

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5): 525–531; 4 May 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.007

AphA 蛋白促进副溶血弧菌 c-di-GMP 合成和生物膜形成

黄倩^{1,2}, 张义全², 胡小许^{2,3}, 王丽², 杨瑞馥², 钟青萍³, 周冬生^{2*}, 黎晓敏^{1*}

¹ 西南大学动物科技学院, 重庆 400715

² 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

³ 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

摘要 【目的】综合运用表型和分子生化实验研究 AphA 蛋白对副溶血弧菌生物膜形成的调节机制。【方法】利用菌落褶皱和结晶紫染色实验比较 *aphA* 突变株 ($\Delta aphA$) 和野生株 (WT) 的表型差异; 进而利用色谱串联质谱 (HPLC-MS/MS) 的方法分别检测 $\Delta aphA$ 和 WT 中 c-di-GMP 分子含量; 提取 $\Delta aphA$ 和 WT 的总 RNA, 采用实时定量 RT-PCR 的方法研究 AphA 对 *scrABC* 和 *scrG* 的调控关系; 分别构建克隆有 *scrABC* 和 *scrG* 上游启动子区的 LacZ 重组质粒, 并将重组质粒转入 $\Delta aphA$ 和 WT 中, 通过测定并比较两株菌中 β -半乳糖苷酶活性差异来进一步研究 AphA 对 *scrABC* 和 *scrG* 的调控关系; PCR 扩增 *scrABC* 和 *scrG* 的整个启动子区 DNA 序列, 并纯化 His-AphA 蛋白, 通过凝胶阻滞实验 (EMSA) 验证 AphA 对靶基因启动子区是否具有直接的相互作用。【结果】表型结果显示 AphA 能促进 c-di-GMP 的合成和生物膜形成; 实时定量 RT-PCR 和 LacZ 结果表明 AphA 能抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录表达; EMSA 结果证明 AphA 不能结合到 *scrABC* 和 *scrG* 的启动子区 DNA 上。【结论】AphA 间接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的表达是其促进副溶血弧菌 c-di-GMP 合成及生物膜形成的机制之一。

关键词: 副溶血弧菌, 生物膜形成, c-di-GMP, AphA, *scrABC*, *scrG*

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209(2014)05-0525-07

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP 菌) 是一种革兰氏阴性弧菌, 主要分布于海水、海河交界处及海产品中。人们食用被其污染的食物后, 很可能会引起以发热、腹泻、呕吐等为主要症状的急性胃肠炎, 严重者可引起脱水、休克, 甚至死亡^[1]。VP 菌可以游离于海水环境, 也可以在固相表面形成生物膜, 生物膜是其适应不利环境而采取的主要生存策略。生物膜形成受密度感应 (Quorum sensing,

QS) 系统和 c-di-GMP 信号通路的调节。

QS 是一种密度依赖性的细胞间信号传递机制。在这一机制中, 细菌通过合成、分泌及感应自诱导因子, 并通过一系列的级联信号传导, 最终开关 QS 系统核心调控子的表达, 核心调控子进而再调节细菌的运动、生物膜形成和毒力因子表达等^[2]。VP 菌能分泌 3 种自诱导因子 HAI-1、AI-2 及 CA-1, 它们与受体蛋白结合, 在 Qrr sRNAs 的参与下, 调节核心调控

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170127)

* 通信作者。黎晓敏, Tel: +86-23-68250635, E-mail: lixiaomin662@sina.com; 周冬生, Tel: +86-10-66948594, E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

作者简介: 黄倩 (1989–) 女, 重庆市人, 硕士研究生, 主要从事副溶血弧菌转录调控机制研究。E-mail: huangam@yeah.net

收稿日期: 2013-09-13; 修回日期: 2013-12-24

子 OpaR 和 AphA 的表达^[3-4]。在低密度时, OpaR 起核心调节作用^[3], 它能抑制毒力因子(T3SS) 的表达^[5]和在固相表面的爬动能力(*laf*)^[6], 而促进荚膜多糖(CPS) 的合成^[6]。在固相表面的爬动是生物膜形成的起始步骤, 而 CPS 是生物膜基质的主要成份之一; 在低密度时, AphA 起核心调节作用^[4], 表型结果显示它能促进毒力因子的表达和生物膜形成^[7], 但是其分子机制还未被阐明。

c-di-GMP 是一个普遍存在的第二信使分子, 能促进细菌生物膜的形成。c-di-GMP 的分子代谢受 GGDEF 和 EAL 结构域的调节。GGDEF 具有鸟苷酸环化酶活性, 能以 GTP 为底物催化合成 c-di-GMP; 而 EAL 具有磷酸二酯酶活性, 能使 c-di-GMP 降解成 GMP^[8]。VP 菌有 50 多个蛋白参与 c-di-GMP 的分子代谢(含有 GGDEF、EAL 或二者兼有), 包括 SerC^[9]和 SerG^[10], 二者均兼具 GGDEF 和 EAL 结构域。SerC 由操纵子 *scrABC* 编码, SerA 产生 S 信号, SerB 感应这种信号并与 SerC 相互作用, 使得 SerC 表现出 EAL 的磷酸二酯酶活性, 并降解 c-di-GMP, 抑制 CPS 的合成, 而激活 *laf* 的表达^[9, 11-12]。SerG 也主要表现为磷酸二酯酶活性, 并发挥与 SerABC 相似的功能^[10]。Ser 通路是 VP 菌生物膜形成的另一信号传导途径, 它是否与 QS 系统相关联, 目前还未见报道。

在本研究中, 我们首先利用表型实验(褶皱和结晶紫染色) 验证了 AphA 能促进 VP 菌生物膜形成, 进而利用 HPLC-MS/MS 的方法测定了野生株和 *aphA* 突变株中 c-di-GMP 的含量, 最后利用实时定量 RT-PCR、LacZ 和 EMSA 等实验技术, 证明了 AphA 能通过间接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录表达而促进 c-di-GMP 的合成, 进而增强 VP 菌生物膜形成。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: VP 菌 RIMD2210633 株(野生型, WT) 及其 *aphA* 突变株(Δ *aphA*)、重组质粒 *scrA*::pHRP309 和 *scrG*::pHRP309(pHRP309 质粒无启动子区的 β -半乳糖苷酶基因上游分别克隆入 *scrA* 和 *scrG* 的启动子区序列, 庆大霉素抗性) 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: TRIzol Reagent 为 Invitrogen 产

品; Taq DNA 连接酶、dNTPs 为 Fermentas 产品; PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 产品; LightCycler[®] 480 SYBR Green Master 为 Roche 产品; Micro BCA Protein Assay Kit 为 Thermo 产品; DNA-free[™] Kit 为 Amibion 产品; M 肉汤(Difco Marine, DM) 和 HI 肉汤(2.5% Bacto heart infusion) 购自 BD Bioscience。

1.2 细菌培养

VP 菌培养方法分为预培养和正式培养。预培养: 取 20 μ L 甘油菌种接种于 15 mL 的 HI 肉汤培养基中(50 mL 的三角烧瓶, 下同), 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至平台期(12 - 14 h), 而后按 1:50 稀释接种至 15 mL 新鲜的 HI 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至 OD_{620} 大约为 1.4。正式培养: 将预培养物按 1:1000 稀释接种至 15 mL 新鲜的 HI 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至 OD_{620} 大约为 0.15, 收集菌体, 备用。

1.3 菌落表面褶皱

将 1.2 中预培养物按 1:50 稀释接种至 3 mL 的 M 肉汤中(试管), 30 $^{\circ}$ C 静止培养 4 d 后, 取 1.5 μ L 滴加于 HI 平板(2.5% Bacto heart infusion + 1.5% 琼脂) 的表面, 每株菌至少 3 个菌落的重复, 37 $^{\circ}$ C 下静置培养 48 h 后拍正照。

1.4 结晶紫染色

将 1.2 中预培养物按 1:50 稀释接种至 2 mL 的 M 肉汤中(试管培养, 3 个重复), 置 30 $^{\circ}$ C 下 100 rpm 培养 48 h。小心的倒出液体培养物, 将附着于试管壁的菌膜用去离子水洗涤 3 次, 干燥后加入 3 mL 的 0.1% 结晶紫溶液, 常温染色 30 min, 再用去离子水洗涤 3 次。晾干试管, 并拍照, 根据结晶紫染色的强弱即可判定生物膜的形成量^[13]。

1.5 c-di-GMP 测定

取 10 mL 的 1.2 中正式培养物, 收集菌体, 用细菌裂解液(甲醇: 乙腈: 水 = 40: 40: 20) 提取 c-di-GMP。利用色谱串联质谱(HPLC-MS/MS) 的方法^[14], 分别检测每 mL 的细菌培养物中 c-di-GMP 的 pmol 量。同时, 利用 Micro BCA Protein Assay Kit, 按说明书提供的方法检测每 mL 细菌培养物中 mg 总蛋白量。细菌培养物中 c-di-GMP 浓度用 pmol/mg 蛋白表示。

1.6 RNA 提取与实时定量 PCR(qRT-PCR)

细菌按 1.2 的方法培养后, 收集菌体, 利用 TRIzol Reagent 提取总 RNA^[3]。利用 Amibion 公司

的 DNA-free™ Kit 去除总 RNA 中可能污染的 DNA, 而后利用 N6 随机引物将其逆转录为 cDNA。用 Roche 的 LightCycler system 作 qRT-PCR 分析。以 16S rRNA 的表达量为内参绘制标准曲线, 用于基因表达水平的相对定量^[15]。

1.7 LacZ 报告基因融合实验

PCR 扩增 *scrA* 和 *scrG* 的启动子区(引物序列见

表 1), 并分别克隆入 pHRP309 质粒的 β -半乳糖苷酶基因(无启动子区)的上游, 得重组质粒。将重组质粒分别转入 WT 和 $\Delta aphA$ 中。细菌按 1.2 的方法培养后, 收集菌体, 分别检测并比较 WT 和 $\Delta aphA$ 菌株中的 β -半乳糖苷酶活性的差异, 从而判定 AphA 对靶基因的调控关系, 一般以 t 检验的 $P < 0.01$ 为判定标准。

表 1. 本研究所用引物汇总

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

| target | primer (5'→3', sense/anti-sense) |
|-------------|---|
| RT-PCR | |
| <i>scrA</i> | GCCGTTGTAGCTGGTGTG/TGAGCCTGTTGTACCAATGTTC |
| <i>scrG</i> | CTCATCTCTGTTGCCAGTAAGG/CCGAACTCGTCCATGTAGAAG |
| LacZ fusion | |
| <i>scrA</i> | GCGCGTCGACCATCAAGCCATTTATGAAAC/GCGCGAATTCGTCGGCTCGGATTAGTCTG |
| <i>scrG</i> | GCGCGTCGACTAGCAGCTTGTGTTGGAC/GCGCGAATTCAGGGAAATGAAGTAATCATGCG |
| EMSA | |
| <i>scrA</i> | GAGCGTATATCCAAGTGTTTG/GTCGGCTGCGATTAGTCTG |
| <i>scrG</i> | TAGCACGCTTGTGTTGGAC/CAGGGAAATGAAGTAATCATGCG |

1.8 凝胶阻滞实验(EMSA)

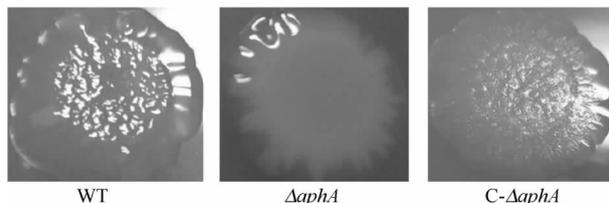
PCR 扩增 *scrA* 和 *scrG* 的启动子区(引物见表 1), 并纯化回收, 用 T4 多聚核苷激酶(T4 PNK)对 DNA 片段 5' 末端进行标记^[16]。利用 Ni-NTA 柱法纯化 His-AphA 蛋白^[4]。将不同浓度的 His-AphA 蛋白与标记的 DNA 探针在 10 μ L 结合反应体系中^[16], 室温共同孵育 20 min 后, 将样品加入 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, -60°C 放射自显影后分析结果。

2 结果和分析

2.1 AphA 蛋白影响 VP 菌生物膜表型

为了研究 *aphA* 缺失后对 VP 菌生物膜形成能力的影响, 我们对 WT 和 $\Delta aphA$ 菌株做了表型分析。图 1-A 为菌落褶皱实验结果, 可以看出: $\Delta aphA$ 的菌落形态要比 WT 光滑的多, 当把 *aphA* 回补到 $\Delta aphA$ 菌株后(*C-aphA*), *C-aphA* 菌落形态又重新变得褶皱, 这表明 AphA 能促进胞外多糖(EPS)的合成; 图 1-B 为结晶紫染色实验结果, 可以看出: $\Delta aphA$ 在试管壁的生物膜形成量明显低于 WT 的, 这表明 *aphA* 缺失后 VP 菌在气液表面的生物膜形成能力降低。总之, AphA 能促进 VP 菌生物膜的形成。

(A) Colony morphology



(B) Crystal violet staining

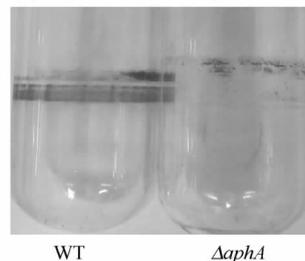


图 1. AphA 促进 VP 菌生物膜形成

Figure 1. AphA promotes biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. Colony morphology (A) on the agar plates was assayed to measure the biofilm exopolysaccharide (EPS) production. Crystal violet staining (B) was applied to analyze the biofilms adhering to the abiotic surface.

2.2 AphA 促进 c-di-GMP 的合成

上文表明 AphA 能促进 VP 菌生物膜形成, 而 c-di-GMP 是促进生物膜形成的第二信使^[8]。为了验证 AphA 是否能调节 c-di-GMP 的合成, 我们利用 HPL-MC/MS 的方法测定了 WT 和 $\Delta aphA$ 中 c-di-

GMP 含量,其结果如图 2 所示,可以看出: $\Delta aphA$ 中的 c-di-GMP 含量明显低于 WT 中的,且二者具有显著性差异 ($P < 0.01$),这表明 AphA 能促进 VP 菌 c-di-GMP 的合成。

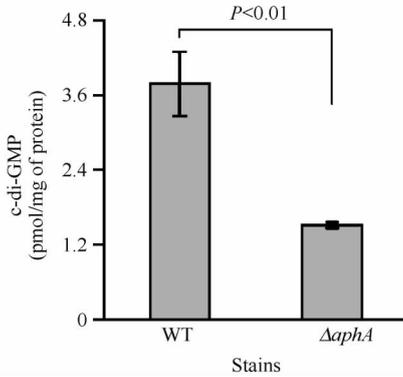


图 2. c-di-GMP 在不同菌株中的含量

Figure 2. Concentrations of c-di-GMP in different strains. The intracellular c-di-GMP concentrations were expressed as pmol/mg of bacterial protein.

2.3 AphA 抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录

AphA 对 *scrABC* 和 *scrG* 调控的 qRT-PCR 结果如图 3-A) 所示:*scrA* 和 *scrG* 在 $\Delta aphA$ 中的相对表达量要明显高于 WT 中的,且二者具有显著性差异 ($P < 0.01$),这说明 AphA 抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录。进一步利用 LacZ 报告基因融合实验研究 AphA 对 *scrABC* 和 *scrG* 的调控关系,其结果如图 3-B) 所示:克隆有 *scrA* 或 *scrG* 启动子区的 β -半乳糖苷酶基因在 $\Delta aphA$ 中的转录活性 (miller units) 明显高于 WT 中的,且二者具有显著性差异 ($P < 0.01$),这进一步说明 AphA 能抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录表达。

2.4 His-AphA 不能结合到 *scrABC* 和 *scrG* 的启动子区

利用 EMSA 实验验证 His-AphA 是否能直接作用于 *scrABC* 和 *scrG* 的启动子区,结果如图 4 所示:当 His-AphA 蛋白量达到 60.0 pmol 时,仍未出现阻滞条带,这已比前期研究中出现阻滞带时所用的蛋白量高出数倍^[4],这表明 AphA 不能结合到 *scrABC* 和 *scrG* 的启动子区。

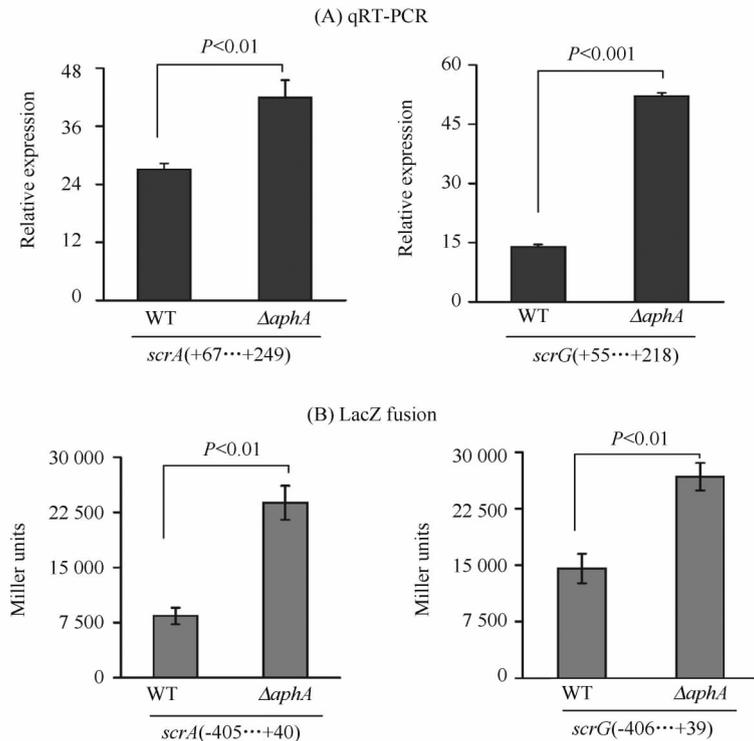


图 3. AphA 抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录

Figure 3. AphA activates the transcription of *scrABC* and *scrG*. (A) qRT-PCR. On the basis of the standard curves of 16S rRNA gene expression, the relative mRNA levels of target genes were compared between $\Delta aphA$ and WT. (B) LacZ fusion. The target promoter-proximal DNA region was cloned into the lacZ transcriptional fusion vector pHRP309 and then transformed into the WT and $\Delta aphA$ strains to determine the promoter activity (Miller units) by using the β -Galactosidase Enzyme Assay System. The negative or positive numbers indicated the nucleotide site upstream or downstream of translation start (+1).

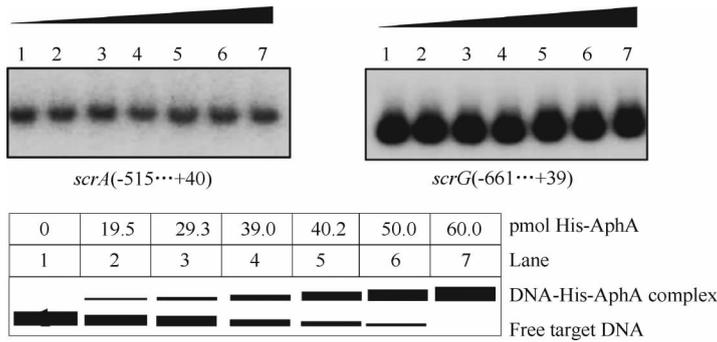


图 4. His-AphA 对靶基因启动子结合的 EMSA 实验结果

Figure 4. EMSA assay of binding of His-AphA to the target promoter-proximal DNA region. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively. Shown below was the schematic representation of the EMSA design.

3 讨论

AphA 是弧菌属 QS 系统在低密度下的核心调控子,参与调解弧菌毒力和生物膜形成。在霍乱弧菌中,AphA 与 AphB 相互作用并激活 *tcpPH* 的转录表达。TcpP/TcpH 在 ToxR/ToxS 的协助下,激活毒力调控子 ToxT 的表达,ToxT 再激活 *tcp* (编码菌毛) 和 *ctx* (编码霍乱毒素) 的转录,而使细菌表现出强毒性^[17]。AphA 还能激活 *vpsT* 的表达,VpsT 再激活胞外多糖基因 *vps* 的表达,而利于生物膜形成^[18]。VP 菌 AphA 与霍乱弧菌的 AphA 高度同源,其功能也具有高度的相似性^[7],但是其分子作用机制还未见报道。

scrABC 操纵子^[9, 11-12]编码 3 种蛋白: ScrA 位于胞浆中,能产生一种称为 S 信号信号分子,并分泌到胞外; ScrB 是位于周质的小分子结合蛋白; ScrC 是一种膜结合蛋白,其 N-末端具有两个跨膜结构域,而 C-末端具有 GGDEF 和 EAL 结构域。ScrB 受 ScrA 产生的 S 信号刺激,能与 ScrC 的 N-末端相互作用,促使 ScrC 表现出 EAL 结构域的磷酸二酯酶活性,降解 c-di-GMP,抑制 *cps* 而激活 *laf* 的表达,使细菌趋于游离;当细胞中只存在 ScrC 时,GGDEF 结构域的活性占主导地位,并能促进 c-di-GMP 和 *cps* 合成,抑制 *laf* 的表达,细菌趋于形成生物膜。由于 *scrC* 和 *scrAB* 位于同一操纵子,ScrA、ScrB 和 ScrC 总是同时存在,因此在生理条件下 ScrC 主要表现出 EAL 结构域的活性,参与降解 c-di-GMP 和抑制生物

膜形成。ScrG 是继 ScrC 之后,在 VP 菌中发现的第 2 个同时具有 GGDEF 和 EAL 结构域的蛋白^[10]。与 ScrC 一样,ScrG 也主要表现出 EAL 结构域活性,过表达 ScrG 能抑制 c-di-GMP 合成和 $\Delta scrABC$ 的表型特征。但是当 ScrG 的 EAL 结构域突变后,GGDEF 结构域也具有酶活性,但是其影响 c-di-GMP 代谢机制还不清楚^[10]。

本文中,我们利用 HPLC-MS/MS、褶皱和结晶紫染色实验证明了 AphA 能促进 VP 菌 c-di-GMP 的合成及生物膜形成,随后的实时定量 RT-PCR 和 LacZ 报告基因融合实验结果表明 AphA 是通过抑制 *scrG* 和 *scrABC* 的转录表达来促进 c-di-GMP 的合成,进而促进生物膜形成,这表明 Scr 通路调解 VP 菌生物膜形成并不是孤立于 QS 系统之外的。但是体外的 EMSA 实验结果显示 AphA 与 *scrABC* 或 *scrG* 的启动子区并无直接的相互作用,这表明 QS 系统与 Scr 通路可能还具有其他的联系方式。在低密度生长时,AphA 能抑制 *opaR* 的转录表达^[4],OpaR 是 QS 系统在高密度下的核心调控子,其识别基序为一个反向互补重复序列“TATTGATAAATTTATCAATA”^[3],而在 *scrABC* 和 *scrG* 的启动子区分别有一段碱基序列“TATAGATAAACTATTATTA”和“TAATGAGTATTCAGTCAATTA”与基序非常相似,这表明 OpaR 极可能对 *scrABC* 和 *scrG* 具有直接的调节作用。AphA 可能是通过抑制 OpaR 或者其他未知调控子的表达来间接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录表达,进而促进 VP 菌生物膜形成的,在后续的研究中我们将验证这一推测。

参考文献

- [1] Daniels NA , MacKinnon L , Bishop R , Altekruze S , Ray B , Hammond RM , Thompson S , Wilson S , Bean NH , Griffin PM , Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States ,1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases* ,2000 ,181(5) : 1661-1666.
- [2] Ng WL , Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Reviews Genetics* , 2009 , 43: 197-222.
- [3] Zhang YQ , Qiu YF , Tan YF , Guo ZB , Yang RF , Zhou DS. Transcriptional regulation of opaR , qrr2-4 and aphA by the master quorum-sensing regulator OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One* ,2012 ,7(4) : e34622.
- [4] Sun FJ , Zhang YQ , Wang L , Yan XJ , Tan YF , Guo ZB , Qiu JF , Yang RF , Xia PY , Zhou DS. Molecular Characterization of Direct Target Genes and cis-Acting Consensus Recognized by Quorum-Sensing Regulator AphA in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One* , 2012 , 7 (9) : e44210.
- [5] Henke JM , Bassler BL. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* ,2004 ,186(12) : 3794-3805.
- [6] Jaques S , McCarter LL. Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* , 2006 ,188(7) : 2625-2635.
- [7] Wang L , Ling Y , Jiang HW , Qiu YF , Qiu JF , Chen HP , Yang RF , Zhou DS. AphA is required for biofilm formation , motility , and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* ,2013 ,160(3) : 245-251.
- [8] Kalia D , Merey G , Nakayama S , Zheng Y , Zhou J , Luo YL , Guo M , Roembke BT , Sintim HO. Nucleotide , c-di-GMP , c-di-AMP , cGMP , cAMP , (p) ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *The Royal Society of Chemistry* ,2013 ,42(1) : 305-341.
- [9] Boles BR , McCarter LL. *Vibrio parahaemolyticus* scrABC , a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *Journal of Bacteriology* ,2002 , 184(21) : 5946-5954.
- [10] Kim YK , McCarter LL. ScrG , a GGDEF-EAL protein , participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* , 2007 , 189 (11) : 4094-4107.
- [11] Trimble MJ , McCarter LL. Bis-(3'-5') -cyclic dimeric GMP-linked quorum sensing controls swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,2011 ,108(44) : 18079-18084.
- [12] Ferreira RB , Antunes LC , Greenberg EP , McCarter LL. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *Journal of Bacteriology* , 2008 , 190 (3) : 851-860.
- [13] Li Y , Zhang Y , Yan X , Liu M , Yang R , Qiu J , Zhou D. Construction of biofilm formation related mutants in *Vibrio parahaemolyticus*. *Chinese Journal of Preventive Medicine* ,2013 ,47(5) : 439-443. (in Chinese)
李迎丽 , 张义全 , 闫小娟 , 刘梦颖 , 杨瑞馥 , 邱景富 , 周冬生. 副溶血弧菌生物膜相关基因突变株的构建. *中华预防医学杂志* ,2013 ,47(5) : 439-443.
- [14] Sun FJ , Gao H , Zhang YQ , Wang L , Fang N , Tan YF , Guo ZB , Xia PY , Zhou DS , Yang RF. Fur is a repressor of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *PLoS One* ,2012 ,7 (12) : e52392.
- [15] Gao H , Zhang YQ , Yang L , Liu X , Guo ZB , Tan YF , Han YP , Huang XX , Zhou DS , Yang RF. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology* , 2011 ,11: 40.
- [16] Zhang Y , Gao H , Wang L , Luo Z , Tan Y , Guo Z , Yang R , Zhou D. Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity. *Acta Microbiologica Sinica* ,2011 ,51(5) : 615-621. (in Chinese)
张义全 , 高鹤 , 王丽 , 罗张 , 谭亚芳 , 郭兆彪 , 杨瑞馥 , 周冬生. 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析. *微生物学报* ,2011 ,51(5) : 615-621.
- [17] Childers BM , Klose KE. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiology* ,2007 , 2(3) : 335-344.
- [18] Yang MH , Frey EM , Liu Z , Bishar R , Zhu J. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. *Infection and Immunity* ,2010 ,78 (2) : 697-703.

AphA is an activator of c-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*

Qian Huang^{1,2}, Yiquan Zhang², Xiaoxu Hu^{2,3}, Li Wang², Ruifu Yang², Qingping Zhong³, Dongsheng Zhou^{2*}, Xiaomin Li^{1*}

¹School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

³School of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract [Objective] To study the regulation mechanism of biofilm formation c-di-GMP synthesis by AphA in *Vibrio parahaemolyticus*, by using phenotypic and molecular biochemical experiments. **[Methods]** Colony morphology and crystal violet staining assays were used to analyze the phenotypic changes between the *aphA* null mutant ($\Delta aphA$) and the wide-type (WT) parent strain. The intracellular levels of c-di-GMP in the $\Delta aphA$ and WT strains were determined by a chromatography-coupled tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method. Total RNAs were extracted from $\Delta aphA$ and WT. Quantitative RT-PCR was applied to calculate the transcriptional variation of *scrABC* and *scrG* between $\Delta aphA$ and WT. The promoter-proximal regions of *scrABC* and *scrG* were cloned into the pHRP309 vector containing a promoterless *lacZ* gene, respectively. Then, each of the two recombinant LacZ reporter plasmids was transformed into $\Delta aphA$ and WT, respectively, to measure the promoter activity (the β -Galactosidase activity) of the target genes in $\Delta aphA$ and WT by using the β -Galactosidase Enzyme Assay System. The over-expressed His-AphA was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham). Then, the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to analyze the DNA-binding activity of His-AphA to *scrABC* and *scrG* promoter regions *in vitro*. **[Results]** The phenotypic experiments disclosed that AphA was an activator of c-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. The quantitative RT-PCR and LacZ fusion results showed that the transcription of *scrABC* and *scrG* was under negative control of AphA. However, the purified His-AphA could not bind to the upstream DNA regions of *scrABC* and *scrG*, as determined by EMSA. **[Conclusion]** The fact that AphA represses the transcription of *scrABC* and *scrG* will at least partially account for the positive regulation of c-di-GMP synthesis and biofilm formation by AphA in *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, biofilm formation, c-di-GMP, AphA, *scrABC*, *scrG*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170127)

* Corresponding author. Xiaomin Li, Tel: +86-23-68250635, E-mail: lixiaomin662@sina.com; Dongsheng Zhou, Tel: +86-10-66948594, E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

Received: 13 September 2013 / Revised: 24 December 2013