



双组分系统 EnvZ/OmpR 促进副溶血弧菌抵抗碱胁迫的作用机制

姚宁, 鲁重, 王菲, 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 311300

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. 微生物学报, 2022, 62(12): 5043–5055.

Yao Ning, Lu Zhong, Wang Fei, Zhong Xiaojun, Yang Menghua. The two-component system EnvZ/OmpR mediates alkaline stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5043–5055.

摘要: 【目的】探究双组分系统(two-component system, TCS) EnvZ/OmpR 对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)抵抗碱胁迫的作用机制。【方法】用 SMART 在线工具(<https://smart.embl.de/>)鉴定出副溶血弧菌基因组中的双组分系统 EnvZ/OmpR, 再利用同源重组技术将 *envZ* 和 *ompR* 基因分别进行缺失, 构建相应回补株, 比较各菌株的生长曲线来检测相应基因对细菌适应高渗透胁迫和碱胁迫的作用, 并结合 qRT-PCR 及荧光检测系统, 筛选参与 EnvZ/OmpR 抵抗碱胁迫的下游靶基因, 鉴定该双组分系统对下游基因的调控机制。【结果】在副溶血弧菌基因组中鉴定出 *vp0155/vp0154* 编码 EnvZ/OmpR 双组分系统同源蛋白。 $\Delta ompR$ 菌株在高渗透胁迫和碱胁迫中的生长能力明显弱于野生株, 而回补株 $C\Delta ompR$ 、 $\Delta envZ$ 和 $C\Delta envZ$ 菌株生长能力与野生株类似。在 $\Delta ompR$ 菌株中, 孔道蛋白基因 *vp1218*、*vp0493*、*vpa1745*、*vpa0085* 与 *vpa1308* 的转录水平均明显低于野生株, 并且发现这些孔道蛋白基因缺失株($\Delta vpa1308$ 除外)在碱性环境中生长能力均明显弱于野生株。OmpR 蛋白可直接抑制调控因子 AphB 基因转录, 而 $\Delta aphB$ 菌株在碱胁迫中的生长能力明显强于野生株。此外, AphB 蛋白可直接抑制孔道蛋白基因 *vp0493* 和 *vpa0085* 转录。【结论】双组分系统 EnvZ/OmpR 促进副溶血弧菌抵抗碱胁迫, 其中 OmpR 蛋白可通过抑制调控因子 AphB

基金项目: 国家自然科学基金(32170174, 31770151); 浙江省自然科学基金(LZ20C010001, LQ22C180002); 浙江农林大学科研发展启动基金(2013FR012, 2020FR042)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32170174, 31770151), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ20C010001, LQ22C180002) and by 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: 7 April 2022; Revised: 7 May 2022; Published online: 20 June 2022

的表达, 以促进部分孔道蛋白的表达, 从而增强副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。

关键词: 副溶血弧菌; 双组分系统; EnvZ/OmpR; 碱胁迫

The two-component system EnvZ/OmpR mediates alkaline stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus*

YAO Ning, LU Zhong, WANG Fei, 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 of Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Vibrio parahaemolyticus* is a significant foodborne pathogen that causes economic and public health problems worldwide. In this study, we explored the roles of the two-component system (TCS) EnvZ/OmpR in mediating the alkaline stress tolerance of *V. parahaemolyticus*. [Methods] We identified the two-component system EnvZ/OmpR in the *V. parahaemolyticus* chromosomes with SMART (<https://smart.embl.de/>). Then, we constructed the *envZ*-deleted strain, the *ompR*-deleted strain, as well as the complemented strains. On this basis, we compared the alkaline stress tolerance of the wild-type strain and the mutants, and the mechanisms whereby the EnvZ/OmpR regulated the alkaline stress tolerance of *V. parahaemolyticus* were explored by qRT-PCR and bioluminescence reporter assay. [Results] Homology analysis of the VP0155 and VP0154 proteins revealed that their amino acid sequences shared a high identity with the two-component system EnvZ/OmpR. *ompR* deletion decreased the tolerance of *V. parahaemolyticus* to osmotic stress and alkaline stress, while the growth status of $C\Delta ompR$, $\Delta envZ$, and $C\Delta envZ$ was similar to that of the wild type. The transcription levels of porin genes *vp1218*, *vp0493*, *vpa1745*, *vpa0085*, and *vpa1308* in $\Delta ompR$ were lower than those in the wild type, and the deletion strains of the porin genes (except for $\Delta vpa1308$) showed low growth ability in the alkaline-shock environment as compared with the wild strains. In addition, OmpR inhibited the expression of AphB and $\Delta aphB$ was significantly more tolerant to alkaline stress than the wild type. Moreover, AphB can directly repress the transcription of *vp0493* and *vpa0085*. [Conclusion] The two-component system EnvZ/OmpR mediates alkaline stress tolerance of *V. parahaemolyticus*, which depends on the transcriptional factor AphB to regulate the expression of the porins.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; two-component system; EnvZ/OmpR; alkaline stress tolerance

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)属于革兰氏阴性嗜盐菌, 其广泛分布于海洋和河口环境中, 可感染多种水生动物, 造成虾、蟹大量死亡, 给水产养殖业带来巨大经济损失^[1]。人类若食用感染副溶血弧菌未煮熟的海产品,

容易出现急性胃肠炎, 引起腹泻、恶心、呕吐、头痛、发热等症状^[1-2]。近年来, 由于经济和物流运输的快速发展, 各类海产品被销往全国各地, 副溶血弧菌及其引发的流行病正在全国范围内呈现扩张态势^[3-5]。

副溶血弧菌具有较强环境适应力,可在盐浓度较高环境中生存与繁殖,并且可抵抗碱胁迫^[6-7]。从有氧和碱性的海水生态系统进入宿主肠道内,副溶血弧菌需要不断地调整基因表达,以适应外部环境的变化^[1-2]。在此过程中,双组分系统(two-component system, TCS)发挥了重要作用。TCS 主要包含 2 种蛋白,即组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和响应调节蛋白(response regulator, RR)^[8]。在典型的 TCS 结构中, HK 作为一种感受器而存在, RR 则作为一种效应器而发挥功能。TCS 的信号传导基于 HK 与 RR 之间的磷酸基团转移,即磷酸基团从 HK 保守的组氨酸上转移到同源 RR 保守的天冬氨酸上,由此调节细菌的一系列生理功能^[8-9]。

目前,有关副溶血弧菌适应高渗透压和碱性环境的作用机制尚不清楚。EnvZ/OmpR 由位于细胞膜上的 HK 蛋白 EnvZ 和细胞质中的 RR 蛋白 OmpR 所构成,已有研究报道双组分系统 EnvZ/OmpR 可调节细菌对渗透压的适应性^[10-12]。该 TCS 最初在大肠杆菌中参与调节孔道蛋白表达,从而促进细菌适应外界渗透压的变化^[13-14]。随后,EnvZ/OmpR 在多种细菌中被发现作为渗透压调节器而发挥功能^[10,15-17]。此外,在霍乱弧菌中,OmpR 蛋白被鉴定可抑制转录调控因子 AphB 的表达,调节细菌对碱性环境的适应力^[12]。因此,EnvZ/OmpR 在调节细菌适应渗透压和碱胁迫中发挥了重要功能,但是该 TCS 在副溶血弧菌中的功能尚未被研究报道。

本文从鉴定副溶血弧菌中的 EnvZ/OmpR 出发,研究该 TCS 对副溶血弧菌适应外部应激环境的影响,并重点研究了 OmpR 对该菌抵抗碱胁迫的作用机制。本研究可为阐明副溶血弧菌适应碱性环境的分子机制提供理论依据,为进一步研究副溶血弧菌的防治策略提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

副溶血弧菌菌株 RMID 2210633(链霉素抗性),质粒 pDS132(氯霉素抗性)、pBAD24-Cm(氯霉素抗性)、pBAD24-Amp(氨苄青霉素抗性)、pBBR-*lux*(氯霉素抗性),大肠杆菌 DH5 α - λ pir 感受态细胞均为实验室自备;MLB 液体培养基:3% NaCl [生工生物工程(上海)股份有限公司]、1%胰蛋白胨(北京拜尔迪生物技术有限公司)、0.5%酵母提取物(北京拜尔迪生物技术有限公司);LB 液体培养基:1% NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物;蔗糖[生工生物工程(上海)股份有限公司];7300 型实时荧光定量 PCR 仪(ABI);pH 计(Sartorius PB-10);PCR 仪(Eppendorf);移液枪(Eppendorf);核酸电泳仪(北京六一仪器);高压灭菌锅(厦门致微仪器有限公司);多功能酶标仪(Bio-Tek);小型台式高速离心机 Centrifuge 5418 (Eppendorf);恒温振荡培养箱(太仓市科教仪器厂);PCR 产物纯化/胶回收试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司);荧光定量试剂盒(TaKaRa);质粒提取试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司);反转录试剂盒(TaKaRa);限制性核酸内切酶(NEB);RNAiso Plus (TaKaRa);阿拉伯糖[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 蛋白结构域预测及序列比对

根据 NCBI 数据库中副溶血弧菌菌株 RMID 2210633 的基因组(GenBank: BA000031.2)信息,获得 VP0154 和 VP0155 的蛋白序列,利用 SMART 在线工具(<https://smart.embl.de/>)对以上蛋白进行结构域分析。此外,利用 NCBI 数据库中 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),对不同种类的蛋白进行同源性分析。若 2 种蛋白序列的同源性大于 30%且具有相似的结构域,则认为两者具有同源性。

1.3 副溶血弧菌缺失株和回补株的构建

以 *ompR* (*vp0154*) 缺失株构建为例, 利用副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株基因组序列为模板, 使用 clone manager 软件设计用于构建 *ompR* 基因缺失株的各对引物(P1-P4)。以副溶血弧菌全基因组为模板进行 PCR, 扩增 *ompR* 基因上下游同源臂。其中上游同源臂由引物 P1 和 P2 扩增所得, 下游同源臂由引物 P3 和 P4 扩增所得。利用引物 P1 和 P4 对上下游同源臂进行融合 PCR, 得到 *ompR* 缺失的 DNA 片段。利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 对该片段和 pDS132 空质粒酶切过夜, 利用 T4 DNA 连接酶进行酶连。随后, 将重组质粒电转至 DH5 α - λ pir 感受态细胞中, 并涂布至含氯霉素抗性(0.02 mg/mL)的 LB 平板上。挑取该平板上的菌落进行 PCR 验证, 得到阳性菌株命名为 pDS132-*ompR*, 并送至杭州有康生物科技有限公司进行测序验证。本研究利用三亲接合的方式进行基因同源重组^[18], 即将含重组质粒的阳性菌株、辅助菌 pRK2013-HB101 以及副溶血弧菌野生株, 在 LB 或 MLB 液体培养基中培养过夜; 随后, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 将 3 种菌体混合, 并在无抗 LB 固体培养基上接合 6 h; 收集菌落, 涂布到含链霉素(0.10 mg/mL)和氯霉素(0.02 mg/mL)双抗的 MLB 固体培养基上, 将单菌落依次在含有该双抗 MLB 平板、含 0.10 mg/mL 链霉素 MLB 平板以及含有 20%蔗糖 LB 平板上划线传代, 以筛选副溶血弧菌的 *ompR* 缺失株 $\Delta ompR$ 。以 *ompR* 回补株构建为例, 利用同样的方法获得构建回补株的引物 (*C Δ vp0154-Rev* 和 *C Δ vp0154-Fwd*)、*ompR* 回补片段以及相应的重组质粒 pBAD24-*ompR*。同样以三亲接合的方法, 获得回补株 *C Δ ompR*。各缺失株构建引物见表 1, 各回补株构建引物见表 2。

1.4 生长曲线测定

将野生型菌株和缺失株转接到含链霉素(0.1 mg/mL)的 MLB 培养基中, 37 °C 振荡过夜培养, 第 2 天按体积比 1:100 转接到含有链霉素的 MLB 液体培养基中, 再吸取 200 μ L 混合液至 96 孔细胞培养板中, 每种菌液吸取 3 个孔作为重复。若平行试验中含有回补株, 则利用含有 pBAD24 空质粒的缺失株与野生株进行生长曲线测定, 但在培养过程中需加入 0.02 mg/mL 氯霉素以及 0.02%阿拉伯糖。利用多功能酶标仪测量菌液的 OD_{600} 值, 每 1 h 测一次, 连续测 12 h, 利用 GraphPad Prism 8.0 进行作图得到各菌株的生长曲线。若测定高渗透条件下各菌的生长曲线, 则在 MLB 培养基中加入 7% NaCl; 若测定酸碱条件下各菌的生长曲线, 则在 MLB 培养基中加入一定体积的 0.2 mol/L 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠, 利用 pH 计将培养基的 pH 值调至所需要的数值, 具体测定方法同上。

1.5 细菌总 RNA 提取和 qRT-PCR

将菌株接到 10 mL MLB 液体培养基(pH 9.0)中, 37 °C 培养 8 h 左右, 使细菌达到生长对数期后, 台式离心机 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。用 Trizol 法提取菌体总 RNA^[19]。利用反转录试剂盒去除基因组 DNA 并生成 cDNA。qRT-PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 3), 利用 7300 型实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 体系: cDNA 4.0 μ L, Green Premix Ex Taq II 12.0 μ L, Primer-F 1.6 μ L, Primer-R 1.6 μ L, ROX Reference Dye 0.8 μ L。设置反应程序: 预变性 95 °C 30 s; 循环反应 95 °C 5 s 和 60 °C 30 s, 共 35 个循环; 熔解曲线 95 °C 15 s、60 °C 60 s 和 95 °C 15 s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的转录水平。得到数据后利用 GraphPad Prism 8.0 进行作图分析。

表 1 构建缺失株所需引物列表

Table 1 Primers used in the gene deletion strains

Primers	Sequences (5'→3')
<i>vp0154</i> -P1- <i>Xba</i> I	GCTCTAGAACAACAAGCAAAGCGCAGAATCTTAACTTC
<i>vp0154</i> -P2	GTATTCACGACCGTGAAAGTTTTCGCGTGT
<i>vp0154</i> -P3	GAAAACTTTCACGGTCGTGAATACTCTGCG
<i>vp0154</i> -P4- <i>Sac</i> I	CGAGCTCCCCTTTTCGACATCTGGTTAAATGCACGAGT
<i>vp0155</i> -P1- <i>Sac</i> I	CGAGCTCGAGCAAGTTTTCAAGTCCGTAGTGTAGCA
<i>vp0155</i> -P2	ATCACCACGGGTATTCAGTTTCGTGAGCAAG
<i>vp0155</i> -P3	CACGAACTGAATACCCGTGGTGATACGGCG
<i>vp0155</i> -P4- <i>Xba</i> I	GCTCTAGAGGGAAACCAACCTCGTTGCGCTACCGATTC
<i>vp2184</i> -P1- <i>Sac</i> I	CGAGCTCCCGTCATCTACGCGAAACCCTGGCTTGAA
<i>vp2184</i> -P2	TTGATGTATTCACGGTTCAATAGTCGAAG
<i>vp2184</i> -P3	CTATTGAACCGTGAATACATCGAAAGTGGTGAA
<i>vp2184</i> -P4- <i>Sph</i> I	ACATGCATGCAAGCTGGGTGAGCGAATTCGTGAAGATTAC
<i>vp0493</i> -P1- <i>Pst</i> I	AAAACCTGCAGATGTAAGTGTATTAATCGTTTAAAG
<i>vp0493</i> -P2	TGGCTTTTTCTGTTTGAGGTAGGTTTAGGTTT
<i>vp0493</i> -P3	ACCTACCTCAAACAGAAAAAGCCATTTTTTC
<i>vp0493</i> -P4- <i>Sac</i> I	CGAGCTCATGCGAGCATTGACGTTGTTTGACACAT
<i>vp1218</i> -P1- <i>Xba</i> I	GCTCTAGATTTTAAGTGGCTACCCATCAA
<i>vp1218</i> -P2	CAAGCGCACGCCGACGTTTTGCAAAGCTAT
<i>vp1218</i> -P3	TTGCAAACGTCGGCGTGCCTTGACAGC
<i>vp1218</i> -P4- <i>Sac</i> I	CGAGCTCGTCATCTTACCCTCAGTTTCG
<i>vp0085</i> -P1- <i>Sac</i> I	CGAGCTCGAACCACGCTGGCATAAACCA
<i>vp0085</i> -P2	CGACACGGAAGAGTGCAGAAGTAAGGTATC
<i>vp0085</i> -P3	TTCTGCACTCTCCGTGTCGGTTTGAAATA
<i>vp0085</i> -P4- <i>Sac</i> I	GCTCTAGAAAATTCGCCGAGTAGTTGGC
<i>vp1745</i> -P1- <i>Xba</i> I	GCTCTAGACTGTATCAAGCGGAAGATGGG
<i>vp1745</i> -P2	AAACTCGAATCTGTATCGTGCTTACAGCTC
<i>vp1745</i> -P3	TAAGCACGATACAGATTCGAGTTTAGCCAG
<i>vp1745</i> -P4- <i>Xba</i> I	GCTCTAGAGGGTCACCCAACAAGTAGCGT
<i>vp1308</i> -P1- <i>Xba</i> I	GCTCTAGATTCTTTGTCTTGGTTTTCTGC
<i>vp1308</i> -P2	CAATTGGGCACAAATTGGTGTGTTTTGGA
<i>vp1308</i> -P3	CACCAATTTGTGCCCAATTGAAGTAATATC
<i>vp1308</i> -P4- <i>Sac</i> I	CGAGCTCCTATGTGGAGAAACAAATTGA

表 2 构建回补株所需引物列表

Table 2 Primers used in the gene replenishment strains

Primer	Sequences (5'→3')
<i>CΔvp0154</i> -Rev	CCCAAGCTTTTACGACTCTTTGCCGTCTGGGACAAATAC
<i>CΔvp0154</i> -Fwd	CGGGGTACCGTCAATAGATGCTTCTGAAAGGATGTTTCA
<i>CΔvp0155</i> -Rev	CCCAAGCTTTTATTTGGTTCGGGAAACTGATTTG
<i>CΔvp0155</i> -Fwd	CGGGGTACCAGGATCATTAGGAAATTTCCATGCG

表 3 qRT-PCR 所需引物列表

Table 3 Primers used in qRT-PCR assay

Primers	Sequences (5'→3')
qRT-PCR- <i>vp1218</i> -F	CTCAGTGCGTATCATCCAAGAG
qRT-PCR- <i>vp1218</i> -R	GGCGTATGTGGTGTGTACTT
qRT-PCR- <i>vp0493</i> -F	GGGATCAGCTACCACTTCAAT
qRT-PCR- <i>vp0493</i> -R	AGGCTACTGTCTTCGGTTTG
qRT-PCR- <i>vpa1745</i> -F	GCGAAAGATTATGGTCGCATTAC
qRT-PCR- <i>vpa1745</i> -R	CGCCATAGAAACATCGGAAGA
qRT-PCR- <i>vpa0085</i> -F	CACCGTTTTGACAACCAAATC
qRT-PCR- <i>vpa0085</i> -R	CAGTTTCATGGCCTGCATTAC
qRT-PCR- <i>vpa1308</i> -F	GGTTTCTCTAGTCATCGGTAGC
qRT-PCR- <i>vpa1308</i> -R	GACGCTGTCCATCTTGGAATA

1.6 荧光检测系统的构建及应用

利用 clone manager 软件设计引物后进行 PCR 扩增, 得到目的基因阅读框 DNA 片段并纯化, 通过酶切连接方法将该片段连入质粒 pBAD24-Amp 中以表达该蛋白。利用 BProm program (SoftBerry) 在线预测靶基因的启动子序列, 利用同样的方法将待测基因启动子连入到质粒 pBBR-*lux* 中。待 2 个重组质粒测序无误后, 利用三亲接合的方法将两者同时导入大肠

杆菌中, 随后涂布到含氨苄青霉素(0.10 mg/mL)和氯霉素(0.02 mg/mL)双抗的 LB 平板上, 挑取单菌落 37 °C 振荡培养过夜。将含有双质粒的大肠杆菌 1:100 转接至 LB 液体培养基中, 分别加入到细胞培养板和荧光板中, 每个孔中加 200 μ L, 每种菌株取 3 个重复, 静置培养。9 h 后测量各菌的 OD_{600} 值和荧光值 Lux。最终各菌的荧光强度 = Lux/ OD_{600} 。利用 GraphPad Prism 8.0 进行作图分析。所需引物见表 4。

表 4 构建荧光检测系统所需引物列表

Table 4 Primers used in bioluminescence reporter assay

Primer	Sequences (5'→3')
pBAD24- <i>vp0154</i> -F	GCTCTAGATTACGACTCTTTGCCGTCTGGGACAAATAC
pBAD24- <i>vp0154</i> -R	GGGTACCCGTCAATAGATGCTTCTGAAAGGATGTTTC
pBAD24- <i>vp2184</i> -F	GCTCTAGATAGGCTCTGGTTTTTATTTTTGTATCATTT
pBAD24- <i>vp2184</i> -R	GGGTACCCCATTAATTGGTAATTTAATGTGTCTGGAAA
P- <i>lux</i> - <i>vp2184</i> -F	GGACTAGTATTTCCAGACACATTAATAATTACCAATTATG
P- <i>lux</i> - <i>vp2184</i> -R	CGAGCTCCAAAAAACAAAATTATTTAAGTTATTATTTTTG
P- <i>lux</i> - <i>vp0493</i> -F	CGAGCTCCCCTTCCTCCGATGTATTTTCTTAATTTTT
P- <i>lux</i> - <i>vp0493</i> -R	GACTAGTTCCTTGTGTCTAACTTTTTTATTAGTATCT
P- <i>lux</i> - <i>vpa0085</i> -F	GACTAGTTTTGAAACACCATTTTTATTTTATAATAAAT
P- <i>lux</i> - <i>vpa0085</i> -R	CGAGCTCTCATGGTTCCTCCACCTTGAAGGAAGTCGT

1.7 数据分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件中的 Student's *t*-test 统计学方法分析数据并作图(*: $P<0.05$; ***: $P<0.001$)。

2 结果与分析

2.1 副溶血弧菌 EnvZ/OmpR 双组分系统的鉴定

利用 SMART 在线工具(<https://smart.embl.de/>)对副溶血弧菌 *vp0154* 与 *vp0155* 基因的编码蛋白进行结构域分析发现, VP0154 蛋白具有 REC 与 Trans_reg_C 结构域(图 1A), 这 2 个结构域均属于响应调节蛋白 RR 的保守性结构域^[8,20]; VP0155 蛋白具有 HAMP、HisKA 和 HATPase_c 结构域(图 1A), 这 3 个结构域均属于组氨酸激

酶 HK 的保守性结构域^[8,20]。通过蛋白序列同源分析发现, VP0154 蛋白分别与霍乱弧菌和大肠杆菌 OmpR 蛋白的同源性高达 92%与 84%; VP0155 蛋白分别与霍乱弧菌和大肠杆菌 EnvZ 蛋白的同源性高达 78%与 50% (图 1B)。这些结果充分说明副溶血弧菌 *vp0154/vp0154* 基因是编码 EnvZ/OmpR 双组分系统的同源蛋白。

2.2 OmpR 促进副溶血弧菌抵抗高渗透胁迫和碱胁迫

通过分别构建基因缺失株 $\Delta envZ$ 与 $\Delta ompR$ 以及相应回补株 $C\Delta envZ$ 与 $C\Delta ompR$, 检测这些菌株与野生株(WT)在不同培养条件下的生长能力。结果显示, 在副溶血弧菌常规培养基 MLB 中, 与 WT 相比, 菌株 $\Delta envZ$ 与 $\Delta ompR$ 的生长能力无明显差异(图 2A); 在高渗透

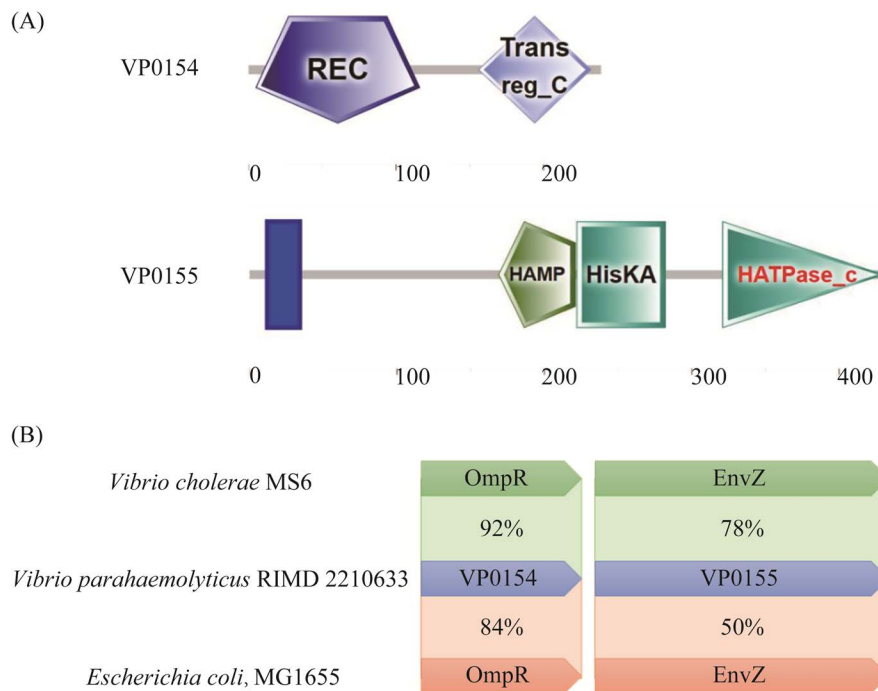


图 1 副溶血弧菌 EnvZ/OmpR 双组分系统的鉴定

Figure 1 Identification of EnvZ/OmpR TCS in *V. parahaemolyticus*. A: the conserved domains of the VP0154 and VP0155 protein, as determined using the SMART online server; B: homology analyses of the VP0154 and VP0155 proteins by the protein BLAST algorithm. The identities of the amino acid sequences encoded by each gene are shown among *V. parahaemolyticus* strain RIMD 2210633, *V. cholerae* strain MS6, and *E. coli* strain MG1655.

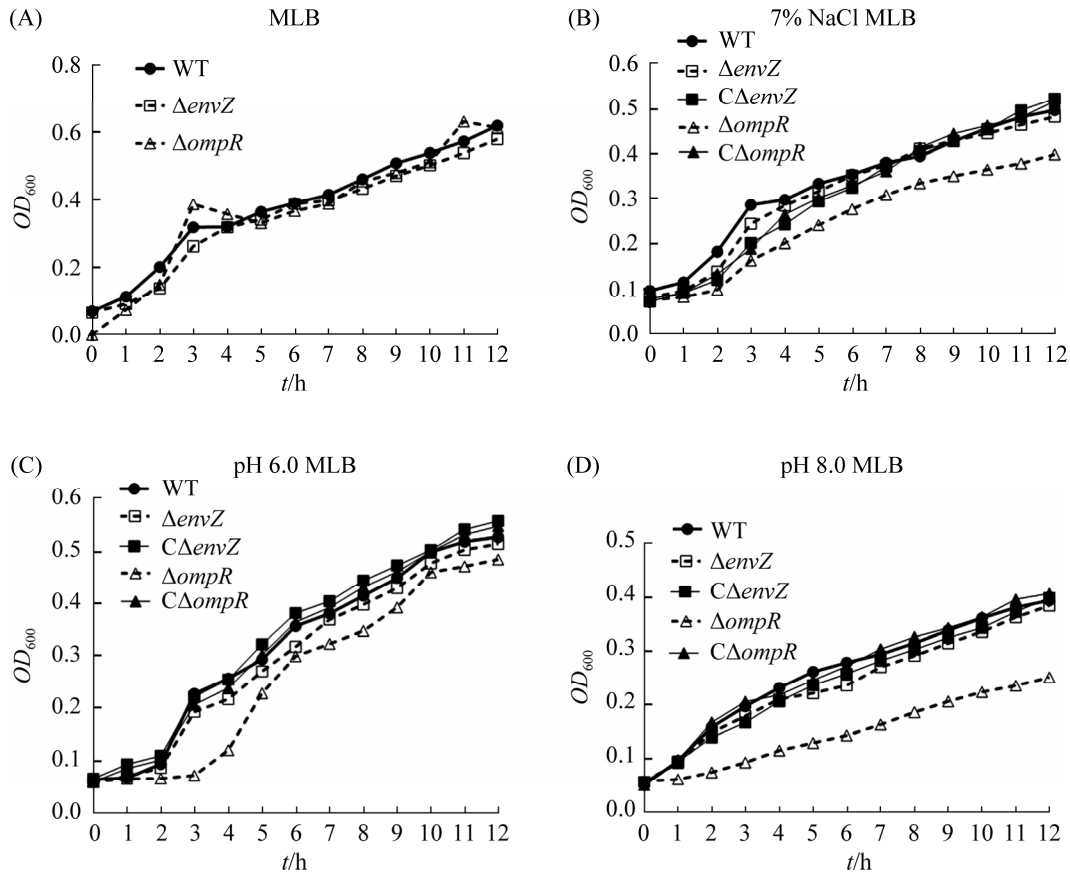


图 2 各菌株在不同条件下的生长能力比较

Figure 2 Growing curves of *V. parahaemolyticus* strains in different environments. A: MLB; B: osmotic-shock; C: acid-shock; D: alkaline-shock.

压环境中, $\Delta ompR$ 菌株的生长能力明显弱于 WT, 而 $C\Delta ompR$ 以及 $\Delta envZ$ 和 $C\Delta envZ$ 菌株的生长能力与 WT 类似(图 2B)。通过改变 MLB 培养基的酸碱性, 检测 EnvZ/OmpR 双组分系统对副溶血弧菌抵抗酸碱应激的作用。结果显示, 在酸性环境中, $\Delta ompR$ 菌株在对数期早期阶段的生长能力明显弱于 WT, 但在对数期晚期及稳定期的生长能力则与 WT 无明显差异, 此外 $C\Delta ompR$ 以及 $\Delta envZ$ 和 $C\Delta envZ$ 菌株的生长能力与 WT 的生长能力在整个生长期均无明显差异(图 2C); 在碱性环境中, $\Delta ompR$ 菌株的生长能力明显弱于 WT, 但 $C\Delta ompR$ 以及 $\Delta envZ$ 和

$C\Delta envZ$ 菌株的生长能力与 WT 类似(图 2D)。这些结果说明 OmpR 可以协助副溶血弧菌抵抗高渗透胁迫和碱胁迫。

2.3 OmpR 调控孔道蛋白转录参与副溶血弧菌抵抗碱胁迫

通过 qRT-PCR 试验检测 EnvZ/OmpR 双组分系统是否调控副溶血弧菌孔道蛋白表达。结果如图 3A 所示, 在 $\Delta ompR$ 菌株中, *vp1218*、*vp0493*、*vpa1745*、*vpa0085* 与 *vpa1308* 基因转录水平明显低于 WT 菌株。随后, 通过构建这些基因缺失株, 在常规 MLB 培养基中检测这些菌株的生长能力, 结果显示, 除 $\Delta vpa1308$ 菌株

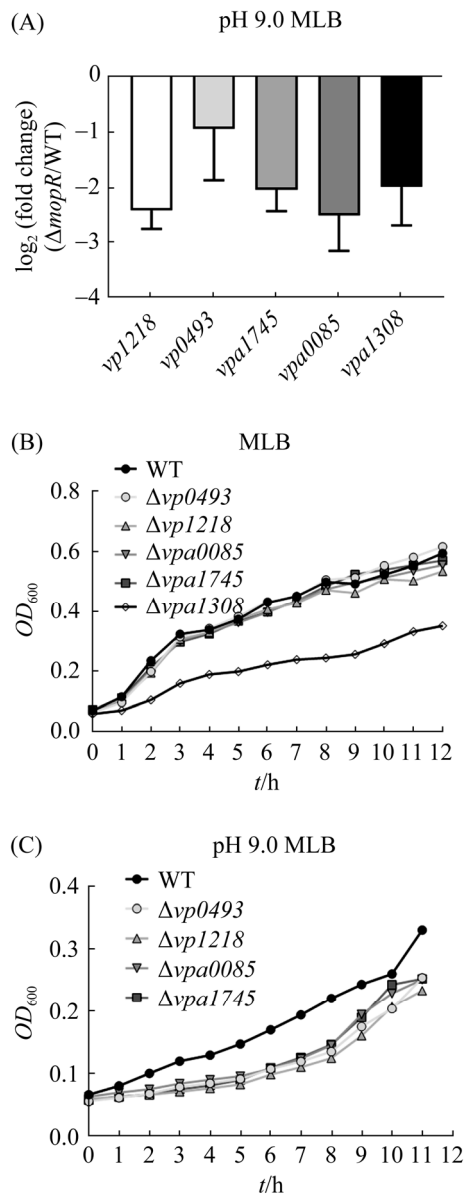


图3 各孔道蛋白在 $\Delta ompR$ 菌株中转录变化及对副溶血弧菌抗碱胁迫的影响

Figure 3 The porins were regulated by OmpR and contribute to the fitness at the alkaline-shock environment. A: the transcription levels of the porin genes in WT and $\Delta ompR$ strains were measured by qRT-PCR. qRT-PCR expression values are presented as the means plus standard deviations from three independent experiments. B: growing curves of *V. parahaemolyticus* strains in MLB; C: growing curves of *V. parahaemolyticus* strains in an alkaline-shock environment.

的生长能力明显弱于 WT 外, 其余孔道蛋白基因缺失株 ($\Delta vp0493$ 、 $\Delta vp1218$ 、 $\Delta vpa0085$ 与 $\Delta vpa1745$) 的生长能力与 WT 类似(图 3B)。我们对在常规 MLB 培养基中生长能力未减弱的缺失株进行碱胁迫试验发现, $\Delta vp0493$ 、 $\Delta vp1218$ 、 $\Delta vpa0085$ 与 $\Delta vpa1745$ 菌株在碱性环境中的生长能力均明显低于 WT 菌株(图 3C)。这些结果提示 OmpR 通过这些调控孔道蛋白基因 (*vp1218*、*vp0493*、*vpa1745* 与 *vpa0085*) 的转录, 进而影响副溶血弧菌抵抗碱胁迫。

2.4 OmpR 通过 AphB 调控部分孔道蛋白的转录表达

在大肠杆菌中导入可表达 OmpR 蛋白的 pBAD24-*ompR* 质粒与含有 *aphB*(*vp2184*) 基因启动子区域的荧光质粒 P_{aphB} -*lux*, 通过检测荧光强度来分析 OmpR 对 *aphB* 基因是否存在转录调控。结果如图 4A 所示, 在表达 OmpR 蛋白的大肠杆菌中, 其荧光强度显著低于无 OmpR 蛋白(含 pBAD24 空质粒)的大肠杆菌。构建 $\Delta aphB$ 菌株, 并检测其抗碱胁迫能力发现, $\Delta aphB$ 菌株的抵抗碱胁迫的能力明显高于 WT 菌株(图 4B)。这说明 OmpR 可抑制 AphB 的表达, 并且 AphB 蛋白本身具有抑制副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。此外, 通过同样的方法检测了 AphB 蛋白对上述孔道蛋白的转录调控, 结果显示 AphB 蛋白可显著抑制 *vp0493* 和 *vpa0085* 基因的表达(图 4C-4D)。由于含有其他孔道蛋白启动子的荧光质粒在大肠杆菌中的荧光值很低(数据未展示), 故未检测 AphB 蛋白对这些基因的调控作用。以上结果提示 OmpR 蛋白可通过抑制 AphB 蛋白的表达, 以促进部分孔道蛋白的表达, 从而增强副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。

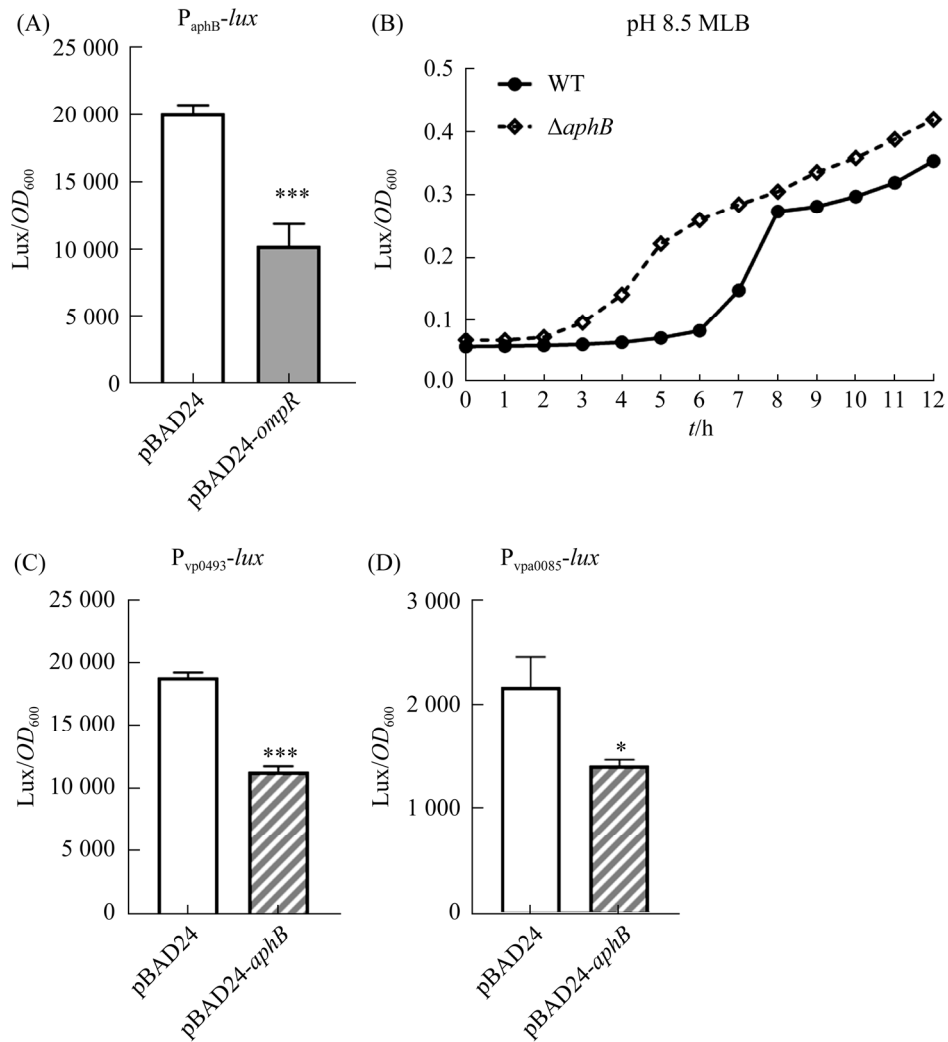


图4 AphB受OmpR调控并影响孔道蛋白基因 $vp0493$ 与 $vpa0085$ 的转录

Figure 4 AphB was regulated by OmpR and affected the expression of gene $vp0493$ and $vpa0085$. A: the regulation of OmpR to *aphB* was assessed by measuring luminescence in *E. coli* strain containing the pBAD24-*ompR* and P_{aphB}-*lux* plasmids; B: growing curves of WT and Δ*aphB* strains in an alkaline-shock environment; C-D: The regulation of AphB to gene $vp0493$ or $vpa0085$ was assessed by measuring luminescence in *E. coli* strain containing the pBAD24-*aphB* and P_{vp0493}-*lux* or P_{vpa0085}-*lux* plasmids. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

副溶血弧菌具有强大的环境适应力,这与其高效而精密的调节系统密切相关。TCS可通过感应外部环境变化调节细菌体内基因表达水平,从而调控细菌对外部环境的适应力^[9]。我们的研究发现副溶血弧菌依赖双组分系统 EnvZ/OmpR 调

节对高渗透压和碱性环境的适应力,这与该TCS在多种细菌中所报道的结果一致^[10,13]。然而,我们同时发现双组分系统 EnvZ/OmpR的2个组分蛋白,即 EnvZ 与 OmpR,在该过程中未发挥相似的功能。对于典型的 TCS,其信号传递可分成3步。首先,由位于HK氮端的激酶催化核心来完成信号检测和传递;其次,HK一旦检测到环

境信号就会进行自身磷酸化, 并将磷酸转基团移到 RR; 最后, RR 与靶基因序列结合, 通过调节靶基因表达而促进细菌产生适应外界环境的生理变化^[9,13]。由于在高渗透压和碱性环境中, $\Delta ompR$ 菌株的生长能力均明显低于 WT, 而 $\Delta envZ$ 菌株的生长能力则始终与 WT 类似, 这说明 OmpR 蛋白在增强细菌适应高渗透压胁迫和碱胁迫中发挥了主要功能, 也间接说明 EnvZ 与 OmpR 蛋白之间的信号传递可能存在不专一性。在大肠杆菌中, 研究人员发现 EnvZ/OmpR 可接受其他 TCS 蛋白(如 ArcB)的磷酸基团^[21], 或者与其他 TCS(如 CpxAR)存在交互作用^[22], 这在一定程度上提示 EnvZ 的磷酸化不具有很强专一性。此外, 在小肠结肠炎耶尔森菌中, 研究人员发现 OmpR 蛋白在调控致病因子 *inv* 表达过程中同样不依赖于 EnvZ^[23]。因此, 在细菌体内还存在其他途径影响 OmpR 蛋白的磷酸化, 这使得 OmpR 可独立于 EnvZ 调控下游基因表达, 进而协助副溶血弧菌抵抗高渗透压胁迫和碱胁迫。

细菌的细胞膜属于高度选择性的渗透性屏障, 位于膜上的孔道蛋白(porin)可显著影响细胞膜的通透性^[24-25]。孔道蛋白是细菌表面一种非特异性的跨膜水溶性通道, 可参与细菌对小分子药物、代谢产物以及离子的外排, 并调节细菌的渗透压和酸碱性^[24-26]。在大肠杆菌中, EnvZ/OmpR 双组分系统可调控孔道蛋白基因 *ompF* 和 *ompC* 的表达, 以响应生长环境中的渗透压变化^[27]。为研究 EnvZ/OmpR 调控副溶血弧菌抵抗碱胁迫的作用机制, 我们在副溶血弧菌基因组中筛选了部分孔道蛋白, 并分析了 EnvZ/OmpR 对这些孔道蛋白的转录调控。我们发现 OmpR 蛋白可促进 *vp1218*、*vp0493*、*vpa1745*、*vpa0085* 与 *vpa1308* 基因的转录表达。后续碱胁迫试验进一步发现 VP1218、VP0493、

VPA1745 与 VPA0085 这 4 个孔道蛋白参与了副溶血弧菌抵抗碱胁迫过程。由于这些孔道蛋白缺失株均属于阅读框内基因序列缺失, 且根据该基因两侧基因的转录方向, 在阅读框内保留了 30、60、150 bp 的碱基。因此, 该基因缺失理论上不影响两侧基因的转录表达, 这也进一步提示这些孔道蛋白本身参与了副溶血弧菌抵抗碱胁迫过程。因此, 在副溶血弧菌中, EnvZ/OmpR 可调控这些孔道蛋白表达, 进而调节副溶血弧菌对碱胁迫的适应力。

AphB 蛋白属于 LysR 家族转录调控因子, 在霍乱弧菌中该蛋白可与 AphA 蛋白共同激活毒力因子的表达^[28-29]。有研究表明, AphB 蛋白可参与调控细菌 pH 动态平衡相关基因的转录, 其中包括酸耐受基因 *cadC*、*cadBA* 和 *clcA* 等^[28,30-31]。在霍乱弧菌中, 碱性 pH 可激活 OmpR 蛋白, 并因此抑制 AphB 蛋白的表达, 从而调节细菌对 *cadC*、*cadBA* 和 *clcA* 的表达, 增强细菌对碱性环境的适应力^[12]。在副溶血弧菌中, 目前尚没有关于 AphB 蛋白的报道。本研究发现 OmpR 蛋白可显著抑制 AphB 的表达, 并且 AphB 蛋白本身具有抑制副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。另外, 我们发现 AphB 蛋白可显著抑制 VP0493 与 VPA0085 这 2 个孔道蛋白的表达。由于这 2 个孔道蛋白可参与副溶血弧菌抵抗碱胁迫的过程, 这说明 OmpR 蛋白可通过抑制 AphB 蛋白的表达, 以促进部分孔道蛋白的表达, 从而增强副溶血弧菌抵抗碱胁迫的能力。

本研究通过分析双组分系统 EnvZ/OmpR 对副溶血弧菌抵抗碱胁迫的作用机制, 发现该 TCS 可通过抑制下游调控因子 AphB 的转录, 以影响孔道蛋白的表达, 从而调节副溶血弧菌对碱胁迫的适应力。该研究将为进一步探究副溶血弧菌抵抗外部环境胁迫, 提高生存能力的机制提供了理论基础。

参考文献

- [1] Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F, Martinez-Urtaza J. *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 8.
- [2] Li L, Meng H, Gu D, Li Y, Jia M. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43–51.
- [3] 刘东立, 刘长宏, 石一, 刘永杰. 西安口岸首例输入性副溶血性弧菌感染性腹泻病原学分析. *现代预防医学*, 2019, 46(13): 2483–2487.
Liu DL, Liu CH, Shi Y, Liu YJ. Pathogenic analysis of the first imported infectious diarrhea by *Vibrio parahaemolyticus*, Xi'an. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(13): 2483–2487. (in Chinese)
- [4] Pang R, Li Y, Chen M, Zeng H, Lei T, Zhang J, Ding Y, Wang J, Wu S, Ye Q, Zhang J, Wu Q. A database for risk assessment and comparative genomic analysis of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China. *Scientific Data*, 2020, 7(1): 321.
- [5] 宗华, 曾德唯, 殷静, 姜欣余, 许磊. 重庆市南岸区水产品 and 腹泻患者副溶血弧菌相关性分析. *现代医药卫生*, 2020, 36(15): 2339–2342.
Zong H, Zeng DW, Yin J, Jiang XY, Xu L. Analysis on correlation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products and diarrhea patients in Nanan district of Chongqing city. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2020, 36(15): 2339–2342. (in Chinese)
- [6] Chiang ML, Chou CC, Chen HC, Tseng YT, Chen MJ. Adaptive acid tolerance response of *Vibrio parahaemolyticus* as affected by acid adaptation conditions, growth phase, and bacterial strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(8): 734–740.
- [7] Yeung PS, Boor KJ. Effects of acid stress on *Vibrio parahaemolyticus* survival and cytotoxicity. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(7): 1328–1334.
- [8] Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton JM, Antoine R. Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(10): 585–593.
- [9] Buschiazzo A, Trajtenberg F. Two-component sensing and regulation: how do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level? *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 507–528.
- [10] Tipton KA, Rather PN. An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(3): e00705–16.
- [11] Chakraborty S, Kenney LJ. A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2656.
- [12] Kunkle DE, Bina XR, Bina JE. *Vibrio cholerae* OmpR contributes to virulence repression and fitness at alkaline pH. *Infection and Immunity*, 2020, 88(6): e00141–e00120.
- [13] Cai SJ, Inouye M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(27): 24155–24161.
- [14] Slauch JM, Garrett S, Jackson DE, Silhavy TJ. EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Anatolian Journal of Cardiology*, 1988, 170(1): 439–441.
- [15] Silva IN, Pessoa FD, Ramires MJ, Santos MR, Becker JD, Cooper VS, Moreira LM. The OmpR regulator of *Burkholderia multivorans* controls mucoid-to-nonmucoid transition and other cell envelope properties associated with persistence in the cystic fibrosis lung. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(17): e00216–e00218.
- [16] Quinn HJ, Cameron AD, Dorman CJ. Bacterial regulon evolution: distinct responses and roles for the identical OmpR proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the acid stress response. *Microbial Biotechnology*, 2014, 10(3): e1004215.
- [17] Gao H, Zhang Y, Han Y, Yang L, Liu X, Guo Z, Tan Y, Huang X, Zhou D, Yang R. Phenotypic and transcriptional analysis of the osmotic regulator OmpR in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 39.
- [18] Zhong X, Lu Z, Wang F, Yao N, Shi M, Yang M. Characterization of GefA, a GGEEF domain-containing protein that modulates *Vibrio parahaemolyticus* motility, biofilm formation, and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(6): e0223921.
- [19] Zhong X, Lu R, Liu F, Ye J, Zhao J, Wang F, Yang M. Identification of LuxR family regulators that integrate into quorum sensing circuit in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 691842.
- [20] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 183–215.
- [21] 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*. *Genes to Cells*, 2000, 5(7): 555–569.

- [22] Siryaporn A, Goulian M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(2): 494–506.
- [23] Brzostek K, Brzóstkowska M, Bukowska I, Karwicka E, Raczkowska A. OmpR negatively regulates expression of invasins in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology: Reading, England*, 2007, 153(pt 8): 2416–2425.
- [24] Vergalli J, Bodrenko IV, Masi M, Moynié L, Acosta-Gutiérrez S, Naismith JH, Davin-Regli A, Ceccarelli M, Van Den Berg B, Winterhalter M, Pagès JM. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 164–176.
- [25] Masi M, Winterhalter M, Pagès JM. Outer membrane porins. *Subcellular Biochemistry*, 2019, 92: 79–123.
- [26] Li Z, Jiang B, Zhang X, Yang Y, Hardwidge PR, Ren W, Zhu G. The role of bacterial cell envelope structures in acid stress resistance in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 2911–2921.
- [27] Sadoira S, Lou YC, Tang HC, Chiu YC, Hsu CH, Chen C. Structural basis for promoter DNA recognition by the response regulator OmpR. *Journal of Structural Biology*, 2021, 213(1): 107638.
- [28] Kovacikova G, Lin W, Skorupski K. The LysR-type virulence activator AphB regulates the expression of genes in *Vibrio cholerae* in response to low pH and anaerobiosis. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(16): 4181–4191.
- [29] Liu Z, Yang M, Peterfreund GL, Tsou AM, Selamoglu N, Daldal F, Zhong Z, Kan B, Zhu J. *Vibrio cholerae* anaerobic induction of virulence gene expression is controlled by thiol-based switches of virulence regulator AphB. *PNAS*, 2011, 108(2): 810–815.
- [30] Merrell DS, Camilli A. Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the “ToxR-like” family of transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(19): 5342–5350.
- [31] Dutzler R. The CIC family of chloride channels and transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006, 16(4): 439–446.