



## 霍乱弧菌DsbA蛋白通过增强MSHA的表达促进生物被膜的形成

薛媛媛<sup>1</sup>, 吴春琴<sup>1,2</sup>, 江秀军<sup>1</sup>, 甘超宁<sup>1</sup>, 宋厚辉<sup>1\*</sup>, 杨梦华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

<sup>2</sup> 温州科技职业学院动物科学系, 浙江 温州 325006

**摘要:** 【目的】阐明霍乱弧菌DsbA蛋白(VcDsbA)在生物被膜形成过程中的作用。【方法】采用Overlapping PCR的方法构建VcDsbA基因敲除质粒pMH524; 采用同源重组和基因克隆的方法对霍乱弧菌dsbA(vc0034)基因进行敲除和回补; 通过结晶紫染色实验, 比较野生株(WT)、dsbA突变株( $\Delta$ dsbA)和回补菌株(C $\Delta$ dsbA)的生物被膜形成差异; 用荧光素酶基因作为报告基因分析与生物被膜形成相关的甘露糖敏感血凝素纤毛合成蛋白(Mannose-sensitive hemagglutinin, pili biogenesis protein, MSHA)在霍乱弧菌WT、 $\Delta$ dsbA和C $\Delta$ dsbA中表达水平的区别。【结果】成功构建霍乱弧菌dsbA基因缺失突变株和回补株; 与WT相比,  $\Delta$ dsbA生物被膜形成能力显著下降, 且msh操纵子的表达水平显著降低。【结论】VcDsbA可能通过影响其它调控因子直接或间接增强霍乱弧菌MSHA的生物合成, 从而促进霍乱弧菌生物被膜的形成。本文为进一步研究DsbA在霍乱弧菌生物被膜形成中的调控机制奠定了基础。

**关键词:** 霍乱弧菌, 生物被膜, VcDsbA, MSHA

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)是一种引起霍乱的革兰氏阴性细菌。而霍乱是一种烈性肠道传染病, 被列为我国传染病防治法规定的2种甲类传染病之一, 也是国际3种检疫传染性疾病中危害最为严重的一种<sup>[1-2]</sup>。霍乱弧菌在水生环境中通常以形成生物被膜的方式与水生环境中的浮游生物共生。当霍乱弧菌进入动物或人体内后, 将会重新

调整毒力因子的表达来适应宿主肠道环境, 并在肠上皮细胞进行定殖、产生毒素, 最后通过形成生物被膜以腹泻的方式回到体外环境中<sup>[3-4]</sup>。有研究发现, 以生物被膜形式进入人体的霍乱弧菌致病性更强<sup>[5-6]</sup>。原因是生物被膜有利于霍乱弧菌抵抗胃酸屏障, 使得更多的细菌进入小肠, 引起腹泻<sup>[7-8]</sup>。因此, 生物被膜的形成对于霍乱弧菌的致

**基金项目:** 国家自然科学基金(31300082, 31470244); 浙江农林大学科研发展基金(2013FR012); 浙江省2015年度高校国内访问学者专业发展项目(178)

\*通信作者。宋厚辉, Tel: +86-571-63741392, songhh@zafu.edu.cn; 杨梦华, Tel: +86-571-63741731, E-mail: yangmh@zafu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-29; 修回日期: 2016-03-21; 网络出版日期: 2016-03-24

病性具有非常重要的作用<sup>[9]</sup>。经过长期的演化, 霍乱弧菌已经形成了一套精密的调节系统来调控体内毒力基因的表达和生物被膜的形成, 从而使其在不同的环境中, 以最适的状态适应环境的变化<sup>[10-11]</sup>。

已有研究表明, 存在于霍乱弧菌内膜和周质空间的二硫键氧化还原蛋白DsbA (Disulfide bond oxidoreductase)是一个至关重要的毒力因子<sup>[12]</sup>。DsbA是周质空间中主要的二硫键供体蛋白, 通过氧化还原反应, 把自身的二硫键转移到需要被折叠的底物蛋白中。同时, DsbA 中被还原的巯基又能被另外一个存在于细胞内膜中的蛋白DsbB氧化, 重新获得氧化态的二硫键, 从而形成一个完整的氧化还原链, 推动胞膜和周质空间中的蛋白正确地被折叠<sup>[13-14]</sup>。

研究发现, 在霍乱弧菌中 $vc0034$ 编码二硫键氧化还原酶(VcDsbA), 对毒力因子——毒素协同菌毛(TCP)的正确折叠具有重要作用,  $VcdsbA$ 缺失株不能在乳鼠肠道定殖<sup>[15]</sup>。霍乱弧菌的霍乱毒素也被证明是VcDsbA蛋白的催化底物<sup>[12]</sup>。因此, VcDsbA对于霍乱弧菌在肠道环境中的定殖以及致病性具有重要的作用。然而, VcDsbA对于霍乱弧菌在体外水生环境中的生存起到什么样的作用, 尚不清楚。因此, 在本研究中通过构建霍乱弧菌 $VcdsbA$ 缺失, 研究VcDsbA在霍乱弧菌体外生物被膜形成中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养条件:** 霍乱弧菌C6706 (野生型菌株, 由南京农业大学朱军老师实验室馈赠, 本实验室保存)、 $dsbA$ 突变株( $\Delta dsbA$ )、 $dsbA$ 回补菌株( $C\Delta dsbA$ )、*E. coli* DH5a、重组质粒 $VcdsbA::pWM91$ 和 $PmshA::pBBR-lux$  [ $mshA$  (VC0397 to VC0398)启动子区序列]均由本实验室

保存。所用到的菌株于37 °C在LB培养基中培养。抗生素使用浓度分别为: 氨苄青霉素(Ap) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 卡那霉素(Km) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 氯霉素(Cm) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.1.2 主要试剂:** PCR扩增酶: KOD-Plus-Neo, Taq酶等, 购自TOYOBO公司。限制性内切酶: *Nco* I-HF, *Hind* III-HF, *Eco*R I-HF, *Pst* I-HF等, 购自NEB公司。T4连接酶, DNA Ladder, Prestained Protein Ladder等均购自TaKaRa公司。质粒小提试剂盒, PCR产物或凝胶回收试剂盒, 购自天根生物。引物由苏州金唯智公司合成。

### 1.2 $VcdsbA(vc0034)$ 缺失株和回补株的构建

根据GenBank发布的基因序列, 截取 $VcdsbA$ 编码框上下游同源臂各1000 bp, 利用Vector NTI软件设计1对上下游引物, 引物由苏州金唯智生物技术有限公司合成。通过Overlapping PCR分子克隆技术将 $VcdsbA$ 编码框上下游同源臂插入到pWM91载体中构建重组质粒pMH524, 将含有自杀质粒pMH524的重组菌与霍乱弧菌C6706野生型进行接合, 在无抗性的培养基中进行培养进行同源重组, 得到 $VcdsbA$ 全编码框缺失突变株( $\Delta dsbA$ )。以缺失突变株为基础, 再用Vector NTI软件设计 $VcdsbA$ 基因1对上下游引物, PCR扩增 $VcdsbA$ 基因片段, 用pBAD24载体携带 $VcdsbA$ 序列通过电击转化转入缺失菌株感受态细胞<sup>[16]</sup>, 得到回补菌株( $C\Delta dsbA$ )。将得到的WT、 $\Delta dsbA$ 和 $C\Delta dsbA$  3种菌株分别作为模板进行PCR验证。为了进一步证实构建的这3个菌株中DsbA的表达情况, 采用Western blot 进行分析<sup>[17]</sup>。

### 1.3 测定野生株、 $dsbA$ 突变株和回补株的生长曲线

将构建成功的霍乱弧菌野生株(WT)、 $VcdsbA$ 突变株( $\Delta dsbA$ )和 $VcdsbA$ 回补株( $C\Delta dsbA$ )接种于200  $\mu\text{L}$ 相应抗性的LB液体培养基中(96孔板培养, 3个重复), 37 °C恒温培养箱中静置培养2 h, 每过1 h分别测定600 nm处OD值, 分析比较3种菌株生

长速度是否存在差异。

#### 1.4 生物被膜形成分析

将霍乱弧菌野生株(WT)、*VcdsbA* 突变株( $\Delta dsbA$ )和*VcdsbA*回补株(*C* $\Delta dsbA$ )接种于5 mL含有相应抗性的LB液体培养基中(试管培养, 3个重复), 37 °C恒温培养箱中静置培养48 h。小心倒出液体培养基, 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, 拍照。根据结晶紫染色的强弱判定生物被膜的形成量。用1 mL 70%乙醇溶液溶解附着于生物被膜上的染料, 用酶标仪(Synergy H1)测定595 nm吸光值并进行定量分析<sup>[18]</sup>。

#### 1.5 荧光素酶报告基因表达分析

为了研究*VcdsbA*对MSHA菌毛合成的影响, PCR扩增*mshA*(VC0397-VC0398)的启动子区, 并克隆入pBBR-lux质粒的荧光素酶(无启动子区)的上游, 得重组质粒<sup>[19]</sup>。将重组质粒分别转入WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 中, 得到含有MSHA荧光报告基因的*VcdsbA*不同突变株。将其分别稀释接种至96孔板, 在37 °C静置培养。用酶标仪分别检测600 nm和420 nm吸光值, 计算单位荧光值( $OD_{420}/OD_{600}$ )。比较WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 中的*msh*表达的差异。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 菌株的鉴定

将WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 菌株基因组分别作为模板, 用PCR扩增*dsbA*基因, 结果显示(图1-A), *C* $\Delta dsbA$ 与WT均扩增出约650 bp的条带, 与野生型*dsbA*基因大小一致, 而 $\Delta dsbA$ 只扩增出约270 bp的条带, 表明其*dsbA*基因已被缺失。通过Western blot分析WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 中DsbA蛋白的表达情况。在20 kDa处WT和*C* $\Delta dsbA$ 菌株均表达出VcDsbA蛋白, 而 $\Delta dsbA$ 菌株没有观察到VcDsbA蛋

白的表达(图1-B)。结果证明*VcdsbA*缺失株和回补株构建成功。Western blot 分析发现*VcdsbA*出现2条免疫印迹的条带, 这是因为当VcDsbA蛋白自身含有的2个半胱氨酸残基可以以二硫键(氧化态O)或自由巯基(还原态R)存在, 而这2种氧化还原状态使得蛋白在丙烯酰胺凝胶电泳中具有不一样的迁移率(图1-B)。另外, 在WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$  3种菌株生长曲线分析发现, *VcdsbA*缺失突变株和回补株的生长与野生型菌株一致(图2)。

### 2.2 DsbA蛋白影响霍乱弧菌生物被膜形成

为了研究VcDsbA缺失后对霍乱弧菌生物被膜形成能力的影响, 对WT、 $\Delta dsbA$ 和*C* $\Delta dsbA$ 进行了生物被膜结晶紫染色分析。 $\Delta dsbA$ 在试管壁形成生物被膜的量明显低于WT和*C* $\Delta dsbA$ (图3), 表明*VcdsbA*缺失后霍乱弧菌在气液表面的生物被膜

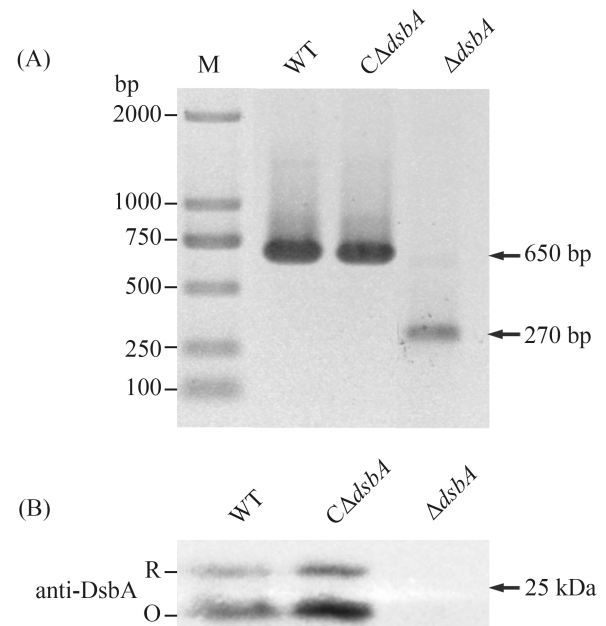


图 1. 霍乱弧菌*dsbA*的PCR扩增和DsbA表达分析

Figure 1. Amplification and expression of the *VcdsbA* (A) and DsbA (B). A: 1% agarose gel electrophoresis of the *VcdsbA* amplified from WT (wild-type),  $\Delta dsbA$  and *C* $\Delta dsbA$  genomic DNA. M: DNA marker; B: Western blot analysis of VcDsbA expression in WT,  $\Delta dsbA$  and *C* $\Delta dsbA$  strains.

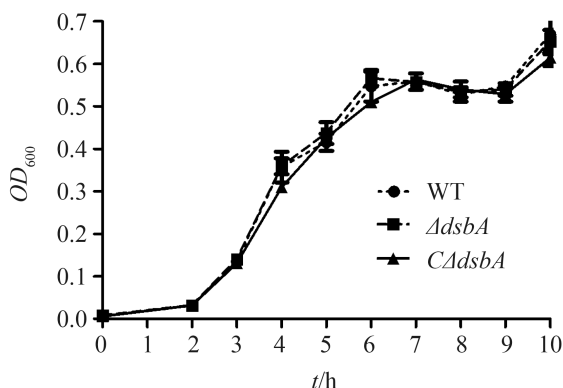


图 2. 霍乱弧菌生长曲线分析

Figure 2. Growth curve of WT,  $\Delta dsbA$  and  $C\Delta dsbA$  strains. The strains in the LB culture medium (pH 7.0), at 37 °C.

形成能力降低。对形成的生物被膜用乙醇溶解后,测定 $OD_{595}$ 。结果发现WT和 $C\Delta dsbA$ 的生物被膜形成量明显高于 $\Delta dsbA$ (图3)。有趣的是, $C\Delta dsbA$ 的生物被膜形成量比WT的还要高,这可能是由于在 $C\Delta dsbA$ 中, $Vc dsbA$ 是以质粒的形式在受阿拉伯糖诱导的启动子调控下表达,其表达量比野生型高,这也说明VcDsbA能促进霍乱弧菌生物被膜的形成。

### 2.3 VcDsbA促进MSHA的合成

上述实验表明VcDsbA能促进霍乱弧菌生物被膜形成,而MSHA是霍乱弧菌生物被膜形成的附着阶段所必需的<sup>[7]</sup>。Watnick等发现MSHA在非生命固体物质表面形成生物被膜起决定性作用<sup>[10]</sup>。因此,MSHA是霍乱弧菌黏附于浮游生物的重要决定因子<sup>[10]</sup>。为了验证VcDsbA是否通过影响MSHA的表达,从而影响生物被膜的形成,利用荧光素酶报告基因融合实验测定了在WT、 $\Delta dsbA$ 和 $C\Delta dsbA$ 菌株中 $msh$ 基因的表达情况。实验结果发现, $msh$ 基因在这3种菌株中的转录情况与这3种菌株生物被膜的形成情况相类似,在 $\Delta dsbA$ 中 $msh$ 启动子的单位荧光值明显低于WT和 $C\Delta dsbA$ 中的,而 $C\Delta dsbA$ 中 $msh$ 启动子的单位荧光值高于

野生株更明显高于 $\Delta dsbA$ (图4)。这说明VcDsbA能促进霍乱弧菌MSHA的合成。

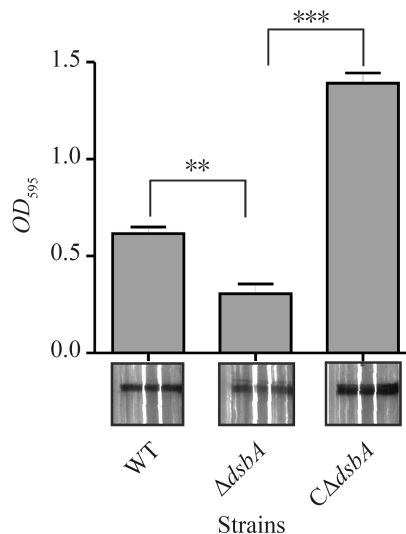


图 3. 霍乱弧菌生物被膜形成分析

Figure 3. Biofilm assay of WT,  $\Delta dsbA$  and  $C\Delta dsbA$ . Biofilms stained with crystal violet are shown above, and the biofilm-associated dye is quantitated below by extraction with 70% ethanol and measurement of the  $OD_{595}$  of the resulting solution. Experiments were done in triplicate. Error bars represent 1 standard deviation. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

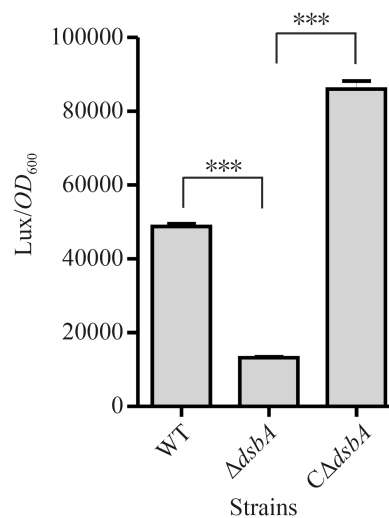


图 4. 霍乱弧菌 $msh$ 的表达分析

Figure 4.  $msh$  expression assay of WT,  $\Delta dsbA$  and  $C\Delta dsbA$ . Different *V. cholerae* strains containing P  $msh$ -luxCDABE plasmid were measured. Error bars indicate standard deviations. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 3 讨论

本研究发现, VcDsbA在体外环境中通过增强MSHA的表达, 从而促进生物被膜的形成。VcDsbA存在于霍乱弧菌周质空间, 帮助底物蛋白形成二硫键, 从而协助底物蛋白正确折叠<sup>[13]</sup>。VcDsbA不是转录因子, 不会通过直接激活基因的转录表达从而影响细菌的表型。然而, 那些直接参与调控基因表达的转录因子(如TcpP)<sup>[20-21]</sup>, 其功能的正确发挥却需要VcDsbA的作用。我们推测, 诱导MSHA表达的某个或某些转录调控因子需要VcDsbA帮助形成正确的二硫键, 从而发挥正确的生物学功能。当VcDsbA缺失后, 这些转录调控因子不能正常的发挥作用, 从而不能正常表达MSHA, 进而影响霍乱弧菌生物被膜的形成。早前的研究表明, VcDsbA帮助TcpP形成分子间的二硫键, 从而形成具有生物学活性的二聚体, 进而诱导产生下游的毒力调控因子ToxT<sup>[21]</sup>。ToxT除了诱导下游毒力基因的表达以外, 还特异性的抑制MSHA的表达, 从而帮助霍乱弧菌逃避宿主的天然免疫系统的攻击<sup>[21]</sup>。而当霍乱弧菌进入体外水生环境时, 毒素基因的表达受到抑制, 而细菌再利用VcDsbA协助诱导MSHA表达的调控因子正常发挥功能, 使得MSHA大量表达, 形成生物被膜, 从而更好的适应体外的生存环境。这表明无论是在体内的肠道环境还是在体外的水生环境, 霍乱弧菌都需要VcDsbA协助调控生物被膜的形成, 使其更好的在环境中生存。本研究的结果对于揭示VcDsbA在霍乱弧菌生物被膜形成中的作用机制具有重要生物学的意义。

本实验室是病原微生物二级实验室, 于2013年12月向浙江省杭州市农业局申报了动物病原微生物二级实验室备案(备案编号: 20130105012), 实验室配备生物安全柜及相关实验设备, 可进行涉及第一类、第二类动物病原微生物有关实验活动, 符合国家有关操作该病原的相关规定。

### 参考文献

- [1] Charles RC, Ryan ET. Cholera in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2011, 24(5): 472-477.
- [2] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya MK, Takeda T, Shimada T, Takeda Y, Deb BC. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *Journal of Infectious Diseases*, 1994, 169(5): 1029-1034.
- [3] Teschler JK, Zamorano-Sánchez D, Utada AS, Warner CJA, Wong GCL, Linington RG, Yildiz FH. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 255-268.
- [4] Kanjilal S, Citorik R, Larocque RC, Ramoni MF, Calderwood SB. A systems biology approach to modeling *Vibrio cholerae* gene expression under virulence-inducing conditions. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(17): 4300-4310.
- [5] Merrell DS, Butler SM, Qadri F, Dolganov NA, Alam A, Cohen MB, Calderwood SB, Schoolnik GK, Camilli A. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 2002, 417(6889): 642-645.
- [6] Lee SH, Hava DL, Waldor MK, Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*, 1999, 99(6): 625-634.
- [7] Paranjpye RN, Strom MS. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infection and Immunity*, 2005, 73(3): 1411-1422.
- [8] Jouravleva EA, McDonald GA, Marsh JW, Taylor RK, Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA. The *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* O139. *Infection and Immunity*, 1998, 66(6): 2535-2539.
- [9] Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(3): 586-595.
- [10] Watnick PI, Fullner KJ, Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(11): 3606-3609.

- [11] Yang MH, Frey E M, 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.
- [12] Walden PM, Heras B, Chen KE, Halili MA, Rimmer K, Sharma P, Scanlon MJ, Martin JL. The 1.2 resolution crystal structure of TcpG, the *Vibrio cholerae* DsbA disulfide-forming protein required for pilus and cholera-toxin production. *Acta Crystallographica Section D*, 2012, 68(10): 1290–1302.
- [13] Bader M, Muse W, Ballou DP, Gassner C, Bardwell JCA. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, 1999, 98(2): 217–227.
- [14] Kpadeh ZZ, Jameson-Lee M, Yeh AJ, Chertihin O, Shumilin IA, Dey R, Day SR, Hoffman PS. Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(8): 1825–1833.
- [15] Peek JA, Taylor RK. Characterization of a periplasmic thiol: disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(13): 6210–6214.
- [16] Liu X, Gao H, Yang L, Zhang YQ, Tan YF, Guo ZB, Huang XX, Yang RF, Zhou DS. Establishment of a suicide vector-based gene knockout method in studies of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2011, 19(3): 188–192. (in Chinese)
- 刘霞, 高鹤, 杨琳, 张义全, 谭亚芳, 郭兆彪, 黄新祥, 杨瑞馥, 周冬生. 副溶血性弧菌基因敲除方法的建立及应用. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 188–192.
- [17] Zhou YZ, Smith DR, Hufnagel DA, Chapman MR. Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli//Delcour AH. *Bacterial Cell Surfaces: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2013, 966: 53–75.
- [18] Kaplan JB, Ragnath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(7): 2633–2636.
- [19] Hammer BK, Bassler BL. 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.
- [20] Gardel CL, Mekalanos JJ. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infection and Immunity*, 1996, 64(6): 2246–2255.
- [21] Hsiao A, Liu Z, Joelsson A, Zhu J. *Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(39): 14542–14547.

# VcDsbA enhances biofilm formation by stimulating MSHA expression in *Vibrio cholerae*

Yuanyuan Xue<sup>1</sup>, Chunqin Wu<sup>1,2</sup>, Xiujun Jiang<sup>1</sup>, Chaoning Gan<sup>1</sup>, Houhui Song<sup>1\*</sup>, Menghua Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325006, Zhejiang Province, China

**Abstract:** [Objective] Biofilm plays an important role during the infection cycle of *Vibrio cholerae*. In this study, we try to demonstrate the role of VcDsbA in the biofilm formation of *V. cholerae*. [Methods] By making the *VcdsbA* in-frame knock-out construct, the *vcdsbA* null mutant ( $\Delta dsbA$ ) strain was obtained. And the complemented strain (*C $\Delta dsbA$* ) was constructed by transferring a plasmid-coded *VcdsbA* expressed under the control of arabinose to  $\Delta dsbA$  strain. Crystal violet staining assay was used to analyze the biofilm formation in the wild-type (WT),  $\Delta dsbA$  and *C $\Delta dsbA$*  strains. *V. cholerae* strains containing *msh* promoter *luxCDABE* transcriptional fusion were used to analyze the transcriptional level. [Results] The  $\Delta dsbA$  and *C $\Delta dsbA$*  strains were constructed successfully. Biofilm formation analysis shows that the ability of biofilm formation of  $\Delta dsbA$  was significantly reduced compared with WT, whereas *C $\Delta dsbA$*  could form even stronger biofilm than WT does. Luminescence expression by *Pmsh* shows that VcDsbA enhanced *msh* expression. VcDsbA enhances the biofilm formation of *V. cholerae* by involving in the regulation of *msh* expression level. VcDsbA up-regulates *msh* expression probably through helping the folding of a *msh* expression activator. [Conclusion] VcDsbA plays an important role in the biofilm formation of *V. cholerae*, which makes the bacteria better survive in their living niche.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, biofilm, VcDsbA, MSHA

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31300082, 31470244), by the Science Development Foundation of Zhejiang Agricultural and Forestry University (2013FR012) and by the National Visiting Scholar Development Program of Zhejiang 2015 (#178)

\*Corresponding author. Houhui Song, Tel: +86-571-63741392, E-mail: songhh@zafu.edu.cn; Menghua Yang, Tel: +86-571-63741731, E-mail: yangmh@zafu.edu.cn

Received: 29 January 2016; Revised: 21 March 2016; Published online: 24 March 2016