

研究报告

Tn5 介导的致病性副溶血弧菌溶血能力差异 突变株表型分析

张茜 牛梦雅 王大鹏* 史贤明

(上海交通大学 农业与生物学院 食品科学与工程系 中美食品安全联合研究中心 上海 200240)

摘要:【目的】构建致病性副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)突变体库, 分析溶血能力差异突变株表型特征, 为深入挖掘和认识 *tdh* 的调控机制提供研究基础。【方法】利用双亲本接合法, 将 Mini-Tn5-Km2 片段随机插入致病性 Vp (ATCC 33846)基因组, 并以含有卡那霉素(Km)和氨苄青霉素(Amp)的 TCBS 选择性培养基进行突变株(Km^RAmp^S)筛选; 结合 PCR 方法对突变菌株进行 Km 基因筛查, 构建在不同基因位点随机插入突变的 Vp 突变体库。以我妻氏血平板筛选溶血表型变化菌株, 并对其生长曲线、菌膜形成能力和运动能力进行测定。【结果】采用双亲本接合法, 成功建立包含 490 株 Vp 突变株的突变体库, 并获得 5 株溶血表型变化稳定的菌株(2 株为溶血能力上调, 3 株为下调)。5 株突变株在生长速率、菌膜形成能力及运动能力方面与亲本株有显著性差异。其中, 2 株溶血能力上调菌株及 1 株溶血能力下调菌株在运动能力、生长速率和菌膜形成能力方面较亲本株显著降低($P<0.05$); 另 2 株溶血能力下调菌株菌膜形成能力较亲本株显著提高($P<0.05$)。【结论】Tn5 转座子可用于建立 Vp 突变体库; Vp 溶血能力与其表型特征具有相关性; 研究所获得的 5 株溶血表型突变株为进一步探讨 Vp *tdh* 的调控机制奠定基础。

关键词: 副溶血弧菌, Tn5, 溶血能力, 表型变化

Phenotype analysis of mutant strains on hemolytic ability mediated by Tn5 in pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Qian NIU Meng-Ya WANG Da-Peng* SHI Xian-Ming

(Department of Food Science and Technology, School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiao Tong University,
MOST-USDA Joint Research Center for Food Safety, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] We established the mutation library of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), analyzed the phenotype characteristic of hemolytic ability changed mutations, to provide the research basis for deeper exploration and understanding of the regulation system and mechanism of *tdh*. [Methods] In this study, the Mini-Tn5-Km2 was inserted randomly into the genome of pathogenic Vp (ATCC 33846) by biparental mating. The conjugants (Km^RAmp^S) were investigated using thiosulfate citrate bile salts sucrose agar medium with kanamycin (Km) and ampicillin (Amp) respectively. After detection of the Km gene by polymerase chain reaction, library of mutations was established, which the

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101601)

*通讯作者: Tel: 86-212-34206920; ✉: norovirus@163.com

收稿日期: 2014-11-19; 接受日期: 2014-12-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-02-10

Tn5 was inserted in different gene locus randomly. The hemolytic activity was evaluated with human blood agar. Different characters of these conjugants were evaluated, including growth rate, biofilm formation and motility ability. **[Results]** Library of mutations was successfully established including 490 mutants. After evaluating hemolytic activity, the phenotype of 5 strains was changed, including 2 up-regulated strains and 3 down-regulated strains. There was significant difference between the 5 conjugants and parent strain on growth rate, biofilm formation and motility ability. Among 3 down-regulated strains, the biofilm formation ability of 2 conjugants was increased ($P<0.05$). The residual 3 strains demonstrated the significant difference ($P<0.05$) on growth rate, biofilm formation ability and motility, comparing with their parent strain. **[Conclusion]** Tn5 transposon can be used to establish the library of Vp mutations; Hemolytic ability of Vp is related to the phenotype; The five conjugants will be contributed on investigation of regulation system and mechanism of *tdh* in further study.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Tn5, Hemolytic ability, Phenotypic changes

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)为革兰氏阴性嗜盐细菌,是重要的食源性致病菌之一,主要通过污染水产品而诱发食品安全事件。由该菌引起的食物中毒表现为恶心、呕吐、发烧和腹泻等临床症状^[1]。目前, Vp 已成为我国沿海地区诱发食品安全事件的首要因素^[2], 由该菌引起的细菌性食物中毒比例已超过 40%^[3]。耐热直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)由 *tdh* 编码,是 Vp 主要致病因子之一,具有溶血性、细胞毒性、心脏毒性及致死性等生物学活性^[4]。TDH 具有阿伦尼乌斯效应(Arrhenius effect),是水产品食品安全的潜在隐患^[5-7]。如何有效降低因 TDH 导致的食物安全问题,已成为亟需解决的科学问题。

目前, Tn5 等转座子广泛用于革兰氏阴性菌突变体库的构建^[8-10]。通常 Tn5 转座子以接合转座方法构建细菌突变体库,并且通过相应抗生素基因对突变体进行快速高效的筛选^[11];再以此转座子携带的抗性基因为选择性标记,进行突变体插入基因位点的鉴定与分析^[12]。目前,以转座子接合法构建 Vp 突变体库的报道并不多见。其中,Robert 等以 Mini-Mu 构建 Vp 突变体库,成功筛选得到周生鞭毛表达相关基因^[11];杨振泉等利用 Tn5 转座子成功获得 3 219 株 Vp 突变株,获得一株胞外蛋白酶缺陷菌株^[13]。该方法的优点在于可以高效获得目的基因突变体库,并利用相应筛选标记进行突变体筛查^[11-12]。本研究利用接合转座方法,构建致病性

Vp (ATCC 33846)突变体库,分析溶血能力变化的菌株,为探索 *tdh* 表达调控机制、控制毒素分泌及降低 Vp 食品安全风险提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

接合实验所用受体菌为致病性副溶血弧菌 ATCC 33846,由本实验室保藏;供体菌菌株 *Escherichia coli* S17-1 λ pir (pUT mini-Tn5-Km2)由华中农业大学农业微生物国家重点实验室李林教授惠赠。

Taq 酶、10×PCR buffer、dNTPs、DNA ladder 等,购自 Thermo scientific 公司;限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;各种培养基购自北京陆桥生物技术有限公司。人血细胞由上海交通大学附属瑞金医院韩燕博士惠赠。卡那霉素(Km)工作浓度为 100 mg/L,氨苄青霉素(Amp)工作浓度为 150 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 突变体库的构建:以致病性 Vp ATCC 33846 为受体菌, *E. coli* S17-1 λ pir (pUT mini-Tn5-Km2)为供体菌,采用接合转座法进行突变体库构建。以含有相应抗生素的 LB 固体培养基活化供体菌和受体菌,其中受体菌培养基中 NaCl 含量为 3%,供体菌及受体菌分别于 37 °C 和 30 °C 培养 14 h。以 PBS (pH 7.4)缓冲液将上述平板表面菌落洗下,调整菌液

浓度至 OD_{600} 为 0.8。等体积混合菌液并 4 200 r/min 离心 3 min; 以 1 mL 10 mmol/L $MgSO_4$ 洗涤 2 次并重悬, 20 μ L/点将混合菌液点种在 BHI (1% NaCl) 平板, 34 °C 培养 48 h。以无菌 PBS (pH 7.4)将上述培养物洗下, 涂布于 Km^+ 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)进行筛选。

1.2.2 抗性平板筛选阳性接合子: 将上述培养基表面长出的菌落分别点接种于 TCBS (Km^+)和 TCBS (Amp^+)培养基, 37 °C 培养 14 h, TCBS (Km^+)培养基生长而 TCBS (Amp^+)培养基不生长的菌株为阳性接合子。

1.2.3 Km 抗性基因的 PCR 检测: 根据质粒 pUT mini-Tn5- $Km2$ 携带的 Km 抗性基因序列设计引物, 具体引物信息见表 1。PCR 反应体系为: 10 \times PCR buffer 2.0 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, *Taq* 酶 (1 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 DNA 2.0 μ L, 以 ddH_2O 补足总体积 20.0 μ L。其中, 以水煮法^[14]提取接合子 DNA 为模板。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 10 min。预期 PCR 产物大小为 492 bp。

1.2.4 *tdh* 基因的 PCR 检测: 为了排除因 Tn5 插入 *tdh* 导致溶血变化, 对 *tdh* 进行 PCR 检测。根据 Vp *tdh* 基因序列设计引物, 具体引物信息见表 1。PCR 反应体系及条件同 1.2.3。预期 PCR 产物大小为 589 bp。

1.2.5 溶血能力测定: 参照国标方法 (GB 4789.7-2013)制备我妻氏血平板^[16]。突变菌株于 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。将菌液调整至 OD_{600} 为 1.0, 取 20.0 μ L 菌液注入 5 mmol/L 左右孔中,

以亲本菌株(ATCC 33846)为对照。37 °C 培养 24 h 以游标卡尺测量溶血圈直径。

1.2.6 菌膜形成能力测定: 采用 96 孔细胞培养板法^[17], 对 Vp 突变株菌膜形成能力进行测定。Vp ATCC 33846 和阳性接合子分别接种于含有相应抗生素的 LB (3% NaCl)培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。将培养物以 1:100 比例稀释于 LB (3% NaCl)培养基中, 200 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板(每个菌株做 3 个重复), 37 °C 静置培养 24 h。弃去菌液, 以 PBS 清洗 3 次。加入 200 μ L/孔 0.1% (质量体积比)结晶紫染色液, 室温静置 1 h。弃去染色液, 以 PBS 清洗 3 次。加入 95%乙醇, 室温下 100 r/min 振荡 30 min。以酶标仪(TECAN Sunrise)检测 OD_{595} 吸光值。

1.2.7 运动能力测定: 以含 2% NaCl 及 0.3%琼脂的 LB 平板测定菌株泳动能力, 含 2% NaCl 及 1.5%琼脂的 BHI 平板测定菌株群集能力。在泳动能力实验中, 以接种针挑取一个单克隆, 穿刺入 LB 平板内部; 在群集能力试验中, 以接种针挑取单克隆, 点种于 BHI 平板表面。

1.2.8 生长曲线测定: 菌液制备过程如 1.2.6 中所述。菌液以 200 μ L/孔注入 96 孔细胞培养板, 将培养板置于生长曲线测定仪中(Bioscreen CMBR), 并用 BioScreener 软件每 30 min 测定 OD_{600} 值, 时间跨度为 48 h。

2 结果与分析

2.1 接合实验结果

Vp 接合转座实验中, 对接合转座温度、时间、接合培养基组成、供受体菌培养方法及比例进行优化, 包含 4(温度) \times 2(培养方式) \times 2(培养基) \times 3(供受体菌比例) \times 3(培养时间)共计 144 组平行优化实验, 各

表 1 实验中引物信息
Table 1 The information of primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Application	来源 Source
Km-F	GGCAGCGCAACGGAACATTCA	Km 抗性基因鉴定	[15]
Km-R	GCGGCCTCGAGCAAGACGTTT		
tdh-F	CCGGAATTCATGAAACACCAATATTTGC	tdh 基因鉴定	自行设计
tdh-R	CCCAAGCTTTTATTGTTGATGTTTATATTC		

表 2 接合转座条件优化						
Table 2 Conditions optimize of bioparental mating						
温度 Temperature (°C)	培养方式 Culture method	培养基 Culture medium	供受体菌比例 Ratio	培养时间 Time (h)		
30	液体摇菌	BHI	1:1	24		
32						
34						
37						
	平板划线	BHI+柠檬酸盐	1:2	36		
			1:3	48		

因素水平见表 2。结果表明:在加入柠檬酸盐的 BHI 固体培养基表面,接合菌落呈现类似于蛋清的粘稠状且未获得阳性接合子;培养时间对于接合转座率具有显著影响,将接合时间由 24 h 及 36 h 延长至 48 h,转座率可提高 2-30 倍(数据未显示);以固体培养基表面菌落作为供受体菌,接合率显著高于液体培养物;以 Vp 为受体菌的接合转座试验中,将供受体菌比例由 1:2 和 1:3 调整为 1:1,转座率明显提高;温度对于转座率具有显著影响,30 °C 和 34 °C 较适于 Vp 接合菌落的培养;34 °C 条件下供受体菌生长速度更为均衡,转座率较 30 °C 更高;37 °C 培养时为接合转座率最低,此时受体菌为明显优势菌株。综上所述,以 Vp 为受体菌的接合转座实验最适条件为:以 1:1 比例混合供、受体菌,34 °C 条件下在 BHI 固体培养基表面培养 48 h。以最优条件进行 Vp 接合转座实验,每块平板上可获得 10-20 个菌落(图 1)。经过双抗性平板筛选之后,排除 5%左右质粒转入菌株。采用上述方法,获得 490 株阳性接合子。

2.2 接合子 PCR 鉴定结果

经过双抗性平板筛选后的接合子,均可扩增出 Km 抗性基因,其条带与供体菌条带大小一致,均

为 492 bp,而亲本菌株则无条带扩出(图 2)。另外,对溶血能力变化的菌株分别进行 Km 和 *tdh* 基因 PCR 检测,结果见图 3。

2.3 接合子溶血能力测定

通过我妻氏血平板的筛选,共得到 5 株溶血表型稳定菌株(图 4),约占突变子总数 1.0% (5/490)。分别编号为: Vp-Tn5-1, Vp-Tn5-2, Vp-Tn5-3, Vp-Tn5-4 和 Vp-Tn5-5。其中, Vp-Tn5-1, Vp-Tn5-2 和 Vp-Tn5-4 为溶血能力下调接合子, Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 为溶血能力上调接合子。各溶血表型变化菌株溶血圈直径见表 3。

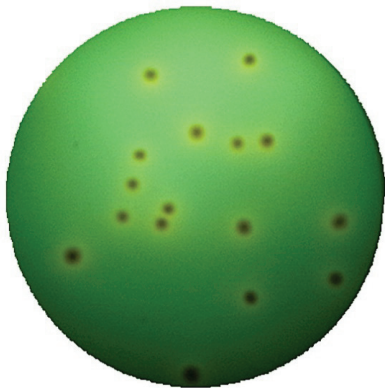


图 1 接合子筛选
Figure 1 Selection of conjugants

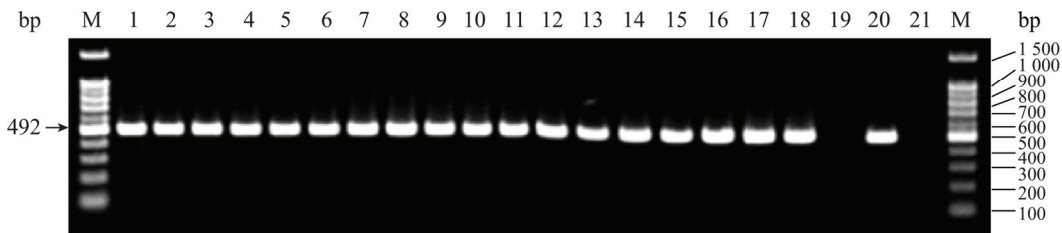
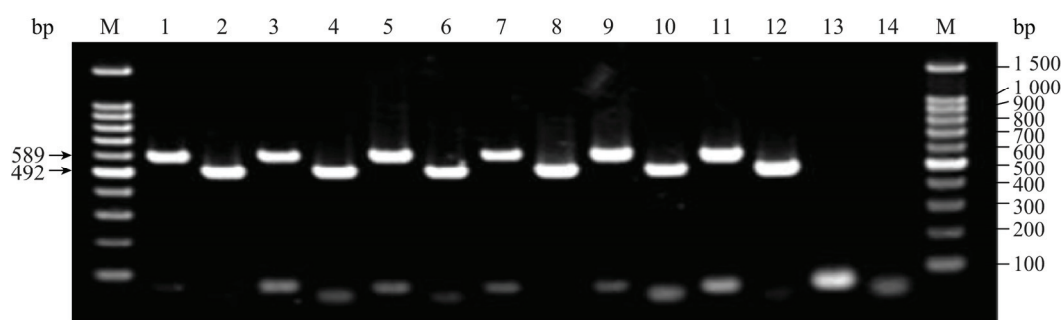


图 2 接合子 Km 抗性基因鉴定
Figure 2 Identification of conjugants Km gene

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1-18: Conjugants; 19: Vp ATCC 33846; 20: *E. coli* S17-1 λ pir (pUT mini-Tn5-Km2); 21: Negative control.

图3 *tdh* 及 *Km* 抗性基因鉴定Figure 3 Identification of *tdh* and *Km* gene

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1: Vp-Tn5-1 *tdh* gene; 2: Vp-Tn5-1 *Km* gene; 3: Vp-Tn5-2 *tdh* gene; 4: Vp-Tn5-2 *Km* gene; 5: Vp-Tn5-3 *tdh* gene; 6: Vp-Tn5-3 *Km* gene; 7: Vp-Tn5-4 *tdh* gene; 8: Vp-Tn5-4 *Km* gene; 9: Vp-Tn5-5 *tdh* gene; 10: Vp-Tn5-5 *Km* gene; 11-12: Positive control; 13-14: Negative control.

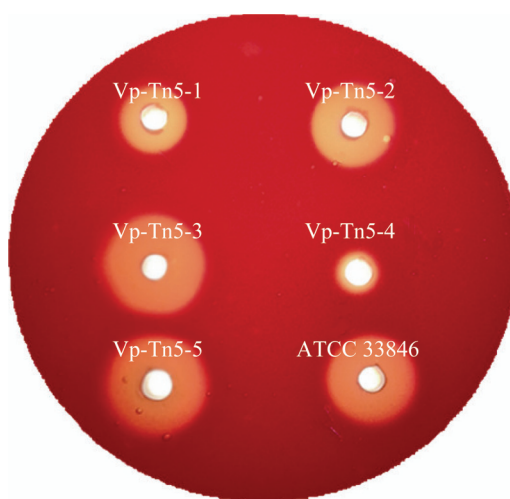


图4 溶血能力图

Figure 4 Hemolytic ability

2.4 生长曲线测定

对溶血表型变化菌株进行生长曲线测定,并与亲本株进行对比。结果显示(图5),溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 生长能力与亲本株相似,于 2 h 进入对数期,28-38 h 相继进入稳定期,最大 OD_{600} 值处于 1.1-1.2 之间。Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 两株溶血能力上调菌株生长速度较慢, OD_{600} 值均

在 4-6 h 内出现大幅度增长;培养 6 h 后,生长速度趋于缓慢;48 h 测定结束时,两菌 OD_{600} 值仍处于缓慢增长状态,未完全进入稳定期。Vp-Tn5-4 生长曲线明显区别于其他菌株,其延滞期长达 5 h,6-13 h 内 OD_{600} 值快速增长,14 h 后趋于缓慢;于培养 28 h 时进入稳定期,稳定期 OD_{600} 值在 1.0 左右,并于 42-44 h 时开始出现衰亡状态。

2.5 接合子运动能力测定

2.5.1 群集能力测定: 群集能力及菌株群集表型呈现一定的规律性。如图 6 所示,溶血能力上调菌株 Vp-Tn5-3 及 Vp-Tn5-5 群集能力相似,较亲本株略有提高。溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-1、Vp-Tn5-2 和 Vp-Tn5-4 中,Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 群集能力与亲本株无明显差别;Vp-Tn5-4 群集能力略有提高。在群集表型方面,经过 60 h 培养,亲本株在培养基表面形成边缘整齐、表面褶皱的圆形菌斑。Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 菌落表型与亲本株相同;Vp-Tn5-4 无法形成与亲本株一致的圆形菌斑,呈不规则的花瓣形,菌落表面更加干燥;Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 菌落表面光滑湿润,呈半流动状态,明显

表3 溶血圈直径
Table 3 Diameter of hemolytic circle

名称 Name	Vp-Tn5-1	Vp-Tn5-2	Vp-Tn5-3	Vp-Tn5-4	Vp-Tn5-5	ATCC 33846
直径 Diameter (mm)	8.88±0.33 ^a	11.64±0.22 ^b	15.35±0.24 ^c	5.12±0.05 ^d	14.87±0.35 ^c	12.30±0.16 ^f

Note: Different letters mean significant difference according to Duncan's text ($P < 0.05$).

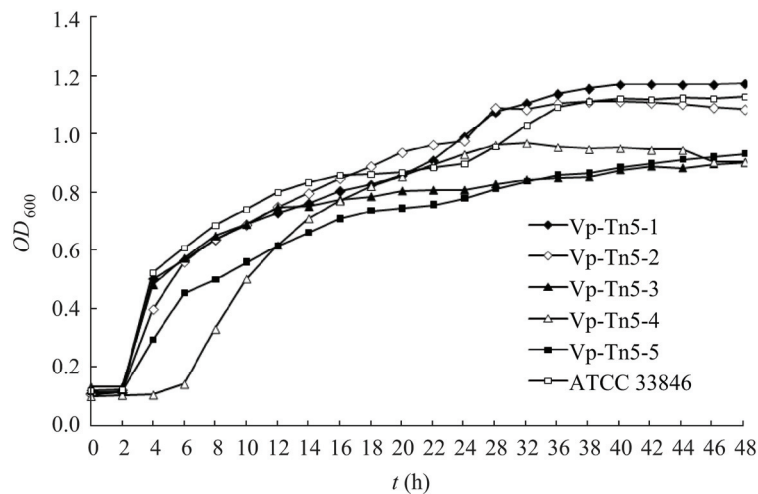


图 5 生长曲线测定图

Figure 5 Growth curve

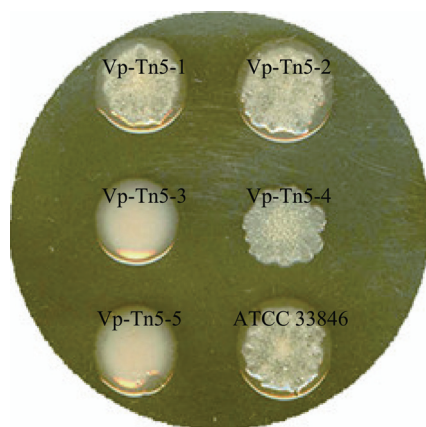


图 6 群集能力图

Figure 6 Swarming ability

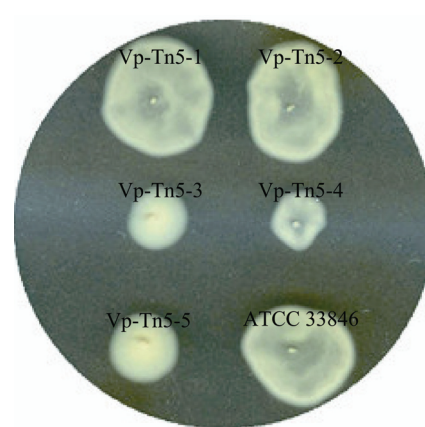


图 7 泳动能力图

Figure 7 Swimming ability

突出于培养基表面, 明显区别于亲本株。以上结果表明, Tn5 转座子插入突变, 对接合子群集能力及菌落形态产生显著影响。

2.5.2 泳动能力测定: 在泳动能力方面(图 7), 溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 与亲本株无明显差别, 且两株菌均呈现出与亲本株相似的表面干燥, 褶皱增多的菌落形态。溶血能力上调菌株 Vp-Tn5-3、Vp-Tn5-5 和溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-4 的泳动能力明显降低, Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 菌落表面呈饱满状态; Vp-Tn5-4 表面干燥, 褶皱增多, 与亲本株相似。

2.6 菌膜形成能力测定

Vp 为菌膜形成能力较强菌株, 亲本株经过 24 h 培养后, 可在气液交界面形成明显菌膜, 染色后测定其在 OD_{595} 条件下平均吸光值达 2.94。阳性接合子菌膜形成能力与亲本株差异显著(图 8)。溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 菌膜形成能力显著提高($P<0.05$), 平均 OD_{595} 值分别达 3.34 和 3.22。另一株溶血能力下调菌株(Vp-Tn5-4)菌膜形成能力有小幅下降, 平均 OD_{595} 值为 2.31。溶血能力上调菌株 Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 菌膜形成能力显著降低($P<0.05$), 平均 OD_{595} 值仅为 0.48 和 0.56。

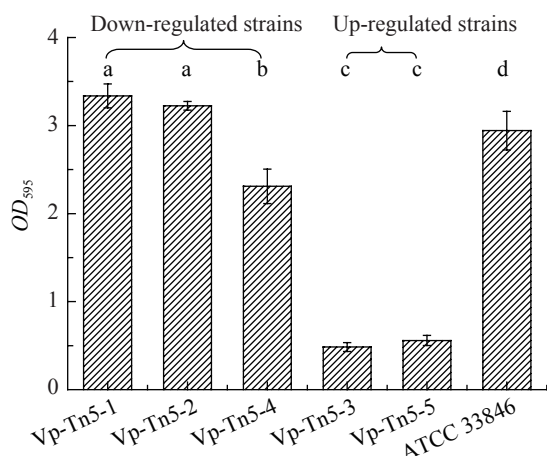


图8 菌膜形成能力图

Figure 8 Ability of biofilm formation

Note: Different letters mean significant difference according to Duncan's text ($P < 0.05$).

3 讨论

耐热直接溶血素是 Vp 主要致病因子之一。在我妻氏血平板上, *tdh* 阳性 Vp 菌株形成特有的神奈川现象是检测 Vp 致病性的依据^[18]。研究 *tdh* 表达机制和调控网络有助于深入认识 Vp 的致病性, 但相关研究并不多见。目前, 仅已知 *toxRS* 基因启动子对于 *tdh* 表达有正调控作用^[19], 而 *hfq* 基因为负调控因子^[20]。本研究利用接合转座方法构建 Vp 突变体库, 筛选溶血表型变化菌株, 为深入挖掘和认识 *tdh* 的调控机制提供研究基础。

实验初期, 我们尝试利用高效率的电击转化方式进行 Vp 突变体库构建, 但最终未能成功获得阳性接合子。可能与 Vp 等弧菌普遍具有分泌胞外 DNA 酶的能力有关^[21-24]。当外源 DNA 浓度较低或与弧菌相互作用时间过长的情况下, DNA 很可能被酶大量降解, 使其很难顺利进入弧菌细胞内并实现插入基因组的活动。基于上述原因, 加之转座子为线性 DNA 片段, 更增加了实验难度。因此, 采用接合转座方法构建 Vp 突变体库。

通过对接合转座前细菌的培养方式进行优化, 最终确定在固体培养基表面生长至对数期的菌体最适于 Vp 接合转座。Biomedal 公司 pUT

mini-Tn5-Cm 质粒说明书建议: 在培养基中加入柠檬酸盐可有效抑制因自杀质粒存在于受体菌体内而形成假阳性接合子情况产生。但以加入柠檬酸盐的 BHI 固体培养基进行培养, 接合菌落呈粘稠的蛋清状, 无法有效重悬于无菌 PBS 中。柠檬酸盐对于 *E. coli* 的生长具有抑制作用。此外, Vp 可分解柠檬酸盐导致培养基 pH 升高, 从而对 *E. coli* 的生长产生更强的抑制作用, 以至于无法获得阳性接合子。在 37 °C 条件下, Vp 生长速度明显大于 *E. coli*, 供受体菌生长速率不相同为接合转座效率较低的原因之一; 而在 30 °C 和 32 °C 条件下, 供受体菌生长相对缓慢, 也不利于提高转座效率。在培养过程中, 菌体量越高, 供体菌与受体菌相互接触并发生转座突变的几率越大。因此, 延长接合培养时间至 48 h, 并将供、受体菌比例调整至 1:1, 使得转座率有了极大提高。经过优化, 确定以 1:1 比例混合供受体菌, 34 °C 条件下在 BHI 固体培养基表面培养 48 h 为以 Vp 为受体菌的接合转座实验最优条件。在此最优条件下, 每 6 个平行接合菌斑共获得 70-80 个阳性接合子。

神奈川试验为国标(GB 4789.7-2013)检测 Vp 致病性的方法^[16], 但溶血结果受诸多因素影响^[25-26]。在初次筛选时, 我们忽略菌液浓度可能对溶血圈大小产生的影响, 均以 10 h 摇菌液进行接菌, 选择溶血圈直径有明显变化的菌株。在第一轮筛选结束时, 共得到 14 株溶血表型变化菌株, 占全部接合子总数的 3.06%。其中, 溶血能力上调及下调菌株各 7 株。将 14 株菌的摇菌液调整至 OD₆₀₀ 为 1.0, 再次进行溶血能力鉴定, 共得到 5 株溶血表型稳定菌株。我们无法确认除 5 株溶血表型稳定接合子外, 仍存在其他因繁殖速率提高而未检测出的溶血能力下调接合子, 以及因繁殖速率降低而未检测到的溶血能力上调接合子。本研究 Vp 突变体库中, 约 1% (5/490) 为溶血表型变化菌株。经 PCR 鉴定, 5 株溶血表型变化菌株中, 转座子均未插入在 *tdh* 基因部位(图 3)。我们推测: Vp 4 832 个基因中^[27],

约 47 个基因可能会参与 *tdh* 的表达调控。

本研究发现运动能力及菌落形态与溶血能力直接相关。溶血能力上调菌株 Vp-Tn5-3 和 Vp-Tn5-5 群集能力增强, 泳动能力减弱, 菌落呈现湿润、半流动及凸起状态, 与亲本株差异显著($P<0.05$)。溶血能力下调菌株 Vp-Tn5-1 和 Vp-Tn5-2 运动性能力和菌落形态与亲本株相比无明显差别, 呈现表面干燥褶皱增多的菌落表型。群集实验中, 这一表型特征培养至 24 h 时即可观察到, 此时各菌落直径约 1 mm, 亲本株和 Vp-Tn5-1、Vp-Tn5-2 两株溶血能力下调菌株菌落表面即出现干燥现象。Vp-Tn5-4 为表型较独特突变株, 其群集能力较亲本株略有降低, 并且形成花瓣状菌斑, 与亲本株圆形菌斑差异明显。泳动能力较亲本株明显降低, 但菌落表面形态与亲本株相似, 推测其泳动能力的改变与生长速度降低有关。

Tn5 插入位点基因的失活, 对于接合子菌膜形成能力产生显著影响。在 5 株溶血表型变化接合子中, 两株溶血能力下调菌株的菌膜形成量较亲本株分别升高了 13.41% 和 9.60%; 两溶血能力上调菌株菌膜形成量较亲本株分别降低了 83.54% 和 81.02%。虽然 Vp-Tn5-4 为溶血能力下调菌株, 但其菌膜形成能力略有下降, 较亲本株降低了 21.51%。我们推测这一现象与其生长能力相关。我们的研究还发现 Vp 溶血能力与菌膜形成能力呈负相关。这与非致病性 Vp 菌株的菌膜形成量高于致病性菌株的结果相似^[28]。

参考文献

- [1] Cai TX, Jiang LY, Huang KH. Research development of molecular biology of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(10): 914-916 (in Chinese)
蔡潭溪, 蒋鲁岩, 黄克和. 副溶血弧菌的分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(10): 914-916
- [2] Liu XM. Studies on the techniques for the monitoring and controlling foodborne illness[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1): 3-9 (in Chinese)
刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9
- [3] Liu XM, Chen Y, Fan YX, et al. Foodborne diseases occurred in 2003-report of the national foodborne diseases surveillance system, China[J]. Journal of Hygiene Research, 2006, 35(2): 201-204 (in Chinese)
刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 201-204
- [4] Li Y, Zhu XQ. Research development of *Vibrio parahaemolyticus* and its hemolytic toxin[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(12): 2835-2839 (in Chinese)
李毅, 朱心强. 副溶血性弧菌及其溶血毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2835-2839
- [5] Baba K, Shirai H, Terai A, et al. Analysis of the *tdh* gene cloned from a *tdh* gene- and *trh* gene-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology and Immunology, 1991, 35(3): 253-258
- [6] Honda T, Ni YX, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin[J]. Infection and Immunity, 1988, 56(6): 961-965
- [7] Yanagihara I, Nakahira K, Yamane T, et al. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin[J]. The Journal Biological Chemistry, 2010, 285(21): 16267-16274
- [8] de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, et al. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(11): 6568-6572
- [9] Nian HJ, Chen LM, Li KZ. Application of Tn5 transposon mutagenesis technology in molecular and genetic researches of gram-negative bacteria[J]. China Biotechnology, 2009, 29(12): 114-118 (in Chinese)
年洪娟, 陈丽梅, 李昆志. Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 114-118
- [10] de Paula Soares C, Rodrigues EP, de Paula Ferreira J, et al. Tn5 insertion in the *tonB* gene promoter affects iron-related phenotypes and increases extracellular siderophore levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus*[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(2): 223-233
- [11] Robert B, Alan M, Melvin S, et al. Transposon mutagenesis of marine *Vibrio* spp.[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(3): 890-896
- [12] Belas R, Mileham A, Cohn D, et al. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*[J]. Science, 1982, 218(4574): 791-793
- [13] Yang ZQ, Geng SZ, Jiao XA. Construction of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular protease defected mutants mediated by Tn5 transposon and study of the extracellular protein toxicity on cells[C]. Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine in 2009, 2009 (in Chinese)
杨振泉, 耿士忠, 焦新安. Tn5 转座子介导副溶血弧菌胞外蛋白酶缺陷体的构建及其胞外蛋白的细胞毒性研究[C]. 中国畜牧兽医学学会 2009 学术年会论文集(下册), 2009
- [14] Zhang Q, Dai M, Liu YH, et al. Comparison of different methods for isolation of bacterial DNA from retail oyster tissues[J]. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 2014, 6(4): 212-215
- [15] Geng SZ, Jiao XA, Chen XJ. Insertion mutagenesis in *Salmonella pullorum* by Mini-Tn5 Transposon[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2008, 39(5): 621-626 (in Chinese)

- 耿士忠, 焦新安, 陈晓娟. 鸡白痢沙门氏菌 Mini Tn5转座子插入突变[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(5): 621-626
- [16] National Standard of the People's Republic of China. GB 4789.7-2013 National food safety standards of food microbiology testing *Vibrio parahaemolyticus* test[S]. (in Chinese)
中华人民共和国国家标准. GB 4789.7-2013食品安全国家标准食品微生物学检验副溶血性弧菌检验[S].
- [17] Whitaker WB, Richards GP, Boyd EF. Loss of sigma factor *RpoN* increases intestinal colonization of *Vibrio parahaemolyticus* in an adult mouse model[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(2): 544-556
- [18] Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, et al. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity[J]. Journal of Bacteriology, 1969, 100(2): 1147-1149
- [19] Lin Z, Kumagai K, Baba K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(12): 3844-3855
- [20] Nakano M, Takahashi A, Su Z, et al. *Hfq* regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 155
- [21] Marcus H, Ketley JM, Kaper JB, et al. Effects of DNase production, plasmid size, and restriction barriers on transformation of *Vibrio cholerae* by electroporation and osmotic shock[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 56(1/2): 149-154
- [22] Hamashima H, Nakano T, Tamura S, et al. Genetic transformation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio cholerae* non O-1 with plasmid DNA by electroporation[J]. Microbiology and Immunology, 1990, 34(8): 703-708
- [23] Kawagishi I, Okunishi I, Homma M, et al. Removal of the periplasmic DNase before electroporation enhances efficiency of transformation in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*[J]. Microbiology, 1994, 140(9): 2355-2361
- [24] Focareta T, Manning PA. Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(10): 2547-2555
- [25] Chun D, Chung JK, Tak R, et al. Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 1975, 12(1): 81-87
- [26] Nishibuchi M, Ishibashi M, Takeda Y, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrio species by the DNA colony hybridization test[J]. Infection and Immunity, 1985, 49(3): 481-486
- [27] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*[J]. The Lancet, 2003, 361(9359): 743-749
- [28] Guo Q, Xu HT, Yang LP, et al. Studies on the biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and the effect of its natural inhibitor under different conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014(10): 110-114 (in Chinese)
郭钦, 徐海棠, 杨龙平, 等. 不同条件下副溶血弧菌生物膜形成规律及其天然抑制物质研究[J]. 食品工业科技, 2014(10): 110-114

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

(下转 p.1769)