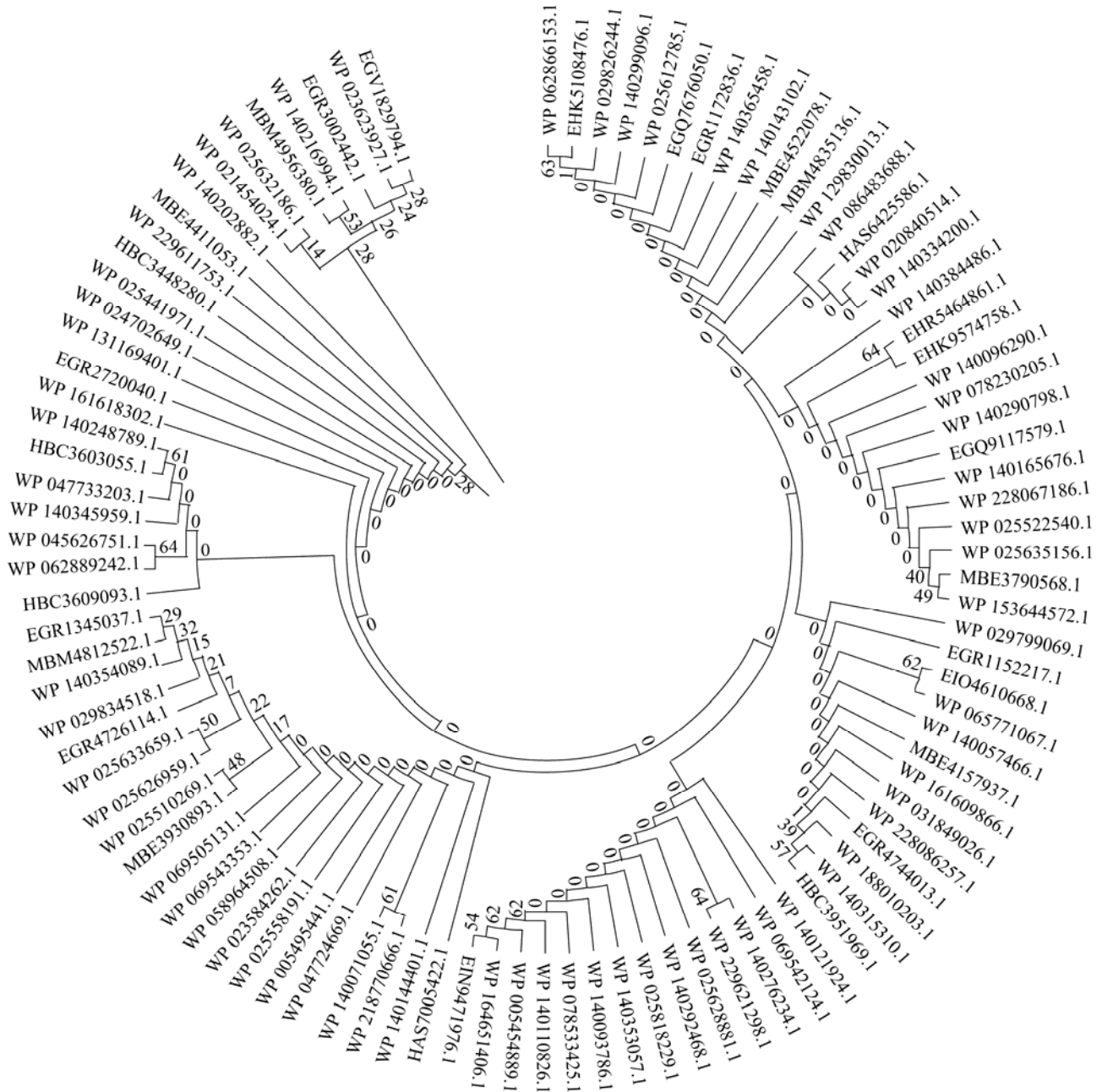


图 1 PepT 的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of PepT.

2.2 基因缺失株 $\Delta pepT$ 及回补株 $C\Delta pepT$ 的鉴定

通过同源臂双交换重组法, 构建 $pepT$ 基因缺失株, 使用 $pepT$ -E/F 引物对验证基因缺失株的正确性。结果如图 2 所示, 野生株扩增出 2 878 bp 长条带(泳道 1), 而缺失株扩增出 1 771 bp 短片段(泳道 2), 此时构建成功的互补株也扩增出 1 771 bp 短片段(泳道 3)。用引物 $pepT$ -pMMB-F/R 扩增时, 野生株有目的片段 1 107 bp (泳道 4), 缺失株无扩增片段(泳道 5), 互补株有目的条带(泳道 6), 与野生株大小相同。综上所述, $pepT$ 基因的缺失株 $\Delta pepT$ 和回补株 $C\Delta pepT$ 构建成功。

将构建成功的缺失株和互补株在 3% NaCl-LB 平板上连续培养 20 代, 最终 PCR 验证, 条带大小均正确, 表明 $\Delta pepT$ 、 $C\Delta pepT$ 具有良好的遗传稳定性。

2.3 qRT-PCR 检测目的基因转录水平结果

通过 qRT-PCR 对 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 进行目的基因 $pepT$ 转录情况分析, 结果如图 3 所示, $\Delta pepT$ 无目的基因转录, 而野生株和互补株中基因 $pepT$ 转录水平正常。

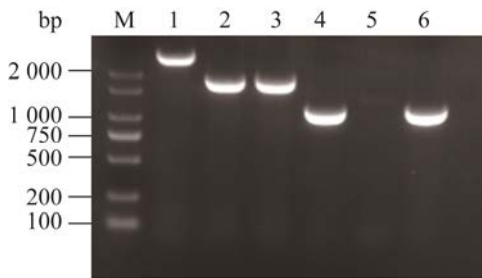


图 2 副溶血弧菌 WT、 $\Delta pepT$ 及回补株 $C\Delta pepT$ 的鉴定

Figure 2 PCR identification of WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$ of *V. parahaemolyticus* using $pepT$ -E/F primers (lanes 1–3) and $pepT$ -pMMB-F/R primers (lanes 4–6), respectively. M: DL2000.

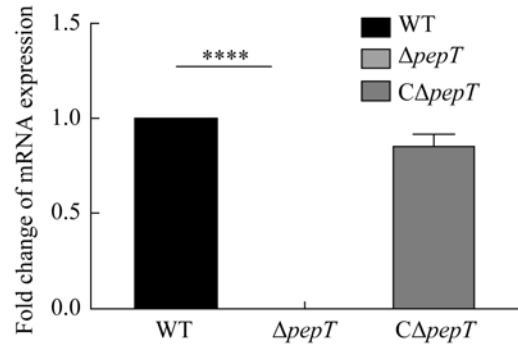


图 3 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 菌株的 $pepT$ 基因表达情况

Figure 3 Expression of $pepT$ gene in WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$ strains. ****: $P < 0.0001$.

2.4 各菌株的生长曲线

如图 4 所示, 3% NaCl-LB 培养基中培养野生株、缺失株和互补株, 结果表明, 基因 $pepT$ 的缺失并不影响副溶血弧菌的生长趋势 ($P > 0.05$), 排除了由于该基因缺失造成副溶血弧菌的生长规律的改变对后续试验的影响。

2.5 各菌株的环境压力耐受因子

如图 5 所示, 耐环境压力试验证实, 缺失株 $\Delta pepT$ 对酸、碱、高渗透压的抵抗力与野生株相比, 没有显著差异 ($P > 0.05$)。

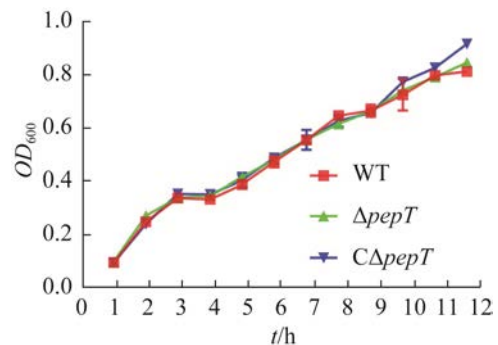


图 4 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 菌株在 3% NaCl-LB 的生长曲线

Figure 4 The growth curve of WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$. $P > 0.05$.

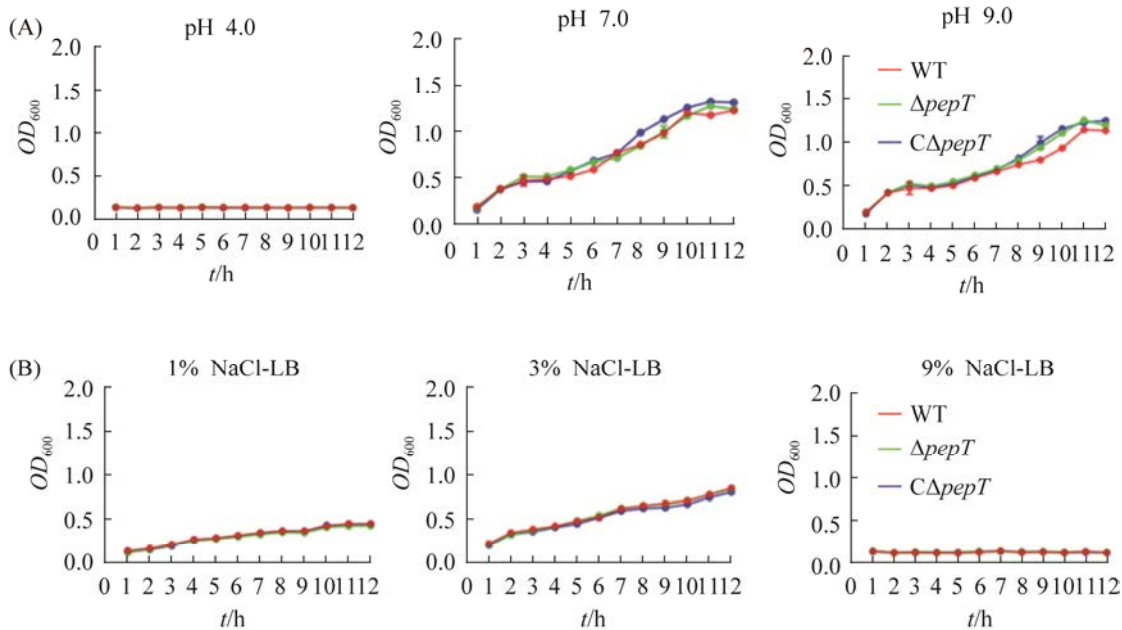


图 5 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 在不同酸碱度(A)和盐浓度(B)培养基中生长曲线

Figure 5 Effects of NaCl (A) and acid-base stress concentration (B) on the growth ability of WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$.

2.6 各菌株的生物被膜形成能力

本研究采用结晶紫染色法检测生物被膜形成能力(图 6A), 95%乙醇溶解后, OD_{595} 读数结果如图 6B, 结果显示, $\Delta pepT$ 生物被膜形成能力显著低

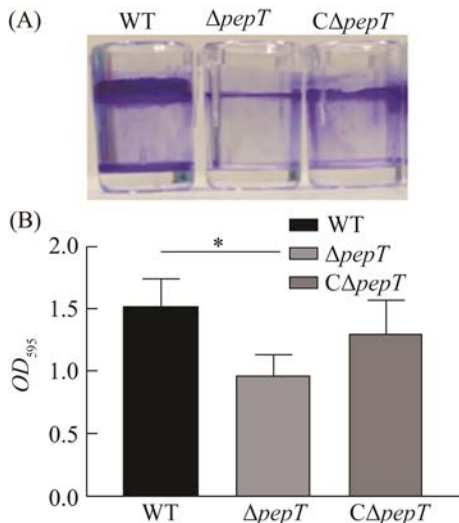


图 6 各菌株生物被膜形成能力的比较

Figure 6 Biofilm formation ability of strains. A: the photograph of stained cells was taken at 2 days after incubation in 3% NaCl-LB; B: stained cells dissolved in 95% ethanol solution read at OD_{595} . *: $P < 0.05$.

于野生株($P < 0.01$), 互补株生物被膜形成能力恢复, 表明基因 $pepT$ 与副溶血弧菌生物被膜形成有关。

2.7 基因 $pepT$ 缺失对浮游运动和群集运动的影响

在运动性试验中, 浮游运动如图 7A 所示, 各菌株呈半透明圆形运动轨迹, 通过测量运动直径, 缺失株 $\Delta pepT$ 的浮游运动能力相较于野生株显著降低($P < 0.05$), 互补株部分恢复至野生株水平。群集运动如图 7B, 缺失株 $\Delta pepT$ 的运动的菌斑直径与野生株相比, 无显著差异($P > 0.05$)。提示基因 $pepT$ 参与副溶血弧菌的浮游运动能力, 而不参与群集运动。

2.8 各菌株鞭毛相关基因的表达水平

通过 qRT-PCR 分析 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 极性鞭毛基因的转录表达情况。如图 8 所示, 和 WT 相比, $\Delta pepT$ 菌株中的极性鞭毛基因 $flaA$ 、 $fliD$ 、 $flgE$ 、 $flgM$ 的 mRNA 水平极显著下调($P < 0.0001$), 在 $C\Delta pepT$ 菌株中的转录水平回复至野生株水平, 提示缺失 $pepT$ 基因影响副溶血弧菌的极性鞭毛基因的转录。

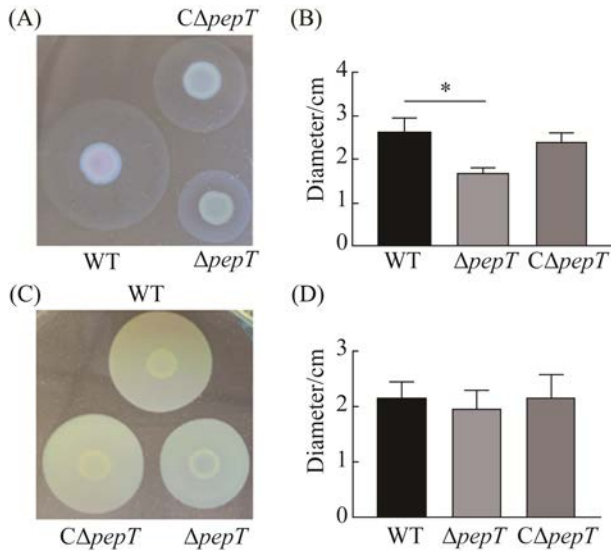


图7 各菌株在浮游平板和群集平板上运动情况
Figure 7 The results of swimming ability and swarming ability of strains. A: the track of three strains on swimming patterns; B: motility zone diameter (cm) measured on swimming patterns; C: the track of three strains on swarming patterns. D: motility zone diameter measured on swarming patterns. *: $P < 0.05$.

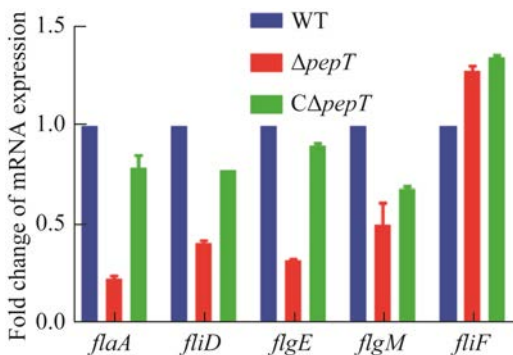


图8 各菌株极性鞭毛基因转录水平的测定
Figure 8 Determination of the transcription levels of polar flagella-related genes in WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$. ****: $P < 0.0001$.

2.9 各菌株对 HeLa 的细胞毒性

WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 以 MOI 为 100:1 感染 HeLa 细胞 2 h 后, 根据 CytoTox 96 试剂盒说明书操作, 检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 的百分含量。结果如图 9 所示, $\Delta pepT$ 对

HeLa 细胞的毒性水平显著下降 ($P < 0.05$), 互补株的细胞毒性百分比基本与野生株水平一致。表明基因 *pepT* 缺失后能够降低副溶血弧菌对 HeLa 细胞的毒性作用。

2.10 各菌株对 ICR 小鼠的致病性

为探讨 *pepT* 基因对副溶血弧菌毒力的影响, 将 WT、 $\Delta pepT$ 和 $C\Delta pepT$ 菌株分别感染小鼠。如图 10 所示, 对照组小鼠存活率为 100%, 感染野生株的小鼠存活率为 0, 而感染缺失株 $\Delta pepT$ 菌株后小鼠存活率为 40%, 显著高于感染野生株。回补株部分恢复野生株毒力水平, 其感染的小鼠存活率为 30%, 低于缺失株水平。以上结果提示, 缺失基因 *pepT* 能减弱副溶血弧菌对 ICR 小鼠的致病性。

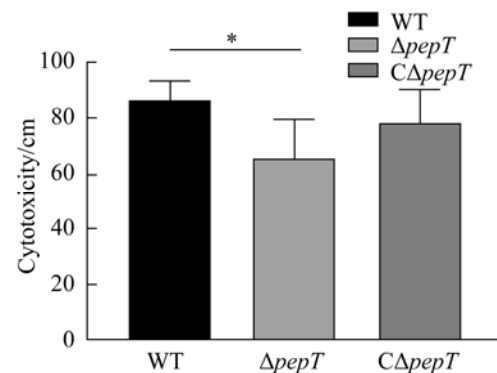


图9 各菌株对 HeLa 细胞的毒性测定结果
Figure 9 Comparison of cytotoxic effects of WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$. Determination of LDH release in the supernatant of HeLa cells *: $P < 0.05$.

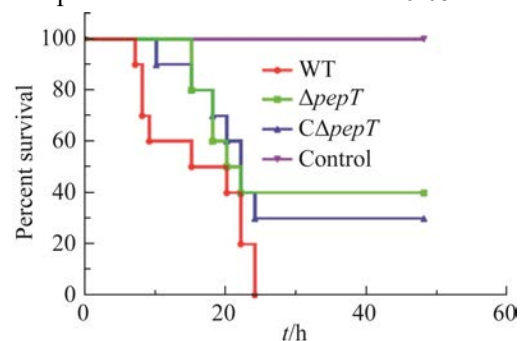


图10 各菌株感染小鼠的存活率比较
Figure 10 Survival curve of ICR mice infected with WT, $\Delta pepT$ and $C\Delta pepT$.

3 讨论与结论

副溶血性弧菌可通过释放多种毒力因子对宿主引起细胞毒性和肠毒性作用, 严重时导致脓毒症甚至死亡^[23]。细菌依赖多种氨肽酶来实现各种细胞功能, 如生长、新陈代谢、参与致病过程等^[24-25]。氨肽酶 *PepT* 在大多数副溶血弧菌分离株中高度保守, 以氨肽酶 *PepT* 作为研究对象, 分析其在副溶血弧菌环境适应性和致病性中的作用, 将为预防和治疗副溶血性弧菌感染提供新的策略。

副溶血弧菌作为一种栖息于海洋和河水域的革兰氏阴性细菌, 其对低渗透压敏感, 需要高于 0.5% 的氯化钠水平才能生长^[26]。此外, 副溶血性弧菌作为一种人类病原体, 一旦进入人体宿主, 与大多数肠道病原体一样, 必须克服胃酸和肠道内 pH 变化的挑战^[27]。但是本研究发现, 基因 *pepT* 缺失株对酸、碱、高渗透压的抵抗力与野生株一致, 即基因 *pepT* 缺失不影响副溶血弧菌对酸碱压力环境的适应性。

生物被膜是一种由附着在生命或非生命物表面以及细菌菌体和胞外基质所形成的固着群体结构^[28]。细菌形成生物被膜后, 对外界不利环境和宿主免疫系统^[29]等比其浮游形式抵抗能力更强^[30]。因此, 病原体形成生物膜的能力对于提高细菌环境存活率和致病性非常重要。本研究结果表明, 副溶血弧菌缺失基因 *pepT* 后生物被膜形成能力显著下降。其他细菌中也存在类似现象, 例如, 缺乏谷氨酸合成酶和细胞质氨基肽酶将会影响枯草芽孢杆菌 JH642 菌株的生物被膜的形成^[31]。在粪肠球菌中, M4 金属蛋白酶家族成员的氨肽酶在生物被膜环境中降解胞外化合物, 用于细菌营养或信号传递^[32]。基于 *PepT* 具备影响氨基酸代谢的能力, 我们推测 *PepT* 可能是通过影响副溶血弧菌部分氨基酸代谢途径进而参与其生物被膜形成过程。

鞭毛介导的运动不仅影响生物被膜的形成, 还与细菌快速定殖宿主细胞能力相关^[33], 因此, 鞭毛系统在细菌致病过程中发挥重要作用。副溶血性弧菌包含 2 个鞭毛系统: 极性鞭毛和侧生鞭毛, 前者是由极性鞭毛基因编码负责浮游运动, 而后者则由侧生鞭毛基因编码负责群集运动^[34]。我们证实, *pepT* 基因缺失导致副溶血弧菌在液体表面的浮游能力极显著减弱, 说明 *PepT* 能够影响副溶血弧菌的浮游运动。从相关基因的数量和表达、蛋白质合成和鞭毛旋转所需的能量来看, 维持细胞运动系统是一项相当大的工程。虽然鞭毛结构复杂, 但其组装过程高度有序。研究表明 *flaA* 基因编码具有功能的鞭毛丝亚基, 从而产生相当多的鞭毛蛋白。FliD 是组织鞭毛蛋白的脚手架结构蛋白, 它对鞭毛丝的聚合至关重要。鞭毛钩子蛋白 FlgE 在鞭毛组装过程中发挥精细作用, 利用灵活特性可以帮助鞭毛有效运转来驱动菌体^[35-36]。细菌鞭毛结构的复杂性和组装的有序性依赖于相对应的基因有序表达和精细调控, 因此鞭毛的组装与鞭毛基因表达是联结的。qRT-PCR 试验结果发现, $\Delta pepT$ 中 *flaA*、*fliD*、*flgE*、*flgM* 基因转录水平相较于野生株极显著下降。对细菌细胞来说, 鞭毛组装是一个复杂的代谢工程, 表明 *pepT* 缺失株可能通过能量代谢过程影响极性鞭毛基因的表达, 调控副溶血弧菌鞭毛蛋白的组装过程, 进而降低副溶血弧菌的浮游运动能力。

氨肽酶在多种细菌病原体的发病机制中起关键作用。M17 家族亮氨酸氨肽酶和 M28 家族的精氨酸特异性氨肽酶的活性分别对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的致病性至关重要^[37-38]。本研究通过体内体外试验发现, *pepT* 基因的缺失能降低副溶血弧菌对 HeLa 细胞的毒性, 并能够显著降低对小鼠的毒力作用, 说明 *PepT* 参与副溶血弧菌的致病性。在小鼠毒力实验中, 互补菌株的毒力部分回复到野生株水

平, 但 qRT-PCR 对目的基因转录分析时结果显示, 互补株和野生株中 *pepT* 基因的转录水平相当, 原因可能是在动物体内感染时互补株和野生株的感染动力学不同, 互补质粒的表达或维持与体外存在一定差异。

综上所述, *pepT* 基因缺失后副溶血弧菌的浮游运动性、生物被膜形成能力、细胞毒性、以及对小鼠的毒力作用均显著降低, 副溶血弧菌黏附宿主和毒力因子的产生^[39]与运动性有关, 而且在生物膜形成的早期阶段也与鞭毛运动相关。细菌通过极性鞭毛迅速移动, 快速感知外界环境^[40], 因此, 基因 *pepT* 缺失可能由于抑制了极性鞭毛基因的表达, 从而减慢了副溶血弧菌与环境表面接触, 导致生物被膜形成能力降低。基因 *pepT* 在副溶血弧菌鞭毛运动中的调控作用, 以及影响生物被膜的形成机理, 可能与氨肽酶影响细菌新陈代谢有关, 但具体过程机制需要进一步探究。我们今后将对 *pepT* 基因具体如何影响鞭毛基因的转录水平, 以及生物被膜的形成等机制展开深入研究。

参考文献

- [1] Singhapol C, Tinrat S. Virulence genes analysis of *Vibrio parahaemolyticus* and anti-*Vibrio* activity of the *Citrus* extracts. *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1390–1398.
- [2] Prithvisagar KS, Krishna Kumar B, Kodama T, Rai P, Iida T, Karunasagar I, Karunasagar I. Whole genome analysis unveils genetic diversity and potential virulence determinants in *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Virulence*, 2021, 12(1): 1936–1949.
- [3] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772–1780.
- [4] Chimalapati S, Lafrance AE, Chen L, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus*: basic techniques for growth, genetic manipulation, and analysis of virulence factors. *Current Protocols in Microbiology*. 2020, 59(1): e131.
- [5] Yang C, Zhang X, Fan H, Li YH, Hu QH, Yang RF, Cui YJ. Genetic diversity, virulence factors and farm-to-table spread pattern of *Vibrio parahaemolyticus* food-associated isolates. *Food Microbiology*, 2019, 84: 103270.
- [6] Duan N, Wu SJ, Zhang HL, Zou Y, Wang ZP. Fluorometric determination of *Vibrio parahaemolyticus* using an F₀ F₁-ATPase-based aptamer and labeled chromatophores. *Mikrochimica Acta*, 2018, 185(6): 304.
- [7] Zhu ZY, Yang LZ, Yu P, Wang YJ, Peng X, Chen LM. Comparative proteomics and secretomics revealed virulence and antibiotic resistance-associated factors in *Vibrio parahaemolyticus* recovered from commonly consumed aquatic products. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1453.
- [8] Wang RZ, Zhong YF, Gu XS, Yuan J, Saeed AF, Wang SH. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 144.
- [9] Simmonds S, Szeto KS, Fletterick CG. Soluble tri- and dipeptidases in *Escherichia coli* K-12+. *Biochemistry*, 1976, 15(2): 261–271.
- [10] Hermsdorf CL. Tripeptide-specific aminopeptidase from *Escherichia coli* AJ005. *Biochemistry*, 1978, 17(16): 3370–3376.
- [11] Strauch KL, Miller CG. Isolation and characterization *Salmonella typhimurium* mutants lacking a tripeptidase (peptidase T). *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(2): 763–771.
- [12] Hakansson K, Miller CG. Structure of peptidase T from *Salmonella typhimurium*. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(2): 443–450.
- [13] Lindner HA, Lunin VV, Alary A, Hecker R, Cygler M, Ménard R. Essential roles of zinc ligation and enzyme dimerization for catalysis in the aminoacylase-1/M20 family. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(45): 44496–44504.
- [14] Chang CY, Hsieh YC, Wang TY, Chen YC, Wang YK, Chiang TW, Chen YJ, Chang CH, Chen CJ, Wu TK. Crystal structure and mutational analysis of aminoacylhistidine dipeptidase from *Vibrio alginolyticus* reveal a new architecture of M20 metallopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(50): 39500–39510.
- [15] Chandu D, Nandi D. PepN is the major aminopeptidase in *Escherichia coli*: insights on substrate specificity and role during sodium-salicylate-induced stress. *Microbiology: Reading, England*, 2003, 149(Pt 12): 3437–3447.
- [16] Hellendoorn MA, Franke-Fayard BM, Mierau I, Venema G, Kok J. Cloning and analysis of the pepV

- dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(11): 3410–3415.
- [17] Tan PS, Poolman B, Konings WN. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *The Journal of Dairy Research*, 1993, 60(2): 269–286.
- [18] Patil V, Kumar A, Kuruppath S, Nandi D. Peptidase N encoded by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates systemic infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2007, 51(2): 431–442.
- [19] Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 158(1): 52–64.
- [20] Robison TM. Characterization of aminopeptidase PepZ in *Staphylococcus aureus* virulence. University of South Florida, 2011.
- [21] Marking D. Exploring the role of intracellular aminopeptidases in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. University of South Florida, 2015.
- [22] 白雪瑞, 王权, 陈永军, 万莹, 凌娇, 王亚磊, 蒋蔚. 副溶血弧菌 ompA 基因缺失株的生物学特性及致病性分析. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 902–910. Bai XR, Wang Q, Chen YJ, Wan Y, Ling J, Wang YL, Jiang W. Biological characteristics and pathogenicity of an ompA mutant of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 902–910. (in Chinese)
- [23] Basler M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, 370(1679): 20150021.
- [24] Blum JS, Cresswell P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(11): 3975–3979.
- [25] Travis J, Potempa J, Maeda H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends in Microbiology*, 1995, 3(10): 405–407.
- [26] Palasuntheram C. The halophilic properties of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology*, 1981, 127(2): 427–428.
- [27] Whitaker WB, Parent MA, Naughton LM, Richards GP, Blumerman SL, Boyd EF. Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4720–4729.
- [28] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95–108.
- [29] 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. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 2018, 11(3): 389–400.
- [30] Kadam SR, Den Besten HMW, Van Der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(3): 259–264.
- [31] Chagneau C, Saier MH Jr. Biofilm-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 8(3): 177–188.
- [32] Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(17): 5629–5639.
- [33] Chen L, Qiu Y, Tang H, Hu LF, Yang WH, Zhu XJ, Huang XX, Wang T, Zhang YQ. ToxR is required for biofilm formation and motility of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2018, 31(11): 848–850.
- [34] McCarter L, Silverman M. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(7): 1057–1062.
- [35] Kim YK, McCarter LL. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(13): 3693–3704.
- [36] 吴林. *Shewanella oneidensis* 鞭毛组装的分子特性及其非运动褶皱表型的形成机理. 浙江大学博士学位论文, 2011.
- [37] Carroll RK, Robison TM, Rivera FE, Davenport JE, Jonsson IM, Florczyk D, Tarkowski A, Potempa J, Koziel J, Shaw LN. Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, 2012, 14(11): 989–999.
- [38] Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(D1): D503–D509.
- [39] Laganenka L, López ME, Colin R, Sourjik V. Flagellum-mediated mechanosensing and RflP control motility state of pathogenic *Escherichia coli*. *mBio*, 2020, 11(2): e02269-19.
- [40] Jiang FF, Lei T, Wang Z, He M, Zhang JM, Wang J, Zeng HY, Chen MT, Xue L, Ye QH, Pang R, Wu S, Gu QH, Ding Y, Wu QP. A novel gene vp0610 negatively regulates biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 656380.