



# 组氨酸氨解酶 HutH 对副溶血弧菌生物学特性及致病性的影响

刘鹏选<sup>1,2</sup>, 白雪瑞<sup>3</sup>, 张小芸<sup>2</sup>, 齐瑜<sup>2</sup>, 王权<sup>2</sup>, 方维焕<sup>4</sup>, 孙卫东<sup>1\*</sup>, 蒋蔚<sup>2\*</sup>

- 1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095
- 2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241
- 3 上海市农业学校动物科学技术系, 上海 201600
- 4 浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

刘鹏选, 白雪瑞, 张小芸, 齐瑜, 王权, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. 组氨酸氨解酶 HutH 对副溶血弧菌生物学特性及致病性的影响. 微生物学报, 2022, 62(7): 2530–2542.

Liu Pengxuan, Bai Xuerui, Zhang Xiaoyun, Qi Yu, Wang Quan, Fang Weihuan, Sun Weidong, Jiang Wei. Effects of histidine aminonolysis-lyase on the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2530–2542.

**摘要:** 组氨酸氨解酶(HutH)作为组氨酸代谢通路上的第一个代谢酶, 控制细菌内部组氨酸的代谢。HutH 在多数细菌中高度保守, 参与细菌的能量代谢平衡。【目的】选取 HutH 作为研究对象, 探究其对副溶血弧菌生物学特性以及致病性的影响。【方法】利用同源重组的方法构建缺失株  $\Delta hutH$  和回补株  $C\Delta hutH$ 。研究 HutH 对副溶血弧菌生长特性、组氨酸利用能力、组氨酸代谢相关基因表达水平、运动性、生物被膜、环境耐受、细胞毒性以及对小鼠毒力的影响。【结果】与野生型菌株相比, *hutH* 基因缺失不影响副溶血弧菌的生长特性、耐酸耐碱能力、耐盐能力和群集运动。但  $\Delta hutH$  在组氨酸作为唯一碳源的 M9 极限培养基中生长受到显著抑制。另外, 我们证实, *hutH* 基因缺失使组氨酸代谢操纵子内的相关基因转录水平显著下降, 基因 *VP0889* 的表达水平提高。*hutH* 基因缺失导致副溶血弧菌生物被膜形成能力下降、泳动能力下降、对 HeLa 细胞的毒性降低、对 ICR 小鼠的致死率显著降低。【结论】本研究表明, *hutH* 基因缺失影响副溶血弧菌代谢

**基金项目:** 上海市自然科学基金(21ZR1477000); 国家自然科学基金(31702277); 兵团财政科技计划项目(2020AB025-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020JB07)

Supported by the Shanghai Natural Science Foundation of China (21ZR1477000), by the National Natural Science Foundation of China (31702277), 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 author. Tel/Fax: +86-21-34293397; E-mail: JIANG Wei, jiangweijw99@163.com, SUN Weidong, swd100@njau.edu.cn

Received: 5 October 2021; Revised: 7 January 2022; Published online: 8 March 2022

组氨酸的能力, 而且首次证实, HutH 在副溶血弧菌的生物被膜形成、运动性和对小鼠毒力等方面具有重要作用, 为从调控组氨酸代谢途径来进行细菌防控提供思路。

**关键词:** 副溶血弧菌; 组氨酸氨解酶 HutH; 生物被膜; 运动性; 致病性

## Effects of histidine aminonia-lyase on the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Pengxuan<sup>1,2</sup>, BAI Xuerui<sup>3</sup>, ZHANG Xiaoyun<sup>2</sup>, QI Yu<sup>2</sup>, WANG Quan<sup>2</sup>,  
FANG Weihuan<sup>4</sup>, SUN Weidong<sup>1\*</sup>, JIANG Wei<sup>2\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

3 Department of Animal Science and Technology, Shanghai Agriculture School, Shanghai 201600, China

4 College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

**Abstract:** As the first metabolic enzyme in the histidine metabolic pathway, histidine aminonia-lyase (HutH) controls the metabolism of histidine in bacteria. HutH is highly conserved in most bacteria and participates in the balance of bacterial energy metabolism. **[Objective]** To investigate the effects of HutH on the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. **[Methods]** The *hutH* gene-deleted mutant  $\Delta hutH$  and the complementary strain  $C\Delta hutH$  were constructed by homologous recombination. The effects of HutH on the growth characteristics, histidine utilization ability, histidine metabolism related gene expression level, motility, biofilm, environmental tolerance, cytotoxicity and mouse toxicity of *V. parahaemolyticus* were researched. **[Results]** Compared with wild strains, the deletion of *hutH* gene did not affect the growth characteristics, acid and alkali tolerance, salt tolerance and swarming ability of *V. parahaemolyticus*. But the growth of  $\Delta hutH$  was significantly inhibited in M9-limited medium with histidine as the only carbon source. In addition, we confirmed that the deletion of *hutH* significantly decreased the transcription level of histidine metabolism related genes in *hut* operon and increased the expression level of the *VP0889* gene. The deletion of *hutH* resulted in the decrease in biofilm formation ability, swimming ability, toxicity to HeLa cells and mortality to institution of cancer research female mice. **[Conclusion]** This study shows that the deletion of *hutH* affects the ability of *V. parahaemolyticus* to metabolize histidine, and it is the first time to confirm that HutH plays an important role in the biofilm formation, motility and toxicity toward mice of *V. parahaemolyticus*, which provides ideas for bacterial prevention and control by regulating histidine metabolism.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; histidine aminonia-lyase; biofilm; motility; pathogenicity

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为革兰氏阴性嗜盐杆菌, 能感染不同类型的水生动物<sup>[1]</sup>。多数副溶血弧菌分离株对人类具有致病性, 人类感染副溶血弧菌多数是由于进食未消

毒完全的海鲜而引起, 感染后出现水样腹泻、腹痛、呕吐、头疼等症状, 严重情况下, 经伤口感染该菌会产生败血症, 进而导致死亡<sup>[2-4]</sup>。自从副溶血弧菌于 1950 年在日本被发现后, 其

已经成为全世界范围内主要的海鲜源性致病菌之一<sup>[5]</sup>，因此，研究副溶血弧菌的环境适应性、致病性以及防治策略愈发重要。

细菌在适应不同环境的过程中，如何快速地获取营养物质对其至关重要。而营养物质中，氨基酸作为一种重要的能量来源物质，在细菌环境适应与致病过程中发挥重要作用。已有研究表明，在氨基酸代谢过程中，细菌通过相关调控因子控制不同的基因表达，使细菌快速适应环境变化。其中，GntR 转录调控因子大家族主要包括 FadR、YtrA、MocR 和 HutC 4 个亚家族<sup>[6]</sup>，而转录调控因子 HutC 调控的组氨酸代谢 (histidine utilization, hut) 途径在绝大多数细菌中高度保守<sup>[7]</sup>，通过调控组氨酸代谢相关基因的表达，利于细菌在不同的环境中获得能量进而生存。组氨酸代谢的前 3 个反应过程一般相同，即组氨酸氨解酶(histidine aminonia-lyase, HutH)降解组氨酸氨基生成尿刊酸(urocanate)；尿刊酸在尿刊酸水合酶(urocanate hydratse, HutU)的作用下生成咪唑-4-酮-5-丙酸(imidazolone propionate, IP)；最后一步生成亚胺甲基谷氨酸(formiminoglutamate, FIG)。细菌再通过代谢 FIG 产生谷氨酸盐，谷氨酸盐进一步代谢为各种碳源，为细菌供能<sup>[8]</sup>。

目前，已有研究表明组氨酸代谢除为细菌提供能量外，与细菌的生存和毒力也具有密切关系。胞内寄生菌流产布鲁氏菌的 HutC 直接调控黏附因子和四型分泌系统等相关毒力因子表达<sup>[9]</sup>；铜绿假单胞菌中组氨酸代谢可能通过调控三型分泌系统进而影响细胞毒性<sup>[10]</sup>；假结核耶尔森氏菌的组氨酸代谢与生物被膜形成具有密切的联系<sup>[11]</sup>。然而，关于副溶血弧菌组氨酸代谢与细菌毒力之间的关系尚未见报道。

本实验室前期研究显示副溶血弧菌 GntR 家族转录调控因子 *hutC* 的基因缺失能够影响该

菌的致病性，而且导致组氨酸代谢中的相关基因(包括 *hutH*)的转录水平显著升高(数据待发表)。HutH 作为第一个组氨酸代谢酶，参与降解组氨酸生成尿刊酸的过程，进而生成一系列中间产物。目前关于 HutH 的研究仅停留在基因序列分析<sup>[12]</sup>、酶活性<sup>[13]</sup>等方面，HutH 在细菌生物学特性和致病性方面的作用研究，尚未见报道。因此，本研究通过同源重组的方式构建 *hutH* 基因缺失株，探究 HutH 对副溶血弧菌相关生物学特性以及致病性的影响，为致病菌能源代谢与毒力调控的关联性提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

副溶血弧菌临床分离株：SH112 (GenBank No.: JACYGZ000000000.1)为本试验所用野生型菌株(wild-type, WT)。大肠杆菌 CC118 $\lambda$ pir、R6K 启动子 pYAK1 自杀质粒、辅助质粒 pRK2013、广宿主质粒 pMMB207 以及 HeLa 细胞均为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要仪器及试剂

细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化科技(上海)有限公司；胶回收试剂盒购自赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)有限公司；限制性内切酶和 T4 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司；DL2000 Plus DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司；CytoTox96 非放射性细胞毒性试剂盒购自 Promega 公司；DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司；细胞培养相关耗材购自美国 Corning 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；结晶紫染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。

LB 液体培养基: 1% NaCl、1% 胰蛋白胨、0.5%酵母提取物。MLB 液体培养基: 3% NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物。HIB 液体培养基: 25 g/L 心浸出液(HI broth)。固体平板则是在对应的液体培养基中加入 1.5%琼脂粉。泳动 (swimming) 平板: 3% NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.3%琼脂粉。群集运动 (swarming) 平板: HIB 25 g/L、2% NaCl、1.5%琼脂粉。

### 1.1.3 细胞和细菌培养条件

HeLa 细胞培养条件为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 10% FBS 的 DMEM, 青、链霉素。将甘油保存的不同副溶血弧菌菌株接种于 MLB 液体培养基过夜活化。次日将过夜活化的菌液 50 倍稀释加入到 MLB 液体培养基中, 待培养至对数生长期, 约  $OD_{600}=0.20\pm 0.02$ , 用于不同试验。

## 1.2 *hutH* 基因缺失株和回补株构建

用 Primer Premier 5.0 软件设计 *hutH* 基因缺失株和回补株的相应引物(表 1), 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。

缺失株和回补株的构建参考本实验室已发表论文并做细微改动<sup>[14]</sup>。以野生株 DNA 为模板, 以引物 *hutH*-A/B 和 *hutH*-C/D 分别扩增 *hutH* 基因的上下游同源臂 AB 片段和 CD 片段。以 AB 片段和 CD 片段为模板, *hutH*-A/D 为引物利用融合 PCR 技术扩增得到 *hutH*-AD 片段。使

用 *Bam*H I / *Pst* I 对 pYAK1 质粒和 *hutH*-AD 片段分别进行双酶切, 利用 PCR 产物回收试剂盒回收酶切产物。利用 T4 连接酶连接相应酶切产物, 转化至 CC118 $\lambda$ *pir* 感受态细胞中, 涂布至含氯霉素抗性(10  $\mu$ g/mL)的平板, 将阳性重组质粒命名为: pYAK1-*hutH*。

将供体菌 CC118 $\lambda$ *pir* (pYAK1-*hutH*)、受体菌 WT、辅助菌 HB101 (pRK2013)按照 1:1:1 比例混合, 放置在 0.22  $\mu$ m 滤膜, 相互作用 18 h, 用 PBS 洗脱滤膜, 涂布于含氯霉素抗性(10  $\mu$ g/mL)的 TCBS 平板, 将 TCBS 平板上的单菌落在含有 20%蔗糖的 LB 平板划线培养至 10 代左右, 利用引物 *hutH*-E/F 筛选、鉴定 *hutH* 基因缺失成功的菌株。上述利用 *hutH*-E/F 引物鉴定成功的菌株继续在 20%蔗糖 LB 平板传代, 利用 *sacB*-E/F 鉴定不含自杀质粒 pYAK1 的基因缺失株, 将筛选到的基因 *hutH* 缺失株命名为  $\Delta$ *hutH*。

以野生型菌株 DNA 为模板, 经 pMMB-*hutH*-F/R 扩增获得 *hutH* 片段, 对 pMMB207 质粒和 *hutH* 片段分别双酶切, 连接后转化入 CC118 $\lambda$ *pir* 感受态细胞, 将获得的阳性回补质粒命名为 pMMB207-*hutH*。参考构建缺失株的方法进行接合转移试验, 利用引物 *hutH*-E/F 和 pMMB-*hutH*-F/R 进行 PCR 鉴定, 将筛选到的  $\Delta$ *hutH* 回补株命名为 C $\Delta$ *hutH*。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers used in this study

Primers	Primer pairs sequences (5'→3')	Restriction enzymes
<i>hutH</i> -A	<b>CGGATCCGGCTCTGTAGCAAGCCCGAACC</b>	<i>Bam</i> H I
<i>hutH</i> -B	CTCTTTCATCCTTACTTGAGCTTCTTC	
<i>hutH</i> -C	GTAAGGATGAAAGAGTCTATAGAAGCAAAC	
<i>hutH</i> -D	<b>CCCCGGGGGGTTGTAATCACCAGCCAC</b>	<i>Sma</i> I
<i>hutH</i> -E	AGGTTTCGTTCTGCTTA	
<i>hutH</i> -F	GTATTCTTTGCCTGCCTC	
pMMB- <i>hutH</i> -F	<b>CGCGGATCCATGTTAAATTTAACGCTAAA</b>	<i>Bam</i> H I
pMMB- <i>hutH</i> -R	<b>AAACTGCAGTTAATGTACGCTTGGCAGAA</b>	<i>Pst</i> I
<i>sacB</i> -F	ACGGCACTGTCGCAAACAT	
<i>sacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT	

Restriction enzyme sites are bolded.

### 1.3 生长曲线测定

将培养至  $OD_{600}=0.20\pm 0.02$  的 WT、 $\Delta hutH$ 、 $C\Delta hutH$  分别按照 1:100 (V/V) 比例接种于新鲜 MLB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养, 每隔 1 h 吸取 200  $\mu$ L 液体测定  $OD_{600}$  值, 共测定 14 h。

### 1.4 组氨酸利用能力测定

参考文献 [15–16], 将已培养至  $OD_{600}=0.20\pm 0.02$  的各菌株菌液分别按照 1:20 (V/V) 比例接种于 M9 极限培养基 (6.8 g/L  $Na_2HPO_4$ , 3 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.5 g/L NaCl, 1 g/L  $NH_4Cl$ ), 另加入 5 mmol/L  $MgSO_4$ , 2 g/L NaCl 增加盐浓度适合弧菌生长, 添加 4 mg/ml L-组氨酸作为唯一的碳源。放置于 96 孔细胞培养板内静置培养, 每个菌株设置 6 个重复, 于接种后不同时间点测量  $OD_{600}$  数值, 统计绘图。

### 1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测组氨酸代谢相关基因转录水平

qRT-PCR 检测 *hutH* 基因缺失对副溶血弧菌组氨酸代谢相关基因的影响。将各菌株培养至  $OD_{600}=0.20\pm 0.02$ , 提取 RNA 并反转录为 cDNA, 引物见表 2。利用 Applied Biosystems 7500 进行 RT-PCR 反应。设置反应参数为: 95 °C 预变性

2 min; PCR 反应阶段: 95 °C 15 s; 56 °C 40 s, 40 个循环。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因转录水平。

### 1.6 环境耐受试验

#### 1.6.1 耐盐试验

将过夜培养的各菌株菌液分别按照 1:20 (V/V) 比例接种于含有 1%、3%、5%、7%、9%、11% NaCl 的 LB 液体培养基中, 每个菌株设置 3 个重复, 每隔 1 h 测量  $OD_{600}$  数值, 统计绘图。

#### 1.6.2 pH 耐受试验

将过夜培养的各菌株菌液分别按照 1:20 (V/V) 比例接种于 pH 4、5、6、7、8、9 的 MLB 液体培养基中, 每个菌株设置 3 个重复, 每隔 1 h 测量  $OD_{600}$  数值, 统计绘图。

### 1.7 生物被膜能力测定

将各菌株过夜培养菌液按照 1:10 (V/V) 比例接种于新鲜的 HI Broth, 30 °C 静置培养 48 h。生物被膜的相对生成能力测定按照相关文献所述略做修改<sup>[17]</sup>。测量  $OD_{600}$ , 弃去浮游菌液, PBS 清洗 3 遍, 自然干燥后, 加入结晶紫染色 15 min, 弃去结晶紫, 用 PBS 清洗 3 遍, 自然干燥后, 加入 95% 乙醇溶解结晶紫, 测量  $OD_{570}$ , 则生物被膜的相对生成能力为:  $100\times OD_{570}/OD_{600}$ 。

### 1.8 运动能力测定

#### 1.8.1 泳动能力测定

参考文献 [18], 将过夜培养各菌株菌液分别吸取 2  $\mu$ L, 垂直接种于泳动平板, 待菌液完全吸收, 轻轻放置于 37 °C 恒温培养箱, 正置培养 4–5 h 后观察结果, 测量各菌株运动直径, 记录并拍照。

#### 1.8.2 群集运动能力测定

参考文献 [18], 将过夜培养各菌株菌液分别吸取 2  $\mu$ L, 垂直接种于群集平板, 待菌液完全吸收, 将群集运动平板放置于 30 °C 恒温培养箱, 正置培养 18 h 观察结果, 测量各菌株运动直径, 记录并拍照。

表 2 RT-PCR 引物

Table 2 Primers of RT-PCR used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
VP0889-RT-F	CGCTAGGTAAGACAGAGGCG
VP0889-RT-R	TTCCATGGCTGTGGCTTAGG
<i>hutH</i> -RT-F	TGAGGCGAACGGTTTCATCA
<i>hutH</i> -RT-R	TACTCAAGTCGTCGATCGCG
<i>hutU</i> -RT-F	GCAGATGTGGGTTGTCAGGA
<i>hutU</i> -RT-R	CTTCCGTTGGGCAGCTCTA
<i>hutG</i> -RT-F	GGCGATGTCCCAACACAAAC
<i>hutG</i> -RT-R	CCTGCGGCTAGAGGTGTAAG
<i>hutI</i> -RT-F	GAGCGGCAAGAAGGGTAGTT
<i>hutI</i> -RT-R	CGCGTTGCCTCGTTTAGATG
<i>gap</i> -RT-F	TTTGAAGAGCGTCCGTTGGTG
<i>gap</i> -RT-R	TTAAGCCAACACAACGTTACG

## 1.9 细胞毒性试验

将 HeLa 细胞铺于 96 孔细胞板中, 置于细胞培养箱内过夜培养, 用 PBS 清洗 2 遍后, 加入 50  $\mu\text{L}$ /孔无酚红 DMEM 待用。将培养至  $OD_{600}=0.20\pm 0.02$  的 WT、 $\Delta hutH$ 、 $C\Delta hutH$  菌株分别用无酚红 DMEM 清洗 3 遍, 调整细菌浓度至  $2\times 10^8$  CFU/mL, 用无酚红 DMEM 稀释菌液, 按照 MOI (multiplicity of infection)=100:1 加入 50  $\mu\text{L}$  菌液感染 HeLa 细胞, 每个试验组重复 6 个孔, 将 96 孔细胞培养板 1 000 r/min 离心 5 min, 使细菌细胞充分接触。孵育 1.5 h 后, 依据 CytoTox96 试剂盒说明书检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量反映不同菌株对 HeLa 细胞造成的损害程度。

## 1.10 小鼠致病性试验

24 只 3–4 周龄雌性 ICR 小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司, 随机分为 4 组, 每组 6 只。参考文献[19], 将过夜培养的 WT、 $\Delta hutH$ 、 $C\Delta hutH$  菌液用 MLB 液体培养基调整至菌量一致, 并用生理盐水洗涤 3 次用于接种小鼠。用酒精棉球消毒小鼠腹部, 按照  $5\times 10^7$  CFU/只 (200  $\mu\text{L}$ ) 将不同菌株腹腔注射小鼠, 其中空白对照组注射生理盐水。持续观察并记录小鼠临床表现与死亡情况, 连续观察 36 h, 统计数据, 绘制小鼠生存曲线。

## 1.11 生物信息学分析网站

NCBI (national center for biotechnology information) 分析 HutH 的保守结构域, 进行功能注释。采用 BLAST (basic local alignment search tool) 分析 *hutH* 基因在副溶血弧菌中的保守情况并构建进化树。KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 检索分析副溶血弧菌中组氨酸代谢过程。RAST (rapid annotation using subsystem technology) 分析组氨酸代谢系统在副溶血弧菌中的基因分布。

## 1.12 数据统计

数据利用 GraphPad Prism 8 软件进行单因

素方差分析(one-way ANOVA), 用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm SD$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 *hutH* 生物信息学分析

利用 pMMB-*hutH*-F/R 扩增野生株基因组 DNA, 将扩增出的核苷酸序列在 NCBI 数据库中利用 BLAST 进行核苷酸序列比对。利用 neighbor-joining 方法分析进化关系<sup>[20]</sup>, 结果表明, 副溶血弧菌临床分离株 SH112 的 *hutH* 核苷酸序列在 131 株副溶血弧菌分离株中高度保守, 相似性达 95%以上(数据未展示)。

### 2.2 *hutH* 基因缺失株 $\Delta hutH$ 及回补株 $C\Delta hutH$ 的鉴定

缺失株  $\Delta hutH$  鉴定结果如图 1 所示, 利用 *hutH*-E/F 引物分别扩增各菌株基因组 DNA, SH112 在 2 700 bp 处扩增出条带(泳道 1), 而  $\Delta hutH$  在 1 200 bp 处扩增出条带(泳道 2),  $C\Delta hutH$  在 1 200 bp 处扩增出条带(泳道 3)。进一步利用 pMMB-*hutH*-E/F 引物扩增各菌株基因组 DNA, SH112 在 1 500 bp 处扩增出条带(泳道 4), 而  $\Delta hutH$  在 1 500 bp 处未扩增出相应条带(泳道 5),  $C\Delta hutH$  在 1 500 bp 处扩增出相应条带(泳道 6), 表明  $\Delta hutH$  和  $C\Delta hutH$  均构建成功。

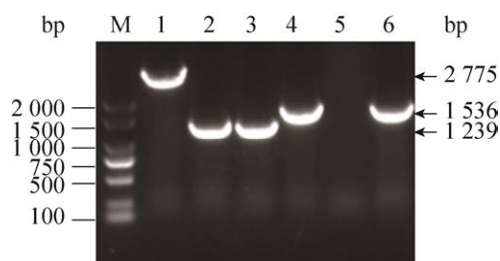


图 1 各菌株 PCR 鉴定结果

Figure 1 PCR identification of WT,  $\Delta hutH$  and  $C\Delta hutH$ . M: DL2000; lanes 1–3: primers of *hutH*-E/F; lanes 4–6: primers of pMMB-*hutH*-F/R; template of lanes 1–3 is WT,  $\Delta hutH$  and  $C\Delta hutH$  respectively; template of lanes 4–6 is WT,  $\Delta hutH$  and  $C\Delta hutH$ , respectively.

### 2.3 生长曲线

结果如图 2 所示, WT、 $\Delta hutH$ 、 $C\Delta hutH$  在 MLB 液体培养基中并无明显的生长差异, 说明 *hutH* 基因缺失并未影响副溶血弧菌的生长特性( $P>0.05$ )。

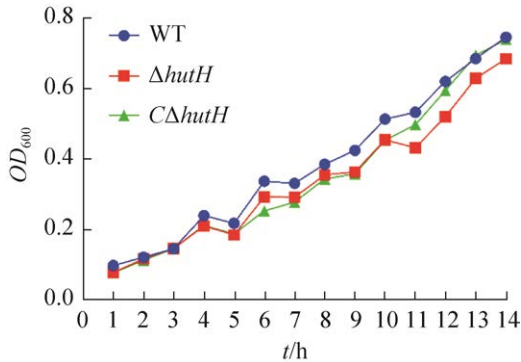


图 2 WT、 $\Delta hutH$  和  $C\Delta hutH$  生长曲线

Figure 2 The growth curves of WT,  $\Delta hutH$  and  $C\Delta hutH$  in MLB broth.

### 2.4 HutH 参与组氨酸代谢

如图 3 所示, 在观察的前 24 h,  $\Delta hutH$  在组氨酸作为唯一碳源的 M9 培养基中, 与 WT 和  $C\Delta hutH$  相比, 生长显著受到抑制( $P<0.01$ ), 提示 *hutH* 基因的缺失使副溶血弧菌丧失代谢

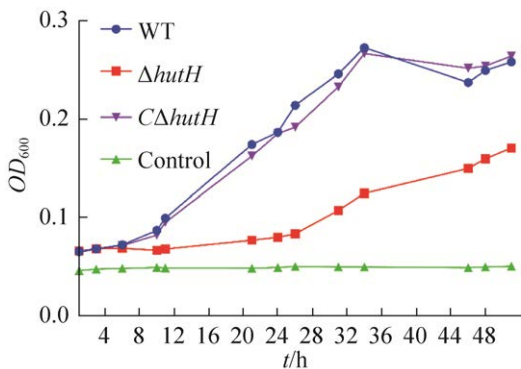


图 3 WT、 $\Delta hutH$  和  $C\Delta hutH$  在组氨酸作为唯一碳源的 M9 培养基中生长情况

Figure 3 The growth curves of WT,  $\Delta hutH$  and  $C\Delta hutH$  when cultivated in M9 medium, which L-histidine as the sole source of nitrogen.

组氨酸作为能量来源的能力; 24 h 后,  $\Delta hutH$  菌株开始逐渐生长, 提示在副溶血弧菌组氨酸代谢方面可能存在一定能量代偿机制。不过生长到 48 h 时,  $\Delta hutH$  生长能力仍未恢复到野生株和回补株的水平( $P<0.01$ ), 说明 *hutH* 基因缺失后显著影响副溶血弧菌代谢组氨酸的能力。

### 2.5 qRT-PCR 检测 3 种菌株组氨酸代谢相关基因转录水平

qRT-PCR 结果显示 *hutH* 基因缺失后, 副溶血弧菌 *hut* 操纵子内相关基因 *hutU*、*hutG*、*hutI* 的转录水平显著降低, 但是基因 *VP0889* (编码假定组氨酸氨解酶) 的转录水平显著提高(图 4), 提示 *hutH* 基因的缺失影响了其他组氨酸代谢酶的表达水平。

### 2.6 环境耐受试验

耐盐试验结果如图 5 所示,  $\Delta hutH$  与 WT 相比, 对于不同盐浓度的耐受情况并无区别。并且各菌株的最适生长盐浓度区间为 1%–5%, 3% 盐浓度为最适生长盐浓度, 而随着盐浓度的提高, 生长情况越来越差。

酸碱耐受试验结果如图 6 所示,  $\Delta hutH$  与 WT 相比较, 在不同的 pH 值条件下, 并没有明

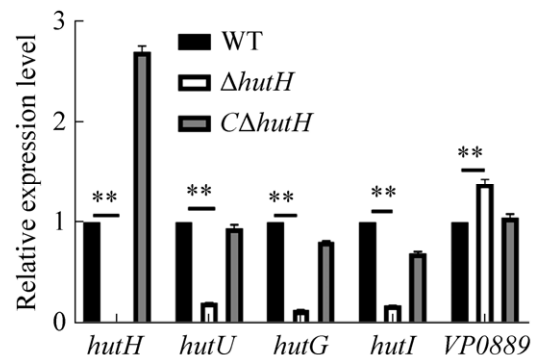


图 4 各菌株组氨酸代谢相关基因转录水平

Figure 4 The transcription levels of histidine metabolism-related genes in WT,  $\Delta hutH$ , and  $C\Delta hutH$ . \*\*:  $P<0.01$ .

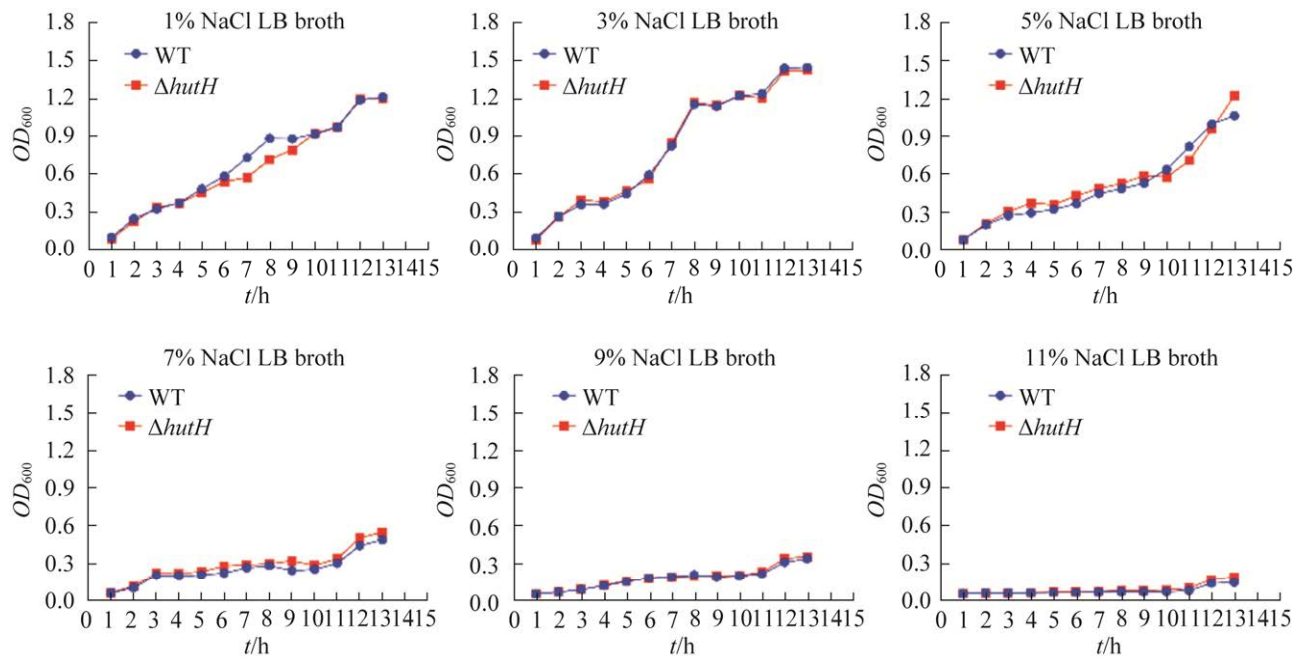


图 5 各菌株在不同盐浓度 LB 培养基中的生长情况

Figure 5 Growth curves of WT and  $\Delta hutH$  cultivated in LB broth with different concentrations of NaCl. Logarithmic strains were diluted into fresh MLB medium, and cultivated at 37 °C without shaking for 13 h. The values of  $OD_{600}$  of medium with planktonic strains were measured every hour.

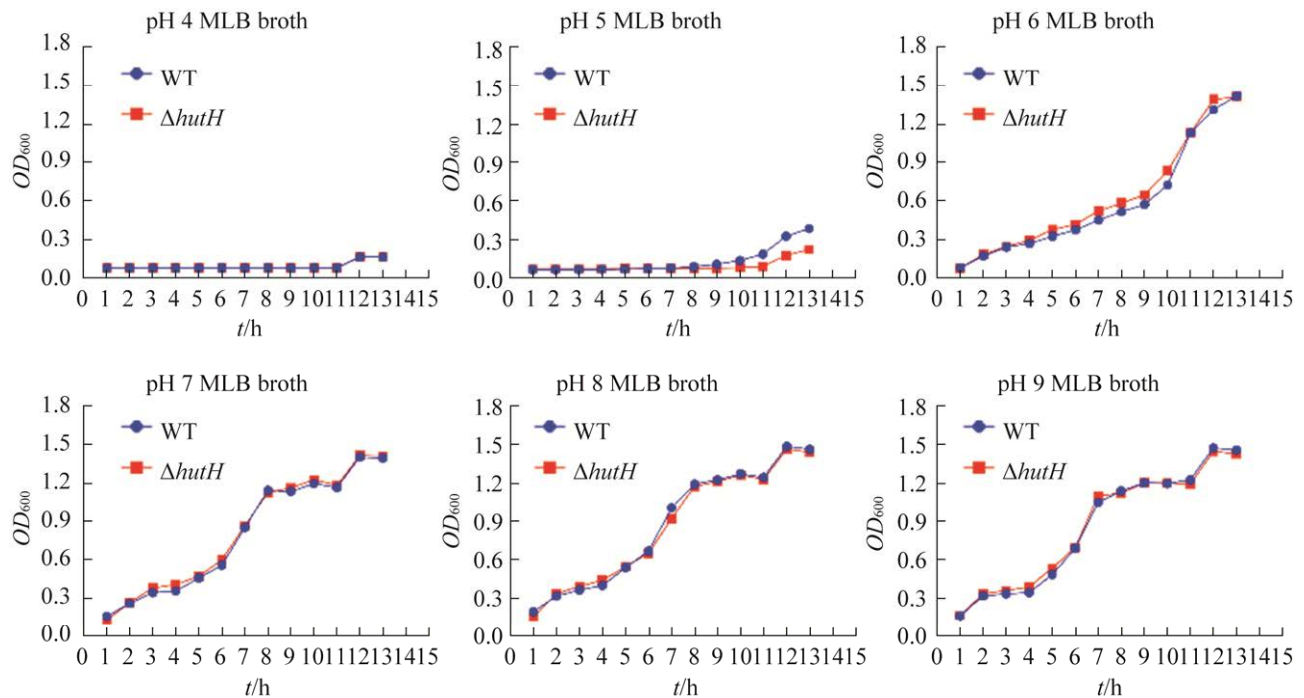


图 6 不同菌株在 pH 酸碱条件下的生长情况

Figure 6 Growth curves of WT and  $\Delta hutH$  cultivated MLB broth with different pH. Logarithmic strains were diluted into fresh MLB medium, and cultivated at 37 °C without shaking for 13 h. The values of  $OD_{600}$  of medium with planktonic strains were measured every hour.



显的生长差异,说明 HutH 不影响副溶血弧菌的酸碱耐受能力。同时由图 6 可知,副溶血弧菌在弱碱环境下生长趋势相对良好,pH 8 最适合副溶血弧菌生长,pH 在 6–9 之间均可以较好生长,然而当 pH 值降低到 5,生长能力显著受到抑制,说明副溶血弧菌对酸性环境更加敏感。

## 2.7 HutH 对生物被膜形成能力的影响

如图 7 所示, *hutH* 基因缺失株生物被膜形成能力显著低于野生株和回补株( $P<0.01$ ),提示 HutH 参与副溶血弧菌的生物被膜形成过程。

## 2.8 HutH 对运动能力的影响

泳动试验结果如图 8 所示,  $\Delta hutH$  的泳动能力显著低于 WT ( $P<0.01$ ),  $C\Delta hutH$  的泳动能力恢复至 WT 水平,说明 *hutH* 参与副溶血弧菌的泳动。

群集运动试验如图 9 所示, WT、 $\Delta hutH$ 、 $C\Delta hutH$  的群集运动能力并无显著差异( $P>0.05$ ),说明 HutH 不参与副溶血弧菌的群集运动过程。

## 2.9 *hutH* 基因缺失对 HeLa 细胞毒性的影响

细胞毒性试验结果如图 10 所示,  $\Delta hutH$  对

HeLa 细胞的损伤能力显著低于 WT ( $P<0.01$ ),  $C\Delta hutH$  对 HeLa 细胞的毒力作用接近 WT,说明 *hutH* 基因缺失能够显著降低副溶血弧菌对 HeLa 细胞的毒性作用。

## 2.10 *hutH* 基因缺失对副溶血弧菌毒力的影响

将各菌株腹腔接种 ICR 小鼠,观察 36 h 内

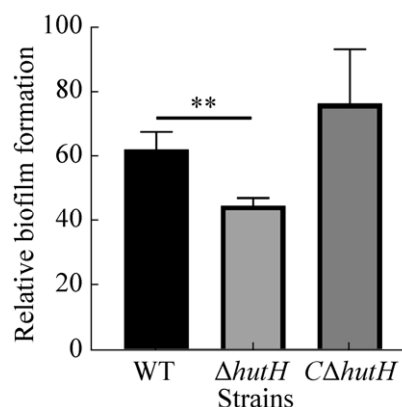


图 7 各菌株生物被膜形成能力

Figure 7 Relative biofilm formation ability of three strains. Logarithmic strains were diluted into fresh MLB medium and cultivated at 37 °C without shaking for 48 h. Relative biofilm formation were calculated with the formula:  $100 \times OD_{570} / OD_{600}$ . \*\*:  $P<0.01$ .

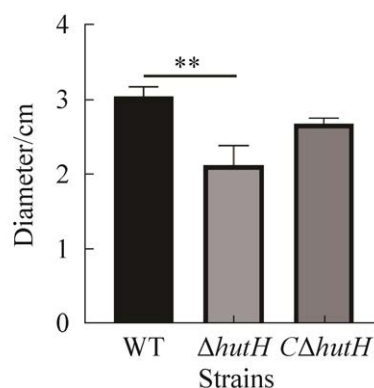
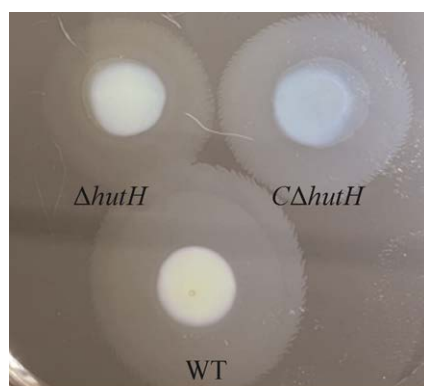


图 8 各菌株泳动能力试验

Figure 8 The ability of swimming of three strains were assayed. Each strain was spotted on swimming plats. After cultivated 4 h at 37 °C without shaking, the images were taken and the diameter of every colony were recorded. \*\*:  $P<0.01$ .

小鼠临床症状和死亡情况。其中 WT 感染的小鼠在 2 h 后开始出现扎堆聚集、颤抖现象, 4 h 背毛凌乱的现象明显, 并在 6 h 逐渐开始死亡。而 *hutH* 缺失株感染的小鼠, 上述症状表型相对轻微, 与 WT 相比, 对小鼠致死率降低。24 h 后, 未死亡小鼠开始恢复至正常状态。小鼠致

病性试验结果以生存曲线的结果呈现, 如图 11 所示, 在腹腔接种后 36 h 观察期内, WT 与 *CΔhutH* 的 ICR 小鼠致死率均是 100%, 而 *ΔhutH* 的致死率为 66.7%, 并且对照组 ICR 小鼠均正常存活, 说明 *hutH* 的缺失能明显降低副溶血弧菌对 ICR 小鼠的致病力。

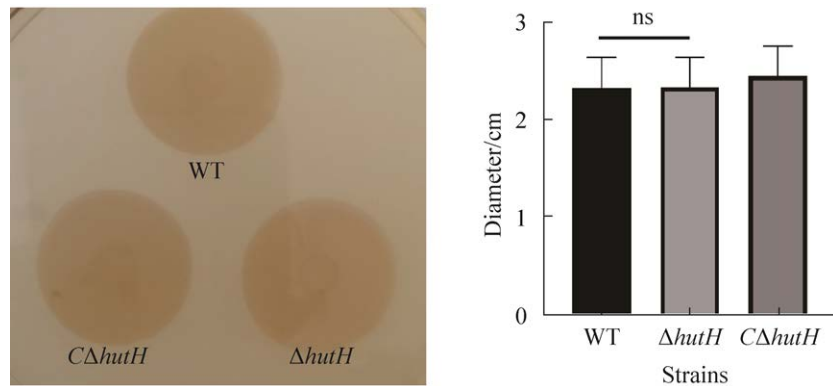


图 9 各菌株群集运动能力比较

Figure 9 The ability of swarming of three strains were assayed. Each strain was spotted on swarming plats. After cultivated 18 h at 30 °C without shaking, the images were taken and the diameter of every colony were recorded. Ns: not significant;  $P>0.05$ .

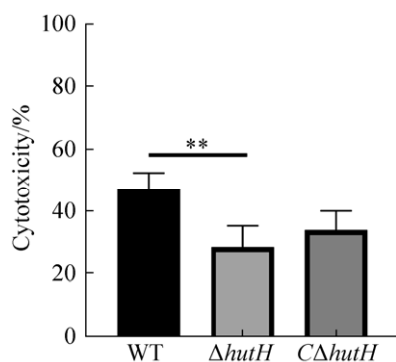


图 10 各菌株对 HeLa 细胞的毒性作用

Figure 10 HeLa cells infected with each strain at MOI (100:1) for 1.5 h. The level of LDH release were measured with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. \*\*:  $P<0.01$ .

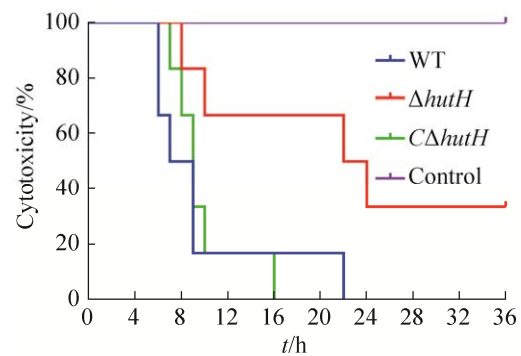


图 11 各菌株感染小鼠后的存活率

Figure 11 Survival curve of mice infected with WT, *ΔhutH*, and *CΔhutH* with an appointed dose.

### 3 讨论与结论

副溶血弧菌可在海水、河口等多种环境生存, 能够导致水生动物和人类发病, 主要通过

其运动能力、生物被膜形成能力、毒力因子等适应外界环境和发挥致病作用<sup>[3]</sup>。大多数细菌均可通过代谢各种氨基酸作为能量来源适应环境的改变,在众多氨基酸中,组氨酸合成所需能量较多<sup>[21]</sup>。细菌的组氨酸代谢主要由 *hut* 系统管控,其中 HutH 作为组氨酸代谢通路上的第一个代谢酶,在多数细菌中高度保守,主要参与细菌的能量代谢平衡<sup>[7]</sup>。本研究利用同源重组方法构建 *hutH* 基因缺失株,研究 HutH 在副溶血弧菌环境耐受、运动性、生物被膜形成、细胞毒性和小鼠毒力等方面的影响。

已有研究表明, *hutH* 基因与 *hut* 系统发挥代谢组氨酸的功能密切相关,如肺炎鲍曼不动杆菌的 *hutH* 基因缺失后,导致细菌不能在组氨酸作为唯一能量来源的培养基中生存<sup>[22-23]</sup>。然而本研究结果表明,副溶血弧菌的 *hutH* 基因缺失后,在组氨酸作为唯一碳源的 M9 培养基中生长虽然受到抑制,但在 24 h 后又逐渐开始生长,表明副溶血弧菌在 *hut* 系统管控代谢组氨酸方面具有一定代偿机制,我们进一步通过 RAST 网站(网址: <https://rast.nmpdr.org/>)分析副溶血弧菌基因组,发现该菌染色体 1 上存在一个独立于 *hut* operon 之外的假定组氨酸氨解酶(由 *VP0889* 基因编码),接着我们通过 RT-PCR 证实 *hutH* 基因缺失株中基因 *VP0889* 的表达量是显著升高的,提示该假定组氨酸氨解酶可能具有一定的代谢组氨酸能力。综上结果,我们推测 *hut* 操纵子内的组氨酸氨解酶 HutH 为副溶血弧菌主要降解组氨酸生成尿刊酸的酶,并影响下游代谢酶的表达,当 *hutH* 缺失后, *hut* 操纵子外的组氨酸氨解酶(*VP0889*)表达量代偿性增高,帮助副溶血弧菌代谢组氨酸提供能量,但由于下游其他代谢酶的表达量仍较低,导致 *hutH* 缺失株利用组氨酸功能的能力仍明显弱于野生株。

副溶血弧菌能在海水、海产品表面、鱼虾肠道乃至宿主肠道内存活<sup>[24]</sup>,这些环境的理化性质不尽相同。本研究通过体外模拟不同 pH 或盐离子浓度的环境,研究 HutH 是否参与副溶血弧菌在不同环境下的生长特性。结果证实副溶血弧菌可以在 1%–7% 的盐浓度下、pH 在 6–9 范围内均能生长,最适盐浓度和 pH 值分别是 3% 和 7%,结果同时也证实 HutH 不参与副溶血弧菌在不同 pH 或盐浓度环境中的耐受能力。

生物被膜是细菌应对不良环境而形成的膜状结构,由大量的胞外多糖、蛋白质和核酸类物质组成,具有提高细菌感染力和抵御不良环境的能力<sup>[25]</sup>。副溶血弧菌在生物被膜的保护下更利于感染水产动物,对水产养殖业造成严重的危害<sup>[26]</sup>。本研究证实, HutH 参与副溶血弧菌生物被膜的形成,我们推测是由于生物被膜在表面黏附、胞外基质的产生,以及生物被膜成熟、消散的过程中需要大量能量供应<sup>[20]</sup>,而 HutH 则能通过代谢组氨酸为细菌生物被膜形成过程提供能量。有文献报道,分别将鲍曼不动杆菌在组氨酸作为唯一碳源的培养基和其他氨基酸作为唯一碳源的培养基中生长,该菌在前者中的生物被膜形成能力显著高于后者<sup>[27]</sup>,结合本研究结果,充分表明组氨酸代谢在细菌生物被膜形成过程中发挥重要作用。

细菌的鞭毛运动与多种生物学过程紧密相关,如定殖、黏附和毒力作用等<sup>[28]</sup>。副溶血弧菌拥有 2 套鞭毛系统,极性鞭毛通过离子泵负责推动菌体在液体环境中运动,侧生鞭毛则由质子泵负责推动在黏稠表面进行群集运动<sup>[29]</sup>。鞭毛运动是一个需要消耗大量能量的过程<sup>[30]</sup>。本研究发现, *hutH* 基因缺失导致副溶血弧菌泳动能力下降,但不影响群集运动能力,提示 HutH 可能通过影响能量供应对极性鞭毛的运

动功能产生显著影响, 进而导致副溶血弧菌的泳动能力下降。而在营养条件良好(群集运动平板为营养丰富的 BHI 平板)的情况下, 组氨酸代谢提供的能量不是侧生鞭毛发挥功能的唯一来源。以上结果也提示组氨酸代谢可能与离子泵具有一定的联系, 需要后续实验进一步证实。

大多数病原菌的生物被膜形成能力和运动能力, 都与细菌的致病性密切相关<sup>[25,28]</sup>。例如, 铜绿假单胞菌丧失运动能力后会降低其对小鼠的毒力作用<sup>[31]</sup>; 形成生物被膜后的霍乱弧菌, 相关毒力因子表达量也显著升高, 且在小鼠肠道的定殖能力更强<sup>[32]</sup>。本研究证实, *hutH* 基因缺失不仅影响副溶血弧菌的生物被膜形成能力、泳动能力, 而且在细胞水平上能显著降低副溶血弧菌对 HeLa 细胞的毒性, 在动物水平上能显著降低该菌对小鼠的毒力, 其他研究也有类似报道, 如鲍曼不动杆菌 *hutH* 基因的缺失导致该菌在小鼠脏器定殖能力显著降低<sup>[23]</sup>。目前, *hut* 系统影响细菌致病能力的机制还未完全阐明, 流产布鲁氏菌中 HutC 能够直接结合在四型分泌系统 *virB* 的启动子区, 进而影响该菌致病性<sup>[9]</sup>, 虽然目前尚未证实铜绿假单胞菌的 *hut* 系统能够直接调控分泌系统, 但却能提高三型分泌系统相关基因的表达<sup>[10]</sup>, 以上结果说明不同细菌的 *hut* 系统影响致病性的机制不尽相同, HutH 影响副溶血弧菌毒力的具体机制仍需进一步探索。

综上所述, 本研究首次证实组氨酸氨解酶 HutH 影响副溶血弧菌代谢组氨酸的能力, 进一步发现 HutH 在副溶血弧菌生物学特性和致病性中发挥重要作用, 为研究副溶血弧菌新型防治策略提供思路和依据。

## 参考文献

- [1] McCarter L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, 1(1): 51–57.
- [2] Yeung PSM, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(2): 74–88.
- [3] Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 549–558.
- [4] DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenge BJ, Nordstrom JL, Wells J, Puhf N, Gendel SM. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 3999–4005.
- [5] Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. *Biocontrol Science*, 2011, 16(4): 129–137.
- [6] Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(15): 12507–12515.
- [7] Bender RA. Regulation of the histidine utilization (*hut*) system in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2012, 76(3): 565–584.
- [8] Magasanik B, Bowser HR. The degradation of histidine by aerobacter aerogenes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1955, 213(2): 571–580.
- [9] Sieira R, Arocena GM, Bukata L, Comerci DJ, Ugalde RA. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 217–224.
- [10] Rietsch A, Wolfgang MC, Mekalanos JJ. Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(3): 1383–1390.
- [11] Joshua GWP, Atkinson S, Goldstone RJ, Patrick HL, Stabler RA, Purves J, Cámara M, Williams P, Wren BW. Genome-wide evaluation of the interplay between *Caenorhabditis elegans* and *Yersinia pseudotuberculosis* during *in vivo* biofilm formation. *Infection and Immunity*, 2015, 83(1): 17–27.
- [12] Consevage MW, Phillips AT. Sequence analysis of the *hutH* gene encoding histidine ammonia-lyase in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(5): 2224–2229.
- [13] Bowden G, Mothibeli MA, Robb FT, Woods DR. Regulation of *hut* enzymes and extracellular protease

- activities in *Vibrio alginolyticus* hut mutants. *Microbiology*, 1982, 128(9): 2041–2045.
- [14] 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): 55–466.
- Bai XR, Wang Q, Ling J, Wan Y, Chen YJ, Fang WH, Sun WD, Jiang W. Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS<sub>1</sub> and T3SS<sub>2</sub> in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(3): 455–466. (in Chinese)
- [15] Fridman CM, Keppel K, Gerlic M, Bosis E, Salomon D. A comparative genomics methodology reveals a widespread family of membrane-disrupting T6SS effectors. *Nature Communications*, 2020, 11: 1085.
- [16] Thomas F, Barbeyron T, Michel G. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR in the marine *Flavobacterium Zobellia galactanivorans*. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(1): 61–66.
- [17] Zhang YQ, Qiu Y, Gao H, Sun JF, Li X, Zhang MM, Xue XF, Yang WH, Ni B, Hu LF, Yin Z, Lu RF, Zhou DS. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676436.
- [18] Zhang YB, Liu HH, Gu D, Lu XX, Zhou XH, Xia XD. Transcriptomic analysis of PhoR reveals its role in regulation of swarming motility and T3SS expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological Research*, 2020, 235: 126448.
- [19] 李洋洋, 王权, 郭容, 张海洋, 刘鹏选, 齐瑜, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. VPA1500 基因缺失对副溶血弧菌生物学特性和致病性的影响. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3937–3951.
- Li YY, Wang Q, Guo R, Zhang HY, Liu PX, Qi Y, Fang WH, Sun WD, Jiang W. Study on biological characteristics and pathogenicity of VPA1500 gene knock-out mutant of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3937–3951. (in Chinese)
- [20] Jiang FF, Lei T, Wang Z, He M, Zhang JM, Wang J, Zeng HY, Chen MT, Xue L, Ye QH, Pang R, Wu S, Gu QH, Ding Y, Wu QP. A novel gene *vp0610* negatively regulates biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 656380.
- [21] Akashi H, Gojabori T. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 2002, 99(6): 3695–3700.
- [22] Naren NR, Zhang XX. Global regulatory roles of the histidine-responsive transcriptional repressor HutC in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(13): e00792–e00719.
- [23] Lonergan ZR, Palmer LD, Skaar EP. Histidine utilization is a critical determinant of *Acinetobacter* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2020, 88(7): e00118–e00120.
- [24] Yang H, De Souza Santos M, Lee JL, 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–e02619.
- [25] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563–575.
- [26] Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109–118.
- [27] Cabral MP, Soares NC, Aranda J, Parreira JR, Rumbo C, Poza M, Valle J, Calamia V, Lasa I, Bou G. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(8): 3399–3417.
- [28] Echazarreta MA, Klose KE. *Vibrio* flagellar synthesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 131.
- [29] McCarter LL. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 7(1/2): 18–29.
- [30] Ni B, Colin R, Link H, Endres RG, Sourjik V. Growth-rate dependent resource investment in bacterial motile behavior quantitatively follows potential benefit of chemotaxis. *PNAS*, 2020, 117(1): 595–601.
- [31] Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and Immunity*, 2005, 73(7): 4395–4398.
- [32] Gallego-Hernandez AL, DePas WH, Park JH, Teschler JK, Hartmann R, Jeckel H, Drescher K, Beyhan S, Newman DK, Yildiz FH. Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. *PNAS*, 2020, 117(20): 11010–11017.

(本文责编 李磊)