

## 副溶血性弧菌 *vtrB* 基因敲除菌株的构建及其在抵抗胆汁中的作用

郜蓉, 后来旺, 赵勇, 潘迎捷, 孙晓红

### Construction of *vtrB* gene knockout strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its role in bile resistance

GAO Rong, HOU Laiwang, ZHAO Yong, PAN Yingjie, SUN Xiaohong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200403004>

#### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 不同振动模式对副溶血性弧菌生物被膜形成的影响

Effects of different vibration modes on *Vibrio parahaemolyticus* biofilm

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 950 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402619>

#### 三株AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性

Isolation, identification and biological properties of 3 lytic bacteriophages against AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus*

水产学报. 2019, 43(5): 1378 <https://doi.org/10.11964/jfc.20180711345>

#### 混合培养对副溶血性弧菌致病株和非致病株生长的影响

Effects of mixed culture on the growth of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2017, 26(5): 776 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170502041>

#### 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析

Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp Culture Ponds and Analysis of its Drug Resistance and Virulence Genes

渔业科学进展. 2020, 41(6): 174 <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20190820003>

#### 巴氏消毒及冷藏温度作用下副溶血弧菌菌株失活异质性的比较

Inactivation variability of *Vibrio parahaemolyticus* under sterilization and storage temperature

上海海洋大学学报. 2020, 29(3): 420 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302568>

#### 生食三文鱼中副溶血性弧菌污染调查及耐药性分析

Infection Survey and Drug Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Atlantic Salmon

水产科学. 2018, 37(2): 267 <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.2018.02.021>

文章编号: 1674-5566(2021)03-0555-09

DOI:10.12024/jsou.20200403004

## 副溶血性弧菌 *vtrB* 基因敲除菌株的构建及其在抵抗胆汁中的作用

郜 蓉<sup>1</sup>, 后来旺<sup>1</sup>, 赵 勇<sup>1,2,3</sup>, 潘迎捷<sup>1,2</sup>, 孙晓红<sup>1,2,3</sup>

(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 210306)

**摘 要:** 构建副溶血性弧菌转录调节因子 *VtrB* (*V. parahaemolyticus* T3SS2 regulator B) 敲除菌株和回补菌株, 探讨 *VtrB* 在副溶血性弧菌抵抗胆汁中的作用。根据 GenBank 数据库中副溶血性弧菌 *vtrB* 基因上下游序列设计引物, 通过融合 PCR 将 *vtrB* 基因上下游同源臂融合并克隆入自杀质粒 pDS132 中, 将重组自杀质粒转入大肠杆菌 S17-1  $\lambda$ pir 中, 再接合转移至副溶血性弧菌中进行同源重组, 通过 10% 蔗糖筛选获得 *vtrB* 基因突变株  $\Delta$ *vtrB*。将 pBAD33-*vtrB* 重组质粒电转入  $\Delta$ *vtrB* 突变株中获得回补菌株 C- $\Delta$ *vtrB*。研究副溶血性弧菌野生型、突变株和回补株在 2% 脱氧胆酸盐 (DOC) 处理后的存活率。基于同源重组原理, 经 *vtrB* 基因的 PCR 扩增和转录水平检测结果表明, 成功获得副溶血性弧菌 *vtrB* 基因缺失突变株  $\Delta$ *vtrB* 和回补株 C- $\Delta$ *vtrB*。与野生型和回补菌株 C- $\Delta$ *vtrB* 相比,  $\Delta$ *vtrB* 突变株在 2% DOC 处理 20、40 和 60 min 后的存活率分别为 17%、4% 和 1%, *vtrB* 基因的失活使得副溶血性弧菌对胆汁抵抗能力极显著降低 ( $P < 0.001$ ), 表现出存活能力的缺陷。由此表明, 转录调节因子 *VtrB* 有助于副溶血性弧菌对胆汁的抵抗。

**关键词:** 副溶血性弧菌; *vtrB* 基因; 基因敲除; 同源重组; 胆汁抵抗

**中图分类号:** S 933

**文献标志码:** A

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是革兰氏阴性嗜盐细菌, 广泛存在于世界各地的海洋和河口环境中, 并且通过被污染的水或者未煮熟的海鲜进入人体, 从而导致急性胃肠炎<sup>[1-3]</sup>。作为一种重要的肠道病原体, 副溶血性弧菌必须克服多种宿主因子的挑战才能成功定殖于人体胃肠道并引起胃肠炎, 其中胆汁是副溶血性弧菌在感染期间遇到的一种宿主因子。胆汁由多种成分组成, 包括蛋白质、离子、色素、胆固醇和胆汁盐, 它们对人体的消化和营养吸收至关重要。在这些成分中, 胆汁盐已被证明可以保护人体免受致病菌的伤害。研究<sup>[4-6]</sup>表明, 当小肠内胆汁盐含量高时, 细菌的生长受到抑制, 而当胆汁分泌减少后, 患者的小肠内又会出现细菌的过度生长。因此, 胆汁盐不仅有助于脂肪的消化, 还具有杀菌作用。然而, 包括副溶血性弧菌在内的肠道致病菌不仅进化出了对胆汁杀菌特性的抵抗

能力, 而且还可以利用胆汁来诱导毒力基因的表达, 从而在胃肠道中定殖并进行有效感染<sup>[7-8]</sup>。因此, 具有对胆汁的抵抗能力是副溶血性弧菌在宿主细胞中长期存活的关键因素之一。

*VtrB* (*V. parahaemolyticus* T3SS2 regulator B) 是在神奈川现象 (KP) 阳性副溶血性弧菌的致病岛 (Vp-PAI) 上的一种新型 ToxR 样转录调节蛋白。在副溶血性弧菌感染宿主时, 转录调节因子 ToxR 有助于副溶血性弧菌对胆汁的抵抗<sup>[9-11]</sup>。*VtrB* 与 ToxR 的 N 末端具有同源性, 研究表明其在胆汁存在时能被诱导表达, 进而增强副溶血性弧菌 TDH 和 T3SS2 介导的细胞毒性和肠毒性。因此, *VtrB* 被认为是胆汁诱导的 Vp-PAI 中毒力基因表达的关键调控因子<sup>[12-14]</sup>。然而作为胆汁依赖性转录调节蛋白, *VtrB* 在副溶血性弧菌抵抗胆汁中的作用以及在胆汁诱导下对毒力基因的整体调控功能还不明确。

收稿日期: 2020-04-17 修回日期: 2020-06-09

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (2019-02-08-00-10-F01149); 上海市科学技术委员会平台能力建设项目 (19DZ2284000)

作者简介: 郜 蓉 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性致病菌致病机理。E-mail: 15021047932@163.com

通信作者: 孙晓红, E-mail: xhsun@shou.edu.cn

基因敲除又叫基因打靶,是建立在同源重组基础上以达到细胞内某一目的基因敲除的一种新型分子生物学技术。多年来,基因敲除技术已成为研究微生物中特定基因功能最重要的手段之一,在生物学等科研领域中都具有非常重要的价值<sup>[15-16]</sup>。基于自杀载体的同源重组法是基因敲除技术中的一种,其基本原理是构建含目的基因同源臂的重组自杀质粒,利用宿主自身的重组系统在同源重组序列间交换,由于自杀性载体在两次重组过程中可丢失上述重组质粒而完成重

组,最终实现目的基因的敲除。该方法操作简单,重组效率高,被广泛应用于基因功能研究中<sup>[17]</sup>。因此,为了解 VtrB 在副溶血性弧菌抵抗胆汁中的作用,采用 pDS132 自杀载体同源重组的方法对副溶血性弧菌 *vtrB* 基因进行敲除,原理见图 1,随后利用表达载体 pBAD33 对 *vtrB* 基因进行回补,并研究突变株在胆汁胁迫下的生长特性,为深入了解 *vtrB* 基因功能、解析副溶血性弧菌的胆汁抵抗机理奠定基础,为副溶血性弧菌引起的疾病的预防和控制提供新靶点。

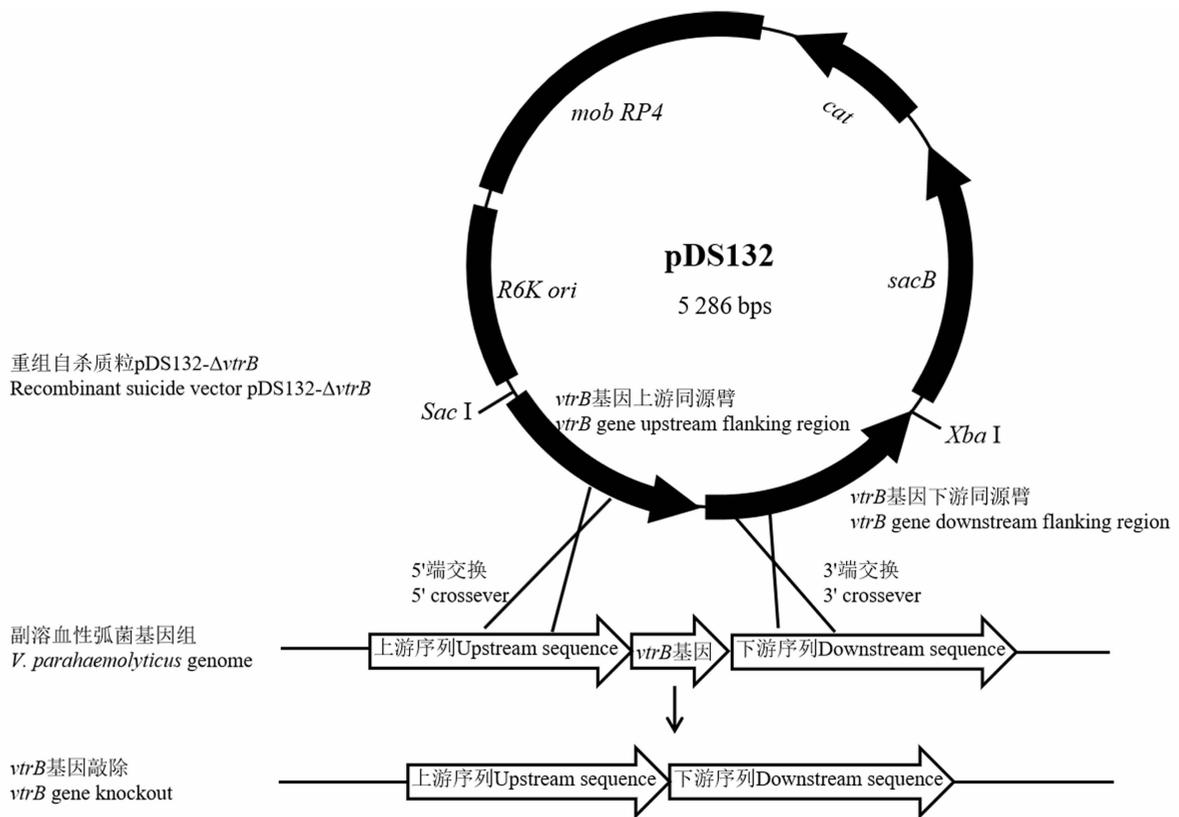


图 1 同源重组敲除副溶血性弧菌 *vtrB* 基因原理图

Fig. 1 Diagram showing homologous knockout of *vtrB* gene in *V. parahaemolyticus*

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

副溶血性弧菌 Vp6 菌株 (Wild Type Strain, WT) (O3;K6 血清型, KP<sup>+</sup>, tdh<sup>+</sup>, Sm<sup>r</sup>) 由本实验室保存; pDS132 自杀质粒 (Cm<sup>r</sup>) 由法国格勒诺布尔大学 Dominique Schneider 教授惠赠, pBAD33 质粒 (Cm<sup>r</sup>) 为华东理工大学吴辉教授赠送, 感受

态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自上海唯地生物技术有限公司, *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 菌株由江苏大学张义全教授馈赠。

#### 1.1.2 主要试剂

LB 培养基和 TCBS 培养基购自陆桥技术有限责任公司; Premix Taq (Ex Taq Version 2.0 plus dye), 高保真 DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Xba* I、*Sac* I 和 *Hind* III 及其缓冲液购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶及其缓冲液、DNA marker、质粒提

取试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;NaCl、蔗糖、L-阿拉伯糖、链霉素(Sm)和氯霉素(Cm)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 产物以及胶回收试剂盒和反转录试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司;脱氧胆酸钠购自 Sigma 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *vtbB* 基因上下游同源臂及融合片段的扩增

根据 GenBank 上公布的副溶血性弧菌中 *vtbB* 基因(BA000032.2)及其上下游核苷酸序列,利用生物学软件 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1),

并由生工生物有限公司合成。以副溶血性弧菌 *Vp6* 菌株基因组 DNA 为模板,用 *vtbB*-up-F、*vtbB*-up-R 和 *vtbB*-down-F、*vtbB*-down-R 两对引物分别扩增 *vtbB* 基因上下游同源臂片段。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s,56 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并回收纯化。将回收获得的上下游同源臂片段等比例混合,以混合的 DNA 片段为模板,引物 *vtbB*-up-F 和 *vtbB*-down-R 进行融合 PCR 扩增同源臂融合片段,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 *vtbB* 基因突变株构建及鉴定用引物

Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting site
<i>vtbB</i> -up-F	<b>GC</b> TCTAGA GTTTCATACACCGATTTG	<i>Xba</i> I
<i>vtbB</i> -up-R	AAAATCATCGAGTAAGTAGTTTCTTAACAT	-
<i>vtbB</i> -down-F	ACTACTTACTCGATGATTTTGTTCCTTAAA	-
<i>vtbB</i> -down-R	C GAGCTC TTCCAGCTATCTACCAAG	<i>Sac</i> I
<i>vtbB</i> -HB-F	<b>GC</b> TCTAGA ATGTTAAGAACTACTTACTAGGAA	<i>Xba</i> I
<i>vtbB</i> -HB-R	<b>CC</b> AAGCTT TTATTTAAGCAACAAAATCATCG	<i>Hind</i> III
pDS132-F	GTTTCTGTTGCATGGGCATAAAG	-
pDS132-R	AACAAGCCAGGGATGTAACG	-
pBAD33-F	ATGCCATAGCATTTTTATCC	-
pBAD33-R	GATTTAATCTGTATCAGG	-
<i>vtbB</i> -RT-F	TTATTTAAGCAACAAAATCATCGCCG	-
<i>vtbB</i> -RT-F	ATGTTAAGAACTACTTACTAGGAAACC	-

注:加粗部分为保护碱基,下划线标记为酶切位点。

Notes: Bold letters represent protective base, underline marked letters represent restriction enzyme cutting sites.

### 1.2.2 重组自杀质粒 pDS132- $\Delta$ *vtbB* 的构建

采用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 对融合片段进行双酶切,经酶切产物回收后与相同内切酶双酶切并胶回收的 pDS132 自杀质粒连接。连接产物转化入 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 感受态细胞中,在含有 30  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆。随后分别以引物对 *vtbB*-up-F、*vtbB*-down-R 和 pDS132-F、pDS132-R 进行 PCR 检测和测序鉴定。

### 1.2.3 副溶血性弧菌 *vtbB* 突变株的构建

通过接合转移将自杀质粒 pDS132- $\Delta$ *vtbB* 从供体菌 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 导入副溶血性弧菌 *Vp6* 中。在含 5  $\mu$ g/mL Cm 的 TCBS 平板上挑选阳性重组克隆,接种在含 10% 蔗糖的 LB 平板上进行同源重组。挑取单菌落分别转接于不含 Cm 抗性

培养。挑选能在前者生长但不能在后者生长的单克隆,用外侧引物 *vtbB*-up-F、*vtbB*-down-R 和内部引物 *vtbB*-F、*vtbB*-R 对单克隆进行 PCR 鉴定。

### 1.2.4 *vtbB* 基因回补株的构建

以副溶血性弧菌 *Vp6* 基因组 DNA 为模板进行 *vtbB* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应条件:98 ℃ 10 s;55 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。对扩增回收后的片段利用 *Xba* I 和 *Hind* III 进行双酶切,与 pBAD33 表达载体连接。连接产物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含有 30  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 培养板上进行筛选,并用 *vtbB*-HB-F 和 *vtbB*-HB-R 引物进行 PCR 扩增鉴定。正确的阳性克隆经测序验证无误后电转化入  $\Delta$ *vtbB* 突变株感受态细胞中,并用引物 pBAD33-F 和 pBAD33-R 对阳性质粒进行 PCR 检测。

### 1.2.5 $\Delta vtrB$ 突变株和 C- $\Delta vtrB$ 回补株中 $vtrB$ 基因转录水平检测

用 Trizol 法提取 WT、 $\Delta vtrB$  和 C- $\Delta vtrB$  菌株的总 RNA。利用反转录试剂盒去除总 RNA 中残留的 DNA 后反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用引物  $vtrB$ -RT-F 和  $vtrB$ -RT-R 进行 PCR 扩增。通过比较野生型、 $vtrB$  突变株和回补株的 RT-PCR 扩增结果来判定  $\Delta vtrB$  和 C- $\Delta vtrB$  菌株中  $vtrB$  基因的转录情况。

### 1.2.6 WT、 $\Delta vtrB$ 和 C- $\Delta vtrB$ 菌株在脱氧胆酸盐胁迫下的存活率测定

将 WT 和  $\Delta vtrB$  菌株接种于 5 mL 的含 Sm 的 LB 液体培养基中,同时将 C- $\Delta vtrB$  菌株接种于 5 mL 的补充有 0.2% 阿拉伯糖的含 Sm 和 Cm 的 LB 液体培养基中,培养至对数中期。离心获得菌体后重悬于补充或未补充 2% 脱氧胆酸盐 (DOC)<sup>[18]</sup> 的 LB 液体培养基中,37 °C 分别孵育 20、40 和 60 min 后进行菌落计数。

## 2 结果

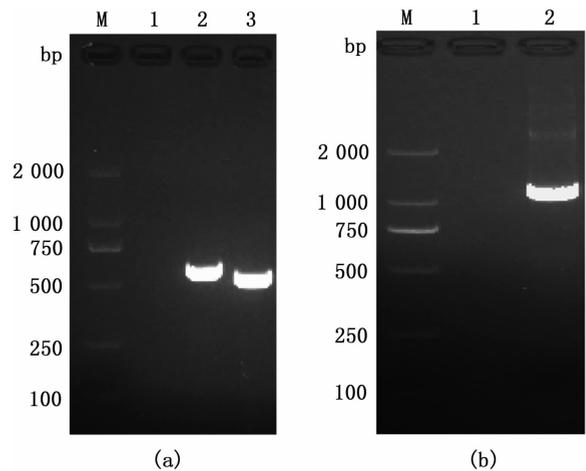
### 2.1 $vtrB$ 基因的上下游同源臂扩增及融合 PCR

以副溶血性弧菌 WT 菌株基因组 DNA 为模板,利用特异性引物  $vtrB$ -up-F、 $vtrB$ -up-R 和  $vtrB$ -down-F、 $vtrB$ -down-R 分别对  $vtrB$  基因上、下游同源臂进行 PCR 扩增,结果见图 2a,成功扩增得到  $vtrB$  基因上游同源臂片段(大小为 542 bp)和下游同源臂片段(大小为 497 bp)。随后以等比例混合的上下游同源臂片段作为模板,用引物  $vtrB$ -up-F 和  $vtrB$ -down-R 进行融合 PCR,扩增得到长度为 1 000 bp 左右的融合片段,电泳结果与预期大小相符(图 2b)。

### 2.2 重组自杀质粒 pDS132- $\Delta vtrB$ 的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 分别对  $vtrB$  基因上下游同源臂融合片段和质粒 pDS132 进行双酶切,连接后转入 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 感受态细胞中,用含 Cm 的 LB 平板筛选阳性克隆,采用引物  $vtrB$ -up-F 和  $vtrB$ -down-R 对目的重组自杀质粒进行鉴定,结果见图 3。以空质粒 pDS132 为模板未扩增出条带,以重组自杀质粒 pDS132- $\Delta vtrB$  为模板扩增出长度为 1 000 bp 的片段,结果与预期相符。测序后序列比对结果也与预期序列信息完全相符,表明  $vtrB$  基因上下游同源臂已成功插

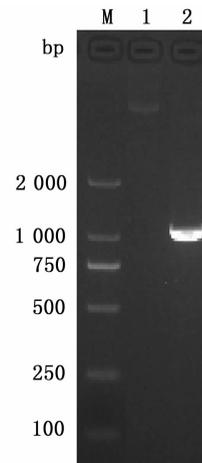
入 pDS132 的 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点之间,获得重组自杀质粒 pDS132- $\Delta vtrB$ 。



(a)  $vtrB$  上下游同源臂 PCR 扩增结果。M. D2 000 DNA marker; 1. 阴性对照(以 ddH<sub>2</sub>O 为模板); 2. 上游同源臂; 3. 下游同源臂; (b) 融合片段 PCR 扩增结果。M. D2 000 DNA marker; 1. 阴性对照(以 ddH<sub>2</sub>O 为模板); 2. 融合片段。

(a) Amplification flanking regions of  $vtrB$ . M. D2 000 DNA marker; 1. ddH<sub>2</sub>O; 2. Upstream flanking region; 3. Downstream flanking region; (b) Fusion of flanking regions. M. D2 000 DNA marker; 1. ddH<sub>2</sub>O; 2. Fusion fragment.

图 2  $vtrB$  基因上下游同源臂及融合片段扩增结果  
Fig. 2 Amplification and fusion of flanking regions of  $vtrB$  gene



M. D2 000 DNA marker; 1. 空质粒(pDS132); 2. 敲除质粒 pDS132- $\Delta vtrB$  的阳性克隆。

M. D2 000 DNA marker; 1. pDS132 plasmid; 2. Positive clones carrying knockout vector pDS132- $\Delta vtrB$ .

图 3 重组自杀质粒的 PCR 鉴定  
Fig. 3 PCR identification of the recombinant suicide vectors

### 2.3 副溶血性弧菌 *vtrB* 突变株的筛选与鉴定

将含有 pDS132- $\Delta vtrB$  的 *E. coli* S17-1  $\lambda pir$  与副溶血性弧菌 Vp6 菌株进行接合转移,在含 10% 蔗糖的 LB 平板上进行同源重组。随后在不含和含 Cm 的 LB 平板上筛选单克隆,结果见图 4,在含 Cm 平板上不能生长而在不含 Cm 的平板上生长的菌落即为 *vtrB* 突变株的疑似菌落。选取疑似菌株采用 *vtrB* 基因外侧引物和内部引物进行 PCR 鉴定,结果如图 5 所示,当引物为 *vtrB* 基因

外侧引物 *vtrB*-up-F 和 *vtrB*-down-R 时,以 WT 菌株的基因组 DNA 为模板扩增的片段大小为 1 550 bp,以重组自杀质粒 pDS132- $\Delta vtrB$  和突变株 DNA 为模板扩增的片段大小为 1 000 bp,与预期结果一致(图 5a)。当引物为 *vtrB* 基因内侧引物 *vtrB*-F 和 *vtrB*-R 时,WT 扩增片段大小为 500 bp, pDS132- $\Delta vtrB$  与突变株不能扩增出条带,与预期结果一致(图 5b)。这表明副溶血性弧菌成功缺失了 *vtrB* 基因,获得 *vtrB* 基因突变株  $\Delta vtrB$ 。

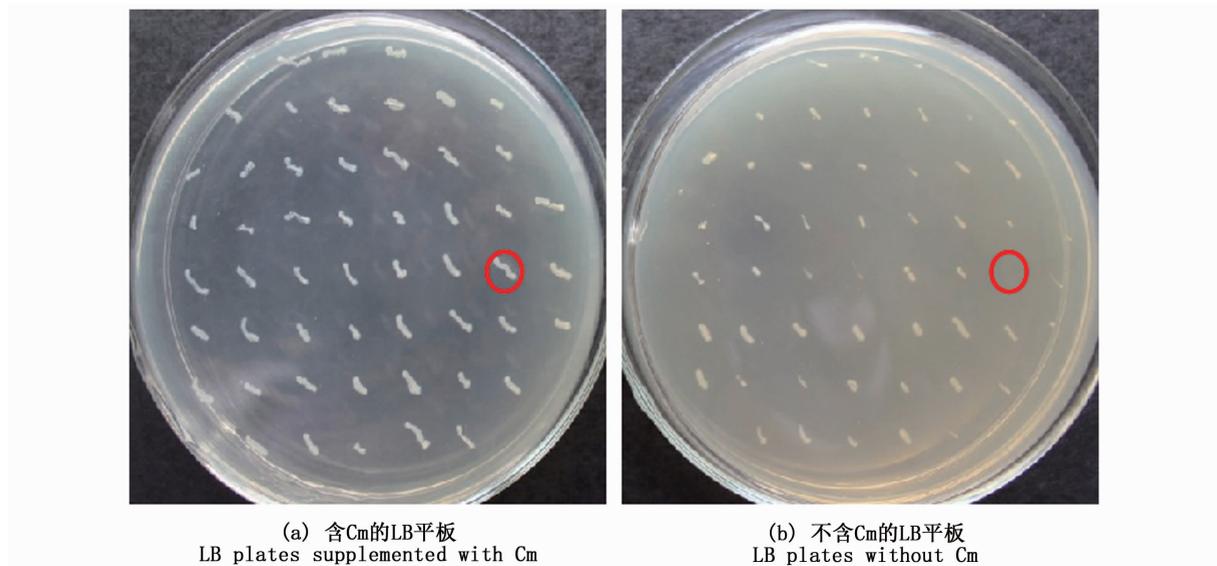
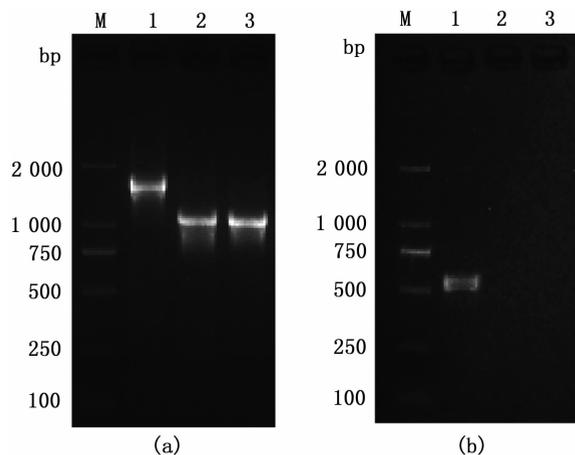


图 4 *Vp6- $\Delta vtrB$*  菌株的筛选照片(红圈表示疑似菌落)

Fig. 4 Screen of *Vp6- $\Delta vtrB$*  strains (red circles indicate suspected colonies)



(a) 以 *vtrB*-up-F/*vtrB*-down-R 为外侧引物对的 PCR 扩增结果;  
(b) 以 *vtrB*-F/R 为内引物对的 PCR 扩增结果。M. D 2000 DNA marker; 1. WT 株; 2. pDS132- $\Delta vtrB$ ; 3. 突变株。

(a) The flanking primers of *vtrB* were used for PCR amplification;  
(b) The internal primers of *vtrB* were used for PCR amplification.  
M. D 2000 DNA marker; 1. WT strain; 2. pDS132- $\Delta vtrB$ ;  
3.  $\Delta vtrB$  mutant.

图 5 *vtrB* 突变株的 PCR 鉴定

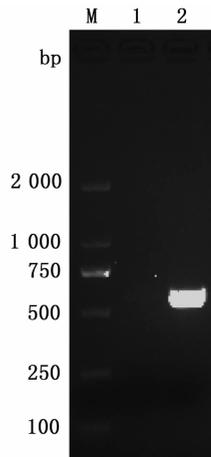
Fig. 5 PCR identification of the *vtrB* mutant

### 2.4 *vtrB* 基因回补株的构建

以 WT 菌株基因组 DNA 为模板,采用引物 *vtrB*-HB-F 和 *vtrB*-HB-R 扩增 *vtrB* 基因全长,将 PCR 产物纯化后与表达载体 pBAD33 在体外进行连接,然后转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,采用引物 *vtrB*-HB-F 和 *vtrB*-HB-R 进行 PCR 鉴定,以空质粒为模板未扩增出条带,以重组质粒 pBAD33-*vtrB* 为模板扩增的片段大小为 500 bp 左右,结果与预期相符,测序结果也与 *vtrB* 基因序列一致,证实重组质粒 pBAD33-*vtrB* 构建成功,可用于副溶血性弧菌 *vtrB* 回补株的构建。见图 6。

将重组质粒 pBAD33-*vtrB* 电转入副溶血性弧菌  $\Delta vtrB$  突变株中,采用引物 pBAD33-F 和 pBAD33-R 进行 PCR 扩增,结果见图 7,以重组质粒 pBAD33-*vtrB* 和 *vtrB* 基因回补株 DNA 为模板扩增的片段大小约为 750 bp,而以 pBAD33 空质粒、WT/pBAD33 和  $\Delta vtrB$ /pBAD33 菌株 DNA 为

模板扩增的片段大小约为 200 bp,表明成功构建副溶血性弧菌 *vtbB* 基因回补株 C- $\Delta$ *vtbB*。

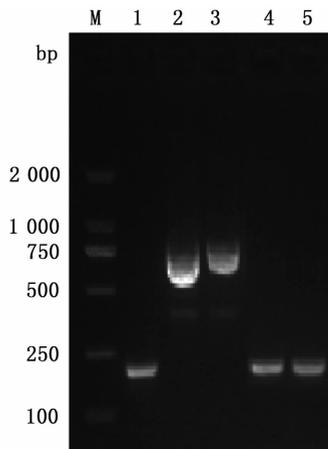


M. D2 000 DNA marker; 1. pBAD33 空质粒; 2. 重组质粒 pBAD33-*vtbB*。

M. D2 000 DNA marker; 1. pBAD33 plasmids; 2. pBAD33-*vtbB*。

图 6 重组质粒 PCR 鉴定电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of recombinant plasmid



M. D2 000 DNA marker; 1. pBAD33 空质粒; 2. pBAD33-*vtbB*; 3. 回补株(C- $\Delta$ *vtbB*); 4. WT/pBAD33; 5.  $\Delta$ *vtbB*/pBAD33。

M. D2 000 DNA marker; 1. pBAD33 plasmid; 2. pBAD33-*vtbB*; 3. C- $\Delta$ *vtbB*; 4. WT/pBAD33; 5.  $\Delta$ *vtbB*/pBAD33

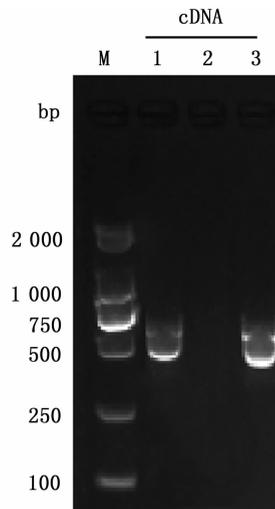
图 7 *vtbB* 基因回补株的鉴定

Fig. 7 PCR identification of the C- $\Delta$ *vtbB* strain

## 2.5 突变株和回补株中 *vtbB* 基因转录水平验证

分别提取 WT、 $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株总 RNA, 采用引物 *vtbB*-RT-F 和 *vtbB*-RT-R 进行 RT-PCR 扩增以验证  $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株中 *vtbB* 基因的转

录活性。以  $\Delta$ *vtbB* 突变株 cDNA 为模板未扩增出条带,以 WT 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株 cDNA 为模板扩增的片段大小为 500 bp 左右,与 *vtbB* 基因大小一致。这表明  $\Delta$ *vtbB* 突变株中无 *vtbB* 基因的 mRNA,而 C- $\Delta$ *vtbB* 中 *vtbB* 基因具有转录活性,进一步证明成功构建副溶血性弧菌 *vtbB* 基因突变株与回补株。见图 8。



M. D2 000 DNA marker; 1-3. WT、 $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株的 cDNA。

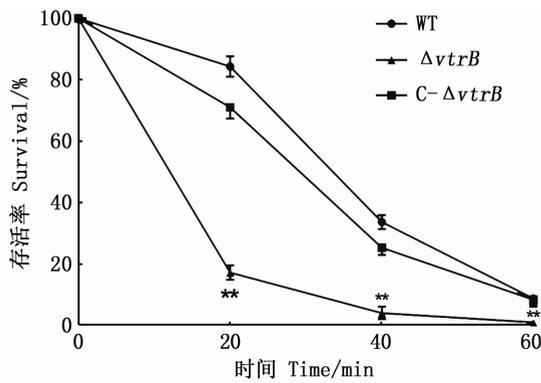
M. D2 000 DNA marker; 1-3. cDNA (WT、 $\Delta$ *vtbB* and C- $\Delta$ *vtbB* strains)。

图 8 突变株和回补株中 *vtbB* 转录水平检测

Fig. 8 Detection of *vtbB* transcription levels in mutant and complement strains

## 2.6 $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株在脱氧胆酸盐胁迫下的存活率测定结果

为了确定 VtrB 在副溶血性弧菌抵抗胆汁中的作用,将 WT、 $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 菌株在含有 2% 脱氧胆酸盐(DOC)的培养基中分别培养 20、40 和 60 min,然后测定 WT、 $\Delta$ *vtbB* 和 C- $\Delta$ *vtbB* 的菌落数。结果如图 9 所示,WT 菌株在 2% DOC 处理 20、40 和 60 min 后的存活率分别为 84%、33% 和 9%, $\Delta$ *vtbB* 突变株的存活率下降至 17%、4% 和 1%,与野生型菌株相比, $\Delta$ *vtbB* 突变株的存活水平极显著降低( $P < 0.001$ ),表现出存活能力的缺陷。C- $\Delta$ *vtbB* 菌株在 2% DOC 处理后的存活率为 71%、26% 和 9%,与 WT 菌株的存活率无显著差异,表明回补的 *vtbB* 基因能够恢复副溶血性弧菌  $\Delta$ *vtbB* 菌株在胆盐中的存活能力。



“\*\*\*”代表差异极显著( $P < 0.001$ )。

“\*\*\*” shows very significant difference( $P < 0.001$ ).

图9 脱氧胆酸盐对 WT、 $\Delta vtB$  和 C- $\Delta vtB$  菌株存活的影响

Fig. 9 Effects of DOC on survival of WT,  $\Delta vtB$  and C- $\Delta vtB$  strains

### 3 讨论

同源重组法可以实现基因的无痕突变,敲除精准度高并且较易实施,是研究微生物中基因功能的常用手段<sup>[15,19]</sup>。本研究选用自杀质粒 pDS132 作为突变载体敲除 *vtb* 基因,其含有反向筛选基因 *sacB*,此基因可以编码分解蔗糖的产物,进而产生能够杀死细菌的有毒物质。因此,只有发生双交换将自杀质粒 pDS132 上的目的基因同源臂的 DNA 片段整合到副溶血性弧菌染色体后的突变株才能够在含有蔗糖的平板上生长。但值得注意的是,*sacB* 很容易发生突变,因此才需要在 2 次重组时进行大量筛选<sup>[19-20]</sup>。并且,为了保证第 2 次重组的效率,可将接合转移与第 1 次重组生长出的单克隆菌落再划线于含 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cm 的弧菌选择性平板 TCBS 上进行筛选。与以往构建副溶血性弧菌相关基因突变株不同,由于本研究所使用的野生型菌株为链霉素抗性菌株,而作为供体菌的 *E. coli* S17-1  $\lambda\text{pir}$  也含有链霉素抗性<sup>[21-22]</sup>,因此在接合转移后选择含氯霉素的弧菌选择性平板进行筛选可以有效地抑制供体菌的生长与干扰,提高阳性率。

转录调节因子 VtrB 是副溶血性弧菌发挥毒力的关键因素,其与跨膜毒力调节因子 ToxR 的 N 末端具有同源性。已有研究表明毒力调节因子 ToxR 有助于霍乱弧菌、河流弧菌和副溶血性弧菌等病原体抵抗胆汁的杀菌作用。对于霍乱弧菌

*toxR* 基因突变株,其胆汁和脱氧胆酸盐的最小杀菌浓度(MBC)均低于亲本野生型。在胆汁和胆汁盐的存在下,ToxR 对于提高霍乱弧菌存活率和生长都是必需的<sup>[23]</sup>。此外,与经胆汁盐处理 40 min 后野生型 24% 的存活率相比,副溶血性弧菌 *toxR* 缺失株的存活率为 0.04%,其表现出对胆汁盐更高的敏感性<sup>[24]</sup>。本研究通过对 WT、 $\Delta vtB$  和 C- $\Delta vtB$  菌株在脱氧胆酸盐存在下的存活率测定发现,与野生株相比,脱氧胆酸盐处理 20 min 后的副溶血性弧菌  $\Delta vtB$  突变株表现出存活能力的急剧降低,而回补的 VtrB 又在一定程度上恢复  $\Delta vtB$  突变株在胆汁中的存活能力,说明  $\Delta vtB$  突变株对脱氧胆酸盐的敏感性升高。此结果与 ToxR 有助于副溶血性弧菌抵抗胆汁的研究结果相似,表明在胆汁盐的存在下 VtrB 是副溶血性弧菌存活和生长所必需的因子。

### 4 结论

采用同源重组法,成功敲除副溶血性弧菌的 *vtb* 基因,构建获得 *vtb* 基因缺失突变株和回补株。通过脱氧胆酸盐处理发现 *vtb* 基因有助于提高副溶血性弧菌在脱氧胆酸盐胁迫下的存活能力,为深入探讨 VtrB 是如何参与对其他毒力因素的协调来促进副溶血性弧菌对胆汁的抵抗,进而成功定殖并在宿主生态位中继发疾病奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] RIVERA-CANCEL G, ORTH K. Biochemical basis for activation of virulence genes by bile salts in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Gut Microbes, 2017, 8(4): 366-373.
- [2] PETRONELLA N, RONHOLM J. The mechanisms that regulate *Vibrio parahaemolyticus* virulence gene expression differ between pathotypes[J]. Microbial Genomics, 2018, 4(6): e000182.
- [3] DE JESUS HERNÁNDEZ-DÍAZ L, LEON-SICAÍROS N, VELAZQUEZ-ROMAN J, et al. A pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 clone causing most associated diarrhoea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 221.
- [4] LETCHUMANAN V, CHAN K G, KHAN T M, et al. Bile sensing: the activation of *Vibrio parahaemolyticus* virulence [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 728.
- [5] INAGAKI T, MOSCHETTA A, LEE Y K, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor[J]. Proceedings of the National Academy

- of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (10): 3920-3925.
- [6] MERRITT M E, DONALDSON J R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58 (12): 1533-1541.
- [7] SISTRUNK J R, NICKERSON K P, CHANIN R B, et al. Survival of the fittest: how bacterial pathogens utilize bile to enhance infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2016, 29(4): 819-836.
- [8] HAY A J, ZHU J. In sickness and in health: the relationships between bacteria and bile in the human gut [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2016, 96: 43-64.
- [9] HUBBARD T P, CHAO M C, ABEL S, et al. Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* intestinal colonization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(22): 6283-6288.
- [10] PETERSON K M, GELLINGS P S. Multiple inraintestinal signals coordinate the regulation of *Vibrio cholerae* virulence determinants [J]. *Pathogens and Disease*, 2018, 76 (1): ftx126.
- [11] ANTE V M, BINA X R, HOWARD M F, et al. *Vibrio cholerae leuO* transcription is positively regulated by ToxR and contributes to bile resistance [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(22): 3499-3510.
- [12] KODAMA T, GOTOH K, HIYOSHI H, et al. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8678.
- [13] GOTOH K, KODAMA T, HIYOSHI H, et al. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13365.
- [14] LIVNY J, ZHOU X H, MANDLIK A, et al. Comparative RNA-Seq based dissection of the regulatory networks and environmental stimuli underlying *Vibrio parahaemolyticus* gene expression during infection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(19): 12212-12223.
- [15] 王丽, 多丽波. 基因敲除技术在肺炎克雷伯菌基因功能研究中的应用进展 [J]. *临床检验杂志*, 2015, 33(5): 376-377.
- WANG L, DUO L B. Application progress of gene knockout technology in the study of gene function of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2015, 33(5): 376-377.
- [16] 王雪, 黄建忠, 李力. 基因敲除技术在微生物中的应用 [J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(4): 100-106.
- WANG X, HUANG J Z, LI L. Advances in gene knockout techniques in microbiology [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(4): 100-106.
- [17] 羊燕燕, 裘娟萍, 余志良. 假交替单胞菌遗传操作系统的研究进展 [J]. *发酵科技通讯*, 2017, 46(2): 100-106.
- YANG Y Y, QIU J P, YU Z L. Advances in genetic manipulation on *Pseudoalteromonas* [J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2017, 46(2): 100-106.
- [18] KRISTOFFERSEN S M, RAVNUM S, TOURASSE N J, et al. Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(14): 5302-5313.
- [19] 刘霞, 高鹤, 杨琳, 等. 副溶血性弧菌基因敲除方法的建立及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 188-192.
- LIU X, GAO H, YANG L, et al. Establishment of a suicide vector-based gene knockout method in studies of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2011, 19(3): 188-192.
- [20] PHILIPPE N, ALCARAZ J P, COURSANGE E, et al. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria [J]. *Plasmid*, 2004, 51(3): 246-255.
- [21] 李迎丽, 张义全, 闫小娟, 等. 副溶血弧菌生物膜相关基因突变株的构建 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(5): 439-443.
- LI Y L, ZHANG Y Q, YAN X J, et al. Construction of biofilm formation related mutants in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2013, 47(5): 439-443.
- [22] FERRIÈRES L, HÉMERY G, NHAM T, et al. Silent mischief: bacteriophage mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by Broad-Host-Range RP4 conjugative machinery [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(24): 6418-6427.
- [23] PROVENZANO D, SCHUHMACHER D A, BARKER J L, et al. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(3): 1491-1497.
- [24] WHITAKER W B, PARENT M A, BOYD A, et al. The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin-induced adult murine model [J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(5): 1834-1845.

## Construction of *vtb* gene knockout strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its role in bile resistance

GAO Rong<sup>1</sup>, HOU Laiwang<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3</sup>, PAN Yingjie<sup>1,2</sup>, SUN Xiaohong<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products 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)

**Abstract:** *Vibrio parahaemolyticus* transcriptional regulator *vtb* gene knockout and complementary strains were constructed, and the role for VtrB in bile resistance was also explored. Two pairs' primers were designed according to the *vtb* gene in GenBank. The upstream and downstream flanking DNA fragments of *vtb* gene were fused by PCR, and then cloned into the suicide plasmid pDS132. The recombinant suicide vector was transferred from *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir to *V. parahaemolyticus* for homologous recombination. The *vtb* gene mutants were screened by 10% sucrose. Complement strain C- $\Delta$ *vtb* was constructed by transferring pBAD33-*vtb* into  $\Delta$ *vtb* mutant strain. The survival rates of wild type,  $\Delta$ *vtb* mutant and C- $\Delta$ *vtb* strains cultured in media containing 2% deoxycholate (DOC) were determined. Based on the principle of homologous recombination, the PCR amplification and transcription level detection results of the *vtb* gene showed that *V. parahaemolyticus* *vtb* gene mutant  $\Delta$ *vtb* and its complementary strain C- $\Delta$ *vtb* were successfully constructed. The survival rates of the  $\Delta$ *vtb* strain was 17%, 4% and 1% in the presence of 2% DOC for 20 min, 40 min and 60 min, respectively. This was a significantly lower level of survival than that of the wild type and C- $\Delta$ *vtb* strains ( $P < 0.001$ ). The results indicated that the VtrB is helpful to the bile resistance of *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *vtb* gene; gene knockout; homologous recombination; bile resistance