

田坤, 李婉君, 曹钰莹, 等. 副溶血弧菌Ⅲ型分泌系统 *vscH* 基因生物学功能分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 57-65.

TIAN S, LI W J, GAO Y Y, et al. Characterization and functional analysis of the *vscH* gene in the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 57-65.

副溶血弧菌Ⅲ型分泌系统 *vscH* 基因生物学功能分析

田坤¹, 李婉君¹, 曹钰莹¹, 许立慧¹, 任建鸾¹, 汤芳¹, 戴建君^{1,2}, 薛峰^{1*}

(1. 南京农业大学动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 江苏 南京 210095;

2. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 副溶血弧菌是一种重要的食源性病原菌。Ⅲ型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 作为该菌的主要毒力因子之一, 在致病过程中发挥重要作用。*vscH* 位于 T3SS1 基因座中, 功能未知。为探究 *vscH* 基因的生物学功能, 通过同源重组的方法在副溶血弧菌 POR-1 菌株的基础上构建 *vscH* 缺失株 $\Delta vscH$ 及回补株 $C\Delta vscH$, 比较各菌株在生物被膜形成、细胞毒性等生物学特性上的差异; 应用 Western blot 检测 T3SS1 效应蛋白的分泌量及其在 HeLa 细胞中易位量; 通过 GST-Pull Down 试验鉴定与 VscH 相互作用的 T3SS1 相关蛋白。结果: 与 POR-1 菌株相比, 缺失株 $\Delta vscH$ 在生长性能上无明显差异, 但生物被膜形成能力下降, 同时对 HeLa 细胞和 CaCo-2 细胞的毒性作用明显下降; *vscH* 基因的缺失使效应蛋白 VopR、VopS 和胞外针结构蛋白 VscI 的分泌显著减少, 同时使 VopR 和 VopS 在 HeLa 细胞内易位量显著下降; GST-Pull Down 试验发现 VscH 与一种位于 T3SS1 的 ATP 酶 VscN 存在相互作用。本研究表明, *vscH* 基因影响副溶血弧菌生物被膜形成, 参与 T3SS1 介导的毒性作用, 同时对 T3SS1 效应蛋白的分泌和易位发挥重要功能。

关键词: 副溶血弧菌; Ⅲ型分泌系统; *vscH*; 分泌; 易位

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)01-0057-09

Characterization and functional analysis of the *vscH* gene in the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system

TIAN Shen¹, LI Wanjun¹, CAO Yuying¹, XU Lihui¹, REN Jianluan¹,

TANG Fang¹, DAI Jianjun^{1,2}, XUE Feng^{1*}

(1. Joint International Cooperation Laboratory of Animal Health and Food Safety, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is an important food-borne pathogen, and type III secretion system 1 (T3SS1) plays a major role in its pathogenic process. *vscH* gene is correlated with T3SS1, and its effects on the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus* have not been clarified. To investigate the biological functions of the *vscH* gene in *Vibrio parahaemolyticus*, *vscH* gene deletion strains $\Delta vscH$ and *vscH* gene compensation strain $C\Delta vscH$ were constructed here based on POR-1 strains using the homologous recombination technology. The biological characteristics, such as biofilm formation and cytotoxicity, of the different strains were compared. The secretion of effector proteins and their translocation in HeLa cells were detected by Western blot. The potential proteins interacting with *vscH* were identified by GST-Pull Down. The results showed that *vscH* deletion did not affect the growth of the mutant, compared with its parent strain; but it inhibited biofilm formation and reduced toxicity to HeLa cells and CaCo-2 cells. Meanwhile, *vscH* deletion greatly reduced the secretion of effector proteins VopR and VopS, the extracellular needle structure protein VscI, and it markedly suppressed the translocation of VopR and VopS in the HeLa cells. Moreover, there was a potential interaction between *vscH* and *vscN* with an ATPase located at T3SS1. The present study indicated that the *vscH* gene had effect on the biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*, participated in T3SS1-mediated cytotoxicity, and was essential for the secretion and translocation of T3SS1 effector proteins.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; type III secretion system; *vscH*; secretion; translocation

收稿日期: 2023-11-21; 修回日期: 2024-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871893)

第一作者: 田坤, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 薛峰, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医公共卫生、食品安全控制、人兽共患病防制新技术及其病原学基础研究, E-mail:

xuefeng@njau.edu.cn.

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰阴性菌,天然地存在于河口与海洋环境中^[1],人类通常因食用污染的海产品而感染,引起胃肠炎、伤口感染及败血症等病症^[2]。1950年,副溶血弧菌在日本首次被分离并确认为食源性致病菌^[3],目前已成为人类海产品相关性胃肠炎的主要病原菌。

副溶血弧菌主要毒力因子有耐热直接溶血素 (thermostable direct hemolysin, TDH), TDH 相关溶血素 (thermostable direct hemolysin-related hemolysin, TRH), 不耐热溶血素 (thermolabile hemolysin, TLH), 黏附素, III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 和 VI 型分泌系统 (type VI secretion system, T6SS) 等^[4]。T3SS 是存在于许多革兰阴性致病菌中的一种复杂分子装置,与鞭毛输出装置有共同的起源^[5]。T3SS 可分为鞭毛 T3SS, 以及向真核宿主细胞注射效应蛋白的易位相关 T3SS^[6], 二者结构高度相似。易位相关 T3SS 是由多种蛋白复合物组成的一种形似针筒状结构的跨膜装置^[7], 在志贺菌^[8]、沙门菌^[9]、耶尔森菌^[10] 和肠致病/肠出血性大肠杆菌^[11] 等动物致病菌及假单胞菌^[12]、黄单胞菌^[13] 等植物致病菌中均存在。副溶血弧菌拥有 2 套 T3SS 即 T3SS1 和 T3SS2, T3SS1 主要引起细胞毒性, T3SS2 与肠毒性有关^[14]。副溶血弧菌 T3SS1 由 42 个基因编码, 与耶尔森菌的 T3SS 基因位点具有高度相似性^[15]。*uscH* 基因位于 T3SS 基因位点内, 其编码的 VscH 蛋白属于耶尔森菌 YopR 蛋白家族。研究表明, 耶尔森菌 YopR 在感染的早期阶段分泌到细胞外环境中并与毒力相关^[16]。Sorg 等^[17] 发现 YopR 控制耶尔森菌 T3SS 早期底物的分泌, 其与二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 融合产生的杂交体会阻断耶尔森菌 T3SS 向宿主细胞注射效应蛋白。目前 *uscH* 基因在副溶血弧菌 T3SS 中是否发挥作用尚未见报道。

本研究以副溶血弧菌 *uscH* 基因为研究对象, 在 POR-1 菌株基础上通过同源重组的方法构建缺失株与回补株, 通过生物被膜、细胞毒性等试验探究其在副溶血弧菌中的生物学作用; 通过检测蛋白分泌、易位及 GST-pulldown 蛋白互作试验初步探究其在 T3SS1 结构组装过程中发挥的功能, 为进一步阐明副溶血弧菌 T3SS1 的致病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要菌株及质粒

副溶血弧菌菌株 RIMD2210633, POR-1 (*tdhA/S* 缺陷菌株), 同源重组质粒 pYAK1, 穿梭质粒

pMMB207, 原核表达载体 pET-32a (+) 和 pGEX-4T-1, 大肠杆菌 SM10、DH5 α 和 BL21- λ pir 感受态细胞, CaCo-2 和 HeLa 细胞均为南京农业大学动物健康与食品安全国际合作联合实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

2 \times Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (P520-01)、2 \times Rapid Taq Master Mix (P222-01)、限制性内切酶、单片段一步法克隆试剂盒, 购自诺唯赞生物技术有限公司; 细胞全蛋白提取试剂盒, 购自江苏凯基生物技术有限公司; GeneJET 试剂盒、细菌 RNA 分离试剂盒、细菌质粒小提试剂盒, 购自 Omega 公司; 细胞毒性检测试剂盒 (LDH Cytotoxicity Assay Kit), 购自 Elabscience 生物科技股份有限公司; DMEM 培养基和胎牛血清, 购自 HyClone (中国) 有限公司; CyaA 抗体、RNAP 抗体, 购自圣克鲁斯生物技术有限公司。辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (二抗), 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

蛋白电泳仪、全自动化学发光图像分析系统、ECL 化学发光液 (Enhanced chemiluminescence), 上海 Tanon 公司产品; 荧光定量 PCR 仪、细胞培养箱, Thermo Fisher Scientific 公司产品; 微孔板检测仪, 帝肯 (上海) 贸易有限公司产品; 蛋白纯化仪, 通用电气 (中国) 有限公司产品。

1.3 引物设计与合成

本研究所用引物名称及序列见表 1。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4 VscH 蛋白同源性比对

uscH (NC_004603.1) ORF 长度 672 bp, 编码 VscH 蛋白共 208 个氨基酸。从蛋白质相似度分析 VscH 蛋白, 结合生物信息学软件 MEGA 进行氨基酸序列比对, ESPript 在线数据处理。

1.5 基因缺失株 Δ *uscH* 和回补株 C Δ *uscH* 的构建

采用同源重组的方法^[14], 在副溶血弧菌 RIMD2210633 的 *tdhA/S* 缺陷菌株 POR-1 上构建缺失株 Δ *uscH*, 步骤如下: 提取副溶血弧菌 RIMD2210633 基因组 DNA 作为模板, 使用上下游引物对 *uscH*-1/2 和 *uscH*-3/4 分别扩增出 *uscH* 的上游和下游同源臂, 再以扩增得到的上下游同源臂混合物为模板, *uscH*-1/*uscH*-4 为引物, 进行融合 PCR 以构建缺失片段。将缺失片段与自杀性质粒 pYAK1 相连接, 得到的重组质粒转化至 SM10 感受态细胞中, 进行接合转移试验。将大肠杆菌 SM10 接合转移至受体菌 POR-1 上, 使用带有氯霉素抗性的 TCBS 平板筛选重组菌株, 以含 20% 蔗糖的 LB 连续传代, 经 PCR 鉴定筛选出稳定遗传的突变株 Δ *uscH*。

表 1 引物信息

| 引物 | 上游序列 (5'→3') | 下游序列 (5'→3') |
|------------------------------|--|--|
| <i>uscH</i> -1/2 | CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGACGACATCGAA | ATGTGTACTCTCATCCAAGATTCCTAATGTCTTGG |
| <i>uscH</i> -3/4 | TCTTGGATGAGAGTACACATGATCAATACACAGTA | CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCGCCGTTTCTTTGGTAAC |
| C- <i>uscH</i> -1/2 | CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAACAGTTGCCGAGG | ATAATTCCGGAAACCGCATCATCCGTTTC |
| C- <i>uscH</i> -3/4 | TGATGCGGTTGACCGGAATTATTGAGCGTTTC | CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCAGGCGCGTACGAAG |
| <i>uscH</i> -NF/NR | TTAGCTCAGCCCAACAATGCCAAAGCGC | GTCCGACCCTAGCTTTGTCCGACAAAACGC |
| P207-1683CyaA -F/R | CGGTACCCGGGGATCATGGTTAATATCAATACGTCACACA | CGACTCTAGAGGATCACCAAGTTTGTGGCTATCG |
| P207-1686CyaA -F/R | CGGTACCCGGGGATCATGATCAGTTTTGGAAATGTGAG | CGACTCTAGAGGATCACCAAGTTTGTGGCTATCG |
| P207- <i>uscF</i> -CyaA -F/R | CGGTACCCGGGGATCATGTCATTTTACGATGCGAC | CGACTCTAGAGGATCCACCTTCTGCAGGATCG |
| P207- <i>uscI</i> -CyaA -F/R | CGGTACCCGGGGATCATGATCAATACACAGTACACCG | CGACTCTAGAGGATCTGCGCCTTCAAAAAGC |
| pGEX4T1- <i>uscH</i> -F/R | TTCCAGGGGCCCTGGGATCCATGAGAGTTCGACCCTA | ACCCGGGAATTCCGGGGATCCCTACGACAAAATCTAA |
| pET32a- <i>uscN</i> -F/R | GGCTGATATCGGATCCTTGAACGATTTCTCATACATCACC | GCTCGAATTCCGGATCTTGACCTGCGATGCCT |
| <i>sacB</i> -F/R | ACGGCACTGTCGCAAATCTAT | TTCCGTCACCGTCAAAGAT |
| <i>uscH</i> -RT -F/R | TGGTATGCGTCGATCAAGGA | TTAGCTCAGCCCAACAATGC |
| DnaK-RT-F/R | ACTGCTTCGTCAGGGTTC | GTCAGACTCGTA TGCCAATG |
| <i>sypG</i> -RT-F/R | GACAGGTCGTGATGCCATTC | GGCGATGATGACCGAAGTC |
| <i>scrA</i> -RT-F/R | CACACCACGAACACATTGC | TCAATAGCGTCACGGAATGC |

用上游片段回补引物对 (C-*uscH*-1/2) 和下游片段引物对 (C-*uscH*-3/4), 以 RIMD2210633 株基因组 DNA 作为模板, 进行 *uscH* 回补片段上、下游同源臂的扩增, 再以扩增得到的上下游同源臂混合物为模板, C-*uscH*-1/4 为引物, 进行融合 PCR 以构建回补片段, 与自杀性质粒 pYAK1 相连接。为区分野生株与回补株, 将回补区域内的 GCG 同义突变为 GCC (两者均编码丙氨酸)。进行接合转移试验将测序后的重组质粒转移至构建成功的 *uscH* 基因缺失株中, 方法同上, 挑取完成第一次重组的单菌落进行传代培养, 诱导其发生同源臂的交换, 以含 20% 蔗糖的 LB 连续传代, 经 PCR 鉴定筛选出稳定遗传的回补菌株 C Δ *uscH*。

1.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 RT-qPCR 检测副溶血弧菌 *uscH* 的基因表达量, 将 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 菌株接种于 LB 培养基中, 置于摇床震荡培养至 OD_{600} 值为 0.8 左右, 提取菌体 RNA 并逆转录为 cDNA 进行 RT-qPCR 反应, 检测各菌株 *uscH* 基因表达量, 所用引物序列见表 1。反应体系: TB Green Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ L, *uscH*-RT-F (10 μ mol/L) 0.4 μ L, *uscH*-RT-R (10 μ mol/L) 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, DEPC H₂O 6.8 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。反应结束后, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算数据, 测定 *uscH* 基因的相对

表达量。

1.7 生长曲线测定

对 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 进行生长曲线测定, 检测 *uscH* 基因缺失对副溶血弧菌生长性能的影响。将相应菌株接种至新鲜 LB 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床过夜培养, 按 1 : 100 比例扩大培养至 50 mL LB 培养基中, 每隔 1 h 取样测量培养液的 OD_{600} 值, 测定至 12 h, 每次测量重复 3 次。

1.8 生物被膜试验

选用结晶紫染色试验测定 *uscH* 基因缺失对副溶血弧菌生物被膜形成能力的影响, 挑取 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 的单菌落接种于新鲜 LB 培养基中, 置于摇床培养至 OD_{600} = 0.6, 在无菌 96 孔板中加入 100 μ L 培养液, 接种 10 μ L 过夜培养液, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h, 新鲜的 LB 液体培养基作为阴性对照。弃去培养液, 无菌 PBS 清洗后放入通风橱干燥, 加入甲醇固定 15 min, 吸出培养孔中的甲醇, 自然风干; 加入 1% 结晶紫溶液室温下染色 5 min, 吸去培养孔中的染液, 洗涤干燥后加入 200 μ L 无水乙醇溶解生物被膜, 酶标仪测定 OD_{595} 值。

除结晶紫染色试验外, 以提取的 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 的 cDNA 为模板, 通过 RT-qPCR 试验对生物被膜相关基因 *scrA* 和 *sypG* 进行检测, 反应程序参照步骤 1.6, 进一步探究 *uscH* 基因对生物被膜相关基因的影响。

1.9 细胞毒性测定

根据 Elabscience LDH 乳酸脱氢酶细胞毒性比色

法测试盒, 设置背景空白对照孔、样品最大酶活性对照孔、样品对照孔和样品处理孔。将野生株、缺失株、回补株于摇床中培养至对数期, 无菌 PBS 洗涤 2 次, 通过离心重悬的方式用含有 1% 血清的 DMEM 制备感染细胞的菌悬液, 取上述菌悬液分别感染 96 孔板中 HeLa 细胞和 CaCo-2 细胞, 每株菌设置 6 个重复孔, 置于 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h, 感染 1 h 后, 在样品最大酶活性对照孔中加入裂解液, 吹打混匀后继续培养 1 h。各样品孔中加入反应工作液, 37 °C 避光孵育 10 min, 酶标仪测定 OD₄₉₀ 值。

1.10 分泌试验

参照 Lin 等^[18]方法, 测定 *uscH* 基因对效应蛋白 Vp1683 (VopR^[19]) 和 Vp1686 (VopS^[20]) 分泌以及结构蛋白 VscF^[21]、VscI^[22] 分泌的影响。构建 pMMB207-*vp1683*-CyaA、pMMB207-*vp1686*-CyaA、pMMB207-*uscF*-CyaA、pMMB207-*uscI*-CyaA 载体转化至大肠杆菌 SM10 中。通过接合转移试验将上述载体分别转移至 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 菌株中, 接种于新鲜的 LB 培养基, 置于摇床中培养至对数期, 取培养后的菌液于离心机中高速离心, 分别收集菌体沉淀和上清液。上清液过滤后转移至超滤管中离心浓缩, 浓缩后的菌液作为上清液样品。向菌体沉淀中加入 PBS 混悬, 取混悬液为沉淀样品。分别向上清液及沉淀样品中加入 5×SDS Loading Buffer, 95 °C 煮沸后备用。制备好的样品进行蛋白免疫印迹试验, 使用 5% 脱脂奶粉封闭, 洗膜后依次用 CyaA 抗体 (一抗), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (二抗) 孵育, Anti-RNAP 作为菌体内参抗体, ECL 化学发光液进行显色, 全自动化学发光图像分析仪拍照。

1.11 易位试验

根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 6 孔细胞培养板中, 使得检测时细胞密度不超过 80%~90%。用无菌 PBS 清洗 2 次待用, 将带有 Vp1683-CyaA 及 Vp1686-CyaA 载体的 POR-1、 Δ *uscH*、C Δ *uscH* 菌株置于摇床中培养至对数期, 离心后弃去培养液, 加入预冷的 PBS, 清洗后重悬, 向 6 孔板中加入培养液感染 HeLa 细胞, 使感染比 (MOI) 为 10:1, 培养 2 h, 感染结束后提取细胞全蛋白样品, 加入 5×SDS Loading Buffer 后 95 °C 煮沸备用, 制备好的样品进行 Western blot, 使用 5% 脱脂奶粉封闭, 洗膜后依次用 CyaA 抗体 (一抗), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (二抗) 孵育。GAPDH 作为细胞内参, ECL 化学发光液曝光显色, 拍照, 用软件 ImageJ 分析条带灰度值。

1.12 蛋白互作试验

为了探索 VscH 是否与 T3SS1 特定蛋白存在潜在相互作用, 选用 GST-Pull Down 试验检测与 VscH 相互作用的蛋白, pET32a 表达载体原核表达 VscN-His (VscN 是为 T3SS 产生能量的 ATP 酶)、VopR-His、VscF-His、VscI-His 融合蛋白, pGEX-4T-1 表达载体原核表达 VscH-GST 融合蛋白, 根据 Glutathione Magarose Beads 说明书将适量磁珠与 VscH-GST 融合蛋白相结合, 得到 VscH-Gst 融合蛋白-磁珠复合物, 孵育洗杂后与上述 His 融合蛋白结合, 孵育洗杂后加入洗脱液得到蛋白复合物, 加入 5×SDS Loading Buffer, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

2 结果

2.1 缺失株 Δ *uscH* 及回补株 C Δ *uscH* 构建与鉴定

通过同源重组的方法成功构建 *uscH* 基因缺失株, PCR 鉴定如图 1A 所示。用 *uscH*-1/4 引物扩增, 野生株 RIMD2210633 基因组 DNA 作为阳性对照, Δ *uscH* 扩增出 2 000 bp 大小的片段, 野生株扩增出 2 672 bp 的片段。同样用 *uscH*-NF/NR 引物扩增缺失株和野生株, Δ *uscH* 无扩增条带, 野生株扩增片段正常。用质粒筛选引物对 *sacB*-F/R 扩增产物 (图 1C), Δ *uscH* 无扩增条带, 野生株扩增片段正常, 表明缺失株 Δ *uscH* 构建成功。

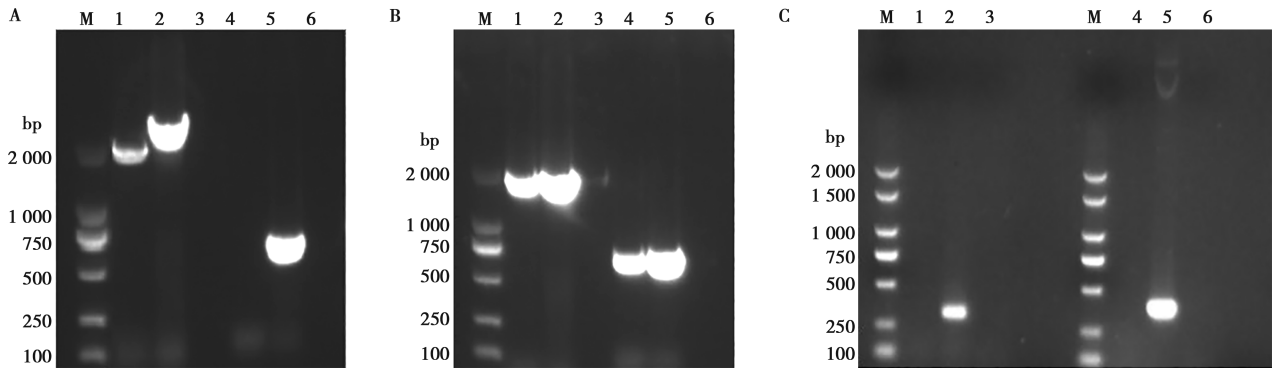
用外部引物 (C-*uscH*-1/4) 和内部引物 (C-*uscH*-NF/NR) 进行互补株鉴定。PCR 鉴定如图 1B 所示, 外部引物扩增回补株 C Δ *uscH* 的产物长度与 POR-1 的产物大小保持一致 (1 671 bp), 同时内部引物扩增回补株 C Δ *uscH* 的产物长度与 POR-1 的产物大小保持一致 (627 bp)。用质粒筛选引物对 *sacB*-F/R 扩增产物 (图 1C), C Δ *uscH* 无扩增条带, 野生株扩增片段正常, 表明回补株 C Δ *uscH* 构建成功。

2.2 VscH 蛋白氨基酸同源性比对

NCBI 数据库检索比对发现 VscH 与 PscH 和 LscH 等属于 YopR 家族蛋白, 在氨基酸序列上高度同源, 存在与 YopR 蛋白中心结构域高度同源的保守位点 (图 2)。

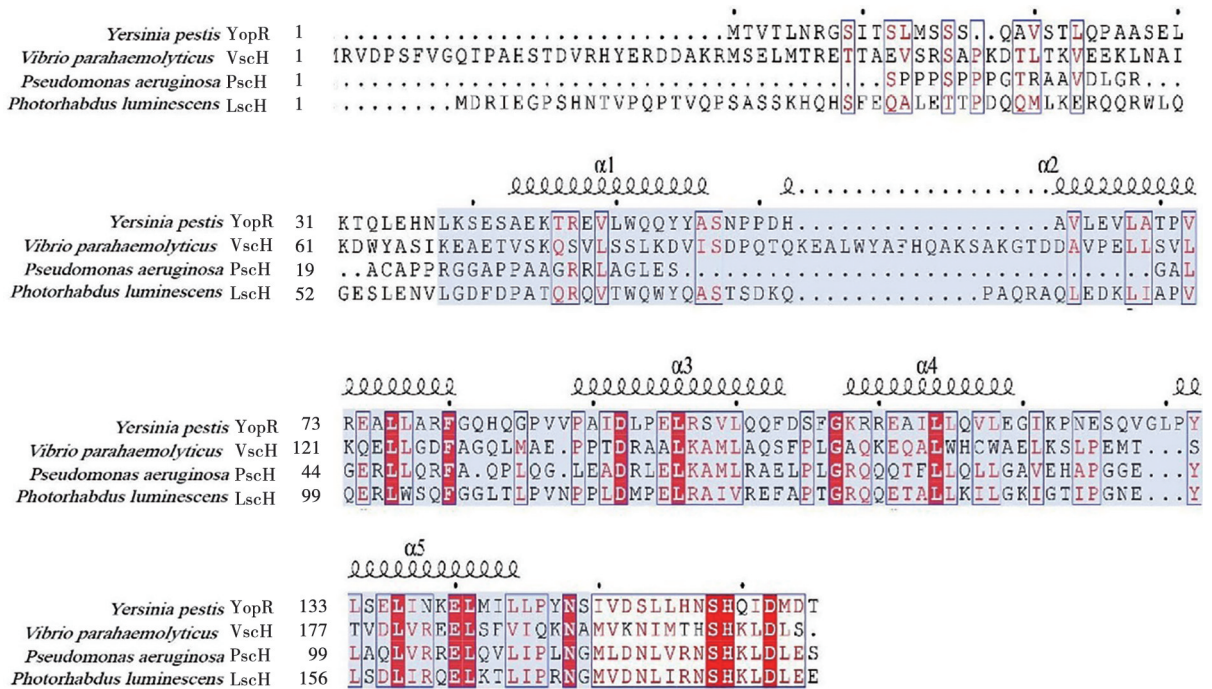
2.3 RT-qPCR 验证

使用 RT-qPCR 对 POR-1、 Δ *uscH* 和 C Δ *uscH* 菌株进行目的基因转录检测, 结果如图 3 所示, Δ *uscH* 内无目的基因转录, 野生株 POR-1 与回补株 C Δ *uscH* 中目的基因转录水平正常, 表明缺失株 Δ *uscH* 和回补株 C Δ *uscH* 均构建成功。



A. $\Delta vscH$ PCR 产物电泳，其中：M 表示 DL2000 Marker，1~3 分别表示引物 $vscH-1/vscH-4$ 扩增 $\Delta vscH$ 、野生株和阴性对照，4~6 分别表示引物 $vscH-NF/vscH-NR$ 扩增 $\Delta vscH$ 、野生株和阴性对照；
 B. $C\Delta vscH$ PCR 产物电泳，其中：M 表示 DL2000 Marker，1~3 分别表示引物 $C-vscH-1/C-vscH-4$ 扩增 $C\Delta vscH$ 、野生株和阴性对照，4~6 分别表示引物 $C-vscH-NF/C-vscH-NR$ 扩增 $C\Delta vscH$ 、野生株和阴性对照；
 C. 质粒筛选引物 PCR 产物电泳，其中：M 表示 DL2000 Marker，1~3 分别表示引物 $sacB-F/R$ 扩增 $\Delta vscH$ 、pYAK1 和阴性对照，4~6 分别表示引物 $sacB-F/R$ 扩增 $C\Delta vscH$ 、pYAK1 和阴性对照。

图 1 PCR 鉴定缺失株与回补株



注：阴影部分表示 YopR 中心结构域序列。

图 2 VscH 蛋白同源性比对

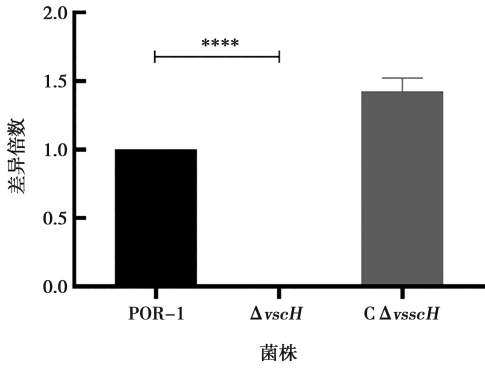
2.4 生长曲线测定

对野生株、 $vscH$ 基因缺失株和回补株的生长性能进行测定，结果如图 4 所示，相比于野生株， $vscH$ 基因缺失株的生长速度没有受到明显的影响，表明副溶血弧菌的生长性能不受 $vscH$ 基因的影响。

2.5 生物被膜形成能力测定

选用结晶紫染色试验对 $vscH$ 基因缺失菌株的生物被膜产生量进行测定，结果如图 5A 所示， $vscH$ 基

因缺失后，缺失株的生物被膜形成能力相比野生株 POR-1 显著下降 ($P < 0.01$)。为探究 $vscH$ 基因对生物被膜形成相关基因的影响，选取 $scrA$ 和 $sypG$ 作为靶基因， $DnaK$ 作为内参基因，对 POR-1、 $\Delta vscH$ 和 $C\Delta vscH$ 的 cDNA 进行靶基因转录水平的检测。结果如图 5B 所示，缺失株的 $scrA$ 和 $sypG$ 的表达量显著降低 ($P < 0.01$)。



注: ****表示 $P < 0.0001$, 下同。

图3 POR-1、ΔvscH 与 CΔvscH 菌株中 vscH 基因表达量检测

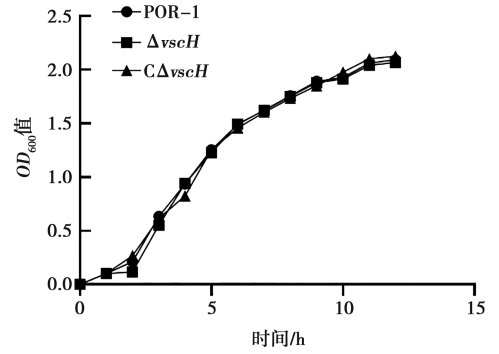
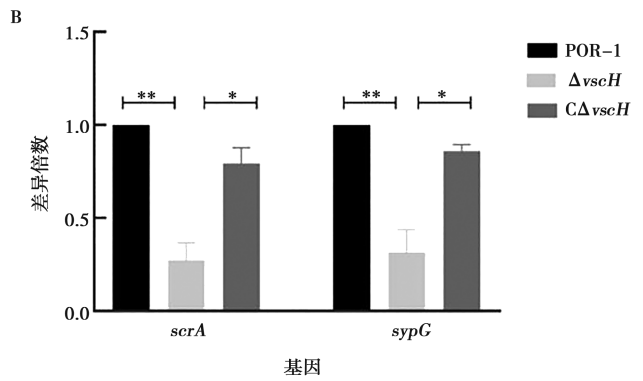
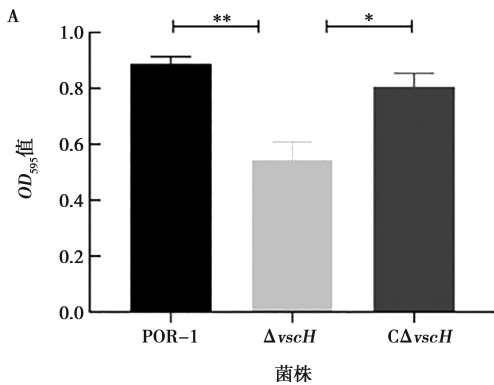


图4 POR-1、ΔvscH 和 CΔvscH 菌株的生长曲线测定



注: A 为结晶紫染色试验, B 为生物被膜相关基因的 RT-qPCR 检测, **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$ 。

图5 POR-1、ΔvscH 及 CΔvscH 菌株生物被膜形成能力

2.6 细胞毒性测定

利用 LDH 细胞毒性比色法试剂盒检测 POR-1、ΔvscH 和 CΔvscH 菌株对 HeLa 和 CaCo-2 细胞的毒性。通过比色法检测细胞毒性时释放的乳酸含量,发现

vscH 基因缺失后, 副溶血弧菌对 HeLa (图 6A) 和 CaCo-2 细胞 (图 6B) 的毒性作用有显著下降 ($P < 0.0001$), 表明 vscH 基因参与副溶血弧菌的细胞毒性作用。

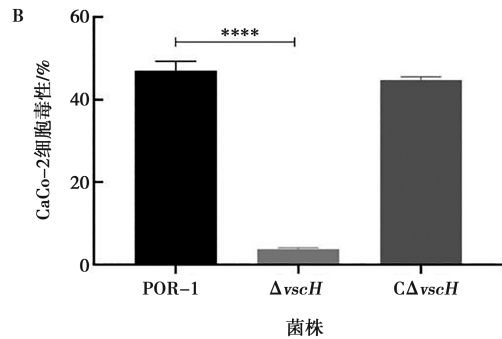
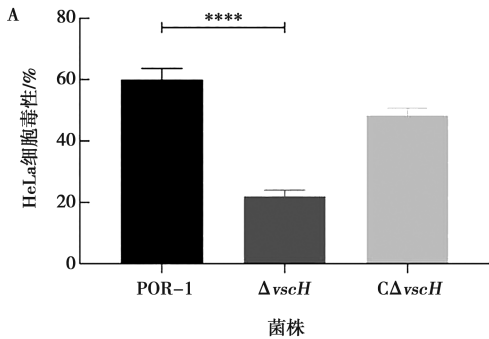


图6 POR-1、ΔvscH 和 CΔvscH 对 HeLa (A) 和 CaCo-2 (B) 细胞的毒性作用

2.7 蛋白分泌测定

在 POR-1、ΔvscH、CΔvscH 菌株的上清液和菌体中分别检测 Vp1683-CyaA、Vp1686-CyaA、VscF-CyaA 和 VscI-CyaA 的分泌量, 结果如图 7 所示,

VscH 的缺失会使菌株上清液中效应蛋白 Vp1683 (VopR) 和 Vp1686 (VopS) 和胞外针结构蛋白 VscI 分泌量显著降低, 但并不影响结构蛋白 VscF 在上清液中的分泌。

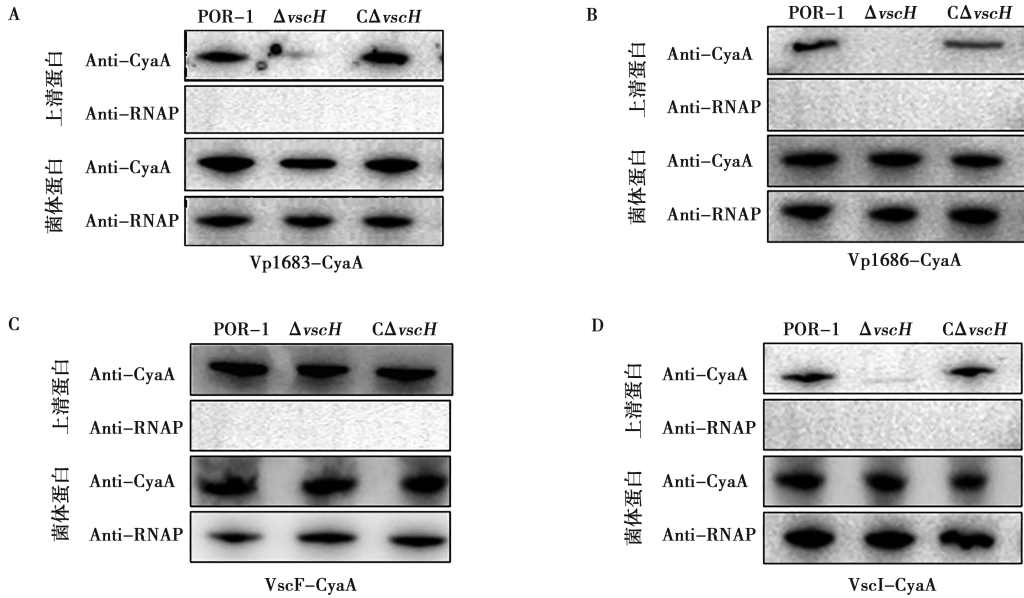
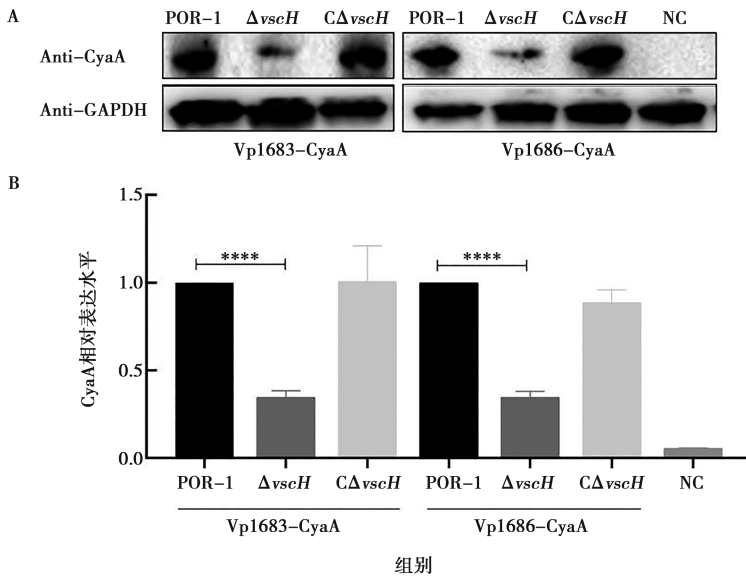


图7 POR-1、 $\Delta vscH$ 和 $C\Delta vscH$ 菌株中 Vp1683-CyaA (A)、Vp1686-CyaA (B)、VscF-CyaA (C) 和 VscI-CyaA (D) 的分泌量

2.8 蛋白易位测定

用带有 *vp1683* 及 *vp1686* 过表达载体的 POR-1、 $\Delta vscH$ 、 $C\Delta vscH$ 菌株感染 HeLa 细胞，通过 Western blot 检测细胞内的 Vp1683-CyaA/Vp1686-CyaA。结

果如图 8 所示，*vscH* 基因缺失后，缺失株感染的 HeLa 细胞内的两者的含量显著下降，($P < 0.0001$)。表明 *vscH* 基因缺失后，副溶血弧菌 T3SS1 效应蛋白向宿主细胞的易位显著减少。



A. Western blot 检测 HeLa 细胞内 CyaA 含量，NC 为阴性对照；B. 灰度分析。

图8 易位试验检测效应蛋白 Vp1683-CyaA 及 Vp1686-CyaA 向 HeLa 细胞的转移量

2.9 蛋白互作分析

GST-Pull Down 试验检测与 VscH 互作的蛋白，pET32a 表达载体原核表达 VscN-His、VopR-His、VscF-His、VscI-His 融合蛋白，pGEX-4T-1 表达载体原核表达 VscH-GST 融合蛋白，根据 Glutathione

Magarose Beads 说明书将 GST 融合蛋白与 His 融合蛋白结合孵育，Western blot 检测 VscH-GST 与 VscN-His、VopR-His、VscF-His、VscI-His 融合蛋白之间能否体外结合，发现 VscH 与 VscN 之间存在物理相互作用，结果如图 9 所示。

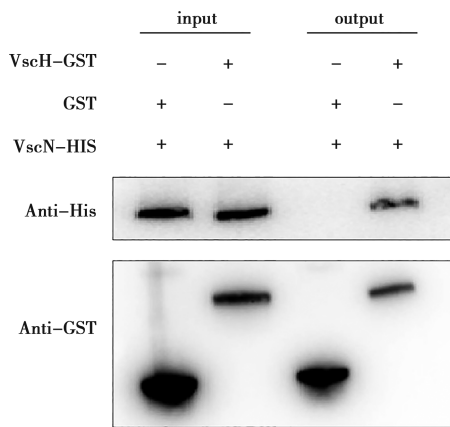


图9 Western blot分析VscH与VscN交互

3 讨论

副溶血弧菌 T3SS 是一种重要的毒力因子，将分泌的效应物运输至宿主细胞发挥作用^[23]。T3SS 由基体和胞外针结构组成，其中底物分泌和针结构组装的过程高度受控且有序^[24]。VscH 蛋白属于 YopR 蛋白家族，在耶尔森菌中 YopR 调控 T3SS 胞外针结构的组装与有序分泌^[25]。副溶血弧菌中 *vscH* 基因的功能尚未有研究，本文利用同源重组技术构建 *vscH* 基因缺失株和回补株，通过细胞毒性、生物被膜等试验探究其在副溶血弧菌中的生物学功能。生长曲线发现，*vscH* 基因缺失后，副溶血弧菌的生长速度无明显变化，说明其不影响副溶血弧菌的生长性能。生物被膜是微生物细胞被包埋在细胞外聚合物基质中的生态聚集体，由水溶性多糖、蛋白质、细胞外 DNA (eDNA) 和水不溶性化合物组成^[26]，主要功能是保护细菌免受抗生素和宿主免疫防御系统的威胁^[27]。Morris 等^[28]发现 SypG 通过与 *syp* 增强子结合来激活 *syp* 基因座转录，进而促进生物被膜的形成。Kimbrough 等^[29]发现 *scr* 基因座中 *scrABC* 操纵子的消除增加了细胞 c-di-GMP 含量，导致生物被膜形成增加。Zhang 等^[30]发现副溶血弧菌密度感应系统 (quorum sensing, QS) 相关调控因子 OpaR 与生物被膜的形成以及荚膜多糖的产生有关，且对于部分 T3SS1 表达相关的基因有负调控作用。结晶紫染色试验发现 *vscH* 基因缺失株的生物被膜能力形成显著下降，qRT-PCR 发现 *vscH* 基因缺失会使生物被膜形成相关基因 *sypG* 和 *scrA* 的表达量显著降低，表明 *vscH* 基因具有促进副溶血弧菌生物被膜形成的能力。*vscH* 对生物被膜相关基因的具体调控机制还有待进一步研究。

研究发现，T3SS1 存在于所有的副溶血弧菌中，而 T3SS2 主要存在于临床菌株中，与肠毒性相关^[13]。T3SS1 通过向宿主细胞注射效应蛋白，诱导细胞发生

自噬、变圆和裂解等系列过程发挥毒性作用，目前已鉴定的 T3SS1 效应蛋白有 4 种，包括 VopQ^[31]、VopS^[20]、VopR^[19] 和 VPA0450^[32]。细胞毒性试验结果显示，当 *vscH* 基因缺失后，副溶血弧菌对于 HeLa 细胞和 CaCo-2 细胞的毒性作用明显下降，表明 *vscH* 基因影响 T3SS1 介导的细胞毒性作用。Blaylock 等^[25]发现鼠疫耶尔森菌中 YopR 缺失会导致对小鼠的毒力缺陷，结肠炎耶尔森菌中 YopR 缺失会使其向巨噬细胞注射效应物的能力降低。本试验中，为了研究 VscH 是否影响 T3SS1 胞外针结构的组装以及效应蛋白的分泌和易位，通过 CyaA 报告系统^[33]构建效应蛋白 VopR、VopS 与胞外针结构蛋白 VscF、VscI 的 pMMB207-CyaA 过表达载体，分别接合至 POR-1、 $\Delta vscH$ 和 $C\Delta vscH$ 菌株，测定蛋白分泌和易位的影响。分泌试验结果显示，*vscH* 缺失会使效应蛋白 VopR、VopS 和胞外针结构蛋白 VscI 的分泌显著减少；易位试验结果显示 *vscH* 缺失导致 VopR 和 VopS 在 HeLa 细胞内易位量显著下降，表明 *vscH* 对效应蛋白的分泌和易位是必须的。由此推测，*vscH* 基因的缺失会使得 T3SS1 分泌装置的胞外针结构无法正常组装，导致菌体向宿主细胞注射效应物的能力显著降低。根据 Sorg 等^[17]的研究，耶尔森菌中 YopR 与 ATP 酶相互作用，引起 T3SS 早期或中期底物的有序分泌，本研究通过 GST-Pulldown 试验体外也证明了 VscN 与 VscH 之间存在相互作用，而 VscN 蛋白则属于 SctN ATPase 家族^[18]。耶尔森菌 T3SS1 中内杆状蛋白 YscI 与针状蛋白 YscF 存在相互作用，共同参与组装针状结构，在副溶血弧菌上缺失 VscH 虽然不影响针状蛋白 VscF 的分泌，但是显著降低了杆状结构蛋白 VscI 的分泌，并且 GST-Pull Down 试验发现在体外 VscH 与胞外针组成结构蛋白 VscI 和 VscF 之间并不存在直接的相互作用，同时与效应蛋白 VopR 之间也不存在直接的相互作用。除直接物理作用外，VscH 可能能够通过影响 VscI 的分泌从而参与副溶血弧菌 T3SS1 针状结构的组装，但是 VscH 是否存在其他功能以及具体如何影响 T3SS1 装置的组装还有待进一步研究。

综上，本研究证实 *vscH* 基因与副溶血弧菌的毒力密切相关，对于 T3SS1 效应蛋白的分泌和易位必不可少，且与 ATP 酶 VscN 之间存在相互作用，为进一步揭示副溶血弧菌 T3SS1 针状结构的组装和调控机制提供了试验依据。

参考文献:

- [1] NDRAHA N, WONG H, HSIAO H I. Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: a re-

- view [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19 (3): 1187-1217.
- [2] MARTINEZ-URTAZA J, BAKER-AUSTIN C. *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28 (10): 867-868.
- [3] NAIR G B, RAMAMURTHY T, BHATTACHARYA S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20 (1): 39-48.
- [4] WANG R, ZHONG Y, GU X, et al. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 144.
- [5] ABBY S S, ROCHA E P C. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8 (9): e1002983.
- [6] BURKINSHAW B J, STRYNADKA N C J. Assembly and structure of the T3SS [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843 (8): 1649-1663.
- [7] CHATTERJEE S, CHAUDHURY S, MCSHAN A C, et al. Structure and biophysics of type III secretion in bacteria [J]. *Biochemistry*, 2013, 52 (15): 2508-2517.
- [8] HODGKINSON J L, HORSLEY A, STABAT D. Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16 (5): 477-485.
- [9] JENNINGS E, THURSTON T L M, HOLDEN D W. *Salmonella* SPI-2 Type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences [J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 22 (2): 217-231.
- [10] CORNELIS G R. The *Yersinia* Ysc-Yop type III weaponry [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3 (10): 742-753.
- [11] SAL-MAN N, SETIAPUTRA D, SCHOLZ R, et al. EscE and EscG are cochaperones for the type III needle protein EscF of enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195 (11): 2481-2489.
- [12] BARBIERI J T, SUN J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT [J]. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2004, 152: 79-92.
- [13] BÜTTNER D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76 (2): 262-310.
- [14] KODAMA T, YAMAZAKI C, PARK K S, 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.
- [15] PARK K S, 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.
- [16] SCHUBOT F D, CHERRY S, AUSTIN B P, et al. Crystal structure of the protease-resistant core domain of *Yersinia pestis* virulence factor YopR [J]. *Protein Science*, 2005, 14 (6): 1679-1683.
- [17] SORG J A, BLAYLOCK B, SCHNEEWIND O. Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (44): 16490-16495.
- [18] LIN I T, TULMAN E R, GEARY S J, et al. A gatekeeper protein contributes to T3SS2 function via interaction with an ATPase in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiological Research*, 2021, 252: 126857.
- [19] HIGA N, TOMA C, KOIZUMI Y, et al. *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9 (1): e1003142.
- [20] YARBROUGH M L, LI Y, KINCH L N, et al. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling [J]. *Science*, 2009, 323 (5911): 269-272.
- [21] LIAN L, XUE J, LI W, et al. VscF in T3SS1 helps to translocate VPA0226 in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 652432.
- [22] 廉乐乐, 薛娇, 李婉君, 等. 副溶血弧菌III型分泌系统I内杆状蛋白基因*vscI*的功能分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44 (3): 506-513.
- [23] HU M, ZHANG Y, GU D, et al. Nucleolar c-Myc recruitment by a *Vibrio* T3SS effector promotes host cell proliferation and bacterial virulence [J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40 (2): e105699.
- [24] ABRUSCI P, MCDOWELL M A, LEA S M, et al. Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 25 (100): 111-117.
- [25] BLAYLOCK B, BERUBE B J, SCHNEEWIND O. YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75 (1): 221-229.
- [26] FLEMMING H C, VAN HULLEBUSCH E D, NEU T R, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21 (2): 70-86.
- [27] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (9): 623-633.
- [28] MORRIS A R, VISICK K L. Inhibition of SypG-induced biofilms and host colonization by the negative regulator SypE in *Vibrio fischeri* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e60076.
- [29] KIMBROUGH J H, CRIBBS J T, MCCARTER L L. Homologous c-di-GMP-binding Scr transcription factors orchestrate biofilm development in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. 2020, 202 (6): e00723-19.
- [30] ZHANG Y, QIU Y, GAO H. OpaR Controls the Metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676436.
- [31] NGUYEN A Q, SHIMOHATA T, HATAYAMA S, et al. Type III secretion effector VopQ of *Vibrio parahaemolyticus* modulates central carbon metabolism in epithelial cells [J]. *mSphere*, 2020, 5 (2): e00960-19.
- [32] BROBERG C A, ZHANG L, GONZALEZ H, et al. A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity [J]. *Science*, 2010, 329 (5999): 1660-1662.
- [33] VOEGELE A, SUBRINI O, SAPAY N, et al. Membrane-active properties of an amphitropic peptide from the CyaA toxin translocation region [J]. *Toxins*, 2017, 9 (11): 369.