



副溶血弧菌 VP2918 基因缺失株的构建及功能研究

张海洋¹, 王权¹, 刘爽^{1,2}, 戚雪芹^{1,2}, 齐瑜¹, 刘鹏选^{1,2}, 李洋洋^{1,2}, 郭容¹,
方维焕³, 韩先干^{1*}, 蒋蔚^{1*}

¹ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

² 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

³ 浙江大学动物科学学院, 浙江 临安 311300

摘要:【目的】以副溶血弧菌 VP2918 为研究对象, 研究其对副溶血弧菌的生物学特性和致病性的影响。【方法】利用同源重组技术构建了 *vp2918* 基因的基因缺失株($\Delta vp2918$)和互补株($C\Delta vp2918$), 并对野生株、缺失株和互补株的细菌生长曲线、运动性、生物被膜形成能力、对 HeLa 细胞的黏附能力、细胞毒性、对小鼠的致死率和组织载菌量进行分析。【结果】缺失 *vp2918* 基因不影响副溶血弧菌的生长特性、运动性、生物被膜形成能力以及对 HeLa 细胞的黏附能力。但与野生株相比, $\Delta vp2918$ 对 HeLa 细胞的毒性作用显著降低; 感染 $\Delta vp2918$ 的小鼠症状明显减轻, 存活率更高; $\Delta vp2918$ 在小鼠脾脏和肝脏中的载菌量显著低于野生株, 互补株毒力基本恢复至野生株水平。【结论】*vp2918* 不参与副溶血弧菌的运动性和生物被膜形成能力等过程, 但与该菌的致病性相关, 为潜在的毒力因子。

关键词: 副溶血弧菌, *vp2918*, 基因缺失, 生物学功能, 致病性

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种革兰氏阴性菌, 广泛分布于海洋和河口环境^[1], 是沿海地区最主要的食源性病原菌之一^[2-4]。食用受该菌污染的海鲜通常会引起急性胃肠炎^[5], 主要症状包括腹泻、腹部绞痛、恶心、呕吐和低烧^[1]。在患者免疫力较差的情况下, 该菌会突破肠

道屏障, 进而引起具有较高致死率的败血症^[6]。此外, 有研究表明该菌可通过暴露在海水中的伤口建立感染, 随后导致严重的坏死性筋膜炎和败血症^[7]。该菌也是对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)的病原体, 对全球水产养殖业造成严重的威胁^[4]。副溶血性弧菌感染宿主细胞需要多种毒力因

基金项目: 国家自然科学基金(31702277); 上海市自然科学基金(17ZR1437200); 兵团财政科技计划(2020AB025-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020JB07)

*通信作者: 蒋蔚, Tel/Fax: +86-21-34293397, E-mail: jiangweijw99@163.com, jiangwei@shvri.ac.cn; 韩先干, E-mail: hanxgan@shvri.ac.cn

收稿日期: 2021-02-19; 修回日期: 2021-04-02; 网络出版日期: 2021-09-23

子, 包括粘附素、溶血素和分泌系统^[8]。T6SS 是近年来发现的与细菌生存和毒力密切相关的蛋白分泌系统, 其通过分泌的效应蛋白参与细菌在环境中的生存和对宿主的致病过程^[9-10]。T6SS 参与细胞黏附及毒性、抗吞噬、抗菌及破坏先天免疫系统过程, 在细菌致病过程中发挥重要作用^[11-12]。T6SS 包括 T6SS-1 和 T6SS-2, 其中 T6SS-2 存在于所有副溶血性弧菌菌株中^[13]。虽然目前关于副溶血弧菌 T6SS-2 的功能研究还比较少, 但是研究已提示 T6SS-2 参与副溶血弧菌细菌竞争、细胞黏附和细胞自噬的过程^[11-14]。本实验室前期通过构建 T6SS-2 的主要结构蛋白 DotU2 的基因缺失株和互补株, 发现缺失了 *dotU2* 基因的副溶血弧菌致病性明显下降^[15]。目前关于 T6SS-2 效应蛋白的研究还较少, 我们前期通过差异蛋白质组学技术比较分析野生株 SH112 和 $\Delta dotU2$ 的分泌差异蛋白(数据待发表), 拟筛选 T6SS-2 潜在的效应因子, 本研究从中选择其中的 VP2918 进行深入研究。

本研究首先通过构建 *vp2918* 基因缺失株及互补株, 比较野生株和缺失株在副溶血弧菌生长特性、运动性、生物被膜形成能力、对小鼠毒力及动物组织载菌量等生物学特性。研究结果为鉴定副溶血性弧菌致病性相关的毒力因子以及了解该

菌致病机制打下坚实的基础, 为该菌引起的疾病提供预防和治疗思路。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒与试剂

副溶血弧菌临床分离株 SH112 (*tdh+*, 血清型 O3:K6)、同源重组质粒 pYAK1 及互补质粒 pMMB207、大肠杆菌 HB101 (pRK2013) 和 CC118 λ pir, 均由本实验室保存。Prime STAR DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA Fragment Purification Kit 均购自 TaKaRa 公司; 细菌质粒提取试剂、细菌 RNA 提取试剂盒购自天根公司; DNA Marker、DNA Gel Purification Kit、2 \times PCR Pre Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Trizol[®]试剂购自 Invitrogen 公司, CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒购自 Promega 公司, DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司, 硫代硫酸盐、柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)购自广东环凯微生物公司; 氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kan)均为 Invitrogen 公司产品。

1.2 引物设计

缺失株、互补株引物设计是根据 GenBank 上副溶血性弧菌 RIMD2210633 标准株的 *vp2918* 基因序列, 用 Primer 5 软件设计引物(表 1), 划

表 1. 本试验所用引物

Table 1. The primers used for gene mutant strain and complement strain in this study

Primers	Sequences (5'→3')	PCR product/bp
<i>vp2918</i> -A	CGCG <u>GATCC</u> CTCCCACTTGTTTCATTG	666
<i>vp2918</i> -B	ACCAAGCTAGTCTAGCAACAGTGATGT	
<i>vp2918</i> C	CTAGACTAGCTTGGTCACGATGAAGAAAACG	547
<i>vp2918</i> -D	TCC <u>CCCGGG</u> TTCATCCGCACAGTAG	
<i>vp2918</i> -E	TGTTGTTGCAGGAAGTGA	Wide type: 1959
<i>vp2918</i> -F	GTGTAGCAACCTCTTTTCG	Mutant: 1422
<i>sacB</i> -F	ACGGCACTGTCGAAACTATA	600
<i>sacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT	
<i>vp2918</i> -PMMB-F	CGCG <u>GATCC</u> ATGACGTTCTGTATTGATGG	537
<i>vp2918</i> - PMMB-R	AAA <u>ACTGCA</u> GTTAGTTCCATGCCTGCTTAAG	

The underline indicates the enzyme digestion site.

线部分分别为 *Bam*H I、*Sma* I 和 *Pst* I 限制性内切酶的酶切位点。引物由上海生工科技有限公司合成。

1.3 基因缺失株和互补株的构建

参照文献[16]的方法,利用同源重组技术构建基因缺失株。以野生株 SH112 株基因组为模板,用上游片段引物(*vp2918-A/vp2918-B*)和下游片段引物(*vp2918-C/vp2918-D*)分别扩增缺失目的基因上、下游同源臂。再以上、下游同源臂的 PCR 产物为模板,用 *vp2918-A/vp2918-D* 引物进行融合 PCR,经酶切、连接后,将融合片段连接到 pYAK1 载体构建质粒 pYAK1-*vp2918*,转入宿主菌 CC118 λ pir 获得重组菌 pYAK1-*vp2918*-CC118 λ pir。以 pYAK1-*VP2918*-CC118 λ pir 为供体菌、SH112 株为受体菌、*pRK2013-HB101* 为辅助菌进行接合转导。用引物 *vp2918-E/F* 筛选、鉴定不含氯霉素抗性基因的缺失株,将成功缺失 *vp2918* 并经 *sacB-F/R* 扩增无目的条带的菌株命名为 Δ *vp2918*。

以 SH112 基因组为模板,以 *VP2918-pMMB-F/R* 为引物,PCR 扩增含 *vp2918* 基因的开放性阅读框(open reading frame, ORF)片段,回收 PCR 产物,对目的片段和 pMMB207 质粒进行双酶切、连接后转化感受态细胞 CC118 λ pir 中,于含 Cm 的 LB 平板上培养 8–12 h。挑取单克隆以 *VP2918-pMMB-F/R* 为引物,进行 PCR 鉴定,将成功构建的互补质粒命名为 pMMB-*vp2918*。含互补质粒 pMMB207-*vp2918* 的 CC118 λ pir 菌为供体菌,*pRK2013-HB101* 菌为辅助菌, Δ *vp2918* 缺失株为受体菌,同 1.3 方法,进行重组接合试验。在氯霉素的 TCBS 平板培养,挑取疑似阳性的单克隆菌株,以 *VP2918-pMMB-F/R* 为引物作 PCR 鉴定,阳性互补株命名为 $C\Delta$ *VP2918*。

1.4 生长曲线、运动性及生物被膜形成能力的测定

将野生株、缺失株和互补株在含有 3% NaCl 的 LB 培养基(pH 7.2)中培养,待菌液培养至对数生长期后,转接至 100 mL 含有 3% NaCl 的 LB 中,每隔 1 h 取各菌液 200 μ L 利用分光光度计测定各自的吸光度,并绘制各菌株在含 3% NaCl 的 LB 培养基中的生长曲线。

取 1 μ L 上述菌液于运动培养基(0.3%琼脂、3% NaCl-LB 半固体培养基)上,37 $^{\circ}$ C 恒温正置培养 4–5 h,观察细菌从中央向周围的泳动情况,并进行测量、拍照。

为评价上述菌株生物被膜形成情况,将 200 μ L ($OD_{600}=1.0$)菌液分别加至 96 孔板中,加入 3% NaCl-LB 液体培养基 200 μ L/孔作为阴性对照孔,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱静置培养 48 h 后弃去 96 孔板上的细菌培养物上清,并用无菌 1 \times PBS (pH 7.2)清洗 2 次除去浮游菌体,用 200 μ L 100%甲醇固定 15 min,空气自然风干。随后,加入 200 μ L 的 1%结晶紫染色 15 min,弃去多余结晶紫,用双蒸水(ddH₂O)冲洗 3 次,待完全干燥后,每孔加入 200 μ L 95%酒精溶液溶解结晶紫,10 min 后用多功能酶标仪测量 OD_{595} 。每种菌株重复接种 8 孔,各自取平均值,测定生物被膜的形成情况。

1.5 细胞黏附试验

用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞于 24 孔板内,待单层细胞布满孔底部 90%时,用 DMEM 洗涤 2 次后,待用。将野生株、缺失株和互补菌株培养至对数生长期,再用 DMEM 培养基洗 2 次并重悬,均以感染率(multiplicity of infection, MOI)为 10:1 (菌数:细胞数)感染 HeLa 细胞,每孔加 200 μ L,重复 3 个孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1 h。用

PBS 洗 1 次, 每孔加 100 μL 预冷的 0.5% (体积分数) TritonX-100 裂解细胞, 作用 10 min。最后用无菌的 PBS 倍比稀释裂解液, 并涂布于含有 3% NaCl 的 LB 琼脂平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 记录单菌落数, 计算各细菌株的相对黏附率。

1.6 细胞毒性测定

将 HeLa 细胞在 96 孔细胞培养板上培养, 用 PBS 洗涤 3 遍, 每孔加入 50 μL 不含酚红的 DMEM。将野生株、缺失株和互补菌株培养至对数生长期, 用 PBS 洗涤重悬后, 加入 50 μL 的菌液(MOI 分别为 1:1、1:10 和 1:100)至上述细胞孔中作为实验孔, 重复 6 个孔。同时设立 100 μL 的 DMEM 作为细胞自发对照孔, 取 90 μL DMEM 加 10 μL 裂解液作为最大释放孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中分别孵育 1.5 h。利用 CytoTox96 试剂盒检测细胞上清中乳酸脱氢酶(LDH)的释放, 参照说明书计算各细菌感染 HeLa 细胞后 LDH 释放的百分比。

1.7 小鼠存活实验和细菌组织载菌量测定

为了评价 *vp2918* 基因缺失对小鼠存活的影响, 参照 Hiyoshi 的方法^[17]选用 4 周龄的 ICR 小鼠平均分成 4 组(野生株 SH112, $\Delta vp2918$, $C\Delta vp2918$, 空白组), 每组 6 只。将各菌液用生理盐水洗 3 遍后重悬, 100 μL 腹腔接种到小鼠体内 (5×10^7 CFU/只)来测定存活曲线; 空白组注射相同剂量的无菌生理盐水。从接种后开始计时, 连续观察 48 h, 按孙氏改良寇式法计算 SH112、 $\Delta vp2918$ 、 $C\Delta vp2918$ 对小鼠的存活曲线。

将 4 周龄 ICR 小鼠分成 4 组(野生株 SH112, $\Delta vp2918$, $C\Delta vp2918$, 空白组), 每组 5 只, 各菌株腹腔注射 1×10^7 CFU/只, 空白组注射相同剂量的无菌生理盐水。15 h 时后, 小鼠眼球摘除采血致死, 并浸润于 75%酒精中, 无菌解剖取其组织

研磨。将研磨好的组织用 PBS 倍比稀释 10^0 – 10^4 倍, 取 100 μL 接种到 TCBS 琼脂平板中, 次日对平板中的副溶血弧菌数量进行计数, 计算各菌株在 ICR 小鼠肝组织、脾组织中的细菌载量。

1.8 数据分析

实验数据采用 GraphPad Prism8 软件进行统计分析。单因素方差分析(one-way ANOVA)用于分析运动性和生物膜形成、细胞黏附、组织载菌量测定的数据, 双因素方差分析(two-way ANOVA)分析细胞毒性测定数据, 用平均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示, $P < 0.05$ 认为变化显著。使用非参数 Mann-Whitney U 检验分析小鼠存活实验。

2 结果和分析

2.1 *VP2918* 基因缺失株及互补株鉴定

对野生株 SH112、 $\Delta vp2918$ 、 $C\Delta vp2918$ 进行 PCR 鉴定, 结果见图 1。以野生株 DNA 为模板, 引物 *vp2918*-E/F 可以扩增到大小约为 1959 bp 的条带(泳道 1), 以缺失株 $\Delta vp2918$ 的 DNA 为模板扩增则只能获得 1422 bp 大小的条带(泳道 2); 进一步使用针对 *vp2918* 的特异性引物 *VP2918*-pMMB-F/R 进行 PCR 检测, 结果表明野生株能够扩增到目的条带(泳道 4), 而缺失株对应泳道(泳道 5)未见相应条带, 表明 $\Delta vp2918$ 缺失株构建成功。以 SH112 的 DNA 为模板, 用引物 *vp2918*-E/F 能扩增到 1422 bp 的短条带(泳道 3), 用 *VP2918*-pMMB-F/R 引物能扩增到 *vp2918* 目的基因(泳道 6), 表明互补株 $C\Delta vp2918$ 构建成功。

2.2 生长曲线、运动性及生物被膜形成能力的测定

野生株 SH112、缺失株 $\Delta vp2918$ 及互补株 $C\Delta vp2918$ 的生长曲线(图 2)、运动性(图 3-A, 3-B)

和生物被膜形成能力(图 4-A, 4-B)检测结果表明, 各菌株间无显著差异($P>0.05$), 表明 *vp2918* 的缺失不影响副溶血弧菌的生长能力、运动性及生物被膜形成能力。

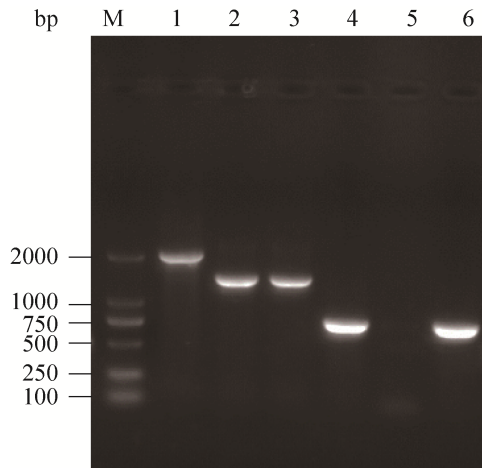


图 1. *VP2918* 基因缺失株和互补株的 PCR 鉴定

Figure 1. Identification of *vp2918* gene mutant strain and complement strain of *V. parahaemolyticus* by PCR. M: DL2000; 1-3: SH112 DNA, *vp2918* mutant DNA and the DNA of positive complement strain were amplified with primer *vp2918*-E/F; 4-6: SH112 DNA, *vp2918* mutant DNA and the DNA of positive complement strain were amplified with primer *vp2918*-pMMB-F/R.

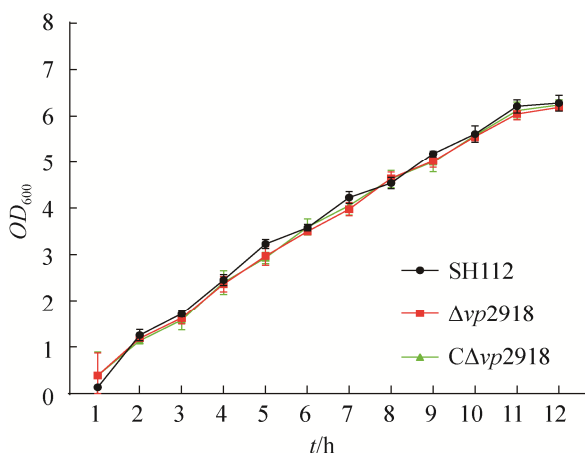


图 2. 各菌株生长曲线测定

Figure 2. Growth curve detection of SH112, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$ strains.

(A)



(B)

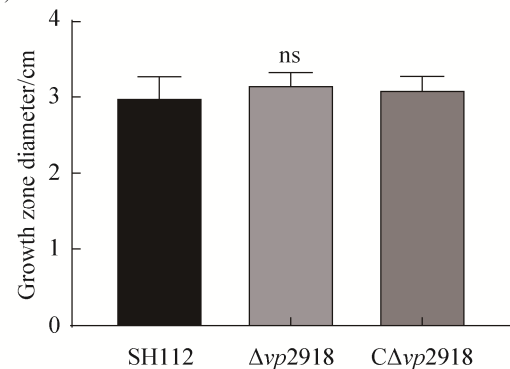


图 3 运动性分析

Figure 3. Motility analysis of SH112, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$ strains. A: The swimming patterns of three strains were exhibited in 0.3% agar-3% NaCl-LB plates for 4 h; B: Motility zone diameter (cm) was used to compare the differences in the movement of the strains. ns: $P>0.05$.

2.3 对 HeLa 细胞的黏附能力

对 HeLa 细胞的黏附结果表明, 与野生株比较, 缺失株 $\Delta vp2918$ 的黏附能力没有明显差异(图 5), 表明缺失 *vp2918* 基因并不影响副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附能力($P>0.05$)。

2.4 细胞毒性测定

如图 6 所示, 缺失株与野生株对细胞的毒性差异显著($*P<0.05$), 推测 *VP2918* 在副溶血弧菌对宿主细胞感染过程中发挥重要作用。

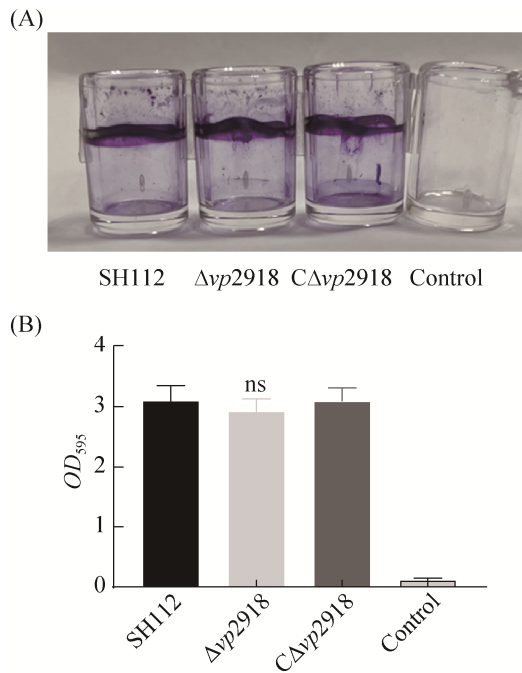


图 4. 各菌株生物被膜形成能力比较

Figure 4. Biofilm formation ability of SH112, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$ strains. A: The strains were grown in LBN at room temperature, and crystal violet staining was performed at 48 hours; B: Data and error bars were showed to assess biofilm biomass on glass from three independent experiments, each with three replications. ns: $P>0.05$.

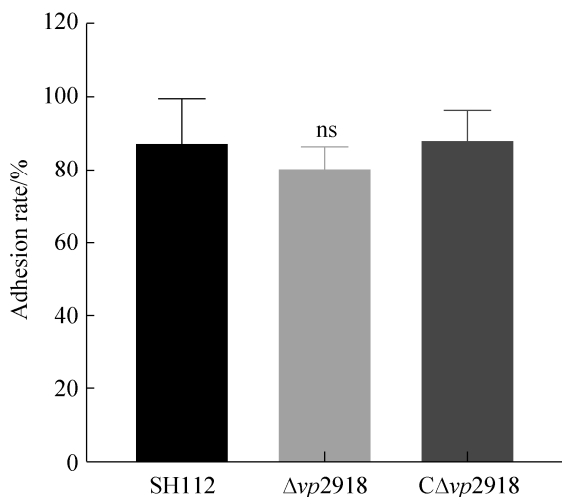


图 5. 各菌株对 HeLa 细胞的黏附作用

Figure 5. Adhesion to HeLa cell monolayers of the strains. ns: $P>0.05$.

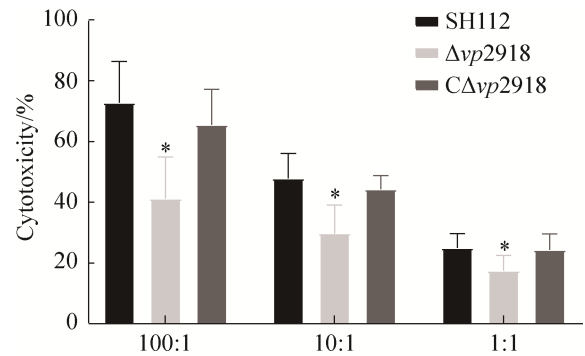


图 6. 各菌株对 HeLa 细胞的细胞毒性影响

Figure 6. Cytotoxic effects of the SH112, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$ strains on HeLa cells. *: $P<0.05$.

2.5 小鼠的存活实验

将各菌株以每只 5×10^7 CFU 的量腹腔注射试验组小鼠, 结果表明(图 7), SH112、 $\Delta vp2918$ 和 $C\Delta vp2918$ 对小鼠的致死率分别为 100%、67%和 83%。感染野生株小鼠的死亡时间主要集中在 10–24 h, 野生株攻毒 5 h 后的小鼠表现出扎堆颤抖、不喜动的特征, 在 10–20 h 后出现眼球干燥、行动不协调、粪便黏稠等临床症状, 并很快死亡; 缺失株感染组小鼠集中发病时间在 12–24 h 内, 与野生株感染组相比临床症状相对较轻; 而互补株

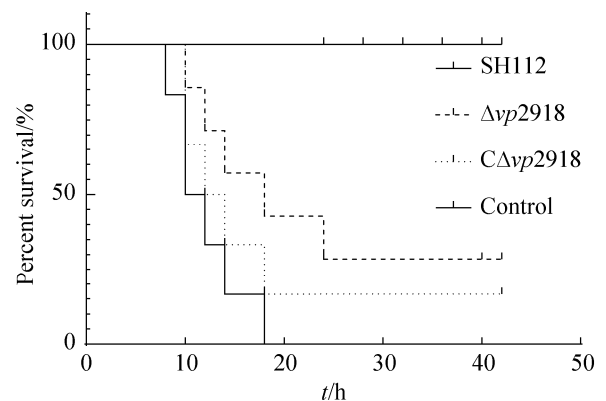


图 7. 各菌株攻毒 ICR 小鼠后的存活率

Figure 7. The survival rate of ICR mice infected with the SH112, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$ strains.

CΔvp2918 恢复了大部分野生株的毒力, 小鼠具有较明显的临床症状。以上结果表明 *vp2918* 基因缺失后能降低副溶血弧菌对小鼠的毒性作用。

2.6 细菌组织载菌量实验

以每只 1×10^7 CFU 的量感染 ICR 小鼠 15 h 时

检测细菌组织载量, 结果显示(图 8), 感染 15 h 后缺失株在心脏、脾脏及部分肝组织的细菌定殖数量明显低于野生株(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。互补株定植能力基本恢复到野生株水平, 表明缺失 *vp2918* 降低 VP 在小鼠组织中的定殖能力。

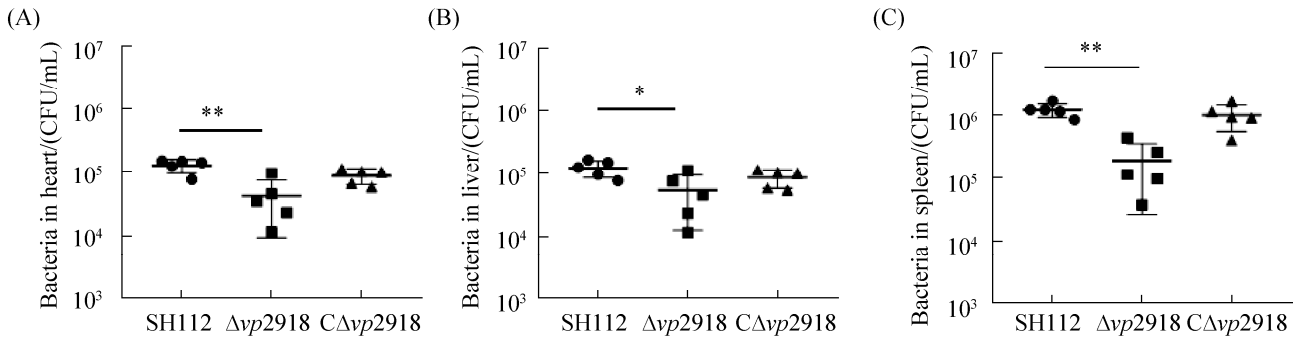


图 8. 各菌株在小鼠心脏(A)、肝(B)和脾组织(C)中的细菌载量

Figure 8. Bacterial loads in heart (A), liver (B) and spleen (C) of infected mice.

3 讨论

副溶血性弧菌不仅严重影响水产养殖业的健康发展, 还是人类健康的重大威胁, 对该菌致病机制的研究非常重要。副溶血弧菌能够在全世界范围内流行, 与毒力因子的作用密切相关^[18-20]。已有报告表明副溶血弧菌 T6SS-2 参与细胞黏附和细胞自噬等过程^[11-12], 与细菌毒力相关。

本实验室前期通过差异蛋白质组学技术比较分析野生株 SH112 和 T6SS-2 主要结构基因缺失株 $\Delta dotU2$ 的差异分泌蛋白, 选择了其中一个编码未知蛋白的基因 *vp2918* 进行深入研究, 经在线网站 TMHMM Server v. 2.0 预测, 该基因是一个含有跨膜区域的膜蛋白。膜蛋白位于细菌病原表面, 与外界具有广泛接触的机会, 在微生物的许多关键生物学功能中发挥重要作用^[21]。本研究构建了 *vp2918* 基因缺失株和互补株, 并比较野生株和缺

失株的生物学特性和致病性的差异。细菌的运动性和生物被膜可增强菌体对不利因素的抵抗能力, 趋向有益刺激或逃避有害刺激^[22-23], 研究结果发现缺失 *vp2918* 基因不影响副溶血性弧菌的生长特性, 同时也不影响副溶血性弧菌运动性和生物被膜的形成能力, 提示 *vp2918* 基因可能不参与副溶血弧菌在环境中的生存能力。

黏附、定殖或入侵宿主细胞是细菌感染宿主的重要步骤, 与细菌的致病机制密切相关^[8,24-25]。本研究发现 VP2918 不参与副溶血弧菌对 HeLa 细胞黏附过程, 但是在不同感染比下(图 6), *vp2918* 基因缺失株对 HeLa 细胞的毒性作用均显著低于野生株($P < 0.05$), 证明 VP2918 与副溶血弧菌对 HeLa 细胞的毒性作用密切相关。细菌对细胞产生毒性作用有利于其在宿主体内定殖和侵袭, 进而产生致病作用。我们通过对小鼠存活率试验发现, 感染 *vp2918* 基因缺失株小鼠表现的症状比野生株

明显较轻,且死亡率(67%)低于野生株(100%)。小鼠体内细菌载量结果进一步表明, *vp2918* 基因缺失导致细菌在小鼠组织中的定殖能力显著低于野生株。通过以上实验我们推测,缺失 *vp2918* 基因降低了副溶血弧菌对宿主细胞的毒力,进而易被宿主清除,所以在组织中的定殖能力显著降低,进而使得感染小鼠存活率高于野生株和互补株。革兰氏阴性菌的膜蛋白在细菌定殖和侵袭等致病过程中扮演重要角色^[26-28]。如铜绿假单胞菌 OprG 蛋白是 OmpW 家族的成员之一,在细菌感染早期参与病原破坏宿主细胞的过程,缺失该基因后铜绿假单胞菌对细胞的毒性作用显著降低^[29]。本实验室前期研究也发现缺失外膜蛋白 OmpA 基因的副溶血弧菌的毒力也明显下降^[30],而且小鼠免疫保护实验结果表明该蛋白可提供一定的免疫保护作用^[31]。

本研究通过对 *vp2918* 基因缺失株进行生物学特性和致病性分析,表明 *vp2918* 基因缺失对副溶血弧菌的基本生物学特性无显著影响,但参与细胞毒性和组织定殖等致病过程,从而影响细菌对小鼠的毒力作用,在副溶血弧菌的致病过程中发挥一定作用。本研究不仅可为副溶血弧菌减毒疫苗开发奠定基础,也可为探讨副溶血性弧菌致病作用的分子机制提供参考。

参 考 文 献

- [1] Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 705.
- [2] Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food Microbiology*, 2016, 57: 128–134.
- [3] Farisa Banu S, Rubini D, Murugan R, Vadivel V, Gowrishankar S, Pandian SK, Nithyanand P. Exploring the antivirulent and sea food preservation efficacy of essential oil combined with DNase on *Vibrio parahaemolyticus*. *LWT*, 2018, 95: 107–115.
- [4] Lei T, Jiang FF, He M, Zhang JM, Zeng HY, Chen MT, Pang R, Wu S, Wei L, Wang J, Ding Y, Wu QP. Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of fluoroquinolone resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different types of food samples in China. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 317: 108461.
- [5] O'Boyle N, Boyd A. Manipulation of intestinal epithelial cell function by the cell contact-dependent type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 3: 114.
- [6] 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.
- [7] Tena D, Arias M, Álvarez BT, Mauleón C, Jiménez MP, Bisquert J. Fulminant necrotizing fasciitis due to *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(Pt 2): 235–238.
- [8] Ghenem L, Elhadi N, Alzahrani F, Nishibuchi M. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on distribution, pathogenesis, virulence determinants and epidemiology. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*, 2017, 5(2): 93–103.
- [9] Alcoforado Diniz J, Liu YC, Coulthurst SJ. Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(12): 1742–1751.
- [10] Tang JY, Bullen NP, Ahmad S, Whitney JC. Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(5): 1504–1514.
- [11] Yu Y, Fang LH, Zhang Y, Sheng HX, Fang WH. VgrG2 of type VI secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* induces autophagy in macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 168.
- [12] Yu Y, Yang H, Li J, Zhang PP, Wu BB, Zhu BL, Zhang Y, Fang WH. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(10): 827–835.
- [13] Li P, Kinch LN, Ray A, Dalia AB, Cong Q, Nunan LM, Camilli A, Grishin NV, Salomon D, Orth K. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio*

- parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00737–e00717.
- [14] Wang L, Zhou DS, Mao PY, Zhang YQ, Hou J, Hu Y, Li J, Hou SJ, Yang RF, Wang RH, Qiu JF. Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e73363.
- [15] 白雪瑞. VI 型分泌系统 2 及 III 型分泌系统对副溶血弧菌生物学特性和致病性的影响. 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- [16] Bai XR, Wang Q, Ling J, Wan Y, Chen YJ, Fang WH, Sun WD, Jiang A. Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS₁ and T3SS₂ in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(3): 455–466. (in Chinese)
白雪瑞, 王权, 凌娇, 万莹, 陈永军, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. T3SS₁ 和 T3SS₂ 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致病性的比较. *微生物学报*, 2018, 58(3): 455–466.
- [17] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772–1780.
- [18] Jiang YH, Chu YB, Xie GS, Li FL, Wang LZ, Huang J, Zhai YX, Yao L. Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 290: 116–124.
- [19] Li YP, Xie TF, Pang R, Wu QP, Zhang JM, Lei T, Xue L, Wu HM, Wang J, Ding Y, Chen MT, Wu S, Zeng HY, Zhang YX, Wei XH. Food-borne *Vibrio parahaemolyticus* in China: prevalence, antibiotic susceptibility, and genetic characterization. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1670.
- [20] Chaban B, Hughes HV, Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 46: 91–103.
- [21] Corbeil LB. *Histophilus somni* surface proteins. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2015: 89–107.
- [22] Han DS, Yu F, Chen X, Zhang R, Li JM. Challenges in *Vibrio parahaemolyticus* infections caused by the pandemic clone. *Future Microbiology*, 2019, 14: 437–450.
- [23] Santhakumari S, Nilofernisha NM, Ponraj JG, Pandian SK, Ravi AV. *In vitro* and *in vivo* exploration of palmitic acid from *Synechococcus elongatus* as an antibiofilm agent on the survival of *Artemia franciscana* against virulent vibrios. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 150: 21–31.
- [24] Yang H, de Souza Santos M, Lee J, Law HT, Chimalapati S, Verdu EF, Orth K, Vallance BA. A novel mouse model of enteric *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals that the type III secretion system 2 effector VopC plays a key role in tissue invasion and gastroenteritis. *mBio*, 2019, 10(6): e02608–19.
- [25] Zhang LL, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 70–77.
- [26] Zhou Y, Zhou J, Wang D, Gao Q, Mu X, Gao S, Liu X. Evaluation of ompA and pgtE genes in determining pathogenicity in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *The Veterinary Journal*, 2016, 218: 19–26.
- [27] Hejair HMA, Zhu YC, Ma JL, Zhang Y, Pan ZH, Zhang W, Yao HC. Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 29–37.
- [28] Maiti B, Dubey S, Munang'Andu HM, Karunasagar I, Karunasagar I, Evensen Ø. Application of outer membrane protein-based vaccines against major bacterial fish pathogens in India. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1362.
- [29] McPhee JB, Tamber S, Bains M, Maier E, Gellatly S, Lo A, Benz R, Hancock REW. The major outer membrane protein OprG of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to cytotoxicity and forms an anaerobically regulated, cation-selective channel. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, (2): 241–247.
- [30] Bai XR, Wang Q, Chen YJ, Wan Y, Ling J, Wang YL, Jiang W. Biological characteristics and pathogenicity of an ompA mutant of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 902–910. (in Chinese)
白雪瑞, 王权, 陈永军, 万莹, 凌娇, 王亚磊, 蒋蔚. 副溶血弧菌 ompA 基因缺失株的生物学特性及致病性分析. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 902–910.
- [31] Wang YL, Wang Q, Bai XR, Bie CN, Chen ZG, Han XG, Jiang W. Expression and immunological characterization of the OmpA protein from *Vibrio parahaemolyticus* strain SH112. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(10): 1937–1947. (in Chinese)
王亚磊, 王权, 白雪瑞, 别闯南, 陈兆国, 韩先干, 蒋蔚. 副溶血弧菌 SH112 株 OmpA 蛋白的高效表达及免疫学特性. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1937–1947.

Gene deletion and functional analysis of *vp2918* gene in *Vibrio parahaemolyticus*

Haiyang Zhang¹, Quan Wang¹, Shuang Liu^{1,2}, Xueqin Qi^{1,2}, Yu Qi¹, Pengxuan Liu^{1,2}, Yangyang Li^{1,2}, Rong Guo¹, Weihuan Fang³, Xian'gan Han^{1*}, Wei Jiang^{1*}

¹ Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China

² College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

³ College of Animal Science, Zhejiang University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] By using comparative proteomics, we identified several potential T6SS-2 effectors, including VP2918. The aim of this study is to elucidate the role of VP2918 in biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] The *vp2918* gene deletion mutant strain ($\Delta vp2918$) and complementary strain ($C\Delta vp2918$) were constructed via homologous recombination technology. Subsequently, the growth characteristics, biofilm formation ability, motility, adhesion and cytotoxicity to HeLa cells, and mice lethality rate, bacterial colonization were analyzed in the wild-type strain (WT), $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$. [Results] The biological characteristics analysis *in vitro* showed that there was no significant difference in growth curve, motility, biofilm formation ability and adhesion ability to HeLa cells among WT, $\Delta vp2918$ and $C\Delta vp2918$. However, compared with WT, the toxicity of $\Delta vp2918$ to HeLa cells was significantly weakened. Animal experimental results showed that compared with the mice infected with WT, the mice infected with $\Delta vp2918$ showed slighter symptoms and higher survival rate. The bacterial loads of $\Delta vp2918$ were significantly lower than that of WT in spleen and liver of infected mice, whereas the complementation strain restored the virulence to resemble that of WT. [Conclusion] The VP2918 was not associated with the motility and biofilm formation ability, but it was a potential virulence factor and associated with the pathogenic of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *vp2918*, gene mutant, biological characteristics, pathogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31702277), by the Shanghai Natural Science Foundation of China (17ZR1437200), by the Key Scientific and Technological Project of Xinjiang Production & Construction Corps (2020AB025-03) and by the Basic Foundation for Scientific Research of State-level Public Welfare Institutes of China (2020JB07)

*Corresponding authors. Wei Jiang, Tel/Fax: +86-21-34293397, E-mail: jiangweijw99@163.com, jiangwei@shvri.ac.cn; Xianghan Han, E-mail: hanxgan@shvri.ac.cn

Received: 19 February 2021; Revised: 2 April 2021; Published online: 23 September 2021