

## 霍乱弧菌中调控 *aphB* 的基因筛选及其功能

陈海丽<sup>1</sup> 朱召芹<sup>1</sup> 钟增涛<sup>2</sup> 朱军<sup>2</sup> 阚飙<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> 上海市公共卫生临床中心 生物安全部 上海 201508

<sup>2</sup> 南京农业大学生命科学学院 南京 210095

<sup>3</sup> 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京 102206

**摘要:** 【目的】筛选霍乱弧菌 C6706<sup>-</sup> 中调控 LysR 家族蛋白 AphB 表达的基因。【方法】将霍乱弧菌埃尔托型菌株 C6706<sup>-</sup> *aphB* 启动子区克隆到 2 个报告质粒 pBBRLux 和 pKP302 上, 并将其导入霍乱弧菌 C6706<sup>-</sup> 中, 以此作为出发菌株。利用出发菌株与转座子 pSC123 接合构建 LZV630-302 转座子随机突变文库, 通过测定化学发光强度检测 *aphB* 启动子的表达水平, 筛选 *aphB* 表达受影响的突变株。利用随机 PCR 方法检测转座子插入位点, 并测序比对分析基因。【结果】从 7 个转座子库中(共约 4 万个突变株)得到能影响 *aphB* 表达(均导致下降)的 2 株突变株 T1 和 T2。测序比对发现 T1 中转座子插入在 *vc1585* 读码框内, T2 中转座子插入在距 *vc1602* 基因末端 7 bp 处。【结论】获得 *aphB* 表达改变的突变株, 基因 *vc1585* 和 *vc1602* 可能直接或间接影响 *aphB* 表达, 为进一步研究 *aphB* 表达调控影响因素奠定了基础。

**关键词:** 霍乱弧菌, *aphB*, 基因调控

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)02-0256-06

霍乱是一种由霍乱弧菌引起的烈性腹泻疾病。霍乱弧菌的毒力因子主要为霍乱毒素 (Cholerae Toxin, CT) 和毒素共调菌毛 (Toxin coregulation pilus, TCP), 其中 CT 是导致病人严重腹泻的主要毒力因子, TCP 是重要的定殖因子<sup>[1]</sup>, 帮助霍乱弧菌定殖于小肠。目前已知与霍乱弧菌发病机理相关的许多主要基因都是属于 ToxR 毒力调控元件, 这些基因的表达依赖于转录调节子 ToxR。ToxT 受 ToxR/S 和 TcpP/H 的调节, 激活下游毒力基因 *tcpA* 和 *ctxAB* 的表达<sup>[2-3]</sup>。上游调控蛋白 AphB 感应环境刺激并激活 *tcpP/H* 的活性, 这个过程需要另一个蛋白 AphA 的协助<sup>[4]</sup>。这 2 个基因相互协作, 在 TcpP/H 感应环境变化, 激活细菌毒力基因表达等方面发挥重要

作用。

霍乱弧菌有三套平行的群体感应系统<sup>[5]</sup>, 这些群体感应系统共同作用调控下游关键应答调节器 LuxO 和 HapR。HapR 是通过直接抑制 *aphA* 的表达来影响毒力表达, 但是并不影响 *aphB* 的表达<sup>[6]</sup>。AphB 是属于 LysR 家族转录调控子, C 端是一个螺旋-转角-螺旋保守结构域, 该结构可与 DNA 结合调节目的基因的表达。许多 LysR 家族蛋白只有在特定的诱导物存在时才调控基因的表达<sup>[7]</sup>。Kovacikova 等人<sup>[4]</sup>推测也许在 AphA 存在时, 只有在特定的环境条

件下 AphB 需要与小诱导物分子共同激活 *tcpPH* 的转录。而高表达的 AphA 或 AphB 也许足

基金项目: 国家自然科学基金 (30830008)

\* 通信作者: Tel: +86-10-58900743; Fax: +86-10-58900742; E-mail: kanbiao@icdc.cn

作者简介: 陈海丽 (1986-) 女, 湖南人, 硕士, 研究方向为霍乱弧菌基因调控。E-mail: hai\_li\_c@sina.com

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2011-12-05

够或至少部分克服依赖诱导物来激活转录。到目前为止,并不知道是什么因子在调控 *aphB* 的表达。本研究通过构建转座子突变文库筛选 *aphB* 调控基因,获得 2 株突变菌株,为进一步研究 LysR 家族蛋白在霍乱弧菌群体感应调控系统中的功能提供了科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**本文所用的菌株与质粒见表 1。

表 1 供试菌株与质粒

| Table 1 Strains and plasmids used in this study |  |             |
|---|--|-------------|
| Strains and plasmids                            | Relevant characteristics   | Source      |
| <i>Escherichia coli</i>                         |  |             |
| SM10 $\lambda$ pir(pSC123)                      | Transposon mutagenesis strain, mariner transposon, Km <sup>R</sup>   | lab storage |
| DH5 $\alpha$ pir                                | F <sup>-</sup> D (lacZYA-argF) U169recA endA1 supE44 relA1 $\lambda$ :pir  | lab storage |
| <i>V. cholerae</i>                              |  |             |
| C6706   | El Tor biotype   | lab storage |
| C6706 <sup>-</sup>                              | El Tor biotype, LacZ <sup>-</sup>  | lab storage |
| LZV630-302                                      | C6706 El Tor biotype LacZ <sup>-</sup> , pBBRLux- <i>aphB</i> , pKP302- <i>aphB</i> , Sm <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup> | this study  |
| Plasmids  |  |             |
| pBBR-lux  | promoterless of <i>luxCDABE</i> , Cm <sup>R</sup>  | lab storage |
| pKP302  | promoterless of <i>lacZ</i> , Spe <sup>R</sup>   | lab storage |
| P <sub><i>aphB</i></sub> - <i>luxCDABE</i>      | promoter of <i>aphB</i> in pBBRLux, Cm <sup>R</sup>  | lab storage |
| P <sub><i>aphB</i></sub> - <i>lacZ</i>          | promoter of <i>aphB</i> in pKP302, Spe <sup>R</sup>  | this study  |

**1.1.2 培养基与培养条件:**在本文中研究所用到的霍乱弧菌均来自于埃尔托 C6706<sup>[8]</sup>。霍乱弧菌和大肠杆菌用 LB 培养基,于 37℃ 培养。培养基中加入合适的抗生素,抗生素所用浓度分别为:Sm (100  $\mu$ g/mL), Km (100  $\mu$ g/mL), Spe (100  $\mu$ g/mL), 大肠杆菌所用的 Cm 浓度为 10  $\mu$ g/mL, 霍乱弧菌所用的 Cm 浓度为 2  $\mu$ g/mL。X-Gal 浓度为 40  $\mu$ g/mL。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**PCR 产物纯化试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒,质粒抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;DNA 提取试剂盒购自天根公司;限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、高保真酶、X-Gal 均购自 TaKaRa 公司;ONPG 购自 Sigma 公司。酶联检测仪:2608P10 及 infinite M200PRO,

TENCAN;化学发光成像系统:美国 UVP;生物安全柜为 Forma Class II, A2, Thermo;PCR 仪:tetrad2, 美国 Bio-rad;电泳仪,电泳槽,凝胶成像仪:美国 Bio-rad。

### 1.2 质粒构建

P<sub>*aphB*</sub>-*luxCDABE* 的构建是通过 PCR 扩增 *aphB* 启动子区并将其连接到 pBBR-lux 载体<sup>[9]</sup>。而 P<sub>*aphB*</sub>-*lacZ* 则是将 *aphB* 启动子区连接到载体 pKP302<sup>[10]</sup>, 所用 PCR 引物为 *aphB*-f: 5'-CGGAATTCGAAGGATAGGACGAACTGAC-3' *aphB*-r: 5'-GCTCTAGAA-GGCTTGGATCCGCTCTTGTG-3', 下划线分别为 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切位点。然后将酶连产物电击到 DH5 $\alpha$ pir 感受态中,提质粒酶切验证,条带大小正确送测序验证。2 个质粒在 *V. cholerae* 的兼容性和稳定性都较好。

### 1.3 转座子随机突变库的建立

转座子随机突变库的建立采用二亲接合的方法,受体菌 LZV630-302 和供体菌 SM10 $\lambda$ pir (pSC123) 接合后, pSC123 上的转座子 Tn5 可以随机插入到受体菌 LZV630-302 的染色体或质粒中,通过抗性平板即可筛选接合子。将供体菌和受体菌液分别及混合均匀后铺在滤膜上 37℃ 培养箱正置培养 3-4 h。吸取 100  $\mu$ L 供体、受体菌分别涂布作对照,供受体混合菌液 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L 涂布, 37℃ 培养箱中过夜培养。剩余混合菌液加入等量 50% 甘油后保存在 -70℃ 备用。次日观察平板生长状况,确保本底(供体菌和受体菌)均没有生长。

### 1.4 筛选调控 *aphB* 的基因

为了筛选调控 *aphB* 的基因,向霍乱弧菌埃尔托生物型 C6706<sup>-</sup> 中导入 2 个质粒, P<sub>*aphB*</sub>-*luxCDABE* 和 P<sub>*aphB*</sub>-*lacZ* 构成此次筛选试验中的出发菌 LZV630-302。质粒 pBBRLux 是利用 *luxCDABE* 基因(发光基因)作为报告基因,在此次试验中冷光的表达需要借助被插入基因 *aphB* 启动子。而质粒 pKP302 是以 *lacZ* 为报告基因,可以用  $\beta$ -半乳糖苷酶法进行复筛。通过二亲接合的方式,构建 LZV630-302 的转座子随机突变文库。

**1.4.1 初筛冷光值改变的突变株:**化学发光凝胶成像系统拍照筛选流程进行筛选。首先正常拍下平板照片,然后在暗室的情况下拍下细菌发光的平板照片,最后通过叠加处理寻找光值降低或升高的菌落。将筛选到的含有 P<sub>*aphB*</sub>-*luxCDABE* 报告质粒的霍乱弧

菌疑似株培养过夜,第2天按1‰的比例转接到3mL LB 试管中,37℃摇动培养,按时间点取200μL菌液转移到96孔透明板中(避免产生气泡),用酶标仪测 $OD_{600}$ ,再吸取100 μL到96孔透明板中检测冷光值,以时间点为横坐标,冷光值/ $OD_{600}$ 为纵坐标,得到光值曲线。

**1.4.2 β-半乳糖苷酶法复筛:**将初筛疑似菌株挑单菌落液体活化培养 $OD_{600}$ 至0.6左右。在离心管中加入800 μL Z-buffer,200 μL移液器加2滴0.5% SDS 3滴 $CHCl_3$ 及200 μL上述培养菌液,充分振荡。加入100 μL显色底物ONPG,振荡10 s,计时至溶液显黄色,加入600 μL 1 mol/L  $NaCO_3$ 终止反应。8000 × g离心2 min,取上清测 $OD_{420}$ ,试管中残留菌体测 $OD_{600}$ 。计算 Miller Units,检测β-半乳糖苷酶活性<sup>[11-12]</sup>。

公式计算采用  $Miller\ Units = 1000 \times OD_{420} / [OD_{600} \times T \times V]$  其中T以分钟为单位,为溶液颜色变黄所需时间,V为反应时所加的菌液量(0.2 mL)。

### 1.5 转座子插入突变基因的确证

**1.5.1 随机 PCR 确定转座子插入位点<sup>[13]</sup>:**随机PCR包括两轮PCR扩增反应,在本实验室已做改进,引物序列见表2。第一轮PCR所用的引物为123-1和随机引物ARB1和ARB6。反应体系为10 μL,反应条件为:95℃,5 min;6个循环:94℃,30 s;30℃,30 s;72℃,1 min;30个循环:94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,1 min;72℃,5 min。第二轮PCR的引物为123-2和随机引物ARB2,反应体系为50 μL,并取1 μL第一轮的产物作为第二轮的模板。反应条件为:30个循环:94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,1 min;72℃,5 min。将第二轮PCR得到的产物送公司测序,测序引物123-2。

表2 随机PCR引物序列

| Primer for PCR | Nucleotide sequence(5' → 3')       |
|----------------|------------------------------------|
| 123-1          | TCACCAACTGGTCCACCTAC               |
| 123-2          | CGCTCTTGAAGGGAAGTATG               |
| ARB1           | GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT |
| ARB6           | GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC |
| ARB2           | GGCCACGCGTCGACTAGTAC               |

**1.5.2 插入位点基因分析:**基因序列同源性分析采用NCBI的BLASTX(<http://www.ncbi.nlm.gov/>

)进行同源比对,确定转座子插入基因位点。所有序列的比对均以霍乱弧菌埃尔托测序菌株N16961全基因组为参照标准(GenBank登录号:AE003852)。在Microbesonline网站上(<http://www.microbesonline.org>)查询基因信息,同时查看上下游基因信息。

## 2 结果

### 2.1 筛选结果

从7个转座子库中(共约4万个转座突变株)得到2株冷光值下降的突变株,分别命名为T1和T2。冷光值约为对照的1/5,β-半乳糖苷酶活性降低至少一倍,见图1和图2。图1中数据采用t检验,LZV630-302与T1的P值为0.0092,LZV630-302与T2的P值为0.0103,都小于0.05,差异有统计学意义。图2中T1及T2的β-半乳糖苷酶活性与LZV630-302相比差异均有统计学意义。

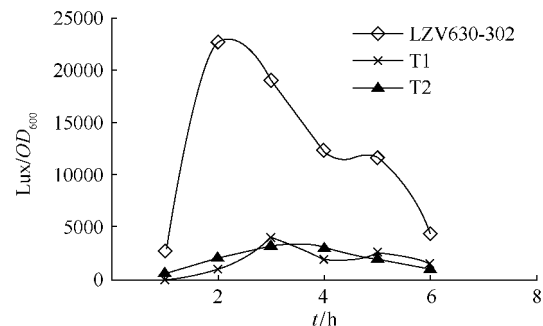


图1 突变株T1和T2的冷光曲线

Fig. 1 The luminescence changes of mutants T1 and T2.

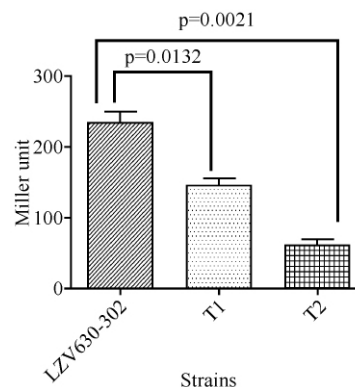


图2 突变株T1和T2的β-半乳糖苷酶活性

Fig. 2 The Miller Unit of mutants T1 and T2.

### 2.2 突变株转座子插入位点侧翼基因的确定

**2.2.1 转座子侧翼序列的随机PCR扩增:**分别提

取 T1、T2 2 株突变株的基因组 DNA 作为随机 PCR 扩增模板, 第二轮 PCR 电泳图谱见图 3。将片段测序后 BLASTX 同源比对获得了转座子插入位点的基因。

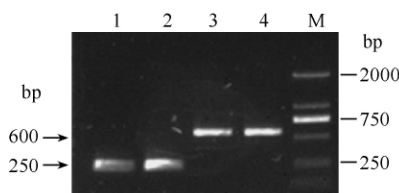


图 3 2 株突变株随机 PCR 第二轮 PCR 电泳图谱

Fig. 3 The second round of Arbitrary PCR result of 2 mutants.

M: DL2000; Lane 1 and 2: T1; Lane 3 and 4: T2.

**2.2.2 突变株转座子插入位点侧翼基因的比对分析:** 通过序列同源性比对分析发现, 所获得的 2 株突变株 T1 插入到基因 *vc1585* 中, *vc1585* 全长 1703 bp, 编码过氧化氢酶, 而转座子插入到 1024 bp 处。T2 插入位点是 *vc1602*, 全长 986 bp, 编码趋化性蛋白 CheV, 转座子插入到基因末端 7 bp 处。图 4 显示了 2 株突变株的转座子插入位点侧翼基因及其周围相关基因。

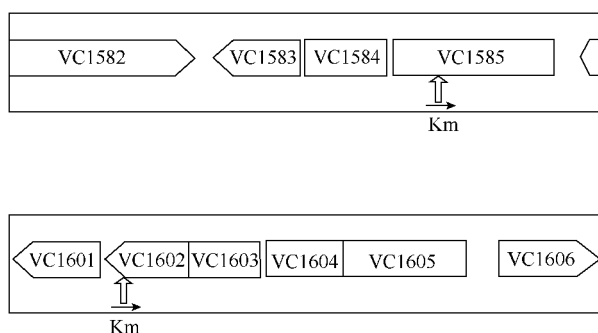


图 4 2 株突变株的转座子插入位点

Fig. 4 Chromosomal locations of transposon insertion of the two mutants.

A: T1, *vc1585* catalase; B: T2, *vc1602* chemotaxis protein CheV.

### 3 讨论

本研究中通过二亲接合的方式, 构建了 LZV630-302 的转座子随机突变文库。筛选方式采用快速便捷的化学发光成像仪拍照筛选, 无需繁琐耗时的挑菌过程, 大大减少了工作量, 提高了工作效率。经过近 4 万株的筛选, 最终筛选到 2 株突变株 T1、T2 能正调控 *aphB* 的表达。为排除 2 个质粒变

异而出现的假阳性, 将突变株中的 2 个质粒丢失 (不加相应抗生素传代), 再导入原始构建好的质粒, 结果仍是一致的。

应用随机 PCR 的方法确定了所筛选得到的 2 株突变株中转座子的插入位点。经 BLASTX 序列同源性比对发现: T1 中转座子插入一个 1703 bp 过氧化氢酶基因 *vc1585* 的读码框中, *vc1583*、*vc1584*、*vc1585* 位于一个操纵子中, *vc1584* 编码 AnkB 蛋白, *vc1583* 编码超氧化物歧化酶。而 T2 的转座子则插入到编码趋化性蛋白 CheV 的基因 *vc1602* 中, 而 *vc1602*、*vc1603*、*vc1604*、*vc1605* 四个基因是一个操纵子, 转座子插入到基因末端 7 bp 处, 可能影响了整个操纵子的功能。而 *vc1601* 与 *vc1602* 间隔 132 bp, 所以转座子的插入位点可能还影响邻近基因 *vc1601* 的表达。而 *vc1601* 是一个假设蛋白, 蛋白同源性分析可能为 ABC 型氨基酸转运子, 为信号传递系统。此突变株是怎么影响 *aphB* 的表达还需深入研究。

Kovacicova<sup>[14]</sup> 等发现 *aphB* 调控的基因表达水平受低 pH 和低氧浓度影响, 当培养环境 pH 为 5.5 时 *aphB* 自身的表达没有显著的影响, 而厌氧培养时 *aphB* 自身的表达增加两倍以上。而 Liu<sup>[15]</sup> 等同样发现 AphB 在厌氧情况下活性比好氧条件高, AphB 蛋白中有三个半胱氨酸, 其中的一个 (C235) 对感受氧压和调节 AphB 的活性非常重要。这些结果都提示 AphB 的表达调控与氧浓度有关系。本实验中筛选到的基因 *vc1585* 是过氧化氢酶, 可能与氧压有关。大肠杆菌中有两类过氧化氢酶或氢过氧化物酶, 双功能的过氧化氢酶-过氧化物酶 HPI 和单功能的过氧化氢酶 HPII, 分别由 *katG*<sup>[16]</sup> 和 *katE*<sup>[17]</sup> 编码。这两类过氧化氢酶分别对不同刺激作出反应: HPI 同时具有过氧化氢酶和过氧化物酶活性, 其合成能被添加到培养基中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导, *katG* 能被正调控子 OxyR 诱导转录<sup>[18]</sup>; 而 HPII 的合成则需要生长到稳定期<sup>[19]</sup> *katE* 的表达调控也完全不一样, 其转录需要 *rpoS* 的调控<sup>[18]</sup>。实验证明, 突然转变为厌氧条件能诱导 HPII 的合成, 而高浓度的葡萄糖能抑制其合成。但是不同的菌其过氧化氢酶系统并不一样, 如 *Rhodobacter sphaeroides* 中 *katE* 能被双氧水强诱导, 而在创伤弧菌中则检测不到 HPII 的活性<sup>[20]</sup>。霍乱弧菌中同样存在着 HPI 和 HPII, *vc1560* 和 *vc1585* 分别编码 *katG* 和 *katE*。本研究通过构建转座子突变文库筛选调控 *aphB* 的基因, 通过对突变株

的分析, *vc1585*、*vc1602* 可能和调控 *aphB* 有关。为进一步研究 LysR 家族蛋白 AphB 在霍乱弧菌中的功能提供了科学依据。

## 参考文献

- [ 1 ] Taylor RK , Miller VL , Furlong DB , Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1987 , 84 ( 9 ) : 2833-2837.
- [ 2 ] Champion GA , Neely MN , Brennan MA , Dirita VJ. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Molecular microbiology* , 1997 23 ( 2 ) : 323-331.
- [ 3 ] Dirita VJ , Parsot C , Jander G , Mekalanos JJ. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1991 88 ( 12 ) : 5403-5407.
- [ 4 ] Kovacicova G , K Skorupski. A *Vibrio cholerae* LysR homolog , AphB , cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *Journal of Bacteriology* , 1999 , 181 ( 14 ) : 4250-4256.
- [ 5 ] Miller MB , Skorupski K , Lenz DH , Taylor RK , Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* , 2002 , 110 ( 3 ) : 303-314.
- [ 6 ] Kovacicova G , Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter. *Molecular microbiology* , 2002 , 46 ( 4 ) : 1135-1147.
- [ 7 ] Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* , 1993 , 47 : 597-626.
- [ 8 ] Joelsson A , Z Liu , J Zhu. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* , 2006 , 74 ( 2 ) : 1141-1147.
- [ 9 ] Hammer BK , BL Bassler. Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2007 , 104 ( 27 ) : 11145-11149.
- [ 10 ] Pappas KM , SC Winans. A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Molecular microbiology* , 2003 , 48 ( 4 ) : 1059-1073.
- [ 11 ] Zhu J , Chai Y , Zhong Z , Li S , Winans SC. *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environment Microbiology* , 2003 , 69 ( 11 ) : 6949-6953.
- [ 12 ] Miller JH , JH Shinaberger , PW Gardner. Experience with a new plate type dialyzer. *Proceedings of the Clinical Dialysis and Transplant Forum* , 1972 , 2 : 50-51.
- [ 13 ] Okura M , Osawa R , Iguchi A , Arakawa E , Terajima J , Watanabe H. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* , 2003 , 41 ( 10 ) : 4676-4682.
- [ 14 ] Kovacicova G. , W Lin , K Skorupski. The LysR-type virulence activator AphB regulates the expression of genes in *Vibrio cholerae* in response to low pH and anaerobiosis. *Journal of Bacteriology* , 2010 , 192 ( 16 ) : 4181-4191.
- [ 15 ] Liu Z , Yang M , Peterfreund GL , Tsou AM , Selamoglu N , Daldal F , Zhong Z , Kan B , Zhu J. *Vibrio cholerae* anaerobic induction of virulence gene expression is controlled by thiol-based switches of virulence regulator AphB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2011 , 108 ( 2 ) : 810-815.
- [ 16 ] Loewen PC , Triggs BL , George CS , Hrabarchuk BE. Genetic mapping of *katG* , a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 1985 , 162 ( 2 ) : 661-667.
- [ 17 ] Loewen PC. Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE* , a locus that affects catalase activity. *Journal of Bacteriology* , 1984 , 157 ( 2 ) : 622-626.
- [ 18 ] Gonzalez-Flecha B , B Demple. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 1997 , 179 ( 2 ) : 382-388.
- [ 19 ] Loewen PC , J Switala , BL Triggs-Raine. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 1985 243 ( 1 ) : 144-149.
- [ 20 ] Park KJ , Kang MJ , Kim SH , Lee HJ , Lim JK , Choi

SH, Park SJ, Lee KH. Isolation and characterization of *rpoS* from a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*: role of sigmaS in survival of exponential-phase cells under

oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (11): 3304-3312.

## Isolation and function of genes regulating *aphB* expression in *Vibrio cholerae*

Haili Chen<sup>1</sup>, Zhaoqin Zhu<sup>1</sup>, Zengtao Zhong<sup>2</sup>, Jun Zhu<sup>2</sup>, Biao Kan<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Pathogen Diagnosis and Biosafety department, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

<sup>2</sup> College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

<sup>3</sup> Corresponding author. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**Abstract:** [Objective] We identified genes that regulate the expression of *aphB*, the gene encoding a key virulence regulator in *Vibrio cholerae* O1 El Tor C6706<sup>-</sup>. [Methods] We constructed a transposon library in *V. cholerae* C6706<sup>-</sup> strain containing a P<sub>*aphB*</sub>-*luxCDABE* and P<sub>*aphB*</sub>-*lacZ* transcriptional reporter plasmids. Using a chemiluminescence imager system, we rapidly detected *aphB* promoter expression level at a large scale. We then sequenced the transposon insertion sites by arbitrary PCR and sequencing analysis. [Results] We obtained two candidate mutants T1 and T2 which displayed reduced *aphB* expression from approximately 40,000 transposon insertion mutants. Sequencing analysis shows that Tn inserted in *vc1585* reading frame in the T1 mutant and Tn inserted in the end of coding sequence of *vc1602* in the T2 mutant. [Conclusion] By using a genetic screen, we identified two potential genes that may involve in regulation of the expression of the key virulence regulator AphB. This study sheds light on our further investigation to fully understand *V. cholerae* virulence gene regulatory cascades.

**Keywords:** *V. cholerae*, *aphB*, gene regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30830008)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-58900743; Fax: +86-10-58900742; E-mail: kanbiao@icdc.cn

Received: 27 September 2011/Revised: 5 December 2011