



副溶血弧菌染色体上毒素-抗毒素系统 YefM-YoeB 的鉴定

卫慢 邱军 贾梦蝶 郑成坤*

扬州大学生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009

摘要:【背景】副溶血弧菌是一种重要的食源性病原菌，给公众健康带来严重危害。毒素-抗毒素系统广泛存在于细菌和古生菌基因组中，具有重要的生物学功能。【目的】在副溶血弧菌中鉴定新的毒素-抗毒素系统，为从毒素-抗毒素系统角度探讨该菌致病性和耐药性的分子机制奠定基础。【方法】通过在线工具预测副溶血弧菌染色体上的假定 II 型毒素-抗毒素系统；通过生长曲线分析和稀释点板实验检测假定毒素对大肠杆菌的毒性作用及相应抗毒素的抗毒性作用；通过反转录 PCR 确定毒素和抗毒素基因是否共转录；通过生物信息学分析确定新鉴定毒素-抗毒素系统的同源蛋白；通过 LacZ 报告实验确定抗毒素及毒素-抗毒素复合物对自身启动子的调控作用。【结果】副溶血弧菌染色体中编码 6 个假定 II 型毒素-抗毒素系统；基因 *vp1820* 的表达产物(VP1820)对大肠杆菌具有杀菌活性，*vp1821* 的表达产物(VP1821)能中和 VP1820 的毒性；基因 *vp1821* 和 *vp1820* 共转录；*vp1821-vp1820* 编码 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统；抗毒素 YefM 正调控启动子，YefM-YoeB 复合物负调控启动子。【结论】在副溶血弧菌中鉴定了一个新的 II 型毒素-抗毒素系统，即 YefM-YoeB，为进一步研究该系统对副溶血弧菌致病性和耐药性的影响奠定了基础。

关键词：副溶血弧菌，毒素-抗毒素系统，YefM-YoeB

Identification of the chromosomal YefM-YoeB toxin-antitoxin system in *Vibrio parahaemolyticus*

WEI Man QIU Jun JIA Mengdie ZHENG Chengkun*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is an important food-borne pathogen causing severe threats to public health. Toxin-antitoxin (TA) systems are widely distributed in the genomes of bacteria and archaea, and possess important biological functions. [Objective] To identify novel TA systems in *V. parahaemolyticus*, and lay the foundation for exploring the underlying mechanism of bacterial pathogenicity and drug resistance from the aspect of TA systems. [Methods] The putative chromosomal type II TA systems in *V. parahaemolyticus* were predicted by a web-based tool. The toxic effects of the putative toxins on *Escherichia coli* and the antitoxic effects of the corresponding antitoxins were assessed

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31802210); China Postdoctoral Science Foundation (2018M630615); Natural Science Foundation of Colleges and Universities of Jiangsu Province (18KJB230007)

*Corresponding author: E-mail: zhengchengkun@yzu.edu.cn

Received: 28-09-2020; Accepted: 10-11-2020; Published online: 03-02-2021

基金项目：国家自然科学基金(31802210)；中国博士后科学基金(2018M630615)；江苏省高校自然科学基金(18KJB230007)

*通信作者：E-mail: zhengchengkun@yzu.edu.cn

收稿日期：2020-09-28；接受日期：2020-11-10；网络首发日期：2021-02-03

by growth curves analyses and spot dilution assays. Reverse transcription PCR was used to determine whether the genes encoding the toxin and antitoxin were co-transcribed. The homologous proteins of the newly identified TA system were determined by bioinformatics analysis. The regulation of their own promoters by the antitoxin and antitoxin-toxin complex was detected by LacZ reporter assay. **[Results]** Six putative chromosomal TA systems were identified in *V. parahemolyticus*. The product of the *vp1820* gene (VP1820) had bactericidal activity against *E. coli*, which could be counteracted by the product of the *vp1821* gene (VP1821). The genes *vp1821* and *vp1820* are co-transcribed. The *vp1821-vp1820* locus encodes the YefM-YoeB TA system. The YefM antitoxin positively regulates the promoter, while the YefM-YoeB complex negatively regulates the promoter. **[Conclusion]** This study identifies a novel type II TA system in *V. parahemolyticus*, namely YefM-YoeB, and lays the foundation for further research on the role of this system in the pathogenicity and drug resistance of *V. parahemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahemolyticus*, toxin-antitoxin system, YefM-YoeB

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐细菌,广泛分布于河口、海洋和沿海环境中^[1]。副溶血弧菌还是一种重要的食源性病原菌,食用生的或未煮熟的被该菌污染的海产品可能会引起急性肠胃炎^[2]。少数情况下,副溶血弧菌也会引起伤口感染、耳朵感染或败血症^[1]。1950年,日本暴发一起食用沙丁鱼导致的食物中毒事件,造成272人发病,其中20人死亡;研究证实副溶血弧菌感染是此次食物中毒的原因,这也是副溶血弧菌首次被报道^[1]。副溶血弧菌是海鲜产品导致人感染细菌性肠胃炎的首要致病因素^[3]。2006–2016年,国内食品携带率最高的食源性病原菌就是副溶血弧菌^[4]。此外,副溶血弧菌在获得一个表达致死性毒素的质粒后能引起虾急性肝胰腺坏死病,给虾养殖业带来巨大的经济损失^[5]。

毒素-抗毒素系统(Toxin-Antitoxin System)是细菌和古生菌基因组中广泛存在的一类遗传元件^[6]。典型的毒素-抗毒素系统编码一个能抑制细胞生长的毒素和一个能中和毒素毒性的抗毒素^[7]。根据抗毒素的性质和作用方式,毒素-抗毒素系统目前分为6种类型,即I–VI型^[8]。I–VI型的毒素都是蛋白质;I型和III型的抗毒素是RNA,而II、IV、V和VI型的抗毒素是蛋白质^[8]。I型的抗毒素是毒素基因的反义RNA,能直接结合毒素基因的mRNA,从而抑制毒素的产生^[6]。III型的抗毒素直接结合毒素,从而抑制其毒性^[6]。IV型的抗毒素

与毒素的靶标结合,通过影响毒素与靶标的结合发挥中和作用^[8]。V型的抗毒素具有核酸内切酶活性,能够特异地切割毒素基因的mRNA,从而抑制毒素的产生^[8]。VI型的抗毒素与毒素结合后,可以促进蛋白酶对毒素的降解,进而抑制其毒性^[8]。II型毒素-抗毒素系统是细菌基因组中分布最广泛、同时也是研究最深入的毒素-抗毒素系统。II型的抗毒素能与毒素形成稳定的复合物,从而封闭毒素的毒性^[8]。毒素-抗毒素系统具有重要的生物学功能,例如影响细菌的耐药性和致病性^[8-9]。

毒素-抗毒素系统在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌等细菌中的研究较为深入^[10];但在弧菌属细菌中,关于该系统的报道较少,而且主要集中在霍乱弧菌和副溶血弧菌中。在霍乱弧菌中,位于超级整合子上的2个*higBA*毒素-抗毒素基因簇编码mRNA切割酶,可以稳定质粒^[11];位于整合接合元件SXT上的MosAT毒素-抗毒素系统具有维持整合接合元件稳定性的作用^[12]。霍乱弧菌II号染色体上编码的3个ParE毒素,在细菌丢失II号染色体后能够降解I号染色体^[13]。霍乱弧菌16961菌株的18个毒素-抗毒素系统也具有稳定超级整合子的作用^[14]。此外,RelBE家族的毒素-抗毒素系统影响霍乱弧菌生物被膜的形成及对肠道的定殖^[15]。

在副溶血弧菌中,目前仅有*vp1842-vp1843*基因簇被报道编码II型毒素-抗毒素系统,该基因簇

位于 I 号染色体上的一个超级整合子中, 与大肠杆菌中编码 DinJ-YafQ 毒素-抗毒素系统的基因簇同源^[16]。在大肠杆菌中诱导毒素基因 *vp1843* 表达能够抑制细菌生长, 而同时诱导抗毒素基因 *vp1842* 表达能中和毒素的毒性作用; 此外, 在大肠杆菌中表达 VP1843 毒素会引起细菌细胞形态的改变^[16]。VP1843 毒素具有 DNA 切割酶活性, 能够切割单链 DNA; VP1842 抗毒素能中和 VP1843 的核酸切割酶活性^[17]。在大肠杆菌中表达 VP1843 可以强烈地诱导染色体 DNA 降解; 在副溶血弧菌基因组中无法通过同源重组的方法缺失 *vp1842-vp1843* 基因簇^[18]。因此, VP1842-VP1843 毒素-抗毒素系统可能通过类似于解离后致死效应的机制, 维持副溶血弧菌 I 号染色体上超级整合子的稳定性^[18]。

TADB 2.0 在线工具^[19]预测副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株染色体上编码 6 个假定 II 型毒素-抗毒素系统, 其中一个已经被证实是有活性的毒素-抗毒素系统, 另一个被证实无活性^[16]。本研究从剩下的 4 个假定 II 型毒素-抗毒素系统中鉴定了一个有活性的毒素-抗毒素系统, 生物信息学分析结果显示该系统与其他细菌的 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统同源, 本研究以期为进一步探讨该毒素-抗毒素系统的功能及基于该系统设计新药靶标奠定基础, 同时对其他细菌中 II 型毒素-抗毒素系统的鉴定具有借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件

副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株和 pBADhisA 质粒由本实验室保存。大肠杆菌 Top10 菌株购自上海唯地生物技术有限公司。大肠杆菌 WM3064 菌株和 pHGEI01 质粒由中科院南海海洋研究所王晓雪研究员惠赠。副溶血弧菌和大肠杆菌均用 LB 培养基, 37 °C 培养。培养 WM3064 菌株时额外添加 50 µg/mL 的二氨基庚二酸(DAP)。培养含 pBADhisA 质粒的细菌时添加 75 µg/mL 的氨苄青

霉素; 培养含 pHGEI01 质粒的细菌时添加 50 µg/mL 的卡那霉素。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶 PrimerSTAR Max Premix、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和反转录试剂盒, 宝日生物技术有限公司; DNA 聚合酶 2×*Taq* Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 清洁试剂盒和质粒小量提取试剂盒, 康宁生命科学(吴江)有限公司; RNA 提取试剂盒, 上海普洛麦格生物产品有限公司; LB 培养基、抗生素、DAP 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; β-半乳糖苷酶活性检测试剂盒, 北京天恩泽基因科技有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪和凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 超微量紫外分光光度计 NanoDrop200, 杭州奥盛仪器有限公司; CMax Plus 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 超声波破碎仪, 南京赛飞生物技术有限公司。

1.1.3 引物

根据副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株的基因组^[20], 利用 Primer Premier 5 软件设计引物。引物序列见表 1, 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 副溶血弧菌染色体上假定 II 型毒素-抗毒素系统的预测

用 TADB 2.0 在线工具^[19]预测副溶血弧菌的假定 II 型毒素-抗毒素系统。通过查阅文献^[16-18]锁定其中尚未被鉴定的假定 II 型毒素-抗毒素系统, 作为本课题的研究对象。

1.2.2 重组质粒的构建

假定毒素诱导表达质粒的构建: 参考试剂盒说明书, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株的基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 用 PrimerSTAR Max Premix 和引物对 0402-F/0402-R、1820-F/1820-R、1884-F/1884-R

表 1 本研究用到的引物

Table 1 Primers used in this study

基因	引物名称	引物序列	内切酶	产物大小
Gene	Primers name	Primers sequence (5'→3')	Endonuclease	Size (bp)
<i>vp0402</i>	0402-F	CCGCGAGCTCGTGAGGACGGTTGGTATGAG	<i>Sac</i> I	1 422
	0402-R	AAA <u>AACTGCAGT</u> TAAAGAAGCCTACTCATTTTCAG	<i>Pst</i> I	
<i>vp1820</i>	1820-F	CCGCGAGCTCTTGATGAGTAGTAGTCAACGTTTATT	<i>Sac</i> I	273
	1820-R	AAA <u>AACTGCAGT</u> TAGTAGTGGAACGACATGAAATT	<i>Pst</i> I	
<i>vp1884</i>	1884-F	CCGCGAGCTCATGTATCCGGCTTGTATGAG	<i>Sac</i> I	186
	1884-R	AAA <u>AACTGCAGT</u> TATAAGAACCGATGCAGTAAT	<i>Pst</i> I	
<i>vp1885</i>	1885-F	CCGCGAGCTCATGACCGAAATTATTTATACGGA	<i>Sac</i> I	129
	1885-R	AAA <u>AACTGCAGT</u> TATTCGAACGTTTCAATTAAGT	<i>Pst</i> I	
<i>vp1821</i>	1821-F	CCGCGAGCTCGTGAAGACTATACTTGTTCATTAAT	<i>Sac</i> I	562
	1821-R	CTACTACTCATCATCTACTCATCAATTA <u>ACTCTCGTGC</u>		
	1820-F2	AATTGATGAGTAGATGATGAGTAGTAGTCAACGTTTATT		
	P1821-1820-F	CGGAATTC <u>CAAGTTGTTGAGCTTGTTCGAC</u>	<i>EcoR</i> I	
	1821'-R1	AGCTGTTTCCTGTGTGAGATCTAGTCTTCACTACTCCAGTTGTACAG		
	1820'-R1	AGCTGTTTCCTGTGTGAGATCTCGTTGACTACTACTCATCAATTA <u>ACT</u>		
	1821-1820-R1	AGCTGTTTCCTGTGTGAGATCTTTAGTAGTGGTAACGACATGAAAT		
	Common-R2	CGGGATCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAGATCT	<i>BamH</i> I	

和 1885-F/1885-R 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 聚合酶 PrimerSTAR Max Premix 25 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, 水 20 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。扩增的 DNA 片段酶切后与 pBADhisA 质粒连接, 连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。待菌落长出, 挑取单菌落培养后进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系: 2 \times Taq Master Mix 10 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 菌液模板 1 μ L, 水 7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。鉴定正确的菌液提取质粒, 进一步进行 DNA 测序鉴定。

假定抗毒素-毒素融合表达质粒的构建: 以副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株的基因组 DNA 为模板, 用 PrimerSTAR Max Premix 和引物对 1821-F/1821-R 和 1820-F2/1820-R 分别扩增 *vp1821* 和 *vp1820* 的 DNA 片段。再以扩增出的 DNA 片段为模板, 用 PrimerSTAR Max Premix 和引物对 1821-F/1820-R

进行重叠 PCR 反应, 得到 *vp1821-vp1820* 融合的 DNA 片段。重叠 PCR 反应体系: DNA 聚合酶 PrimerSTAR Max Premix 25 μ L, 2 个 DNA 片段各 1 μ L, 水 19 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。第一轮 PCR 结束后添加引物 F 和 R (10 μ mol/L)各 2 μ L, 进行第二轮 PCR。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。DNA 片段经酶切后与 pBADhisA 质粒连接, 转化 Top10 感受态细胞, 后续进行 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定。

LacZ 报告质粒的构建: 参考文献[21]构建 LacZ 报告质粒。以副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株的基因组 DNA 为模板, 用 PrimerSTAR Max Premix 和引物对 P1821-1820-F/1821'-R1、P1821-1820-F/1820'-R1 和 P1821-1820-F/1821-1820-R1 分别扩增 *vp1821-vp1820* 的启动子区加一小段 *vp1821* 的编码区、启动子区加 *vp1821* 和一小段 *vp1820* 的编码区、启动子区加 *vp1821-vp1820* 的 DNA 片段。再以扩增出的 DNA 片段为模板, 用 PrimerSTAR Max

Premix 和引物对 P1821-1820-F/Common-R2 进行第 2 轮 PCR 扩增, 得到添加核糖体结合位点序列 (Ribosome-Binding Site, RBS, 5'-AGATCTCACAC AGGAAACAGCT-3') 的上述 DNA 片段。DNA 片段经酶切后与 pHGEI01 质粒连接, 转化大肠杆菌 WM3064 感受态细胞, 后续进行 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定。

1.2.3 通过生长曲线检测假定毒素的毒性作用

转化 pBADhisA 和假定毒素诱导表达质粒的大肠杆菌 Top10 菌株接种于添加 0.1% 葡萄糖(防止毒素渗漏表达)的 LB 培养基, 培养至指数生长期中期($OD_{600}=0.6-0.8$), 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后用 LB 培养基洗一次, 再用等量 LB 培养基重悬。随后按照 1:100 比例分别转接于添加 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件)和 0.1% 葡萄糖(抑制条件)的 LB 培养基。将菌液分装于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μ L, 设置 3 个重复。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 的摇床中, 每隔 1 h 取出, 用酶标仪测定 OD_{595} 值, 连续测量 7 h, 绘制细菌生长曲线。

1.2.4 通过生长曲线检测假定抗毒素对毒素毒性的中和作用

转化 pBADhisA 和 pBADhisA-*vp1821-vp1820* 质粒的大肠杆菌 Top10 菌株接种于添加 0.1% 葡萄糖的 LB 培养基。菌液培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后用 LB 培养基洗 1 次, 再用等量 LB 培养基重悬。随后按照 1:100 比例分别转接于添加 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件)和 0.1% 葡萄糖(抑制条件)的 LB 培养基。将菌液分装于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μ L, 设置 3 个重复。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 的摇床中, 每隔 1 h 取出, 用酶标仪测定 OD_{595} 值, 连续测量 7 h, 绘制细菌生长曲线。

1.2.5 稀释点板实验检测毒素的杀菌活性及抗毒素对毒素杀菌活性的中和作用

转化 pBADhisA、pBADhisA-*vp1820* 和 pBADhisA-*vp1821-vp1820* 质粒的大肠杆菌 Top10

菌株接种于添加 0.1% 葡萄糖的 LB 培养基, 培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后用 LB 培养基洗 1 次, 再用等量 LB 培养基重悬。随后将菌液等分为 2 份, 一份添加 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件), 另一份添加 0.1% 葡萄糖(抑制条件), 将菌液置于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 的摇床中培养, 每隔 0.5 h 取出, 用添加 0.1% 葡萄糖的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)进行梯度稀释, 各稀释度吸取 5 μ L 点到添加 0.1% 葡萄糖的 LB 平板上。将平板置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养过夜后取出拍照。

1.2.6 副溶血弧菌 RNA 提取及 *vp1821-vp1820* 共转录分析

RNA 提取: 副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8, 用 RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA, 操作步骤参考试剂盒说明书。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, NanoDrop200 测定 RNA 浓度和 A_{260}/A_{280} 值。

vp1821-vp1820 共转录分析: RNA 检测合格后, 用反转录试剂盒合成 cDNA, 同时设置阴性对照组 cDNA-(不添加反转录酶)。以 cDNA、基因组 DNA 和 cDNA-为模板, 用引物对 1821-F/1821-R、1820-F/1820-R 和 1821-F/1820-R 分别扩增 *vp1821*、*vp1820* 和 *vp1821-vp1820* 的 DNA 片段。琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小。

1.2.7 毒素-抗毒素系统 VP1821-VP1820 的生物信息学分析

根据副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株的基因组注释, *vp1821* 编码 YefM 蛋白, 推测 *vp1820* 编码 YoeB 蛋白。在 NCBI 网站上查找其他细菌抗毒素 YefM 和毒素 YoeB 的氨基酸序列, 用蛋白比对工具 BLASTP 分析 VP1821、VP1820 与其他细菌 YefM、YoeB 蛋白的氨基酸序列同源性。用 EBI 网站的 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行多序列比对, 比对结果用 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) 输出。为了确定 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统是否存在于其

他弧菌属细菌中,以副溶血弧菌 VP1821、VP1820 的氨基酸序列为参考序列,用 BLASTp 检索霍乱弧菌和创伤弧菌中的同源蛋白,并分析氨基酸序列同源性。

1.2.8 β -半乳糖苷酶活性检测(LacZ 报告实验)

参考文献[21]进行 β -半乳糖苷酶活性检测。含有 LacZ 报告质粒的 WM3064 菌株培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 PBS 洗 1 次,加裂解缓冲液(pH 7.5 的 0.25 mol/L Tris-HCl, 0.5% Trion-X100)重悬。用超声波破碎仪裂解细菌(功率: 130 W, 超声 6 s, 间隔 8 s, 全部时间: 45 min), 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定上清的蛋白浓度,用 β -半乳糖苷酶活性检测试剂盒测定上清的 β -半乳糖苷酶活性,操作步骤参考试剂盒说明书。

2 结果与分析

2.1 副溶血弧菌染色体上编码假定 II 型毒素-抗毒素系统

TADB 2.0 在线工具^[19]预测副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株染色体上编码 6 对 II 型毒素-抗毒素系统(表 2)。其中, *vp1842-vp1843* 已经被证实编码一对毒素-抗毒素系统, VP1830-VP1829 被证实无活性^[16-18]。本研究针对剩下的 4 对假定 II 型毒素-抗毒素系统开展鉴定工作。

表 2 副溶血弧菌染色体上的假定 II 型毒素-抗毒素系统
Table 2 Putative chromosomal type II toxin-antitoxin systems in *Vibrio parahaemolyticus*

编号 No.	毒素基因 Toxin gene	抗毒素基因 Antitoxin gene	参考文献 Reference
TA1	<i>vp0402</i>	<i>vp0403</i>	
TA2	<i>vp1820</i>	<i>vp1821</i>	
TA3	<i>vp1830</i>	<i>vp1829</i>	[16]
TA4	<i>vp1843</i>	<i>vp1842</i>	[16-18]
TA5	<i>vp1884</i>	<i>vp1885</i>	
TA6	<i>vp1885</i>	<i>vp1886</i>	

2.2 基因 *vp1820* 表达产物对大肠杆菌具有毒性作用

将 pBADhisA 和 4 个假定毒素的诱导表达质粒分别转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。在添加 0.1% 葡萄糖(抑制条件)和 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件)的培养基中,测定细菌生长曲线。结果显示,在添加葡萄糖条件下, pBADhisA-*vp1820*/Top10 菌株表现出生长缺陷,转化其他重组质粒的 Top10 菌株和转化 pBADhisA 质粒的菌株生长一致(图 1A); 在添加阿拉伯糖条件下, pBADhisA-*vp1820*/Top10 菌株不能正常生长,而其他菌株生长一致(图 1B)。以上结果说明 *vp1820* 表达产物对大肠杆菌 Top10 菌株具有毒性作用,推测 *vp1820* 编码毒素。由于其他 3 个假定毒素基因的表达产物不具有毒性作用,不符合 II 型毒素-抗毒素系统的基本特征,因

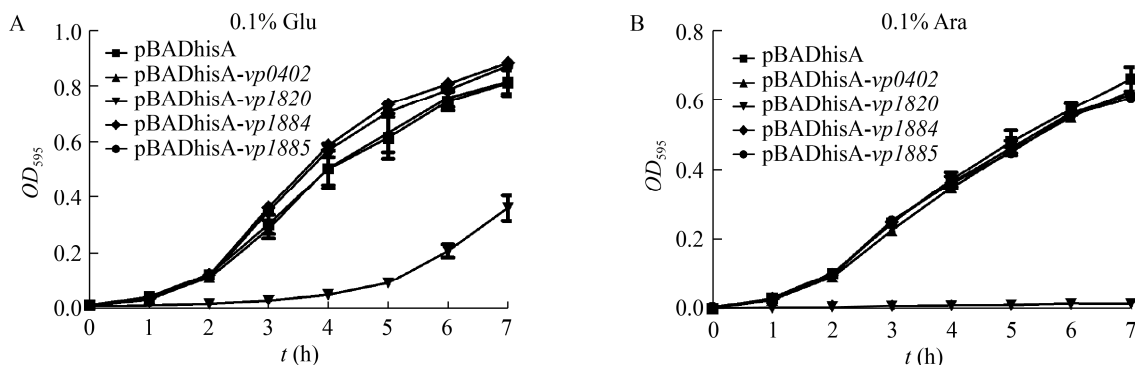


图 1 诱导假定毒素表达对大肠杆菌生长的影响

Figure 1 Effects of induction of putative toxins on *E. coli* growth

注: A: 添加葡萄糖条件下各菌株的生长曲线; B: 添加阿拉伯糖条件下各菌株的生长曲线

Note: A: Growth curves of the strains in the presence of glucose; B: Growth curves of the strains in the presence of arabinose

此后续实验仅针对 *vp1821-vp1820* 系统进一步开展鉴定工作。

2.3 基因 *vp1821* 表达产物能中和 *vp1820* 表达产物的毒性作用

将 pBADhisA 和 *vp1821-vp1820* 融合表达质粒 (pBADhisA-*vp1821-vp1820*) 分别转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。在添加 0.1% 葡萄糖(抑制条件)和 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件)的培养基中,测定细菌生长曲线。结果显示,在添加葡萄糖条件下,2 个菌株的生长曲线几乎完全重合(图 2A);在添加阿拉伯糖条件下, pBADhisA-*vp1821-vp1820*/Top10 菌株仅表现出轻微的生长缺陷(图 2B)。以上结果说明 *vp1821* 的表达产物能中和 *vp1820* 表达产物的毒性作用,推测 *vp1821* 编码抗毒素。

2.4 VP1820 具有杀菌活性, VP1821 能中和 VP1820 的杀菌活性

通过稀释点板实验确定 *vp1820* 表达产物是通过杀菌活性还是抑菌活性导致的大肠杆菌生长抑制。将细菌培养至指数生长期中期,分装两等份,一份添加 0.1% 葡萄糖(抑制条件),另一份添加 0.1% 阿拉伯糖(诱导条件),每隔 0.5 h 分别取样进行梯度稀释并点板。在 0 h, 3 个菌株在添加葡萄糖和阿拉伯糖条件下的生长情况一致(图 3A);在

0.5 h 时,添加葡萄糖条件下的 3 个菌株生长正常;而添加阿拉伯糖条件下的 pBADhisA-*vp1820*/Top10 菌株在平板上无菌落长出(图 3B);在 1 h 时,各菌株在平板上的生长情况和 0.5 h 时一致(图 3C)。以上结果说明 VP1820 具有杀菌活性,在大肠杆菌中诱导其表达 0.5 h 即可以杀死细菌,而 VP1821 能中和 VP1820 的杀菌活性。

2.5 基因 *vp1821* 和 *vp1820* 共转录

基因结构分析显示 *vp1821* 和 *vp1820* 之间有 11 个碱基重叠(图 4A),推测 2 个基因共转录。提取副溶血弧菌的总 RNA,反转录成 cDNA。分别以 cDNA、基因组 DNA 和 cDNA-为模板,用基因特异性引物扩增 *vp1821*、*vp1820* 和 *vp1821-vp1820* 的 DNA 片段。结果显示,以 cDNA 为模板扩增出的 *vp1821-vp1820* 片段与以基因组为模板扩增出的该片段大小一致,大致等于 *vp1821* 和 *vp1820* 片段大小之和,而用 cDNA-不能扩增出 *vp1821-vp1820* 的片段(图 4B)。以上结果说明 *vp1821* 和 *vp1820* 共转录。

2.6 基因簇 *vp1821-vp1820* 编码 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统

根据副溶血弧菌 RIMD 2210633 的基因组注释, *vp1821* 编码 YefM 抗毒素, *vp1820* 编码假想

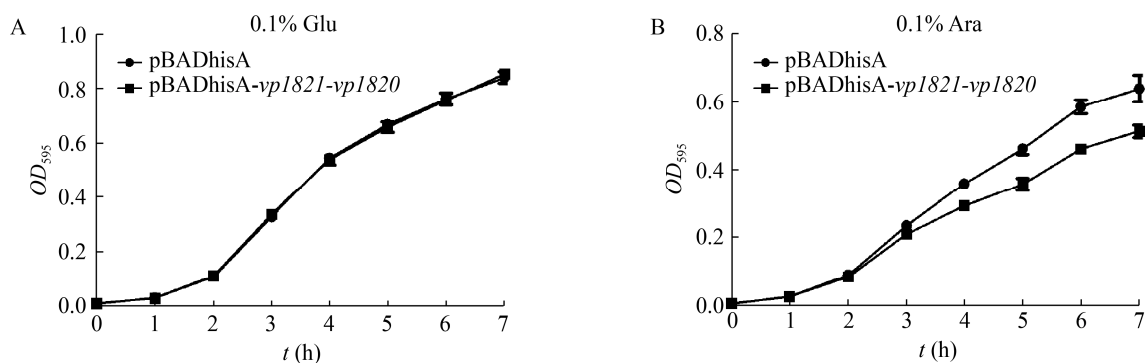


图 2 共诱导假定抗毒素和毒素表达对大肠杆菌生长的影响

Figure 2 Effects of coinduction of putative antitoxin and toxin on *E. coli* growth

注: A: 添加葡萄糖条件下各菌株的生长曲线; B: 添加阿拉伯糖条件下各菌株的生长曲线

Note: A: Growth curves of the strains in the presence of glucose; B: Growth curves of the strains in the presence of arabinose

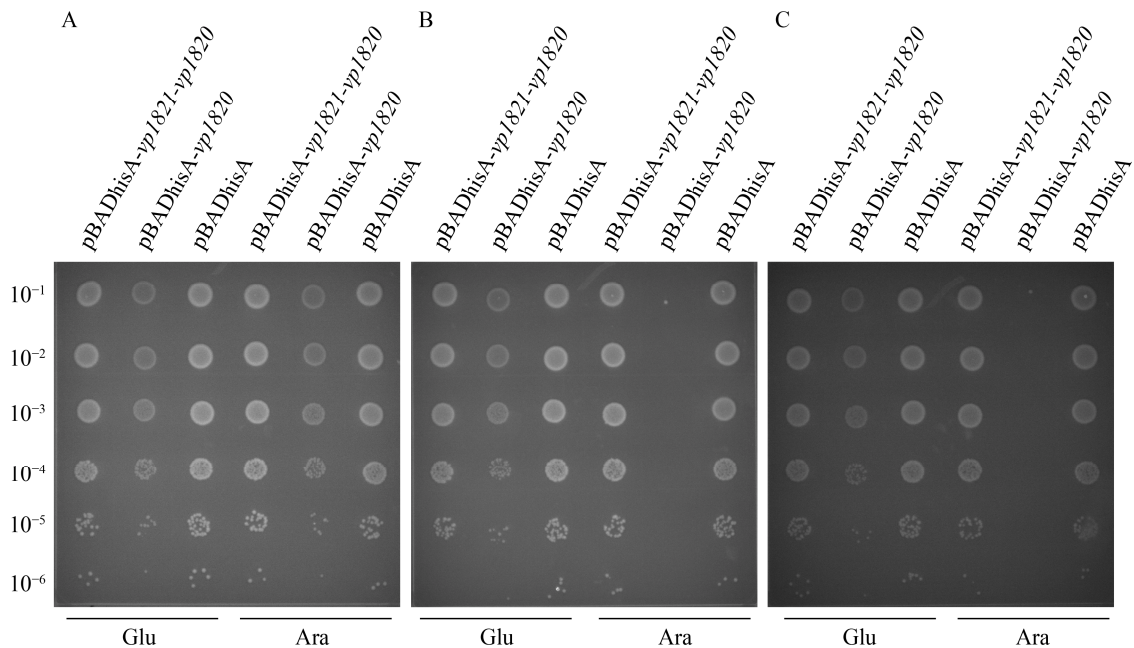


图3 稀释点板实验检测毒素的杀菌作用和抗毒素的中和作用

Figure 3 Detection of the bactericidal effect of toxin and the neutralization of antitoxin by spot dilution assays

注: A: 0 h; B: 0.5 h; C: 1 h。 10^{-1} – 10^{-6} 表示稀释倍数。Glu 表示添加葡萄糖; Ara 表示添加阿拉伯糖

Note: A: 0 h; B: 0.5 h; C: 1 h. 10^{-1} to 10^{-6} indicate dilution multiple. Glu indicates the addition of glucose, and Ara indicates the addition of arabinose

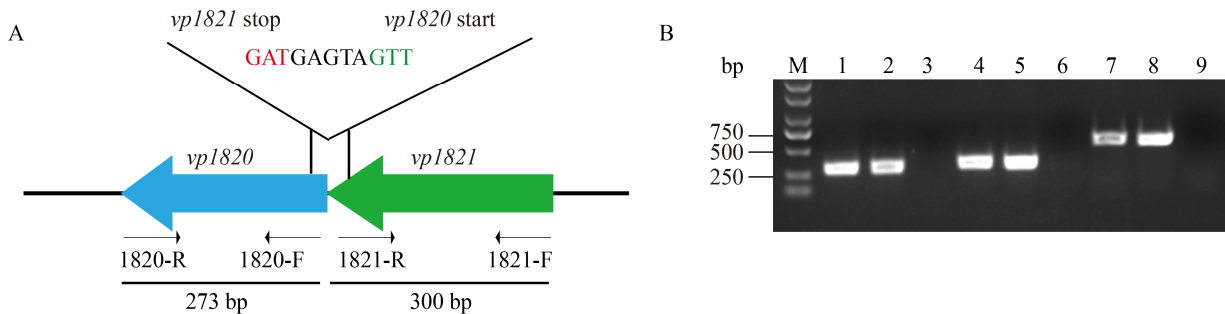


图4 基因簇 *vp1821-yp1820* 共转录分析

Figure 4 Co-transcription analysis of the *vp1821-yp1820* locus

注: A: 基因簇 *vp1821-yp1820* 的结构。B: 共转录分析: M: DL2000 DNA Marker; 1–3: 用引物对 1820-F/1820-R 扩增的结果; 4–6: 用 1821-F/1821-R 扩增的结果; 7–9: 用 1821-F/1820-R 扩增的结果; 1、4 和 7 是以 cDNA 为模板扩增的结果; 2、5 和 8 是以基因组 DNA 为模板扩增的结果; 3、6 和 9 是以 cDNA-为模板扩增的结果

Note: A: Genetic organization of the *vp1821-yp1820* locus. B: Co-transcription analysis: M indicates DL2000 DNA Marker, lanes 1–3 represent the amplification using primer pair 1820-F/1820-R, lanes 4–6 represent the amplification using primer pair 1821-F/1821-R, lanes 7–9 represent the amplification using primer pair 1821-F/1820-R, lanes 1, 4 and 7 represent the amplification using cDNA as the templates, lanes 2, 5 and 8 represent the amplification using genomic DNA as the templates, lanes 3, 6 and 9 represent the amplification using cDNA- as the templates

蛋白, 推测 *vp1821-yp1820* 编码 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统。检索其他细菌中 YefM 抗毒素和 YoeB 毒素的氨基酸序列, 进行 BLASTp 分析和多序列比对。BLASTp 结果显示副溶血弧菌 VP1821 蛋

白与大肠杆菌、猪链球菌、肺炎链球菌、鼠李糖乳杆菌和胸膜肺炎放线杆菌 YefM 抗毒素的氨基酸序列一致性分别为 45%、29%、30%、33%和 40%; VP1820 蛋白与大肠杆菌、猪链球菌、肺炎

链球菌、鼠李糖乳杆菌和胸膜肺炎放线杆菌 YoeB 毒素的氨基酸序列一致性分别为 65%、63%、63%、56%和 66%。多序列比对结果也显示副溶血弧菌的 VP1821-VP1820 蛋白与其他细菌的 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统具有较高的同源性, 而且各种细菌 YoeB 蛋白之间的同源性高于 YefM 蛋白 (图 5A 和 5B)。此外, BLASTp 结果显示副溶血弧菌 VP1821 蛋白与霍乱弧菌、创伤弧菌中同源蛋白的氨基酸序列一致性达到 85% 以上; VP1820 蛋白与这 2 个细菌中同源蛋白的氨基酸序列一致性达到 90% 以上。以上结果表明, 在副溶血弧菌中 *vp1821-vp1820* 编码 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统, 而且该系统也存在于霍乱弧菌和创伤弧菌中。

2.7 YefM 抗毒素增强启动子活性, YefM-YoeB 复合物抑制启动子活性

采用 pHGEI01 系列质粒(图 6A), 通过 LacZ 报告实验检测 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统组分对自身启动子的调控作用。结果如图 6B 所示, 当质粒上克隆了 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统的启动子 (pHGEI01-1821'), 细菌表现出较强的 β -半乳糖苷酶活性(2 394.77 酶活力单位); 当启动子后面加上抗毒素的编码基因 *vp1821* (pHGEI01-1821-1820'), β -半乳糖苷酶活性进一步提高, 达到 6 888.23 酶活力单位, 说明抗毒素 YefM (VP1821)能增强启动子活性; 当启动子后面加上 *vp1821-vp1820* (pHGEI01-1821-1820), 启动子活性显著降低至 693.33 酶活力单位, 说明 YefM-YoeB 复合物对启动子活性具有抑制作用。

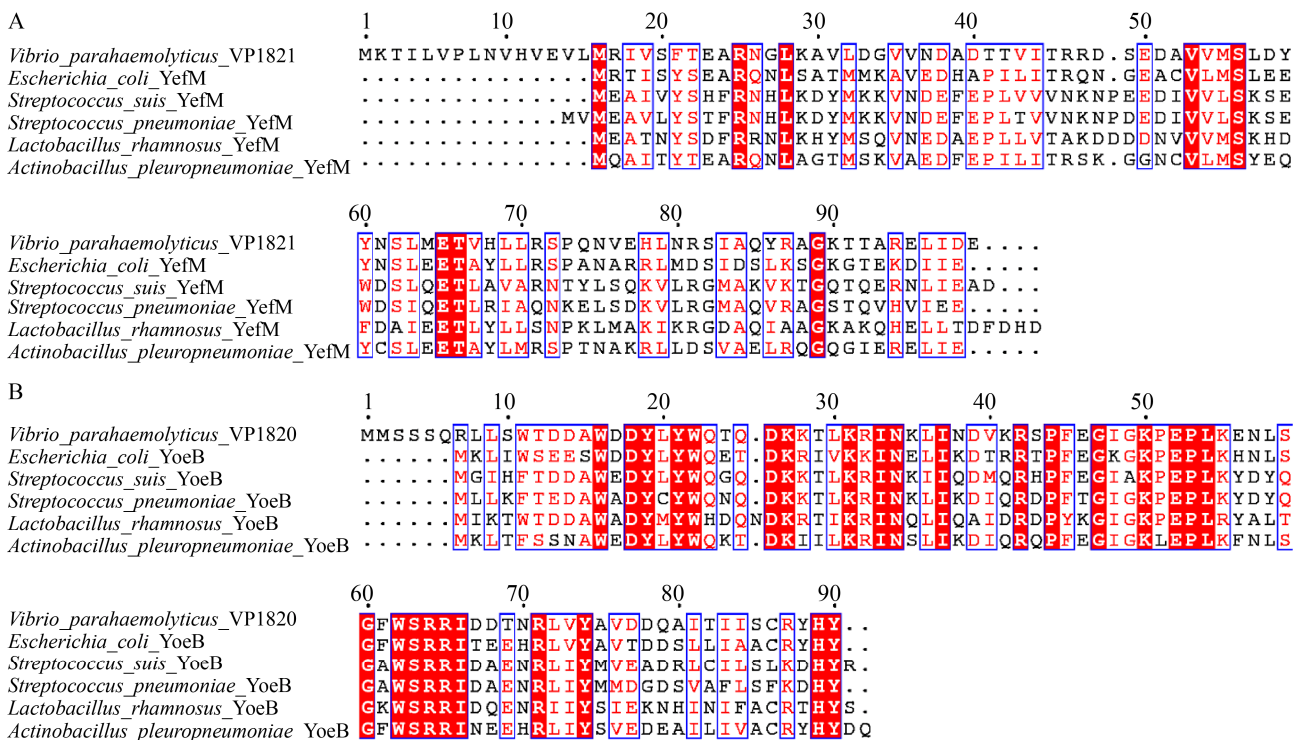


图 5 副溶血弧菌 VP1821-VP1820 蛋白与其他细菌 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统的多序列比对
Figure 5 Multiple sequence alignments of the *V. parahaemolyticus* VP1821-VP1820 proteins with the YefM-YoeB toxin-antitoxin systems from other bacteria

注: A: VP1821 蛋白与其他细菌 YefM 抗毒素的多序列比对; B: VP1820 蛋白与其他细菌 YoeB 毒素的多序列比对
 Note: A: Alignment of the VP1821 protein with the YefM antitoxins from other bacteria; B: Alignment of the VP1820 protein with the YoeB toxins from other bacteria

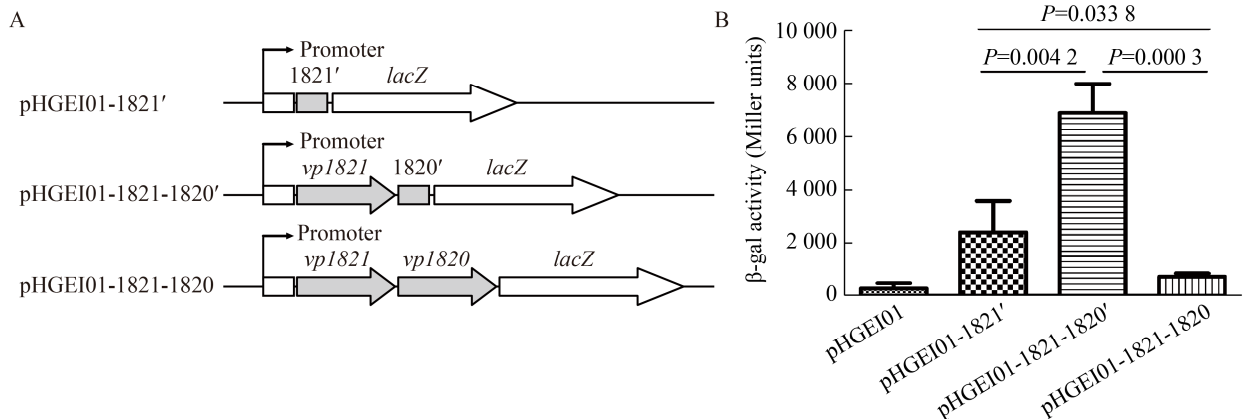


图 6 抗毒素和毒素-抗毒素复合物对启动子的自调控作用

Figure 6 Autoregulation of the promoter by the antitoxin and toxin-antitoxin complex

注: A: LacZ 报告质粒的示意图; B: β -半乳糖苷酶活性测定。显示的数据是 3 次独立实验的平均值加减标准差, 用单尾不配对 t 检验进行统计分析

Note: A: Schematic diagram of the LacZ reporter plasmids; B: Measurement of β -galactosidase activity. The data shown are means \pm standard deviations of three independent experiments; statistical analyses were performed using the one-tailed unpaired t test

3 讨论与结论

毒素-抗毒素系统广泛分布于细菌和古生菌的基因组中, 近年来该系统吸引了越来越多的注意。在许多病原菌中, 也有关于毒素-抗毒素系统的报道。在尿道致病性大肠杆菌中, 毒素-抗毒素系统对生态位特异性定殖和抗应激能力至关重要^[22]。在猪链球菌中, 有 5 个 II 型毒素-抗毒素系统被鉴定出来, 其中 SezAT 与 89K 致病岛的稳定性有关^[23-25]。在胸膜肺炎放线杆菌中, 有 4 个 II 型毒素-抗毒素系统被鉴定出来, 但这些毒素-抗毒素系统的功能仍然未知^[21]。最近的一项研究发现, 结核分枝杆菌的 VapBC22 毒素-抗毒素系统与细菌致病性和调节宿主免疫反应相关^[26]。

一方面由于数量众多, 另一方面由于开发了在线工具(例如 TADB 2.0)进行鉴定, II 型毒素-抗毒素系统成为鉴定数量最多、研究最深入的毒素-抗毒素系统类型^[8]。本研究证实副溶血弧菌的 *vp1821-vp1820* 基因簇编码一个 II 型毒素-抗毒素系统: (1) 基因 *vp1820* 的表达产物对大肠杆菌表现出毒性作用; (2) *vp1821* 的表达产物能中和 VP1820 的毒性作用; (3) 基因 *vp1821* 和 *vp1820* 共转录; (4) VP1821 和 VP1821-VP1820 复合物能

调控自身启动子。这些结果与 II 型毒素-抗毒素系统的典型特征^[6]一致。此外, VP1821-VP1820 和其他细菌的 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统具有较高的同源性, 进一步说明 *vp1821-vp1820* 编码 II 型毒素-抗毒素系统 YefM-YoeB。

本研究首先通过生物信息学方法预测副溶血弧菌染色体上的假定 II 型毒素-抗毒素系统。此前这种方法已经被用于 II 型毒素-抗毒素系统的鉴定, 并成功鉴定出一些毒素-抗毒素系统^[21,25], 说明该方法具有较高的可靠性。由于具有成熟的诱导表达系统, 大肠杆菌被广泛用于毒素-抗毒素系统的验证工作^[27]。因此, 本研究也用大肠杆菌来检测假定毒素的毒性作用和相应抗毒素的中和作用。本研究发现, pBADhisA-*vp1820*/Top10 菌株在添加葡萄糖条件下也表现出生长缺陷, 推测在抑制条件下, *vp1820* 基因仍然发生了渗漏表达, 而且表达产物对大肠杆菌具有较强的毒性作用。后续实验发现 VP1820 具有极强的杀菌活性, 说明这个推测是合理的。与本研究观察到的结果相似, 在猪链球菌和胸膜肺炎放线杆菌中, 携带 *yoeB* 基因重组表达质粒的大肠杆菌在抑制条件下也表现出生长缺陷^[21,23]。

诱导 VP1820 表达后, pBADhisA-*vp1820*/Top10 菌株不能在添加葡萄糖的培养基中恢复生长,说明 VP1820 通过杀菌活性而不是抑菌活性发挥毒性作用。在胸膜肺炎放线杆菌中, YoeB 毒素也是通过杀菌活性发挥毒性作用^[21]。在一些细菌中, YoeB 具有内切核糖核酸酶活性, 能切割 mRNA, 抑制转录起始^[28-31]。推测副溶血弧菌的 VP1820 蛋白通过相似的机制发挥毒性作用。副溶血弧菌的 VI 型分泌系统 1 (T6SS-1)也具有杀菌活性, 能杀死一些其他种群的细菌, 从而促进种间竞争^[32]。与之不同的是, 毒素-抗毒素系统中的毒素通常针对的是细菌自身^[6]。

II 型毒素-抗毒素系统的一个典型特征是抗毒素和毒素-抗毒素复合物对自身的启动子具有调控作用^[6]。本研究发现 YefM 抗毒素能增强自身启动子的活性, 而 YefM-YoeB 复合物能抑制启动子活性。在胸膜肺炎放线杆菌中, YefM 抑制启动子活性, YefM-YoeB 对启动子活性无显著调控作用^[21]。这说明在不同细菌中, YefM 抗毒素和 YefM-YoeB 复合物对启动子的调控作用并不一致。

毒素-抗毒素系统具有重要的生物学功能。第一个毒素-抗毒素系统发现于低拷贝的质粒上, 其通过解离后致死效应的机制维持质粒的稳定性^[33]。此后的研究发现毒素-抗毒素系统也能维持其他遗传元件的稳定性, 如整合接合元件、基因岛等^[12,24,34]。此外, 也有毒素-抗毒素系统介导抗噬菌体活性和调控生物被膜形成的报道^[35-36]。毒素-抗毒素系统对细菌致病性的影响也得到充分证实。例如, 在致病性大肠杆菌和结核分枝杆菌中, 均有毒素-抗毒素系统被报道与细菌致病性有关^[22,26]。将来可以构建 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统的单基因和双基因缺失株, 探讨该系统的功能。毒素-抗毒素系统是优良的新药设计靶标^[37], 由于 YefM-YoeB 毒素-抗毒素系统在副溶血弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌等细菌中具有极高的同源性, 基于该系统开发新型药物也对相关病原菌的防控具有重要意义。

本研究在副溶血弧菌中鉴定了一个新的毒素-

抗毒素系统 YefM-YoeB, YoeB 毒素通过杀菌活性抑制大肠杆菌的生长, 抗毒素 YefM 能中和 YoeB 的毒性作用, YefM 正调控自身启动子的活性, YefM-YoeB 复合物负调控启动子活性。本研究为将来深入探讨该系统的功能及基于该系统开发新型药物奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 705
- [2] Zhang LL, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 70-77
- [3] Matsuda S, Hiyoshi H, Tandhavanant S, Kodama T. Advances on *Vibrio parahaemolyticus* research in the postgenomic era[J]. *Microbiology and Immunology*, 2020, 64(3): 167-181
- [4] Paudyal N, Pan H, Liao XY, Zhang X, Li XL, Fang WH, Yue M. A meta-analysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(4): 187-197
- [5] Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, Huang MF, Lin SJ, Chen CY, Lin SS, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798-10803
- [6] Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 61-79
- [7] Harms A, Brodersen DE, Mitarai N, Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(5): 768-784
- [8] Lobato-Márquez D, Díaz-Orejas R, García-del Portillo F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 592-609
- [9] Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 208-214
- [10] Fernández-García L, Blasco L, Lopez M, Bou G, García-Contreras R, Wood T, Tomas M. Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens[J]. *Toxins*, 2016, 8(7): E227
- [11] Christensen-Dalsgaard M, Gerdes K. Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(2): 397-411
- [12] Wozniak RAF, Waldor MK. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(3): e1000439

- [13] Yuan J, Yamaichi Y, Waldor MK. The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(3): 611-619
- [14] Iqbal N, Guérout AM, Krin E, Le Roux F, Mazel D. Comprehensive functional analysis of the 18 *Vibrio cholerae* N16961 toxin-antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(13): 2150-2159
- [15] Wang YN, Wang H, Hay AJ, Zhong ZT, Zhu J, Kan B. Functional RelBE-family toxin-antitoxin pairs affect biofilm maturation and intestine colonization in *Vibrio cholerae*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135696
- [16] Hino M, Zhang J, Takagi H, Miyoshi T, Uchiumi T, Nakashima T, Kakuta Y, Kimura M. Characterization of putative toxin/antitoxin systems in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(1): 185-195
- [17] Zhang J, Ito H, Hino M, Kimura M. A RelE/ParE superfamily toxin in *Vibrio parahaemolyticus* has DNA nicking endonuclease activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 489(1): 29-34
- [18] Zhang J, Taniguchi S, Ito H, Iiyama K, Hino M, Katayama T, Kimura M. Expression of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin in *Escherichia coli* results in chromosomal DNA degradation[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(10): 1937-1940
- [19] Xie YZ, Wei YQ, Shen Y, Li XB, Zhou H, Tai C, Deng ZX, Ou HY. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D749-D753
- [20] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749
- [21] Zheng CK, Zhao XG, Zeng T, Cao MM, Xu JL, Shi GL, Li JQ, Chen HC, Bei WC. Identification of four type II toxin-antitoxin systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(12): fnx126
- [22] Norton JP, Mulvey MA. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10): e1002954
- [23] Zheng CK, Xu JL, Ren SJ, Li JQ, Xia MM, Chen HC, Bei WC. Identification and characterization of the chromosomal *yefM-yoeB* toxin-antitoxin system of *Streptococcus suis*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13125
- [24] Yao XY, Chen T, Shen XD, Zhao Y, Wang M, Rao XC, Yin SP, Wang J, Gong YL, Lu SG, et al. The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(2): 243-257
- [25] Xu JL, Zhang N, Cao MM, Ren SJ, Zeng T, Qin ML, Zhao XG, Yuan FY, Chen HC, Bei WC. Identification of three type II toxin-antitoxin systems in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Toxins*, 2018, 10(11): E467
- [26] Agarwal S, Sharma A, Bouzeyen R, Deep A, Sharma H, Mangalparthi KK, Datta KK, Kidwai S, Gowda H, Varadarajan R, et al. VapBC22 toxin-antitoxin system from *Mycobacterium tuberculosis* is required for pathogenesis and modulation of host immune response[J]. *Science Advances*, 2020, 6(23): eaba6944
- [27] Ning DG, Jiang Y, Liu ZY, Xu QG. Characterization of a chromosomal type II toxin-antitoxin system *mazEaFa* in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56035
- [28] Larson AS, Hergenrother PJ. Light activation of *Staphylococcus aureus* toxin YoeBSa1 reveals guanosine-specific endoribonuclease activity[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(1): 188-201
- [29] Feng S, Chen Y, Kamada K, Wang H, Tang K, Wang MT, Gao YG. YoeB-ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): 9549-9556
- [30] Yoshizumi S, Zhang YL, Yamaguchi Y, Chen L, Kreiswirth BN, Inouye M. *Staphylococcus aureus* YoeB homologues inhibit translation initiation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(18): 5868-5872
- [31] Zhang YL, Inouye M. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(11): 6627-6638
- [32] Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086
- [33] Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(10): 3116-3120
- [34] Huguet KT, Gonnet M, Doublet B, Cloeckeaert A. A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32285
- [35] Hoskisson PA, Sumbly P, Smith MCM. The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)₂ is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity[J]. *Virology*, 2015, 477: 100-109
- [36] Wood TL, Wood TK. The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation[J]. *MicrobiologyOpen*, 2016, 5(3): 499-511
- [37] Park SJ, Son WS, Lee BJ. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(6): 1155-1167