

## 研究报告

副溶血性弧菌 CalR 调控 *vopB2* 的分子机制张凌宇<sup>1</sup> 唐浩<sup>2</sup> 仇越<sup>2</sup> 张义全<sup>2</sup> 王丽<sup>\*3</sup>

1 南京大学医院 江苏 南京 210000

2 江苏大学医学院 江苏 镇江 212013

3 河南大学第一附属医院 河南 开封 475000

**摘要:**【背景】副溶血性弧菌是一种非常重要的食源性致病菌, CalR 蛋白是一种全局转录调节因子。III 型分泌系统 2 (Type 3 secretion systems 2 T3SS2) 是副溶血性弧菌主要的毒力因子, *vopB2* 是 T3SS2 中的一个关键效应蛋白。【目的】研究副溶血弧菌 CalR 对 *vopB2* 的转录调控机制。【方法】利用引物延伸实验鉴定 *vopB2* 及 *vtrA* 的转录起始位点, 并根据产物的丰度判断 CalR 对靶基因的调控关系; 采用实时定量 RT-PCR 研究靶基因 mRNA 在 WT 和  $\Delta calR$  中转录丰度, 验证 CalR 对靶基因的转录调控关系, 进一步利用 LacZ 实验通过比较  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的差异来判定 CalR 对靶基因的调控关系; 利用凝胶阻滞实验分析 His-CalR 对靶基因启动子区是否具有直接的结合作用。【结果】*vopB2* 有两个转录起始位点 A (-130 和 -28) 且其活性受 CalR 的直接抑制; 引物延伸和 LacZ 结果表明 CalR 对 *vtrA* 的转录并无调控作用。【结论】CalR 直接抑制 *vopB2* 的转录, 该抑制作用与 *vtrA* 无关联。

关键词: 副溶血弧菌, 转录调控, CalR, *vopB2*, *vtrA*

## The transcriptional regulation role of CalR on *vopB2* in *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Ling-Yu<sup>1</sup> TANG Hao<sup>2</sup> QIU Yue<sup>2</sup> ZHANG Yi-Quan<sup>2</sup> WANG Li<sup>\*3</sup>

1 Nanjing University Hospital, Nanjing, Jiangsu 210000, China

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

3 The First Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng, Henan 475000, China

**Abstract:** [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is a seafood-borne pathogen. CalR is a global transcriptional regulator in *V. parahaemolyticus*. Type 3 secretion systems 2 (T3SS2) is one of the major virulence determinants of *V. parahaemolyticus*. VopB2 is a key effector protein of T3SS2. [Objective] To study the transcriptional regulation of *vopB2* by CalR in *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] Primer extension assay was employed to detect the transcription start sites and the amount of primer extension

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81501779); Higher Education Key Research Program of Henan Province (18A320024); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20160505)

\*Corresponding author: Tel: 86-371-22736871; E-mail: wangli851217@163.com

Received: 22-01-2019; Accepted: 25-04-2019; Published online: 09-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81501779); 河南省高等学校重点科研项目(18A320024); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20160505)

\*通信作者: Tel: 0371-22736871; E-mail: wangli851217@163.com

收稿日期: 2019-01-22; 接受日期: 2019-04-25; 网络首发日期: 2019-05-09

porroducts of target genes in  $\Delta calR$  and WT. Quantitative RT-PCR was then carried out to calculate the transcriptional variation of target genes between  $\Delta calR$  and WT. LacZ assay was used to verify regulation relationship by measuring the  $\beta$ -galactosidase activities in cellular extracts using a  $\beta$ -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega). Finally the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to analyze the DNA-binding activity of His-CalR to target promoters *in vitro*. **[Results]** We detected one transcription start site for *vopB2*, which was located at 130 bp and 28 bp upstream of *vopB2* and its transcribed activity was under the negative control of the CalR. We also found that His-CalR was bind to the promoter region of *vopB2* directly. Besides, our data showed that CalR had no regulatory effect on *vtrA* transcription, a known regulator for *vopB2*. **[Conclusion]** *V. parahaemolyticus* CalR represses the transcription of *vopB2* directly, which is not associated to *vtrA*.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Transcriptional regulation, CalR, *vopB2*, *vtrA*

副溶血性弧菌是一种嗜盐弧菌,主要寄生在海水、港口水及海产品上,人们主要通过食用被污染的海产品而感染。目前副溶血性弧菌已经成为全世界范围内食源性胃肠道感染的主要病原菌<sup>[1]</sup>。副溶血性弧菌基因组包含两套染色体,编码两套三型分泌系统(Type 3 secretion systems, T3SS), T3SS1 和 T3SS2 (T3SS2 $\alpha$  和 T3SS2 $\beta$ )<sup>[2]</sup>。T3SS 由很多不同的结构蛋白组装而成,其结构为注射针状,病原菌可以直接通过 T3SS 将毒力效应蛋白注射到宿主细胞膜和胞浆内,从而引起细胞损伤。T3SS 是副溶血性弧菌主要致病因子之一。

副溶血性弧菌的 T3SS2 位于小染色体的毒力岛上,与细菌对宿主的肠毒性相关<sup>[3]</sup>。T3SS2 的效应蛋白主要包括 VopV、VopL、VopC、VopO、VopA/P、VopT、VopC、VPA1380。细菌通过这些分泌蛋白的联合作用导致宿主细胞的损伤。但是 T3SS 毒力作用的发挥依赖于转座蛋白将效应蛋白转移至宿主细胞内,所以转座蛋白也是 T3SS 引起致病的关键因子。研究表明在副溶血性弧菌中,T3SS2 的效应蛋白 VopB2 不但可以发挥肠毒性作用,同时也是转位蛋白,与效应蛋白 VopT 的转运及在细胞表面成孔作用相关<sup>[4]</sup>。VtrA (*V. parahaemolyticus* T3SS2 regulator A)和 VtrB 由毒力岛基因 VPA1332 和 VPA1348 编码,为 ToxR 样转录调节蛋白,它们可以调节毒力岛基因 *tdh* (Thermostable direct hemolysin)和 T3SS2 基因的表达,是 T3SS2 发挥肠毒性所必需的(VtrA 和或 VtrB

的缺失株肠毒性也缺失),同时 VtrA 可以直接调控 VtrB 的表达<sup>[5-7]</sup>。

CalR 属于 LysR 家族的转录调节因子,这类调控因子广泛存在于原核生物中。在副溶血弧菌中 CalR 由位于大染色体上的 *calR* (VP0350)基因所编码。在副溶血弧菌中,CalR 直接抑制 T3SS1 的表达,同时 ToxR 作为一种跨膜调节蛋白,可以通过激活 CalR 的表达间接抑制 T3SS1 基因的转录,而 CalR 对 ToxR 又具有负调控作用<sup>[8-9]</sup>。CalR 还可以激活 T6SS2 的表达来加强副溶血性弧菌与 HeLa 细胞之间的粘附作用<sup>[10]</sup>。同时 CalR 通过下调主要毒力因子 TDH (Thermostable direct hemolysin)基因的转录,从而抑制副溶血性弧菌的溶血素活性<sup>[11]</sup>。基于此,可以看出在副溶血弧菌中,CalR 是一个非常重要的转录调节因子,所以本文以分泌蛋白 VopB2 为靶基因,主要研究调控因子 CalR 是否对 T3SS2 有调控作用及具体的调控机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

副溶血弧菌野生株 RIMD2210633 (WT)、*calR* 非极性突变株( $\Delta calR$ <sup>[12]</sup>)、重组质粒 *vopB2*::pHRP309 及 *vtrA*::pHRP309 (庆大霉素抗性)均来自江苏大学国家重点实验室。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 以及 DNA marker,

TaKaRa 公司; PCR 产物纯化试剂盒, Qiagen 公司; Primer Extension System 和 Fmol<sup>®</sup> DNA Cycle Sequencing System, Promega 公司; TRIzol Reagent, Invitrogen 公司; DNA-free<sup>™</sup> Kit, Amibion 公司。

PCR 仪, Eppendor 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; ND-100 核酸检测仪, NanoDrop 公司; 凝胶成像分析系统, Syngene 公司。

### 1.1.3 培养基

HI 肉汤(2.5% Bacto heart infusion)购自 BD Biosciences 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌培养

取 5  $\mu$ L 甘油菌种接种至 5 mL 的 HI 肉汤中(玻璃试管), 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至平台期(12–14 h), 按 1:50 转接至 15 mL 新鲜的 HI 肉汤(50 mL 的三角烧瓶)中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.4–0.6 (对数期早期), 收集菌体。

### 1.2.2 引物

本文所用引物见表 1。

### 1.2.3 引物延伸实验

用 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/mL) 将同靶基因(*vopB2* 和 *vtrA*)的 mRNA 互补的特异性引物(表 1) 5'-末端进行放射性标记, 分别以等量 WT 和  $\Delta$ *calR* 的总 RNA 为模板, 利用被标记的特异性引物将靶基因的 mRNA 逆转录为 cDNA, 经 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳、放射自显影, 随后分析结果。可对比测

序条带鉴定出靶基因的转录起始位点(+1), 并且分析 WT 和  $\Delta$ *calR* 中的基因转录表达差异。

### 1.2.4 LacZ 实验

分别将 *vopB2* 及 *vtrA* 的启动子区克隆至 pHRP309 质粒的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因上游, 构建 LacZ 重组质粒, 并分别将重组质粒导入 WT 和  $\Delta$ *calR* 中, 将 WT 和  $\Delta$ *calR* 在一定的条件下(见 1.2.1) 培养后, 通过比较其  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的差异来分析 CalR 对靶基因的调控关系。

### 1.2.5 实时定量 RT-PCR (qRT-PCR)

用 TRIzol 法提取 WT 和  $\Delta$ *calR* 的总 RNA, 使用 DNA-free<sup>™</sup> Kit 去除基因组 DNA 污染后, 将总 RNA 逆转录为 cDNA。用 Bio-Rad 的 C1000 Thermal Cycler 作 qRT-PCR 分析。以 16S rRNA 基因的表达量为内参(表 1), 用 Bio-Rad CFX\_Manger 和 T-test 统计分析目的基因的转录水平。

### 1.2.6 凝胶阻滞实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

PCR 扩增 *vopB2* 的启动子区(表 1), 用 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 标记 DNA 片段的 5'-末端来制备特异性的 DNA 探针。将不同浓度的 His-CalR 与约为 50 ng/ $\mu$ L 的 DNA 探针在 10  $\mu$ L 结合反应体系中室温孵育 20 min, 随后使用 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测条带, -20  $^{\circ}$ C 下放射自显影后, 分析结果。

表 1 本文所用引物汇总

Table 1 Special primer sequences for this study

基因名称 Genes name	序列 Primers sequence (5'→3')
荧光定量 RT-PCR 实验 qRT-PCR	
<i>vopB</i>	ACCAGCCTCAGCAACAAGC/CTTTCACGAATACTACGC
LacZ 实验 LacZ fusion assay	
<i>vopB</i>	GCGTACTAAGTGATGAAGAG/CAACAGAACCCTTCAGC
<i>vtrA</i>	TACGCTTCCAATAATCACC/CCGATCTTGTGAGCCTAGAC
引物延伸实验 Primer extension assay	
<i>vopB</i>	TAGCTTGCCCCACAGAG
<i>vtrA</i>	GAGATTCGTAGCGTATAAGTGC
凝胶阻滞实验 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	
16S rRNA gene	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GTGCTTCTTCTGTGCGCTAAC
<i>vopB</i>	GCGTACTAAGTGATGAAGAG/CAACAGAACCCTTCAGC

## 2 结果与分析

### 2.1 CalR 负调控 *vopB2* 的转录

首先利用引物延伸实验研究 *vopB2* 的转录起始位点, 并通过测序比对出其转录起始位点, 如图 1A 所示: *vopB2* 的转录起始位点有两个, 分别为位于起始密码子 ATG 上游 130 bp 的 A 和 ATG 上游 28 bp 的 A, 且在  $\Delta calR$  中产物丰度明显高于 WT, 这表明 CalR 能抑制 *vopB2* 的转录; 图 1B 所示为验证 CalR 调控 *vopB2* 的实时定量 RT-PCR 结果, 可以看出  $\Delta calR$  中 *vopB2* 的 mRNA 表达水平明显升高, 约为 WT 表达量的 6 倍; 图 1C 所示为 LacZ 报告基因融合实验, 该实验更进一步验证了 CalR 对 *vopB2* 的调控关系, 可以看出在  $\Delta calR$  中检测到的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性(Miller units)明显高于 WT, 而且差别具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 这进一步说明 CalR 抑制 *vopB2* 的转录。上述实验综合证明 CalR 负调控 *vopB2* 的转录。

### 2.2 CalR 能够直接结合到 *vopB2* 的启动子区

采用体外的 EMSA 实验进一步研究 CalR 是否对 *vopB2* 启动子区 DNA 具有直接的结合作用, 结

果如图 2 所示: 当 His-CalR 的用量达到 2.78 pmol 时即与 *vopB2* 形成复合物条带, 其泳动速度明显慢于游离的靶基因片段, 并随着 His-CalR 浓度的增加, 游离带越来越弱, 而阻滞带越来越明显, 阴性对照 16S rRNA 基因不具有结合反应。此结果说明 CalR 能直接结合到 *vopB2* 的启动子区。

### 2.3 CalR 不调控 *vtrA* 的转录

Kodama 等<sup>[5]</sup>的研究结果表明 VtrA 蛋白能激活 Vp-PAI 内基因的表达。据此假设 CalR 是否能够通过调节 *vtrA* 的转录来抑制 T3SS2 基因的表达。

首先采用引物延伸实验研究 CalR 对 *vtrA* 基因的调控关系, 结果显示(图 3A) *vtrA* 的转录起始位点为 A, 位于起始密码子 ATG 上游 283 bp, 且 WT 和  $\Delta calR$  中 *vtrA* 基因的 mRNA 表达量没有差异。进一步在体外进行的 LacZ 报告基因融合实验结果显示(图 3B):  $\Delta calR$  中测得的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性与 WT 基本相同, 无显著性差异, 这同样说明 CalR 不调控 *vtrA* 基因的转录, 综合结果表明 CalR 不能通过调控 *vtrA* 的转录来调控 T3SS2 的表达。

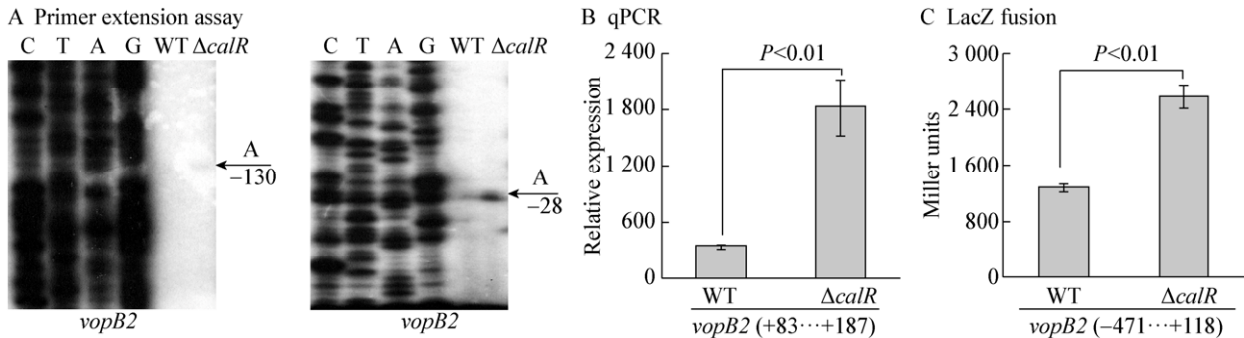


图 1 CalR 对 *vopB2* 的引物延伸、qPCR 和 LacZ 实验结果

#### Figure 1 The results of primer extension assay, qPCR and LacZ fusion of CalR on *vopB2*

注: A: 引物延伸: 其中 C、T、A、G 为测序反应条带; 箭头所指的是 *vopB2* 基因的转录起始位点; 翻译起始密码子“ATG”的“A”标记为“+1”, “-”代表 ATG 上游的碱基数. B: 荧光定量 RT-PCR: 以 16S rRNA 基因的表达量作为内参, 检测 WT 和  $\Delta calR$  中 *vopB2* mRNA 的相对转录水平. C: LacZ 实验: 克隆 *vopB2* 基因启动子区至质粒 pHRP309 中, 检测含有重组质粒的 WT 和  $\Delta calR$  中  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达量差异.

Note: A: Primer extension assay: Lanes C, T, A, and G represent the Sanger sequencing reactions. The transcriptional start sites of *vopB2* were indicated by arrows with nucleotides and positions; The minus and positive numbers indicated the nucleotide positions upstream and downstream of indicated genes. B: qRT-PCR: The relative mRNA level of *vopB2* was compared between  $\Delta calR$  and WT strains based on the standard curve of 16S rRNA gene expression for each RNA preparation. C: LacZ fusion: The *vopB2* promoter-proximal DNA region was cloned into the LacZ transcriptional fusion vector pHRP309 and then transformed into WT or  $\Delta calR$  to determine the  $\beta$ -galactosidase activities (miller units).

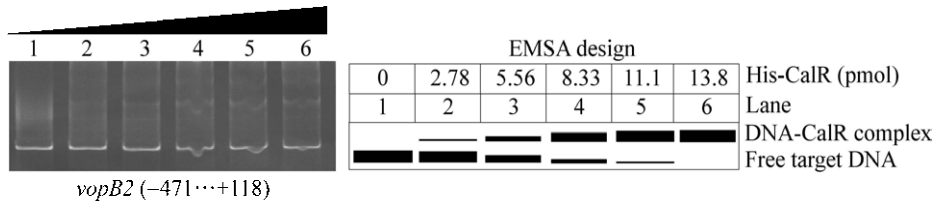


图2 His-CalR 结合 *vopB2* 启动子区的 EMSA 结果

**Figure 2 EMSA of the promoter region of *vopB2* with His-CalR protein**

注: PCR 扩增 *vopB2* 的启动子区片段, 5'末端进行放射性标记, 然后与不同浓度梯度的 His-CalR 蛋白在结合体系中孵育, 最后进行 4% 聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳. 1-6: 逐渐增加 His-CalR 蛋白浓度, 分别为 0、2.78、5.56、8.33、11.1、13.8 pmol.

Note: The DNA sequences in the promoter region of the *vopB2* were amplified by PCR. The radioactively labeled DNA fragments were incubated with increasing amounts of purified His-CalR protein and then subjected to 4% (W/V) polyacrylamide gel electrophoresis; 1-6: Increased amounts of His-CalR protein, 0 pmol; 2.78 pmol; 5.56 pmol; 8.33 pmol; 11.1 pmol; 13.8 pmol.

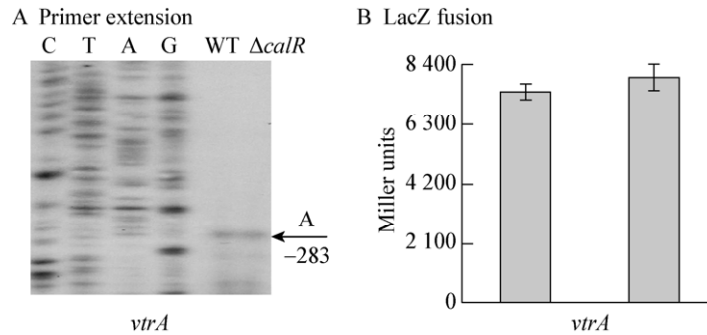


图3 CalR 对 *vtrA* 的引物延伸结果和 LacZ 实验结果

**Figure 3 The results of primer extension assay and LacZ fusion of CalR on *vtrA***

注: A: 引物延伸: C、T、A、G 为测序反应条带, 箭头所指的是 *vtrA* 基因转录起始位点, 翻译起始密码子“ATG”的“A”标记为“+1”, “-”代表 ATG 上游的碱基数. B: LacZ 实验: 扩增 *vtrA* 基因启动子区, 并克隆至质粒 pHRP309 中, 然后检测含有重组质粒的 WT 和  $\Delta calR$  中  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达量差异.

Note: A: Primer extension assay: lanes C, T, A and G represent the Sanger sequencing reactions. The transcriptional start sites of *vtrA* were indicated by arrows with nucleotides and positions; The minus and positive numbers indicated the nucleotide positions upstream and downstream of indicated genes. B: LacZ fusion: The *vtrA* promoter-proximal DNA region was cloned into the lacZ transcriptional fusion vector pHRP309 and then transformed into WT or  $\Delta calR$  to determine the  $\beta$ -galactosidase activities (miller units).

### 3 讨论与结论

本文利用分子生物学实验研究了 CalR 对 *vopB2* 的转录调控机制。引物延伸和 qRT-PCR 实验结果表明 *vopB2* 有两个转录起始位点, 且 CalR 抑制 *vopB2* 的转录活性; LacZ 报告基因融合实验表明 CalR 抑制 *vopB2* 的启动子区活性; 而 EMSA 实验结果进一步表明 CalR 能直接结合到 *vopB2* 的启动区, 综合所有实验说明 CalR 通过直接抑制 *vopB2* 的转录活性, 从而抑制副溶血弧菌的肠毒性作用。Kodama 等<sup>[5]</sup>的研究表明 VtrA 和 VtrB 可以激活毒力岛内基因的转录, 同时 VtrA 又能激活

*vtrB* 的转录。据此我们提出疑问: CalR 是否可以通过抑制 *vtrA* 的转录表达来间接抑制 *vopB2* 的转录, 然而引物延伸和 LacZ 报告基因融合实验均表明 CalR 不调控 *vtrA* 的转录表达, 说明 CalR 不能通过影响 *vtrA* 的转录来调控 T3SS2 的转录活性。

副溶血性弧菌有两套 T3SS, 其中 T3SS1 位于大染色体上, 其(G+C)mol% 含量与基因组一致, 来自于垂直遗传且存在于所有的副溶血性弧菌中, 与细菌对宿主的细胞毒性相关。但是 T3SS1 引起细胞毒性的具体机制还有争议, Ono 等报道 T3SS1 是通过加速细胞凋亡来引起细胞毒性的<sup>[13]</sup>;

Burdette 等报道 T3SS1 是通过一种特殊形式的自噬现象引起细胞毒性<sup>[14]</sup>;但是 Zhou 等认为 T3SS1 是通过细胞肿胀而非自噬或者凋亡引起细胞毒性的发生<sup>[15]</sup>。T3SS2 位于小染色体的毒力岛上 (Vp-PAI), 其基因簇的(G+C)mol%含量为 39.8%, 明显低于基因组的平均(G+C)mol%含量(45.5%), 而且只存在于临床致病菌株中, 提示其最有可能是通过水平转移获得的, 与细菌对宿主的肠毒性相关<sup>[3]</sup>。副溶血性弧菌感染所引起的主要症状为恶心、呕吐、腹泻等胃肠炎症状<sup>[16]</sup>。所以在副溶血性弧菌的 T3SS 中, T3SS2 为主要的致病因子, 研究 T3SS2 的分子调控机制至关重要。

在副溶血弧菌中, 对 CalR 功能的研究还处于起始阶段。课题组前期研究表明 CalR 作为一个全局调控子不仅介导了 T3SS1 和 T6SS2 相关基因的转录, 还参与了 TDH 基因的转录<sup>[8,10-11]</sup>, 所以本文主要研究了 CalR 对 T3SS2 基因 *vopB2* 的具体调控机制, 丰富了副溶血性弧菌的转录调控网络, 更进一步揭示了副溶血性弧菌的分子致病机制。

## REFERENCES

- [1] Raszl SM, Froelich BA, Vieira CRW, et al. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(5): 1201-1222
- [2] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. *Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749
- [3] Park KS, Ono T, Rokuda M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659-6665
- [4] Kodama T, Hiyoshi H, Gotoh K, et al. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(9): 4282-4289
- [5] Kodama T, Gotoh K, Hiyoshi H, et al. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8678
- [6] Okada R, Matsuda S, Iida T. *Vibrio parahaemolyticus* VtrA is a membrane-bound regulator and is activated via oligomerization[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187846
- [7] Cai Q, Zhang YQ. Structure, function and regulation of the thermostable direct hemolysin (TDH) in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 123: 242-245
- [8] Osei-Adjei G, Gao H, Zhang Y, et al. Regulatory actions of ToxR and CalR on their own genes and type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65809-65822
- [9] Zhang YQ, Hu LF, Osei-Adjei G, et al. Autoregulation of ToxR and its regulatory actions on major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 291
- [10] Zhang LY, Osei-Adjei G, Zhang Y, et al. 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
- [11] Zhang YQ, Zhang Y, Gao H, et al. *Vibrio parahaemolyticus* CalR down regulates the thermostable direct hemolysin (TDH) gene transcription and thereby inhibits hemolytic activity[J]. *Gene*, 2017, 613: 39-44
- [12] Hou SN, Meng YY, Zhu WJ, et al. Construction of the *calR* null mutant and the complemented mutant strains in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Military Medical Sciences*, 2016, 40(5): 374-378 (in Chinese)  
侯书宁, 孟彦言, 朱文君, 等. 副溶血弧菌 *calR* 的基因敲除株与回补株构建[J]. *军事医学*, 2016, 40(5): 374-378
- [13] Ono T, Park KS, Ueta M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(2): 1032-1042
- [14] Burdette DL, Yarbrough ML, Orth K. Not without cause: *Vibrio parahaemolyticus* induces acute autophagy and cell death[J]. *Autophagy*, 2009, 5(1): 100-102
- [15] Zhou XH, Konkel ME, Call DR. Type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus* induces oncosis in both epithelial and monocytic cell lines[J]. *Microbiology*, 2009, 155: 837-851
- [16] Wang JJ, Sun WS, Jin MT, et al. Fate of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp after acidic electrolyzed water treatment[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 179: 50-56