

霍乱弧菌甘露醇 PTS 操纵子中 *mtlR* 为转录抑制基因

王海燕^{1,2} 闫梅英² 赵英伟¹ 阚 飙^{2*}

(¹苏州大学医学院微生物学教研室 苏州 215123)

(²中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206)

摘 要 :产毒和非产毒的 El Tor 生物型霍乱弧菌对甘露醇发酵利用的速率有明显差别 ,在霍乱致病株的快速判断中有重要的参考价值。通过比较快发酵菌株(非产毒株)和慢发酵菌株(产毒株) *mtlR* 缺失突变株与野生株在含 0.2% 甘露醇的 M9 培养液及甘露醇发酵液中生长、产酸等的变化 ,定性地证明了 *mtlR* 基因的抑制作用 ;另外通过定量 RT-PCR 进一步验证了 MtlR 蛋白在 *mtlCBA* 转录水平发挥负调控作用。但是 *mtlR* 还不是引起快慢发酵菌株对甘露醇发酵差异的直接原因。本研究也为我们研究霍乱弧菌甘露醇快慢发酵差异机制提供了必要的参考依据。

关键词 :霍乱弧菌 ;甘露醇发酵 ;PTS 系统

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)03-0522-04

O1 群和 O139 群霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中的产毒株是目前引起暴发流行的主要病原。在我国的霍乱防治中 ,根据噬菌体-生物分型方案 ,又将 O1 群的 El Tor 生物型菌株区分为流行株和非流行株两类菌株^[1] ,其中从流行中分离的菌株属于前者 ,目前发现几乎均为产毒株(产生霍乱毒素) ,而后者不致疾病或个别菌株从散发的轻症病人中分离到 ,为非产毒株。该方案已应用 30 多年 ,在我国霍乱防治中发挥了重要作用。在该分型方案中 ,山梨醇发酵试验在两类菌株中具有明显的特征 ,流行株发酵试验慢而非流行株发酵快 ,我们也发现在甘露醇发酵中表现同样的特点。我们的研究提示 ,在这两类菌株中甘露醇被转运的快慢与其发酵快慢有明确的关联。

细菌中有超过 20 种的碳水化合物(糖、醇)多通过磷酸烯醇丙酮酸依赖的磷酸转运酶系统(Phosphoenolpyruvate :carbohydrate Phosphotransferase Systems ,PTS)进行跨膜转运 ,该 PTS 系统在细菌界普遍存在^[2]。PTS 在不同种的细菌中转运并伴随磷酸化多种底物碳水化合物。在霍乱弧菌标准株 N16961 基因组中没有预测到山梨醇的 PTS 基因簇 ,但在小染色体上预测出甘露醇代谢相关的 PTS 操纵子^[3] ,由 3 个开放读码框构成 ,分别为 *mtlCBA*、*mtlD* 和 *mtlR* ,推测依次编码甘露醇膜转运蛋白、甘露醇-1-磷酸-5-脱氢酶以及转录调节蛋白。我们通过基因缺失等方法已明确验证了 *mtlCBA*、*mtlD* 基因在甘露醇代谢过程中发挥作用 ,但是 *mtlR* 对 PTS 操纵子的转录调节功能、以及其是否会在两类菌株的甘露醇发酵快慢特征中发挥作用尚未明确。甘露醇 PTS 的 *mtlR* 基因在枯草杆菌^[2,4]、嗜热脂肪芽孢杆菌^[2,5]、丙酮丁醇梭菌^[2,6]、变形链球菌^[7]等中发挥激活蛋白的作用 ,对 PTS 结构基因的转

录起增强作用 ;而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[8]、肺炎克雷伯杆菌^[9]等中则编码转录抑制子。因此 ,本文就霍乱弧菌甘露醇 PTS 中 *mtlR* 基因的调控功能展开研究 ,并分析其对流行株和非流行株的不同甘露醇转运能力是否有影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和材料 :核酸酶购自 TaKaRa 公司 ;One Step SYBR RT-PCR Kit (TaKaRa) ;扩增检测仪器为 Roche 公司 Lightcycler II。

1.1.2 质粒和菌株 :霍乱菌株流行株(产毒株)N16961、非流行株(非产毒株)93097、以及质粒 pUC18、自杀质粒 pDS132、大肠杆菌 SM10λpir 由本实验室保存。

1.1.3 引用 表 1 为 PCR 扩增用引物

表 1 实验用引物

Table 1 The primers used in this work		
Primer	Sequence (5'→3')	Product/bp
<i>mtlR</i> UP-FP :	<u>C</u> CGGAATTCATCATCGCCTGTGAGA	971
<i>mtlR</i> UP-RP :	<u>A</u> CGCGTCGCACAAGAATCCTCGTACCGTG	
<i>mtlR</i> DOWN-FP :	<u>A</u> CGCGTCGAC ACTCAACAAAGACAGCC	916
<i>mtlR</i> DOWN-RP :	<u>A</u> CATGCATGCTCGGTGTCCAATCTTTTA	
pUCR-FP :	TGCATCTCAGATCATCGCCTGTGAGA	1887
pUCR-RP :	<u>A</u> CATGCATGCTCGGTGTCCAATCTTTTA	
<i>dmtlR</i> -FP :	AGCTGTCACTCGCTCTCGAC	301
<i>dmtlR</i> -RP :	GTGGAAAACCTCATCTGGGA	
<i>mtlCBA</i> -FP :	GGCGGTGATTGTCGGTACC	114
<i>mtlCBA</i> -RP :	CTGCGCATTTAGCATCGATT	
<i>thyA</i> -FP :	ACATGGGACGGGTGTATGG	61
<i>thyA</i> -RF :	ATATGACCACCATCAGGCTTAGC	
<i>mtlR</i> huibu-FP	<u>C</u> CGGAATTCACACITTCGCCGCTAT ACC	711
<i>mtlR</i> huibu-RP	<u>A</u> CGCGTCGACTTAAACGGGCTGTCTTT	

Underline parts for digestion sites and protective bases.

基金项目 :国家 973 项目 "——国家重点基础研究项目(G1999054102)

* 通讯作者。Tel 86-10-61739458 Fax 86-10-61739156 E-mail kanbiao@icdc.cn

作者简介 :王海燕(1981-)女 ,江苏省溧阳市人 ,硕士研究生 ,主要从事病原菌分子生物学研究。Email :wanghaiyan-cdc@163.com

收稿日期 2006-11-02 接受日期 2006-12-08 修回日期 2007-03-01

1.2 培养方法

甘露醇-M9 培养基配制方法参见文献 [10],其中添加的唯一碳源为 0.2%的甘露醇。甘露醇发酵液的配制参见文献 [1]中山梨醇发酵液的配置,其中甘露醇为 0.2%。发酵液培养过程见参考文献 [1],非流行株(非产毒株)一般于培养 3~4h 后发酵液颜色变黄,流行株(产毒株)于 6~7h 之后发酵液颜色变黄。发酵液中的酚红作为显色指示剂,当发酵液 pH 值大于 7.5 时,发酵液显示紫红色,pH 降至 6.5 左右,发酵液呈橘黄色。

1.3 *mtlR* 缺失突变重组质粒 pDSR 及回补重组质粒 pUC-R 的构建

以霍乱弧菌流行株(产毒株)N16961 和非流行株(非产毒株)93097 作为构建 *mtlR* 缺失株的出发菌株,以出发菌株染色体为模板,将 *mtlR* 缺失基因的上下游同源臂片段,通过酶切位点(*EcoR* I/*Sal* I、*Sal* I/*Sph* I)顺次克隆入质粒 pUC18,再将此连接片段克隆至自杀质粒 pDS132 得到重组自杀质粒 pDSR,转化带 λ pir 的 *E. coli* SM10,筛选转化子 SM-DSR。将 N16961、93097 染色体上含有完整 *mtlR* 基因包括上游启动子区域片段,克隆到质粒 pUC18,构建用于回补试验的重组质粒 pUC-9R、pUC-NR。

1.4 生长曲线制作和甘露醇发酵液的 pH 值测定

分别将 93097 和 N16961 及各自的 *mtlR* 缺失株在 0.2%甘露醇-M9 培养基和甘露醇发酵试验所用的发酵液中培养,每隔 1h 吸取 200 μ L 培养液稀释 3 倍作为平行对照测定 OD_{595} ,各自以不加菌液的 M9 培养基、发酵液作为空白对照,连续监测 10h,记录每次所得数据,绘制生长曲线。 OD 值的测定用 TECAN 公司的 GENios-BASIC 多功能酶标仪。

菌株在甘露醇发酵液的培养过程中,在每个时间点取样、集菌、提取 Total RNA 用于荧光 PCR 检测的同时(见后),从中取出 1mL 各发酵培养液,使用 pH 计(HANNA 公司)测定发酵液 pH 值,连续监测至各发酵液均变成黄色,绘制 pH 变化曲线。

1.5 荧光定量 RT-PCR

N16961、N16961-dmtlR、93097、93097-dmtlR 在 0.2%甘露醇发酵液中培养,于培养第 1h、2h、3h、4h、5h、6h 直至各发酵液均由紫红色变为橘黄色,每个样品收集 1~2mL 菌液,使用 RNeasy Mini KIT(Qiagen)提取 Total RNA,以 DNase set KIT(Qiagen)去除各样品中 DNA 的污染。使用 Nano Drop ND-1000 核酸定量检测仪和琼脂糖凝胶电泳对各样品总 RNA 进行定量和定性检测。稀释各样品至终浓度 1ng/ μ L 作为定量逆转录 PCR 的模板,以管家基因 *thyA* 作为内对照,进行荧光定量 PCR,每个样品平行 3 次。荧光定量 RT-PCR 体系、扩增参数参照 TaKaRa 试剂盒说明书。

相对定量的方法比较 *mtlR* 缺失突变株和野生株的 *mtlCBA* 转录水平差异,平均 C_t 值是 3 个平行样品间 C_t 的算术平均值; ΔC_t 是目的检测基因(*mtlCBA*)的平均 C_t 值与其本身的内对照管家基因(*thyA*)的平均 C_t 值的差值; $\Delta\Delta C_t$ 是缺失突变株每个样品的 ΔC_t 与野生株相对应样品 ΔC_t 的差值;

转录表达差异的相对量计算公式^[11]为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t-N16961-dmtlR/93097-dmtlR(mtlCBA-thyA)} - \Delta C_{t-N16961/93097(mtlCBA-thyA)}$,其含义是:某一时间点上,*mtlR* 缺失株的 *mtlCBA* 基因转录的 mRNA 是野生株 *mtlCBA* 基因转录 mRNA 的多少倍。

2 结果

2.1 *mtlR* 缺失突变株的构建

通过同源重组对 *mtlR* 基因框内部分(435bp)进行缺失。用 pUC18 以及自杀质粒 pDS132 作为载体构建目的基因部分片段缺失的重组自杀质粒 pDSR。质粒 pDSR 中的插入片段与野生株中 *mtlR* 缺失部分的上下游臂序列同源,通过接合转移实验,将带 pDSR 的大肠杆菌 SM10 分别与霍乱弧菌产毒株 N16961 和非产毒株 93097 混合,用庆大霉素选择性培养基(0.5U/mL)加氯霉素抗性(15 μ g/mL)的平板进行霍乱弧菌阳性接合子的筛选,获得接合子,然后用 20%的蔗糖培养基进行 2 次同源重组筛选,得到缺失突变株 N16961-dmtlR、93097-dmtlR,PCR 证实这些菌株的 *mtlR* 框内部分基因片段被缺失。由于同源片段部分落在了 *mtlR* 基因上游 VCA1047(*mtlD*)和下游 VCA1048 基因中,又对这两个基因分别设计引物进行了 PCR 扩增和测序,确认这两个基因的序列没有因为发生同源片段的重组而发生任何碱基的变异。

2.2 *mtlR* 缺失突变株及其野生株在甘露醇-M9 培养基和甘露醇发酵液中的生长速率

快发酵菌株 93097 及其突变株 93097-dmtlR、慢发酵菌株 N16961 及突变株 N16961-dmtlR 在不加任何碳源的 M9 培养基中生长相当缓慢,在添加了 0.2%甘露醇后生长比较迅速(图 1-A)。两个菌株的野生型及其突变株相比较,发现在生长的早期和中期,对生长更快的菌株 93097 为前 6h 内、生长较慢的 N16961 在 9h 内),*mtlR* 被缺失的菌株生长要略快于其各自的野生型菌株。在该培养基中霍乱弧菌的生长主要依赖

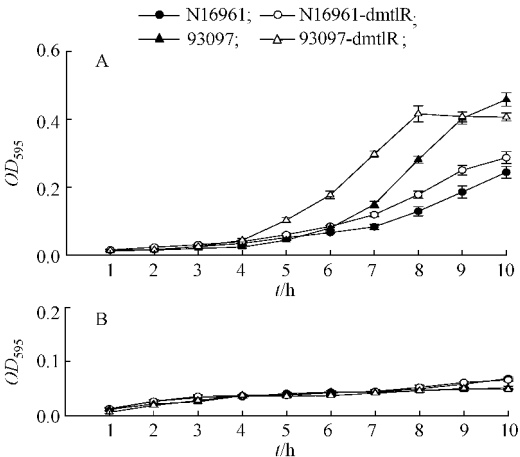


图1 霍乱弧菌产毒株 N16961 与非产毒株 93097 及其 *mtlR* 缺失突变株在 0.2%甘露醇-M9 (A) 和 0.2%甘露醇发酵液 (B) 中的生长曲线

Fig.1 Growth curves of toxigenic strain N16961 and non-toxicogenic strain 93097 of *V. cholerae* and their *mtlR* deletion mutants in 0.2% mannitol of M9 (A) and in 0.2% mannitol-containing broth (B).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

于甘露醇,当 *mltR* 缺失后生长加快,提示在霍乱弧菌中,*MltR* 对转运甘露醇的 *MltCBA* 来说是个抑制因素。实验所用的慢发酵菌株 N16961 及其突变株生长明显慢于快发酵菌株 93097 及其突变株。这提示流行株(至少在本实验中的 N16961)对甘露醇的利用可能要慢于快发酵菌株,这与该两类菌株的甘露醇快慢发酵可能有关联。缺失突变株与野生株在甘露醇发酵液的生长速度要缓慢得多(图 1-B),说明发酵液成分不是这些菌株适宜的生长环境,但也发现在生长早期 *mltR* 缺失株生长要比相应的野生株略快些,而在后期则又慢于野生株。

2.3 *mltR* 突变株和野生株在甘露醇发酵液中 pH 值的变化

图 2 为各菌株在甘露醇发酵液中的 pH 值变化。野生株表现为常见的在甘露醇发酵液中的 pH 变化,非产毒株 93097 在第 4 小时 pH 下降至 6.5 左右,发酵液颜色变黄;产毒株 N16961 则在第 6 小时发酵液变为黄色,为慢发酵特征;对于各自的 *mltR* 缺失株,则表现了明显的 pH 下降加快,与各自野生株相比 pH 下降为 6.5 左右均提前了 1h。培养基变酸与代谢甘露醇有关,缺失 *mltR* 后突变株甘露醇利用加快,因此 *mltR* 应起到抑制 *mltCBA* 转录的作用。

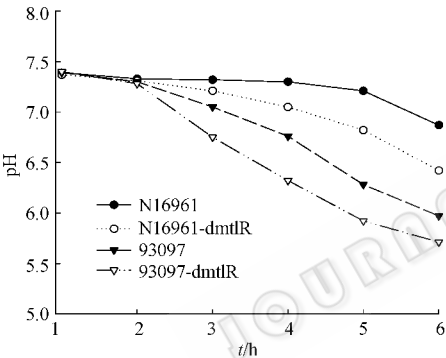


图 2 霍乱弧菌产毒株 N16961 与非产毒株 93097 及其 *mltR* 缺失突变株在 0.2% 甘露醇发酵液中 pH 值变化

Fig.2 pH changes of toxigenic strain N16961 and non-toxicogenic strain 93097 and their *mltR* deletion mutants in 0.2% mannitol-containing of broth.

2.4 荧光定量 PCR 检测 *mltR* 突变株、野生株的 *mltCBA* 转录水平差异

发酵各时间点提取各样品的 Total RNA 进行荧光 PCR 定量检测 *mltCBA* 和 *thyA* 基因的 mRNA 转录水平,结果显示(表 2),在检测的早期,对于快发酵和慢发酵菌株均表现为 *mltR* 缺失株的 *mltCBA* 转录水平高于野生株,在这个时期细菌生长对甘露醇的利用迅速,因此,能够明确 *mltR* 对 *mltCBA* 的转录是起抑制作用的。在后期,类似于在甘露醇-M9 培养基以及甘露醇发酵液中各菌株的生长曲线,各缺失株相当于其野生株的 *mltCBA* 转录水平要高,推测是在发酵培养后期,早期活跃生长的细菌(为各缺失株)因为甘露醇消耗快、细胞内外浓度差变小,另外因发酵液 pH 下降加快,对霍乱弧菌生长不利,以及分解代谢产物对 PTS 操纵子的负反馈抑制作用,因此表现为后期缺失株生长反而减弱, *mltCBA* 的转录减弱。

表 2 霍乱弧菌流行株 N16961 和非流行株 93097 的 *mltR* 缺失株、野生株 *mltCBA* mRNA 表达差异相对量

Table 2 Relative difference of <i>mltCBA</i> mRNA transcriptional level in toxigenic strain N16961 and nontoxigenic strain 93097 and their <i>mltR</i> deletion mutants						
Strain	relative difference of <i>mltCBA</i> mRNA transcriptional level					
	1h	2h	3h	4h	5h	6h
N16961-dmltR/N16961 2-ΔΔ <i>Ct</i>	3.94	6.82	0.94	1.07	0.81	0.22
93097-dmltR/93097 2-ΔΔ <i>Ct</i>	2.93	1.67	0.52	0.67		

2.5 *mltR* 缺失突变株的回补实验

为了排除 N16961-dmltR、93097-dmltR 的表型是由于极性效应或染色体上其他基因位点突变所造成的可能性,进行了突变株的回补试验。高拷贝质粒 pUC18 在霍乱弧菌中能以质粒形式进行自我复制。将重组质粒 pUC-9R、pUC-NR 分别电击转化入相应缺失突变株,以扩增缺失基因框内片段作为筛选标志,得到遗传回补株。野生株、缺失株、遗传回补株在相同条件下进行甘露醇发酵反应,观察发现回补株发酵培养基颜色变黄时间比相应野生株更晚,考虑可能是由于 pUC-9R、pUC-NR 质粒在霍乱弧菌中仍以高拷贝的形式存在,使得 *mltR* 基因的抑制作用更显著,从而也进一步证明 *mltR* 突变株表型变化确实是由于 *mltR* 的破坏引起的。

3 讨论

甘露醇发酵试验实质反映了霍乱弧菌利用甘露醇等营养物质进行生长代谢,产生有机酸使发酵液中 pH 值下降,酚红作为指示剂使培养基颜色发生改变。霍乱弧菌通过甘露醇特异 PTS 系统转运甘露醇并进入代谢。不同细菌 *mltR* 对 *mltCBA* 的调控方向是不同的。霍乱弧菌与大肠杆菌 *MltR* 具有很高的同源性。大肠杆菌甘露醇 PTS 操纵子中 *mltR* 基因表达的调控蛋白起抑制作用^[8]。证实在早期对甘露醇的利用中,霍乱弧菌 *mltR* 基因对 *mltCBA* 的转录起抑制作用, *mltR* 缺失突变株在发酵第 1、2 小时 *mltCBA* mRNA 转录水平都在相应野生株的两倍以上, *mltR* 缺失后使得 *mltCBA* 的转录速度都相应加快。野生株、*mltR* 突变株在甘露醇-M9 培养基、甘露醇发酵试验的培养过程中细菌生长的快慢以及 pH 值的改变,也定性地说明了 *mltR* 的抑制作用。

在连续培养和监测的 *mltCBA* 转录水平的分析中,早期结果表明 *mltR* 为转录抑制因素。在后期,虽然表现为野生株的转录又高于缺失株,但甘露醇 PTS 对培养基中甘露醇的转运,在环境中有甘露醇时 PTS 获得表达,这个时段的转录分析能够说明 *mltR* 对 *mltCBA* 的调节作用。在后期的数据,由于缺失株对甘露醇的利用更快造成甘露醇在培养基中浓度下降比野生株快,产酸也更快形成了不利于霍乱弧菌生长的酸环境、以及分解代谢产物增加,负反馈抑制作用更加明显,但此时利用甘露醇慢的野生株则还可继续利用甘露醇和生长,因此在后期的同一时点上,已不能通过比较缺失株和野生株的 *mltCBA* 转录水平来分析 *mltR* 的作用。

本研究也从另一侧面为我们探讨霍乱弧菌甘露醇快慢

发酵因素提供了一定的分析依据。霍乱弧菌甘露醇发酵试验与噬菌体-生物分型中的山梨醇发酵具有相似的作用,能简易快速区分流行株和非流行株^[2]。分析不同菌株甘露醇快慢发酵差异的原因,*mtlR* 对 *mtlCBA* 的转录调节作用也是应考虑的一个环节或因素。甘露醇发酵快慢,实质反映了流行株和非流行株代谢甘露醇产酸速度的快慢。实验中我们发现快慢发酵与 *mtlCBA* 基因转录水平有关,而 *MtlR* 在霍乱弧菌甘露醇 PTS 操纵子中发挥负调控作用,则自然要分析 *mtlCBA* 转录快慢是否与 *MtlR* 的抑制强弱有关。但是 *mtlR* 缺失后并没有使慢发酵菌株达到快发酵的程度,并且在快发酵和慢发酵菌株中也只是使甘露醇利用和产酸加快,仍能区分出快慢发酵。从生长曲线也看出 *mtlR* 基因的缺失对于霍乱弧菌流行株和非流行株对甘露醇的代谢利用并不产生明显的影响。M9 培养基中加入 0.2% 的甘露醇作为唯一碳源成分,*mtlR* 基因缺失后霍乱弧菌仍能利用甘露醇进行生长代谢,说明 *MtlR* 蛋白不是控制甘露醇代谢过程中的主要因素。因此,对于不同霍乱弧菌甘露醇代谢快慢的机制分析,还需要寻找其它的因素。

参 考 文 献

- [1] 卫生部疾病控制司.霍乱防治手册.第五版.1999,59-63.
- [2] Pavel K,Masayuki I,Hideaki Y. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J Bioscience and Bioengineering Rev* 2001 **9**(6):502-517.
- [3] Heidelberg JF,Eisen JA,Clayton RA,et al. DNA sequence of both

- chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000, **406**(6795):477-483.
- [4] Shouji W, Miyuki H, Hiroshi K, et al. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*MtlD*) is required for mannitol and glucitol assimilation in *Bacillus subtilis*: possible cooperation of *mtl* and *gut* operons. *J Bacteriol* 2003 **185**(16):4816-4824.
- [5] Sytse AH, Menno T, Ria H, et al. The *Bacillus stearothermophilus* Mannitol Regulator, *MtlR*, of the Phosphotransferase System. *J Biological Chemistry* 1999 **274**(8):4754-4763.
- [6] Susanne B, Wilfrid JM, Hubert B. Molecular analysis of the mannitol operon of *Clostridium acetobutylicum* encoding a phosphotransferase system, and a putative PTS-modulated regulator. *Microbiol* 2001, **147**:75-86.
- [7] Allen L, Honeyman, Roy C. The mannitol-specific enzyme II (*mtlA*) gene and the *mtlR* gene of the PTS of *Streptococcus mutans*. *Microbiol* 2000 **146**:1565-1572.
- [8] Rainer MF, Tom MR, Milton HS. The Mannitol Repressor (*MtlR*) of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994 **176**(3):840-847.
- [9] Otte S, Lengeler JW. The *mtl* genes and the mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* KAY2026. *FEMS Microbiol Lett* 2001 **194**(2):221-227.
- [10] Joseph SB, David WR. 分子克隆实验指南.黄培堂,等译.第三版.北京:科学出版社 2002.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt methods. *Methods* 2001, **25**:402-408.

Transcriptional repressor gene——*mtlR* of mannitol PTS operon in *Vibrio cholerae*

WANG Hai-yan^{1,2}, YAN Mei-ying², ZHAO Ying-wei¹, KAN Biao^{2*}

(¹ Department of Microbiology, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

(² National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China)

Abstract :The fermentation rates of mannitol in toxigenic and non-toxigenic El Tor strains of *Vibrio cholerae* are obviously different, which is a valuable indicator in the rapid identification of toxigenic strain. To determine the regulating role of *mtlR* in transcription of mannitol PTS operon in *V. cholerae* and whether it plays a role in the ferment difference of the toxigenic and non-toxigenic strains, the *mtlR* deletion mutants from the mannitol rapid-ferment strain (non-toxigenic strain) and slow-ferment strain (toxigenic strain) were constructed. Comparisons of the growth in M9 containing 0.2% mannitol as the sole carbon source and pH change in mannitol fermentation media of these wild strains and their mutants, indicated that *mtlR* is a repressor. Its repression in *mtlCBA* transcription was further verified with the analyses of quantitative reverse-transcriptional PCR. However, the regulation of *mtlR* is not the immediate cause of the ferment difference of the toxigenic and non-toxigenic strains. The study also provides the necessary data in the analyses of mannitol ferment difference between the toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* strains.

Keywords : *Vibrio cholerae* ; mannitol ferment ; PTS

Foundation item :Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999054102)

* Corresponding author. Tel 86-10-61739458 ;Fax 86-10-61739156 ;E-mail kanbiao@icdc.cn.

Received : 2 November 2006/ Accepted : 8 December 2006/ Revised : 1 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn