

vcrV 基因对副溶血弧菌生物学特性及 III 型分泌系统 1 效应蛋白易位的影响

李婉君¹, 薛婷月¹, 廉乐乐¹, 任建鸾¹, 汤芳¹, 薛峰^{*1}, 戴建君^{1,2}

1 南京农业大学 教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 江苏 南京 210095

2 中国药科大学, 江苏 南京 211199

李婉君, 薛婷月, 廉乐乐, 任建鸾, 汤芳, 薛峰, 戴建君. *vcrV* 基因对副溶血弧菌生物学特性及 III 型分泌系统 1 效应蛋白易位的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1608-1618

Li Wanjun, Xue Tingyue, Lian Lele, Ren Jianluan, Tang Fang, Xue Feng, Dai Jianjun. *vcrV* gene affects translocation of T3SS1 effector protein and biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1608-1618

摘要: 【背景】副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)具有两套 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)。T3SS1 通过向宿主细胞分泌效应蛋白发挥致病作用, *vcrV* 基因位于 T3SS1 编码基因簇。【目的】以 *vcrV* 基因为研究对象, 探索其对副溶血弧菌生物学特性及 T3SS1 致病机制的影响。【方法】以副溶血弧菌 POR-1 株为参考菌株, 利用同源重组技术构建 *vcrV* 基因缺失株 $\Delta vcrV$ 和回补株 $C\Delta vcrV$, 比较各菌株在生长性能、生物被膜形成能力、细胞黏附及细胞毒性等生物学特性的差异, 应用 Western Blot 检测 T3SS1 诱导条件下 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 等菌株效应蛋白分泌量, 进一步利用具有过表达载体 pMMB207-*vp1683*-CyaA 的各菌株侵染 HeLa 细胞, 通过 Western Blot 检测细胞内效应蛋白 VopR (Vp1683)的易位量。【结果】与基础菌株 POR-1 相比, 缺失 *vcrV* 基因不影响副溶血弧菌的生长性能、生物被膜形成能力及细胞黏附等生物学特性, 显著降低了对 HeLa 细胞的毒性作用, 具有过表达载体的 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 等菌株效应蛋白 VopR 的分泌差异不显著, $\Delta vcrV$ 菌株侵染 HeLa 细胞的过程中, VopR 的易位量显著下降。【结论】*vcrV* 基因参与 T3SS1 介导的细胞毒性过程, 对于副溶血弧菌 T3SS1 效应蛋白易位是必需的, 具有过表达载体的 $\Delta vcrV$ 仍能分泌效应蛋白 VopR。

关键词: 副溶血弧菌; III 型分泌系统 1; *vcrV* 基因; 生物学特性

基金项目: 国家自然科学基金(31871893)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31871893)

*Corresponding author: E-mail: xuefeng@njau.edu.cn

Received: 2021-12-03; Accepted: 2022-01-25; Published online: 2022-02-23

vcrV* gene affects translocation of T3SS1 effector protein and biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus

LI Wanjun¹, XUE Tingyue¹, LIAN Lele¹, REN Jianluan¹, TANG Fang¹,
XUE Feng^{*1}, DAI Jianjun^{1,2}

1 Joint International Research Laboratory of Animal Health and Food Safety, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 China Pharmaceutical University, Nanjing 211199, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *vcrV* is an important gene located in the T3SS1 gene cluster, which is one of the two sets of type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* and plays a pathogenic role by secreting effector proteins to host cells. **[Objective]** In this study, the effect of *vcrV* was explored on the T3SS1 pathogenesis and the biological characteristics of *V. parahaemolyticus*. **[Methods]** The *vcrV*-deleted strain $\Delta vcrV$ and the complemented strain $C\Delta vcrV$ were constructed by homologous recombination technology, using *V. parahaemolyticus* POR-1 as the reference strain. The growth performance, biofilm formation ability, cell adhesion, and cytotoxicity were compared among different strains. Western Blot was employed to detect the effector proteins secreted by POR-1, $\Delta vcrV$, and $C\Delta vcrV$ under T3SS1 induction. The translocation of the effector protein VopR (Vp1683) was detected by Western Blot after each strain with the pMMB207-*vp1683*-CyaA overexpression vector was used to infect HeLa cells. **[Results]** The deletion of *vcrV* did not affect the growth performance, biofilm formation ability, or cell adhesion while significantly reduced the strain toxicity to HeLa cells. The effector protein VopR secretion had no significant difference among POR-1, $\Delta vcrV$, and $C\Delta vcrV$ with the overexpression vector. The translocation of VopR decreased significantly when $\Delta vcrV$ infected HeLa cells. **[Conclusion]** The T3SS1-mediated cytotoxicity involving with *vcrV* is critical for the translocation of T3SS1 effector protein in *V. parahaemolyticus*, while the effector protein VopR could still be secreted by $\Delta vcrV$ with overexpression vector.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; type III secretion system 1; *vcrV* gene; biological characteristics

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐革兰氏阴性菌,广泛分布于温暖的海洋和河口环境中^[1],是世界范围内重要的食源性致病菌。1950年, Fujino 博士在日本首次发现该菌引起人类感染,并于1960年正式命名为副溶血弧菌^[2]。人类常通过食用污染的海产品而感染该菌,出现水样腹泻、腹部绞痛和呕吐等典型胃肠炎症状,严重者可引发较高致死率的败血症^[3]。研究表明,获得 pVA 质粒的致病性副溶血弧菌可引起对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND),严重危害全球水产

养殖业^[4]。

副溶血弧菌致病株的基因组序列显示,存在耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)和两套 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)等重要毒力因子^[5]。以耶尔森氏菌(*Yersinia*)为代表的革兰氏阴性菌通过 III 型分泌系统将效应蛋白注入宿主细胞,实现逃避真核宿主免疫反应的目的^[6]。据报道, T3SS1 通过诱导自噬、细胞圆化和细胞裂解等多方面参与细胞毒性^[7],而 T3SS2 在家兔回肠循环模型中参与肠毒性^[8]。T3SS 装置是一个高度保守的多蛋白复

合体,主要由基体、针状结构和针尖复合体组成,与鞭毛组分之间存在序列相似性^[9-10]。生物信息预测发现,副溶血弧菌 *vcrV* 基因编码的蛋白 VcrV 与耶尔森氏菌 LcrV、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PcrV 和气单胞菌 (*Aeromonas*) AcrV 等具有同源性^[11-13]。研究表明,耶尔森氏菌 LcrV 与毒力相关,可作为抵抗鼠疫保护性抗原^[14]。Mueller 等^[15]利用扫描透射电子显微镜证明 LcrV 在针状复合体的尖端形成五聚体的帽子结构。LcrV 具有正向调节耶尔森氏菌 T3SS 效应蛋白 (*Yersinia* outer proteins, Yops) 分泌的作用,其伴侣蛋白 LcrG 是负向调节因子,可直接或者间接阻断 Yops 分泌,二者相互作用共同调控 Yops 分泌^[16]。转运蛋白 YopB 与 YopD 在宿主细胞膜上形成孔,与 LcrV 共同完成效应蛋白的易位^[17]。目前 VcrV 在副溶血弧菌 III 型分泌系统功能方面的作用有待进一步研究。

本研究选取 *vcrV* 基因进行深入探索,以缺失株 POR-1 作为基础菌株,利用同源重组技术构建 *vcrV* 基因缺失株和回补株,探究其在副溶血弧菌生长性能、生物被膜形成能力、细胞黏附和细胞毒性等生物学特性的作用,同时验证其对效应蛋白分泌与易位的影响,以期对完善副溶血弧菌 T3SS1 胞外针状复合体的组装机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株和质粒

副溶血弧菌参考菌株 RIMD2210633、tdhA/S 缺陷菌株 POR-1、*Escherichia coli* SM10 λ pir 和质粒 pMMB207、pYAK1 及 HeLa 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

PrimeSTAR HS (Premix)、TB Green® Premix Ex Taq、限制性内切酶, TaKaRa 公司; ClonExpress® II One Step Cloning Kit、HiScript®

II Q RT SuperMix for qPCR, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细菌质粒提取试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒, Omega 公司; DMEM 培养基和胎牛血清, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; LDH 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 细胞全蛋白提取试剂盒, 江苏凯基生物技术有限公司; CyaA 抗体, 圣克鲁斯生物技术有限公司; 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS), 海博生物技术有限公司; ECL 化学发光液, 天能公司。荧光定量 PCR 仪和细胞培养箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 全自动化学发光图像分析系统, 天能公司; 多功能酶标仪和紫外分光光度计, 帝肯(上海)贸易有限公司。

1.3 *vcrV* 基因缺失株和回补株的构建

参照 Park 等^[8]的方法, 利用同源重组技术在 tdhA/S 缺陷菌株 POR-1 基础上构建缺失株 Δ vcrV。缺失 *vcrV* 基因与耶尔森氏菌 *lcrV* 同源功能域 (1 174–1 818 bp), 以参考菌株 RIMD2210633 基因组为模板, 用 *vcrV*-1/*vcrV*-2 和 *vcrV*-3/*vcrV*-4 两对引物分别扩增出 *vcrV* 上、下游同源臂, 并利用 *vcrV*-1/*vcrV*-4 引物进行融合 PCR。经 *Bam*H I 酶切, 同源重组酶连接, 获得 pYAK1- Δ vcrV 自杀性质粒。转化至大肠杆菌 SM10 感受态细胞, 以大肠杆菌 SM10 为供体菌、以 POR-1 为受体菌进行接合转移。利用氯霉素抗性 TCBS 平板筛选阳性克隆, 20%蔗糖 LB 传代, 通过 *vcrV*-1/*vcrV*-4、*vcrV*-NF/*vcrV*-NR 和 *sacB*-F/*sacB*-R 引物鉴定缺失成功的菌株, 将该菌株命名为 Δ vcrV。

构建回补株的具体方法与缺失株相同。将回补区域内的 ATT 同义突变为 ATA, 以区分回补株与野生株, 两者均编码异亮氨酸, 回补株命名为 C Δ vcrV, 构建缺失株和回补株所用的引物具体信息见表 1。

表 1 *vcrV* 缺失株与回补株的引物Table 1 The primers of *vcrV*-deleted strain and the complemented strain

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
vcrV-1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGTTTTTAAACAAATTGGTA
vcrV-2	TTAGTCATGGCCTAAGTTCTTGCGTAATGT
vcrV-3	AGAACTTAGGCCATGACTAAAACAAACGCG
vcrV-4	CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCCTTTTGTTCACCGCT
C-vcrV-1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGTTTTTAAACAAATTGGTA
C-vcrV-2	CATTGTCGGTGAGGTATTTATACTCAGGCGAG
C-vcrV-3	TAAATACCTCACCGACAATGGCATAACTACAC
C-vcrV-4	CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCCTTTTGTTCACCGCT
vcrV-NF	TCAACATCACCGAGCAAGAG
vcrV-NR	GGCTCGTAGGATTTCTTGTA

1.4 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 鉴定

挑取 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 单菌落于 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 以 1:100 (体积比) 接种于新鲜的 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养至 OD_{600} 为 0.6。使用细菌总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录为 cDNA。以 DnaK-RT 为内参引物, 利用 *vcrV*-RT 引物按照 TB Green® Premix Ex Taq 试剂盒说明书在 StepOnePlus Real-Time PCR System 进行 PCR 反应, 每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 *vcrV* 基因相对表达率^[18], 所用引物具体信息见表 2。

1.5 生长曲线的测定

挑取 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 单菌落于 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 以 1:100 (体积比) 接种于 50 mL LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养 13 h, 每隔 1 h 从同一锥形瓶取 3 次样, 测量每株菌的 OD_{600} 。

1.6 生物被膜形成能力的测定

将 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 接种于 LB 培养

基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6, 按照 1:100 (体积比) 接种于新鲜的 2 mL LB 液体培养基, 取 200 μ L 稀释好的菌液于无菌 96 孔板中, 以 LB 液体培养基作为空白对照组, 每组做 6 个重复, 于 37 °C 温箱静置培养 48 h。培养结束后除去孔内液体, 用无菌 1×PBS 清洗孔 3 次, 通风橱干燥。每孔用 200 μ L 无水甲醇固定 15 min, 风干。孔内生物被膜用 1% 结晶紫溶液染色 5 min, 除去染液, 用 200 μ L ddH₂O 清洗孔 3 次, 风干后用 95% 乙醇溶液溶解孔内生物被膜, 作用 30 min, 用酶标仪测量波长 595 nm 处的吸光度。

1.7 细胞毒性试验

根据碧云天乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明书, 设置背景空白对照组、样品对照组、最大酶活性对照组和样品组。37 °C、180 r/min 条件下, 将 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 培养至 OD_{600} 为 0.6, 无菌 1×PBS 洗涤 2 次, 取菌悬液感染 96 孔板培养的细胞, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10:1, 每株菌重复 6 个孔。37 °C 孵育 1 h 后, 将适量 LDH 释放试剂与最大酶活性对照组细胞样品混匀, 在细胞培养箱继续反应 1 h。各样品孔分别加入 60 μ L LDH 检测工作液, 室温避光孵育 30 min, 用酶标仪测定 OD_{490} 数值, 根据细胞毒性或死亡率 = (样品吸光度 - 样品对照孔吸光度) / (细胞最大酶活性的吸光度 - 样

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Sequence of the primers used for RT-qPCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
DnaK-RT-F	ACTGCTTCGTCAGGGTTC
DnaK-RT-R	GTCAGACTCGTA TGCCAATG
<i>vcrV</i> -RT-F	TTAGTGCGAGCGACTTCAAC
<i>vcrV</i> -RT-R	GTCAGCTACCGTTACACCT

品对照孔吸光度) $\times 100\%$ 公式计算 LDH 酶活性。

1.8 细胞黏附试验

HeLa 细胞培养于 10%胎牛血清 DMEM、37 °C、5% CO₂ 条件下, 试验前一天将 HeLa 细胞以 2×10^4 密度接种于 24 孔板。用新鲜 LB 培养基重悬 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$, 37 °C、180 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.6, 使用无菌 1 \times PBS 分别洗涤细菌和细胞 2 次, 取等量的菌悬液感染 HeLa 细胞, MOI 为 10:1, 每株菌重复 2 个孔。在细胞培养箱孵育 2 h 后, 用无菌 1 \times PBS 洗涤 1 次, 每孔加入 1 mL 预冷的 0.1% TritonX-100, 37 °C 孵育 10 min。每孔取 100 μ L 样品用无菌 1 \times PBS 进行 10 倍倍比稀释, 每个稀释度取样 3 次涂布于 LB 琼脂平板, 37 °C 培养过夜后记录菌落数, 运用公式黏附率=(黏附细菌数/细菌总数) $\times 100\%$ 计算各菌株相对黏附率。

1.9 分泌试验

通过接合转移的方式, 使 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 获得大肠杆菌 SM10 具有的 pMMB207-*vp1683*-CyaA 载体, VopR (Vp1683) 是副溶血弧菌 T3SS1 已鉴定的效应蛋白。将具有 *vp1683* 过表达载体的 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 接种于 5 mL 含 3% NaCl 的 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 转接至 10 mL LB 培养基, 使 OD_{600} 为 0.3, 继续摇床培养 3 h。5 000 r/min 离心 10 min 分别收集上清和菌体沉淀, 上清用 0.22 μ m 滤器除菌, 利用 30 kDa 超滤管浓缩后, 将 200 μ L 预冷的 1 \times PBS 反复冲洗超滤管底部获得上清样品。菌体用 2 mL 预冷的 1 \times PBS 洗涤 3 次, 取 200 μ L 重悬后的菌悬液作为样品。将上清样品、菌体样品与 5 \times SDS Loading Buffer 混合, 煮沸 10 min, 进行蛋白免疫印迹实验(Western Blot), 一抗用 CyaA 抗体孵育, 采用 ECL 化学发光液曝光显色, 分泌试验重复 3 次。

1.10 易位试验

将 HeLa 细胞以 2×10^5 密度接种于 6 孔板, 在 10%胎牛血清 DMEM、37 °C、5% CO₂ 条件下培养至 80%–90%。使含有 *vp1683* 过表达载体的 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 于 37 °C、180 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.6, 除去细菌和细胞的培养基, 用无菌 1 \times PBS 分别洗涤 2 次, 取菌悬液感染 HeLa 细胞 2 h, MOI 为 10:1, 设置未感染细胞组。感染结束后, 采用细胞全蛋白提取试剂盒提取 HeLa 细胞全蛋白, 添加适量 5 \times SDS Loading Buffer 至样品, 煮沸 10 min, 进行蛋白免疫印迹实验(Western Blot), 一抗和二抗分别用 CyaA 抗体和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体孵育, 用 ECL 化学发光液曝光拍照, 易位试验重复 3 次。

1.11 数据分析

所有试验均进行了 3 次, 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图, 数据用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD)表示, 利用 *t* 检验比较了 POR-1 与 $\Delta vcrV$ 在生物被膜、细胞黏附、细胞毒性、荧光定量 PCR 鉴定等实验数据的差异。蛋白免疫印迹实验结果通过 Image J 软件进行灰度分析。

2 结果与分析

2.1 *vcrV* 基因缺失株及回补株的鉴定结果

如图 1A 所示, 用 *vcrV*-1/*vcrV*-4 引物对 $\Delta vcrV$ 进行 PCR 鉴定, 以 RIMD2210633 基因组 DNA 为阳性对照, $\Delta vcrV$ 扩增出 945 bp 大小的片段(泳道 1), RIMD2210633 基因组 DNA 扩增出 1 604 bp 大小的片段(泳道 2)。用内部引物对 *vcrV*-NF/*vcrV*-NR 和 筛选标记引物对 *sacB*-F/*sacB*-R 进行鉴定, $\Delta vcrV$ 无扩增条带(泳道 4 和泳道 7), 阳性对照均扩增出正确大小片段(泳道 5 和泳道 8), 证明 $\Delta vcrV$ 构建成功。

如图 1B 所示,用外部引物 *vcrV*-1/*vcrV*-4 和内部引物 *vcrV*-NF/*vcrV*-NR 对 $C\Delta vcrV$ 进行 PCR 检测,分别扩增出 1 604 bp 和 659 bp 大小的片段(泳道 1 和泳道 4),与 RIMD2210633 标准菌株相同(泳道 2 和泳道 5),用筛选标记引物 *sacB*-F/*sacB*-R 对 $C\Delta vcrV$ 进行鉴定,无扩增条带(泳道 7),证明 $C\Delta vcrV$ 构建成功。

2.2 RT-qPCR 检测 *vcrV* 基因转录水平的结果

采用 *vcrV*-RT 引物对 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 进行荧光定量 PCR 检测,结果显示 POR-1、 $C\Delta vcrV$ 目的基因转录正常, $\Delta vcrV$ 无 *vcrV* 基因转录(图 2),表明 *vcrV* 基因缺失株及回补株构建成功。

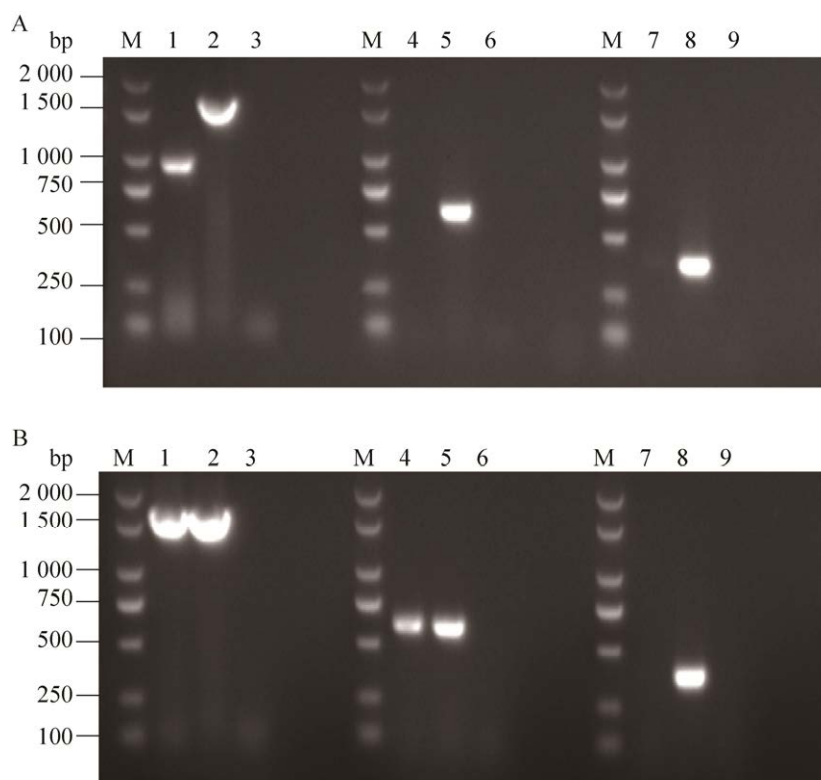


图 1 *vcrV* 基因缺失株及回补株的 PCR 鉴定电泳图 M: DL2000 DNA Marker。A: *vcrV* 基因缺失株的 PCR 鉴定;1-3:引物 *vcrV*-1/*vcrV*-4 扩增 $\Delta vcrV$ 、RIMD2210633 和阴性对照;4-6:引物 *vcrV*-NF/*vcrV*-NR 扩增 $\Delta vcrV$ 、RIMD2210633 和阴性对照;7-9:引物 *sacB*-F/*sacB*-R 扩增 $\Delta vcrV$ 、pYAK1 和阴性对照。B: *vcrV* 基因回补株的 PCR 鉴定;1-3:引物 *vcrV*-1/*vcrV*-4 扩增 $C\Delta vcrV$ 、RIMD2210633 和阴性对照;4-6:引物 *vcrV*-NF/*vcrV*-NR 扩增 $C\Delta vcrV$ 、RIMD2210633 和阴性对照;7-9:引物 *sacB*-F/*sacB*-R 扩增 $C\Delta vcrV$ 、pYAK1 和阴性对照

Figure 1 Electrophoretic map of *vcrV* gene deletion and complement strains identified by PCR. M: DL2000 DNA Marker. A: PCR identification of the *vcrV* gene deletion strain; 1-3: Primer pair *vcrV*-1/*vcrV*-4 was used to amplify $\Delta vcrV$, RIMD2210633 and negative control; 4-6: Primers *vcrV*-NF/*vcrV*-NR were used to amplify $\Delta vcrV$, RIMD2210633 and negative control; 7-9: Primers *sacB*-F/*sacB*-R were used to amplify $\Delta vcrV$, pYAK1 and negative control. B: PCR identification of the *vcrV* gene complement strain; 1-3: Primer pair *vcrV*-1/*vcrV*-4 was used to amplify $C\Delta vcrV$, RIMD2210633 and negative control; 4-6: Primers *vcrV*-NF/*vcrV*-NR were used to amplify $C\Delta vcrV$, RIMD2210633 and negative control; 7-9: Primers *sacB*-F/*sacB*-R were used to amplify $C\Delta vcrV$, pYAK1 and negative control.

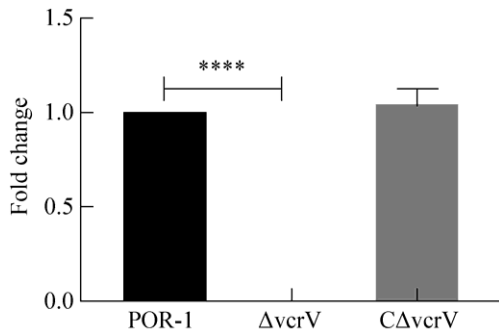


图2 各菌株 *vcrV* 基因转录水平检测

Figure 2 Detection of *vcrV* gene transcription level in each strain. ****: $P < 0.0001$.

2.3 生长曲线测定结果

POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 C $\Delta vcrV$ 等菌株的生长曲线结果比较显示(图3), *vcrV* 基因的缺失不影响副溶血弧菌的生长性能。

2.4 *vcrV* 基因缺失对生物被膜形成能力的影响结果

采用结晶紫染色法定量检测 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 C $\Delta vcrV$ 等菌株的生物被膜形成能力, 结果如图4所示, $\Delta vcrV$ 的生物被膜形成能力与基础菌株 POR-1 相比无显著差异($P > 0.05$), 表明 *vcrV* 基因不参与副溶血弧菌生物被膜形成的调控。

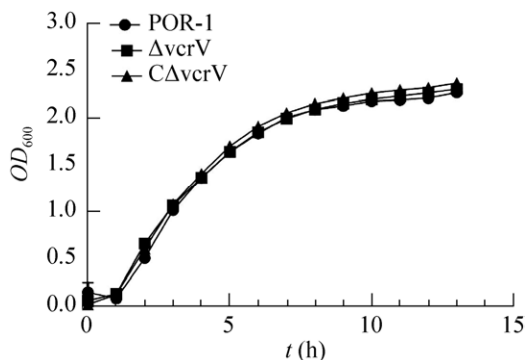


图3 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 C $\Delta vcrV$ 菌株的生长曲线差异

Figure 3 The difference of growth curves of POR-1, $\Delta vcrV$ and C $\Delta vcrV$ strains.

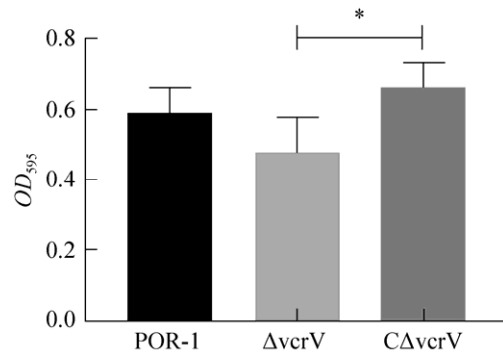


图4 POR-1、 $\Delta vcrV$ 及 C $\Delta vcrV$ 菌株的生物被膜形成能力差异

Figure 4 The difference of biofilm formation ability between POR-1, $\Delta vcrV$ and C $\Delta vcrV$ strains. *: $P < 0.05$.

2.5 *vcrV* 基因缺失对细胞毒性的影响结果

POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 C $\Delta vcrV$ 等菌株对 HeLa 细胞的细胞毒性结果如图5所示, $\Delta vcrV$ 与基础菌株 POR-1 相比, 细胞毒性极显著降低($P < 0.0001$), 回补株的细胞毒性得以恢复, 表明 *vcrV* 基因影响副溶血弧菌 T3SS1 介导的细胞毒性。

2.6 *vcrV* 基因缺失对细胞黏附的影响结果

POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 C $\Delta vcrV$ 等菌株对 HeLa 细胞的黏附能力如图6所示, *vcrV* 基因缺失株与基础菌株 POR-1 相比, 对 HeLa 细胞的黏附作用差异不明显, 表明 *vcrV* 基因不影响副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附能力。

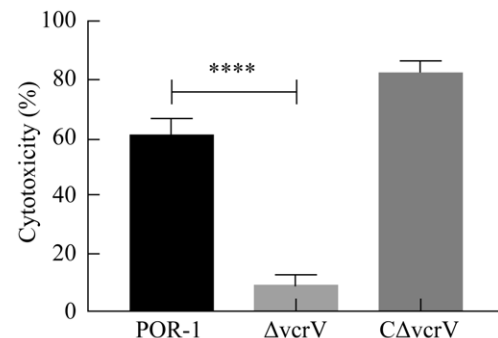


图5 POR-1、 $\Delta vcrV$ 及 C $\Delta vcrV$ 菌株对 HeLa 细胞的毒性影响

Figure 5 Cytotoxicity of POR-1, $\Delta vcrV$ and C $\Delta vcrV$ strains on HeLa cells. ****: $P < 0.0001$.

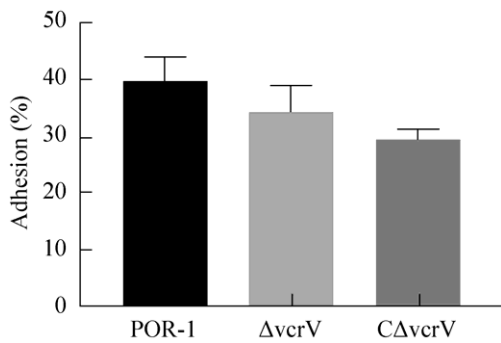


图 6 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 菌株对 HeLa 细胞的黏附能力

Figure 6 Adhesion ability of POR-1, $\Delta vcrV$ and $C\Delta vcrV$ strains to HeLa cells.

2.7 *vcrV* 基因缺失对效应蛋白分泌的影响结果

POR-1-*vp1683-CyaA*、 $\Delta vcrV$ -*vp1683-CyaA* 和 $C\Delta vcrV$ -*vp1683-CyaA* 等菌株上清和菌体沉淀所含 Vp1683-CyaA 的量如图 7A 所示, 3 株菌分

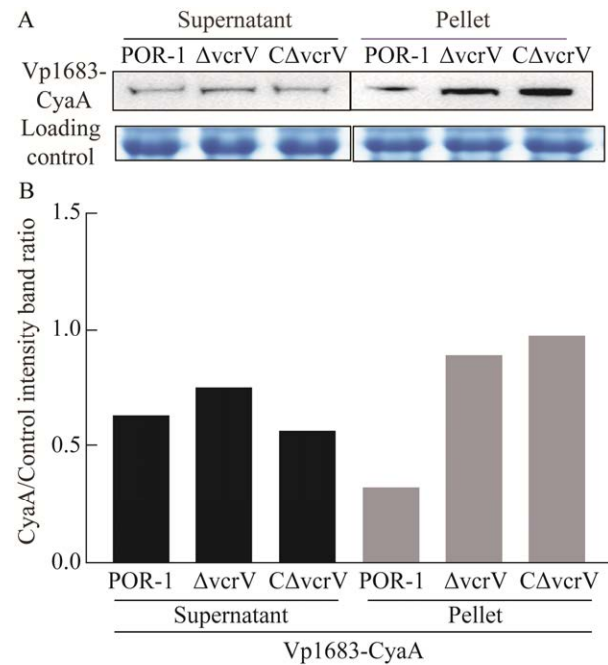


图 7 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 菌株分泌 Vp1683-CyaA 的量 A: Western Blot 检测各菌株 Vp1683-CyaA 分泌量; B: 灰度分析结果

Figure 7 The amount of Vp1683-CyaA secreted by POR-1, $\Delta vcrV$ and $C\Delta vcrV$ strains. A: Western Blot was used to detect the secretion of Vp1683-CyaA of each strain. B: Gray analysis results.

泌 Vp1683-CyaA 的量相近, 灰度分析结果显示差异不显著, 表明 *vcrV* 基因缺失株在含有过表达载体的条件下可以分泌 T3SS1 效应蛋白 VopR (Vp1683)。

2.8 *vcrV* 基因缺失对效应蛋白易位的影响结果

POR-1-*vp1683-CyaA*、 $\Delta vcrV$ -*vp1683-CyaA* 和 $C\Delta vcrV$ -*vp1683-CyaA* 等菌株感染 HeLa 细胞, 检测细胞内 Vp1683-CyaA 的易位量如图 8A 所示, 与基础菌株 POR-1 相比, *vcrV* 基因缺失株感染 HeLa 细胞后细胞内 Vp1683-CyaA 的易位量

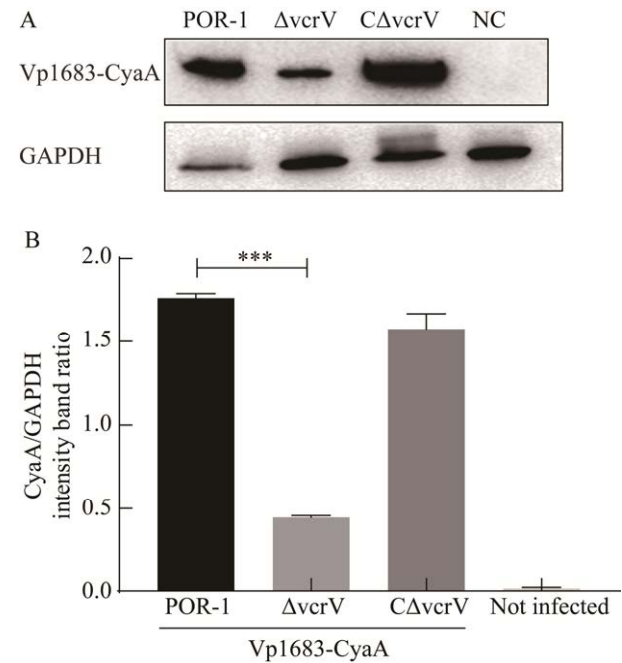


图 8 POR-1、 $\Delta vcrV$ 和 $C\Delta vcrV$ 菌株感染 HeLa 细胞后 Vp1683-CyaA 易位量的比较 A: Western Blot 检测 HeLa 细胞内 Vp1683-CyaA 的易位量, NC 作为未感染细胞组; B: 灰度分析结果。***: $P < 0.001$

Figure 8 Comparison of Vp1683-CyaA translocations of POR-1, $\Delta vcrV$ and $C\Delta vcrV$ strains infected HeLa cells. A: Western Blot was used to detect the translocation of Vp1683-CyaA in HeLa cells, and NC was used as the uninfected cell group. B: Gray analysis results. ***: $P < 0.001$.

显著下降,回补株的该性状得以恢复,灰度分析结果显示存在极显著差异($P<0.001$),表明 *vcrV* 基因的缺失显著减少副溶血弧菌 T3SS1 效应蛋白 VopR (Vp1683)的易位量。

3 讨论与结论

副溶血弧菌 T3SS1 介导的细胞毒性与装置的组装和效应蛋白易位有关,T3SS1 装置的组装是一个错综复杂和高度协调的过程,需要一系列结构蛋白相互作用,形成了包括基体、针状结构和针尖复合体在内的主要部分^[19]。我们通过阅读文献发现,*vcrV* 基因编码的蛋白 VcrV (420AA-607AA)与铜绿假单胞菌 PcrV (95AA-294AA)序列相似性为 55%^[20],表明 VcrV 蛋白可能是副溶血弧菌 T3SS1 针尖蛋白。本研究以 *vcrV* 基因为研究对象构建了缺失株与回补株,并探索其在副溶血弧菌生物学功能和 T3SS1 效应蛋白分泌中的作用。

副溶血弧菌黏附在海鲜、水产养殖设备、食品加工设备及其他非生物表面可形成生物膜^[21]。生物膜是一种由多糖、蛋白质、核酸和脂类等胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)形成的复杂微生物聚集体,可以保护菌体避免恶劣环境、抗生素、宿主免疫防御的侵害^[22]。OpaR 是副溶血性弧菌密度感应系统(quorum sensing, QS)调控因子,有研究报道 OpaR 正调控荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)生成和生物膜形成,负调控 T3SS1 基因的表达和群集运动,表明 T3SS1 基因的表达与生物膜形成的调控是相反的^[23-26]。生物被膜试验结果显示,*vcrV* 基因缺失株的生物被膜形成能力未显著下降,提示 *vcrV* 基因的表达不影响副溶血弧菌生物被膜形成过程。黏附是病原菌对宿主细胞有效感染的第一步,参与细胞黏附的毒力因子包括甘露糖敏感血凝素(mannose-sensitive hemagglutinin,

MSHA)、多价黏附分子 7 (multivalent adhesion molecule 7, MAM7)、VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)、荚膜多糖和烯醇化酶^[27-31]等。有文献报道副溶血弧菌 T3SS1 负调节因子 ExsE 参与调节细胞黏附^[32],然而 T3SS1 是否参与调控细胞黏附仍有待进一步的研究证明。细胞黏附试验结果表明,*vcrV* 基因不参与副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附过程。

副溶血弧菌主要毒力因子耐热直接溶血素、T3SS1 和 T3SS2 均参与细胞毒性,T3SS2 只对 Caco-2 等部分细胞系产生毒性作用^[33],T3SS1 通过向宿主细胞注射效应蛋白产生细胞毒性,目前已发现的有 VopS、VopR、VPA0450 和 VopQ^[34-37]等。据报道耶尔森氏菌 *lcrV* 基因缺失株不能将 YopE、YopH、YopM 和 YopN 等效应蛋白注入宿主细胞^[38],证明 T3SS1 结构的完整性是效应蛋白向宿主细胞易位的首要条件。细胞毒性试验结果显示,*vcrV* 基因缺失株对 HeLa 细胞毒性作用显著降低,表明不能正常表达针尖蛋白 VcrV 将破坏副溶血弧菌 T3SS1 装置的组装,从而影响 T3SS1 介导的细胞毒性作用。Zhou 等^[39]报道了在 *vp1659* (*vcrV*)基因缺失的情况下 T3SS1 效应蛋白 VopS 仍能易位到宿主细胞,对于其是否影响效应蛋白的分泌和易位有待深入探索。本研究采用 CyaA 报告系统^[40]检测效应蛋白 VopR (Vp1683)是否分泌与易位,将 pMMB207-*vp1683*-CyaA 过表达载体结合进 POR-1、 Δ *vcrV* 和 C Δ *vcrV* 等菌株,诱导 T3SS1 分泌效应蛋白,实验结果发现基础菌株、缺失株和回补株之间的 VopR 分泌差异不显著,提示针尖蛋白 VcrV 可能不是效应蛋白从菌内分泌的必要结构蛋白,利用具有 *vp1683* 过表达载体的各菌株侵染 HeLa 细胞,试验结果显示 *vcrV* 基因的缺失极显著影响了副溶血弧菌侵染宿主细胞过程中 VopR 的易位量。

试验结果表明, *vcrV* 基因对副溶血弧菌生长性能、生物被膜形成能力、黏附细胞能力等生物学特性无显著影响, 虽然对 T3SS1 效应蛋白 VopR 分泌影响不显著, 但参与 T3SS1 介导的细胞毒性, 是副溶血弧菌 T3SS1 向 HeLa 细胞注射效应蛋白 VopR 的必要条件。本研究不仅为揭示 T3SS1 胞外针状结构蛋白分泌与调控机制提供了理论基础, 也可为研发针尖蛋白 VcrV 相关疫苗提供借鉴。

REFERENCES

- [1] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12-13): 992-1001
- [2] Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections[J]. *Biocontrol Science*, 2011, 16(4): 129-137
- [3] Barker WH Jr, Gangarosa EJ. Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Annual Review of Medicine*, 1974, 25: 75-81
- [4] Lai HC, Ng TH, Ando M, Lee CT, Chen IT, Chuang JC, Mavichak R, Chang SH, Yeh MD, Chiang YA, et al. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006-1014
- [5] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749
- [6] Büttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(2): 262-310
- [7] Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, Gilpin CJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis[J]. *PNAS*, 2008, 105(34): 12497-12502
- [8] Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659-6665
- [9] Cornelis GR. The type III secretion injectisome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(11): 811-825
- [10] Blocker A, Komoriya K, Aizawa S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities[J]. *PNAS*, 2003, 100(6): 3027-3030
- [11] Skrzypek E, Straley SC. Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca²⁺ response, and virulence of *Yersinia pestis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(9): 2530-2542
- [12] Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, Attree I. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(8): 4741-4750
- [13] Chacón MR, Soler L, Groisman EA, Guarro J, Figueras MJ. Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(3): 1285-1287
- [14] Burrows TW. An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*[J]. *Nature*, 1956, 177(4505): 426-427
- [15] Mueller CA, Broz P, Müller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, Kuhn M, Engel A, Cornelis GR. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles[J]. *Science*, 2005, 310(5748): 674-676
- [16] Matson JS, Nilles ML. LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(17): 5082-5091
- [17] Marenne MN, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35(6): 243-258
- [18] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45
- [19] 李楚楚, 李伟燕, 潘建义. 副溶血弧菌 III 型分泌系统 (T3SS) 效应蛋白及其对宿主细胞的操控[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(3): 247-251
- [19] Li CC, Li WY, Pan JY. T3SS effectors and their functions in manipulating host cell in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(3): 247-251 (in Chinese)
- [20] Sato H, Frank DW. Multi-functional characteristics of

- the *Pseudomonas aeruginosa* type III needle-tip protein, PerV; comparison to orthologs in other Gram-negative bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 142
- [21] Aagesen AM, Phuvasate S, Su YC, Häse CC. Characterizing the adherence profiles of virulent *Vibrio parahaemolyticus* isolates[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 75(1): 152-162
- [22] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [23] Kernell Burke A, Guthrie LTC, Modise T, Cormier G, Jensen RV, McCarter LL, Stevens AM. OpaR controls a network of downstream transcription factors in *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121863
- [24] Gode-Potratz CJ, McCarter LL. Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4224-4237
- [25] Calder T, De Souza Santos M, Attah V, Klimko J, Fernandez J, Salomon D, Krachler AM, Orth K. Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 361(2): 107-114
- [26] Jaques S, McCarter LL. Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(7): 2625-2635
- [27] O'Boyle N, Houeix B, Kilcoyne M, Joshi L, Boyd A. The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(8): 563-573
- [28] Krachler AM, Ham H, Orth K. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens[J]. *PNAS*, 2011, 108(28): 11614-11619
- [29] 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
- [30] Hsieh YC, Liang SM, Tsai WL, Chen YH, Liu TY, Liang CM. Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(6): 3329-3336
- [31] Jiang W, Han XG, Wang Q, Li XT, Yi L, Liu YJ, Ding C. *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 4937-4948
- [32] Erwin DP, Nydam SD, Call DR. *Vibrio parahaemolyticus* ExsE is requisite for initial adhesion and subsequent type III secretion system 1-dependent autophagy in HeLa cells[J]. *Microbiology*, 2012, 158(9): 2303-2314
- [33] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772-1780
- [34] Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling[J]. *Science*, 2009, 323(5911): 269-272
- [35] Salomon D, Guo Y, Kinch LN, Grishin NV, Gardner KH, Orth K. Effectors of animal and plant pathogens use a common domain to bind host phosphoinositides[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2973
- [36] Broberg CA, Zhang L, Gonzalez H, Laskowski-Arce MA, Orth K. A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity[J]. *Science*, 2010, 329(5999): 1660-1662
- [37] Sreelatha A, Bennett TL, Carpinone EM, O'Brien KM, Jordan KD, Burdette DL, Orth K, Starai VJ. *Vibrio* effector protein VopQ inhibits fusion of V-ATPase-containing membranes[J]. *PNAS*, 2015, 112(1): 100-105
- [38] Lee VT, Tam C, Schneewind O. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(47): 36869-36875
- [39] Zhou XH, Konkil ME, Call DR. Vp1659 is a *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 protein that contributes to translocation of effector proteins needed to induce cytolysis, autophagy, and disruption of actin structure in HeLa cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3491-3502
- [40] Sory MP, Cornelis GR. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(3): 583-594