

文章编号: 1674-5566(2020)03-0429-10

DOI:10.12024/j.sou.20190402602

副溶血弧菌 VI 型分泌系统对其种内竞争的影响

穆丽丽¹, 牛犇¹, 张昭寰¹, 王思琦¹, 王敬敬¹, 刘海泉^{1,2,3,4}, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 对 85 株副溶血弧菌的 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)相关基因的携带情况进行分析, 并选取部分副溶血弧菌菌株进行混合培养, 探究其种内竞争情况。利用 qPCR 技术, 分析混合培养后 T6SS 相关基因的表达情况。结果表明: 85 株副溶血弧菌均携带 T6SS2, 62 株副溶血弧菌携带 T6SS1, 其中临床分离株 41 株, 占全部临床分离株的 93.2%; 环境分离株 21 株, 占全部临床分离株的 51.2%, 并且 T6SS1 基因簇在不同来源的副溶血弧菌中存在一定的差异性。在混合培养条件下, 部分 T6SS1⁺ 的副溶血弧菌存在明显的种内竞争优势。基因表达分析结果显示, 较单一培养的菌株, 混合培养中副溶血弧菌 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的表达量均有明显的上调。导致这一现象的原因可能是在混合培养的条件下, 副溶血弧菌可通过增强自身 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的表达, 以提升其在种内的竞争力。初步探究了副溶血弧菌 VI 型分泌系统对其种内竞争的影响, 为副溶血弧菌 T6SS 功能的进一步揭示提供科学的参考。

关键词: 副溶血弧菌; T6SS; 种内竞争; 定量 PCR; 基因表达

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是一种常见的嗜盐性革兰氏阴性菌, 广泛分布于近海水域及海底沉积物中^[1], 是我国海产品中最为常见的病原菌之一^[2-3]。食用被该菌污染的水产品, 可引起恶心、呕吐、腹泻等肠胃炎反应, 严重的可能引发败血症甚至导致死亡^[4]。近年来, 副溶血弧菌还被证实是对虾肝胰腺坏死综合征的主要诱因^[5], 严重危害对虾的质量安全, 制约着对虾养殖业的可持续发展。

副溶血弧菌全基因组序列显示, 该菌存在两种 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS): 位于 1 号染色体上的 T6SS1 和位于 2 号染色体上的 T6SS2^[6]。T6SS 是近年来新发现的一种蛋白

转运系统, 与细菌的毒力和环境适应能力密切相关^[7-9]。近期研究发现 T6SS 可帮助霍乱弧菌在种内和种间竞争中发挥优势^[10-11], 并且有研究^[12]表明副溶血弧菌的 T6SS1 与其生态位的竞争相关。然而, 关于副溶血弧菌 VI 型分泌系统对其种内竞争的影响, 研究尚属空白。

本研究针对这一空白, 首先对 85 株副溶血弧菌的 T6SS 相关基因的携带情况进行了分析, 并选取 T6SS1⁺ 与 T6SS1⁻ 的副溶血弧菌菌株进行混合培养, 探究其种内竞争情况, 同时运用 qPCR 技术分析混合培养后 T6SS 相关基因的表达情况, 以期探究副溶血弧菌 T6SS 对其种内竞争的影响, 为副溶血弧菌 T6SS 功能的进一步揭示提

收稿日期: 2019-04-15 修回日期: 2019-09-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671779, 31571917); 国家重点研发计划(2018YFC1602205); 上海市科技兴农项目(沪农科政字 2016 第 1-1 号, 沪农科推字 2017 第 4-4 号); 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056); 上海市教委曙光计划(15SG48)

作者简介: 穆丽丽(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全风险评估。E-mail: ml60209507@st.shou.edu.cn

通信作者: 赵勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

供科学的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

选取本实验室分离自环境的 41 株菌株,其中 3 株(vps3、vps5、vps7)来自于中国科学院微生物研究所(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, IMCAS), 1 株(vps39)来自于美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC), 其余 37 株均来自于上海市各水产市场的水产品中。其中 *tdh*⁺ 基因型(*tdh*⁺/*trh*⁺ 和 *tdh*⁺/*trh*⁻) 菌株 22 株, *tdh*⁻ 基因型(*tdh*⁻/*trh*⁺ 和 *tdh*⁻/*trh*⁻) 菌株 19 株。44 株临床分离株, 其中 42 株来自于肠道门诊腹泻患者肛拭子样本, 2 株为标准菌株 ATCC17802、ATCC33847 由本实验室保存。其中 *tdh*⁺ 基因型(*tdh*⁺/*trh*⁺ 和 *tdh*⁺/*trh*⁻) 菌株 38 株, *tdh*⁻ 基因型(*tdh*⁻/*trh*⁺ 和 *tdh*⁻/*trh*⁻) 菌株 6 株, 所有菌株均为 *tlh* 阳性(种特异性基因)。基本信息如表 1 所示。

1.2 培养基及试剂

硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)、蛋白胨大豆琼脂培养基(Tryptic soy broth, TSB)和蛋白胨购自北京陆桥科技有限公司; DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, PCR Mix、琼脂糖和细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司, 动物总 RNA 快速提取试剂盒(Trizol-离心柱型)、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购于 TaKaRa 公司。以上试剂均在有效期内使用。

1.3 菌种活化及菌液制备

将副溶血弧菌菌株从 -80 °C 保存的甘油管中取出, 划线接种于 TCBS 平板, 37 °C 倒置培养 12 ~ 16 h, 挑取合适单菌落于 10 mL TSB 试管中(3% NaCl), 37 °C、200 r/min 摇床培养 8 ~ 10 h, 连续活化 2 次, 作为 DNA 提取菌液备用。

1.4 副溶血弧菌基因组 DNA 的提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书对

85 株副溶血弧菌基因组 DNA 进行提取, 将提取的 DNA 储藏于 -20 °C 的冰箱中备用。

1.5 PCR 引物与扩增条件

引物设计: *tlh*, *tdh*, *trh* 引物序列参考文献[13]合成。其他引物参考副溶血弧菌 RIMD 2210633 (GenBank 登录号: BA000032) 基因序列, 使用 Primer 5.0 软件设计, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。序列信息见表 2。PCR 扩增条件: 25 μL 体系, 95 °C, 4 min; 94 °C, 1 min; 退火 30 s, 退火温度见表 2; 72 °C, 1 000 bp/min; 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行验证, 阳性对照由生工生物工程(上海)有限公司测序验证, 所有实验均独立重复 2 次。

1.6 qPCR 检测副溶血弧菌混合培养中的数量变化

1.6.1 不同基因型副溶血弧菌的混合培养

由于同种菌株之间的检测需要不同的目标基因, 所以选取 *tdh* 和 *trh* 基因为目标引物和探针。每组选取 1 个 *tdh* 菌株与 1 个 *trh* 菌株进行混合培养, 其中: *tdh*⁺ 菌株为 vps2、vpc16、vps16 (T6SS1⁺) 和 vpd18 (T6SS1⁻); *trh*⁺ 菌株为 vps7 (T6SS1⁺), vpr108、vpr111 和 vpc18 (T6SS1⁻)。

菌株活化 2 次, 离心取沉淀, 用蛋白胨水 (Peptone water, PW, 0.85% NaCl, 0.1% 蛋白胨) 进行稀释, 将 OD₆₀₀ 值调整至 0.6 左右, 保证接种量一致。将其分为 8 组, 第 1 组: vps2 (T6SS1⁺) 和 vpr108 (T6SS1⁻); 第 2 组: vpc16 (T6SS1⁺) 和 vpr108 (T6SS1⁻); 第 3 组: vps7 (T6SS1⁺) 和 vpd18 (T6SS1⁻); 第 4 组: vps7 (T6SS1⁺) 和 vps16 (T6SS1⁺); 第 5 组: vpc16 (T6SS1⁺) 和 vpc18 (T6SS1⁻); 第 6 组: vps2 (T6SS1⁺) 和 vpr111 (T6SS1⁻); 第 7 组, vpd18 (T6SS1⁻) 和 vpr108 (T6SS1⁻); 第 8 组, vps7 (T6SS1⁺) 和 vpc16 (T6SS1⁺)。按 0.1% 接种量将两株菌接种到同一 10 mL TSB 试管中, 置于 37 °C 摇床培养 8 h 后, 取 1 mL 菌液按上述方法提取 DNA, 用于 qPCR 反应。

表 1 85 株副溶血弧菌的基本信息

Tab. 1 The information of 85 *V. parahaemolyticus* isolates

菌株 Strains	来源 Source	tlh	tdh	trh	菌株 Strains	来源 Source	tlh	tdh	trh
vpc1	临床 Clinical	+	+	-	vps1	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc2	临床 Clinical	+	+	-	vps2	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc15	临床 Clinical	+	+	-	vps3	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	+	-
vpc16	临床 Clinical	+	+	-	vps4	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc17	临床 Clinical	+	+	-	vps5	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	+	-
vpc18	临床 Clinical	+	-	+	vps7	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc19	临床 Clinical	+	+	-	vps9	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc20	临床 Clinical	+	+	-	vps10	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	+
vpc21	临床 Clinical	+	+	-	vps12	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc22	临床 Clinical	+	+	-	vps14	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc25	临床 Clinical	+	+	-	vps15	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc26	临床 Clinical	+	+	-	vps16	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc27	临床 Clinical	+	+	-	vps17	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc28	临床 Clinical	+	+	-	vps18	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc29	临床 Clinical	+	+	-	vps19	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc32	临床 Clinical	+	+	-	vps20	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc33	临床 Clinical	+	+	-	vps22	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc34	临床 Clinical	+	+	-	vps32	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc35	临床 Clinical	+	+	-	vps33	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc36	临床 Clinical	+	-	+	vps34	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc37	临床 Clinical	+	+	-	vps35	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc38	临床 Clinical	+	+	-	vps36	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc40	临床 Clinical	+	+	-	vps38	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	-	-
vpc41	临床 Clinical	+	+	-	vps39	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	+
vpc42	临床 Clinical	+	+	-	vpd8	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc43	临床 Clinical	+	+	+	vpd14	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc44	临床 Clinical	+	-	-	vpd18	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc45	临床 Clinical	+	+	-	vpd33	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc46	临床 Clinical	+	+	-	vpd34	牡蛎 <i>Ostrea gigas</i> Thunberg	+	+	-
vpc47	临床 Clinical	+	+	-	vpd57	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	+	+	-
vpc48	临床 Clinical	+	+	-	vpd58	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	+	-
vpc49	临床 Clinical	+	+	+	vpd61	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	+	-
vpc50	临床 Clinical	+	+	-	vpr102	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc51	临床 Clinical	+	+	-	vpr103	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc54	临床 Clinical	+	+	+	vpr104	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc55	临床 Clinical	+	+	-	vpr105	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc85	临床 Clinical	+	-	+	vpr106	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc89	临床 Clinical	+	+	-	vpr107	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc90	临床 Clinical	+	+	-	vpr108	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc94	临床 Clinical	+	-	+	vpr110	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc97	临床 Clinical	+	+	-	vpr111	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	+	-	+
vpc100	临床 Clinical	+	+	-					
ATCC17802	临床 Clinical	+	-	+					
ATCC33847	临床 Clinical	+	+	-					

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Notes: “+” means positive, “-” means negative

表 2 引物序列信息

Tab. 2 Information of primer sequences

蛋白名称 Protein names	基因名称 Gene names	引物 Primers	序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物 Amplicon/bp	退火温度 Annealing/°C
VipA1	<i>vipA1</i>	vipA1-F vipA1-R	ACCGTGACGGCTCGGTGG CTCTCTTTTCGGCTCTTGGTGG	457	58
VipA2	<i>vipA2</i>	vipA2-F vipA2-R	CGAGTATCCACTCGAACTTTC TTCTGCTCCCTCAGTACTTTCTG	487	52
VgrG1	<i>vp1388</i>	1388-F 1388-R	GAAATGGGAAGTGGG GGTCGGAACAAGGGAT	409	51
OmpA	<i>vp1390</i>	1390-F 1390-R	CTGTGGGCAACTAATCAT TCCAAGTGGCTACTCAAC	551	48
Hcp1	<i>vp1393</i>	1393-F 1393-R	CGCCAGTCGTCGTTA CACCGTCCACTTGTG		
VP1415	<i>vp1415</i>	1415-F 1415-R	AAGCCGCAACCAAC AGGCCTCAGCAACAAC	559	50

1.6.2 荧光定量 PCR (qPCR)

菌液活化 2 次, 确定其 OD_{600} 值后, 用 PW 进行 10 倍梯度稀释, 取合适浓度涂布于 TCBS 平板上, 37 °C 过夜培养计数。同时取 1 mL 菌液进行 DNA 提取, -20 °C 冰箱保存备用。将平板涂布结果为 10^9 CFU/mL 的副溶血弧菌菌悬液进行 10 倍梯度稀释, 获得终浓度为 $10 \sim 10^9$ CFU/mL 的菌液, 分别取 1 mL 提取 DNA 后进行 qPCR 反应, 输出相应的循环阈值 (C_t 值) 作为标准曲线 y 轴。同时将菌液稀释涂布于 TCBS 培养基, 计数结果作为 x 轴 (\log_{10} CFU/mL), 构建该反应的标准曲线, 并计算曲线的斜率 (slope), 利用公式 $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ 计算反应的扩增效率^[14]。

选择副溶血弧菌 *tdh* 基因和 *trh* 基因作为荧光定量 PCR 的扩增靶基因, 其中 Taq Man 探针分别标记为 CY5 和 FAM 作为荧光基团。本实验所使用的 Taq Man 探针以及相关引物根据参考文献[15] 由上海英潍捷基公司合成。荧光定量 PCR 的反应体系为 20 μ L, 包括 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, Mg^{2+} 缓冲液 (50 μ mol/ μ L) 1.2 μ L, dNTPs Mix (10 μ mol/ μ L) 0.5 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/ μ L) 各 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, 探针 (10 μ mol/ μ L) 0.2 μ L 及 ddH₂O 13.9 μ L。qPCR 反应参数为: 95 °C 预变性 1 min; 共 40 个循

环, 每个循环 95 °C, 5 s; 59 °C, 45 s。在延伸阶段收集荧光信号, 反应结束后, 对获得的信号数据进行处理。

1.7 T6SS 相关基因表达量的检测

荧光定量 PCR 的反应体系 (20 μ L): TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L, PCR Primer-F 0.8 μ L (10 μ mol/ μ L), PCR Primer-R 0.8 μ L (10 μ mol/ μ L), ROX Reference Dye 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L 及 ddH₂O 6 μ L。PCR 反应参数为: 95 °C 预变性 30 s; 40 个循环中, 每个循环均 95 °C 15 s, 60 °C 60 s。

将 16S rRNA 基因定为副溶血弧菌的内参基因, 其上下游引物 5' 端到 3' 端分别为 gacacgggtccagactectac/ggtgcttctctgtcctaac^[16], 参考副溶血弧菌 RIMD 2210633 (GenBank 登录号: BA000032) 基因序列, 使用 Primer 5.0 软件将 T6SS 相关蛋白基因作为靶基因设计引物, 委托生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物序列及基因功能信息见表 3。

1.8 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 检验水平为 $P < 0.05$ 时为差异显著, 具有统计学意义。

表3 反转录荧光定量 PCR 反应引物序列信息
Tab.3 Information of qPCR primer sequences

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	功能 Putative function
<i>OmpA1</i>	CAAAAGCGATCACAAAAGCA AGCGACTTAACGCCATCATC	T6SS1 跨膜蛋白 Transmembrane protein
<i>Hcp1</i>	ACACCGTCCACTTGTGTGA AGTAGTCTCTTGCTTGCCT	T6SS1 转位蛋白 Transfer protein
<i>Hcp2</i>	TCGCCCTGCTTAGTGATGTG GGTACAGCAATGGACCGTGA	T6SS2 转位蛋白 Transfer protein
<i>VgrG1</i>	CCTGTAATGGGGCAGGTGAG AGCTGTAACCAGACGCCAAA	T6SS1 转位蛋白 Transfer protein
<i>VgrG2</i>	CTGGAAGAGAATACGGGGGC TCGGGTAGGGCAAGAGTTA	T6SS2 转位蛋白 Transfer protein
<i>VipB2</i>	AAGTAATTCAGCCACGCCA CCGTAACCTTCCGTGAAGCC	T6SS2 结构蛋白 Structural protein

2 结果与分析

2.1 T6SS 基因携带情况分析

选取 T6SS1 结构蛋白 VipA1 和 T6SS2 结构蛋白 VipA2 基因,以及 4 个 T6SS1 相关基因 *vp1388*、*vp1390*、*vp1393*、*vp1415*^[17] 进行检测。结果发现,在 85 株副溶血弧菌中,有 62 株携带 T6SS1 结构基因 *vipA1*,其中临床分离株中有 41 株,占全部临床分离株的 93.2%,而环境分离株中有 21 株,占全部环境分离株的 51.2%,临床分

离株中的而 T6SS2 结构基因 *vipA2* 在所有的副溶血弧菌中广泛存在。

所检测的 4 个 T6SS1 相关基因 *vp1388*、*vp1390*、*vp1393*、*vp1415* 在 85 株所测副溶血弧菌中只有 34 株为全部阳性,其余 53 株中均至少缺少 1 个 T6SS1 相关基因,并且这其中环境分离株的缺失程度明显大于临床分离株,说明 T6SS1 基因簇在不同来源副溶血弧菌中存在一定的差异性,检测结果见表 4。

表4 临床与环境分离株 T6SS 相关基因携带情况

Tab.4 Distribution of T6SS related genes for all 85 *V. parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources

菌株数量 Number	目的基因 Target genes						
	<i>vipA1</i>	<i>vipA2</i>	<i>vp1388</i>	<i>vp1390</i>	<i>vp1393</i>	<i>vp1415</i>	
临床分离菌株数量(<i>n</i> = 44) Number of clinical isolates (<i>n</i> = 44)	<i>tdh</i> ⁺ / <i>trh</i> ⁻ (<i>n</i> = 35)	34	35	33	20	34	20
	<i>tdh</i> ⁻ / <i>trh</i> ⁺ (<i>n</i> = 5)	3	5	3	0	3	0
	<i>tdh</i> ⁺ / <i>trh</i> ⁺ (<i>n</i> = 3)	3	3	3	1	3	1
	<i>tdh</i> ⁻ / <i>trh</i> ⁻ (<i>n</i> = 1)	1	1	1	0	1	0
	总计(<i>n</i> = 44) Total(<i>n</i> = 44)	41	44	40	21	41	21
环境分离菌株数量(<i>n</i> = 41) Number of seafood isolates (<i>n</i> = 41)	<i>tdh</i> ⁺ / <i>trh</i> ⁻ (<i>n</i> = 21)	15	21	11	10	14	10
	<i>tdh</i> ⁻ / <i>trh</i> ⁺ (<i>n</i> = 11)	3	11	3	1	2	1
	<i>tdh</i> ⁺ / <i>trh</i> ⁺ (<i>n</i> = 1)	1	1	1	1	1	1
	<i>tdh</i> ⁻ / <i>trh</i> ⁻ (<i>n</i> = 8)	2	8	1	1	1	1
	总计(<i>n</i> = 41) Total(<i>n</i> = 41)	21	41	16	13	18	13

以溶血素基因为依据,所检测的 60 株 *tdh*⁺ 菌株(*tdh*⁺/*trh*⁺ 和 *tdh*⁺/*trh*⁻)中,32 株含有全部的 T6SS 基因,占 53.3%;25 株 *tdh*⁻ 菌株(*tdh*⁻/*trh*⁺ 和 *tdh*⁻/*trh*⁻)中只有 2 株含有全部的 T6SS 基因,占 8.0% (2/25),*tdh* 菌株更倾向于含有完

整的 T6SS 基因簇。以 *tdh*⁺ 和 *tdh*⁻ 为分组,T6SS1 相关基因携带情况有显著性差异, $P < 0.05$,具有统计学意义,*tdh*⁺ 菌株比 *tdh*⁻ 菌株携带更多的 T6SS1 相关基因,未发现 *trh* 基因与 T6SS1 有何相关性。

2.2 副溶血弧菌混合培养中的数量变化

以已知菌数量的 DNA 建立标准曲线, 标定 C_i 值与菌落数的关系。以 *tdh* 基因做标准曲线获得方程为 $y = 45.929 - 3.75x$, $R^2 = 0.990$; 以 *trh*

基因建立标准曲线方程为 $y = 43.575 - 3.498x$, $R^2 = 0.984$; 其扩增效率 E 在 80% ~ 120% 之间, 表明该方程能够较好地描述 C_i 值与菌落数的线性关系。见图 1。

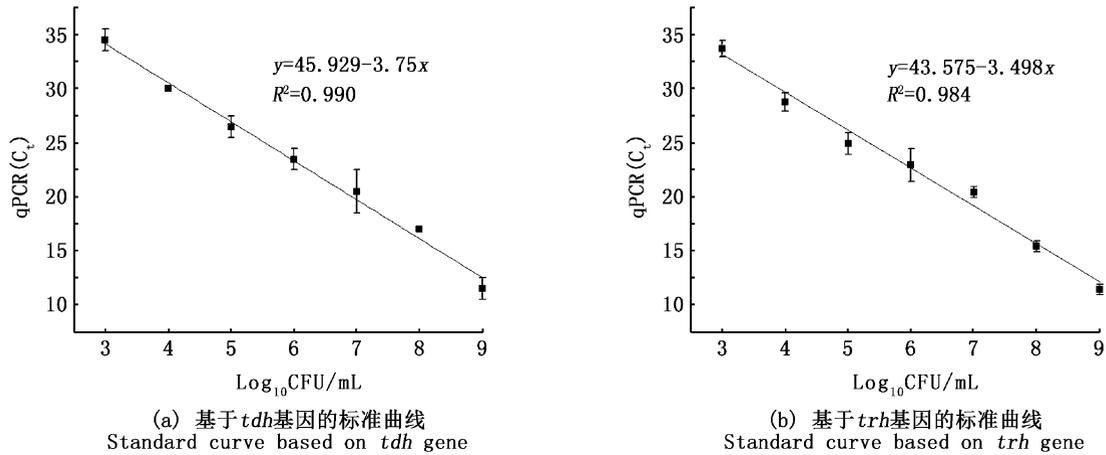


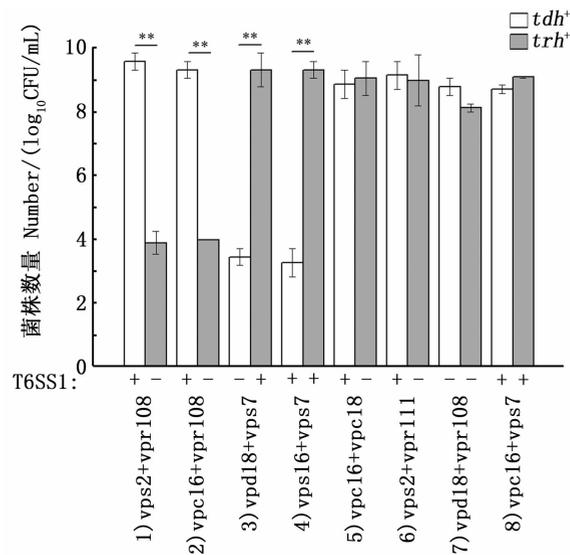
图 1 副溶血弧菌 qPCR 定量标准曲线

Fig. 1 Standard curves of qPCR for *V. parahaemolyticus*

选取 8 株菌株, 两两混合培养 8 h, 测定各菌株数量, 其中: *vps2*、*vpc16*、*vps16* 为 T6SS1⁺ 菌株, *vpd18* 为 T6SS1⁻ 菌株, 但 4 株菌都携带 *tdh* 基因, 且不含 *trh* 基因, 因此将 *tdh* 基因作为该菌株的标志基因进行细菌数量检测; 菌株 *vps7* 为 T6SS1⁺ 菌株, *vpr108*、*vpr111*、*vpc18* 为 T6SS1⁻ 菌株, 4 株菌都携带 *trh* 基因, 且不含 *tdh* 基因, 因此将 *trh* 基因作为标志基因进行细菌数量检测。

每组以相同接种量进行混合培养 8 h 后, 用 qPCR 进行数量统计。由图 2 可知: 8 组中有 4 组出现数量上的明显差异, 携带 T6SS1 的菌株 *vps2*、*vpc16* 以及 *vps7* 在特殊组别中呈现出了明显的种内竞争能力(组 1、2、3、4), 1、2 组中 *vps2* 和 *vpc16* 为优势菌株, 3、4 组中 *vps7* 为优势菌株, 并且优势菌株数量范围在 9.31 ~ 9.58 log₁₀ CFU/mL, 劣势菌只有 3.27 ~ 3.98 log₁₀ CFU/mL, 统计学分析显示两菌株之间数量差异极显著, $P < 0.01$ 。而第 5、6、7、8 组在混合培养时, 各菌株数量并未出现类似前 4 组的明显差异, 其菌数量范围均在 8.12 ~ 9.14 log₁₀ CFU/mL 之间, 差异不显著, $P > 0.05$ 。这一结果表明, 在混合培养条件下, 大部分携带 T6SS1 的副溶血弧菌存在明显的种内竞争优势, 但并非所有的 T6SS1⁺ 菌株都对 T6SS1⁻ 菌株有明显抑制作用。T6SS1⁺ 菌株对

T6SS1⁺ 菌株之间也可能存在竞争作用, *vps7* (T6SS1⁺) 可以抑制 *vps16* (T6SS1⁺), 但是 *vps7* 和 *vpc16* (T6SS1⁺) 混合培养后其数量差异不大。在 T6SS1⁻ 菌株中并未发现具有竞争优势的菌株, 当 *vpd18* (T6SS1⁻) 与 *vpr108* 混合培养, 其数量差异不大, 无显著性差异, $P > 0.05$ 。



* 表示差异显著, ** 表示差异极显著

* means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$

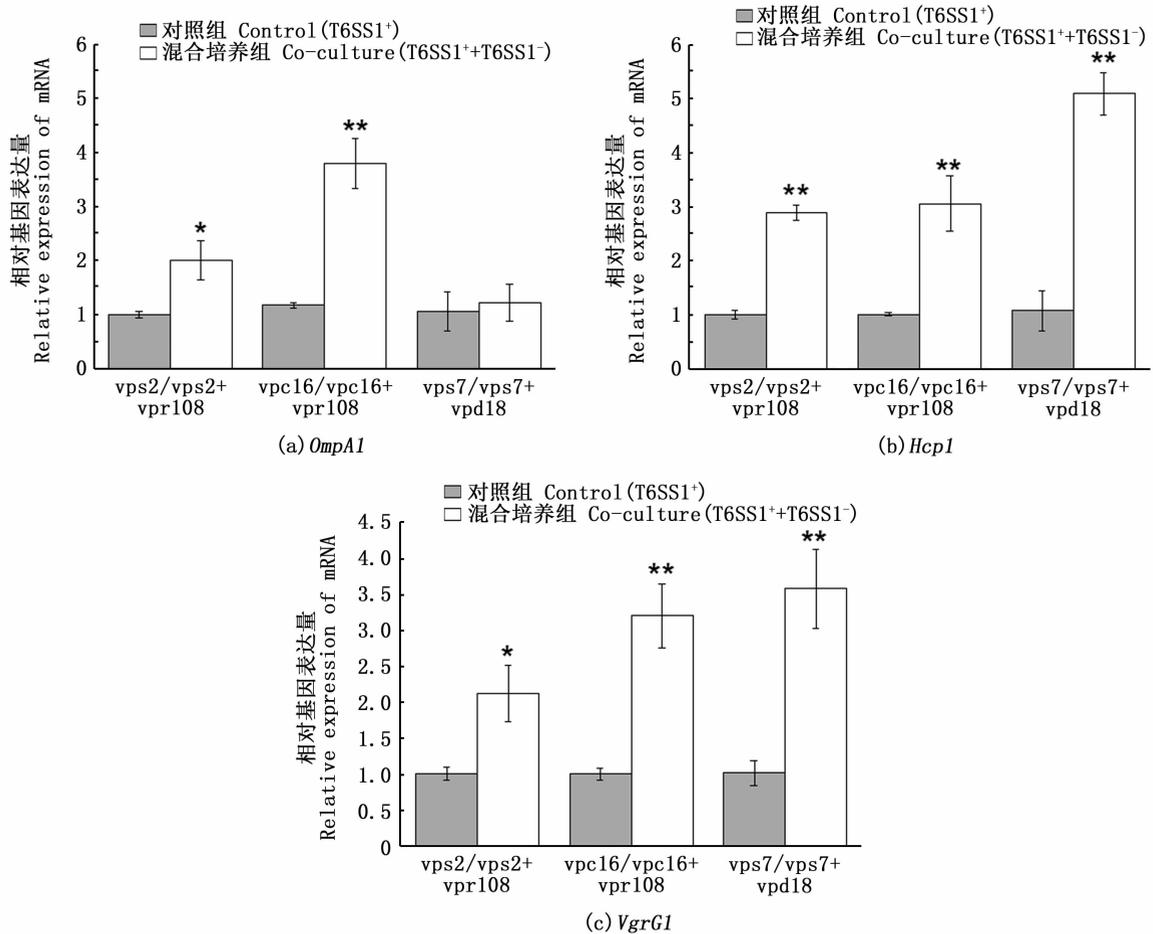
图 2 混合培养条件下不同副溶血弧菌的数量变化

Fig. 2 A competition assay of different *V. parahaemolyticus* at a 1:1 concentration

2.3 混合培养对 T6SS 相关基因表达量的影响

提取培养 8 h 后的副溶血弧菌 RNA,以单独培养时副溶血弧菌的基因表达量为参照,通过 qPCR 相对定量法 ($\Delta\Delta C_t$),观察 T6SS 相关基因 (*OmpA*、*VgrG*、*Hcp*、*VipB*) 表达变化。*OmpA* 为 T6SS 的跨膜蛋白,介导分泌蛋白的跨膜转运,*VgrG* 为 T6SS1 的转位蛋白,介导效应物的转移;*Hcp* 为 T6SS 的转位蛋白,同时也是 T6SS 的结构蛋白,构成 T6SS 注射器结构,*VipB* 是 T6SS 的结构蛋白。

较单一培养的菌株,混合培养 8 h 后的副溶血弧菌 T6SS1 相关基因 *OmpA1*、*Hcp1*、*VgrG1* 的表达量均有明显的上调,结果如图 3 所示。图 4 呈现了混合培养中副溶血弧菌 T6SS2 相关基因 *VipB2*、*Hcp2*、*VgrG2* 的表达情况,结果显示这些基因的表达量在混合培养条件下也都明显上调。导致这一现象的原因可能是,在混合培养的条件下,副溶血弧菌可通过增强自身 T6SS1 和 T6SS2 相关基因的表达,以应对其在混合培养中的种内竞争。



* 表示差异显著, ** 表示差异极显著
* means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$

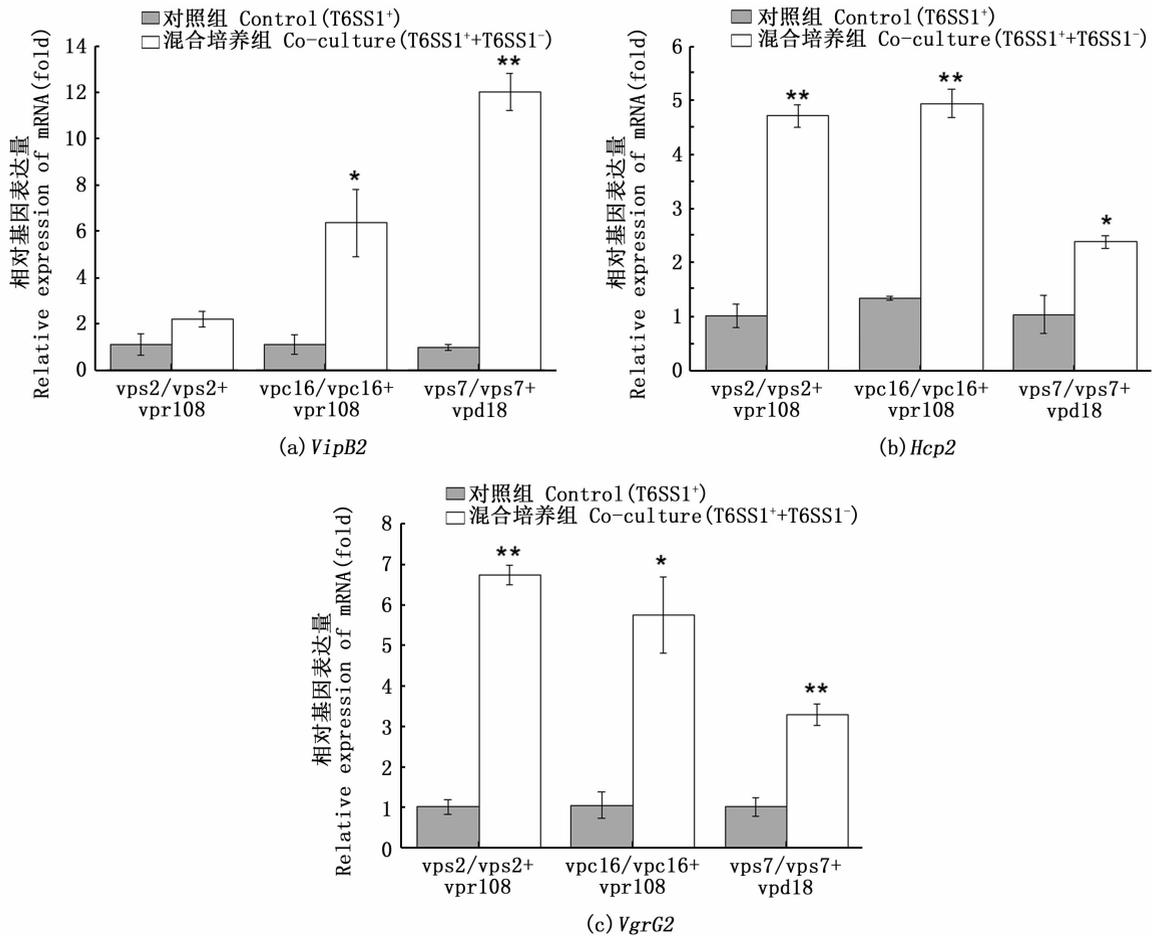
图 3 混合培养后不同组副溶血弧菌 T6SS1 相关基因表达水平
Fig. 3 T6SS1 genes expression of qPCR analysis in *V. parahaemolyticus*

3 讨论

对 85 株副溶血弧菌的基因检测发现,大约 90% 的临床分离株携带 T6SS1 基因,而在环境分离菌株中,只有约一半的菌株携带部分所检测的

T6SS1 基因。针对 T6SS1 的主要结构蛋白进行调查,发现在副溶血弧菌临床分离株中的 T6SS1 基因存在比例要远远高于环境分离株,而 T6SS2 存在于所有的副溶血弧菌中。这一结果大致与之前的报道^[17]一致,比例上的差异可能跟细菌的分

类不同(按血清型分类或按分离来源分类)有关,也有可能和不同地区分离的细菌背景不同有关。



* 表示差异显著, ** 表示差异极显著

* means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$

图4 混合培养后不同组副溶血弧菌 T6SS2 相关基因表达水平

Fig. 4 T6SS2 genes expression of qPCR analysis in *V. parahaemolyticus*

T6SS 是近年来新发现的与细菌致病力和适应性密切相关的分泌系统,费氏弧菌可依赖 VI 型分泌系统杀死非致病菌株,从而进行种内竞争^[18]。在霍乱弧菌中 T6SS 介导抗菌作用和种内竞争^[19-20],副溶血弧菌的基因组结构与霍乱弧菌的基因结构相似,因此,我们推测副溶血弧菌的 T6SS 在功能上可能与霍乱弧菌相似,与种内竞争相关^[12,21]。本研究通过混合接种的方式,进一步证实了该观点:部分 T6SS1⁺ 的副溶血弧菌存在明显的种内竞争优势,混合接种条件下能够特异性地明显抑制其他同种菌株的生长繁殖。

在本实验条件下,有一部分 T6SS1⁺ 的菌株可与 T6SS1⁻ 菌株兼容共生,例如 vpc16 和 vpc18, vps2 和 vpr11,并且在 T6SS1⁺ 与 T6SS1⁺ 菌株的

混合培养组中,有 1 组出现了数量上的差异(vps16 和 vps7),1 组兼容共存(vps7 和 vpc16)。造成这一现象的原因可能是,这些菌株的 T6SS1 相关基因存在不同程度的突变或缺失,导致其种内竞争能力不能很好地展现。针对研究结果,提出这样的推测:(1) 副溶血弧菌针对的是一种细菌成分,这种成分在某些菌株中是不存在的,或者对某些菌株种类来说不是必需的,这可能和 T6SS1 相关基因存在不同程度的突变或缺失有关;(2) 部分菌株能抑制 T6SS1 活性;(3) 一些菌株对 T6SS1 的毒性具有抵抗力,例如霍乱弧菌和费氏弧菌的 T6SS 可以选择性的抑制同种菌株^[12,18]。

进一步分析 T6SS1 相关基因的表达情况,结

果显示在混合培养之后,其相关基因表达量均上调,这证实了混合培养确实激活了 T6SS1 的表达。并且,研究表明 T6SS2 在混合培养后的基因相对表达量也显著上调,这是否说明 T6SS2 也参与混合培养下的种内竞争? 本研究初步探究了副溶血弧菌VI型分泌系统对其种内竞争的影响,表明 T6SS1 的存在可明显地提升副溶血弧菌在混合培养中的生长能力,是其进行种内竞争的主要工具之一。但是在自然环境中,副溶血弧菌的种内竞争现象可能不只由 T6SS1 单一因素介导,可能是由于多种基因共同作用的结果,其作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LETCHUMANAN V, CHAN K G, LEE L H. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 705.
- [2] TSAI S E, JONG K J, TEY Y H, et al. Molecular characterization of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Taiwan[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(1): 18-26.
- [3] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌病发病率[J]. *中华疾病控制杂志*, 2013, 17(3): 265-267.
- MAO X D, HU J F, LIU X M. Study on incidence of foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* by literature review method [J] *Chinese Journal of Disease Control & Prevention*, 2013, 17(3): 265-267.
- [4] WANG R Z, FANG S, WU D L, et al. Screening for a single-chain variable-fragment antibody that can effectively neutralize the cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus* thermostable hemolysin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(14): 4967-4975.
- [5] LI P, KINCH L N, RAY A, et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00737-17.
- [6] BOYD E F, COHEN A L V, NAUGHTON L M, et al. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8(1): 110.
- [7] HACHANI A, WOOD T E, FILLOUX A. Type VI secretion and anti-host effectors[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 29: 81-93.
- [8] RINGEL P D, HU D, BASLER M. The role of type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer[J]. *Cell Reports*, 2017, 21(13): 3927-3940.
- [9] WANG J F, ZHOU Z H, HE F, et al. The role of the type VI secretion system *vgrG* gene in the virulence and antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192288.
- [10] UNTERWEGER D, KITAOKA M, MIYATA S T, et al. Constitutive type VI secretion system expression gives *Vibrio cholerae* intra- and interspecific competitive advantages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48320.
- [11] UNTERWEGER D, MIYATA S T, BACHMANN V, et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3549.
- [12] SALOMON D, GONZALEZ H, UPDEGRAFF B L, et al. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086.
- [13] WEST C K G, KLEIN S L, LOVELL C R. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(7): 2247-2252.
- [14] 牛犇, 穆丽丽, 张昭寰, 等. 低温条件下即食虾中单增李斯特菌与副溶血性弧菌共存分子预测模型的建立[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 1-6.
- NIU B, MU L L, ZHANG Z H, et al. Development of predictive models based on qPCR for the growth of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* coexisting on cooked shrimps stored at low temperatures[J]. *Food Science*, 2018, 39(23): 1-6.
- [15] NIU B, MU L L, XIAO L L, et al. Reduction of infection risk mediated by co-culturing *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked shrimp [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(12): 4454-4461.
- [16] WANG L, LING Y, JIANG H W, et al. *AphA* is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 245-251.
- [17] 柴旭锋, 齐家伟, 赵莉, 等. 副溶血弧菌在鱼鳞表面形成生物被膜的动态过程及酸性电解水对其清除效果[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 792-800.
- CHAI X F, QI J W, ZHAO L, et al. Eradication effect of acidic electrolyzed water on *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formed on fish scale surface[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 792-800.
- [18] SPEARE L, CECERE A G, GUCKES K R, et al. Bacterial symbionts use a type VI secretion system to eliminate competitors in their natural host [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(36): E8528-E8537.

- [19] SALOMON D, KINCH L N, TRUDGIAN D C, et al. Marker for type VI secretion system effectors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(25): 9271-9276.
- [20] RAY A, SCHWARTZ N, DE SOUZA SANTOS M, et al. Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities [J]. EMBO Reports, 2017, 18(11): 1978-1990.
- [21] JIANG N, TANG L, XIE R Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* RhsP represents a widespread group of pro-effectors for type VI secretion systems[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3899.

Effect of *Vibrio parahaemolyticus* T6SS on intraspecific competition

MU Lili¹, NIU Ben¹, ZHANG Zhaohuan¹, WANG Siqi¹, WANG Jingjing¹, LIU Haiquan^{1,2,3,4}, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 4. Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The 85 strains of *Vibrio parahaemolyticus* harboring the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretory system (T6SS) related genes were investigated in this study. The T6SS1⁺ and T6SS1⁻ strains chosen were analysed in mixed culture to explore their intraspecific competition. The qPCR technology was employed to analyze the expression of related genes of T6SS. The results show that: although all *Vibrio parahaemolyticus* harbored T6SS2, T6SS1 were found in a certain number of strains, 85 strains of *Vibrio parahaemolyticus* all carried T6SS2, and 62 strains of *Vibrio parahaemolyticus* carried T6SS1, of which 41 were clinical isolates, accounting for 93.2% of all clinical isolates; there were 21 environmental isolates, accounting for 51.2% of all environmental isolates, T6SS1 gene clusters were different in *Vibrio parahaemolyticus* from different sources. Some T6SS1⁺ strains had significant intraspecific competitive advantages, which could suppress the growth of other strains in mixed culture. Compared with monoculture strains, the expression levels of T6SS1 and T6SS2 strains were significantly up-regulated in mixed culture. The reason for this phenomenon might be that strains could strengthen the expression of its related T6SS1 and T6SS2 genes to enhance its competitiveness in the species. The influence of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system on its intraspecies competition was preliminarily explored, providing scientific reference for further revealing *Vibrio parahaemolyticus* T6SS function.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; T6SS; intraspecific competition; quantitative real-time PCR; gen expression