

研究报告

AphA 蛋白对副溶血弧菌 *vopT* 的转录调控研究

张伟¹ 侯书宁² 何婷² 徐森² 黄新祥² 杨瑞馥³ 周冬生³ 张义全^{2,3*}

(1. 河北北方学院附属第一医院 微生物科 河北 张家口 075000)

(2. 江苏大学 医学院 江苏 镇江 212013)

(3. 北京微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要:【目的】研究副溶血弧菌 AphA 对 *vopT* 的转录调控机制。【方法】提取野生株(WT)和 *aphA* 突变株(Δ *aphA*)的总 RNA, 采用引物延伸实验研究 *vopT* 的转录起始位点, 并根据产物的丰度差异判断 AphA 对其调控关系。分别将 WT 和 Δ *aphA* 的总 RNA 逆转录成 cDNA, 利用实时定量 RT-PCR 进一步研究 AphA 对靶基因的调控关系。将 *vopT* 的启动子区克隆入 pHRP309 质粒的 β -半乳糖苷酶基因上游, 构建 LacZ 重组质粒, 并将该重组质粒转入 WT 和 Δ *aphA* 中, 通过测定并比较两株菌中 β -半乳糖苷酶活性的差异来判定 AphA 对 *vopT* 的调控关系。PCR 扩增靶基因整个启动子区 DNA 序列, 并纯化 His-AphA 蛋白, 利用凝胶阻滞实验(EMSA)验证 His-AphA 对靶基因启动子区是否具有直接的结合作用。【结果】*vopT* 只有一个转录起始位点 A (-86), 且其转录活性受 AphA 的间接抑制。RT-PCR 和 EMSA 结果显示 AphA 对 *vtrA* 的转录也具有间接的抑制作用。【结论】AphA 间接抑制 *vopT* 转录, 且该间接抑制作用与 VtrA 无关。

关键词: 副溶血弧菌, 转录调控, AphA, *vopT*

Transcriptional regulation of *vopT* by AphA in *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Wei¹ HOU Shu-Ning² HE Ting² XU Miao² HUANG Xin-Xiang²
YANG Rui-Fu³ ZHOU Dong-Sheng³ ZHANG Yi-Quan^{2,3*}

(1. Department of Clinical Microbiology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

(2. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

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

Abstract: [Objective] To study the transcriptional regulation of *vopT* by AphA in *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] Total RNAs were extracted from the wide-type (WT) strain and the *aphA* mutant (Δ *aphA*). Primer extension assay was employed to detect the transcription start site and the promoter activity of *vopT* in WT, and that in Δ *aphA*. Quantitative RT-PCR was also applied to calculate

基金项目: 江苏大学高级人才科研启动基金项目(No. 14JDG166); 国家自然科学基金项目(No. 31170127)

*通讯作者: ✉: zhangyiquanq@163.com

收稿日期: 2014-11-27; 接受日期: 2015-01-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-09

the transcriptional variation of target genes between WT and *ΔaphA*. The entire promoter region of *vopT* was cloned into the pHRP309 containing a promoterless *lacZ* gene. The recombinant *lacZ* reporter plasmid was transformed into WT and *ΔaphA*, respectively, to measure the promoter activity (the β -Galactosidase activity) of *vopT* in WT and *ΔaphA* by using the β -Galactosidase Enzyme Assay System. The over-expressed His-AphA was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham), and the entire promoter region of the target genes was amplified by PCR. Then, the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to analyze the DNA-binding activity of His-AphA to target promoter regions *in vitro*. **[Results]** Primer extension assay detected only one transcriptional start site located at 86 bp upstream of *vopT*, whose transcript was negative regulated by AphA in an indirectly manner. Moreover, RT-PCR and EMSA results showed that the transcription of *vtrA* was also indirectly controlled by AphA. **[Conclusion]** AphA repressed the transcription of *vopT* indirectly, and this indirect inhibition was not dependent on VtrA.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Transcriptional regulation, AphA, *vopT*

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐的革兰氏阴性弧菌, 主要栖息于海水和海产品中。当人们食用生的或未被彻底煮熟的海产品时, 可能会被其感染而引起以腹痛、腹泻、恶心、发热等为主要症状的急性胃肠炎^[1]。流行病学调查显示副溶血弧菌已成为沿海地区引发食物中毒的首要病原菌^[1-2]。

III 型分泌系统(T3SS)是一种由多组分蛋白复合体在细菌表面形成的“针状”注射装置, 通过该装置可将分泌性效应蛋白直接注入宿主细胞内而发挥致病作用^[3]。副溶血弧菌 O3:K6 型菌株 RIMD2210633 拥有两套 T3SS 基因簇, 分别称为 T3SS1 和 T3SS2^[4]。T3SS1 位于大染色体, 主要与副溶血弧菌对巨噬细胞、HeLa 细胞等的细胞毒性有关, 可引起细胞凋亡^[5]; T3SS2 位于小染色体致病岛(Vp-PAI)内, 主要与肠毒性有关, 但是也具有一定的细胞毒性^[6-7]。T3SS2 与其他细菌的 T3SS 同源性较低, 对其结构与功能的认识还比较肤浅, 但是该系统一些转位蛋白(如 VopB2 和 VopD2)和效应蛋白(如 VopA/P、VopT、VopL 和 VopC 等)的功能已经被研究得比较详细^[8-11]。其中, VopT 具有 ADP-糖基转移酶活性, 能通过对靶蛋白特定的氨基酸残基进行 ADP 基团化修饰, 而改变靶蛋白的生物学活性^[9]。

T3SS 是副溶血弧菌毒力因子之一, 其转录表达应是一个被紧密调控的过程。已有研究表明

T3SS1 的表达受 ExsA 的激活, 而受 ExsD、ToxR、OpaR、H-NS 和 CalR 等调控子的抑制^[12-15]; 另外, T3SS1 的表达还受 Ca^{2+} 和 Fe^{2+} 的调节, 高 Ca^{2+} 或低 Fe^{2+} 条件下表达量增高^[16]。然而, T3SS2 的转录调控研究还处于起步阶段, 目前仅发现其表达受胆汁酸盐的诱导和 VtrA 及 VtrB 的激活^[17-18], 而是否有其他调控子蛋白参与其表达调控, 还有待于进一步研究。AphA 是弧菌密度感应(Quorum sensing, QS)系统在低密度下的核心调控子^[19-22], 研究表明霍乱弧菌的 AphA 可促进霍乱毒素基因 *ctx* 和菌毛基因 *tcp* 的转录^[21], 也可促进生物膜形成^[22]; 表型结果显示副溶血弧菌的 AphA 也能增强生物膜形成、运动能力和对小鼠的致死毒性^[20]。可见, 弧菌的 AphA 主要起激活毒力因子表达和生物膜形成的作用。本文中, 利用引物延伸、LacZ 报告基因融合实验, 实时定量 RT-PCR、EMSA 等经典的分子生化实验研究了 AphA 蛋白对 T3SS2 的效应蛋白基因——*vopT* 的调控, 结果发现 AphA 能间接抑制其转录, 这丰富了我们对 AphA 功能的认识。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验所用的副溶血弧菌 RIMD2210633 株(野生型, WT)及其 *aphA* 非极性突变株(*ΔaphA*)^[19-20]、重组质粒 *vopT*::pHRP309 (pHRP309 质粒无启动子区的 β -半乳糖苷酶基因上

游分别克隆入 *vopT* 的启动子区序列, 庆大霉素抗性)均由北京微生物流行病学研究所病原微生物国家重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂: HI 肉汤(2.5% Bacto heart infusion) 购自 BD Bioscience; TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 购自 Fermentas 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; Primer Extension System 和 fmol[®] DNA Cycle Sequencing System 购自 Promega 公司; DNA-free[™] Kit 购自 Amibion 公司; LightCycler[®] 480 SYBR Green Master 购自 Roche 公司。

1.2 细菌培养

取 10–20 μ L 甘油菌种接种至 15 mL 的 HI 肉汤中(50 mL 的三角烧瓶, 下同), 37 °C、200 r/min 培养至平台期(12–14 h), 而后按 1:50 稀释接种至 15 mL 新鲜的 HI 肉汤中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 大约为 1.0, 再按 1:1 000 稀释接种至 15 mL 新鲜的 HI 肉汤中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.15, 收集菌体待用。

1.3 引物延伸实验^[19]

将能与 *vopT* 的 mRNA 互补的特异性引物(表

1)的 5'-末端进行放射性标记, 进而分别以 WT 和 Δ *aphA* 的总 RNA 为模板(总 RNA 的量一致), 在逆转录酶的作用下, 将其逆转录成 cDNA。cDNA 产物配伍测序反应的条带进行 6%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 经放射自显影后, 分析结果。

1.4 实时定量 RT-PCR

利用 TRIzol Reagent 提取细菌总 RNA, 进而利用 DNA-free[™] Kit 去除总 RNA 中可能污染的基因组 DNA, 最后利用 N6 随机引物将总 RNA 逆转录为 cDNA。用 Roche 的 LightCycler system 作 RT-PCR 分析。以 16S rRNA 基因的表达量为内参(引物序列见表 1), 利用经典的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法对基因表达水平进行相对定量。

1.5 LacZ 实验

PCR 扩增 *vopT* 的整个启动子区序列(引物序列见表 1), 并将其直接克隆入 pHRP309 质粒的 β -半乳糖苷酶基因(无启动子区)的上游, 以构建 LacZ 重组质粒。将重组质粒分别转入 WT 和 Δ *aphA* 中。细菌按 1.2 的方法培养收集后, 通过检测并比较 WT 和 Δ *aphA* 菌株中 β -半乳糖苷酶活性的差异, 即可判断 AphA 对 *vopT* 的调控关系, 一般以 *t* 检验的 $P < 0.01$ 为标准。

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

Gene name	Sequences (5'→3')
EMSA	
<i>vopT</i>	AAAAGATGTTTGTGCGATTATTC/CTGCTTTTCAGATATGGAGG
<i>vtrA</i>	TACGCTTCCAATAATCACC/CCGATCTTGTGAGCCTAGAC
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTCTGTCGCTAAC
RT-PCR	
<i>vopT</i>	CGGCGGAGCAATTACTGG/TCTGGGTCTCGTGAGGTTG
<i>vtrA</i>	AGTCTAGGCTCACAAGATCG/AAATGGGCTCTGATGTTACG
Primer extension	
<i>vopT</i>	TCTACAAACCTTCACATCTGC
<i>lacZ</i> fusion	
<i>vopT</i>	GCGCGTCGACAAAAGATGTTTGTGCGATTATTC/GCGCGAATTCCTGCTTTTCAGATATGGAGG

1.6 凝胶阻滞实验(EMSA)^[23]

PCR 扩增 *vopT* 的启动子区(引物序列见表 1), 并纯化回收, 用 T4 多聚核苷激酶(T4 PNK)对 DNA 片段 5'-末端进行放射性标记。利用 Ni-NTA 柱法纯化 His-AphA 蛋白。将不同浓度的 His-AphA 蛋白与标记的 DNA 探针在 10 μ L 结合反应体系中, 室温共同孵育 20 min 后, 进行 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 放射自显影后分析结果。

2 结果与分析

2.1 AphA 抑制 *vopT* 的转录

首先利用引物延伸实验搜寻 *vopT* 的转录起始位点, 其结果如图 1A 所示: *vopT* 的转录起始位点为-86 位的 A (翻译起始位点为+1), 且只能在 Δ *aphA* 中检测出引物延伸产物, 而在 WT 中检测不到, 这表明 AphA 能抑制 *vopT* 的转录; 进一步采用 LacZ 报告基因融合实验研究 AphA 对 *vopT* 的调控关系, 如图 1B 所示: 在 WT 中所检测到的 β -半乳糖苷酶活性(Miller units)明显低于 Δ *aphA* 中的, 且二者具有显著性差异($P < 0.01$), 这说明 AphA 能抑制 *vopT* 的转录; 图 1C 为 AphA 对 *vopT* 调控的实时定量 RT-PCR 结果, 可以看出: Δ *aphA* 中 *vopT* 的 mRNA 表达水平明显高于 WT 中, 二者相差大约 7 倍, 这

进一步说明 *vopT* 的转录受 AphA 的抑制。总之, 在低密度下, AphA 负调控 *vopT* 的转录。

2.2 AphA 不能结合到 *vopT* 的启动子区

图 1 的结果显示 AphA 能抑制 *vopT* 的转录, 为了验证这种转录抑制作用是否是直接通过蛋白-DNA 相互作用而实现的, 表达纯化了 His-AphA 重组蛋白, 并采用体外的 EMSA 实验进行验证, 结果如图 2 所示: 当 His-AphA 蛋白使用量达到 60.0 pmol 时, *vopT* 仍未出现阻滞条带, 而在前期研究中 His-AphA 在低浓度下(15.0 pmol)就能结合到 *aphA* 的启动子区^[19], 说明 AphA 不能结合到 *vopT* 的启动子区。

2.3 AphA 间接抑制 *vtrA* 的转录

上文结果显示 AphA 只能间接抑制 *vopT* 的转录, 而 Kodama 等^[18]的研究结果表明 VtrA 蛋白能激活 Vp-PAI 内基因(包括 *vopT*)的表达。据此推测: AphA 可能是通过抑制 VtrA 的转录而间接抑制 *vopT* 的表达。RT-PCR 结果(图 3A)显示 *vtrA* 的转录确实受 AphA 的抑制, 但是体外的 EMSA 结果(图 3B)却表明 His-AphA 对 *vtrA* 启动子区没有直接的结合作用, 这说明 AphA 不是通过 VtrA 而间接抑制 *vopT* 的转录。

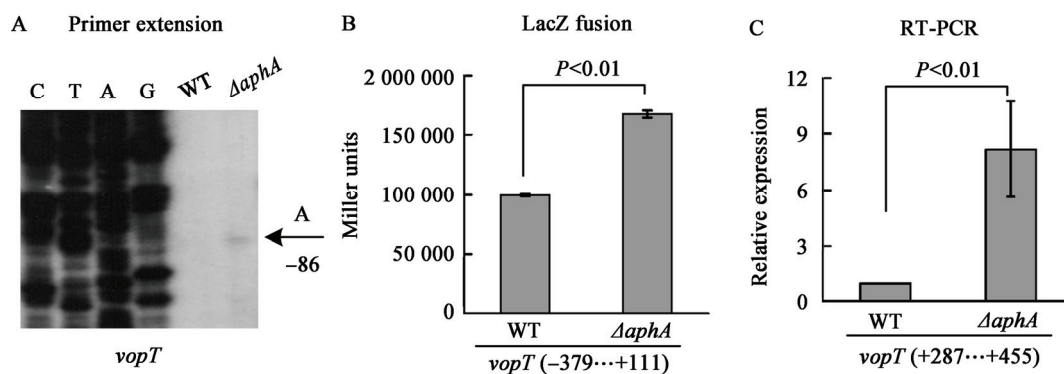


图 1 AphA 负调控 *vopT* 的转录

Figure 1 AphA represses the transcription of *vopT*

注: G、A、T、C: Sanger 测序条带; 正、负数值表示距离起始密码子上下游的碱基数(翻译起始位点为“+1”).

Note: Lanes G, A, T and C represented the Sanger sequencing reactions. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively.

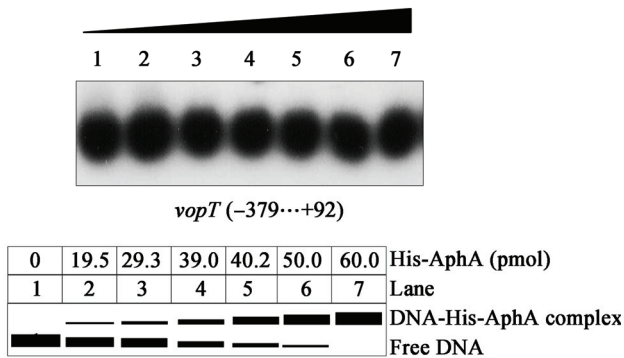


图2 His-AphA 对 *vopT* 启动子区结合的 EMSA 实验结果

Figure 2 EMSA assay of binding of His-AphA to *vopT* promoter region

注: 正、负数值表示距离起始密码子上下游的碱基数(翻译起始位点为“+1”).

Note: The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively.

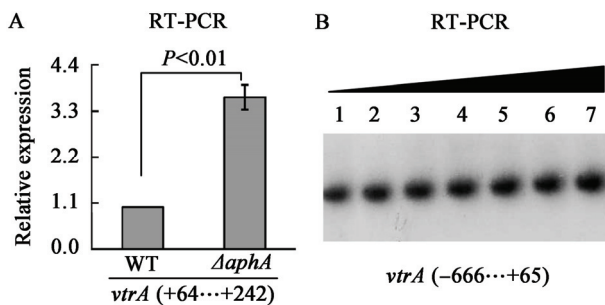


图3 AphA 间接抑制 *vtrA* 的转录

Figure 3 AphA represses the transcription of *vtrA* in an indirect manner

注: 正、负数值表示距离起始密码子上下游的碱基数(翻译起始位点为“+1”).

Note: The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively.

3 结论

AphA 是弧菌的毒力调控子, 参与调控众多细胞途径。霍乱弧菌的 AphA 能直接结合到 *vpsT* 的启动子区并激活其表达, *VpsT* 再通过激活胞外多糖的合成而促进生物膜形成^[23]。AphA 与 AphB 相互作用可激活 *tcpPH* 的转录, *TcpP/TcpH* 再通过激活毒力调控子 *ToxT* 的表达而促进 *ctx* (编码霍乱毒素)

和 *tcp* (编码菌毛)的转录^[22]。在副溶血弧菌中, 对 AphA 功能的研究还处于起始阶段, 仅有表型结果显示它能增强生物膜形成、运动能力和对小鼠的致死毒性等, 但对其分子机制还一无所知^[20]。本文利用引物延伸、LacZ 报告基因融合实验和实时定量 RT-PCR 实验证明了 AphA 能抑制 *vopT* (*VPA1327*) 的转录, 而随后的 EMSA 结果显示 His-AphA 不能作用于 *vopT* 的启动子区。*vopT* 位于 *Vp-PAI* 内, 编码产物为 T3SS2 的效应蛋白^[9]。Kodama 等的研究表明 *Vp-PAI* 内的基因转录均受 *VtrA* 和 *VtrB* 蛋白的激活, 而 *VtrA* 又能激活 *vtrB* 的转录^[18]。我们推测 AphA 可能是通过抑制 *VtrA* 的转录而间接抑制 *vopT* 的表达。然而, RT-PCR 和 EMSA 结果(图3)表明 AphA 只能间接抑制 *vtrA* 的转录, 这说明我们的推测是不成立的。因此, AphA 对 T3SS2 基因转录的间接抑制机制还有待于进一步研究。*VopT* 是一种 ADP-糖基转移酶, 能将 NAD⁺ 上的 ADP 基团转移至靶蛋白特定的氨基酸残基上, 从而改变靶蛋白的生物学活性^[9]。*VopT* 对 Caco-2 和 HCT-8 细胞也具有一定的细胞毒性^[9]。可见, 在低密度时, AphA 对副溶血弧菌毒力因子的表达具有正、负调控的双重模式。本研究结果不仅丰富了对 AphA 蛋白功能的认识, 还有助于理解该菌的致病机制。

参考文献

- [1] Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(5): 1661-1666
- [2] Wang S, Duan H, Zhang W, et al. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2007, 51(1): 8-13
- [3] Yang F, Yang QL, Du ZM. Function and regulation of type III secretion system in *Yersinia* species[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(3): 418-422 (in Chinese)
阳芬, 杨秋林, 杜宗敏. 耶尔森菌 III 型分泌系统研究进展[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 418-422
- [4] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. The Lancet, 2003, 361(9359): 743-749
- [5] Park KS, Ono T, Rokuda M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(11): 6659-6665
- [6] Caburlotto G, Lleo MM, Hilton T, et al. Effect on human cells of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains carrying type III secretion system 2[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(7): 3280-3287
- [7] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, et al. Contribution of *Vibrio*

- parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxigenicity, and lethality in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772-1780
- [8] Kodama T, Hiyoshi H, Gotoh K, et al. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(9): 4282-4289
- [9] Kodama T, Rokuda M, Park KS, et al. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2[J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(11): 2598-2609
- [10] Liverman AD, Cheng HC, Trosky JE, et al. Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 2007, 104(43): 17117-17122
- [11] Trosky JE, Mukherjee S, Burdette DL, et al. Inhibition of MAPK signaling pathways by VopA from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 51953-51957
- [12] Henke JM, Bassler BL. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(12): 3794-3805
- [13] Kodama T, Yamazaki C, Park KS, et al. Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 311(1): 10-17
- [14] Whitaker WB, Parent MA, Boyd A, et al. The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin-induced adult murine model[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(5): 1834-1845
- [15] Zhou X, Konkel ME, Call DR. Regulation of type III secretion system 1 gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* is dependent on interactions between ExsA, ExsC, and ExsD[J]. *Virulence*, 2010, 1(4): 260-272
- [16] Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(22): 6025-6038
- [17] Gotoh K, Kodama T, Hiyoshi H, et al. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13365
- [18] Kodama T, Gotoh K, Hiyoshi H, et al. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxigenicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8678
- [19] Sun F, Zhang Y, 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
- [20] Wang L, Ling Y, Jiang H, et al. AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 245-251
- [21] Childers BM, Klose KE. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon[J]. *Future Microbiology*, 2007, 2(3): 335-344
- [22] Yang M, Frey EM, Liu Z, et al. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(2): 697-703
- [23] Zhang YQ, Gao H, Wang L, et al. Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 615-621 (in Chinese)
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[J]. *微生物学报*, 2011, 51(5): 615-621