温度对副溶血弧菌 T3SS 中相关基因表达的影响*

丁晓燕[1,2]，曲凌云[2,3]*，王 琛[1,2]，田欣欣[2]，孙承君[2]，王敏强[1]

(1. 烟台大学 生命科学学院，山东 烟台 264005；2. 国家海洋局 第一海洋研究所，山东 青岛 266061；
3. 海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室，山东 青岛 266237)

摘 要：III 型分泌系统(type III secretion system，T3SS)是副溶血弧菌主要的毒力因子之一，能传递与致病有关的毒性因子来发挥病原菌的毒性，而温度是影响细菌基因表达等生命活动的关键生态因子。本文以 ATCC17802 和 JA21 作为实验菌株，分别提取其 RNA，在不同温度和温度应激条件下，以 pvuA 为内参基因，以副溶血弧菌 T3SS1 的 vcrD1、vopS、vopD1 和 T3SS2 的 vscC2β、vcrD2β、vopP2β 作为目的基因，运用荧光定量 PCR(RT-PCR)技术检测 T3SS 相关基因的表达下，用 ΔΔCt 法计算基因表达差异。结果表明：副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802 菌株的 T3SS1 基因在 16 ℃表达量最高，T3SS2 基因在 25 ℃表达量最高。副溶血弧菌 JA21 菌株的 T3SS1 基因和 T3SS2 基因均在 25 ℃表达量最高。2 株副溶血弧菌从不同的培养温度转入到应激温度 37 ℃后，T3SS1 和 T3SS2 基因的表达量均被显著诱导，并表现出时间依赖性，呈现先升高后降低的趋势。这为进一步探究环境因素与副溶血弧菌致病力的关系提供了科学依据。

关键词：副溶血弧菌；T3SS；RT-PCR；基因表达

中图分类号：X834 **文献标识码**：A **文章编号**：1671-6647(2016)02-0250-10

doi：10.3969/j.issn.1671-6647.2016.02.010

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) 属于弧菌科弧菌属，是一种嗜盐嗜温性的革兰氏阴性短杆菌[1]，主要生活在海洋环境、盐湖和鱼虾贝类等海产品中。副溶血弧菌能感染鱼类、对虾、文蛤、九孔鲍等，引起水生动物疾病[2]，对水产养殖行业造成危害；人类误食带有副溶血弧菌的海产品可导致肠胃炎、呕吐、发烧等症状，严重者甚至引发败血症[3]。副溶血弧菌病主要在中国、日本等沿海国家或地区流行，我国部分沿海地区，细菌性食物中毒的病例中副溶血弧菌食物中毒占居首位(31%)[4]。副溶血弧菌的致病性与其产生的多种毒力因子密切相关，其中 III 型分泌系统(type III secretion system，T3SS)是副溶血弧菌的主要毒力因子之一，具有细胞毒性[5]和肠毒性[6]。2002 年 Tagomori[7]完成第一株副溶血弧菌全基因组测序，发现副溶血弧菌含有两套 III 型分泌系统(T3SS)，分别是 T3SS1，T3SS2。T3SS1 位于染色体 1 的毒力岛上，具有 30 个开放阅读框，且 T3SS1 存在于所有的副溶血弧菌分离株中，其 G+C 含量与基因组其它区域有差别，被认为是该菌的一个遗传标记[8]。副溶血弧菌 T3SS1 主要贡献对宿主细胞的细胞毒性，引发一系列的细胞效应，介导宿主细胞的自体吞噬作用，最后导致细胞死亡。副溶血弧菌 T3SS2 位于染色体 2 的毒力岛上，主要具有肠毒性[9]，引起腹泻和破坏肠道组织，同时也发挥少量细胞毒性，在感染过程中发挥重要功能。

* **收稿日期**：2015-09-09

资助项目：国家科技支撑计划项目——海洋水产病害实用化检测及预警技术的建立与应用(2012BAD17B01)；青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目——近海健康养殖关键技术研究与新生产模式构建(2015ASKJ02－03)；海洋公益性行业科研专项——重要鱼类增养殖区致病细菌基因芯片检测技术研究开发与示范(201105007-1)；山东省自主创新及成果转化专项——重要水产养殖病害防治替代产品(2014ZZCX06205)；泰山学者海外人才项目

作者简介：丁晓燕(1990-)，女，山东青岛人，硕士研究生. 主要从事海洋微生物分子生物学方面研究. E-mail：dingxiaoyan1010@163.com

* **通讯作者**：曲凌云(1975-)，女，山东荣成人，研究员，博士，硕士生导师，主要从事海洋微生物和海洋分子生物学以及海水养殖动物病原微生物学方面研究. E-mail：qly@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

环境温度作为关键生态因子之一，其变化会影响微生物等生命体的生命活动[10-11]，Hoe 和 Gogven[12]研究表明外界环境温度的变化可诱导细菌分泌系统的表达。Rao 等[13]发现，迟缓爱德华氏菌在感染过程中经历了由环境温度到宿主温度的变化，T3SS 的表达相应的受到温度的调控，37 ℃条件下与 28 ℃条件下 T3SS 的转运蛋白表达量不同，而在 20 ℃条件下，没有检测到 T3SS 转运蛋白的表达。Vilches 等[14]发现环境因子诱导嗜水气单胞菌 AH-3 菌株 T3SS 的表达，其中 Ca^{2+} 的消耗和高浓度 Mg^{2+} 是最主要的因素，温度升高也能促进表达。庞欢瑛等[15]研究了溶藻弧菌 T3SS 转运蛋白 vscO 基因在不同环境下的表达差异，结果显示 vscO 基因在特定的环境下表达量最高。而关于环境因子对副溶血弧菌 T3SS 表达的影响未曾见到报道。

本研究共选取 T3SS 中 6 个相关结构和效应蛋白基因为目的基因，采用 RT-PCR 方法比较不同生长温度和温度应激条件下副溶血弧菌 T3SS 中相关基因的表达差异，以探讨副溶血弧菌 T3SS 基因表达与环境温度适应性之间的关系，并进一步探究环境因素变化对副溶血弧菌致病因子表达的影响。

1　材料与方法

1.1　菌株来源及毒力基因特征

本研究使用的菌株保存于国家海洋局第一海洋研究所免疫与疾控实验室近海微生物资源库。其中，副溶血弧菌 ATCC17802 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心，副溶血弧菌 JA21 为本实验室分离。

表 1　副溶血弧菌 T3SS 基因信息

Table 1　Information of T3SS gene of *Vibrio parahaemolyticus*

所属系统	基因名称	基因功能	参考文献
T3SS1	vcrD1	内膜蛋白	[16]
	vopS	抑制肌动蛋白的重排	[17]
	vopD1	转运蛋白，溶血功能	[18]
T3SS2	vscC2β	外膜蛋白	[16]
	vcrD2β	内膜蛋白	[16]
	vopP2β	抑制 MAPK 通路	[19]

1.2　引物设计

根据 GeneBank 数据库中副溶血弧菌 T3SS 基因，利用 Primer Premier 5.0 软件在 T3SS 基因比较保守区域设计特异性引物，引物序列见表 2。内标基因 pvuA 上、下游引物序列引用自参考文献[20]。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 2　RT-PCR 所用引物

Table 2　Primers used for RT-PCR

基　因	引物名称	引物序列/5′-3′	扩增片段长度/bp	退火温度/℃
vcrD1	Q-vcrD1-F2	AAGGTAGGGCAACGCAAAGA	134	55
	Q-vcrD1-R2	AGCAGCACGACAGCAATACT		
vopS	Q-vopS-f	TAGAACGCGATTACCGTGGG	133	55
	Q-vop-S-r	TTACCGAGGTCTTTGTCCGC		
vopD1	Q-vopD1-f	GCGGGTGCAGTAAAAAGCAA	126	55
	Q-vopD1-r	AAGCTCACCCATCAGGTTCG		
vcrD2β	Q-vcrD2β-F2	AGAGAGTTTGGGGACAAGCG	124	55
	Q-vcrD2β-F2	CCTTCAGCCGAGCTTTGAGA		
vscC2β	Q-vscC2β-F	CAGTGAAGGCGATCGTCAGA	97	55
	Q-vscC2β-R	GGGCGTTCCTCGAACTAACA		
vopP2β	Q-vopP2β-F	AGAAGGCGGGGTTAAATGCT	122	55
	Q-vopP2β-R	ACCTCCGCAACCTAAGTTCA		
pvuA	Q-pvuA-f	CAAACTCACTCAGACTCCA	150	55
	Q-pvuA-r	CGAACCGATTCAACACG		

1.3　实验试剂与仪器

细菌培养所用 2216E 培养基按照《微生物学实验》(第三版)[21]进行配制；细菌 RNA 提取试剂盒 R6950-

01购自Omega公司;逆转录试剂盒RR047A、荧光定量PCR试剂盒RR820A购自Takara公司;荧光定量PCR仪型号为Applied Biosystems 7500。

1.4 实验方法

1.4.1 培养温度对T3SS基因表达的影响

将2株副溶血弧菌ATCC17802、JA21接种于2216E培养基中,37 ℃[22]摇床震荡过夜培养,将过夜培养的细菌以1%的比例接种于2216E培养基中,分别放置于16,20,25和37 ℃条件下120 rpm/min摇床震荡培养。根据生长曲线估计培养时间,在OD_{600}达到0.6时,取菌液4 ℃离心取沉淀,用RNA提取试剂盒(Omega)提取总RNA用于T3SS基因转录水平差异的检测。每个实验组各设3个平行。

1.4.2 温度应激对T3SS基因表达的影响

将2株副溶血弧菌ATCC17802、JA21接种于2216E培养基中,37 ℃摇床震荡过夜培养,将过夜培养的细菌以1%的比例接种于2216E培养基中,分别放置于16,20,25和37 ℃条件下120 rpm/min摇床震荡培养。根据生长曲线估计培养时间,待培养至OD_{600}达到0.6,离心弃上清,用等体积2216E培养基重悬菌体沉淀,放置于模拟人体温度的37 ℃条件下120 rpm/min摇床震荡培养,分别于1,2,3和4 h取菌液4 ℃离心取沉淀,用RNA提取试剂盒提取总RNA用于T3SS基因转录水平差异的检测。每个实验组各设3个平行。

1.4.3 总RNA提取与反转录

使用Omega细菌RNA提取试剂盒提取副溶血弧菌的总RNA,操作在紫外线灭菌的独立RNA实验室中进行。提取的总RNA的完整性用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,同时用紫外分光光度计确定RNA浓度。

反转录使用Takara反转录试剂盒,首先去除总RNA中残留的基因组,随后将RNA反转录成单链cDNA,反转录产物cDNA分装后置于−80 ℃保存。

1.4.4 荧光定量PCR反应体系与条件

反应体系为20 μL,其中:cDNA 2 μL,2×SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) 10 μL,50×ROX Reference Dye II 0.4 μL,浓度为10 μmol/L的上下游引物各0.8 μL,无菌双蒸水6 μL。

反应条件:95 ℃ 5 min预变性;95 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s, 72 ℃ 34 s,40个循环,72 ℃实时检测荧光信号,同时进行ROX值校正。最后进行RT-PCR溶解曲线分析。

1.5 数据处理

RT-PCR结果采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析不同条件下T3SS基因表达差异。每个菌株以培养温度37 ℃为对照组。

2 结 果

2.1 提取的总RNA检测结果

用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的副溶血弧菌总RNA的完整性,结果显示5SrRNA条带很弱,几乎不可见,而16SrRNA,23SrRNA条带明亮清晰,说明提取的总RNA条带完整。利用紫外分光光度计检测总RNA浓度及纯度,A260/280数值处于1.8~2.0,说明RNA可以进行下一步反转录。分析pvuA基因和vcrD1,vopS,vopD1,vscC2β,vcrD2β,vopP2β基因溶解曲线可知只有单峰值,排除了非特异性扩增,阴性对照无扩增曲线,表明加样时无交叉污染。

2.2　荧光定量 PCR 结果

2.2.1　不同培养温度下副溶血弧菌 T3SS 基因的表达差异

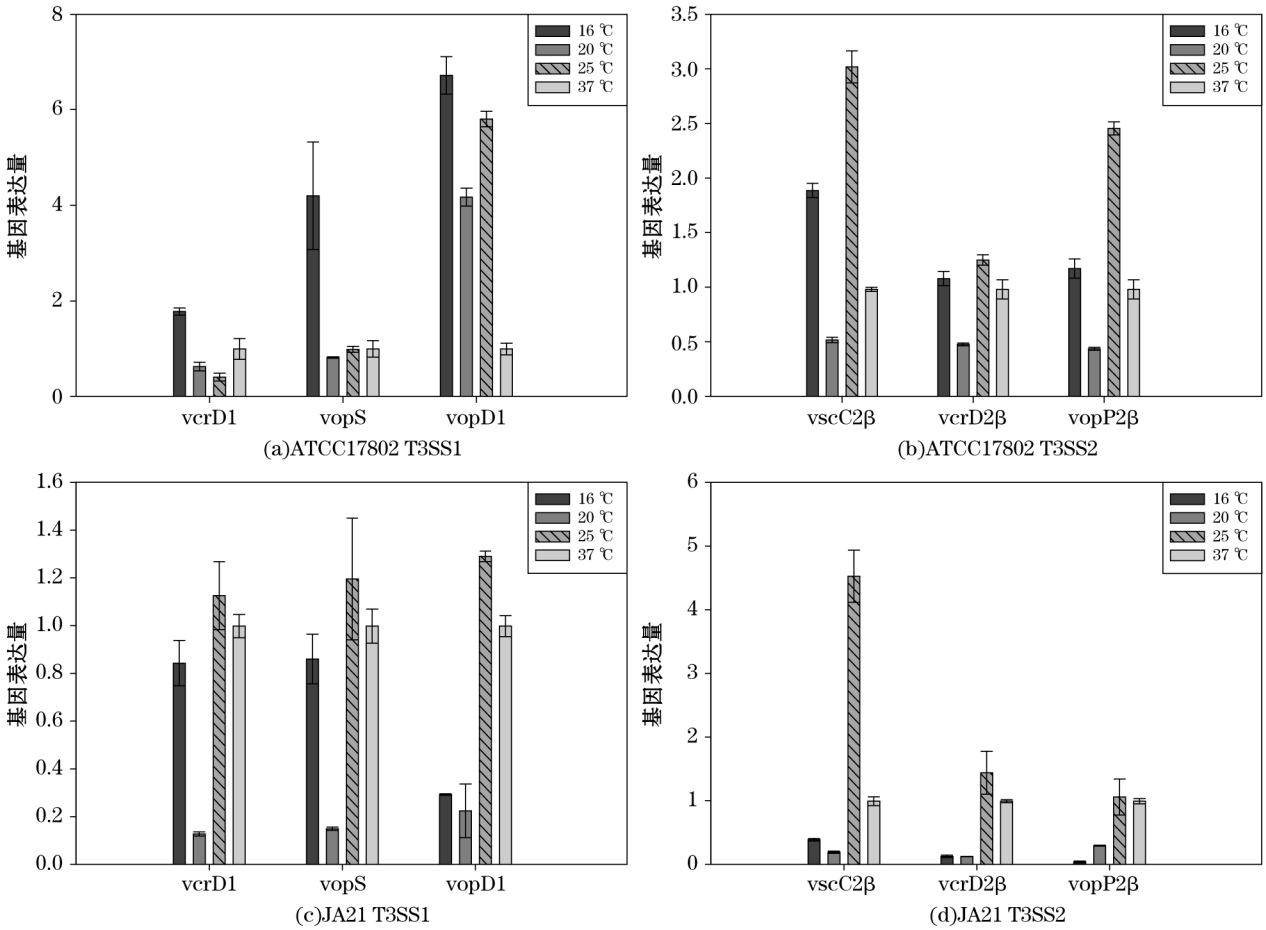

图 1　副溶血弧菌在不同温度下 T3SS 基因的表达差异

Fig. 1　Differential expression of T3SS gene in *V. parahaemolyticus* cultured at different temperature

将 2 株副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 分别接种于不同培养温度的 2216E 培养基中生长，比较 T3SS 基因的表达差异。实验结果表明(图 1)：副溶血弧菌 ATCC17802 的 T3SS1 基因在 16 ℃表达量最高，其次是 25 ℃；其中 16 ℃时 T3SS1 内膜蛋白基因 vcrD1 的表达量是最低组的 4.31 倍，T3SS1 转运蛋白基因 vopD1 的表达量最低组的 5.11 倍，T3SS1 效应蛋白基因 vopS 的表达量是最低组的 6.71 倍；T3SS2 基因在 25 ℃表达量最高，其次是 16 ℃；其中 25 ℃时 T3SS2 内膜蛋白基因 vcrD2β 的表达量是最低组的 2.61 倍，T3SS2 外膜蛋白基因 vscC2β 的表达量是最低组的 5.80 倍，T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β 的表达量是最低组的 5.59 倍；副溶血弧菌 JA21 的 T3SS1 基因和 T3SS2 基因均在 25 ℃表达量最高，其次是 37 ℃；其中 25 ℃时 T3SS1 内膜蛋白基因 vcrD1 的表达量是最低组的 1.34 倍，T3SS1 转运蛋白基因 vopD1 的表达量是最低组的 5.72 倍，T3SS1 效应蛋白基因 vopS 的表达量是最低组的 1.39 倍；25 ℃时 T3SS2 编码内膜蛋白基因 vcrD2β 的表达量是最低组的 11.02 倍，T3SS2 外膜蛋白基因 vscC2β 的表达量是最低组的 22.75 倍，T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β 的表达量是最低组的 22.60 倍。整体而言，2 株副溶血弧菌 T3SS 基因均在 20 ℃表达量最低。

2.2.2 温度应激条件下副溶血弧菌 T3SS 基因表达差异

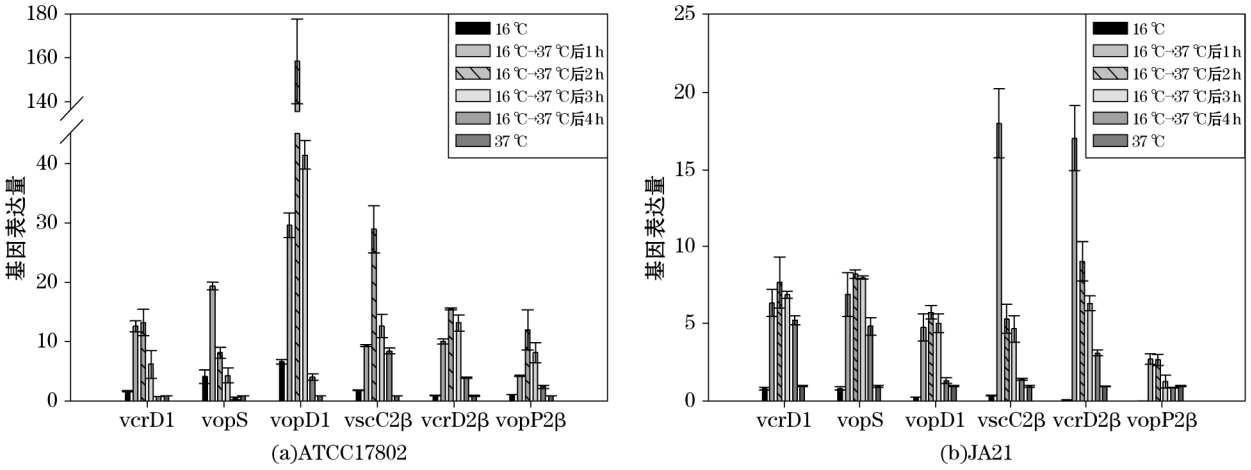

图 2 副溶血弧菌从 16 ℃转入 37 ℃培养 1，2，3 和 4 h 后与培养温度为 16 ℃和 37 ℃条件下的 T3SS 基因表达差异

Fig. 2 Differential expression of T3SS gene in *V. parahaemolyticus* at 1，2，3 和 4 h after transporting from 16 ℃ to 37 ℃ compared with which cultured at temperature 16 ℃ and 37 ℃

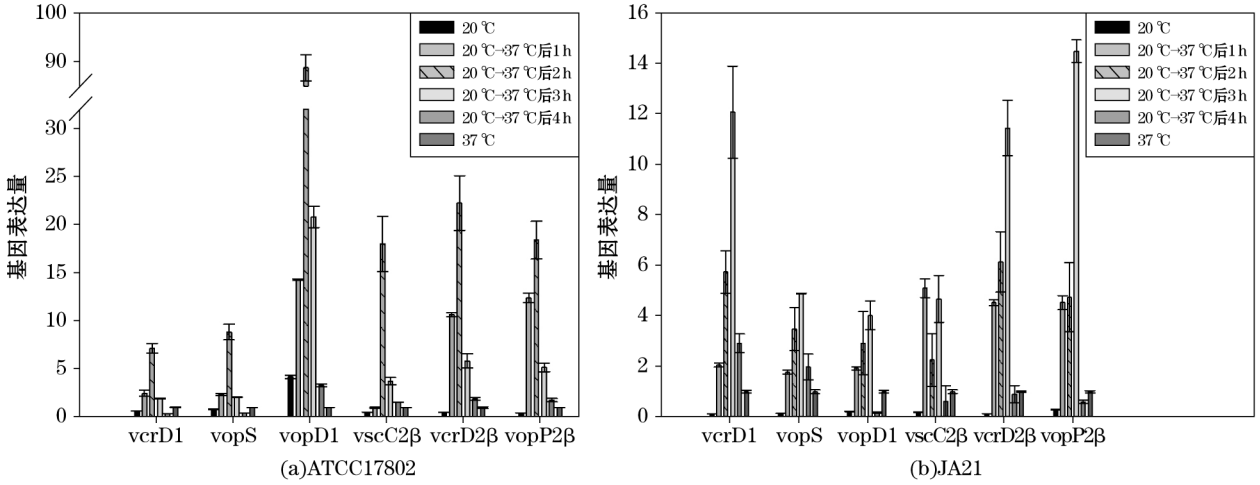

图 3 副溶血弧菌从 20 ℃转入 37 ℃培养 1，2，3 和 4 h 后与培养温度为 20 ℃和 37 ℃条件下的 T3SS 基因表达差异

Fig. 3 Differential expression of T3SS gene in *V. parahaemolyticus* at 1，2，3 和 4 h after transporting from 20 ℃ to 37 ℃ compared with which cultured at temperature 20 ℃ and 37 ℃

如图 2a 所示，副溶血弧菌 ATCC17802 从培养温度 16 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS 基因的表达量明显升高，除 vopS 外其它基因在 2 h 时达到最高值，然后表达量开始回落。其中，T3SS1 转运蛋白基因 vopD1 的表达量是对照组(37 ℃)的 157.97 倍，远高于其他基因。除此之外 5 个 T3SS 基因在最高值处的变化范围是 12.05～28.91 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β，表达量变化最大的是 T3SS2 外膜蛋白基因 vscC2β。

如图 2b 所示，副溶血弧菌 JA21 从培养温度 16 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS 基因的表达量明显升高，且 T3SS1 基因表达量在 2 h 时达到最高值，T3SS2 基因表达量在 1 h 时达到最高值，然后表达量开始回落。T3SS 基因在最高值处的变化范围是 2.74～17.91 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β，表达量变化最大的是 T3SS2 外膜蛋白基因 vscC2β。

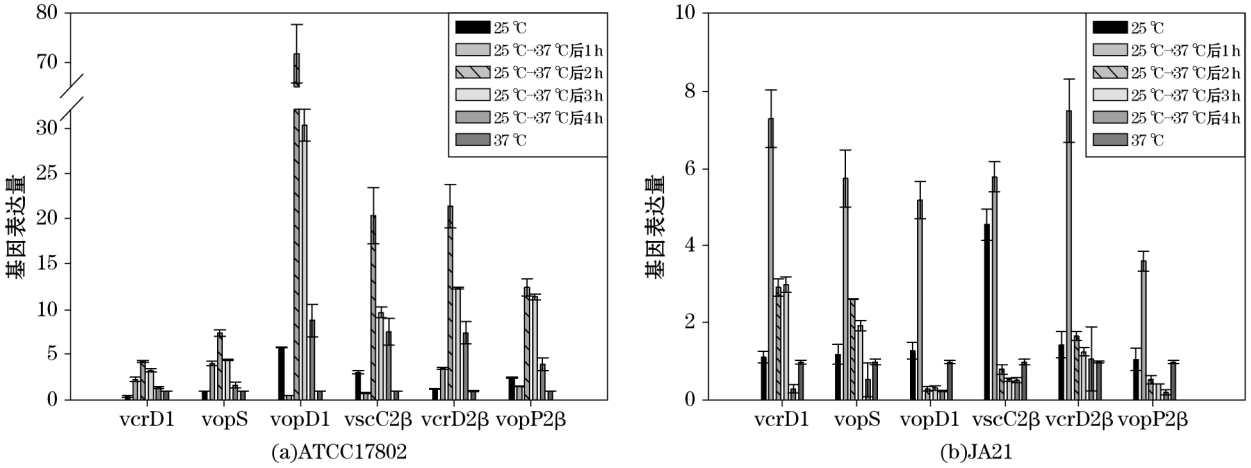

图 4　副溶血弧菌从 25 ℃转入 37 ℃培养 1，2，3 和 4 h 后与培养温度为 25 ℃和 37 ℃条件下的 T3SS 基因表达差异

Fig. 4　Differential expression of T3SS gene in *V. parahaemolyticus* at 1，2，3 和 4 h after transporting from 25 ℃ to 37 ℃ compared with which cultured at temperature 25 ℃ and 37 ℃

如图 3a 所示，副溶血弧菌 ATCC17802 从培养温度 20 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS 基因的表达量明显升高，且在 2 h 时达到最高值，然后表达量开始回落。其中 T3SS1 转运蛋白基因 vopD1 的表达量是对照组（37 ℃）的 88.74 倍，远高于其他基因。除此之外 5 个 T3SS 基因在最高值处的变化范围是 7.14～22.25 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS1 内膜蛋白基因 vcrD1，表达量变化最大的是 T3SS2 内膜蛋白基因 vcrD2β。

如图 3b 所示，副溶血弧菌 JA21 从培养温度 20 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS1 基因和 T3SS2 基因的表达量明显升高，除 vscC2β 外在 3 h 时达到最高值，然后表达量开始回落。T3SS 基因在最高值处的变化范围是 4.01～14.47 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS1 转运蛋白基因 vopD1，表达量变化最大的是 T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β。

如图 4a 所示，副溶血弧菌 ATCC17802 从培养温度 25 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS1 基因和 T3SS2 基因的表达量明显升高，且在 2 h 时达到最高值，然后表达量开始回落。其中 T3SS1 转运蛋白基因 vopD1 的表达量是对照组（37 ℃）的 71.71 倍，远高于其他基因。除此之外 5 个 T3SS 基因在最高值处的变化范围是 4.26～21.33 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS1 内膜蛋白基因 vcrD1，表达量变化最大的是 T3SS2 内膜蛋白基因 vcrD2β。

如图 4b 所示，副溶血弧菌 JA21 从培养温度 25 ℃转入 37 ℃后 1 h，T3SS1 基因和 T3SS2 基因的表达量明显升高，且在 1 h 达到最高值，然后表达量开始回落。T3SS 基因在最高值处的变化范围是 3.59～7.46 倍，其中表达量变化最小的是 T3SS2 效应蛋白基因 vopP2β，表达量变化最大的是 T3SS2 内膜蛋白基因 vcrD2β。

由图 2，3，4 结果可见，2 株副溶血弧菌从不同的培养温度转入到应激温度 37 ℃后，T3SS 基因的表达量明显升高，既高于在原本的培养温度时的表达量，也高于 2 株菌在培养温度为 37 ℃时的表达，转入应激条件下的副溶血弧菌 T3SS 基因表现出显著的时间依赖性，表现为先升高后降低的趋势。

3　讨论与分析

T3SS 作为副溶血弧菌的主要毒力因子之一，能传递与致病有关的毒性因子来发挥病原菌的毒性，而温度是影响细菌基因表达等生命活动的关键生态因子。

副溶血弧菌 T3SS1 主要贡献对宿主细胞的细胞毒性，介导宿主细胞的自体吞噬作用，最后导致细胞死亡。vcrD1 编码的内膜蛋白是组成 T3SS1 分泌装置基体的一部分，在此基础上针管状结构蛋白才能继续生

长。vopD1 编码的转运蛋白功能是在宿主细胞的细胞膜表面形成孔洞，效应蛋白沿该通道进入宿主细胞内，此外还具有对 HeLa 细胞的毒性和接触溶血活性[23]。图 1a、1c 显示，副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 的 vcrD1 和 vopD1 基因分别在 16 ℃和 25 ℃条件下表达量最高。转运蛋白 vopD1 的高表达量有利于 T3SS 分泌通道的完善，释放分泌蛋白，表现细菌毒性。vopS 编码的效应蛋白可导致细胞变圆和通过抑制 RhoB 的鸟苷三磷酸酶导致肌动蛋白细胞骨架的崩溃，并且 vopS 可以使 AMPylation 阻止 Rho 家族的鸟苷三磷酸酶与下游的效应蛋白反应，因此抑制受感染细胞内肌动蛋白的重排[17]。图 1a 、1c 显示，副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 的 vopS 基因分别在 16 ℃和 25 ℃条件下表达量最高，暗示 2 株菌分别在 16 ℃和 25 ℃温度下，其相关毒素分泌较多。

上述实验结果表明副溶血弧菌 ATCC17802、JA21 在不同的环境温度下表现对宿主细胞不同的细胞毒性作用，即它们表现最强细胞毒性的温度不同。副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 的 T3SS1 分别在 16 ℃和 25 ℃表达量最高，二者的差异可能是由于菌株来源不同，菌株宿主的生存环境温度有所差异，造成了温度调控的多样性。吕远志[24]在研究迟缓爱德华氏菌的双组份系统的毒力调控机制中发现，在相同的温度条件下，不同来源的 2 株菌的 T3SS 转运蛋白 EseBCD 的分泌量差异很大，实验现象与本实验相似。Zhou 等[25]研究表明副溶血弧菌 T3SS1 主要受 exsACDE 操纵子的调控，在诱导条件下 ExsA 蛋白促进 T3SS1 介导的细胞毒性的表达，而 ExsD 可以结合 ExsA 从而阻断其对 T3SS1 表达的促进作用，ExsC 结合 ExsD 释放 ExsA，从而促进 T3SS1 的表达。Kodama 等[26]研究证明，H-NS 蛋白能够通过抑制 exsA 基因的表达来调控 T3SS1 的表达，而 H-NS 蛋白能够响应环境刺激对许多系统起调控作用，因此温度对副溶血弧菌 T3SS1 表达的影响是否与 H-NS 蛋白和 *exsACDE* 操纵子响应环境温度有关及其响应机制仍需进一步验证。

副溶血弧菌 T3SS2 位于染色体 2 的毒力岛上，具有肠毒性，在感染过程中发挥重要作用。vcrD2β 和 vscC2β 分别编码 T3SS2 内膜蛋白和外膜蛋白，这 2 种蛋白是组成 T3SS2 分泌装置基体的一部分。图 1b、1d 显示，副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 的 vscC2β、vcrD2β 基因都是在 25 ℃表达量最高，暗示在 25 ℃条件下，副溶血弧菌 T3SS2 的基底装置部分组装最多。vopP2β 编码的效应蛋白能活化激酶催化环结构中保守的赖氨酸乙酰化，阻止 ATP 的结合，最终组织激酶的磷酸化[19]。图 1d 显示 JA21 的 vopP2β 基因在 25 ℃和 37 ℃条件下表达量远高于 16 ℃和 20 ℃，提示副溶血弧菌 JA21 的 T3SS2 的效应蛋白基因可能在高温环境下表达量高，在低温环境下表达量低。图 1b、1d 显示，副溶血弧菌 ATCC17802 和 JA21 的 vopP2β 基因都在 25 ℃下表达量最高，暗示在该温度下 T3SS2 分泌的毒力因子最多。由效应蛋白的功能描述可知，副溶血弧菌的 T3SS2 能够破坏肠道组织，诱导腹泻，并且具有一定的细胞毒性，是发挥感染作用的重要毒力因子。本文研究显示，在 25 ℃下，2 株副溶血弧菌的 T3SS2 表达量均最高；而且陈星等[27]研究表明，副溶血弧菌耐热直接溶血素基因 tdh 也在 25 ℃表达量最高，溶血活性最强；由此暗示此温度下，养殖环境中的副溶血弧菌对受感染宿主有较强的致病性。

本实验还研究了副溶血弧菌从不同培养温度转入人体温度 37 ℃培养 1，2，3 和 4 h 后 T3SS 基因的表达差异。实验结果如 2.2.2 所示，2 株副溶血弧菌从不同的培养温度转入到应激温度 37 ℃后，T3SS 基因的表达量明显升高，其中副溶血弧菌 ATCC17802 从不同培养温度转入 37 ℃后 2 h，vopD1 的表达量升高异常显著。vopD1 是 T3SS1 的转运蛋白，在形成 T3SS1 的早期阶段，细菌只具备横跨膜的环状基底部分和在此基础上突出的针管状装置，当细菌与宿主细胞接触后，T3SS1 通过针管状通道输出转运蛋白安装到针管结构的顶端，转运蛋白在靶细胞膜上形成孔洞，效应蛋白通过孔洞进入宿主细胞[28]。副溶血弧菌 ATCC17802 的 vopD1 表达量的大量升高，可能是由于温度应激条件能诱导副溶血弧菌释放转运蛋白，完善分泌通道，释放分泌蛋白。

应激条件下 2 株菌 T3SS 基因的表达表现出显著的时间依赖性，表现为先升高后降低的趋势，4 h 后 T3SS 表达量明显降低，由于 37 ℃是模拟人体温度，可以猜测副溶血弧菌被误食进入人体后，前 3 h T3SS 的表达量是最高的，即副溶血弧菌分泌的毒素较多，随后 T3SS 基因表达量降低。比较 2 株副溶血弧菌转入 37 ℃后 T3SS 基因表达量的变化，可以发现，ATCC17802 的 T3SS 基因表达量变化显著高于 JA21，说明

ATCC17802 对温度变化的反应更强烈，应激条件下毒力因子基因表达增加显著。

苑淑宾，朱爱贵[28]认为，条件致病菌一般情况下不会引起养殖动物发生病害，但一些环境因子，例如温度、盐度等均可以调控其致病性相关蛋白的表达，从而影响细菌的致病性[29]。庞欢瑛等[15]对溶藻弧菌 T3SS 的转运蛋白 vscO 基因的表达差异进行了研究，结果显示 vscO 基因在 28 ℃时表达量最高。这与本研究中副溶血弧菌 17802 和 JA21 的 T3SS 在 25 ℃表达量最高相似。Rao 等[12]认为，迟缓爱德华氏菌在感染过程中经历了由环境温度到宿主温度的变化，T3SS 的表达相应的受到温度的调控，实验结果表明在 28 ℃条件下，T3SS 的转运蛋白表达最高，而在 20 ℃条件下，没有检测到 T3SS 转运蛋白的表达，说明迟缓爱德华氏菌 T3SS 的转运蛋白表达量在不同培养温度下有较大差异，这与本研究中副溶血弧菌的 T3SS 基因在不同培养温度下表达差异显著的现象一致。

探究环境因素对副溶血弧菌致病力的影响，将有助于揭示副溶血弧菌的致病规律。综上研究，温度的变化对副溶血弧菌 T3SS 基因的表达具有显著的影响，但是不同的基因对温度的响应不同。由副溶血弧菌全基因组测序表明[7]，副溶血弧菌的基因结构与耶尔森氏菌相似，已有文献显示耶尔森菌的 T3SS 具有多个操纵子[30]，副溶血弧菌 T3SS 基因对温度不同的响应特性是否根源于不同基因受不同的操纵子调控有待进一步的验证。

参考文献(References)：

[1] SU Y C, LIU C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.

[2] YU Y, WU B B, FANG W H. Type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 848-852. 俞盈，吴蓓蓓，方维焕. 副溶血弧菌的 III 型分泌系统[J]. 微生物学报，2009，49(7)：848-852.

[3] YEUNG P M, BOOR K J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2004, 1(2): 74-88.

[4] LIU X, CHEN Y, WANG X, et al. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J]. Journal of Hygiene Research, 2004, 33(6): 725-727.

[5] BURDETTE D L, YARBROUGH M L, ORVEDAHL A, et al. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(34): 12497-12502.

[6] HAM H, ORTH K. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 719-725.

[7] TAGOMORI K, IIDA T, HONDA T. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(16): 4351-4358.

[8] MAKINO K, OSHIMA K, KUROKAWA K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. The Lancet, 2003, 361(9359): 743-749.

[9] DING X Y, ZHU P F, WANG M Q, et al. Research progress of Type III secretion system in common mariculture Gram-negative pathogenic bacterium[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 13:156-161,172. 丁晓燕，朱鹏飞，王敏强，等. 海水常见革兰氏阴性病原菌 III 型分泌系统的研究进展[J]. 安徽农业科学，2015，13:156-161,172.

[10] CHEN B Z, WANG Z L, ZHU M Y, et al. Effect of temperature and salinity on growth of prorocentrum dentatum and comparisons between growths of prorocentrum dentatum and skeletonema costatum[J]. Advances in Marine Science, 2005, 23(1): 60-64. 陈炳章，王宗灵，朱明远，等. 温度，盐度对具齿原甲藻生长的影响及其与中肋骨条藻的比较[J]. 海洋科学进展，2005，23(1)：60-64.

[11] DOU J J, WANG Y, SUN Y, et al. Effect of temperature and salinity on plasma marine of arctic sea-ice bacteria[J]. Advances in Marine Science, 2013, 31(2): 229-236. 窦京娇，王燕，孙岳，等. 温盐变化对北极海冰细菌质膜的影响研究[J]. 海洋科学进展，2013，31(2)：229-236.

[12] HOE N P, GOGVEN J D. Temperature sensing in Versinia pestis: translation of the LerF activator protein is thermally regulated[J]. Journal of Bacteriol, 1993, 175(24): 7901-7909.

[13] RAO P S, YAMADA Y, TAN Y P, et al. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for Edwardsiella tarda pathogenesis[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(2): 573-586.

[14] VILCHES S, JIMENEZ N, TOMAS J M, et al. Aeromonas hydrophila AH-3 type III secretion system expression and regulatory net-

work[J]. Applied Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6382-6392.

[15] PANG H Y, ZHOU Z J, DING J, et al. Different expressions of vscO gene from *Vibrio Alginolyticus* in different environments[J]. Journal of Jishou University: Natural Sciences Edition, 2014, 4: 59-63. 庞欢瑛，周泽军，丁燏，等. 溶藻弧菌 vscO 基因在不同环境下的表达差异[J]. 吉首大学学报：自然科学版，2014，4：59-63.

[16] PARK K S, ONO T, ROKUDA M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(11): 6659-6665.

[17] YARBROUGH M L, LI Y, KINCH L N, et al. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling[J]. Science, 2009, 323(5911): 269-272.

[18] SHIMOHATA T, MAWATARI K, IBA H, et al. VopB1 and VopD1 are essential for translocation of type III secretion system 1 effectors of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(8): 1002-1007.

[19] TROSKY J E, LI Y, MUKHERJEE S, et al. VopA inhibits ATP binding by acetylating the catalytic loop of MAPK kinases[J]. The Journal of Biological Chemictry, 2007, 282(47): 34299-34305.

[20] COUTARD F, LOZACH S, POMMEPUY M, et al. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5183-5189.

[21] SHEN P. Microbiology experiment[M]. Beijing: China Higher Education Press, 2007. 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京：高等教育出版社，2007.

[22] ZHAO G Y, SHEN K M, LI J R. Improving enrichment M edium and culture condi tions in bacterium *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(3): 137-141. 赵广英，申科敏，励建荣. 副溶血性弧菌增菌培养基及培养条件的改进[J]. 水产科学，2010，29(3)：137-141.

[23] ONO T, PARK K S, UETA M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1032-1042.

[24] LV Y Z. Virulence regulation by two-component systems in edwardsiella tarda[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013. 吕远志. 迟钝爱德华氏菌双组分系统的毒力调控机制[D]. 上海：华东理工大学，2013.

[25] ZHOU X, KONKEL M E, CALL D R. Regulation of type III secretion system 1 gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* is dependent on interactions between ExsA, ExsC, and ExsD[J]. Virulence, 2010, 1(4): 260-272.

[26] KODAMA T, YAMAZAKI C, PARK K S, et al. Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS[J]. FEMS Microbiology letters, 2010, 311(1): 10-7.

[27] CHEN X, PAN Y J, SUN X H, et al. Detection of tlh and tdh expression differences in *Vibrio parahaemolyticus* by real-time quantitative PCR[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1077-1083. 陈星，潘迎捷，孙晓红，等. 荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌 tlh 和 tdh 基因的表达差异[J]. 微生物学通报，2011，38(7)：1077-1083.

[28] DEANE J E, ABRUSCI P, JOHNSON S, et al. Timing is everything: the regulation of type III secretion[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(7): 1065-1075.

[29] YUAN S B, ZHU A Y. Progress on pathogenicity research on *Vibrio alginolyticus* to aquatic products[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2012, 31(3): 256-264. 苑淑宾，朱爱意. 溶藻弧菌对水产动物致病性及其防治的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报：自然科学版，2012，31(3)：256-264.

[30] CORNELIS G R, BOLAND A, BOYD A P, et al. The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1315-1352.

Effect of Temperature on T3SS Gene Expression of *Vibrio parahaemolyticus*

DING Xiao-yan[1,2], QU Ling-yun[2,3], WANG Chen[1,2], TIAN Xin-xin[2], SUN Cheng-jun[2], WANG Min-qiang[1]

(1. *College of Life Sciences*, *Yantai University*, Yantai 264005, China;
2. *The First Institute of Oceanography*, *SOA*, Qingdao 266061, China;
3. *National Laboratory for Marine Science and Technology*, *Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes*, Qingdao 266237, China)

Abstract: T3SS (Type III secretion system) is one of the major virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus*, which could deliver pathogenic virulence factors or effectors to eukaryotic host cells, and temperature is one of the key ecological factors which could influence gene expression. We can compare the virulence of strains which in different culture temperature and stress conditionsby comparing the expression level of T3SS genes, including vcrD1, vopS, vopD1, vscC2β, vcrD2β, vopP2β, which encode T3SS1 inner membrane protein, T3SS1 effector, T3SS1 translocator, T3SS2 outer membrane protein, T3SS2 inner membrane protein and T3SS2 effector, respectively. In this paper, we extracted total RNA from two kinds of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802 and JA21 cultured under different temperature and stress condition. By means of established fluorescence quantitative RT-PCR method which using pvuA as the internal standard gene and the ΔΔCt method as the calculation method, the transcription changes of the T3SS mRNA were studied. The results showed that in *V. parahaemolyticus* 17802, T3SS1 exhibited highest expression at 16℃ while T3SS2 exhibited highest expression at 25℃. In *V. parahaemolyticus* JA21, both T3SS1 and T3SS2 exhibited highest expression at 25℃. The expression level of T3SS of the 2 strains *V. parahaemolyticus* changed over time in response to stress condition, and were significantly increased compared to control group at 1h after transporting from culture temperature into stress condition. After the peak point, the expression level dropped down. This research provides a scientific basis for the study of the relationship between the environmental factors and the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: *V. parahaemolyticus*; T3SS; RT-PCR; gene expression

Received: September 9, 2015