



QsvR 对副溶血弧菌 VI 型分泌系统 1 相关基因的转录调控

吴燕^{1,2}, 仇越³, 吴齐敏^{1,2}, 张苗苗², 李雪², 张义全^{1,2*}, 陆仁飞^{1,2*}

1 南通大学医学院, 江苏 南通 226019

2 南通市第三人民医院 南通大学附属南通第三医院检验科, 江苏 南通 226006

3 南京医科大学附属常州第二人民医院检验科, 江苏 常州 213000

吴燕, 仇越, 吴齐敏, 张苗苗, 李雪, 张义全, 陆仁飞. QsvR 对副溶血弧菌 VI 型分泌系统 1 相关基因的转录调控[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 597-606.

WU Yan, QIU Yue, WU Qimin, ZHANG Miaomiao, LI Xue, ZHANG Yiquan, LU Renfei. Transcriptional regulation of type VI secretion system 1 genes by QsvR in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 597-606.

摘要: 【目的】研究调控蛋白 QsvR 对副溶血弧菌 VI 型分泌系统 1 (type VI secretion system 1, T6SS1) 相关基因的转录调控关系。【方法】提取野生株(wild type, WT)和 *qsvR* 突变株($\Delta qsvR$)的总 RNA, 采用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 研究 QsvR 对靶基因的调控关系; 进而采用引物延伸法定位靶基因的转录起始位点和核心启动子区, 并根据引物延伸产物丰度判断 QsvR 对靶基因的调控关系; 将靶基因的调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中的 β -半乳糖苷酶基因上游(*LacZ* 重组质粒), 并将重组质粒转化入 WT 和 $\Delta qsvR$ 中, 通过 *LacZ* 报告基因融合试验研究 QsvR 对靶基因的调控关系; 将 *LacZ* 重组质粒分别转化入含有 pBAD33 或 pBAD33-*qsvR* 的大肠杆菌 100 λ pir 中, 进一步采用 *LacZ* 报告基因融合试验研究在异体宿主中 QsvR 对靶基因的调控关系; PCR 扩增靶基因调控区 DNA 序列, 同时表达并纯化 His-QsvR 重组蛋白, 采用凝胶阻滞试验(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)研究 His-QsvR 对靶基因调控区 DNA 序列是否具有直接的结合作用。【结果】qPCR 结果显示, 与 WT 相比, $\Delta qsvR$ 中 T6SS1 相关基因 VP1388 (操纵子 VP1388–1390 首基因)和 *hcp1* (操纵子 VP1393–1406 首基因)的转录水平显著性升高, 表明 QsvR 抑制 VP1388 和 *hcp1* 的转录; 引物延伸结果显示 VP1388 和 *hcp1* 各有一个转录起始位点, 分别为 C (-64)和 T (-62), 且它们的转录活性受 QsvR 的抑制; *LacZ* 报告基因融合试验结果显示

资助项目: 南通市自然科学基金(JC2021027); 南通市卫生健康委员会科研课题(QN2022044)

This work was supported by the Nantong Natural Science Foundation (JC2021027) and the Research Projects of Nantong Health Commission (QN2022044).

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

Received: 2023-07-22; Accepted: 2023-08-30; Published online: 2023-09-08

QsvR 可以抑制副溶血弧菌和 EC100 λ pir 中 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区转录活性; EMSA 结果显示 His-QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区 DNA 序列具有直接的结合活性。【结论】QsvR 对 T6SS1 相关操纵子 VP1388–1390 和 VP1393–1406 的转录具有直接的抑制作用。

关键词: 副溶血弧菌; QsvR; VI 型分泌系统 1 (T6SS1); 转录调控

Transcriptional regulation of type VI secretion system 1 genes by QsvR in *Vibrio parahaemolyticus*

WU Yan^{1,2}, QIU Yue³, WU Qimin^{1,2}, ZHANG Miaomiao², LI Xue², ZHANG Yiquan^{1,2*}, LU Renfei^{1,2*}

1 School of Medicine, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu, China

2 Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nantong Hospital 3 of Nantong University, Nantong Third People's Hospital, Nantong 226006, Jiangsu, China

3 Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To study the transcriptional regulation of type VI secretion system 1 (T6SS1) genes by QsvR in *Vibrio parahaemolyticus*. **[Methods]** Total RNA was extracted from the wild type (WT) and *qsvR* mutant ($\Delta qsvR$). Quantitative real-time PCR (qPCR) was employed to investigate the transcriptional regulation of target genes by QsvR. Primer extension was carried out to detect the transcription initiation site and core promoter for each target gene and calculate the transcriptional variations between WT and $\Delta qsvR$. The regulatory DNA region of each target gene was cloned into the restriction endonuclease sites of pHRP309 harboring a promoterless gene *lacZ*, and then each recombinant plasmid was transferred into WT and $\Delta qsvR$, respectively. A β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) was used to measure the β -galactosidase activity in cell lysates. The recombinant pHRP309 vector containing the regulatory DNA region of one of the target gene was transferred into *Escherichia coli* 100 λ pir harboring an empty pBAD33 or pBAD33-*qsvR* to test whether QsvR can regulate the target genes in a heterologous host. The regulatory DNA region of each target gene was amplified by PCR, and His-QsvR was over-expressed and then purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was employed to determine the DNA-binding activity of His-QsvR to each target DNA fragment *in vitro*. **[Results]** The mRNA levels of T6SS1-associated genes, VP1388 (the first gene of VP1388–1390 operon) and *hcp1* (the first gene of VP1393–1406 operon), were significantly up-regulated in $\Delta qsvR$ relative to those in WT, indicating that QsvR activated the transcription of VP1388 and *hcp1*. Only one transcription initiation site was detected for VP1388 or *hcp1*, locating at 64 bp upstream of VP1388 and 62 bp upstream of *hcp1*, respectively, and their transcriptional activities were all repressed by QsvR. QsvR repressed the promoter activities of VP1388 and *hcp1* in both *V.*

parahaemolyticus and *E. coli* 100λpir. His-QsvR was able to bind to the regulatory DNA regions of VP1388 and *hcp1*. [Conclusion] QsvR directly repressed the transcription of T6SS1-associated operons, VP1388–1390 and VP1393–1406, in *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; QsvR; type VI secretion system 1 (T6SS1); transcriptional regulation

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性、革兰氏阴性弧菌,广泛存在于海洋生态系统中,是沿海地区细菌性食物中毒的首要病原菌^[1]。当人们食用生的或未被彻底煮熟的海产品时,可能会被其感染,引起以腹泻、腹痛、呕吐和发热等为主要症状的急性肠胃炎,但通常为自限性^[2]。当开放性伤口与海水或者海产品接触时,副溶血弧菌还可能引起蜂窝织炎、坏死性肌膜炎等软组织感染,严重者可导致组织坏死,多见于渔民^[3]。当副溶血弧菌播散至被感染者的血液循环系统时,可引起败血症甚至死亡,多见于免疫功能低下者(特别是肝肿瘤患者)^[3]。

副溶血弧菌能表达多种毒力因子,如耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、TDH 相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)、III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)、VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)等^[4]。其中, T6SS 是普遍存在于革兰氏阴性菌中的一种针状蛋白注射装置,能将效应子蛋白注入靶细胞(真核或原核细胞)内,影响细胞生命活动^[5]。副溶血弧菌能表达 2 种类型的 T6SS, 分别称为 T6SS1 (VP1386–1420)和 T6SS2 (VPA1024–1046)^[6]。T6SS1 存在于致病菌株中,主要具有抑菌活性,与副溶血弧菌的环境竞争能力相关^[7-8]。T6SS2 存在于所有菌株中,主要具有细胞黏附活性,与副溶血弧菌的致病性相关^[7-8]。此外,有研究者在副溶血弧菌中发现了一种新型 T6SS, 其基因位点位于质粒上,与 T6SS1 只有 4%的相似性,但同样具有抑菌活性^[9]。

QsvR 是 AraC 家族的转录调控子,由操纵子 VPA0607-*qsvR* 编码^[10]。QsvR 直接抑制 VPA0607-*qsvR* 的转录,而 VPA0607 蛋白是活性 RNase II,能转录后抑制 QsvR 的表达^[10]。QsvR 与群体感应系统(quorum sensing, QS)核心调控子 AphA 和 OpaR 之间具有相互调控作用,并协同调控关键毒力基因(如 TDH 基因)的转录^[10-11]。QsvR 与 OpaR 通过协调控制多个与生物被膜形成相关基因的转录来抑制副溶血弧菌生物被膜形成^[12]。QsvR 还能直接抑制 *toxR* 和 *calR* 的转录,但对 *cpsQ-mfpABC*、*mfpABC* 和 T6SS2 相关基因的转录具有直接的激活作用^[13-14]。此外, QsvR 对极鞭毛基因的转录也具有直接的抑制作用^[15]。本研究探究了 QsvR 对 T6SS1 相关基因(VP1388–1390 和 VP1393–1406)的转录调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

副溶血弧菌 RIMD2210633 [野生型(wild type, WT)]及其 *qsvR* 突变株($\Delta qsvR$)、His-QsvR 重组蛋白表达菌、pHRP309 质粒等由南通市第三人民医院、南通大学附属南通第三医院检验科保存^[11]。在之前的研究中,已证明 $\Delta qsvR$ 为非极性突变株,因为回补株的生物被膜和毒力相关表型均与 WT 保持一致^[11-12]。

1.1.2 主要试剂

TRIzol 试剂, Invitrogen 公司; Primer Extension System 和 β -Galactosidase Enzyme

Assay System 试剂盒, Promega 公司; AccuPower & Top DNA Sequencing Kit, Bioneer 公司; 蛋白胨粉 (tryptone) 和酵母提取物 (yeast extract), OXOID 公司; 氯化钠 (NaCl), 生工生物工程(上海)股份有限公司; $2\times$ 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盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒等, 天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 细菌培养

对副溶血弧菌的培养方法如下: 取 20 μ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 marine Luria-Bertani (MLB) 肉汤 (1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物和 3% NaCl) 中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h, 至平台期; 培养产物直接用 MLB 肉汤稀释至 OD_{600} 为 0.5, 取 25 μ L 滴加在 MLB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 4 h 后(该条件下 T6SS1 具有杀菌活性^[8])收集菌体。对大肠杆菌 (*Escherichia coli*, EC) 的培养方法如下: 取 20 μ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 LB 肉汤 (1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物和 1% NaCl) 中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h; 按 1:1 000 稀释后接种至 5 mL 新鲜的 LB 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min

培养至对数中期 (OD_{600} 为 1.2), 收集菌体^[13]。某些情况下, 还需添加 L-阿拉伯糖和抗生素, 工作浓度如下: L-阿拉伯糖为 0.1%、氯霉素为 20 μ g/mL、庆大霉素为 100 μ g/mL。

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

采用 TRIzol 试剂提取 WT 和 $\Delta qsvR$ 的总 RNA。取 1 μ g 的总 RNA, 利用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒制备 cDNA, 进而采用 SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 (SYBR Green) 进行 qPCR 分析。以 16S rRNA 基因的表达量为内参, 采用经典的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对靶基因的转录水平进行相对定量^[16]。所用引物见表 1。

1.4 引物延伸 (primer extension)

将能与靶基因 mRNA 互补的特异性引物 (表 1) 的 5' 末端用 [γ -³²P]-ATP (5 000 Ci/mmol) 进行放射性标记^[17]。分别以等量的 WT 和 $\Delta qsvR$ 总 RNA 为模板, 利用 Primer Extension System 进行引物延伸试验, 将靶基因的 mRNA 逆转录成 cDNA。逆转录产物配伍 Sanger 测序条带进行 6% 聚丙烯酰胺变性胶凝胶电泳, -20 $^{\circ}$ C 放射自显影后, 分析结果^[18-19]。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Sequences (forward/reverse, 5'→3')
qPCR	
VP1388	CGTCCTTACACCTGATGAG/TGTCGAATAGCCGTTAG
<i>hcp1</i>	GGTCAACCTACTGGTCAACG/TAGTGCTCTTGCTTGCCTTG
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC
Primer extension	
VP1388	/GATAGCTCGTTGGAGGAAAG
<i>hcp1</i>	/GAGTTTCACCGTTGATAGAC
LacZ fusion	
VP1388	AAAGTCGACCAATGGTGAATATGCCGTG/AAGGTACCGATAGCTCGTTGGAGGAAAG
<i>hcp1</i>	GCGCGTCGACGCTATCGGGTGTAGACGCTG/GCGCGAATTCGAGTTTCACCGTTGATAGAC
EMSA	
VP1388	CAATGGTGAATATGCCGTG/GATAGCTCGTTGGAGGAAAG
<i>hcp1</i>	GCTATCGGGTGTAGACGCTG/GAGTTTCACCGTTGATAGAC
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC

1.5 *LacZ* 报告基因融合试验

pHRP309 质粒含有一个无启动子区的 β -半乳糖苷酶基因和一个庆大霉素抗性基因, 广泛用于原核生物中的 *LacZ* 报告基因融合试验^[20]。将靶基因启动子区 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* 质粒, 并将其转化入 WT 和 $\Delta qsvR$ 中, 获得 *LacZ* 菌株。*LacZ* 菌株按 1.2 的方法培养后, 采用 β -Galactosidase Enzyme Assay System 试剂盒检测不同菌株中 β -半乳糖苷酶活性(用 Miller units 表示), 通过比较 Miller units 数值大小即可判断 QsvR 对靶基因的调控关系^[14]。

1.6 凝胶阻滞试验(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

PCR 扩增靶基因启动子区 DNA 序列(引物见表 1), 并用 T4 多聚核苷酸激酶和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 对其 5'末端进行放射性标记, 制备 EMSA 探针^[17]。表达并纯化 His-QsvR 重组蛋白^[11]。将不同浓度的 His-QsvR 与 EMSA 探针在 10 μL 结合体系(1 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl, 0.05 mg/mL 鲑鱼精 DNA, EMSA 探针)中共孵育 20 min (室温条件下), 然后进行 4%非变性聚丙烯

酰胺凝胶电泳, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 放射自显影后分析结果。

1.7 统计学分析方法

引物延伸和 EMSA 至少重复 2 次, 并获得相似或相同的试验结果。qPCR 和 *LacZ* 报告基因融合试验至少被重复 3 次, 每次至少包含 3 个生物学重复, 结果用平均值 \pm 标准差(standard deviation, SD)表示, 利用双尾 *t* 检验进行统计学分析, $P<0.01$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 QsvR 负调控 T6SS1 相关基因的转录

研究表明, QsvR 对 T6SS2 相关基因转录具有直接的激活作用^[13]。本研究用能诱导 T6SS1 杀菌活性的条件培养副溶血弧菌^[8], 并收集菌体, 研究 QsvR 对 VP1388–1390 和 VP1393–1406 操纵子首基因的转录调控关系。qPCR 结果显示(图 1A), $\Delta qsvR$ 中的 VP1388 和 *hcp1* (VP1393) mRNA 丰度比在 WT 中的高 4 倍以上, 且具有统计学意义($P<0.01$), 说明 QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的转录具有抑制作用; 进一步采用引物延伸试验研究 VP1388 和 *hcp1* 的转录起始位点以及 QsvR 对它们的调控关系, 如图 1B 所示, VP1388 和 *hcp1* 各有 1 个转录起始位点, 分别

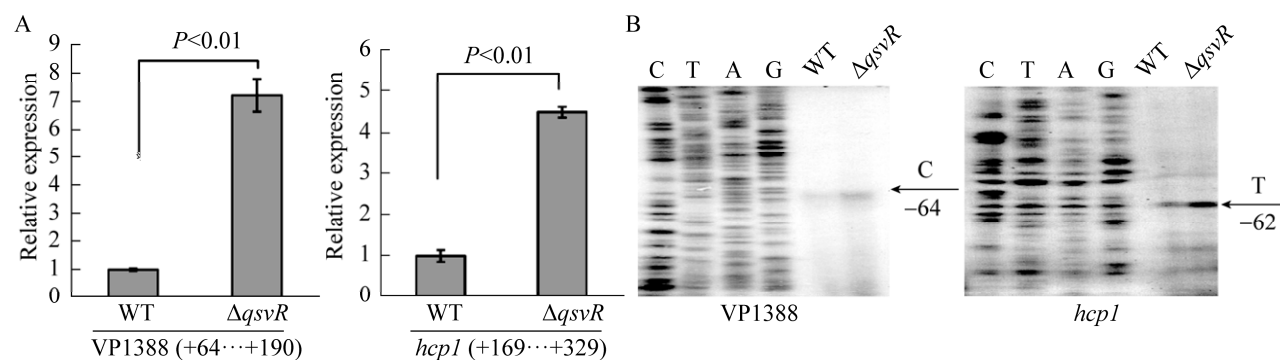


图 1 QsvR 负调控 VP1388 和 *hcp1* 的转录

Figure 1 Negative regulation of VP1388 and *hcp1* by QsvR. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of each target gene, respectively. A: qPCR. The relative mRNA levels of each target gene were compared between $\Delta qsvR$ and WT. $P<0.01$ was considered significant based on paired Student's *t*-test. B: Primer extension. Lanes G, A, T, and C represent the Sanger sequencing reactions.

为位于起始密码子 ATG 上游第 64 位碱基的 C 和第 62 位碱基的 T, 且二者在 $\Delta qsvR$ 中的转录丰度显著高于在 WT 中的, 这进一步表明 QsvR 负调控 VP1388 和 *hcp1* 的转录。总之, 上述结果表明 QsvR 负调控 T6SS1 相关基因的转录。

2.2 QsvR 负调控 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区活性

分别将 VP1388 和 *hcp1* 上游调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中无启动子的 β -半乳糖苷酶基因的上游, 获得 LacZ 重组质粒, 并将重组质粒分别转化入 WT 和 $\Delta qsvR$ 中, 采用 LacZ 报告基因融合试验进一步研究 QsvR 对 T6SS1 相关基因的转录调控关系, 结果如图 2 所示。与 WT 相比, $\Delta qsvR$ 中的 VP1388 和 *hcp1* 启动子区控制下的 β -半乳糖苷酶基因表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), 这说明 QsvR 负调控 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区转录活性。

2.3 在 EC 中 QsvR 抑制 VP1388 和 *hcp1* 的表达

分别将 pBAD33 和 pBAD33-*qsvR* 转化入 EC100 λ pir 中, 构建双质粒报告基因试验的受体

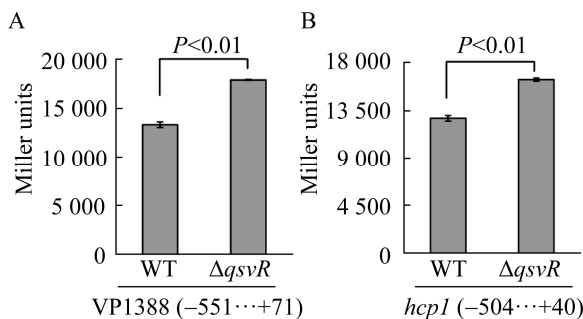


图 2 QsvR 负调控 VP1388 (A) 和 *hcp1* (B) 的启动子区转录活性

Figure 2 QsvR inhibited the promoter activities of VP1388 (A) and *hcp1* (B). The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of each target gene, respectively. $P < 0.01$ was considered significant based on paired Student's *t*-test.

菌(分别记为 EC100/pBAD33 和 EC100/pBAD33-*qsvR*)。经 0.1% L-阿拉伯糖诱导后, EC100/pBAD33-*qsvR* 中的 *qsvR* 可高水平转录, 从而过表达 QsvR 蛋白, 而 EC100/pBAD33 则不能表达 QsvR (图 3A)。将靶基因(VP1388 和 *hcp1*)的 LacZ 重组质粒分别转化入 EC100/pBAD33 和 EC100/pBAD33-*qsvR* 中, 采用 LacZ 试验研究异源宿主中表达的 QsvR 是否能调控靶基因启动子区活性, 如图 3B、3C 所示。与 EC100/pBAD33 相比, 在 EC100/pBAD33-*qsvR* 中检测到的 β -半乳糖苷酶活性显著降低 ($P < 0.01$), 这说明在异源宿主中, QsvR 的过表达也可以抑制 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区活性, 说明 QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的启动子区 DNA 序列具有直接的结合活性。

2.4 His-QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的上游调控区 DNA 序列具有结合活性

PCR 扩增 VP1388 和 *hcp1* 的上游调控区 DNA 序列, 并用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5 000 Ci/mmol) 对其 5' 末端进行放射性标记, 进而采用 EMSA 试验研究体外条件下 His-QsvR 是否对其具有作用, 结果如图 4 所示。His-QsvR 能剂量依赖性地结合到 VP1388 和 *hcp1* 上游调控区 DNA 序列上; 当提前加入 2 pmol 未标记的相同 DNA 片段作为竞争性 DNA (第 5 泳道) 时, 由于 His-QsvR 先与竞争性 DNA 结合而导致不能再与 EMSA 探针结合, 因此阻滞带减弱或消失; 当提前加入 2 pmol 未标记的 16S rDNA 作为阴性探针(第 6 泳道)时, 则对 His-QsvR 与 EMSA 探针结合无任何影响; 当用鼠疫菌 F1 抗原作为无关蛋白(第 7 泳道)替代 His-QsvR 加入到反应体系中, 则没有出现任何阻滞条带。这些结果表明 His-QsvR 能特异性地结合到 VP1388 和 *hcp1* 上游调控区 DNA 序列上。可见, QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的转录具有直接的调控作用。

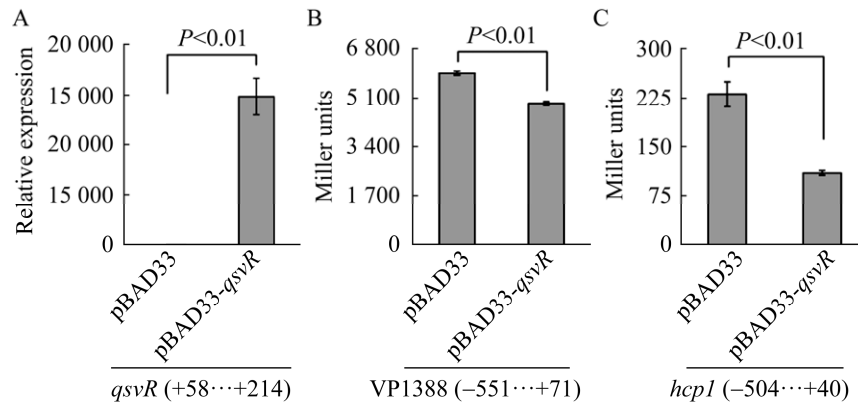


图 3 QsvR 调控异源宿主中 VP1388 和 *hcp1* 的表达

Figure 3 Regulation of VP1388 and *hcp1* by QsvR in a heterologous host. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of each target gene, respectively. $P < 0.01$ was considered significant based on paired Student's *t*-test. A: qPCR. The relative mRNA levels of *qsvR* were compared between EC100/pBAD33 and EC100/pBAD33-*qsvR*. B and C: Two-plasmid *lacZ* reporter assay.

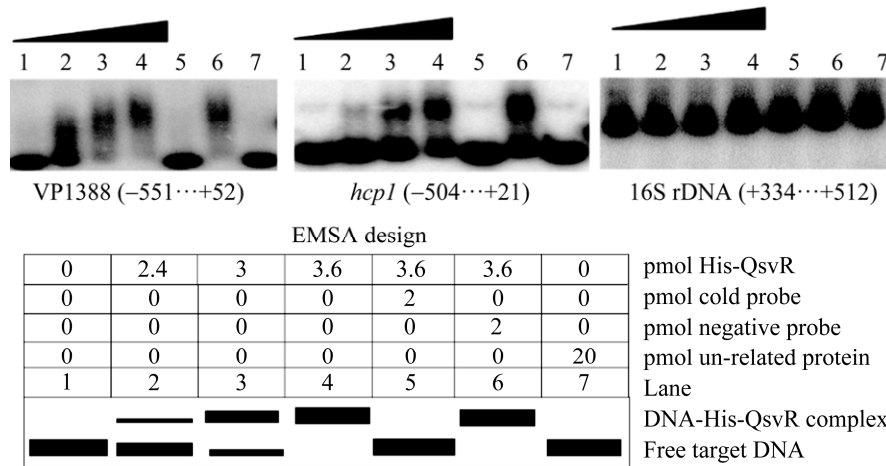


图 4 His-QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 调控区 DNA 序列的结合作用分析

Figure 4 Binding of His-QsvR to the regulatory DNA regions of VP1388 and *hcp1*. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of each target gene, respectively.

3 讨论与结论

副溶血弧菌 T6SS1 基因位点 (VP1386-1420) 至少包含 7 个推定的操纵子, 即 VP1386-1387、VP1388-1390、VP1392-1391、VP1393-1406、VP1400-1406、VP1409-1407 和 VP1410-1420^[6]。本研究以 VP1388-1390 和 VP1393-1406 操纵子首基因为研究对象, 利用一系列经典的分子调控

试验技术研究了 QsvR 对它们的转录调控机制。qPCR 和引物延伸结果显示, VP1388 和 *hcp1* 各只有 1 个转录起始位点, 分别为 C (-64) 和 T (-62), 且二者的转录活性受 QsvR 的抑制 (图 1); 随后的 *LacZ* 报告基因融合试验结果显示, QsvR 能够抑制 VP1388 和 *hcp1* 的启动子活性 (图 2); 双质粒报告基因融合试验结果表明, 在 EC 中过表达的 QsvR 可以结合到 VP1388 和 *hcp1*

的启动子区而抑制它们转录(图 3); 体外的 EMSA 试验结果表明 His-QsvR 对 VP1388 和 *hcp1* 的调控区 DNA 序列具有结合作用(图 4)。总之, QsvR 直接抑制 VP1388 和 *hcp1* 的转录。

研究结果表明, T6SS1 在模拟海洋环境的培养基中表达水平高, 而 T6SS2 在模拟宿主体内条件的培养基中表达水平高^[8]。QS 系统核心调控子 AphA 和 OpaR 对 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录均具有调控作用^[21-22]。低细菌密度时, AphA 起调控作用, 间接抑制 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录; 而高细菌密度时, OpaR 起调控作用, 分别直接抑制和直接激活 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录^[21-22]。因此, T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录均具有细菌密度依赖性特征^[21-22]。毒力调控子 ToxR 也能直接抑制 T6SS1 相关基因的转录^[21]。位于 T6SS1 基因点位内的 VP1391 和 VP1407, 以及 VP1028 编码产物均为调控子蛋白, 它们对 T6SS1 相关基因的转录均具有正调控作用^[23-25]。CalR 对 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录均具有直接的转录调控作用^[26-27]。H-NS 对 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的转录均具有抑制作用^[23,28-29]。RpoN 能直接激活 T6SS2 相关基因的转录, *rpoN* 突变株中 T6SS2 基因转录被显著下调^[30]。此外, 副溶血弧菌能在褶皱型和光滑型菌落之间自发、可逆地转换, 相比于在光滑型菌落中, 褶皱型菌落中 T6SS1 和 T6SS2 的表达水平被显著下调^[31]。研究发现, QsvR 也能直接结合到 T6SS1 和 T6SS2 相关基因启动子区而调控它们的转录^[13]。另外, QsvR 直接抑制 *calR*、*toxR* 和 *aphA* 的转录, 而直接激活 *opaR* 的转录^[11,14]; 同时, AphA 间接激活 VPA0607-*qsvR* 的转录, 而 OpaR 直接抑制其转录^[10]。可见, 副溶血弧菌 T6SS 的表达受 QS 系统(通过 AphA 和 OpaR)及其他相关调控子(如 QsvR、ToxR 等)组成的调控网络的紧密调控。后

续仍需要大量的研究来进一步解析副溶血弧菌 T6SS 基因的表达调控网络。

参考文献

- [1] CHEN LL, SUN L, ZHANG RH, LIAO NB, QI XJ, CHEN J. Surveillance for foodborne disease outbreaks in Zhejiang Province, China, 2015–2020[J]. *BMC Public Health*, 2022, 22(1): 1-9.
- [2] YANG C, LI YH, JIANG M, WANG L, JIANG YX, HU LL, SHI XL, HE LH, CAI R, WU S, QIU YQ, LU LY, ZUO L, CHEN QC, WU YR, MARTINEZ-URTAZA J, WAN CS, YANG RF, CUI YJ, HU QH. Outbreak dynamics of foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* over a seventeen year period implies hidden reservoirs[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(8): 1221-1229.
- [3] BROBERG CA, CALDER TJ, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [4] LI LZ, MENG HM, GU D, LI Y, JIA MD. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43-51.
- [5] GALLIQUE M, BOUTEILLER M, MERIEAU A. The type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1454.
- [6] MAKINO K, OSHIMA K, KUROKAWA K, YOKOYAMA K, UDA T, TAGOMORI K, IJIMA Y, NAJIMA M, NAKANO M, YAMASHITA A, KUBOTA Y, KIMURA S, YASUNAGA T, HONDA T, SHINAGAWA H, HATTORI M, IIDA T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. *Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749.
- [7] YU Y, YANG H, LI J, ZHANG PP, WU BB, ZHU BL, ZHANG Y, FANG WH. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(10): 827-835.
- [8] SALOMON D, GONZALEZ H, UPDEGRAFF BL, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086.

- [9] WANG R, XIAO JZ, WANG QY, ZHAO WY, LIU XY, LIU Y, FU SZ. Genomic analysis of a new type VI secretion system in *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for environmental adaptation in shrimp ponds[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2023, 69(1): 53-61.
- [10] ZHANG YQ, XUE XF, SUN FJ, LI X, ZHANG MM, WU QM, ZHANG TT, LUO X, LU RF. Quorum sensing and QsvR tightly control the transcription of vpa0607 encoding an active RNase II-type protein in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1123524.
- [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[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(3): 1054-1067.
- [12] ZHANG MM, XUE XF, LI X, WU QM, ZHANG TT, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. QsvR and OpaR coordinately repress biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1079653.
- [13] QIU Y, HU LF, YANG WH, YIN Z, ZHOU DS, YANG HY, ZHANG YQ. The type VI secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* is regulated by QsvR[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104579.
- [14] ZHANG YQ, QIU Y, XUE XF, ZHANG MM, SUN JF, LI X, HU LF, YIN Z, YANG WH, LU RF, ZHOU DS. Transcriptional regulation of the virulence genes and the biofilm formation associated operons in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Gut Pathogens, 2021, 13(1): 15.
- [15] ZHANG MM, XUE XF, LI X, LUO X, WU QM, ZHANG TT, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. QsvR represses the transcription of polar flagellum genes in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 174: 105947.
- [16] 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*[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 40.
- [17] 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[J]. 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[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(5): 615-621 (in Chinese).
- [18] 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*[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34622.
- [19] 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[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(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*[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2021, 41(12): 906-911 (in Chinese).
- [20] PARALES RE, HARWOOD CS. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram⁻ bacteria[J]. Gene, 1993, 133(1): 23-30.
- [21] WANG L, ZHOU DS, MAO PY, ZHANG YQ, HOU J, HU Y, LI J, HOU SJ, YANG RF, WANG RH, QIU JF. Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73363.
- [22] ZHANG YQ, GAO H, OSEI-ADJEI G, ZHANG Y, YANG WH, YANG HY, YIN Z, HUANG XX, ZHOU DS. Transcriptional regulation of the type VI secretion system 1 genes by quorum sensing and ToxR in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2005.
- [23] SALOMON D, KLIMKO JA, ORTH K. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1[J]. Microbiology (Reading), 2014, 160(Pt 9): 1867-1873.
- [24] BEN-YAAKOV R, SALOMON D. The regulatory network of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(7): 2248-2260.
- [25] METZGER LC, MATTHEY N, STOUDEMANN C, COLLAS EJ, BLOKESCH M. Ecological implications of gene regulation by TfoX and TfoY among diverse *Vibrio* species[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(7): 2231-2247.
- [26] 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[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(6): 931-938.
- [27] 陆仁飞, 李雪, 薛星帆, 张苗苗, 孙君芳, 高鹤, 周冬生, 张义全. CalR 激活副溶血弧菌VI型分泌系统1相关基因的转录[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 715-726.
- LU RF, LI X, XUE XF, ZHANG MM, SUN JF, GAO H, ZHOU DS, ZHANG YQ. CalR activates the transcription of type VI secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 715-726 (in Chinese).
- [28] SUN FJ, ZHANG YQ, QIU YF, YANG HY, YANG WH, YIN Z, WANG J, YANG RF, XIA PY, ZHOU DS. H-NS is a repressor of major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 675.
- [29] 王洁, 董新波, 高丽晓, 周冬生, 殷喆, 张义全. H-NS 蛋白对副溶血弧菌 hcp1 的转录调控[J]. *微生物学报*, 2016, 56(1): 143-149.
- WANG J, DONG XB, GAO LX, ZHOU DS, YIN Z, ZHANG YQ. Transcriptional regulation of hcp1 by H-NS in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 143-149 (in Chinese).
- [30] GU D, ZHANG YK, WANG KR, LI MZ, JIAO XN. Characterization of the RpoN regulon reveals the regulation of motility, T6SS2 and metabolism in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1025960.
- [31] WU QM, LI X, ZHANG TT, ZHANG MM, XUE XF, YANG WH, HU LF, YIN Z, ZHOU DS, SUN YY, LU RF, ZHANG YQ. Transcriptomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* underlying the wrinkly and smooth phenotypes[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0218822.