

## 研究报告

副溶血弧菌III型分泌系统 *vscG* 基因缺失株的构建及其生物学特性薛娇<sup>1</sup> 廉乐乐<sup>1</sup> 李婉君<sup>1</sup> 任建鸾<sup>1</sup> 汤芳<sup>1</sup> 薛峰<sup>\*1</sup> 戴建君<sup>1,2</sup><sup>1</sup> 南京农业大学动物医学院 动物健康与食品安全国际合作联合实验室 江苏 南京 210095<sup>2</sup> 中国药科大学 江苏 南京 211199

**摘要:**【背景】副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性病原微生物, III型分泌系统(Type III Secretion System, T3SS)在致病过程中发挥重要作用。*vscG* 基因编码的 VscG 蛋白是III型分泌系统的伴侣蛋白。*vscG* 基因在副溶血弧菌中的生物学功能尚未确定。【目的】构建副溶血弧菌 *vscG* 基因的缺失株和回补株, 研究 *vscG* 基因对副溶血弧菌生物学特性的影响。【方法】在副溶血弧菌 POR-1 菌株基础上利用同源重组法构建 *vscG* 基因的缺失株  $\Delta vscG$  和回补株  $C\Delta vscG$ , 分析比较 POR-1、 $\Delta vscG$  和  $C\Delta vscG$  在生长性能、生物被膜形成能力、运动性、溶血活性、细胞黏附和细胞毒性等方面存在的差异。【结果】与 POR-1 菌株相比, 缺失株  $\Delta vscG$  和回补株  $C\Delta vscG$  的生长特性和溶血活性无明显差异, 缺失株  $\Delta vscG$  的生物被膜形成能力下降, 运动性较 POR-1 菌株和回补株  $C\Delta vscG$  增强。细胞感染试验显示, *vscG* 基因的缺失明显降低了副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附和毒性作用。【结论】*vscG* 基因影响副溶血弧菌生物被膜的形成和运动性, 在该菌黏附细胞和发挥细胞毒性过程中具有重要作用, 为进一步探讨副溶血弧菌 T3SS 的致病机理奠定基础。

**关键词:** 副溶血弧菌, III型分泌系统, *vscG* 基因, 生物学特性

Construction and characterization of the *vscG* gene mutant strain of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systemXUE Jiao<sup>1</sup> LIAN Lele<sup>1</sup> LI Wanjuan<sup>1</sup> REN Jianluan<sup>1</sup> TANG Fang<sup>1</sup> XUE Feng<sup>\*1</sup>  
DAI Jianjun<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Joint Laboratory of Animal Health and Food Safety International Cooperation, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China<sup>2</sup> China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211199, China

**Abstract:** [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is an important food-borne pathogenic microorganism. Type III secretion system (T3SS) plays an important role in the pathogenic process of *V. parahaemolyticus*. The VscG protein encoded by the *vscG* gene is a chaperone protein in T3SS. The biological function of *vscG* gene has not been determined. [Objective] To analysis the effect of the *vscG* gene on the biological

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31871893)

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

**Received:** 28-10-2020; **Accepted:** 23-12-2020; **Published online:** 12-03-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(31871893)

**\*通信作者:** E-mail: xuefeng@njau.edu.cn

**收稿日期:** 2020-10-28; **接受日期:** 2020-12-23; **网络首发日期:** 2021-03-12

characteristics, a deletion strain and complement strain of the *vscG* gene were constructed and characterized. **[Methods]** We constructed the *vscG* gene mutant strain and complemented strain of POR-1 strain using the homologous recombination method. Then we analyzed the growth characteristics, biofilm formation, motility, hemolytic activity, cells adhesion and cytotoxicity. **[Results]** Compared with POR-1 strain, the growth characteristics and hemolytic activity of the deletion strain  $\Delta vscG$  and the complementing strain  $C\Delta vscG$  were not significantly different. The biofilm formation ability of  $\Delta vscG$  was reduced. The motility was enhanced of  $\Delta vscG$  as compared with POR-1 and  $C\Delta vscG$ . Cell infection tests showed that the deletion of the *vscG* gene significantly reduced the adhesion and toxicity of *V. parahaemolyticus* to HeLa cells. **[Conclusion]** The *vscG* gene affects the motility and formation of the biofilm of *V. parahaemolyticus*, it plays an important role in the adhesion and cytotoxicity to HeLa cells, laying a foundation for further exploring the pathogenic mechanism of T3SS in *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, T3SS, *vscG* gene, biological characteristics

副溶血弧菌是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 在温暖的海洋和河流中广泛分布<sup>[1]</sup>。人类常通过食用生或未烹饪完全的海产品而感染, 出现伤口感染或急性胃肠炎等症状, 严重者可引发败血症危及生命<sup>[2]</sup>。1950 年在日本大阪首次确认该菌可引起人类感染, 目前已成为食源性疾病的主要病原体之一<sup>[3]</sup>。据报道, 副溶血弧菌还可导致对虾的急性肝胰腺坏死综合征, 给对虾养殖业带来严重危害<sup>[4]</sup>。因此有必要对其毒力特征进行研究。

副溶血弧菌重要的毒力因子主要包括耐热直接溶血素 (Thermostable Direct Hemolysin, TDH)、耐热相关溶血素 (Thermostable Related Hemolysin, TRH)、III 型分泌系统 (Type III Secretion System, T3SS) 和 VI 型分泌系统 (Type VI Secretion System, T6SS) 等<sup>[5]</sup>。T3SS 作为高度组织化的多蛋白纳米装置, 在沙门氏菌<sup>[6]</sup>、大肠杆菌<sup>[7]</sup>、耶尔森氏菌<sup>[8]</sup>和假单胞菌<sup>[9]</sup>等多数革兰氏阴性菌中均存在, 上述菌株通过该装置将效应物注入宿主细胞而引发感染。因此, T3SS 在革兰氏阴性菌感染与致病过程中发挥重要作用。在这些细菌中, T3SS 系统的结构和功能在进化上是保守的; T3SS 由结构蛋白、转运蛋白、调控蛋白、效应蛋白和伴侣蛋白等组成<sup>[8]</sup>。副溶血弧菌具有 2 套 III 型分泌系统 (T3SS1 和 T3SS2), 分别表现为细胞毒性与肠毒性<sup>[5]</sup>。该菌 T3SS1 由 42 个基因 (*vp1656*–*vp1697*) 组成, 其中 30 个基因与编码耶尔

森氏菌装置的基因具有序列相似性<sup>[10]</sup>。耶尔森氏菌 T3SS 装置的结构包括: 嵌入外膜中的 YscC 分泌素环, YscD 和 YscJ 在内膜上形成的跨膜环以及从细菌包膜伸出的 60 nm 长的“针”<sup>[11]</sup>。跨膜环中的输出设备包含 5 个跨膜蛋白: YscR、YscS、YscT、YscU 和 YscV, YscN 与 2 个辅助蛋白 YscK 和 YscL 为底物易位提供了能量<sup>[12]</sup>, 多聚体蛋白 YscQ 形成了基体的胞质部分<sup>[13]</sup>。分泌装置组装完成后, 针状亚基蛋白 YscF 通过新生的注射体输出并聚合成空心针<sup>[11]</sup>。T3SS 针具有螺旋结构, 耶尔森氏菌 T3SS 的针由 87 个 YscF 蛋白组装而成, 并由 LcrV 针尖复合物覆盖<sup>[14]</sup>。在针头组装之前, YscF 先与 2 个分子伴侣蛋白 YscG 和 YscE 结合, 以避免 YscF 在细菌胞浆中的过早聚合<sup>[15]</sup>。分子标尺蛋白 YscP 负责控制 T3SS 注射针的长度<sup>[16]</sup>, YscU 和 YscP 通过控制内杆蛋白 YscI 的分泌协同调节耶尔森氏菌 T3SS 的底物特异性<sup>[17]</sup>。当结构蛋白组装的针装置与宿主细胞接触后, 菌体在针尖复合物与宿主细胞之间组装易位子, 穿透宿主细胞膜为效应蛋白的易位提供管状通道; 递送至宿主细胞质后, 效应蛋白通过操纵宿主细胞信号传导、细胞骨架动力学和炎症反应等过程来引发并维持感染<sup>[18-19]</sup>。最后, 分子伴侣通过隔离细菌细胞质内的效应蛋白和结构蛋白而充当分泌调节剂<sup>[19]</sup>。

*vscG* 基因位于 III 型分泌系统大染色体上, 其

编码的 VscG 蛋白属于 YscG 蛋白家族, 是III型分泌系统的伴侣蛋白。注射体的组装和操作需要 T3SS 伴侣蛋白的协助, 伴侣蛋白可分为 5 类: I 类伴侣蛋白主要与效应蛋白结合; II 类与转运蛋白结合; 以 FliS 为例的鞭毛分子伴侣属于 III 类伴侣蛋白, 在肠致病性大肠杆菌中与 T3SS 的 EspA 细丝蛋白相互作用的 CesA 分子伴侣在结构上不同于其他类别, 属于 IV 类伴侣蛋白; 耶尔森氏菌 YscE 蛋白和 YscG 蛋白与针状蛋白结合, 属于 V 类伴侣蛋白<sup>[15]</sup>。伴侣蛋白具有维持蛋白质稳定、促进并调节蛋白分泌等作用<sup>[20]</sup>。关于 *vscG* 基因在副溶血弧菌致病过程中是否发挥作用的研究未见报道。本研究以 *vscG* 基因为研究对象, 通过在 POR-1 菌株基础上构建缺失株和互补株, 探究 *vscG* 基因在副溶血弧菌生物学特性中的作用, 对于阐明副溶血弧菌 T3SS1 的致病机理具有重要意义, 可为进一步研究革兰氏阴性菌中 T3SS 的致病机制提供试验依据。

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* SM10λpir、质粒 pYAK1 以及 HeLa 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

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), 海博生物技术有限公司; 我妻

氏血琼脂基础、无菌兔红细胞, 山东拓普生物工程有限公司; PrimeSTAR HS (Premix)、TB Green Premix *Ex Taq*, 宝生物工程(大连)有限公司; 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; 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; 细菌基因组 DNA 提纯试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 多功能酶标仪、紫外分光光度计, 帝肯(上海)贸易有限公司。

TCBS 固体培养基(g/L): 酵母浸粉 5.000, 蛋白胨 10.000, 硫代硫酸钠 10.000, 枸橼酸钠 10.000, 牛胆粉 5.000, 牛胆酸钠 3.000, 蔗糖 20.000, 氯化钠 10.000, 柠檬酸铁 1.000, 溴麝香草酚蓝 0.040, 麝香草酚兰 0.040, 琼脂 15.000。

我妻氏血琼脂固体培养基(g/L): 酵母浸膏粉 3.000, 蛋白胨 10.000, 氯化钠 70.000, 甘露醇 10.000, 磷酸氢二钾 5.000, 结晶紫 0.001, 琼脂 15.000。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中公布的副溶血弧菌 RIMD2210633 菌株 T3SS1 中的 *vscG* 基因序列 (NC\_004603.1) 设计引物, 使用软件 Primer Premier 5.0 设计相关引物, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物具体信息见表 1。

表 1 缺失株和回补株的引物信息

Table 1 Information of the primers of the deletion strains and complementation strains

引物名称	序列	产物大小
Primers name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>vscG</i> -1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCAAGTGCCATACGTCATTC	260
<i>vscG</i> -2	TCTGTTGGCGCGCTTTACCGCTGCCTGT	
<i>vscG</i> -3	CGGTAAAGCGCGCCAACAGACAGAGCAGC	457
<i>vscG</i> -4	CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCAGGATCGTCACCGACCATTT	
C- <i>vscG</i> -1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCAAGTGCCATACGTCATTC	1 026
C- <i>vscG</i> -2	TCGGTTGAATGAGCGGGCGTTTGTCCGATAAAGCTAGGGTCGA	
C- <i>vscG</i> -3	TATCGGACAAACGCCCCGCTCATTC AACCGATGTTTCGTCACTA	828
C- <i>vscG</i> -4	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCAAGTGCCATACGTCATTC	
<i>vscG</i> -F	CTCCGCAGCAGTATCAAT	452
<i>vscG</i> -R	CAAGGCAATCAGCAATCG	

#### 1.4 *vscG* 基因缺失株的构建

在副溶血弧菌 RIMD2210633 株中, 常把其重要毒力因子 *tdhA/S* 的缺失株 POR-1 作为研究 T3SS1 的基础菌株, 以消除这些溶血素对宿主细胞的毒性效应<sup>[21]</sup>。参照 Park 等<sup>[10]</sup>方法, 在 POR-1 菌株的基础上构建缺失株  $\Delta vscG$ 。根据细菌基因组 DNA 提纯试剂盒使用说明提取副溶血弧菌 RIMD2210633 菌株基因组 DNA 作为模板, 采用引物对 *vscG*-1/*vscG*-2 和 *vscG*-3/*vscG*-4 分别扩增目的片段的上、下游同源臂, 并进行融合 PCR。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PrimeSTAR HS (Premix) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, DNA 模板(100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 3 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。经酶切、连接, 构建 PYAK1  $\Delta vscG$  自杀性质粒。转化至宿主菌 *Escherichia coli* SM10 $\lambda$ pir 中, 通过接合的方式将重组质粒从供体菌 *Escherichia coli* SM10 $\lambda$ pir 转移至受体菌副溶血弧菌 RIMD2210633 POR-1 菌株中。用含 Cm (10  $\mu$ g/mL)抗性的 TCBS 平板进行筛选, 经 PCR 鉴定, 筛选出完成单交换的菌株。经连续传代, 划线于含 20%蔗糖的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 12 h 左右, 挑取单菌落至含有 20%蔗糖的 LB 培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡条件下培养 6 h, 进行 PCR 鉴定, 筛选出完成第 2 次同源重组后缺失 *vscG* 基因的菌株。

#### 1.5 *vscG* 基因回补株的构建

设计引物, 将回补区域内的 TTG 突变成 TTA 用来区分野生株和缺失株, 两者均编码亮氨酸。利用同源重组的方法构建回补株, 具体方法类似于缺失株的构建。以 RIMD2210633 株基因组 DNA 为模板, 采用上游片段引物对(C-*vscG*-1/C-*vscG*-2)和下游片段引物对(C-*vscG*-3/C-*vscG*-4)分别扩增目的片段的上、下游同源臂, 用 C-*vscG*-1/C-*vscG*-4 引物分别作为上、下游引物进

行融合 PCR, PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PrimeSTAR HS (Premix) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, DNA 模板(100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 3 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物与 PYAK1 载体相连, 进行接合转移将重组质粒从 *Escherichia coli* SM10 $\lambda$ pir 转移至上述构建的缺失株中。连续传代诱导其发生第 2 次同源重组, 经 PCR 鉴定筛选出回补成功的菌株 C $\Delta vscG$ 。

#### 1.6 荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测

挑取 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  单菌落于 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.8 左右, 根据细菌总 RNA 提取试剂盒使用说明提取细菌 RNA, 逆转录为 cDNA, 将 DnaK-RT 作为内参引物, 用 *vscG*-RT 引物进行荧光定量 PCR 检测各菌株 *vscG* 基因的转录水平。RT-qPCR 反应体系(20  $\mu$ L): TB Green Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。RT-qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算数据。重复 3 次试验, 荧光定量 PCR 所用引物具体信息如表 2 所示。

#### 1.7 生长曲线测定

挑取 POR-1、 $\Delta vscG$  和 C $\Delta vscG$  单菌落于 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。将  $OD_{600}$  调至 1.0, 按 1:100 的比例转接至 50 mL LB 液体培

表 2 荧光定量 PCR 所用引物信息

Table 2 Information of the primers used for RT-qPCR

引物名称 Primers name	序列 Sequence (5'→3')
DnaK-RT-F	ACTGCTTCGTCAGGGTTC
DnaK-RT-R	GTCAGACTCGTATGCCAATG
<i>vscG</i> -RT-F	CTGATGAACAAAGGCGCGTA
<i>vscG</i> -RT-R	CTTGAGCTGCCAGTTCCATC

培养基中, 继续振荡培养, 每隔 1 h 测量每个菌株的  $OD_{600}$ , 重复 3 次, 共测 14 h。

### 1.8 生物被膜形成能力测定

将上述 3 种菌株接种于 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 条件下培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 将菌液按 1:100 稀释。取 200  $\mu$ L 稀释后的菌液于无菌 96 孔平底细胞板中, 每种菌做 6 个复孔, 用新鲜 LB 液体培养基加入孔中作为阴性对照。将细胞板于 37 °C 培养箱中静置培养 48 h, 吸净菌液, 使用无菌磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Solution, PBS)清洗孔, 干燥后每孔加 200  $\mu$ L 甲醇固定 15 min, 吸净甲醇, 干燥后用 1% 结晶紫溶液染色 5 min, 使用 ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次。完全干燥后使用 95% 乙醇溶液溶解黏附的被膜, 测定  $OD_{595}$  数值。

### 1.9 运动性测定

配制 3 g/L 琼脂含量的 LB 固体培养基, 风干过夜待用。在 37 °C、180 r/min 摇床振荡条件下, 将各菌株培养至  $OD_{600}$  为 1.0, 取 2  $\mu$ L 菌液垂直点在上述培养基表面, 37 °C 静置培养 18 h 后, 测量细菌圆形运动轨迹的直径并拍照。

### 1.10 溶血活性测定

在 37 °C、180 r/min 摇床振荡条件下, 将 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  培养至  $OD_{600}$  为 1.0 左右, 取 2  $\mu$ L 菌液点在我妻氏血平板表面, 37 °C 静置培养 18 h 后测量其溶血直径。

### 1.11 细胞黏附测定

使用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞于 24 孔板中, 待单层细胞密度为 90% 左右时, 用 DMEM 清洗 2 次后待用。37 °C、180 r/min 条件下将 POR-1、 $\Delta vscG$  和 C $\Delta vscG$  菌株培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 将菌量调成一致, 用无菌 PBS 洗涤 3 次后用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬。以 10:1 的感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)感染 HeLa 细胞, 将等量的菌量添加到等量的培养基中, 作为细菌数的对照。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 2 h。用灭菌的

PBS 清洗 1 次以去除未黏附的细胞, 每孔加 200  $\mu$ L 预冷的 0.1% TritonX-100 裂解 10 min。收集裂解液并用灭菌的 PBS 进行 10 倍比稀释, 并涂布于 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜, 每个稀释度做 3 个重复。记录菌落数, 并计算黏附率, 黏附率=(黏附细菌数/细菌总数)×100%。

### 1.12 细胞毒性测定

将 HeLa 细胞培养于 96 孔板中, 待单层细胞密度为 80% 左右时, 用灭菌的 PBS 清洗 2 次后待用。在 37 °C、180 r/min 摇床振荡条件下, 将 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 将  $OD_{600}$  调至 0.2 左右, 用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬。设置背景空白孔、样品对照孔、样品最大酶活性对照孔和样品孔。按 MOI=10:1 感染 HeLa 细胞, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 2 h, 每种菌重复 6 个孔。使用乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒进行检测。感染 1 h 后, 在样品最大酶活性对照孔中加入 LDH 释放试剂, 吹打混匀后继续作用 1 h。取出细胞培养板, 400×g 离心 5 min, 每孔取 120  $\mu$ L 上清液于另一新的 96 孔板, 加入 LDH 检测工作液避光作用 30 min, 在 490 nm 处测定吸光度。

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-样品对照孔吸光度)×100%。

### 1.13 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图, 使用 SPSS 软件对数据进行统计学分析, 结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 进行 *t* 检验分析,  $P<0.05$  表示差异显著,  $P<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *vscG* 基因缺失株和回补株的鉴定

利用同源重组法构建 *vscG* 基因缺失株, 对挑取的疑似阳性克隆株进行 PCR 鉴定。用引物对 *vscG*-1/*vscG*-4 进行 PCR 扩增, 野生株 RIMD2210633

扩增出 1 854 bp 大小目的片段, 而缺失株  $\Delta vscG$  扩增出 717 bp 大小的目的片段。用内部引物对 *vscG*-F/*vscG*-R 进行检测, 野生株无条带, 说明基因缺失株  $\Delta vscG$  构建成功(图 1A)。

以 RIMD2210633 株基因组为模板, 用回补引物对扩增 *vscG* 基因互补片段, 构建回补株。用引物对 C-*vscG*-1/C-*vscG*-4 和 *vscG*-F/*vscG*-R 进行鉴定, 结果如图 1B 所示。引物扩增条带与野生株一致, 表明回补株 C $\Delta vscG$  构建成功。

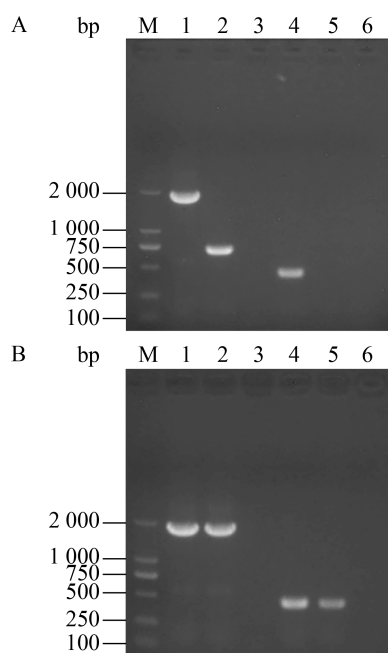


图 1 *vscG* 基因缺失株和回补株的 PCR 鉴定

**Figure 1 PCR identification of the *vscG* gene-deleted and gene-complemented strains**

注: M: DL2000 DNA Marker. A: 基因缺失株 PCR 鉴定; 1-3: *vscG*-1/*vscG*-4 引物对依次检测 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和阴性对照; 4-6: *vscG*-F/*vscG*-R 引物对检测 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和阴性对照。B: 基因回补株 PCR 鉴定; 1-3: C-*vscG*-1/C-*vscG*-4 引物对依次检测 POR-1、回补株 C $\Delta vscG$  和阴性对照; 4-6: *vscG*-F/*vscG*-R 引物对检测 POR-1、回补株 C $\Delta vscG$  和阴性对照  
Note: M: DL2000 DNA Marker. A: PCR identification of the gene-deleted strain; 1-3: Primers *vscG*-1/*vscG*-4 were used to detect the POR-1,  $\Delta vscG$  and negative control; 4-6: Primers *vscG*-F/*vscG*-R were used to detect the POR-1,  $\Delta vscG$  and negative control. B: PCR identification of the gene-complemented strain; 1-3: Primers C-*vscG*-1/C-*vscG*-4 were used to detect the POR-1, C $\Delta vscG$  and negative control; 4-6: Primers *vscG*-F/*vscG*-R were used to detect the POR-1, C $\Delta vscG$  and negative control

## 2.2 RT-qPCR 验证

采用 RT-qPCR 对 POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  进行目的基因转录分析, 结果显示, 缺失株  $\Delta vscG$  无目的基因转录, 而野生株和互补株中均有一定水平的转录(图 2)。

## 2.3 生长性能差异比较

POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  的生长曲线结果显示(图 3): POR-1、 $\Delta vscG$  和 C $\Delta vscG$  的生长速度无明显差异( $P>0.05$ ), 表明 *vscG* 基因的缺失对副溶血弧菌的生长性能无明显影响。

## 2.4 生物被膜形成能力比较

为了分析 *vscG* 基因对于副溶血弧菌 RIMD2210633 POR-1 菌株生物被膜形成能力的影

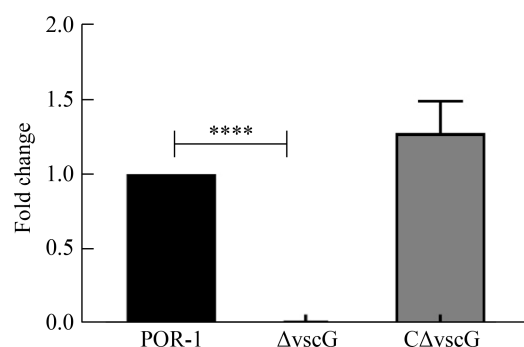


图 2 POR-1、 $\Delta vscG$  及 C $\Delta vscG$  菌株的 *vscG* 基因表达情况

**Figure 2 *vscG* gene expression of POR-1,  $\Delta vscG$  and C $\Delta vscG$**

Note: \*\*\*\*:  $P<0.0001$

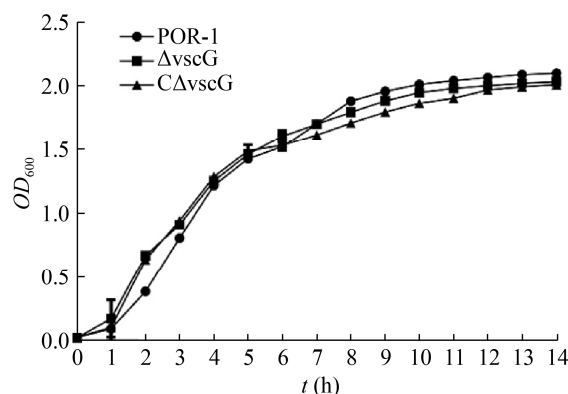


图 3 POR-1、 $\Delta vscG$  及 C $\Delta vscG$  菌株的生长曲线测定  
**Figure 3 Growth curve determination of POR-1,  $\Delta vscG$  and C $\Delta vscG$**

响, 用结晶紫染色法对各菌株的生物被膜进行定量。结果显示(图 4): 与 POR-1 菌株相比, 缺失株  $\Delta vscG$  的生物被膜形成能力显著下降( $P<0.01$ ), 回补株生物被膜形成能力稍有恢复( $P<0.05$ ), 提示该基因参与调控生物被膜的形成。

## 2.5 运动性能比较

POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  的运动性检测结果表明: 除 POR-1 菌株外, 各菌株均表现出明显的运动性, 在 3 g/L 琼脂含量的 LB 平板上呈半透明圆形运动轨迹(图 5A)。圆形运动轨迹的直径测定发现: 缺失株  $\Delta vscG$  的运动能力极显著增强( $P<0.0001$ ), 回补株 C $\Delta vscG$  运动能力稍有恢复( $P<0.05$ ), 见图 5B。提示 *vscG* 基因可能抑制了副溶血弧菌 POR-1 菌株的运动性。

## 2.6 溶血活性试验

POR-1、缺失株  $\Delta vscG$  和回补株 C $\Delta vscG$  的溶血试验结果(图 6)显示: POR-1、 $\Delta vscG$ 、C $\Delta vscG$  对兔红细胞的溶血性没有明显差异( $P>0.05$ ), 说明 *vscG* 基因的敲除并不影响副溶血弧菌 RIMD2210633 对兔红细胞的溶血活性。

## 2.7 细胞黏附试验

将各菌株以 MOI=10:1 感染 HeLa 细胞, 黏附

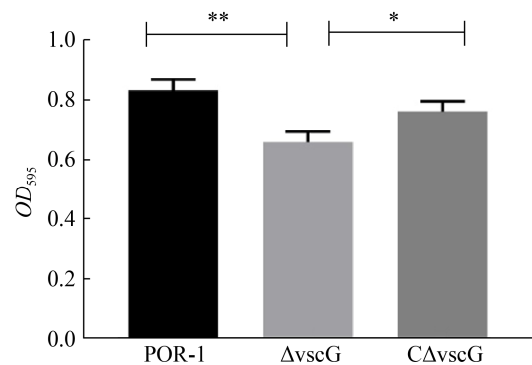


图 4 POR-1、 $\Delta vscG$  及 C $\Delta vscG$  菌株的生物被膜形成能力测定

Figure 4 Biofilm formation ability of POR-1,  $\Delta vscG$  and C $\Delta vscG$

Note: \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$

结果显示缺失株  $\Delta vscG$  对 HeLa 细胞的黏附能力显著低于 POR-1 菌株( $P<0.001$ ), 回补株的黏附能力得到部分恢复(图 7)。表明 *vscG* 基因参与副溶血弧菌 RIMD2210633 对 HeLa 细胞的黏附过程。

## 2.8 细胞毒性试验

将菌株感染 HeLa, 通过检测细胞乳酸脱氢酶活性, 对细胞毒性进行定量分析。结果显示(图 8): 与 POR-1 菌株相比, 缺失株对 HeLa 细胞的毒性极显著下降( $P<0.0001$ ), 提示 *vscG* 基因与副溶血弧菌 RIMD2210633 的细胞毒性相关。

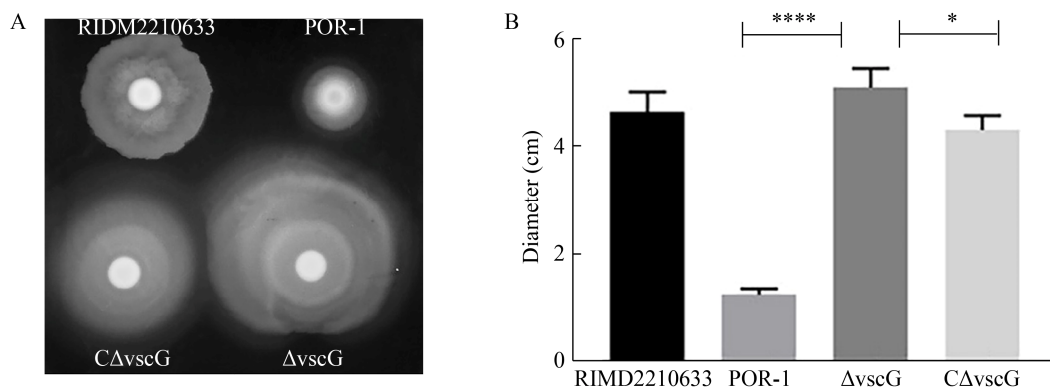


图 5 POR-1、 $\Delta vscG$  及 C $\Delta vscG$  菌株的运动性测定

Figure 5 Motility assay of POR-1,  $\Delta vscG$  and C $\Delta vscG$

注: A: 菌株的运动轨迹; B: 菌株的运动半径。\*:  $P<0.05$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$

Note: A: The swimming pattern of the strains; B: The mobility zone diameter of the strains. \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$

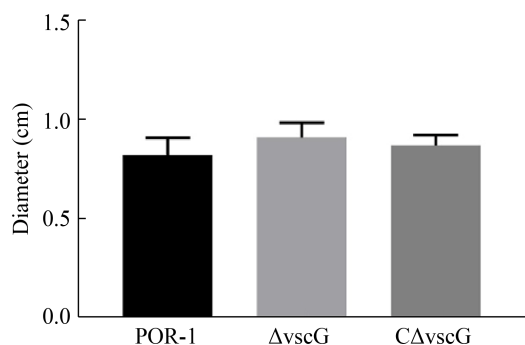


图6 POR-1、ΔvscG 及 CΔvscG 菌株的溶血活性测定  
Figure 6 Hemolytic activity assay of POR-1, ΔvscG and CΔvscG

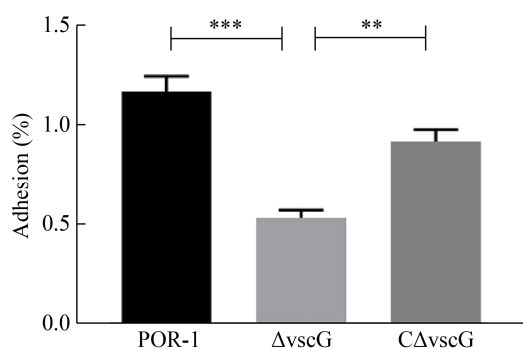


图7 POR-1、ΔvscG 及 CΔvscG 菌株对 HeLa 细胞的黏附试验

Figure 7 Adhesion assay of POR-1, ΔvscG and CΔvscG to HeLa cells

Note: \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$

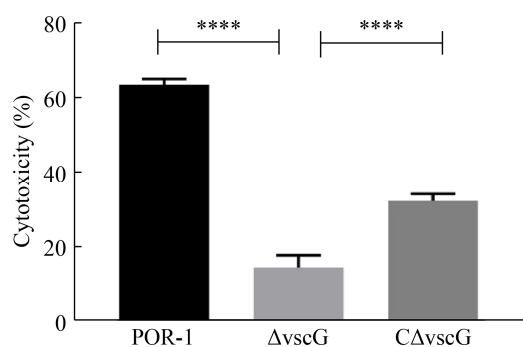


图8 POR-1、ΔvscG 及 CΔvscG 菌株对 HeLa 细胞的毒性试验

Figure 8 Cytotoxicity assay of POR-1, ΔvscG and CΔvscG on HeLa cells

Note: \*\*\*\*,  $P < 0.0001$

### 3 讨论与结论

副溶血弧菌普遍存在于牡蛎、比目鱼、蛤蜊和螃蟹等海产品中,属于革兰氏阴性致病菌,可引起海鲜源性胃肠炎。T3SS 是一种类似于注射器的多组分装置,其能够分泌效应物并横跨菌体细胞膜将效应物运输到宿主细胞内<sup>[22-23]</sup>。T3SS1 在副溶血弧菌中普遍存在,而 T3SS2 的流行仅限于致病性菌株中。在组织培养的感染模型中, T3SS1 是细胞毒性所必需的,而在兔回肠感染模型中, T3SS2 与肠毒性有关<sup>[24]</sup>。

T3SS 组装过程中的重要环节是外部针头结构的选择性识别、分泌和组装, T3SS 针蛋白的分泌和聚合是一个高度受控的过程,对于所有 T3SS 系统的组装和功能都是至关重要的<sup>[15]</sup>。耶尔森菌、沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌、假单胞菌中 T3SS 的针分别由单个 YscF、PrgI、MxiH、EscF 和 PscF 蛋白聚合形成内径为 2.5 nm、长度为 40–60 nm 的空心导管<sup>[6-9]</sup>。根据注释, VscG 蛋白属于 YscG 蛋白家族,是针状蛋白的伴侣蛋白。副溶血弧菌 T3SS1 中 *vscG* 基因的功能未见报道,本研究通过同源重组技术构建了 *vscG* 基因缺失株和回补株,分析比较其生物学功能。测定生长曲线发现 *vscG* 基因的缺失并不影响副溶血弧菌的生长性能。副溶血弧菌有 2 种不同类型的鞭毛系统:极生鞭毛和侧生鞭毛,使其能够适应不断变化的环境。极生鞭毛由 6 种不同的鞭毛蛋白组成,主要用于游泳,并且有鞘,这可能有助于附着<sup>[25]</sup>。运动性试验结果显示 *vscG* 基因缺失株的运动性增强,表明 *vscG* 基因抑制了副溶血弧菌的运动性。生物膜由多糖、胞外聚合物基质、胞外 DNA 和蛋白质组成,其通过减缓细菌的扩散来保护菌体免受宿主防御系统和抗生素的侵害<sup>[26]</sup>,高生物膜聚集性显示出更大的感染性<sup>[27]</sup>。生物被膜试验结果可见缺失株 ΔvscG 的生物被膜形成能力下降。由此可见, *vscG* 基因的表达能够增强副溶血弧菌的生存能力。有类似研究表明, T3SS1 主要影响生

物膜的形成、运动性和细胞毒性,并有助于环境中副溶血弧菌的存活<sup>[28]</sup>。T3SS1 主要通过诱导细胞自噬、变圆和裂解等发挥细胞毒性<sup>[24]</sup>,细菌定殖并黏附于物体表面是生物被膜形成的第一步,黏附试验和细胞毒性试验发现缺失了 *vscG* 基因后副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附能力大大降低,细胞毒性也显著下降,说明 *vscG* 基因表达有助于副溶血弧菌对 HeLa 细胞产生毒性作用。

Sun 等在细菌胞浆中发现 YscF 与异二聚体 YscE/YscG 分子伴侣形成异源三聚体 YscEFG<sup>[15]</sup>,与其同源的铜绿假单胞菌和嗜水气单胞菌中也存在 PscEFG 复合物和 AscEG 复合物<sup>[9]</sup>。YscG、PscG 和 AscG 是四肽重复序列家族蛋白,分别与 YscF、PscF 和 AscF 的 C 端直接结合<sup>[29]</sup>。YscE、PscE 和 AscE 是小的螺旋状的肽,可直接与 YscG、PscG 和 AscG 的 N 端区域相互作用,但不与针状亚基蛋白(YscF、PscF 和 AscF)接触<sup>[15]</sup>。Quinaud 等证明,在铜绿假单胞菌中 PscE 和 PscG 将针状蛋白 PscF 募集到复合物中,从而阻止了 PscF 的聚合<sup>[29]</sup>。YscG 和 YscE 作为伴侣蛋白可防止细菌胞质中 YscF 蛋白在组装针之前的过早聚合,并且是分泌 YscF 所必需的;在 YscEFG 复合物中与 YscF 的所有分子间接触均是由伴侣蛋白 YscG 介导的,YscG 充当支架以组织 YscE 和 YscF 组装成异源三聚体复合物<sup>[15]</sup>。T3SS 存在于多种动植物病原体中,其中大多数具有与 YscF 和其他已知 T3SS 针蛋白的同源物,但是只有少数 T3SS 具有可识别的 YscE 和 YscG 直系同源物;这表明那些具有 T3SS 并且可以编码针状蛋白但缺乏 YscE 和 YscG 同源物的生物,例如弗氏志贺氏菌和鼠伤寒沙门氏菌,在组装分泌装置之前采用了不同的机制来控制其针状蛋白的过早聚合<sup>[15]</sup>。

本文探索了副溶血弧菌 *vscG* 基因缺失株和回补株的生物学特性和细胞毒性,初步揭示了 *vscG* 基因影响副溶血弧菌的生物被膜形成能力和运动能力,并对该菌在 HeLa 细胞黏附和毒性方面发挥

重要作用。然而,VscG 蛋白在针头组装过程中所发挥的作用及其致病机制还有待进一步的研究。

## 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] Jones JL, Ludeke CHM, Bowers JC, Garrett N, Fischer M, Parsons MB, Bopp CA, DePaola A. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(7): 2343-2352
- [3] Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558
- [4] Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(1): 45-55
- [5] Wang RZ, Zhong YF, Gu XS, Yuan J, Saeed AF, Wang SH. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 144
- [6] Kubori T, Sukhan A, Aizawa SI, Galan JE. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 2000, 97(18): 10225-10230
- [7] Wilson RK, Shaw RK, Daniell S, Knutton S, Frankel G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Cellular Microbiology, 2001, 3(11): 753-762
- [8] Hoiczky E, Blobel G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(8): 4669-4674
- [9] Quinaud M, Plé S, Job V, Contreras-Martel C, Simorre JP, Attree I, Dessen A. Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 2007, 104(19): 7803-7808
- [10] 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
- [11] Cao SY, Liu WB, Tan YF, Yang HY, Zhang TT, Wang T, Wang XY, Song YJ, Yang RF, Du ZM. An interaction between the inner rod protein YscI and the needle protein YscF is required to assemble the needle structure of the *Yersinia* type three secretion system[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(13): 5488-5498

- [12] Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM, Schneewind O. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3525-3534
- [13] Diepold A, Kudryashev M, Delalez NJ, Berry RM, Armitage JP. Composition, formation, and regulation of the cytosolic C-ring, a dynamic component of the type III secretion injectisome[J]. *PLoS Biology*, 2015, 13(1): e1002039
- [14] Mueller CA, Broz P, Müllerl 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
- [15] Sun P, Tropea JE, Austin BP, Cherry S, Waugh DS. Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3): 819-830
- [16] Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler[J]. *Science*, 2003, 302(5651): 1757-1760
- [17] Wood SE, Jin J, Lloyd SA. YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(12): 4252-4262
- [18] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(34): 12497-12502
- [19] Burdette DL, Seemann J, Orth K. *Vibrio* VopQ induces PI3-kinase-independent autophagy and antagonizes phagocytosis[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(4): 639-649
- [20] Losada LC, Hutcheson SW. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(3): 941-953
- [21] Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Iida T, Honda T. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48(4): 313-318
- [22] Matsuda S, Okada R, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Gotoh K, Iida T, Kodama T. Export of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(5): 781-788
- [23] 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)  
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
- [24] Piñeyro P, Zhou XH, Orfe LH, Friel PJ, Lahmers K, Call DR. Development of two animal models to study the function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(11): 4551-4559
- [25] Brenzinger S, Pecina A, Mrusek D, Mann P, Völse K, Wimmi S, Ruppert U, Becker A, Ringgaard S, Bange G, et al. ZomB is essential for flagellar motor reversals in *Shewanella putrefaciens* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 109(5): 694-709
- [26] Gocer H, Emir D, Önger ME, Dabak N. Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation: an *in vitro* study[J]. *Joint Diseases and Related Surgery*, 2017, 28(1): 13-18
- [27] Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 244-247
- [28] 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
- [29] Quinaud M, Chabert J, Faudry E, Neumann E, Lemaire D, Pastor A, Elsen S, Dessen A, Attree I. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(43): 36293-36300