

pVA 质粒中 II 型分泌系统同源基因对副溶血弧菌生物学特性及 PirAB 表达和分泌的影响

苏彤彤¹, 唐磊^{1,2}, 莫照兰^{*1,2}

1 中国海洋大学三亚海洋研究院 海南省热带水产种质重点实验室, 海南 三亚 572024

2 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

苏彤彤, 唐磊, 莫照兰. pVA 质粒中 II 型分泌系统同源基因对副溶血弧菌生物学特性及 PirAB 表达和分泌的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5459-5474.

SU Tongtong, TANG Lei, MO Zhaolan. Two T2SS homologous genes of pVA plasmid affect biological characteristics and PirAB expression and secretion of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5459-5474.

摘要:【背景】副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是引起养殖对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)的病原之一, 毒素蛋白 PirAB 是该病原的致病因子, 由病原携带的 pVA 质粒上的 *pirA* 和 *pirB* 编码。PirAB 的分泌途径尚未明确。【目的】探究 pVA 质粒中 II 型分泌系统同源基因 *epsG2* 和 *epsE2* 对副溶血弧菌生物学特性及 PirAB 表达和分泌的影响。【方法】通过生物信息学分析发现副溶血弧菌 VP220218 株 pVA 质粒上存在 2 个 II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS)的同源基因 *epsG2* 和 *epsE2*; 利用框内缺失方法构建了突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$, 检测其生长、生物被膜形成、运动力和胞外蛋白酶活力的变化, 进一步用 RT-qPCR 和 Western blotting 分析了 PirAB 表达和分泌的变化。【结果】*epsG2* 和 *epsE2* 能够抑制 VP220218 的胞外蛋白酶活力($P < 0.001$)、在对数生长期抑制细菌的生长($P < 0.05$); 此外, *epsG2* 能够促进细菌的运动($P < 0.05$)、在平台期抑制 VP220218 的生物膜形成($P < 0.05$), *epsE2* 能够抑制细菌的运动、在对数生长中后期促进 VP220218 的生物膜形成($P < 0.05$)。RT-qPCR 结果显示, *epsE2* 对 *pirA* 和 *pirB* 的表达无影响; *epsG2* 在对数生长初期和中期抑制 *pirA* 和 *pirB* 的表达, 在对数生长后期和平台期则促进 *pirA* 和 *pirB* 的表达。Western blotting 结果显示, *epsG2* 对 PirAB 的合成和分泌无影响, *epsE2* 能够促进 PirAB 的合成和分泌。【结论】*epsG2* 和 *epsE2* 参与了副溶血弧菌 VP220218 的生理活动, 且 *epsE2* 影响 PirAB 的合成和分泌。研究结果为了解致 AHPND 菌 PirAB 毒素的合成和分泌途径提供了参考。

关键词: 对虾急性肝胰腺坏死病; 副溶血弧菌; II 型分泌系统; *epsG2*; *epsE2*

资助项目: 三亚崖州湾科技城管理局 2019 年重大科技项目(SKJC-KJ-2019KY01)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Sanya Yazhou Bay Science and Technology City Management Bureau in 2019 (SKJC-KJ-2019KY01).

*Corresponding author. E-mail: mzl@ouc.edu.cn

Received: 2023-04-27; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-07-25

Two T2SS homologous genes of pVA plasmid affect biological characteristics and PirAB expression and secretion of *Vibrio parahaemolyticus*

SU Tongtong¹, TANG Lei^{1,2}, MO Zhaolan^{*1,2}

1 Key Laboratory of Tropical Aquatic Germplasm of Hainan Province, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya 572024, Hainan, China

2 Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ministry of Education), College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract: [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is one of the pathogens causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in cultured shrimp. PirAB, encoded by *pirA* and *pirB* located on the plasmid pVA, acts as the virulence factor of AHPND. However, the secretion pathway of PirAB remains unclear. [Objective] To explore the effect of two T2SS homologous genes *epsG2* and *epsE2* of pVA on biological characteristics and PirAB expression and secretion of *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] The bioinformatics analysis revealed two type II secretion system (T2SS) homologous genes *epsG2* and *epsE2* on the pVA plasmid in *V. parahaemolyticus* VP220218. The mutants $\Delta epsG2$ and $\Delta epsE2$ were constructed by in-frame deletion. The growth, biofilm formation, swimming ability, and extracellular protease activity were compared between VP220218 and mutants. RT-qPCR and Western blotting were performed to compare the expression and secretion of PirAB between VP220218 and mutants. [Results] *epsG2* and *epsE2* suppressed the extracellular protease activity ($P < 0.001$) and the growth during the logarithmic stage ($P < 0.05$). In addition, *epsG2* promoted the swimming ($P < 0.05$) and inhibited the biofilm formation of VP220218 at the plateau stage ($P < 0.05$); *epsE2* restrained the swimming ability and promoted the biofilm formation of VP220218 at the middle and late logarithmic stage ($P < 0.05$). The results of RT-qPCR showed that *epsE2* had no effect on the expression of *pirA* or *pirB*; *epsG2* inhibited the expression of *pirA* and *pirB* at the early and middle logarithmic stage, while it promoted the expression of *pirA* and *pirB* at the late logarithmic stage and plateau stage. The results of Western blotting showed that *epsE2* promoted the synthesis and secretion of PirAB while *epsG2* had no significant effect on the synthesis or secretion of PirAB. [Conclusion] The results indicated that *epsG2* and *epsE2* were involved in the physiological activities of *V. parahaemolyticus* VP220218. Moreover, *epsE2* affected the synthesis and secretion of PirAB. The findings provided a reference for understanding the synthetic and secretory pathways of PirAB in AHPND-causing bacteria.

Keywords: acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp; *Vibrio parahaemolyticus*; type II secretory system; *epsG2*; *epsE2*

急性肝胰脏坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是一种世界范围内流行的对虾疾病^[1]。已知最早引起 AHPND 的病原是

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (VP_{AHPND}), 后来陆续发现浦那弧菌(*V. punensis*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、欧文氏弧菌(*V. owensii*)和坎贝氏

弧菌(*V. campbelli*)等也可以引起 AHPND^[2-7]。引起 AHPND 的细菌均携带一个 63–70 kb 的类 pVA1 质粒,该质粒上的 *pirA* 和 *pirB* 基因编码发光杆菌杀虫相关毒素(*Photorhabdus* insect-related, Pir) PirAB,该毒素可使对虾肝胰腺受损,是决定病原致病力的主要原因^[8]。PirAB 的表达和毒力受多种环境因子的影响。例如, Kumar 等^[9]发现在低转速培养条件下, VP_{AHPND} 菌株 M0904 的 PirA^{Vp} 和 PirB^{Vp} 的合成减少,对对虾的毒力降低,其原因可能是低转速培养容易引起细菌形成絮团,由此引起病原其他生理表型的改变。吡啶对 *pirA* 和 *pirB* 的转录有一定的抑制作用^[10];当致 AHPND 副溶血弧菌从高温(26–32 °C)转至低温(22–28 °C)培养时,可诱导 *pirA* 和 *pirB* 的表达^[11];盐度对 *pirAB* 的表达也有重要的影响^[12]。此外,密度感应(quorum sensing, QS)系统也影响 PirA^{Vp} 和 PirB^{Vp} 毒素蛋白的合成,通过主要调节因子 LuxO 和转录因子 AphB 调节 *pirA*^{Vp} 和 *pirB*^{Vp} 的表达,进而参与毒力的调控^[13]。最新的研究发现, PirB^{Vp} 具有凝集素样活性并识别虾肝胰腺的黏蛋白样 O-糖苷结构,引起肝胰腺细胞损伤;同时 VP_{AHPND} 还具有杀死周围细菌的作用^[14]。另外, AHPND 的感染程度并非由 PirAB 毒素编码基因拷贝数决定,而是取决于毒素释放量^[15]。目前尚无 PirAB 毒素通过何种途径从细胞内释放到细胞外的相关报道。

通过生物信息学分析,我们发现致 AHPND 菌株的类 pVA1 质粒存在 2 个 II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS)同源基因,分别编码假菌毛蛋白 EpsG 和胞质 ATP 酶 EpsE。T2SS 最早在克雷伯杆菌中发现,之后在大多数革兰氏阴性菌中都发现了 T2SS^[16]。T2SS 由 12–15 种核心蛋白质组成,在克雷伯杆菌中称为 Pul 蛋白,在弧菌中称为 extracellular protein secretion (Eps),在大肠杆菌和其他一些细菌中称为 general secretory

pathway (Gsp)蛋白^[16]。这些蛋白组成外膜复合体、周质中的假菌毛蛋白、内膜平台和胞质 ATP 酶^[16]。T2SS 通过向胞外分泌各种水解酶(蛋白酶、脂肪酶和磷酸酶)、毒素、黏附素和细胞色素等,在获取营养、呼吸、生物膜形成、运动和致病性方面发挥作用^[16]。在弧菌属中,关于 T2SS 的研究多见于霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。霍乱弧菌在小肠定殖后,通过 T2SS 分泌霍乱毒素(cholera toxin, CT)等致病因子,导致腹泻症状^[17]。此外,霍乱弧菌中的 T2SS 还负责分泌生物膜形成相关的胞外基质蛋白、几丁质结合和降解蛋白、血凝素/蛋白酶(hemagglutinin/protease, HA/P)、胶原酶以及丝氨酸蛋白酶 VesA、VesB 和 VesC^[18-22]。致 AHPND 菌株 pVA 质粒的两个 T2SS 同源基因是否对 PirAB 毒素的表达、合成和分泌产生影响,需要开展相关研究。

本研究对致 AHPND 的副溶血弧菌 pVA 质粒上的两个 T2SS 同源基因进行生物信息学分析,利用框内基因缺失技术构建两个 T2SS 同源基因的突变株,在此基础上分析突变株的生物学特性(生长、运动、生物被膜形成和胞外蛋白酶活力),用 RT-qPCR 检测突变株 *pirA* 和 *pirB* 的表达情况,用 Western blotting 检测 PirAB 蛋白的合成和分泌情况,初步探究 pVA 质粒上的两个 T2SS 同源基因的功能。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验中所用菌株和质粒的详细信息见表 1,所用引物信息见表 2。副溶血弧菌的培养基为含 2% NaCl 的胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)/胰蛋白胨大豆琼脂培养基(trypticase soy agar, TSA) (g/L): 胰蛋白胨大豆肉汤 30.0, 氯化钠 10.0, 固体培养基添加琼脂粉 20.0;培养条件: 28 °C、150 r/min。大肠杆菌的培养基为 LB (g/L):

表 1 试验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

名称 Name	描述 Description	来源 Source
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
VP220218	致 AHPND 副溶血弧菌菌株, 含有 <i>pirA</i> 和 <i>pirB</i> 基因 AHPND-causing <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain, contains <i>pirA</i> and <i>pirB</i> genes	本实验室 Our laboratory
VPΔ <i>epsG2</i>	副溶血弧菌 VP220218 <i>epsG2</i> 基因缺失突变菌株(缺失 <i>epsG2</i> 基因 22-951 bp) <i>epsG2</i> mutant (22-951 bp of <i>epsG2</i> was deleted in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain VP220218)	本研究 This study
VPΔ <i>epsE2</i>	副溶血弧菌 VP220218 <i>epsE2</i> 基因缺失突变菌株(缺失 <i>epsE2</i> 基因 232-1 497 bp) <i>epsE2</i> mutant (232-1 497 bp of <i>epsG2</i> was deleted in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain VP220218)	本研究 This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Clone strain, endA1, RecA1 mutation, <i>lacZ</i> ΔM15	购自南京诺维赞公司 Purchased from Vazyme Company, Nanjing
MC1061 (<i>λpir</i>)	<i>thi thr-1 leu6 proA2 his-4 arg E2 lacY1 galK2 aral4xyl5 supe44λpir</i>	新加坡国立大学惠赠 Obtained from National University of Singapore
S17-1 (<i>λpir</i>)	Tp ^f Sm ^r <i>recA thi pro rK-mK-RP4:2-Tc:: Mu-Km Tn7λpir</i>	新加坡国立大学惠赠 Obtained from National University of Singapore
Plasmids		
pCE2 TA/ Blunt-Zero	3 957 bp, cloning vector, Amp ^r , Kan ^r	南京诺维赞公司 Purchased from Vazyme Company, Nanjing
pRE112	5 760 bp, suicide plasmid pGp704, depends on <i>pir</i> factor, <i>oriT</i> , <i>oriV</i> , <i>sacB</i> , and Cm ^r	本实验室 Our laboratory
pRE112- <i>DepsG2</i>	插入 <i>DepsG</i> 片段的 pRE112 重组质粒 PRE112 recombinant plasmid inserted with <i>DepsG</i> fragment	本研究 This study
pRE112- <i>DepsE2</i>	插入 <i>DepsE</i> 片段的 pRE112 重组质粒 PRE112 recombinant plasmid inserted with <i>DepsE</i> fragment	本研究 This study

胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 固体培养基添加琼脂粉 20.0; 培养条件: 37 °C、150 r/min。突变株构建所用抗生素及浓度分别为: 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 50 μg/mL、氯霉素 (chloramphenicol, Cm) 10 μg/mL。小鼠抗 PirB 单克隆抗体由中国水产科学院黄海水产研究所董宣博士惠赠, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥(北京)生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

偶氮酪蛋白、0.1% (质量体积分数) 结晶紫草酸铵染料, 北京索莱宝科技有限公司; 细菌总

RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×Phanta Max Master Mix、Vazyme ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Without ROX)、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 化学发光检测试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; MonScript™ RTIII Super Mix with dsDNase (Two-Step), 莫纳生物科技有限公司。

PCR 仪、凝胶成像仪、酶标仪、紫外分光光度计、Thermo Fisher iBlot™ 2 干转系统, Thermo Fisher 公司; 电击转化仪、荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

表 2 试验所用引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequences (5'→3')
用于 <i>epsG2</i> 基因敲除 For <i>epsG2</i> mutation	
VP220218- <i>epsG2</i> -dele-for	GGGGTACCGCGGGCGTAAGCCTTTCTG
VP220218- <i>epsG2</i> -int-rev	<u>CTATTTACATTGGGTTCCTCGTTGGCGTTTCATCA</u>
VP220218- <i>epsG2</i> -int-for	ACCCAATGTAAATAGCAAAGGAGC
VP220218- <i>epsG2</i> -dele-rev	GGGGTACCTGCGGTAATGGCATAGCGTC
用于 <i>epsE2</i> 基因敲除 For <i>epsE2</i> mutation	
VP220218- <i>epsE2</i> -dele-for	GGGGTACCCGGTCACCCCCACTCTAACG
VP220218- <i>epsE2</i> -int-rev	<u>TACTTGCTCGGAGGCAACATTTTGCTCGCCTTGCTCT</u>
VP220218- <i>epsE2</i> -int-for	GCCTCCGAGCAAGTAGATGACC
VP220218- <i>epsE2</i> -dele-rev	GGGGTACCCGTTTGGCAGTAAGAGACCCGTAT
RT-qPCR	
RT-16S rRNA-for	ATGACTCGCTGGCAAACAAGGAT
RT-16S rRNA-rev	TGGGGAGTACGGTCGCAAGATT
RT- <i>pirA</i> -for	TTAGCCACTTTCCAGCCGC
RT- <i>pirA</i> -rev	CCGGAAGTCGGTCGTAGTGT
RT- <i>pirB</i> -for	TCGTTATCAGCCCACGCAG
RT- <i>pirB</i> -rev	TTTACCGATTCTGATGTGCA

斜体加粗表示限制性内切酶识别位点和保护碱基, 下划线为重叠序列

Italic and bold marked are restriction enzyme recognition sites and protective bases. The underlined are overlapping sequences.

1.3 生物信息学分析

在非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein database, NR)^[23]、基因本体(gene ontology, GO)^[24]、蛋白质直系同源簇(cluster of orthologous groups of proteins, COG)^[25]、致病菌毒力因子(virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB)^[26]等数据库中, 使用 BLASTp 对副溶血弧菌 VP220218 的 pVA 质粒编码基因进行注释, 得到两个 T2SS 同源基因(GM001736 和 GM001740)信息, 进一步使用在线工具 NCBI CDD、HMMER、SMART 和 SignalP 综合分析编码蛋白质的功能域和信号肽结构。从 GenBank 提取 AHPND 菌株 (*V. parahaemolyticus*、*V. owensii* 和 *V. campbelli*) 类 pVA 质粒中的 T2SS 同源蛋白序列, 用 MEGA 6 进行蛋白序列对齐后采用 GeneDoe 软件绘图。

1.4 基因突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 的构建

采用框内缺失、两次同源重组的方法构建副溶血弧菌 VP220218 突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ ^[27]。利用高温水煮裂解法提取 VP220218 的基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 使用引物 *epsG2*-dele-for/*epsG2*-int-rev、*epsG2*-int-for/*epsG2*-dele-rev 和 *epsE2*-dele-for/*epsE2*-int-rev、*epsE2*-int-for/*epsE2*-dele-rev (表 2) 扩增 *epsG2* 和 *epsE2* 的上游和下游同源臂。接着以扩增得到的上、下游同源臂的混合物为模板, 以含有 *Kpn* I 酶识别位点的 *epsG2*-dele-for/*epsG2*-dele-rev 和 *epsE2*-dele-for/*epsE2*-dele-rev (表 2) 为引物进行 overlap-PCR, 连接上、下游同源臂以构建缺失片段 *DepsG2* 和 *DepsE2*。PCR 反应体系: 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, *epsG2/epsE2* 上游同源臂片段 0.5 μ L,

epsG2/epsE2 下游同源臂片段 0.5 μL , ddH_2O 10.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 15 s, 58 $^\circ\text{C}$ 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 5 min。将获得的缺失片段与自杀质粒 pRE112 连接, 得到的重组质粒分别电转到大肠杆菌 S17 (λpir)感受态细胞中, 分别以 S17 (pRE112-*DepsG2*)和 S17 (pRE112-*DepsE2*)为供体菌株、VP220218 为受体菌株进行接合试验。使用 20%蔗糖 TSA 平板筛选一次重组菌株, 再分别用含氯霉素和不含氯霉素的 TSA 平板筛选二次重组菌株。将阳性克隆传代 10 代检测遗传稳定性, 最终获得稳定遗传的突变株 ΔepsG2 和 ΔepsE2 。

1.5 突变株生物学特性的测定

对 ΔepsG2 和 ΔepsE2 进行生长曲线、生物被膜形成、运动和胞外蛋白酶活力的测定。进行生长曲线测定^[27]时, 将野生株和突变株接种于 TSB 培养基, 28 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜, 将菌液浓度调整到 OD_{540} 为 1.0, 以 1:100 的体积比接入 200 mL TSB, 28 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 设置 3 个平行, 定时取样测定 OD_{540} 值, 绘制生长曲线。

采用结晶紫染色法进行突变株生物膜测定^[28], 取对数生长期($OD_{540}=0.5$)的菌液加入 96 孔板中, 28 $^\circ\text{C}$ 静置培养, 测定时去除表层菌液, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 96 孔板, 加入甲醇固定 20 min, 倒掉溶液并晾干孔板后加入 200 μL 0.1% (质量体积分数)的结晶紫草酸铵染色, 染色 15 min 后倒掉染液并用 PBS 洗涤 96 孔板, 加入 200 μL 无水乙醇溶解生物被膜, 测定 OD_{570} 值。

用含 0.3%琼脂的 TSA 培养基进行细菌运动性测定^[27], 取对数生长期、 OD_{540} 为 1.0 的突变株菌液 2.5 μL , 垂直接种在含 0.3%琼脂的 TSA 平板上, 28 $^\circ\text{C}$ 培养, 在 12 h 和 24 h 观测泳动圈

的直径。

进行胞外蛋白酶活力测定时, 首先制备胞外蛋白产物, 将 OD_{540} 为 1.0 的突变株培养液 100 μL 涂布于铺有无菌玻璃纸的 TSA 平板, 28 $^\circ\text{C}$ 倒置培养 20 h。用 10 mL PBS 冲洗收集玻璃纸上的菌苔, 在 4 $^\circ\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 35 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液即为胞外蛋白产物。采用偶氮酪蛋白测定法检测胞外蛋白酶活力^[29], 取 100 μL 胞外蛋白产物与 100 μL 0.5% (质量体积分数)偶氮酪蛋白溶液混合, 加入 300 μL Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 8.0)缓冲液, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 然后加入 400 μL 10% (质量体积分数)三氯乙酸, 室温静置 30 min。12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清加入 800 μL NaOH 溶液(0.5 mol/L)显色, 测量溶液 OD_{442} 。上述试验均设置 3 个平行, 所得数据采用统计学分析。

1.6 实时定量聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

用 RT-qPCR 检测副溶血弧菌 *pirA* 和 *pirB* 的表达量。取不同培养时间的野生株 VP220218、 ΔepsG2 和 ΔepsE2 的菌液, 测定菌液 OD_{540} 值。对不同培养时间的不同菌株均取 OD_{540} 为 1.0 的菌体, 用细菌总 RNA 提取试剂盒提取菌体 RNA, 使用 MonScriptTM RTIII Super Mix with dsDNase (Two-Step)将 RNA 反转录为 cDNA, 以 16S rRNA 基因为内参进行 RT-qPCR 反应, 所用引物序列见表 2。反应体系: 2 \times ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (without ROX) 10 μL , RT-16S/*pirA*/*pirB*-for (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , RT-16S/*pirA*/*pirB*-for (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , cDNA 1 μL , DEPC H_2O 8.2 μL 。反应条件(两步法): 95 $^\circ\text{C}$ 3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线: 65–95 $^\circ\text{C}$, 每个循环下降 0.5 $^\circ\text{C}$, 每个循环反应时间 5 s。反应结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *pirA* 和 *pirB* 的相对表达量^[30]。

1.7 副溶血弧菌胞内胞外 PirB 的检测

用 Western blotting 检测副溶血弧菌胞内胞外 PirB 的变化。在不同培养时间(1、2、3 和 6 h)取野生株 VP220218、 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 的菌液, 调节浓度至 OD_{540} 为 1.0, 利用三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)法^[31]提取胞内蛋白(intracellular protein, ICP)和胞外蛋白质(extracellular protein, ECP), 取等量样品进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 利用 Thermo Fisher iBlot™ 2 干转系统将蛋白质条带转印到 PVDF 膜上, 浸没于 PBST 中(含 5%脱脂奶粉)封闭过夜, 洗膜后依次用一抗(1:4 小鼠抗 PirB 单抗)、二抗(1:5 000 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG)孵育, 使用 ECL 化学发光液进行显色、拍照, 利用软件 ImageJ 分析条带灰度值。

1.8 数据分析

菌株生长曲线、泳动性、生物被膜和胞外蛋白酶活性测定与 RT-qPCR 检测中, 每组试验重复 3 次, 每个试验组和对照组均有至少 3 个生物学重复。利用 SPSS 26.0 对数据进行单因素 ANOVA 检验, 最终结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, $P<0.05$ 表示有显著性差异, $P<0.001$ 表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

对副溶血弧菌菌株 VP220218 的 pVA 质粒编码基因注释, 发现两个 T2SS 同源基因 *GM001736* 和 *GM001740*, 在致 AHPND 菌株 (*V. parahaemolyticus*、*V. owensii* 和 *V. campbelli*) 中, 这两个基因编码的蛋白质序列高度保守(图 1)。*GM001736* 基因由 966 个核苷酸组成, 编码 321 个 aa, N 末端起始的 68 个 aa 组成 PulG 超家族结构域(图 1A), 即克雷伯氏菌 T2SS 假

菌毛 PulG 的特征结构域, 其同源蛋白在弧菌中称为 EpsG。进一步分析发现, *GM001736* 具有一个菌毛蛋白(Pilin)样信号肽(Sec/SPIII) (127 aa), 含有一个跨膜结构域(7–28 aa)。*GM001740* 基因由 1 572 个核苷酸组成, 编码 523 个 aa, 具有 PulE 超家族保守结构域(45–485 aa), 即克雷伯氏菌 T2SS ATP 酶 PulE 特征结构域(图 1B), 其同源蛋白在弧菌中称为 EpsE。*GM001740* 无信号肽和跨膜结构域。同时, 在副溶血弧菌菌株 VP220218 的染色体 II 上发现一套完整的 T2SS, 含有 12 个基因。本研究将副溶血弧菌菌株 VP220218 染色体 II 上的 *epsG* (*GM004805*)和 *epsE* (*GM004807*)同源基因命名为 *epsG1* 和 *epsE1*, 在 pVA 质粒上的同源基因命名为 *epsG2* (*GM001736*)和 *epsE2* (*GM001740*)。序列比对分析显示, *epsG1* 和 *epsG2* 的核酸序列并未发现显著的相似性, 氨基酸序列相似性为 27%; *epsE1* 和 *epsE2* 的核酸序列并未发现显著的相似性, 氨基酸序列相似性为 27%。

2.2 突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 的构建和鉴定

采用框内缺失突变技术构建了 *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失片段, 通过两次同源重组构建了 *epsG2* 和 *epsE2* 缺失突变株。 $\Delta epsG2$ 的 PCR 鉴定如图 2A 所示, 用引物 *epsG2-dele-for/epsG2-dele-rev* 扩增后, 野生株(泳道 P1)扩增得到 2 486 bp 的 DNA 片段, $\Delta epsG2$ (泳道 9)扩增得到 1 556 bp 的片段, 缺失了 22–951 bp 的 DNA 片段。 $\Delta epsE2$ 的 PCR 鉴定如图 2B 所示, 用引物 *epsE2-dele-for/epsE2-dele-rev* 扩增后, 野生株(泳道 P2)扩增得到 2 840 bp 的 DNA 片段, $\Delta epsE2$ (泳道 9)扩增得到 1 574 bp 的片段, 缺失了 232–1 497 bp 的 DNA 片段。PCR 产物经 Sanger 测序验证无误。

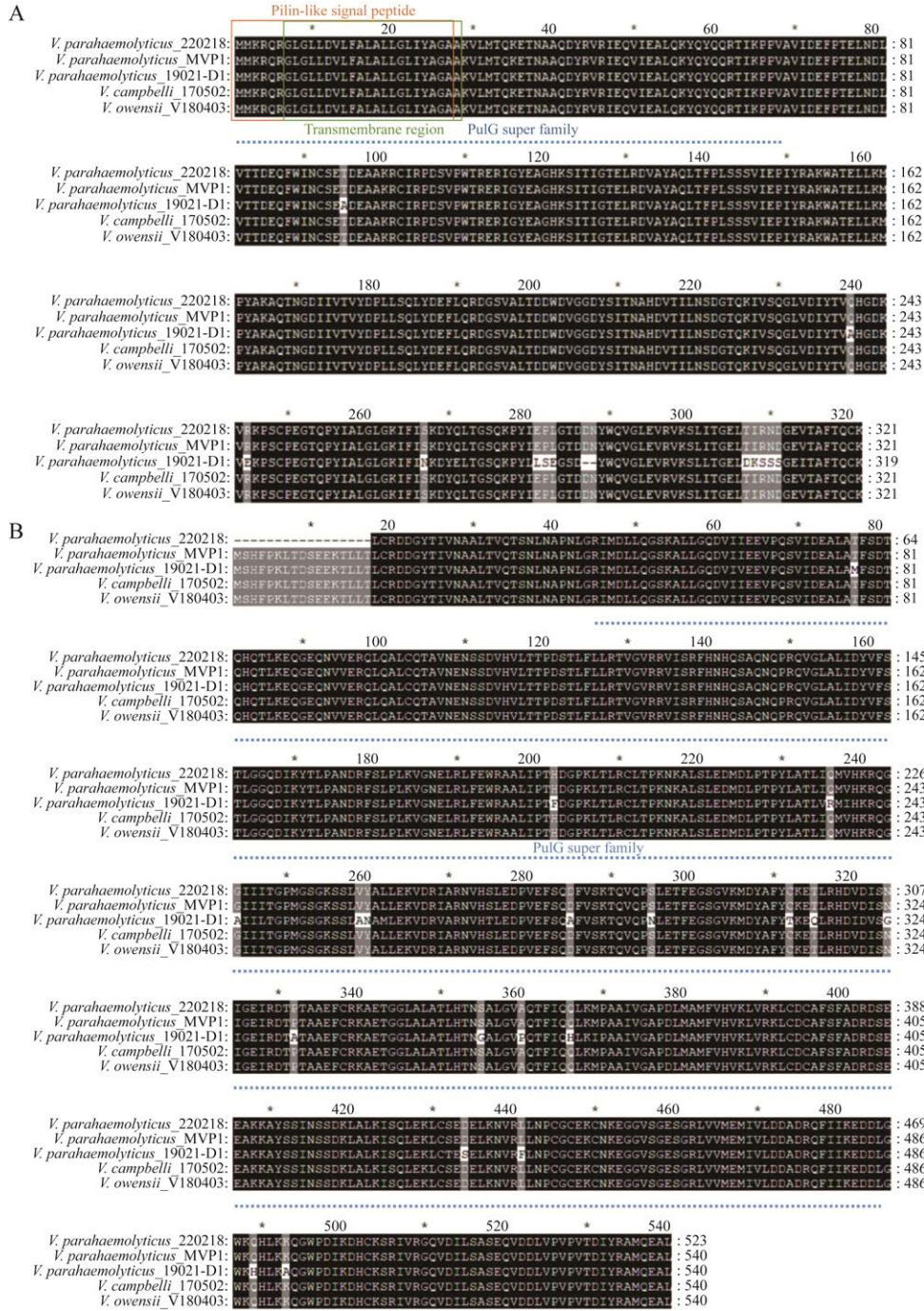


图 1 蛋白质序列同源比对图 A: pVA 质粒上 EpsG2 蛋白质序列同源比对图. B: pVA 质粒上 EpsE2 蛋白质序列同源比对图. 图中左侧为致 AHPND 菌株名称, 黑色标注为蛋白质序列高度保守区域, 虚线标注为蛋白质保守结构域, 橙色方框标注为菌毛蛋白样信号肽, 绿色方框标注为跨膜区域

Figure 1 Homology map of protein sequences. A: Homology map of EpsG2 on plasmid pVA. B: Homology map of EpsE2 on plasmid pVA. The left side of the figure shows the name of AHPND-causing strains. The black regions are marked as the highly conservative regions of the protein, the dotted lines are marked as the conservative domain of the protein, the orange box is marked as the Pilin like signal peptide, and the green box is marked as the transmembrane region.

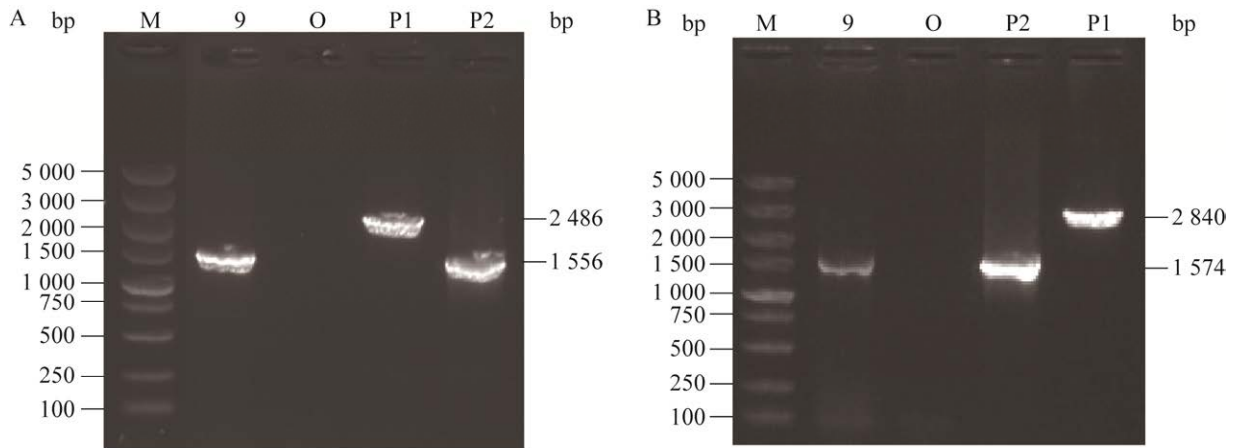


图 2 PCR 鉴定突变株 A: $\Delta epsG2$ PCR 产物电泳图, 9: 突变株 $\Delta epsG2$; O: 空白对照; P1: 野生型菌株对照; P2: pRE112- $\Delta epsG2$ 重组质粒对照. B: $\Delta epsE2$ PCR 产物电泳图, 9: 突变株 $\Delta epsE2$; O: 空白对照; P1: 野生型菌株对照; P2: pRE112- $\Delta epsE2$ 重组质粒对照. M: DL5000 DNA Marker
 Figure 2 PCR identification of mutant strains. A: Agarose gel electrophoresis of $\Delta epsG2$ PCR product. 9: Mutant $\Delta epsG2$; O: Blank control; P1: Wild type control; P2: pRE112- $\Delta epsG2$ recombinant plasmid control. B: Agarose gel electrophoresis of $\Delta epsE2$ PCR product. 9: Mutant $\Delta epsE2$; O: Blank control; P1: Wild type control; P2: pRE112- $\Delta epsE2$ recombinant plasmid control. M: DL5000 DNA Marker

2.3 突变株的基本生物学特性

为了探究 $epsG2$ 和 $epsE2$ 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 的生长, 测定了野生株、 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 在 0-96 h 的生长曲线。结果如图 3 所示, 野生株和两株突变株的生长速率在延滞期(0-1 h)、平台期(40-88 h)和衰退期(88-96 h)无显著性差异($P>0.05$)。在对数生长期(1-40 h), 两株突变株的生长速率显著大于野生型菌株($P<0.05$)。上述结果可以看出, $epsG2$ 和 $epsE2$ 基因的缺失显著提高了 VP220218 在对数生长期的生长速度, 即 $epsG2$ 和 $epsE2$ 基因对 VP220218 对数期的生长具有抑制作用。

为了探究 $epsG2$ 和 $epsE2$ 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 生物被膜的形成, 采用结晶紫法检测野生株、 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 在 0-96 h 的生物被膜量, 结果如图 4 所示。在培养期间, 3 个菌株的生物被膜含量均呈现先上

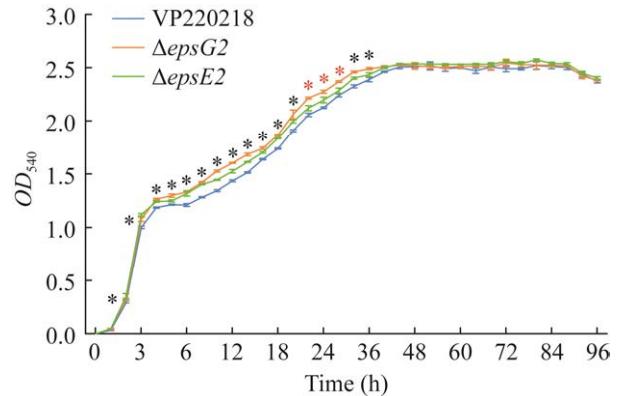


图 3 副溶血弧菌 VP220218 及其突变株的生长曲线 黑色*代表 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 均与野生株有显著差异($P<0.05$), 红色*代表只有 $\Delta epsG2$ 与野生株有差异($P<0.05$)

Figure 3 Growth curve of *Vibrio parahaemolyticus* VP220218 and its derivative mutants. Black * represents that both $\Delta epsG2$ and $\Delta epsE2$ have significant differences from wild type strain ($P<0.05$). Red * represents that only $\Delta epsG2$ has significant differences from wild type strain ($P<0.05$).

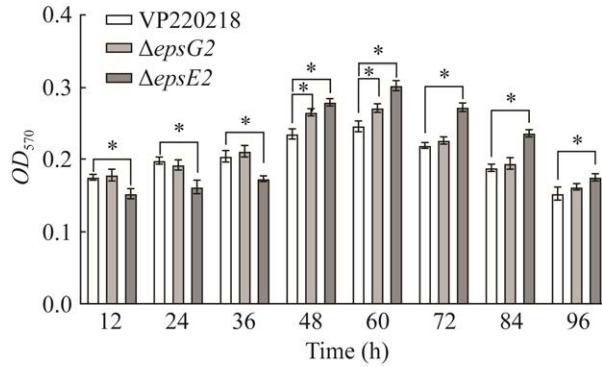


图4 副溶血弧菌 VP220218 及其突变株的生物被膜量

Figure 4 Biofilm forming ability of *Vibrio parahaemolyticus* VP220218 and its derivative mutants. *: $P < 0.05$.

升后下降的趋势, 在 60 h 达到最高, 而后逐渐降低。ΔepsE2 在 12–36 h (对数生长中后期) 生物被膜含量显著低于野生型菌株 ($P < 0.05$), 在 48–96 h (平台期和衰退期) 的被膜含量显著高于野生型菌株 ($P < 0.05$); ΔepsG2 在 48–60 h (平台期) 的生物被膜含量显著高于野生型菌株 ($P < 0.05$), 在其他时期则与野生株无显著性差异 ($P > 0.05$)。

以上结果说明, *epsE2* 基因在对数生长中后期能促进 VP220218 的生物膜形成, 在平台期和衰退期具有抑制作用; *epsG2* 基因在平台期能够抑制 VP220218 的生物膜形成。

为了探究 *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 的运动, 在软琼脂平板上测定了野生株、ΔepsG2 和 ΔepsE2 的泳动圈直径。结果如图 5 所示, ΔepsG 的泳动圈直径在培养 12 h 时显著小于野生型菌株 ($P < 0.05$), 24 h 后与野生株无显著性差异; ΔepsE 的泳动圈直径在培养 12 h 与野生型菌株无显著差异, 24 h 后泳动圈直径显著大于野生株 ($P < 0.05$)。以上结果说明, *epsG2* 对副溶血弧菌的泳动性呈现促进作用, 而 *epsE2* 则呈现抑制作用。

为了探究 *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 的胞外蛋白酶活力, 采用偶氮酪蛋白测定法测定了野生株、ΔepsG2 和 ΔepsE2 的胞外蛋白酶水解蛋白质的能力, 结果如图 6 所示。ΔepsG2 和 ΔepsE2 的 OD₄₄₂ 值均显著高于野生型菌株 ($P < 0.001$), 即胞外蛋白酶活力均显著高于野生型菌株, 说明 *epsG2* 和 *epsE2*

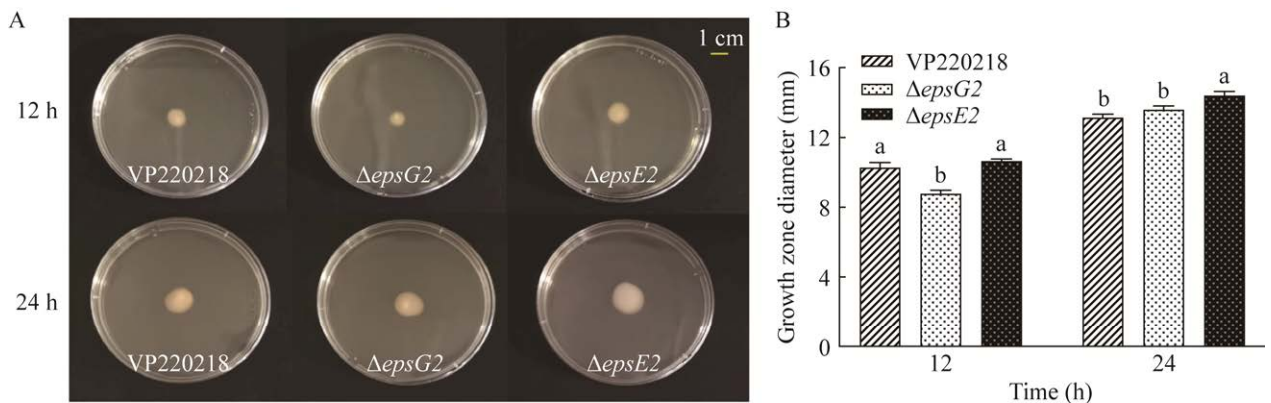


图5 副溶血弧菌 VP220218 及其突变株的泳动性 A: 3 种菌株泳动生长情况. B: 3 种菌株泳动圈直径. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 5 Swimming ability of *Vibrio parahaemolyticus* VP220218 and mutants. A: Swimming growth of VP220218, ΔepsG2 and ΔepsE2. B: Diameter for swimming circle of VP220218, ΔepsG2 and ΔepsE2. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

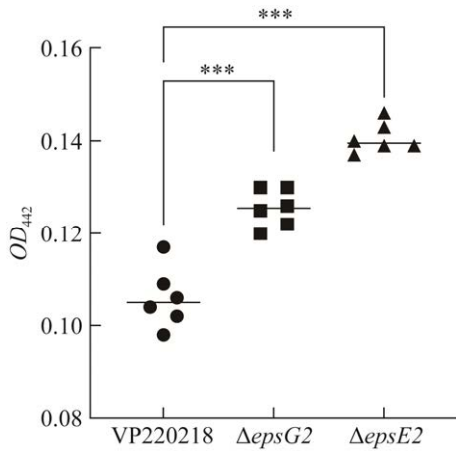


图 6 副溶血弧菌 VP220218 及其突变株的胞外蛋白酶活性
Figure 6 Extracellular protease activity of *Vibrio parahaemolyticus* VP220218 and its derivative mutants. ***: $P < 0.001$.

基因的缺失使副溶血弧菌 VP220218 胞外蛋白酶活力显著升高, 即 *epsG2* 和 *epsE2* 对胞外蛋白的蛋白酶活力具有抑制作用。

2.4 突变株 *pirA* 和 *pirB* 基因的表达量

为了解 *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 的 *pirA* 和 *pirB* 的表达, 用 RT-qPCR 分析 $\Delta epsG2$ 、 $\Delta epsE2$ 和野生株 VP220218 在不同生长时期 *pirA* 和 *pirB* 的相对表达量。结果如图 7 所示, 野生株及突变株的 *pirA* 和 *pirB* 的相对表达量在生长期间呈现由高到低的趋势, 最高表达量出现在对数生长初期 ($OD_{540}=0.5, 2\text{ h}$) 和中期 ($OD_{540}=1.5, 12\text{ h}$)。 $\Delta epsG2$ 在对数生长初期和中期的 *pirA* 和 *pirB* 的相对表达量显著高于野生株 ($P < 0.05$), 在对数生长后期

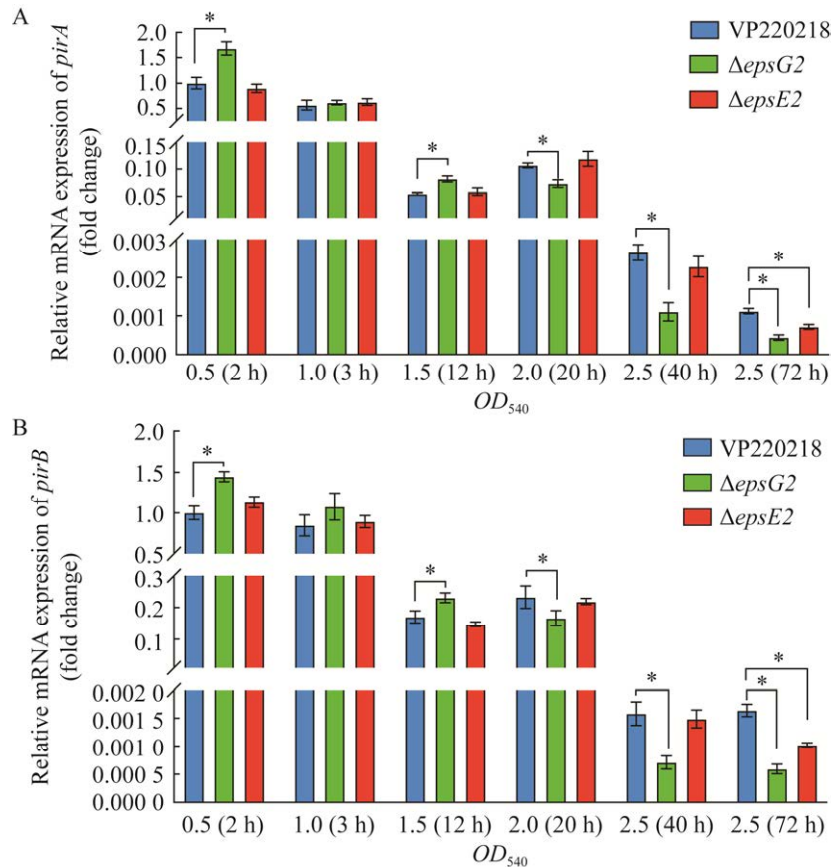


图 7 副溶血弧菌 VP220218 及其突变株的 *pirA* (A) 和 *pirB* (B) 基因的相对表达量
Figure 7 The expression of *pirA* and *pirB* of *Vibrio parahaemolyticus* VP220218 and mutants. *: $P < 0.05$.

($OD_{540}=2.0$, 20 h)和平台期($OD_{540}=2.5$, 40 h 和 72 h)显著低于野生株($P<0.05$); $\Delta epsE2$ 的 *pirA* 和 *pirB* 的相对表达量在平台末期显著低于野生株($P<0.05$), 在其他时期与野生株无显著性差异($P>0.05$)。

以上结果说明, *epsG2* 对 VP220218 中 *pirAB* 的表达具有显著影响, 在对数生长初期和对数生长中期呈现抑制作用, 在对数生长后期和平台期呈现促进作用。然而 *epsE2* 基因对 *pirAB* 的表达影响较小, 仅在平台末期呈现促进作用。

2.5 PirB 毒素的胞内合成和胞外分泌

为了解 *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失是否影响副溶血弧菌 VP220218 的 PirB 的表达, 利用 Western blotting 检测野生株 VP220218、 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 在不同培养时间(1、2、3 和 6 h)的 PirB 胞内合成和胞外分泌量。结果如图 8 所示, 随着菌株的生长, 3 个菌株胞内蛋白(ICP)和胞外蛋白(ECP)中 PirB 含量整体上均呈现逐渐增加的趋势。 $\Delta epsG2$ ICP 和 ECP 中 PirB 含量与野生株差异不显著, $\Delta epsE2$ ICP 和 ECP 中 PirB 含量均低于野生型株。因此, *epsG2* 不影响 PirB 蛋白的合成和分泌, 而 *epsE2* 能促进 PirB 蛋白的合成和分泌。本研究用 PirB 蛋白来表征 PirAB 二元毒素, 因此认为 *epsG2* 不影响 PirAB 毒素的合成和分泌, 而 *epsE2* 能够促进 PirAB 毒素的合成和分泌。

3 讨论与结论

对虾急性肝胰腺坏死病的主要致病因子是毒素蛋白 PirAB^[32], 该毒素的分泌途径尚未明确。很多病原菌利用 T2SS 将周质空间的毒性蛋白转移到细胞膜外环境或宿主体内, 使宿主细胞致病^[18,33-34]。通过分析致 AHPND 副溶血弧菌中编码 PirAB 的质粒 pVA 序列发现, 该质粒上有 2 个 T2SS 同源基因 *epsG2* 和 *epsE2*, 分别编码 T2SS 主要假菌毛蛋白和胞质 ATP 酶。为

探究 *epsG2* 和 *epsE2* 的功能, 本研究构建了突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$, 对突变株的部分生理表型特征进行了测定。结果显示, *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失提高了 VP220218 在对数生长期的生长速度。有研究表明, T2SS 与细菌的生长有关, 如杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的 T2SS 编码基因 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 缺失后细菌的生长速度下降^[35]; 也有研究表明, T2SS 结构基因的缺失对一些细菌的生长无影响, *gspD* 和 *gspK* 的缺失对肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)的生长无影响^[36], *gspD* 的缺失也不会影响鲍曼氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)生长^[37]。这些结果说明在不同细菌中不同 T2SS 基因对生长具有不同的功能。T2SS 与细菌的生物被膜形成有关, 如霍乱弧菌(*V. cholerae*) T2SS 基因 *epsG* 和 *epsD* 的缺失会抑制细菌生物被膜形成^[17], 肠致病性大肠杆菌 T2SS 基因 *gspD* 的缺失也会抑制 EPEC 生物被膜的形成^[36]。我们的研究显示, *epsG2* 在平台期、*epsE2* 在对数生长中后期抑制 VP220218 的生物被膜形成, 这个结果说明 T2SS 基因对细菌生物被膜形成的影响与细菌的培养时间有关。在 EPEC 的研究中也发现了类似的结果, 在培养早期 T2SS 基因缺失株生物被膜的形成未受到影响, 在培养后期(96 h)生物被膜的形成则显著减少^[36]。T2SS 与细菌的运动有关, 如在玉米迪基氏菌(*Dickeya zeae*)中, T2SS 基因 *otatA*、*otatB* 和 *otatE* 缺失后, 细菌的运动能力下降^[38]; 而在杀鲑气单胞菌中, T2SS 基因 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 缺失后, 细菌的运动能力未发生变化^[35]。类似地, 我们的研究结果也显示, *epsG2* 的缺失降低了 VP220218 的运动能力; 相反地, *epsE2* 缺失加快了细菌的运动。这些结果说明在不同细菌中不同 T2SS 基因对细菌运动具有不同的功能。T2SS 能够分泌多种水解酶, 如酯酶、

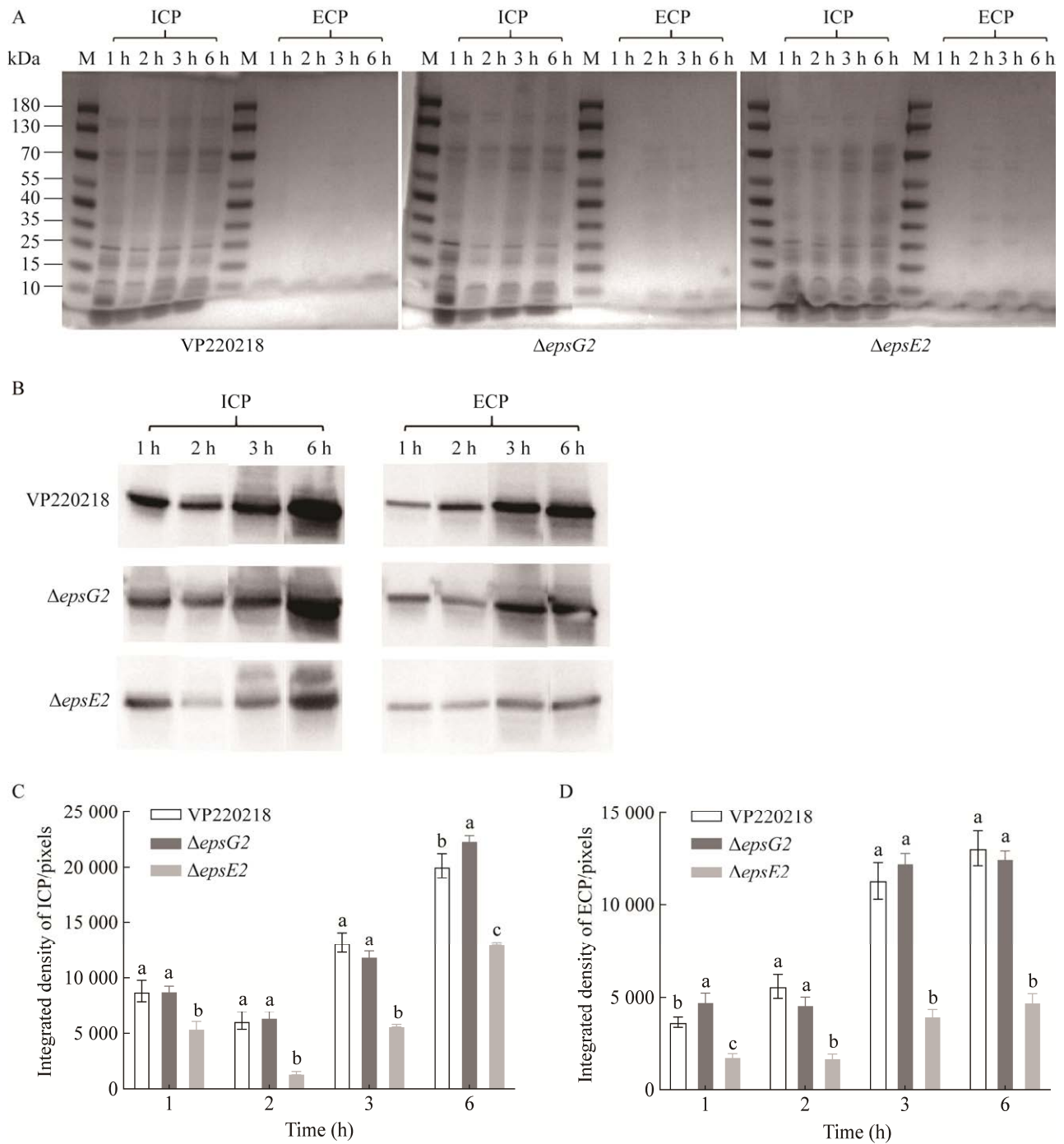


图 8 *epsG2* 和 *epsE2* 的敲除对 PirB 合成和分泌的影响 A: 各取样点 ICP 与 ECP 样品的考马斯亮蓝染色对照. B: ICP 和 ECP 中 PirB 的含量, 1、2、3 和 6 h 分别为取样时菌株生长的时间, ICP 为胞内蛋白样品, ECP 为胞外蛋白样品. C: ICP 中 PirB 条带灰度值统计. D: ECP 中 PirB 条带灰度值统计

Figure 8 Effect for knockout of *epsG2* and *epsE2* on the synthesis and secretion of PirB. A: Loading control. B: The content of PirB in ICP and ECP. 1, 2, 3 and 6 h respectively represents growth time of strains. ICP is intracellular protein, ECP is extracellular protein. C: Statistics for gray values of PirB stripe in ICP. D: Statistics for gray values of PirB stripe in ECP.

蛋白酶、淀粉酶和几丁质酶等,因此 T2SS 基因的缺失可引起多种水解酶的运输障碍。例如,杀鲑气单胞菌 T2SS 基因 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 缺失后,细菌各种胞外酶活力大大下降^[35]。与此研究结果不同的是, *epsG2* 和 *epsE2* 的缺失能够促进 VP220218 胞外蛋白酶活力,说明 *epsG2* 和 *epsE2* 具有抑制胞外蛋白酶合成或者分泌的作用。在我们的研究中未对突变株的酯酶、淀粉酶和溶血素的活力进行检测, *epsG2* 和 *epsE2* 是否对这些胞外酶的合成和运输有影响还需要进一步开展研究。

RT-qPCR 结果显示,野生株、突变株 $\Delta epsG2$ 和 $\Delta epsE2$ 中的 *pirA* 和 *pirB* 从对数生长前期到对数生长后期表现较高的相对表达量,进入平台期后相对表达量均出现大幅下降,这个结果与 Lin 等^[13]基本一致,似乎说明 *pirA* 和 *pirB* 的表达量与细菌的生长速度呈正相关。与此推测一致的是, $\Delta epsG2$ 的生长速度在对数生长期快于野生株,这个时期其 *pirA* 和 *pirB* 的表达量也高于野生株;在菌株进入对数生长后期,即 $\Delta epsG2$ 生长速度变慢后,其 *pirA* 和 *pirB* 的表达明显低于野生株,这些结果意味着 *epsG2* 对 *pirA* 和 *pirB* 的表达有双重调节作用。然而 *epsE2* 对 *pirA* 和 *pirB* 的表达表现为单向调节作用,在平台末期促进 *pirA* 和 *pirB* 的表达。

Western blotting 结果显示, *epsE2* 的缺失使 VP220218 菌株 ICP 和 ECP 中 PirB 含量降低。EspE 是位于细胞质内具有环状六聚体结构的 ATP 酶,已有研究表明 EspE 可与 T2SS 的假菌毛组分 EspL 和 EspG 结合,为假菌毛的组装或拆卸提供能量,是 T2SS 进行蛋白质运输不可缺少的组分^[39]。因此 *epsE2* 的缺失会对 VP220218 菌株 T2SS 的功能产生影响,直接影响了 T2SS 的组装,同时对 PirAB 的合成分泌造成直接的影响。

综上所述,本文研究了副溶血弧菌 VP220218 菌株 pVA 质粒 T2SS 同源基因 *epsG2* 和 *epsE2* 的功能,初步探究了 *epsG2* 和 *epsE2* 在 PirAB 表达和分泌中的作用,但还需进一步探究 *epsG2* 和 *epsE2* 对副溶血弧菌菌株毒力的影响。而且考虑到 VP220218 菌株的染色体存在一套完整的 T2SS,染色体上的同源基因 *epsG1* 和 *epsE1* 是否对 PirAB 的表达和分泌具有作用,将是下一步的工作。

REFERENCES

- [1] KUMAR V, ROY S, BEHERA BK, BOSSIER P, DAS BK. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture[J]. *Toxins*, 2021, 13(8): 524.
- [2] HAN JE, TANG KFJ, TRAN LH, LIGHTNER DV. *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33-40.
- [3] ESHIK MME, ABEDIN MM, PUNOM NJ, BEGUM MK, RAHMAN MS. Molecular identification of AHPND positive *Vibrio parahaemolyticus* causing an outbreak in south-west shrimp farming regions of Bangladesh[J]. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 2018, 41(2): 127-135.
- [4] RESTREPO L, BAYOT B, ARCINIEGAS S, BAJAÑA L, BETANCOURT I, PANCHANA F, REYES MUÑOZ A. PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis clade*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13080.
- [5] KONDO H, VAN PT, DANG LT, HIRONO I. Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): e00978-15.
- [6] LIU LY, XIAO JZ, XIA XM, PAN YJ, YAN SL, WANG YJ. Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01395-15.

- [7] DONG X, WANG HL, ZOU PZ, CHEN JY, LIU Z, WANG XP, HUANG J. Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. Gut Pathogens, 2017, 9: 31.
- [8] LEE CT, CHEN IT, YANG YT, KO TP, HUANG YT, HUANG JY, HUANG MF, LIN SJ, CHEN CY, LIN SS, LIGHTNER DV, WANG HC, WANG AHJ, WANG HC, HOR LI, LO CF. 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.
- [9] KUMAR V, ROY S, BARUAH K, van HAVER D, IMPENS F, BOSSIER P. Environmental conditions steer phenotypic switching in acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*, affecting PirA^{VP}/PirB^{VP} toxins production[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(10): 4212-4230.
- [10] ZHANG SS, YANG Q, DEFOIRD T. Indole decreases the virulence of pathogenic vibrios belonging to the *Harveyi* clade[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(1): 167-176.
- [11] PRAGTHONG P, CHIRAPONGSATONKUL N. Temperature-dependent expression of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain (VpAHPND)[J]. International Journal of Agricultural Technology, 2020, 16: 1185-1198.
- [12] SOTO-RODRIGUEZ SA, LOZANO-OLVERA R, PALACIOS-GONZALEZ DA, BOLAN-MEJIA C, RENDON-AGUILAR KG. Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2019, 50(5): 1002-1015.
- [13] LIN SJ, HUANG JY, LE PT, LEE CT, CHANG CC, YANG YY, SU ECY, LO CF, WANG HC. Expression of the AHPND toxins PirA^{VP} and PirB^{VP} is regulated by components of the *Vibrio parahaemolyticus* quorum sensing (QS) system[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2889.
- [14] SOTO-RODRIGUEZ SA, LOZANO-OLVERA R, RAMOS-CLAMONT MONTFORT G, ZENTENO E, SÁNCHEZ-SALGADO JL, VIBANCO-PÉREZ N, AGUILAR RENDÓN KG. New insights into the mechanism of action of PirAB from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Toxins, 2022, 14(4): 243.
- [15] TINWONGGER S, NOCHIRI Y, THAWONSUWAN J, NOZAKI R, KONDO H, AWASTHI SP, HINENOYA A, YAMASAKI S, HIRONO I. Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(6): 1755-1765.
- [16] KOROTKOV KV, SANDKVIST M, HOL WGJ. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(5): 336-351.
- [17] SANDKVIST M, MICHEL LO, HOUGH LP, MORALES VM, BAGDASARIAN M, KOOMEY M, DIRITA VJ, BAGDASARIAN M. General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(22): 6994-7003.
- [18] JOHNSON TL, FONG JC, RULE C, ROGERS A, YILDIZ FH, SANDKVIST M. The type II secretion system delivers matrix proteins for biofilm formation by *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(24): 4245-4252.
- [19] SANDKVIST M. Type II secretion and pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(6): 3523-3535.
- [20] CONNELL TD, METZGER DJ, LYNCH J, FOLSTER JP. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the *eps*-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(21): 5591-5600.
- [21] PARK BR, ZIELKE RA, WIERZBICKI IH, MITCHELL KC, WITHEY JH, SIKORA AE. A metalloprotease secreted by the type II secretion system links *Vibrio cholerae* with collagen[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(6): 1051-1064.
- [22] SIKORA AE, ZIELKE RA, LAWRENCE DA, ANDREWS PC, SANDKVIST M. Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(19): 16555-16566.
- [23] LI WZ, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. Bioinformatics, 2002, 18(1): 77-82.
- [24] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S,

- MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, SHERLOCK G. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [25] GALPERIN MY, MAKAROVA KS, WOLF YI, KOONIN EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(database issue): D261-D269.
- [26] CHEN LH, XIONG ZH, SUN LL, YANG J, JIN Q. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D641-D645.
- [27] 王小鹿, 李杰, 李贵阳, 唐磊, 杨慧超, 莫照兰. *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株 Hcp 表达和杀菌能力的影响[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 125-134.
- WANG XL, LI J, LI GY, TANG L, YANG HC, MO ZL. The effect of *rpoS* on Hcp expression and bactericidal activity in *Vibrio anguillarum* MHK3[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 125-134 (in Chinese).
- [28] DI HL, CHEN C, SHI L. Comparative study of biofilm formation and its associated factors in opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(11): 1177-1180.
- [29] 崔一, 赵晶, 张福蓉, 郭婉萍, 陈明, 权春善, 范圣第. 嗜水气单胞菌 ATCC7966 *luxS* 基因缺失株构建及特性研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(5): 462-468.
- CUI Y, ZHAO J, ZHANG FR, GUO WP, CHEN M, QUAN CS, FAN SD. Construction of *luxS* gene deletion mutant strain in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2016, 32(5): 462-468 (in Chinese).
- [30] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] TANG L, YUE S, LI GY, LI J, WANG XR, LI SF, MO ZL. Expression, secretion and bactericidal activity of type VI secretion system in *Vibrio anguillarum*[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(8): 751-760.
- [32] YANG YT, CHEN IT, LEE CT, CHEN CY, LIN SS, HOR LI, TSENG TC, HUANG YT, SRITUNYALUCKSANA K, THITAMADEE S, WANG HC, LO CF. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(5): e00816-14.
- [33] D'ENFERT C, RYTER A, PUGSLEY AP. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase[J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(11): 3531-3538.
- [34] LU HM, LORY S. A specific targeting domain in mature exotoxin A is required for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(2): 429-436.
- [35] YI X, CHEN YN, CAI HY, WANG JJ, ZHANG YY, ZHU ZQ, LIN M, QIN YX, JIANG XL, XU XJ. The temperature-dependent expression of type II secretion system controls extracellular product secretion and virulence in mesophilic *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 945000.
- [36] BALDI DL, HIGGINSON EE, HOCKING DM, PRASZKIER J, CAVALIERE R, JAMES CE, BENNETT-WOOD V, AZZOPARDI KI, TURNBULL L, LITHGOW T, ROBINS-BROWNE RM, WHITCHURCH CB, TAUSCHEK M. The type II secretion system and its ubiquitous lipoprotein substrate, SslE, are required for biofilm formation and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(6): 2042-2052.
- [37] ELHOSSEINY NM, EI-TAYEB OM, YASSIN AS, LORY S, ATTIA AS. The secretome of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 type II secretion system reveals a novel plasmid encoded phospholipase that could be implicated in lung colonization[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2016, 306(8): 633-641.
- [38] ZHANG Q, YU CP, WEN LP, LIU QG. Tat system is required for the virulence of *Dickeya zeae* on rice plants[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2018, 100(3): 409-418.
- [39] LU C, KOROTKOV KV, HOL WGJ. Crystal structure of the full-length ATPase GspE from the *Vibrio vulnificus* type II secretion system in complex with the cytoplasmic domain of GspL[J]. *Journal of Structural Biology*, 2014, 187(3): 223-235.