

ToxR 负调控副溶血弧菌中 c-di-GMP 的合成

张苗苗¹, 薛星帆¹, 孙君芳², 吴齐敏², 李雪², 周冬生³, 倪斌¹, 陆仁飞², 张义全^{1,2}

1 江苏大学 医学院, 江苏 镇江 212013

2 南通大学附属南通第三医院检验科, 江苏 南通 226006

3 北京微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全重点实验室, 北京 100071

张苗苗, 薛星帆, 孙君芳, 吴齐敏, 李雪, 周冬生, 倪斌, 陆仁飞, 张义全. ToxR 负调控副溶血弧菌中 c-di-GMP 的合成. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4719-4730.

ZHANG MM, XUE XF, SUN JF, WU QM, LI X, ZHOU DS, NI B, LU RF, ZHANG YQ. ToxR represses the synthesis of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4719-4730.

摘 要: 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是世界范围内引起海产品相关食物中毒的主要致病菌, 具有很强的生物膜形成能力。ToxR 是一种膜结合调控蛋白, 对副溶血弧菌生物膜形成具有一定的调控作用, 但具体机制尚未见报道。c-di-GMP 是一种普遍存在于细菌中重要的第二信使, 参与调控细菌的多种生物学行为包括生物膜的形成。本文探究 ToxR 对副溶血弧菌中 c-di-GMP 代谢的调控作用。利用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定副溶血弧菌野生株 (wild-type, WT) 和 *toxR* 突变株 ($\Delta toxR$) 中 c-di-GMP 水平的差异。挑选 c-di-GMP 代谢相关基因 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 为进一步研究的靶标, 采用实时定量 qPCR 实验检测靶基因在 WT 和 $\Delta toxR$ 中的转录水平差异; 将靶基因调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中无启动子的 β 半乳糖苷酶基因上游, 采用 *lacZ* 报告基因融合实验进一步研究 ToxR 对靶基因的转录调控关系; 将重组质粒分别导入含有 pBAD33 或 pBAD33-*toxR* 的 EC100 λ pir 中, 采用 *lacZ* 报告基因融合实验研究 ToxR 是否能在异体宿主中调控靶基因的表达; PCR 扩增靶基因上游调控区 DNA 序列, 并纯化 His-ToxR 蛋白, 用凝胶阻滞实验 (electrophoresis mobility shift assay, EMSA) 研究 His-ToxR 与靶基因启动子区 DNA 序列是否具有结合作用。ELISA 结果显示 $\Delta toxR$ 中 c-di-GMP 含量显著性高于 WT 中的, 说明 ToxR 抑制 c-di-GMP 的产生; 实时定量 qPCR 结果表明 WT 中 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的转录水平显著性高于 $\Delta toxR$ 中的, 表明 ToxR 抑制它们的转录; *lacZ* 报告基因融合实验结果表明 ToxR 可抑制副溶血弧菌和 EC100 λ pir 中 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子区活性; EMSA 实验显示

Received: October 16, 2021; Accepted: May 19, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82072239); Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (JUSRP121061)

Corresponding authors: ZHANG Yiquan. E-mail: zhangyiquanq@163.com
LU Renfei. E-mail: rainman78@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (82072239); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP121061)

His-ToxR 能特异性地结合到 *scrA* 和 *scrG* 的上游调控区 DNA 序列上, 而对 *vpa0198* 的上游调控区 DNA 序列无结合作用。综上所述, ToxR 通过直接调控相关酶蛋白基因的转录来抑制副溶血弧菌内 c-di-GMP 的合成, 从而有助于精确调控生物膜形成等细菌行为。

关键词: 副溶血弧菌; 转录调控; ToxR; c-di-GMP

ToxR represses the synthesis of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Miaomiao¹, XUE Xingfan¹, SUN Junfang², WU Qimin², LI Xue²,
ZHOU Dongsheng³, NI Bin¹, LU Renfei², ZHANG Yiquan^{1,2}

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

2 Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nantong Hospital 3 of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus*, the main pathogen causing seafood related food poisoning worldwide, has strong biofilm formation ability. ToxR is a membrane binding regulatory protein, which has regulatory effect on biofilm formation of *V. parahaemolyticus*, but the specific mechanism has not been reported. c-di-GMP is an important second messenger in bacteria and is involved in regulating a variety of bacterial behaviors including biofilm formation. In this study, we investigated the regulation of ToxR on c-di-GMP metabolism in *V. parahaemolyticus*. Intracellular c-di-GMP in the wild type (WT) and *toxR* mutant ($\Delta toxR$) strains were extracted by ultrasonication, and the concentrations of c-di-GMP were then determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Three c-di-GMP metabolism-related genes *scrA*, *scrG* and *vpa0198* were selected as the target genes. Quantitative real-time PCR (q-PCR) was employed to calculate the transcriptional variation of each target gene between WT and $\Delta toxR$ strains. The regulatory DNA region of each target gene was cloned into the pHR309 plasmid harboring a promoterless *lacZ* gene. The recombinant plasmid was subsequently transferred into WT and $\Delta toxR$ strains to detect the β -galactosidase activity in the cellular extracts. The recombinant *lacZ* plasmid containing each of the target gene was also transferred into *E. coli* 100 λ pir strain harboring the pBAD33 plasmid or the recombinant pBAD33-*toxR* to test whether ToxR could regulate the expression of the target gene in a heterologous host. The regulatory DNA region of each target gene was amplified by PCR, and the over-expressed His-ToxR was purified. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to verify whether His-ToxR directly bound to the target promoter region. ELISA results showed that the intracellular c-di-GMP level significantly enhanced in $\Delta toxR$ strain relative to that in WT strain, suggesting that ToxR inhibited the production of c-di-GMP in *V. parahaemolyticus*. qPCR results showed that the mRNA levels of *scrA*, *scrG* and *vpa0198* significantly increased in $\Delta toxR$ strain relative to those in WT strain, suggesting that ToxR repressed the

transcription of *scrA*, *scrG* and *vpa0198*. *lacZ* fusion assay showed that ToxR was able to repress the promoter activities of *scrA*, *scrG* and *vpa0198* in both *V. parahaemolyticus* and *E. coli* 100λpir. EMSA results showed that His-ToxR was able to bind to the regulatory DNA regions of *scrA* and *scrG*, but not to the regulatory DNA region of *vpa0198*. In conclusion, ToxR inhibited the production of c-di-GMP in *V. parahaemolyticus* via directly regulating the transcription of enzyme genes associated with c-di-GMP metabolism, which would be beneficial for *V. parahaemolyticus* to precisely control bacterial behaviors including biofilm formation.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; transcriptional regulation; ToxR; c-di-GMP

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰氏阴性、嗜盐弧菌, 属弧菌属, 广泛地分布于海河交界口及海洋生态系统中, 是世界范围内海产品相关性食物中毒的主要病原菌^[1]。副溶血弧菌有较强的表面生物膜形成能力, 可以提高菌体对不利生存环境的适应性和对宿主的致病性^[2]。副溶血弧菌生物膜的形成需要许多特定的结构和物质, 包括鞭毛、IV型菌毛、荚膜多糖、胞外多糖、蛋白质等^[2-3]。此外, 生物膜的形成还是一个被多种因素严格调控的复杂过程, 如密度感应系统、环二鸟苷酸 (c-di-GMP) 等均可调节副溶血弧菌的生物膜形成^[2,4]。

c-di-GMP是一种普遍存在于细菌中重要的第二信使。二鸟苷酸环化酶 (diguanylate cyclase, DGC) 催化两分子的GTP生成c-di-GMP, 磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 可将其降解为两分子的GMP或线性pGpG^[5]。DGC含有GGDEF结构域, 而PDE含有EAL或HD-GYP结构域^[6]。c-di-GMP控制细菌的多种生物学行为, 包括运动、毒力因子表达、生物膜形成和细胞周期等^[7]。胞内c-di-GMP浓度的升高可以促进生物膜的形成, 但抑制细菌的运动^[7]。因此, 细菌内c-di-GMP的合成与降解应是一个被严格控制的过程。副溶血弧菌菌株RIMD2210633的基因组中含有50多个可编码含有GGDEF和/或EAL结构域蛋白质的基因^[8], 目前只有少数

几个基因被证明可以参与c-di-GMP代谢。其中, ScrC (*scrABC*操纵子编码) 和ScrG同时包含GGDEF和EAL结构域, 但在正常生理条件下它们仅具有PDE活性^[9-10]。ScrO含有GGDEF结构域, 能促进生物膜形成并且对菌落形态具有调控作用^[11]。ScrJ和ScrL含有GGDEF结构域, 而LafV含有EAL结构域, 但三者均负调控副溶血弧菌的爬动能力^[12]。GefA含有GGDEF结构域, 可抑制副溶血弧菌的爬动能力, 但能促进生物膜的形成^[13]。TpdA具有PDE活性, 能增强运动能力、降低生物膜的形成^[14]。此外, 已发表的可能与c-di-GMP代谢有关的基因还包括 *vpa1176*、*vp0117*、*vp0699*、*vp2979* 和 *vpa0198*^[15], 其具体功能尚未阐明。

ToxR 是一种膜结合调控蛋白, 在低密度时转录水平最高, 为副溶血弧菌的毒力调控因子^[16]。ToxR 对副溶血弧菌关键毒力因子 (如直接耐热溶血素、III型分泌系统等) 基因的转录均具有直接的调控作用^[17-18]。ToxR 自身基因的转录受群体感应系统核心调控子 AphA 和 ToxR 的抑制^[16]。此外, ToxR 和 CalR 之间具有相互调控作用, 进而共同调控III型分泌系统 1 相关基因的转录^[19]。已有研究表明, ToxR 对副溶血弧菌生物膜的形成也具有调控作用, 但其机制目前尚未完全阐明^[17,20]。本研究结果显示 ToxR 对副溶血弧菌 c-di-GMP 的合成具有抑制作用; 此外, ToxR 可以直接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转

录,并间接抑制 *vpa0198* (编码蛋白含有 GGDEF 结构域) 的转录。因此, ToxR 调控 c-di-GMP 代谢相关基因的转录,进而调控胞内 c-di-GMP 浓度,可能是其调控生物膜形成的机制之一。本研究结果有利于我们理解副溶血弧菌中 c-di-GMP 代谢和生物膜形成的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血弧菌 RIMD2210633 (野生型, WT) 及 *toxR* 非极性突变株 ($\Delta toxR$)、His-ToxR 重组蛋白表达菌 (*Escherichia coli* BL21/pET28a-*toxR*) 等均为本课题组在前期研究中构建的^[16,19],并由南通大学附属南通第三医院检验科保存。

1.1.2 主要试剂

HI 培养基 (2.5% Bacto heart infusion) 购自 BD Bioscience; TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; β -Galactosidase Enzyme Assay System 购自 Promega; 2 \times Taq PCR Mastermix、SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 (SYBR Green)、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂等购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; c-di-GMP 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自默沙克生物科技 (武汉) 有限公司; Micro BCA™ Protein Assay Kit 购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 细菌培养

取 10 μ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 HI 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。培养产物直接用无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 稀释 40 倍, 取 150 μ L 均匀涂布于直径为 5 cm 的 HI 平板上, 置 37 $^{\circ}$ C 下静置培养 4.5 h 后, 收集菌体。庆大霉素工作浓度

为 100 μ g/mL。

1.3 胞内 c-di-GMP 浓度测定

采用超声裂解法破碎 WT 和 $\Delta toxR$ 菌液, 提取菌体中的 c-di-GMP, 而后分别取 30 μ L 裂解上清 (含有 c-di-GMP) 进行双抗体夹心法酶联免疫吸附实验, 用 Thermo Scientific 公司的 FC/MK3 酶标仪测定 OD_{450} , 计算 c-di-GMP 水平^[21]。取 25 μ L 裂解上清, 采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒按照说明书步骤测定总蛋白浓度。c-di-GMP 浓度用 pmol/mg 蛋白表示。

1.4 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)

采用 TRIzol 法提取 WT 和 $\Delta toxR$ 的总 RNA。分别取 1 μ g 的总 RNA, 利用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒将其逆转录成 cDNA, 最后用 SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 (SYBR Green) 在 Bio-Rad 公司的 C1000 Thermal Cycler 实时荧光定量 PCR 仪中作 qPCR 分析^[22]。以 16S rRNA 基因的表达量为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对靶基因表达水平进行相对定量。本研究所用引物如表 1 所示。

1.5 *lacZ* 报告基因融合实验

将靶基因调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中无启动子的 β -半乳糖苷酶基因的上游, 构建 *lacZ* 重组质粒。将重组质粒分别转化入 WT 和 $\Delta toxR$ 中, 获得 *lacZ* 菌株。*lacZ* 菌株按 1.2 所述方法培养后, 收集菌体, 采用 β -Galactosidase Enzyme Assay System 检测不同菌株中的 β -半乳糖苷酶活性。 β -半乳糖苷酶活性用 miller units 表示, 其计算公式为: $10^6 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / (T \times V \times OD_{600})]$, 其中 T 表示反应时间 (min), V 表示反应体系的体积 (μ L)^[23]。通过比较 miller units 数值差异, 可以判断 ToxR 对 c-di-GMP 代谢的调控关系。将

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
qPCR		
<i>scrA</i>	Forward: GCCGTTGTAGCTGGTGTTG	19
	Reverse: TGAGCCTGTTGTACCAATGTTC	22
<i>scrG</i>	Forward: CTCATCTCTGTTGCCAGTAAGG	22
	Reverse: CCGAACTCGTCCATGTAGAAG	21
<i>vpa0198</i>	Forward: GCATCAGAATCAGCAAGAC	21
	Reverse: ATGCTTAGCTCCTCTTCTTC	19
16S rRNA	Forward: GACACGGTCCAGACTCCTAC	20
	Reverse: GGTGCTTCTTCTGTCGCTAAC	21
<i>lacZ</i> fusion		
<i>scrA</i>	Forward: GCGCGTCGACCATCAAGCCATTTTATGAAAC	31
	Reverse: GCGCGAATTCGTCGGCTGCGATTAGTCTG	29
<i>scrG</i>	Forward: GCGCGTCGACTAGCACGCTTGTGTTGGAC	29
	Reverse: GCGCGAATTCAGGGAAATGAAGTAATCATGC	32
<i>vpa0198</i>	Forward: GCGCGTCGACCTCTGGTTCATTGTCTTG	28
	Reverse: GCGCGAATTCGTCTTGCTGATTCTGATG	28
EMSA		
<i>scrA</i>	Forward: GCGCGTCGACCATCAAGCCATTTTATGAAAC	31
	Reverse: GCGCGAATTCGTCGGCTGCGATTAGTCTG	29
<i>scrG</i>	Forward: GCGCGTCGACTAGCACGCTTGTGTTGGAC	29
	Reverse: GCGCGAATTCAGGGAAATGAAGTAATCATGC	32
<i>vpa0198</i>	Forward: GCGCGTCGACCTCTGGTTCATTGTCTTG	28
	Reverse: GCGCGAATTCGTCTTGCTGATTCTGATG	28

GTCGAC, *Sal* I site; GAATTC, *EcoR* I site.

lacZ 重组质粒分别转入携带 pBAD33 和 pBAD33-*toxR* 的大肠杆菌 100λpir (EC100λpir) 中, 获得双质粒报告基因融合实验菌株。采用 LB 肉汤培养基 (1.0%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物和 1.0% NaCl) 在 37 °C 下培养双质粒报告基因融合实验菌株, 收集对数中期 ($OD_{600}=1.2$) 的细菌培养产物, 采用 *lacZ* 报告基因融合实验研究在异源表达条件下 *ToxR* 是否对靶基因也具有调控作用。

1.6 凝胶阻滞实验 (electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

PCR 扩增靶基因上游调控区 DNA 序列 (引物见表 1), 并用 PCR 产物纯化试剂盒对产

物进行纯化回收, 用 T4 多聚核苷酸激酶和 [γ - 32 P]-ATP (5 000 Ci/mmol) 对 DNA 片段 5'-末端进行放射性标记, 制备 EMSA 用 DNA 探针。用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 *E. coli* BL21/ pET28a-*toxR* 表达 His-*ToxR* 重组蛋白, 并纯化^[24]。将不同浓度的 His-*ToxR* 与 DNA 探针在 10 μL 结合反应体系中, 室温共同孵育 20 min, 进行 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, -20 °C放射自显影后分析结果^[24]。若 His-*ToxR* 蛋白与靶基因 DNA 片段结合, 则 DNA 相对分子量就会变大, 在其他条件一致的情况下, His-*ToxR*-DNA 复合体在电场中的迁移率比游离 DNA 片段的慢, 出现阻滞条带。

1.7 统计学分析方法

胞内 c-di-GMP 浓度测定、qPCR 和 *lacZ* 报告基因融合实验至少形成 3 次独立实验, 每次实验 3 个生物学重复, 最终结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用双尾 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.01$ 表示具有统计学差异。EMSA 至少重复两次, 并获得相似结果。

2 结果与分析

2.1 ToxR 抑制胞内 c-di-GMP 的合成

本研究利用 ELISA 法测定了 WT 和 $\Delta toxR$ 内的 c-di-GMP 水平, 如图 1 所示, 在 $\Delta toxR$ 中检测出 c-di-GMP 浓度明显高于 WT 的 ($P < 0.01$), 说明 ToxR 抑制副溶血弧菌中 c-di-GMP 的产生。

2.2 ToxR 靶基因预测

利用 ToxR 结合基序和“Motif Scanning”(https://meme-suite.org/meme/) 软件对已发表的 10 个与 c-di-GMP 代谢相关基因调控区 DNA 序列进行了预测, 以期找出哪些基因可能是受 ToxR 直接调控的。如表 2 所示, 若以 6 为阈值, 只在 *scrA* 和 *scrG* 的调控区发现了与 ToxR 基序相似的序列, 表明 ToxR 可能对 *scrA* 和 *scrG* 的转录具有直接的调控作用。本研究选择 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 作为进一步研究的靶基因。

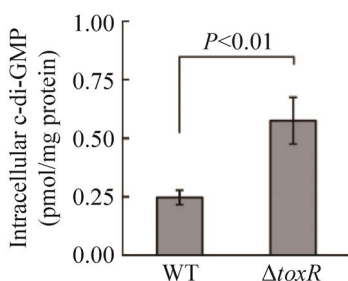


图1 胞内c-di-GMP浓度测定

Figure 1 Determination of intracellular c-di-GMP concentrations.

2.3 ToxR 抑制 c-di-GMP 代谢相关基因的表达

采用实时定量 qPCR 实验研究 ToxR 对 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的调控关系, 如图 2A 所示, 在 $\Delta toxR$ 中检测到的 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* mRNA 丰度均显著高于在 WT 中检测到的, 这说明 ToxR 负调控 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的转录; 采用 *lacZ* 报告基因融合实验进一步研究 ToxR 是否对靶基因启动子活性具有调控作用, 如图 2B 示, 在 $\Delta toxR$ 中检测到的 β -半乳糖苷酶活性均显著高于在 WT 中检测到的, 说明 ToxR 抑制 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子活性。总之, ToxR 负调控 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的转录。

2.4 异源表达 ToxR 可抑制 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子区活性

将靶基因的 *lacZ* 重组质粒分别导入含有 pBAD33 或 pBAD33-*toxR* 的大肠杆菌 100 λ pir (EC100 λ pir) 中, 采用 *lacZ* 报告基因融合实验研究异源表达的 ToxR 是否能调控 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子区活性, 结果如图 3 所示, 相较于携带 pBAD33 空质粒的 EC100 λ pir, 携带 pBAD33-*toxR* 的 EC100 λ pir 经 0.1% 阿拉伯糖诱导后过表达 ToxR, 导致 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子活性明显降低, 这表明在 EC100 λ pir 中 ToxR 可以结合到 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子区 DNA 序列上而抑制它们的表达。

2.5 His-ToxR 与 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 上游调控区 DNA 序列的结合

用 EMSA 实验来验证 His-ToxR 与 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的调控区 DNA 序列是否具有结合作用, 如图 4 所示, His-ToxR 可以结合到 *scrA*、*scrG* 上游调控区 DNA 序列上, 且阻滞强度与 His-ToxR 的使用量成正比 (第 1–4 泳道); 而当用冷探针作为竞争性 DNA 加入 (第 5 泳道)

表 2 ToxR 直接调控的靶基因预测结果

Table 2 Predicted ToxR box-like sequences within target promoters

Gene_ID	Strand	Start	End	Sequence	Weight score
<i>vpa1069</i>	NA	NA	NA	NA	NA
<i>vpa1115</i>	NA	NA	NA	NA	NA
<i>vpa1176</i>	NA	NA	NA	NA	NA
<i>vpa1547</i>	NA	NA	NA	NA	NA
<i>vp0117</i>	R	-221	-207	TAAAATGCGCTCAAA	4.3
<i>vp0699</i>	D	-120	-106	GAAAATATTAAAAAA	4.2
	R	-57	-43	GATAATAACAAAAAA	3.3
	R	-52	-38	TAACTGATAATAACA	1.3
<i>scrG</i>	R	-337	-323	TAGTATTTAATAAAT	1.4
	R	-334	-320	TAATAGTATTTAATA	2.6
	D	-269	-255	TCAATTCATTTCAT	1.7
	D	-215	-201	TAAAACCATTTTATT	1.1
	R	-207	-193	TCCATAAAAAATAAAA	5.2
	R	-201	-187	GCTAAGTCCATAAAA	3.8
	R	-169	-155	TAAAATTAGTTAATA	6.3
	R	-160	-146	TCAAATTATTAAAAAT	4.9
	R	-95	-81	TCGATATTTATAAAA	3.1
	R	-55	-41	TCAAATGAATAAAAAC	1.2
<i>vp2979</i>	D	-441	-427	TCGACTTAGATAAAA	2.8
	R	-264	-250	CAAAACCCGCTAACT	1.9
	D	-223	-209	AAAAATGTCATTAAT	1.6
	D	-100	-86	TAGAAAAGCATCAAA	1.6
	D	-98	-84	GAAAAGCATCAAAAA	2.4
<i>vpa0198</i>	D	-125	-111	TTAAACCATAAAAAAT	3.0
<i>scrA</i>	R	-395	-381	TTAAGTTTCATAAAA	2.9
	R	-296	-282	TAAATTCATTAAAAA	3.6
	R	-295	-281	ATAAATTCATTAAAA	1.1
	R	-294	-280	TATAAATTCATTAAA	2.9
	R	-205	-191	GAATACATATTAAAA	2.1
	R	-204	-190	TGAATACATATTAAA	2.3
	D	-150	-136	TCAAATAAGCTAAAA	10.1
	R	-79	-65	TAAAACATTATTACC	1.6
	D	-44	-30	TAAAAATTAATAATA	6.0

Translation start site was defined as +1; R: non-coding chain; D: coding chain; NA: not detected.

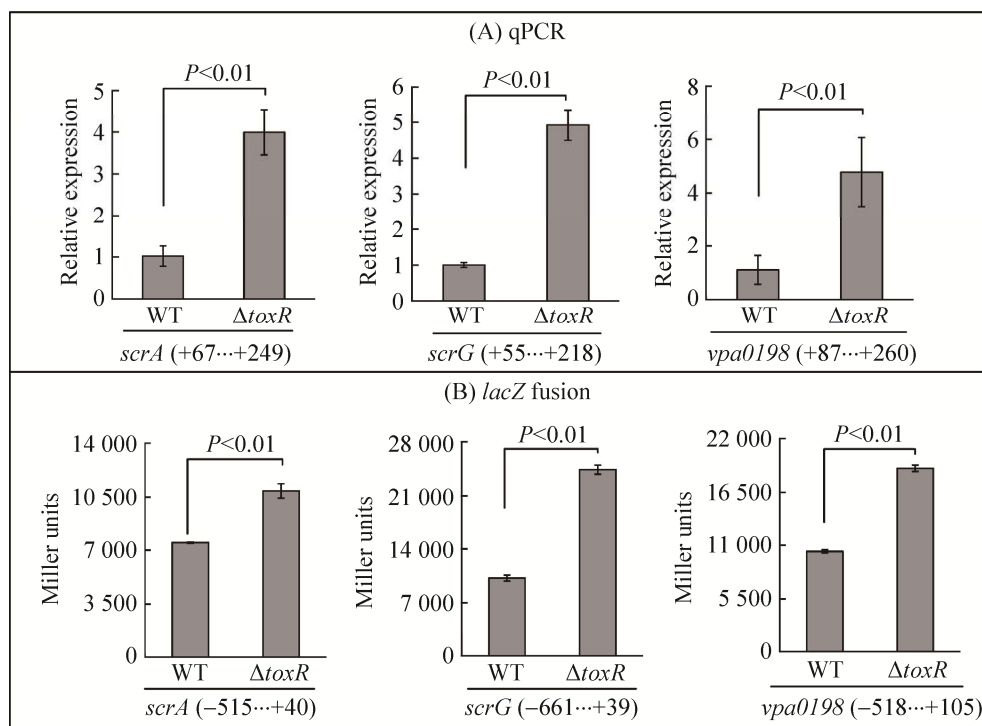


图2 ToxR抑制 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的表达

Figure 2 ToxR inhibited the transcription of *scrA*, *scrG* and *vpa0198*. The minus and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of coding region, respectively.

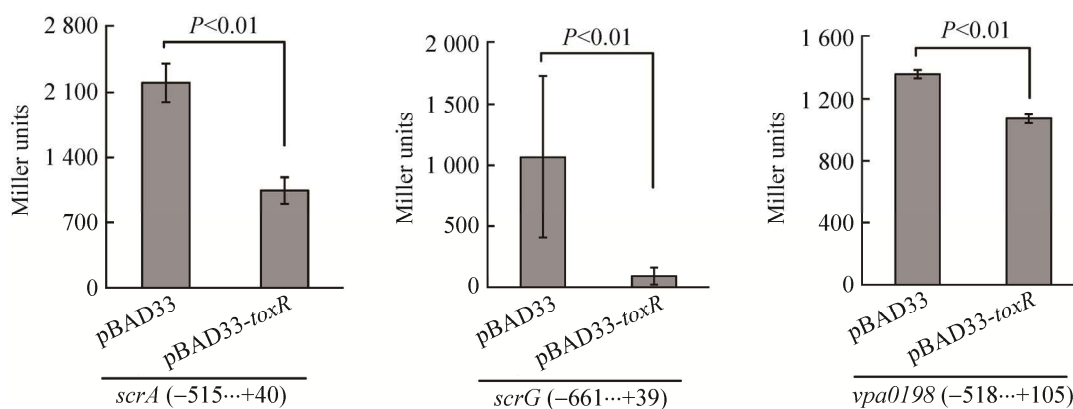


图3 异源表达 ToxR 抑制 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 的启动子区活性

Figure 3 ToxR inhibited the expression of *scrA*, *scrG* and *vpa0198* in a heterologous host. The minus and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of coding region, respectively.

或者加入无关蛋白 (第 7 泳道) 时, 则未出现阻滞条带。此外, His-ToxR 未能与 *vpa0198* 上游调控区 DNA 序列结合, 未出现阻滞条带。然而, 图 3 的结果表明在大肠杆菌中 ToxR 可

以直接结合到 *vpa0198* 启动子区 DNA 序列上并抑制其转录, 这似乎与图 4 的结果相矛盾。实际上在阿拉伯糖的诱导下, 携带 pBAD33-toxR 的 EC100λpir 能过表达 ToxR, 使得 EC100λpir

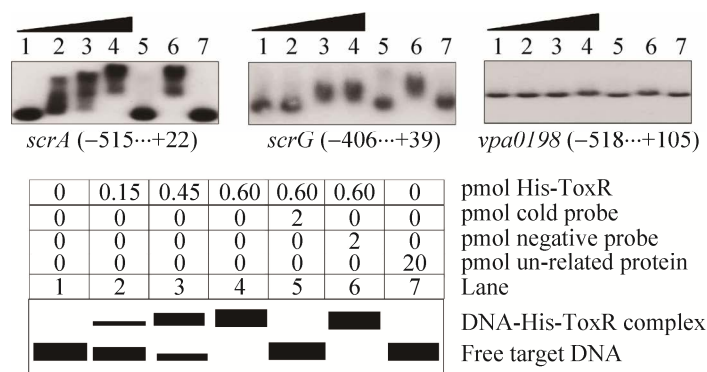


图 4 His-ToxR 与 *scrA*、*scrG* 和 *vpa0198* 调控区 DNA 序列结合结果

Figure 4 Binding of His-ToxR to the regulatory DNA regions of *scrA*, *scrG* and *vpa0198*. The minus and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of coding region, respectively. The schematic representation of the EMSA design is shown below the figure.

中ToxR的含量可能远远高于正常生理条件下副溶血弧菌中的水平,过高浓度的ToxR是具有结合低亲和力DNA序列的能力的。总之,正常生理条件下,ToxR直接抑制*scrA*和*scrG*的转录,而对*vpa0198*转录具有间接的抑制作用。

3 讨论

ToxR是一种膜结合调控蛋白,除调控毒力因子表达外,对弧菌生物膜形成也具有普遍的调控作用^[16]。比如,在霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 中, *toxR*突变株在固体培养基表面形成的菌落更加粗糙,且生物膜形成能力也显著性高于野生株,说明ToxR负调控生物膜形成^[25-26]。此外,ToxR对鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 的生物膜形成能力也具有抑制作用^[27]。然而,在溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 中,ToxR可以促进生物膜的形成^[28]。已有研究表明ToxR对副溶血弧菌的生物膜形成也具有正调控作用^[20],但具体的机制尚未阐明。

本研究发现ToxR可抑制副溶血弧菌胞内c-di-GMP的合成(图1)。此外,ToxR对*scrABC*和*scrG*的转录具有直接的抑制作用,而对*vpa0198*的转录具有间接的抑制作用(图2-4)。

ToxR与*scrA*的调控区DNA序列有两个可能的结合位点,这两个推定的结合位点均位于转录起始位点的下游^[15](图5)。因此,ToxR的结合可能会阻断RNA聚合酶的作用,从而抑制*scrA*的转录。ToxR与*scrG*的调控区DNA序列只有一个可能的结合位点,且该位点位于-35区上游,转录负调控子对靶基因启动子区的这种结合位置是不寻常的,有待于进一步研究解析其抑制机制。*scrABC*和*scrG*编码蛋白已被证明可以降解胞内的c-di-GMP,而*vpa0198*编码产物含有GGDEF结构域,很可能也参与胞内c-di-GMP的代谢^[9-10]。因此,ToxR可通过直接调控c-di-GMP代谢相关基因(如*scrA*和*scrG*)的转录来抑制c-di-GMP的产生,进而调控生物膜形成。

副溶血弧菌基因组中含有50多个可以编码含有GGDEF和/或EAL结构域蛋白质的基因^[8],但只有少数基因的功能得到了详细研究^[9-10,12-14]。群体感应系统两个核心调控子AphA和OpaR对副溶血弧菌的c-di-GMP代谢均具有调控作用^[29,15]。AphA可能通过间接抑制*scrA*和*scrG*的转录而促进c-di-GMP合成和生物膜形成^[29]。OpaR可能通过直接抑制*scrA*、*vp0117*、*vpa0198*、*vpa1176*和*vp0699*的转录,并直接激活*scrG*和

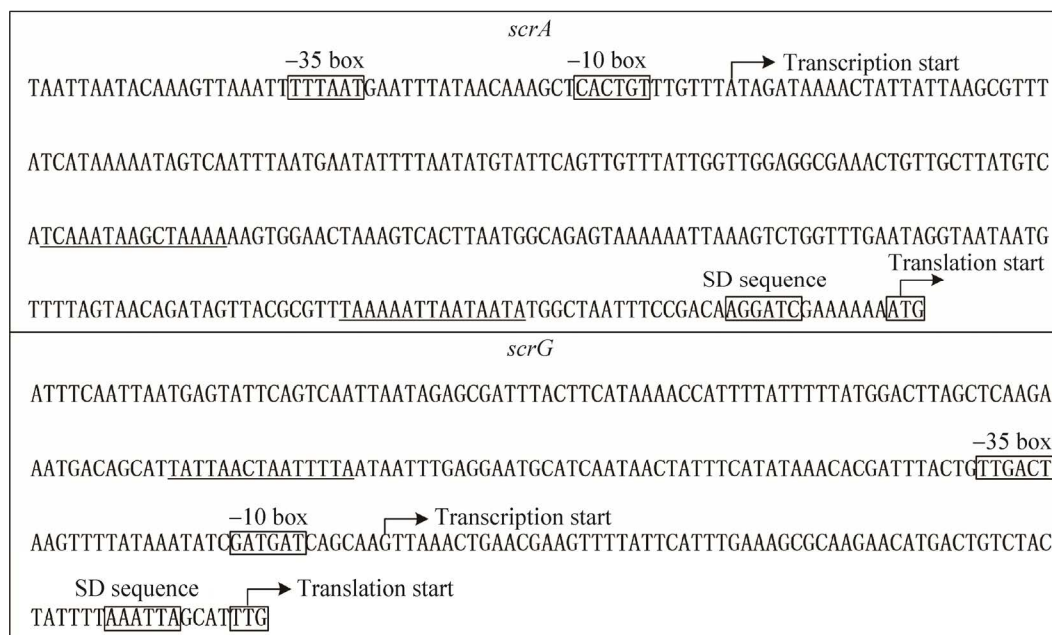


图5 *scrA* 和 *scrG* 启动子区序列

Figure 5 Promoter sequences of *scrA* and *scrG*. The underlined nucleotides are the ToxR-box like sequences, which represent the putative minimal ToxR binding sites.

vp2979 的转录, 来抑制 c-di-GMP 合成和生物膜形成^[15]。H-NS 对 *scrA*、*vp0117*、*vpa0198*、*vpa1176*、*vp0699*、*scrG* 和 *vp2979* 的转录也具有直接抑制作用, 从而降低胞内 c-di-GMP 浓度和生物膜形成^[30]。此外, 低盐生长条件抑制 *scrA* 和 *scrG* 的转录, 进而抑制 c-di-GMP 的降解, 促使生物膜形成能力增强^[31]。本研究发现 ToxR 对 *scrABC*、*scrG* 和 *vpa0198* 的转录和 c-di-GMP 的合成也具有抑制作用。可见, c-di-GMP 代谢及其相关基因的转录是被多种因素紧密调控的。

总之, 通过直接调控 c-di-GMP 代谢相关基因 (如 *scrA* 和 *scrG*) 的转录来抑制 c-di-GMP 的产生, 可能是 ToxR 调控副溶血弧菌生物膜形成的机制之一。先前研究结果表明 ToxR 可促进生物膜形成^[20], 而胞内 c-di-GMP 浓度的升高也可促进生物膜形成。本研究中 ToxR 抑制 c-di-GMP 合成的结果似乎与之前的研究结

论相矛盾。然而, 生物膜形成是一个复杂的、且被严密调控的过程, 本研究及之前的研究仅是收集特定时间点的细菌培养产物, 来分析 ToxR 对生物膜相关表型或相关基因转录的调控作用, 并不能动态反应 ToxR 对生物膜形成的调控作用, 因此 ToxR 对副溶血弧菌生物膜形成的调控机制还有待于进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect*, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [2] Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol*, 2009, 17(3): 109-118.
- [3] Li W, Wang JJ, Qian H, et al. Insights into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol*, 2020, 11: 813.

- [4] Lu R, Osei-Adjei G, Huang X, et al. Role and regulation of the orphan AphA protein of quorum sensing in pathogenic *Vibrios*. *Future Microbiol*, 2018, 13(3): 383-391.
- [5] 冯媛, 王惠, 王崇刚. 环二鸟苷酸在生物膜形成中作用的研究进展. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(3): 353-357.
Feng Y, Wang H, Wang CG. Research updates on the role of cyclic diguanosine monophosphate in biofilm formation. *Chin J Infect Chemother*, 2021, 21(3): 353-357(in Chinese).
- [6] Chou S, Galperin MY, O'Toole GA. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. *J Bacteriol*, 2016, 198(1): 32-46.
- [7] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 271-284.
- [8] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749.
- [9] Kim YK, McCarter LL. ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 2007, 189(11): 4094-4107.
- [10] Ferreira RB, Antunes LC, Greenberg EP, et al. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol*, 2008, 190(3): 851-860.
- [11] Kimbrough JH, Cribbs JT, McCarter LL, et al. Homologous c-di-GMP-binding Scr transcription factors orchestrate biofilm development in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 2020, 202(6).
- [12] Kimbrough JH, McCarter LL, O Toole G. Identification of three new GGDEF and EAL domain-containing proteins participating in the Scr surface colonization regulatory network in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 2021, 203(4).
- [13] Zhong X, Lu Z, Wang F, et al. Characterization of GefA, a GGDEF domain-containing protein that modulates *Vibrio parahaemolyticus* motility, biofilm formation, and virulence. *Appl and Environ Microb*, 2022, 88(6): e223921.
- [14] Martínez-Méndez R, Camacho-Hernández DA, Sulvarán-Guel E, et al. A trigger phosphodiesterase modulates the global c-di-GMP pool, motility and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 2021, 203(13): e4621.
- [15] Zhang Y, Qiu Y, Gao H, et al. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol*, 2021, 12: 676436.
- [16] Zhang Y, Hu L, Osei-Adjei G, et al. Autoregulation of ToxR and its regulatory actions on major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Cell Infect Mi*, 2018, 8.
- [17] 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 Bacteriol*, 1993, 175(12): 3844-3855.
- [18] Hubbard TP, Chao MC, Abel S, et al. Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* intestinal colonization. *PNAS*, 2016, 113(22): 6283-6288.
- [19] Osei-Adjei G, Gao H, Zhang Y, et al. Regulatory actions of ToxR and CalR on their own genes and type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65809-65822.
- [20] Chen L, Qiu Y, Tang H, et al. ToxR is required for biofilm formation and motility of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(11): 848-850.
- [21] Gao H, Ma L, Qin Q, et al. Fur represses *Vibrio cholerae* biofilm formation via direct regulation of *vieSAB*, *cdgD*, *vpsU*, and *vpsA-K* transcription. *Front Microbiol*, 2020, 11: 587159.
- [22] Gao H, Zhang Y, Yang L, et al. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 40.
- [23] 杜德燕, 张义全, 郭兆彪, 等. 副溶血弧菌 LacZ 报告基因融合实验方法的建立与应用. *生物技术通讯*, 2012, 23(4): 550-553.
Du DY, Zhang YQ, Guo ZB, et al. Development and application of the *LacZ* fusion in *vibrio parahaemolyticus*. *Lett Biotechnol*, 2012, 23(4): 550-553(in Chinese).
- [24] 张义全, 高鹤, 王丽, 等. 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析. *微生物学报*, 2011, 51(5): 615-621.
Zhang YQ, Gao H, Wang L, et al. Purification of

- recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(5): 615-621(in Chinese).
- [25] Gubensäk N, Schrank E, Hartlmüller C, et al. Structural and DNA-binding properties of the cytoplasmic domain of *Vibrio cholerae* transcription factor ToxR. *J Biol Chem*, 2021: 101167.
- [26] Valeru SP, Wai SN, Saeed A, et al. ToxR of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 33.
- [27] Wang S, Lauritz J, Jass J, et al. A ToxR homolog from *Vibrio anguillarum* serotype O1 regulates its own production, bile resistance, and biofilm formation. *J Bacteriol*, 2002, 184(6): 1630-1639.
- [28] Cai S, Cheng H, Pang H, et al. Role of the *toxR* gene from fish pathogen *Vibrio alginolyticus* in the physiology and virulence. *Indian J Microbiol*, 2017, 57(4): 477-484.
- [29] 黄倩, 张义全, 胡小许, 等. AphA 蛋白促进副溶血弧菌 c-di-GMP 合成和生物膜形成. *微生物学报*, 2014, 54(5): 525-531.
- Huang Q, Zhang YQ, Hu XX, et al. AphA is an activator of c-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(5): 525-531(in Chinese).
- [30] Xue X, Zhang M, Qiu Y, et al. H-NS represses biofilm formation and c-di-GMP synthesis in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biomed Environ Sci*, 2022, 35(9): 821-829.
- [31] Li X, Sun J, Zhang M, et al. The effect of salinity on biofilm formation and c-di-GMP production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Curr Microbiol*, 2021, 79(1): 25.

(本文责编 郝丽芳)