

群体感应调控子 AphA 对河弧菌 VI 型分泌系统 VflT6SS2 的调控研究

程倩 韩雨 黄元铭 冀赛森 李杰 刁保卫 梁未丽

传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

通信作者: 梁未丽, Email: liangweili@icdc.cn

【摘要】目的 研究河弧菌群体感应调控子 AphA 对 VI 型分泌系统 VflT6SS2 功能活性的调控机制。**方法** 采用 Western Blot 检测河弧菌野生株、*aphA* 缺失株 ($\Delta aphA$) 和 *aphA* 回补株中 VflT6SS2 标志性组件溶血素共调节蛋白 (Hcp) 的表达和分泌。采用实时荧光定量 PCR 和启动子-*lux* 融合冷光系统检测野生株和 $\Delta aphA$ 中 VflT6SS2 核心基因簇和附属基因簇代表基因 *tssB2*、*hcp(tssD2)* 和 *vgrG(tssI2)* 以及群体感应调控子 HapR 的 mRNA 相对表达量和启动子活性。采用定点突变实验结合启动子活性测定确定 AphA 在 *tssD2b* 启动子区的调控结合位点; 采用电泳迁移率位移测定 (EMSA) 确定 AphA 与 *hapR* 启动子的结合。**结果** $\Delta aphA$ 中 *tssB2*、*hcp(tssD2)*、*vgrG(tssI2)* 和 *hapR* 的 mRNA 相对表达量及 Hcp 蛋白的表达分泌明显高于野生株。VflT6SS2 核心基因簇、*tssD2a*、*tssI2a* 和 *hapR* 的启动子活性在 $\Delta aphA$ 中均高于野生株, 而 *tssD2b* 启动子活性则低于野生株。*tssD2a* 和 *tssD2b* 的启动子序列分析显示 -335 bp~-229 bp 区差异较大, 在 *tssD2b* 中该区域存在 2 个潜在 AphA 结合位点, 将其中的保守位点 ATG 替换为 CGA, *tssD2b* 启动子活性明显降低。EMSA 结果显示, AphA 与 *hapR* 启动子直接结合。**结论** AphA 在转录水平直接抑制 *hapR* 的表达, 间接参与对 VflT6SS2 核心基因簇和附属基因簇的调控。AphA 对 *tssD2a* 和 *tssD2b* 呈现相反的调控模式, AphA 可直接与 *tssD2b* 启动子区 (-335 bp~-229 bp) 结合正向调控 *tssD2b* 的表达。

【关键词】 河弧菌; 群体感应调控子; VI 型分泌系统; 转录调控

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC2604400, 2021YFC2300302); 国家自然科学基金 (81772242)

Regulation mechanism of the quorum sensing regulator AphA on the type VI secretion system VflT6SS2 in *Vibrio fluvialis*

Cheng Qian, Han Yu, Huang Yuanming, Ji Saisen, Li Jie, Diao Baowei, Liang Weili

National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Liang Weili, Email: liangweili@icdc.cn

【Abstract】 Objective To explore the regulation mechanism of the quorum sensing regulator AphA on the functional activity of type VI secretion system VflT6SS2 in *Vibrio fluvialis*. **Methods** Western Blot analysis was used to detect the relative expression and secretion of VflT6SS2 signature component hemolysin-coregulated protein (Hcp) in wild type (WT), $\Delta aphA$, and corresponding complementary strains. Quantitative reverse transcription PCR and luminescence

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20231215-00354

收稿日期 2023-12-15 本文编辑 万玉立

引用格式: 程倩, 韩雨, 黄元铭, 等. 群体感应调控子 AphA 对河弧菌 VI 型分泌系统 VflT6SS2 的调控研究[J]. 中华流行病学杂志, 2024, 45(4): 566-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20231215-00354.

Cheng Q, Han Y, Huang YM, et al. Regulation mechanism of the quorum sensing regulator AphA on the type VI secretion system VflT6SS2 in *Vibrio fluvialis*[J]. Chin J Epidemiol, 2024, 45(4): 566-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20231215-00354.



activity assay of the promoter-*lux* fusion system was used to measure the mRNA expression levels and promoter activity of the VflT6SS2 core and accessory gene-cluster representative genes *tssB2*, *hcp* (*tssD2*) and *vgrG* (*tssI2*), and the quorum sensing regulator HapR in WT and Δ *aphA* strains. A point mutation experiment combined with a luminescence activity assay was used to verify the regulatory binding site of AphA in the *tssD2b* promoter region. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to determine AphA binding to the *hapR* promoter. **Results** The mRNA expression levels of *tssB2*, *hcp*(*tssD2*), *vgrG* (*tssI2*), and *hapR* as well as the protein expression and secretion levels of Hcp in Δ *aphA* strain, were significantly higher than those in the WT strain. The promoter activities of the VflT6SS2 core cluster, *tssD2a*, *tssI2a*, and *hapR* were higher in Δ *aphA* strain than in the WT strain, while the promoter activity of *tssD2b* showed the opposite trend. The promoter sequence analysis of *tssD2a* and *tssD2b* found significant differences in the region from -335 bp to -229 bp, and two potential AphA binding sites on *tssD2b*. The promoter activity of *tssD2b* decreased significantly after the point mutation of the two potential AphA binding sites. EMSA results showed that AphA binds directly to the promoter region of *hapR*. **Conclusions** AphA indirectly inhibits the regulation of the VflT6SS2 core and accessory gene clusters at the promoter level by directly repressing the expression of *hapR*. AphA showed opposite regulation patterns for *tssD2a* and *tssD2b*, and AphA could positively regulate the expression of *tssD2b* by directly binding to the *tssD2b* promoter region (-335 bp to -229 bp).

【Key words】 *Vibrio fluvialis*; Quorum sensing regulator; Type VI secretion system; Transcriptional regulation

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2023YFC2604400, 2021YFC2300302); National Natural Science Foundation of China (81772242)

河弧菌(*Vibrio fluvialis*)是一种嗜盐的革兰阴性菌,广泛分布于温暖含盐的自然水体中。河弧菌是一种新型的食源性病原菌,常见于婴儿、儿童和年轻成年人的感染^[1]。其感染可引发人类急性胃肠炎、菌血症等^[2-6],鱼虾类也会感染,对经济发展和公共卫生安全造成严重威胁。

VI型分泌系统(T6SS)是一种接触依赖性的多功能细菌武器,可通过直接传递分泌的蛋白质类毒素来杀伤靶标细胞^[7-8],在种间竞争和环境适应性等方面起着重要作用^[9-10]。河弧菌 85003 中存在 VflT6SS1 和 VflT6SS2 两套 T6SS 编码基因簇,其中 VflT6SS2 在 25~30 °C 条件下组成性表达并具有功能活性^[11]。VflT6SS2 由 1 个以 *tssB2* 起始的核心基因簇以及 3 个独立的 *hcp-vgrG* (*tssD2a-tssI2a*、*tssD2b-tssI2b* 和 *tssD2c-tssI2c*) 附属基因簇组成,其功能活性受温度、盐离子浓度、渗透压^[11]以及多种调节因子的调控,如群体感应调控子 HapR^[12-13] 和 VfqR^[14]、宿主整合因子 IHF^[13] 等均正向调控 VflT6SS2 的表达。

群体感应是细菌之间的一种通信机制,通过自诱导信号分子监测群体密度变化发挥作用,参与生物膜形成、毒力因子表达和包含分泌系统在内的细菌间竞争等多种特定的生理过程^[15-16]。AphA 和 HapR 是群体感应系统重要的转录调控子,分别在低细胞密度(LCD)和高细胞密度(HCD)状态下单

独或共同调控下游数百个基因的表达^[17-19]。AphA 和 HapR 作为群体感应调控子的作用在整个弧菌中是保守的^[20]。同时,AphA 和 HapR 不仅可以进行自我反馈调节,还能相互抑制^[20-22]。目前,河弧菌中已发现 CqsA/LuxS-HapR 和 VfqI/R 两套群体感应系统^[23],已有研究证明 CqsA/LuxS-HapR 系统通过 HapR 直接激活核心基因簇和附属基因簇 *hcp-vgrG* 调节 VflT6SS2 的表达^[12-13]。但 AphA 在河弧菌中是否调控 VflT6SS2 尚不清楚。本研究通过检测野生株和 *aphA* 缺失株(Δ *aphA*)中 T6SS 标志性组件 Hcp 的表达和分泌^[24],检测 VflT6SS2 核心基因簇和附属基因簇代表基因 *tssB2*、*hcp* (*tssD2*) 和 *vgrG* (*tssI2*) 以及群体感应调控子 HapR 的 mRNA 相对表达量以及启动子活性,分析 AphA 对 VflT6SS2 的调控机制。

材料与方法

1. 菌株、质粒和培养条件:河弧菌 85003 作为野生株,大肠埃希菌 SM10 λ *pir* 作为接合宿主株;瞬时表达回补质粒 pMal-c2x,自杀质粒 pWM91,冷光报告质粒 pBBR*lux*,蛋白表达质粒 pET28a(+),冷光融合质粒 pVflT6SS2-*lux*、*ptssD2a-lux*、*ptssD2b-lux* 和 *ptssI2a-lux*,以上菌株和质粒均由本研究室保存;大肠埃希菌感受态细胞 Top10 和 BL21 (DE3) 购自中国北京康为世纪生物科技有限公司。本实验所用

河弧菌均在含有 2% NaCl 的 LB 培养基中 30 °C 培养,大肠埃希菌均在含有 1% NaCl 的 LB 培养基中 37 °C 常规培养。培养所需抗生素:氨苄青霉素(终浓度为 100 μg/ml)、链霉素(终浓度为 100 μg/ml)。

2. 主要仪器和试剂:罗氏 LightCycle 96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司),Bio-Tecan 分光光度计(奥地利 TECAN 公司),BCA™ 蛋白质检测试剂盒和 SuperScript™ III 反转试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司),同源重组无缝克隆试剂盒(中国北京全式金生物公司),Hcp 多克隆抗体血清(中国武汉吉天朋生物科技公司),Crp 抗体(美国 BioLegend 公司),His-Bind® 纯化试剂盒(爱尔兰 Novogen 公司)Western Blot Chemiluminescence HRP Substrate、TB Green® Premix Ex Taq™ II 和限制性内切酶(日本 TaKaRa 公司),引物均由中国北京擎科生物科技公司合成。

3. 菌株构建和蛋白检测:

(1) $\Delta aphA$ 的构建:以野生株基因组为模板,用引物对 *aphA*-F1-F-*Sac* I / *aphA*-F1-R 和 *aphA*-F2-F-*Xho* I / *aphA*-F2-R 分别扩增 *aphA* 基因的上、下游片段,参考文献[25]通过搭桥 PCR 将其拼接一起,使用同源重组无缝克隆试剂盒,将搭桥片段克隆于自杀质粒 pWM91 的 *Sac* I / *Xho* I 位点,连接产物转入感受态细胞 Top10,PCR 扩增鉴定筛选阳性克隆,提取质粒进行测序获得 pWM- $\Delta aphA$ 。将测序正确的重组自杀质粒转入 SM10 λ *pir*,与野生株进行接合,采用链霉素和氨苄青霉素双抗平板筛选接合子,并在无盐的 10% 蔗糖 LB 平板上 22 °C 培养 48 h,单菌落分别点种至链霉素抗性与氨苄青霉素抗性的平板,挑选对氨苄青霉素敏感但对链霉素耐药的克隆子,采用菌落 PCR 和测序验证 $\Delta aphA$ 。

(2) *aphA* 回补株的构建:用引物对 *aphA*-*Nde* I -*F* / *aphA*-*Xba* I -*R* 扩增 *aphA* 基因的完整编码序列,纯化酶切后,克隆于表达质粒 pMal-c2x 中,获得回补质粒 pMal-*aphA*。将回补质粒转化进 SM10 λ *pir*,通过接合转入 $\Delta aphA$,获得 *aphA* 回补株。以 pMal-c2x 空质粒转入 $\Delta aphA$ 作为阴性对照。

(3) Hcp 的表达及分泌:将过夜培养的野生株、 $\Delta aphA$ 和 *aphA* 回补株转接(1:100)至新鲜 LB 培养基中,30 °C 振荡(220 rpm)培养至 A_{600} 约为 0.20,收集细菌上清液(15 ml/管)和细菌沉淀物(4 ml/管)。细菌上清和沉淀的蛋白制备方法参考文献[11-12]。使用 BCA™ 蛋白质检测试剂盒测定蛋白质浓度,使用 Hcp 抗体和 Crp 抗体(内参)进行 Western Blot 分析。

4. 转录水平的检测:

(1) RNA 提取和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR):将过夜培养的野生株和 $\Delta aphA$ 转接(1:100)至新鲜 LB 培养基中,30 °C 振荡培养至指定的细胞浓度,离心收取细胞沉淀,参照文献[25]TRIzol 法提取总 RNA 并进行 cDNA 的合成,使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 进行 qRT-PCR。引物名称及序列见表 1。未进行反转录的总 RNA 作为阴性对照,*recA* 作为内参基因。相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (目的基因- ΔCt 内参基因)。

(2) 启动子融合冷光质粒的构建:采用 PCR 分别扩增 *tssD2a*、*ptssD2b* 启动子区 *myc* 片段和 *hapR* 启动子序列,产物纯化后,克隆到含有无启动子的冷光报告质粒 pBBR*lux* 中,获得重组质粒 *ptssD2a**myc-lux*、*ptssD2b**myc-lux* 和 *phapR-lux*。通过 PCR 对 *tssD2b* 进行定点突变后构建重组质粒 *ptssD2b**mu1-lux* 和 *ptssD2b**mu2-lux*,这些质粒在预测的 AphA 结合位点中均含有 3 个碱基的突变。

(3) 启动子活性检测:将含有启动子融合冷光质粒的河弧菌株接种于新鲜 LB 培养基中 30 °C 振荡(220 rpm)培养至平台期;一次转接(1:100)至新鲜的 LB 培养基,培养至对数生长期;二次转接(1:1 000)至新鲜的 LB 培养基中并转入(200 μl/孔)96 孔黑色培养板,使用 Bio-Tecan 分光光度计于每小时检测每孔冷光值(Luminescence, Lux)和 A_{600} ,以 Lux/A_{600} 反映启动子活性[26]。

5. 蛋白与核酸的体外结合:

(1) AphA 蛋白的表达和纯化:扩增 *aphA* 基因的完整编码序列,并在 *Bam*H I / *Hind* III 位点克隆到蛋白表达质粒 pET28a 中以产生表达质粒 pET*aphA*。将含有表达质粒 pET*aphA* 的大肠埃希菌 BL21(DE3)在 37 °C 下振荡培养至 A_{600} 0.40~0.60,添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度 0.50 mmol/L 于 22 °C 诱导过夜。根据制造商的说明,使用亲和色谱法 Ni 树脂纯化 6 \times His 标签的 AphA 蛋白。将洗脱样品在 4 °C 下用 1 倍体积的磷酸盐缓冲液稀释替换,20 817 g 离心 30 min 得到浓缩 AphA 蛋白。

(2) 电泳迁移率位移测定(EMSA):以质粒 *phapR-lux* 为模板,采用引物对 *hapR*-F/*hapR*-R 扩增 *hapR*-pro 的片段。在反应缓冲液(1 mmol/L MgCl₂, 0.50 mmol/L EDTA, 0.50 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.50)中,将 20 ng 的 *hapR*-pro DNA 片段,100 ng BSA,100 ng dI-dC 和纯化的 AphA 蛋白混合在 20 μl 体系中,室温孵育 30 min,参考文献[26],在 6% 的非变形聚丙烯酰胺

表 1 PCR 引物序列

引物名称	序列(5'~3')
缺失株构建	
<i>aphA</i> -F1-F- <i>Sac</i> I	CACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCGCCGTTCTTCTCGACCCG
<i>aphA</i> -F1-R	TCCCTTTTCTGTTTATGACATGTCTTCAATCCAAATGG
<i>aphA</i> -F2-F- <i>Xho</i> I	CGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGCAATACCGCCTCGATGCC
<i>aphA</i> -F2-R	TGGATTGAAGACATGTCATAAACAGAAAAAAGGGATGATGC
回补质粒构建	
<i>aphA</i> - <i>Nde</i> I -F	CACTTCACCAACAAGGACCATAGCATATGTCATTACCACACGTTATCC
<i>aphA</i> - <i>Xba</i> I -R	GTCCGCTGAAGTGGACGCCATGGCGCACCACCACCACCACCTAATCTAGA
qRT-PCR	
<i>tssB2</i> -qPCR-F ^a	TCAGAAGAGACGCCAGTAGAAGAG
<i>tssB2</i> -qPCR-R ^a	CTTCACCCAGTTTGTCTTCACTG
<i>hep</i> -qPCR-F ^a	TCGGCGATTCAATTCGTT
<i>hep</i> -qPCR-R ^a	CAGTTCAACCGTCGCATCT
<i>vgrG</i> -qPCR-F ^b	GCATCTTCCAACCTAACAC
<i>vgrG</i> -qPCR-R ^b	GTACACCAGCCCTTCTTC
<i>hapR</i> -qPCR-F	CTGTCCGCCACCGTGTTCAC
<i>hapR</i> -qPCR-R	GGCAATCTTCATTGGCCAGC
<i>recA</i> -qPCR-F ^a	ACCGAGTCAACGACGATAAC
<i>recA</i> -qPCR-R ^a	TGATGAACTGCTGGTGTCTC
表达质粒构建	
<i>aphA</i> - <i>Bam</i> H I -F	GCAAATGGGCTCGCGGATCCATGTCATTACCACAC
<i>aphA</i> - <i>Hind</i> III -R	CTCGAGTGGCGCCGAAGCTTTTACGCCATGGCGTCCAG
启动子融合冷光质粒构建	
<i>plux-tssD2 myc-Sac</i> I -F	CTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCCTTGCCCGACAAGCAA
<i>plux-tssD2-Bam</i> H I -R	CCATTTTGGCGCCGCAACTAGAGGATCCGAGTTTGACCTTCGATAGAG
<i>plux-tssD2b-Sac</i> I -F	ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCGTCCACCTTTGGCTACGTT
<i>tssD2b</i> -mu1-F	GTTTATCGACTGACGAACTCATTAGCCTG
<i>tssD2b</i> -mu1-R	CAGGCTAATGAGTTTCGTCAGTCGATAAAC
<i>tssD2b</i> -mu2-F	GCCCCGATTTTACAGATAAATCGGGCTTTTTTG
<i>tssD2b</i> -mu2-R	CAAAAAAGCCCGATTTATCGTGTAAATCGGGC
<i>plux-hapR-Sac</i> I -F	CGGAGCTCCTAGTCTCAGTCTGCTGCTG
<i>plux-hapR-Bam</i> H I -R	CGGGATCCGATATCCGCATGACCACCAC
EMSA 引物	
<i>hapR</i> -F	GACTCACTATAGGGCGAATTGG
<i>hapR</i> -R	TTGCCATCCATTTTGGCGG

注:^a来源于文献[11];^b来源于文献[13];其余为自行设计;EMSA:电泳迁移率位移测定

凝胶上分离,通过核酸染料 Gel-Red 染色可视化蛋白和 DNA 片段的结合。

6. 统计学分析:采用 qRT-PCR 检测和启动子活性检测,均设置 3 个生物学重复,采用非配对双侧 *t* 检验,用 GraphPad Prism 8 软件绘图进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同细胞生长密度下 *aphA* mRNA 丰度分析

和 AphA 对 Hcp 表达分泌的影响:采用 qRT-PCR 检测野生株在 A_{600} 0.15~0.75 之间不同生长状态下 *aphA* mRNA 的相对表达量以确定 AphA 的表达水平,结果显示 *aphA* 的 mRNA 相对表达量随 A_{600} 增加而下降。 $A_{600}=0.15$ 时,*aphA* mRNA 的相对表达量最高; $A_{600}=0.75$ 时,*aphA* mRNA 的相对表达量非常低。见图 1。在河弧菌中,AphA 的高表达水平在 LCD 状态。基于前期的研究,T6SS2 在 HCD 状态表达活性较高^[12],因此,选取 $A_{600}=0.20$ 的细胞生长状态进行后续实验研究。

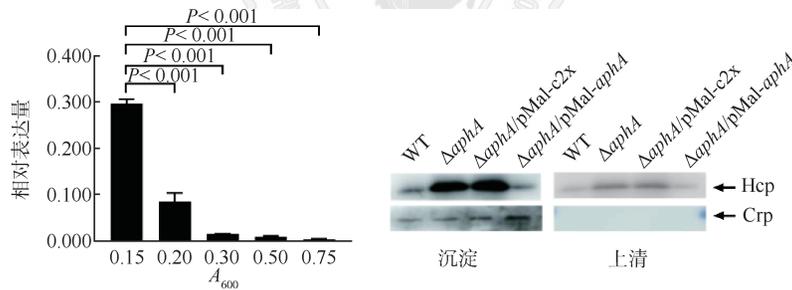
Western Blot 结果显示, $\Delta aphA$ 上清与沉淀中的 Hcp 的表达和分泌均明显高于野生株; 导入回补质粒 pMal-*aphA* 诱导表达后, Hcp 的蛋白量恢复到野生株水平, 该结果提示 AphA 抑制 Hcp 的表达。见图 1。

2. AphA 在转录水平调控 VflT6SS2 的核心基因簇和附属基因簇的表达: 为分析 AphA 对 VflT6SS2 的调控机制, 采用 qRT-PCR 检测 VflT6SS2 核心基因簇 *tssB2* 和附属基因簇 *hcp* (*tssD2*) 和 *vgrG* (*tssI2*) 的 mRNA 相对表达量。与野生株相比, $\Delta aphA$ 中 *tssB2* ($t=5.69, P=0.005$)、*hcp* (*tssD2*) ($t=24.10, P<0.001$) 和 *vgrG* (*tssI2*) ($t=9.08, P<0.001$) 的 mRNA 相对表达量明显升高。见图 2。

VflT6SS2 中, *tssD2a*、*tssD2b* 和 *tssI2a* 在野生株中的启动子活性相对较高^[13,26]。为进一步明确 AphA 对 VflT6SS2 核心基因簇和附属基因簇启动子水平的表达调控, 将 VflT6SS2 核心基因簇、附属基因簇 *tssD2a*、*tssD2b* 和 *tssI2a* 的启动子融合冷光质粒 pVflT6SS2-*lux*、*ptssD2a-lux*、*ptssD2b-lux* 和 *ptssI2a-lux*

分别转入 $\Delta aphA$ 中。结果显示, 与野生株相比, $\Delta aphA$ 中 VflT6SS2 核心基因簇 ($t=6.30, P=0.003$)、附属基因簇 *tssD2a* ($t=7.46, P=0.002$) 和 *tssI2a* ($t=5.88, P=0.004$) 的启动子活性均升高, *tssD2b* 的启动子活性明显下降 ($t=35.88, P<0.001$)。见图 3。提示 AphA 在启动子水平抑制 VflT6SS2 核心基因簇和附属基因 *tssD2a* 和 *tssI2a* 的转录, 激活附属基因 *tssD2b* 的转录。

3. AphA 对附属基因 *tssD2a* 和 *tssD2b* 的 myc 区 (-228 bp 至起始密码子) 启动子活性的影响: 对 *tssD2a* 和 *tssD2b* 启动子区 (-335 bp 至起始密码子) 分析显示, 从 -228 bp 到起始密码子的序列仅有 4 bp 的差异; 而 -335 bp~-229 bp 的 107 bp 序列同源性只有 26%。见图 4。将 myc 区启动子融合冷光报告质粒 *ptssD2amyc-lux* 和 *ptssD2bmyc-lux* 分别转入野生株和 $\Delta aphA$ 。结果显示, $\Delta aphA$ 中 *tssD2a* ($t=4.29, P=0.013$) 和 *tssD2b* ($t=6.27, P=0.003$) myc 区启动子活性均高于野生株。见图 4。提示 AphA 对 *tssD2a* 和 *tssD2b* 的 myc 区 (-228 bp 至起始密码子)



注: WT: 野生株; $\Delta aphA$: 缺失株; $\Delta aphA/pMal-c2x$: *aphA* 回补株阴性对照; $\Delta aphA/pMal-aphA$: *aphA* 回补株

图 1 河弧菌不同生长状态下 *aphA* 的 mRNA 相对表达量和 *aphA* 对 VflT6SS2 Hcp 蛋白表达分泌水平的影响

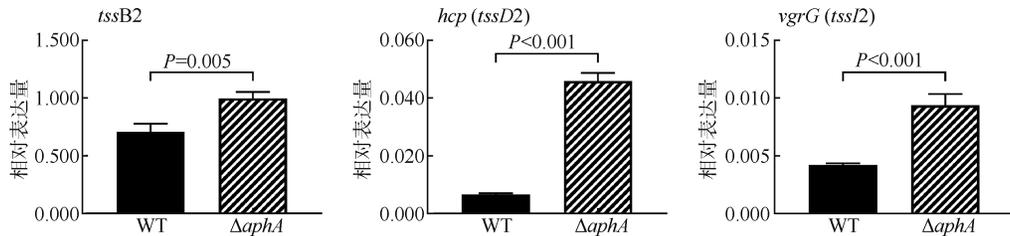


图 2 河弧菌野生株 (WT) 和 *aphA* 缺失株 ($\Delta aphA$) 中 *tssB2*、*hcp* (*tssD2*) 和 *vgrG* (*tssI2*) 的 mRNA 相对表达量

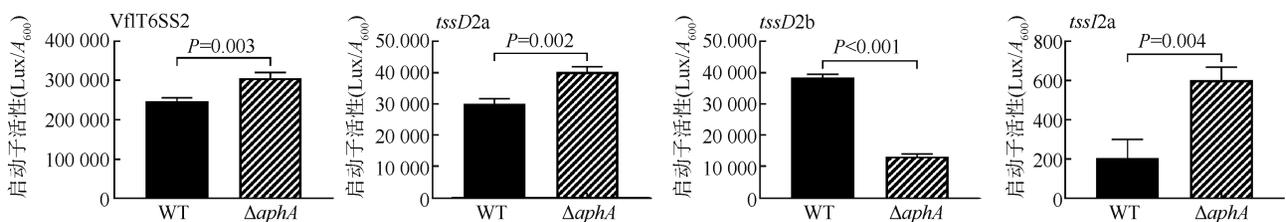


图 3 河弧菌野生株 (WT) 和 *aphA* 缺失株 ($\Delta aphA$) 中 VflT6SS2 核心基因簇、*tssD2a*、*tssD2b* 和 *tssI2a* 的启动子活性检测

启动子活性呈负向调控。

4. AphA 对附属基因 *tssD2b* 启动子区(-335 bp~-229 bp)启动子活性的影响:由于 AphA 在河流弧菌和霍乱弧菌中的序列同源性高达 93%,因此参考 AphA 在霍乱弧菌中报道的共用基序“TATGCA-N₆-TNCNNA”对 *tssD2a* 和 *tssD2b* 的启动子区域中序列差异较大的 107 bp(-335 bp~-229 bp)进行分析^[27],结果显示,在 *tssD2b* 启动子区的-335 bp~-229 bp 中有 2 个潜在 AphA 结合位点(图 4),将其中的保守位点 ATG(红色)替换为 CGA,构建启动子融合冷光质粒 *ptssD2bmu1-lux* 和 *ptssD2bmu2-lux*,转入河弧菌野生株中。启动子活性测定结果显示,与野生株中 *tssD2b* 启动子活性相比,突变后 *tssD2bmu1* ($t=22.94, P<0.001$) 和 *tssD2bmu2* ($t=11.61, P<0.001$) 的启动子活性均下降。见图 5。提示 AphA 在 *tssD2b* 启动子区的-335 bp~-229 bp 存在 2 个直接结合位点, AphA 可能直接与这 2 个位点结合参与 *tssD2b* 的正向调控。

5. AphA 在转录水平上抑制 *hapR* 的表达:为明确 AphA 对 *VfiT6SS2* 的调控是否依赖于 *hapR*,对野生株和 $\Delta aphA$ 中 *hapR* 的 mRNA 相对表达量进行检测,并构建 *phapR-lux* 质粒,转入野生株和 $\Delta aphA$ 中,对 *hapR* 启动子活性进行检测。结果显示, $\Delta aphA$ 中 *hapR* 的 mRNA 相对表达量($t=7.24, P=$

0.002)和启动子活性($t=37.65, P<0.001$)均高于野生株。见图 6。提示 AphA 在转录水平上抑制 *hapR* 的表达。在 *hapR* 启动子序列预测到 1 个 AphA 结合位点, EMSA 结果显示,在含有 20 ng *hapR*-pro 的反应混合物中加入 100 nmol/L AphA 蛋白时,可观察到 1 条迁移率较慢的阻滞条带,随 AphA 蛋白浓度的增加(>100 nmol/L),阻滞条带强度增强,同时游离的 *hapR*-pro 亮度减弱。见图 6。提示 AphA 与 *hapR*-pro 的直接结合。

讨 论

T6SS 是革兰阴性细菌中新发现的一种蛋白质分泌系统,通过影响定植竞争、毒力和应激反应等多种生理功能,广泛参与细菌的致病性和环境生存适应性^[8,10]。前期研究表明,河弧菌的 CqsA/LuxS-HapR 群体感应回路利用 LuxO 和 HapR 来协调 *VfiT6SS2* 的表达,即在 LCD 状态下被 LuxO 抑制,在 HCD 状态下被 HapR 激活^[12]。本研究证明 *VfiT6SS2* 在 LCD 状态下的表达受到 AphA 的负向调控,该调控通过 AphA 在转录水平抑制 *VfiT6SS2* 的核心基因簇和附属基因簇 *tssD2a* 和 *tssI2a* 的表达来实现的。对 *VfiT6SS2* 的核心基因簇和附属基因簇 *tssD2a* 和 *tssI2a* 的启动子序列分析,没有预测到潜

启动子序列比对

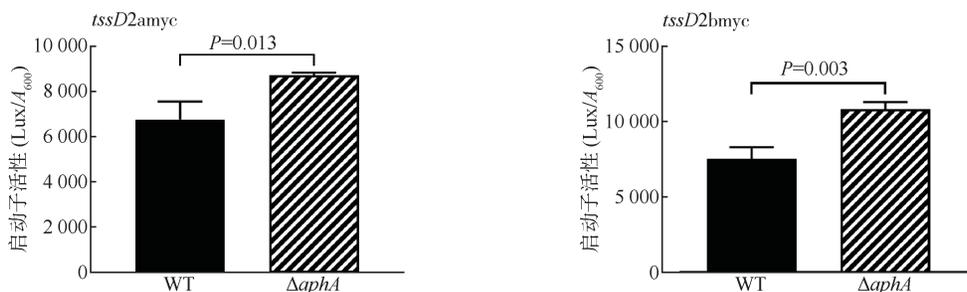
```

tssD2a : TGAGAATAGCCCTTCCTTGACGAAAAATGAGAGAGAAGTGTACCAACGTGCTACAGATTAACAAGTGGCCCTGAGTCGGTGTTCGTTACTTGAAC
tssD2b : GTGCCACCTTTGGCTACGTTAATGTATAAGTTTATCGACTGAATGACTCATTAGCCTGTCGAGCCCGATTTTACAATGTAATCGGGCTTTT
(-335 bp ~ -229 bp)                               AphA 潜在结合位点 1                               AphA 潜在结合位点 2

                                                HapR结合位点           IHF结合位点
tssD2a : CAGCGACGTGAACCTTGCCCGACAAGCAAGATCTTGCTTGTCTCAAAGGCAGCTTGTGCTCTAATGGCAAGGTTTAAATATAACTAATTGATTT
tssD2b : GTATCGCAGGATCCTTGCCCGACAAGCAAGATCTTGCTTGTCTCAAAGGCAGTTCGCTCTAATGGCAAGGTTTAAATATAACTAATTGATTT
myc (-228 bp 至起始密码子)

-24           -12           TSS
tssD2a : TAAAAGAAATGCCAAAGTGGCATCGACTTTGCTCCCTTACTCACTGAATTCGCGCTGAGCGCACTTACATCAGCAACGTTTTATCGAATGGCAAAG
tssD2b : TAAAAGAAATGCCAAAGTGGCATCGACTTTGCTCCCTTACTCACTGAATTCGCGCCAGCGCACTTACATCAGCAACGTTTTATCGAATGGCAAAG

                                                起始密码子
tssD2a : GTTGTCTTAACACGTTGCCTGATAAAACAACAGTTAGAAAGGAATGAGCAATG
tssD2b : GTTGTCTTAACACGTTGCCTGATAAAACAACAGTTAGAAAGGAATGAGCAATG
    
```



注: WT:野生株; $\Delta aphA$:缺失株

图 4 AphA 调控附属基因 *tssD2a* 和 *tssD2b* 的 myc 区(-228 bp 至起始密码子)的启动子活性

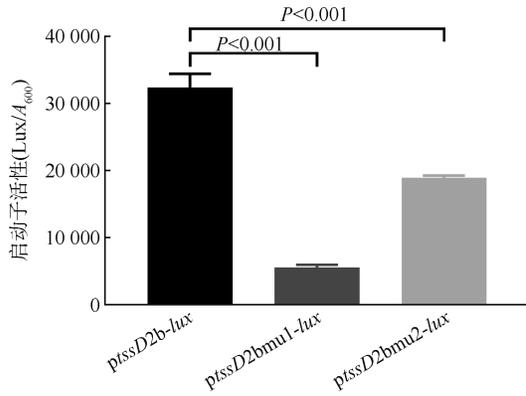


图5 AphA 潜在结合位点突变对 *tssD2b* 启动子区 (-335 bp~-229 bp) 活性的影响

在 AphA 结合位点。群体感应调控子 HapR 可以直接与 VfiT6SS2 的核心基因簇及附属基因簇 *hcp-vgrG(tssD2-tssI2)* 的启动子区结合发挥正向调控的作用^[12-13], 因此, AphA 对 VfiT6SS2 的抑制作用可能是通过 HapR 实现的间接调控。本研究结果证明 AphA 在转录水平上通过直接与 *hapR* 的启动子区结合抑制 HapR 的表达, 间接参与对 VfiT6SS2 的核心基因簇和附属基因簇的调控。另外, LuxO 位于群体感应级联反应 AphA 的上游, 通过磷酸化后激活小 RNA 而进一步激活 AphA 的表达, 推测 LuxO 抑制 VfiT6SS2 的表达是通过激活 AphA 来实现的。

在野生株中附属基因 *tssD2a* 和 *tssD2b* 的 myc 区 (-228 bp 至起始密码子) 的启动子活性均要低于其全长的启动子活性, 这表明在 *tssD2a* 和 *tssD2b* 截短的前 107 bp (-335 bp~-229 bp) 可能有其他调控子的参与。VasH 是霍乱弧菌 T6SS 核心基因簇编码的一种增强结合蛋白, *hcp(tssD2)* 启动子已被证明属于 RpoN 型, 它的转录依赖于 σ^{54} , IHF 和增强结合蛋白 (VasH) 的辅助^[28-29]。推测在附属基因 *tssD2a* 和 *tssD2b* 启动子区 -335 bp~-229 bp 存在 VasH 的结合位点。将截短的质粒 *ptssD2amyc-lux* 和 *ptssD2bmyc-lux* 分别导入到 $\Delta vasH$ 缺失株中, 结果

显示启动子活性明显低于其在野生株的活性(数据未展示)。目前 VasH 对 *hcp(tssD2)* 的调控并未完全明确, 仍有待进一步的确认。

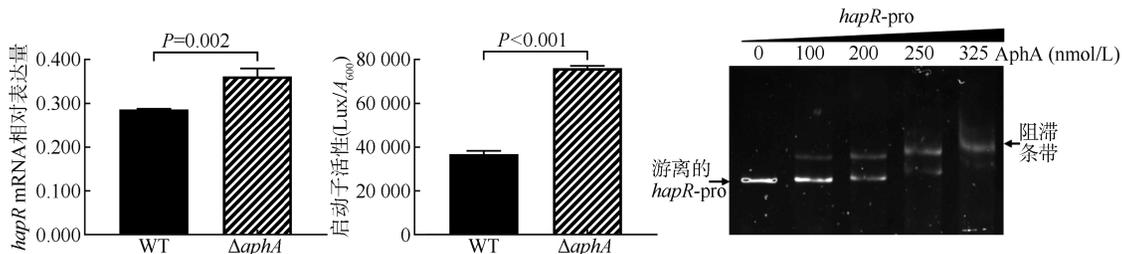
本研究结果显示, 河弧菌 AphA 在 LCD 状态下通过抑制 *hapR* 的表达间接抑制 VfiT6SS2 的核心基因簇及附属基因簇 *hcp-vgrG(tssD2-tssI2)* 的表达。AphA 可以直接结合附属基因 *tssD2b* 启动子区而增强 *tssD2b* 的表达。AphA 对附属基因 *tssD2a* 和 *tssD2b* 完全相反的调控模式, 提示 *tssD2a* 和 *tssD2b* 可能在不同的生长状态下发挥不同的生理功能; AphA 对 *hcp(tssD2)* 这种精密的调控模式提示 VfiT6SS2 和 Hcp 网络系统调控的复杂性。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 程倩: 论文撰写、实验设计、实施研究、数据整理/分析; 韩雨: 实验指导、数据整理/分析、论文修改; 黄元铭: 生物信息学分析、数据整理/分析、论文修改; 冀赛森: 实施研究、数据整理/分析; 李杰、刁保卫: 试剂配置、实验指导; 梁未丽: 课题设计、论文修改/指导

参 考 文 献

- [1] Igbinosa E, Okoh AI. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern[J]. Int J Environ Res Public Health, 2010, 7(10): 3628-3643. DOI: 10.3390/ijerph7103628.
- [2] Kobayashi K, Taguchi M, Shimada T, et al. Acute gastroenteritis probably caused by *Vibrio fluvialis* and enteropathogenicity of the organism[J]. Kansenshogakussishi, 1983, 57(5): 375-382. DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.57.375.
- [3] Lai C, Hwang C, Chin C, et al. Severe watery diarrhoea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*[J]. J Infect, 2006, 52(3): e95-98. DOI: 10.1016/j.jinf.2005.05.023.
- [4] Kitaura S, Okamoto K, Wakabayashi Y, et al. *Vibrio fluvialis* liver abscess and bacteremia in a sashimi lover: a case report and review of the literature[J]. Open Forum Infect Dis, 2020, 7(6): ofaa212. DOI: 10.1093/ofid/ofaa212.
- [5] Usta J, Araj G, Taleb R. An unusual urinary tract infection caused by *Vibrio fluvialis*[J]. J Infect Dev Ctries, 2018, 12(8): 673-675. DOI: 10.3855/jidc.9709.
- [6] Huang KC, Hsu RWW. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis[J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(9):



注: WT: 野生株; $\Delta aphA$: 缺失株; *hapR-pro*: 探针; AphA: 蛋白 AphA; 阻滞条带: 蛋白与 DNA 结合条带

图6 AphA 直接与 *hapR-pro* 结合并在转录水平抑制 *hapR* 的表达

- 75-77. DOI:10.1086/429328.
- [7] Ma AT, Mcauley S, Pukatzki S, et al. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells[J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(3):234-243. DOI:10.1016/j.chom.2009.02.005.
- [8] Ray A, Schwartz N, de Souza Santos M, et al. Type VI secretion system MIX - effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities[J]. EMBO Rep, 2017, 18(11):1978-1990. DOI:10.15252/embr.201744226.
- [9] Murdoch SL, Trunk K, English G, et al. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors[J]. J Bacteriol, 2011, 193(21):6057-6069. DOI:10.1128/jb.05671-11.
- [10] Ross BD, Verster AJ, Radey MC, et al. Human gut bacteria contain acquired interbacterial defence systems[J]. Nature, 2019, 575(7781):224-228. DOI:10.1038/s41586-019-1708-z.
- [11] Huang YM, Du PC, Zhao M, et al. Functional characterization and conditional regulation of the type vi secretion system in *Vibrio fluvialis*[J]. Front Microbiol, 2017, 8:528. DOI:10.3389/fmicb.2017.00528.
- [12] Liu XS, Pan JJ, Gao H, et al. CqsA/LuxS-HapR Quorum sensing circuit modulates type VI secretion system VftT6SS2 in *Vibrio fluvialis*[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 589-601. DOI: 10.1080/22221751.2021.1902244.
- [13] Zhang AR, Han Y, Huang YM, et al. *vgrG* is separately transcribed from *hcp* in T6SS orphan clusters and is under the regulation of IHF and HapR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 559:15-20. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.04.092.
- [14] Han Y, Pan JJ, Huang YM, et al. VfqI-VfqR quorum sensing circuit modulates type VI secretion system VftT6SS2 in *Vibrio fluvialis*[J]. Biochem Biophys Rep, 2022, 31:101282. DOI:10.1016/j.bbrep.2022.101282.
- [15] Hawver LA, Jung SA, Ng WL. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems[J]. FEMS Microbiol Rev, 2016, 40(5):738-752. DOI:10.1093/femsre/fuw014.
- [16] Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1100. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01100.
- [17] Kovacicova G, Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter[J]. Mol Microbiol, 2002, 46(4):1135-1147. DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.03229.x.
- [18] Sun FJ, Zhang YQ, Wang L, et al. Molecular characterization of direct target genes and *cis*-acting consensus recognized by quorum-sensing regulator AphA in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44210. DOI:10.1371/journal.pone.0044210.
- [19] Gu D, Liu H, Yang Z, et al. Chromatin immunoprecipitation sequencing technology reveals global regulatory roles of low-cell-density quorum-sensing regulator AphA in the pathogen *Vibrio alginolyticus*[J]. J Bacteriol, 2016, 198(21):2985-2999. DOI:10.1128/jb.00520-16.
- [20] Rutherford ST, van Kessel JC, Shao Y, et al. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in *Vibrios*[J]. Genes Dev, 2011, 25(4): 397-408. DOI: 10.1101/gad.2015011.
- [21] Lin W, Kovacicova G, Skorupski K. The quorum sensing regulator HapR downregulates the expression of the virulence gene transcription factor AphA in *Vibrio cholerae* by antagonizing Lrp- and VpsR-mediated activation[J]. Mol Microbiol, 2007, 64(4): 953-967. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05693.x.
- [22] Pompeani AJ, Irgon JJ, Berger MF, et al. The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters[J]. Mol Microbiol, 2008, 70(1): 76-88. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06389.x.
- [23] García-Aljaro C, Melado-Rovira S, Milton DL, et al. Quorum-sensing regulates biofilm formation in *Vibrio scophthalmi*[J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 287. DOI: 10.1186/1471-2180-12-287.
- [24] Peng Y, Wang XR, Shou J, et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):26816. DOI:10.1038/srep26816.
- [25] Wu R, Zhao M, Li J, et al. Direct regulation of the natural competence regulator gene *tfoX* by cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein (CRP) in *Vibrios*[J]. Sci Rep, 2015, 5(1):14921. DOI:10.1038/srep14921.
- [26] Pan JJ, Zhao M, Huang YM, et al. Integration host factor modulates the expression and function of T6SS2 in *Vibrio fluvialis*[J]. Front Microbiol, 2018, 9:962. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00962.
- [27] Kovacicova G, Lin W, Skorupski K. The virulence activator *aphA* links quorum sensing to pathogenesis and physiology in *Vibrio cholerae* by repressing the expression of a penicillin amidase gene on the small chromosome[J]. J Bacteriol, 2003, 185(16): 4825-4836. DOI:10.1128/jb.185.16.4825-4836.2003.
- [28] Bernard CS, Brunet YR, Gavioli M, et al. Regulation of type VI secretion gene clusters by σ^{54} and cognate enhancer binding proteins[J]. J Bacteriol, 2011, 193(9):2158-2167. DOI:10.1128/jb.00029-11.
- [29] Kitaoka M, Miyata ST, Brooks TM, et al. VasH is a transcriptional regulator of the type vi secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(23): 6471-6482. DOI: 10.1128/jb.05414-11.