

维氏气单胞菌 VasH 正调控VI型分泌系统表达并影响细菌竞争力和毒力

高士杰, 马香*

海南大学 生命健康学院, 海南 海口

高士杰, 马香. 维氏气单胞菌 VasH 正调控VI型分泌系统表达并影响细菌竞争力和毒力[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4135-4149.

GAO Shijie, MA Xiang. VasH positively regulates type VI secretion system expression and influences competition and virulence of *Aeromonas veronii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4135-4149.

摘要: 维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)属革兰氏阴性致病菌, 可引发水产动物及人类多种疾病, 对水产养殖业和人类公共健康构成严重威胁。VI型分泌系统(type 6 secretion system, T6SS)是决定维氏气单胞菌致病性的关键毒力因子, 已知细菌增强子结合蛋白(bacterial enhancer-binding protein, bEBP) VasH 负责调控 T6SS 功能, 但维氏气单胞菌中是否存在这一调控关系尚不明确。【目的】揭示 VasH 蛋白对维氏气单胞菌 T6SS 表达及功能的影响, 为深入探究 T6SS 介导的维氏气单胞菌致病机制, 以及后续防控维氏气单胞菌感染提供理论依据。【方法】以 *A. veronii* C4 为原始菌株, 通过同源重组策略构建 VasH 缺失菌株 $\Delta vasH$ 和回补株 $\Delta vasH/p-vasH$ 。通过 RT-qPCR 测定各菌株中 T6SS 基因的相对表达量, 明确 VasH 对 T6SS 基因表达水平的影响; 通过测定生长曲线、透射电镜观察菌体形态, 采用结晶紫法测定生物膜形成能力, 确定 VasH 对病原菌致病相关特征的影响; 通过体外细菌竞争实验及斑马鱼模型体内半数致死浓度(median lethal dose, LD₅₀)测定评估 VasH 对病原菌竞争力和致病性的综合效应。【结果】成功构建了 *vasH* 基因敲除和回补菌株。VasH 缺失导致 T6SS 结构蛋白和效应蛋白编码基因的表达均显著降低($P<0.05$), 说明 VasH 正向调控 T6SS 基因表达。*vasH* 基因敲除未显著影响维氏气单胞菌的生长能力、表面形态及结构, 但导致病原菌生物膜形成能力显著增强, 且体外竞争能力显著下降。斑马鱼体内感染实验显示, $\Delta vasH$ 菌株的 LD₅₀ 为 1.58×10^{11} , 约为野生型菌株 LD₅₀ (7.34×10^{10}) 的 2.15 倍; 在感染浓度为 5×10^8 CFU/mL 时, $\Delta vasH$ 菌株感染导致斑马鱼的死亡率由野生型感染时的 33.3% 降至 0, 表明 VasH 缺失降低了维氏气单胞菌的致病性。【结论】维氏气单胞菌 VasH 蛋白对 T6SS 基因表达具有正调控活性, 其可能不参与调控病原菌的生长状态及外部形态, 但显著影响生物膜形成能力和种

资助项目: 海南省自然科学基金(324MS017); 国家自然科学基金(32360047)

This work was supported by the Hainan Province Natural Science Foundation (324MS017) and the Natural Science Foundation of China (32360047).

*Corresponding author. E-mail: 993034@hainanu.edu.cn

Received: 2026-01-10; Accepted: 2026-03-31; Published online: 2026-04-21

间竞争力，进而调控病原菌对斑马鱼宿主的综合毒力。本研究为进一步探究 VasH 通过调控维氏气单胞菌 T6SS 活性与功能介导病原菌致病性的分子机制提供了必要的研究工具，并奠定了初步基础。

关键词：维氏气单胞菌；*vasH*；T6SS；毒力

VasH positively regulates type VI secretion system expression and influences competition and virulence of *Aeromonas veronii*

GAO Shijie, MA Xiang*

School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan, China

Abstract: *Aeromonas veronii* is a Gram-negative pathogenic bacterium that causes various diseases in aquatic animals and humans, posing a serious threat to aquaculture and public health. The type VI secretion system (T6SS) is a key virulence factor determining the pathogenicity of *A. veronii*. It is known that the bacterial enhancer-binding protein (bEBP) VasH is responsible for regulating the T6SS function, while whether this regulatory relationship exists in *A. veronii* remains unknown. **[Objective]** To elucidate the impacts of VasH on T6SS expression and function in *A. veronii*, thereby providing a theoretical basis for deciphering the mechanism of T6SS-mediated pathogenicity of *A. veronii* and for the subsequent prevention and control of *A. veronii* infections. **[Methods]** With *A. veronii* C4 as the wild-type strain, the VasH-deficient mutant strain $\Delta vasH$ and the complemented strain $\Delta vasH/p-vasH$ were constructed via a homologous recombination strategy. RT-qPCR was employed to measure the relative expression levels of T6SS genes in each strain to clarify the effect of VasH on T6SS gene expression. Growth curve establishment, transmission electron microscopy (TEM) for observing bacterial morphology, and the crystal violet assay for biofilm quantification were performed to determine the influences of VasH on pathogenic characteristics. An *in vitro* bacterial competition assay and a zebrafish model for determining the median lethal dose (LD₅₀) were employed to assess the comprehensive effects of VasH on bacterial competitiveness and pathogenicity. **[Results]** The VasH-deficient mutant strain $\Delta vasH$ and the complemented strain $\Delta vasH/p-vasH$ were successfully constructed. The deletion of VasH resulted in a decrease ($P < 0.05$) in the expression of genes encoding both T6SS structural and effector proteins, indicating that VasH was responsible for regulating T6SS gene expression. The deletion of *vasH* did not significantly affect the growth or surface morphology/structure of *A. veronii*. However, it led to a significant increase in the biofilm formation and a significant decrease in *in vitro* bacterial competitiveness. The zebrafish infection assay showed that the LD₅₀ of $\Delta vasH$ was 1.58×10^{11} , which was 2.15 times that (7.34×10^{10}) of the wild type. Moreover, at an infection concentration of 5×10^8 CFU/mL, the death rate of zebrafish decreased from 33.3% in the wild-type infection group to 0 following infection with $\Delta vasH$, indicating that deletion of *vasH* attenuated the virulence of *A. veronii*. **[Conclusion]** In *A. veronii*, VasH positively regulates T6SS gene

expression. It may not be involved in regulating the growth state or external morphology of the pathogen but significantly influences the biofilm formation and competitiveness of *A. veronii*, thereby modulating the overall virulence during infection of the zebrafish host. This study provides essential research tools and lays a preliminary foundation for further exploration of the molecular mechanisms by which VasH mediates pathogenicity through regulating T6SS activity and function in *A. veronii*.

Keywords: *Aeromonas veronii*; *vasH*; T6SS; virulence

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*) C4 属于气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)、气单胞菌属(*Aeromonas*), 是一种具有运动能力的革兰氏阴性短杆菌, 广泛分布于地下水、湖泊及经氯处理或未经处理的饮用水等多种水体中^[1-2]。维氏气单胞菌感染可引起鱼类全身性出血、烂尾病、败血症等^[3], 也可导致人类肠胃炎、脑膜炎等疾病^[4-6]。目前, 维氏气单胞菌已被公认为水产养殖业和人类公共卫生安全的潜在威胁。

分泌系统是介导维氏气单胞菌毒力的关键结构, 通过分泌气溶素、溶血素、肠毒素及蛋白酶等效应蛋白调控细菌致病性^[7]。其中, VI型分泌系统(type 6 secretion system, T6SS)在介导细菌竞争力和环境适应性方面发挥关键作用^[8]。T6SS 是广泛存在于革兰氏阴性菌中的纳米级生物大分子机器, 能够向外分泌具有脂酶、溶菌酶等功能的效应蛋白以杀伤邻近细胞, 从而确保自身竞争优势^[9]。T6SS 的活性通常受到严格调控, 仅在特定条件下被激活。深入研究 T6SS 的调控机制, 不仅有助于进一步解析维氏气单胞菌的致病机理, 也可为预防和治疗其引起的动物与人类感染、减少经济损失提供重要理论依据。

维氏气单胞菌 C4 菌株基因组中存在一套编码 T6SS 的基因簇, 包括 1 个主簇和 3 个副簇, 主簇中含有编码细菌增强子结合蛋白 VasH 的基因。已知 VasH 能够与 σ^{54} 协同作用, 在霍乱弧菌、嗜水气单胞菌等细菌中调控 T6SS 的转录活性及功能^[10-11]。为初步鉴定维氏气单胞菌中 VasH 的生物学功能, 本研究采用同源重组基因

敲除技术构建了 *vasH* 基因敲除菌株及其回补菌株; 通过与野生型菌株比较, 初步鉴定 *vasH* 缺失对 T6SS 基因表达水平的影响; 通过测定病原菌生长能力和生物膜形成能力, 明确 *vasH* 缺失对病原菌致病相关特征的影响; 通过体外种间竞争实验及斑马鱼感染模型测定体内毒力和半数致死浓度(median lethal dose, LD₅₀), 阐明 *vasH* 缺失对病原菌综合毒力的影响。本研究以期深入解析 VasH 蛋白调控维氏气单胞菌 T6SS 功能的分子机制奠定基础, 同时也为制定维氏气单胞菌感染的防控策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

自杀型质粒 pRE112、大肠杆菌(*Escherichia coli*) WM3064 均为本实验室保存菌株。

细菌基因组快速提取试剂盒、一步克隆酶试剂盒、2×Phanta UniFi Master Mix、Clon Express Ultra One Step Cloning Kit、HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Kit、ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 蛋白胨、酵母膏, OXOID 公司; 抗生素、琼脂粉、三氯乙酸、无机盐, 北京索莱宝科技有限公司; RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit、PCR 产物纯化试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

透射电子显微镜, Hitachi 公司; Roche LightCycle[®] 96 仪器, Roche Diagnostics 公司。

实验所用引物合成及样品测序服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。本研究所用

引物如表 1 所示, 所构建及使用的菌株和质粒如表 2 所示。

1.2 重组菌株构建

采用细菌基因组快速提取试剂盒从 *A. veronii* C4 野生型菌液中提取基因组 DNA 作为 PCR 模板, 以 *vasH*F1/R1 和 *vasH*F2/R2 (表 1) 为引物, 分别 PCR 扩增 *vasH* 基因的上、下游同

源臂片段。PCR 反应体系(50 μ L): 2 $\times$ Phanta UniFi Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化回收。以上、下游同源臂片段为模板, 利用 Overlap PCR 获得同源臂

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Note
pRE112 F	ACGCCATTCATGGCCATATCA	pRE112 validation primer
pRE112 R	GTTATTGGTGCCTTAAACGC	
pRE112-anti-F	TCTAGAAGAAGCTTGGGATCG	Primers for pRE112 vector linearization
pRE112-anti-R	GAGCTCTCCCGGAATTCATG	
<i>vasH</i> F0	GGATGCTGGAGTCCGTCATT	Validation of <i>vasH</i> gene knockout
<i>vasH</i> R0	CTCCTTGTGCTGATTGCGC	
<i>vasH</i> F1	AATCCCGGGAGAGCTCATCATCGACTGCAAGAACGTG	Amplification of the upstream homologous sequence of <i>vasH</i>
<i>vasH</i> R1	ATGATGCTCAGGTCAGCCCTCCACCTCG	
<i>vasH</i> F2	GCTGACCTGAGCATCATGGGTTTGTTC	Amplification of the downstream homologous sequence of <i>vasH</i>
<i>vasH</i> R2	CCAAGCTTCTTCTAGAAATCCCTGATCCCGGATAAACC	
<i>vasH</i> F3	GCTTGATATCGAATTCATGGAGCAAGCCCTCGCATT	<i>vasH</i> complementation plasmid primers
<i>vasH</i> R3	TAGAACTAGTGGATCCTCAGTTCACCTCCAGTTTCTG	
pBBR-anti-F	GAATTCGATATCAAGCTTATCG	Primers for pBBR vector linearization
pBBR-anti-R	GGATCCACTAGTTCTAGAGC	
pBBR-F	AGCGGCTATTTAACGACCCTGCC	Primers for pBBR plasmid verification
pBBR-R	GTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGT	
<i>gyrB</i> -qF	GCTCACCATTTCGTCGTAACGG	Primers for RT-qPCR
<i>gyrB</i> -qR	GCCACCCTCGTAGCAGAAAT	
<i>hcp</i> -qF	GGTCAGCGTGTCCACAAACC	
<i>hcp</i> -qR	GGCATCTGGCAGTCGATGTC	
<i>vgrG(cluster2)</i> -qF	AAGCCCGATGAAATCCTC	
<i>vgrG(cluster2)</i> -qR	CCTTGCACTTCTCACACTCCTCA	
<i>vgrG(cluster134)</i> -qF	ACACAGAAGCCTGACGAA	
<i>vgrG(cluster134)</i> -qR	GTGTTTGGCCTGCTCGAA	
<i>tse1</i> -qF	CACTGGCACCAGCAAAACCG	
<i>tse1</i> -qR	GACATGCTCGCGCTTTACATCG	
<i>tse2</i> -qF	AGGGACGAGGTTTGACCCAT	
<i>tse2</i> -qR	ATTCGTGGGCACACCAAACA	
<i>tse3</i> -qF	GCCAACAACACCACCAAGCA	
<i>tse3</i> -qR	TCTTCCTTGTTGCGGCAACT	

表2 本研究所用菌株和质粒

Table 2 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristic(s)	Source
<i>Aeromonas veronii</i> C4	Wild type, ampicillin resistance, virulent to fish	Lab stock
<i>Aeromonas veronii</i> C4 $\Delta rsmA$	Ampicillin resistant, <i>rsmA</i> gene deleted from WT, T6SS-activated strain	Previously constructed in our laboratory ^[12]
<i>Aeromonas veronii</i> C4 $\Delta tssB$	Ampicillin resistant, <i>tssB</i> gene deleted from WT, T6SS-inactivated strain	Previously constructed in our laboratory ^[12]
<i>Aeromonas veronii</i> C4 $\Delta vasH$	Ampicillin resistant, <i>vasH</i> gene deleted from WT	This study
<i>Aeromonas veronii</i> C4 $\Delta vasH$ /P- <i>vasH</i>	Ampicillin and kanamycin resistant, <i>vasH</i> gene deleted from WT and complemented with functional <i>vasH</i> gene on pBBR plasmid	This study
pRE112	Suicide plasmid for homologous recombination to construct knockout strains, chloramphenicol (Cam) resistant	Laboratory stock
<i>Escherichia coli</i> WM3064	Encodes a relaxase, a mating pair formation (MPF) complex and a type IV coupling protein on the chromosome, diaminopimelic acid (DAP) auxotroph	Laboratory stock
pBBR- <i>vasH</i>	Derived from pBBR-MCS-2, contains the ORF region of <i>vasH</i> ; kanamycin resistance	This study
pBBR- <i>eGFP</i>	Derived from pBBR-MCS-2, contains the ORF region of <i>eGFP</i> ; gentamicin resistance	Previously constructed in our laboratory ^[12]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Used for plasmid cloning and protein expression; served as the target strain for competition assay in this study	Laboratory stock

连接产物；以 pRE112-anti-F/R 为引物通过反向 PCR 线性化 pRE112 载体(PCR 反应体系同上，延伸时间为 2.5 min)，再利用一步克隆酶试剂盒将线性化载体与 *vasH* 上、下游同源臂连接产物连接，构建重组敲除质粒 pRE112- $\Delta vasH$ ，并热激转化至 *E. coli* WM3064 感受态细胞。采用同源臂与载体的交叉引物验证阳性克隆，PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将鉴定正确的 pRE112- $\Delta vasH$ 重组菌株转接培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6，与相同浓度的维氏气单胞菌 C4 WT 按 1:1、3:1、1:3 的比例混合，终体积为 800 μ L。分别取 50 μ L 混合菌液滴加于含 50 μ g/mL 二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP)的 LB 平板上，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h。挑取平板上的菌落，涂布于含 25 μ g/mL 氯霉素(chloramphenicol, Cam)和 50 μ g/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的双抗平板上，以 pRE112 F/R 为引物进行 PCR 验证接合子。挑取阳性接合子

的单菌落接种于 LB 液体培养基中，30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜，取 100 μ L 菌液涂布于含 20% 蔗糖的 LB 平板上，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h。通过菌落 PCR 验证 *vasH* 敲除菌株，PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

回补菌株的构建流程与上述基本一致，仅将载体更换为 pBBR 质粒，线性化引物更换为 pBBR-anti-F/R，目的基因片段扩增引物更换为 *vasH* F3/R3。

1.3 生长曲线测定

挑取 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH$ /p-*vasH* 的单菌落，分别接种于 LB 培养基中，30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养过夜。按每毫升 OD_{600} =0.02 的浓度分别转接至 LB 和 M9 培养基；转接至 M9 培养基前，先用 M9 培养基清洗菌体 1 次。30 $^{\circ}$ C 下使用酶标仪每隔 1 h 测定 OD_{600} 值，记录数据并绘制生长曲线。每组设 3 个生物学重复，实验独立重复 3 次。使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统

计分析并绘制生长曲线图。

1.4 生物膜形成能力测定

挑取 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 单菌落, 分别按每毫升 $OD_{600}=0.02$ 的浓度转接至 LB 培养基中, 并按照每孔 300 μL 菌液转移至 48 孔板, 以含 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 培养基作为空白对照。30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 36 h 后吸出培养液, 用无菌 PBS 缓冲液冲洗残留的成膜菌体 3 次, 加入 200 μL 0.5% 结晶紫染色液染色 10 min, 再用无菌水充分冲洗去除残留染色液。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中彻底干燥后加入 200 μL 33% 醋酸溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 使用酶标仪于 570 nm 波长下测定吸光度值。每组设 3 个生物学重复, 实验重复 4 次。

1.5 透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察

将培养过夜的菌体转接至新鲜 LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6。收集 1.5 mL 菌液至离心管中, 6 000 r/min 离心 5 min 去除上清, 用 1 mL 无菌 PBS 清洗 3 次, 加 1 mL 电镜固定液室温固定 2 h。取涂有碳膜的铜网, 碳膜面朝上, 滴加 10 μL 菌液, 静置 15 min, 去除多余液体, 室温晾干。使用 HT7800 透射电子显微镜观察并拍照。每组设 3 个生物学重复, 实验重复 3 次。

1.6 RT-qPCR 检测

收集 LB 培养基中培养至稳定期的细菌, 10 000 r/min 离心 1 min 去除培养基, 用 DEPC 水洗涤残余培养基, 按照 RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit 说明书提取细菌总 RNA。以 1 000 ng RNA 为模板, 去除 gDNA 和逆转录反应体系的配制和程序按照 HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Kit 说明书进行。每个菌株设 3 个生物学重复, 每个生物学重复设 3 个技术重复。各检测基因所用引物如表 1 所示, 内参基因为

gyrB。实时荧光定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 按照 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix Kit 的说明书进行, 使用 Roche LightCycle[®] 96 仪器测定循环阈值(C_q)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 计算各基因的相对表达量, 并用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验。

1.7 细菌竞争实验

将维氏气单胞菌重组菌株作为攻击菌, 携带 pBBR-*eGFP* 质粒的大肠杆菌 BL21 作为目标菌株, 分别取培养过夜菌液调整至 10^8 CFU/mL。按攻击菌与靶标菌数量比 1:1 或 10:1 混合, 将混合液滴加于无抗生素 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。随后刮取平板上的混合菌落, 采用抗生素选择性平板或荧光标记法分离 2 株菌, 通过滴板实验、涂板计数及流式细胞术评估竞争后靶标菌的存活情况。每组设 3 个生物学重复, 实验重复 3 次。

1.8 斑马鱼 LD₅₀ 测定

采用 LD₅₀ 评价 $\Delta vasH$ 菌株相对于野生型 (WT) 菌株的毒力变化。选取健康的 5 dpf AB 系斑马鱼幼鱼, 随机分为 3 组, 每组设 4 个平行亚组, 每亚组 30 尾, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ E3 培养基中培养, 光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗。在更换新鲜 E3 培养基后, 将各组斑马鱼幼鱼分别浸泡于 WT、 $\Delta vasH$ 及 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌液的 10 倍梯度稀释液(浓度范围 5×10^6 – 5×10^9 CFU/mL)中, 对照组以 PBS 处理。每 4 h 记录死亡情况, 持续 48 h, 根据简易寇氏法^[13]计算 LD₅₀ 值。本研究所有动物实验均获得海南大学动物伦理委员会批准, 编号为 HNUAUCC-2023-00141。

1.9 数据处理

实验数据使用 Excel 整理, 采用 SPSS 24.0 进行统计分析, GraphPad Prism 10.0 进行数据可视化。统计方法包括采用双尾 *t* 检验、单因素方差分析(one-way ANOVA)、Dunnnett 检验及

Log-rank (Mantel-Cox)检验。

2 结果与分析

2.1 *vasH* 敲除菌株 $\Delta vasH$ 和回补菌株 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 的构建

分别扩增 *vasH* 基因上、下游同源臂(图 1A、1B)并线性化 pRE112 载体(图 1C), 利用一步克隆酶构建敲除质粒 pRE112- $\Delta vasH$ 。经菌落 PCR 验证阳性克隆, $\Delta vasH$ 敲除株的扩增产物为 309 bp, 而 *A. veronii* C4 野生型对照的扩增产物为 1 848 bp (图 1D), 条带大小符合预期, 表明目的基因 *vasH* 已成功敲除。进一步对 PCR 产物测序, 确认 *vasH* 基因已完全缺失。同时, 利用 pBBR 质粒验证引物对回补菌株进行 PCR 验证, 结果显示扩增产物条带大小与理论值 2 440 bp 一致, 表明回补菌株构建成功(图 1E)。

通过 RT-qPCR 检测所构建敲除及回补菌株中 *vasH* 基因的转录水平, 结果如图 1F 所示。与野生型相比, $\Delta vasH$ 菌株中 *vasH* 基因表达水平显著降低; 而回补菌株 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 中 *vasH* 基因表达水平显著高于野生型, 达到了过表达的效果, 这可能归因于回补质粒 pBBR 所携带的组成型高表达启动子。

2.2 VasH 蛋白对维氏气单胞菌 T6SS 基因表达具有正调控活性

在其他病原菌中 VasH 是 T6SS 发挥功能所必需的蛋白, 其缺失可导致 T6SS 失活^[10]。为明确 VasH 蛋白对维氏气单胞菌 T6SS 基因表达水平的影响, 以维氏气单胞菌野生型、*vasH* 敲除菌株 $\Delta vasH$ 和回补菌株 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 为研究对象, 通过 RT-qPCR 比较 T6SS 结构标志性蛋白 Hcp、VgrG 及效应蛋白 Tse1、Tse2、Tse3 的基因表达水平。结果显示, $\Delta vasH$ 菌株中 T6SS 代表性结构基因和效应蛋白基因的表达水平均显著降低, 而回补菌株中相应基因的表达水平恢复至接近野生型的水平(图 2)。上述结果表明, VasH 对维氏气单胞菌 T6SS 基因的表达具有正

调控活性。

2.3 VasH 蛋白不参与调控维氏气单胞菌富营养条件下的生长和外部形态

生长曲线结果显示, 在寡营养培养基(M9 培养基)中各菌株的生物量均低于富营养培养基(LB 培养基)。培养至 25 h 时, 寡营养条件下 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的 OD_{600} 均值分别为 0.7、0.8、0.8, 而富营养条件下三者 OD_{600} 均值均为 1.6。在富营养培养条件下, $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的生长曲线与野生型相比无显著差异(图 3A); 而在寡营养培养条件下, $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的初期生长速度略有降低, 野生型于 14 h 进入稳定期, 重组菌株则延至约 18 h (图 3B)。上述结果表明, 营养限制显著抑制了维氏气单胞菌的生长, VasH 蛋白可能参与调控寡营养条件下的细菌生长, 但在富营养条件下对细菌生长无显著影响。

透射电镜观察结果显示, $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的形态及外部结构与野生型相比未见显著差异, 3 株菌的鞭毛和菌毛均完整, 未发现分裂异常或菌体长度异常等现象(图 4)。该结果表明, VasH 蛋白可能不参与细菌细胞壁或表面结构的组装, 也不影响细菌的增殖与分裂过程。

2.4 VasH 蛋白抑制菌群生物膜形成

采用结晶紫染色法检测 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的生物膜形成能力, 结果如图 5 所示。与野生型相比, $\Delta vasH$ 菌株的生物膜形成能力显著增强, 而 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的生物膜形成能力恢复至接近野生型的水平, 表明 VasH 可能参与抑制生物膜的形成^[14-17]。

2.5 VasH 蛋白正调控细菌的种间竞争力

分别以维氏气单胞菌 C4 的 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 为攻击菌, 以携带 pBBR-*eGFP* 质粒的大肠杆菌 BL21 为目标菌株, 通过体外竞争

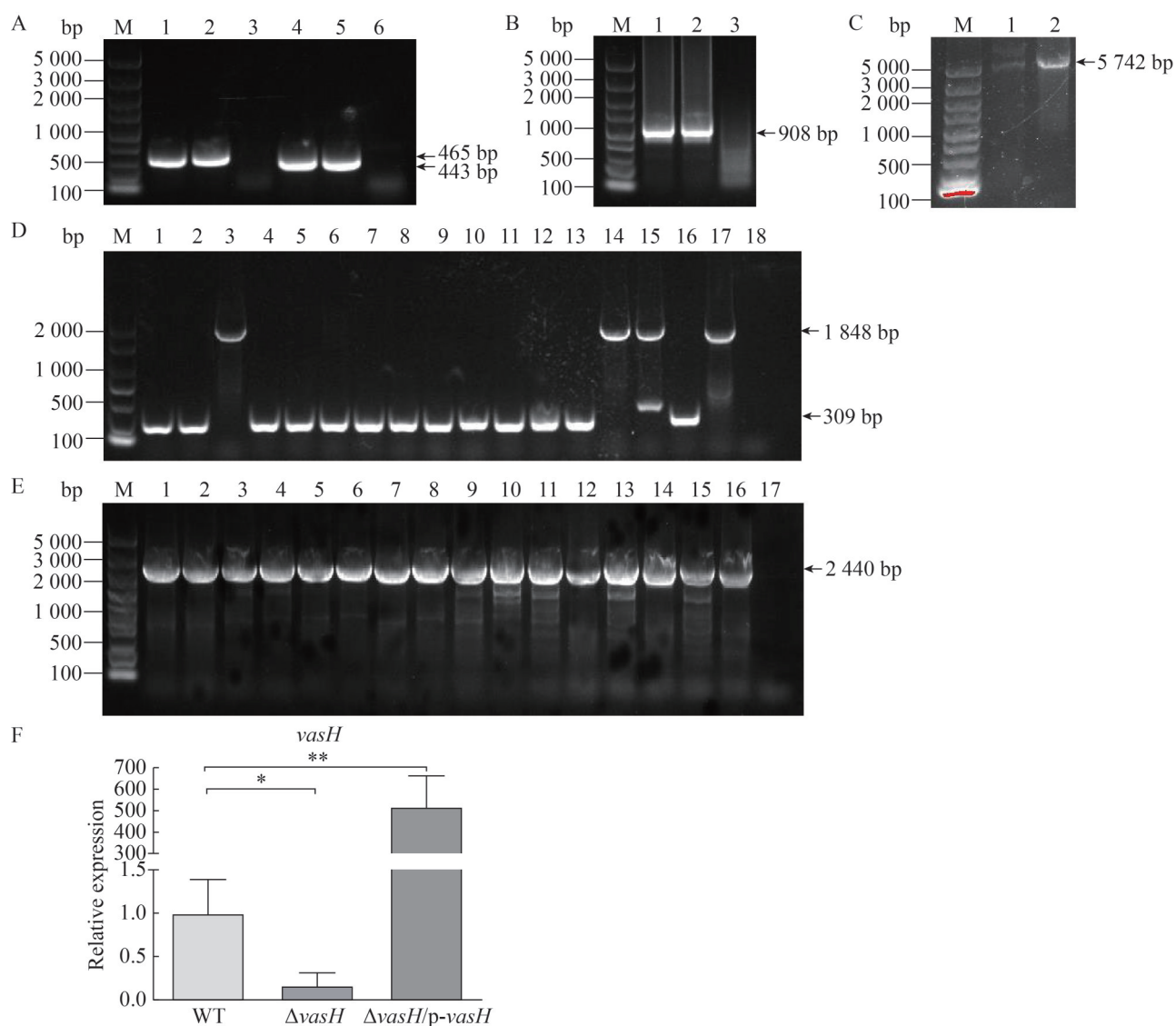


图1 敲除菌株 $\Delta vasH$ 和回补菌株 $\Delta vasH/p-vasH$ 的构建及转录水平验证

Figure 1 Construction of the knockout strain $\Delta vasH$ and the complemented strain $\Delta vasH/p-vasH$, and validation of *vasH* transcription levels. A: Linearized fragments of the homologous arms flanking *vasH* (Lanes 1, 2: PCR product of the upstream homologous arm; Lane 3: Negative control for upstream fragment PCR; Lanes 4, 5: PCR product of the downstream homologous arm; Lane 6: Negative control for downstream fragment PCR); B: The upstream and downstream homology arm fragments were linked by overlap extension PCR (Lanes 1, 2: Overlap-PCR product of the upstream and downstream homologous arms of *vasH*; Lane 3: Negative control for overlap-PCR); C: Linearization of the pBBR vector by inverse PCR (Lane 1: Non-linearized vector; Lane 2: Linearized vector fragment after inverse PCR); D: Validation of the $\Delta vasH$ knockout strain (Lanes 1–17: candidate clones; Lane 18: PCR negative control); E: Validation of the $\Delta vasH/p-vasH$ strain (Lanes 1–16: Candidate clones; Lane 17: PCR negative control); F: RT-qPCR analysis of *vasH* expression in $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$. M: DL5000 bp DNA marker. Statistical significance for RT-qPCR data was determined by one-way ANOVA. **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

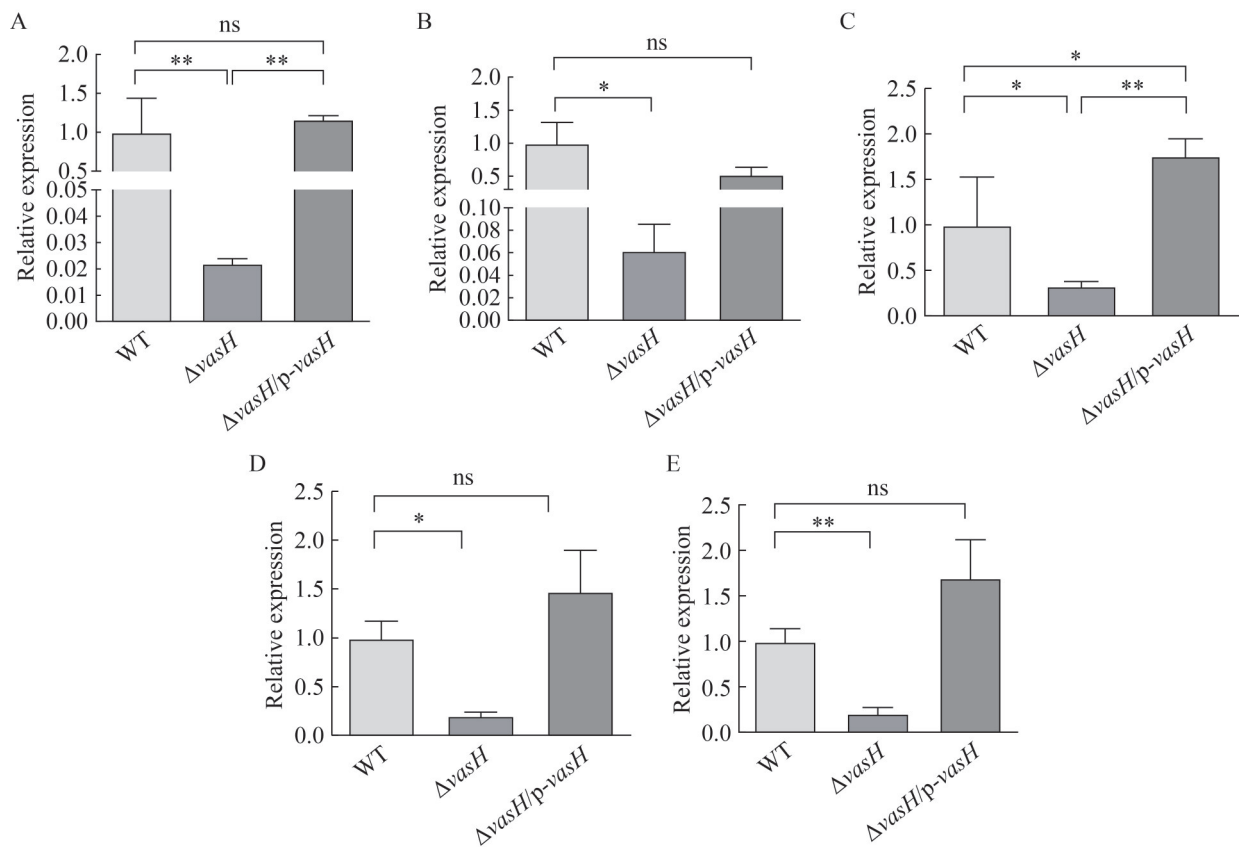


图2 RT-qPCR检测WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株中T6SS相关基因的表达水平

Figure 2 RT-qPCR analysis of the effect of *vasH* deletion on T6SS gene expression in WT, $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$ strains. A, B: Expression levels of T6SS structural genes *hcp* and *vgrG*; C–E: Expression levels of three T6SS effector proteins Tse1, Tse2 and Tse3. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

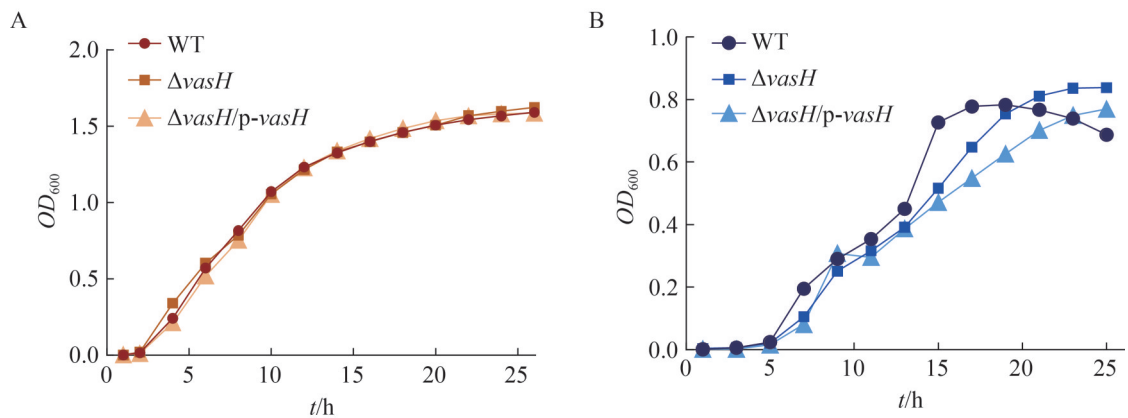


图3 维氏气单胞菌WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株的生长曲线

Figure 3 Growth curves of *Aeromonas veronii* C4 WT, $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$ strains. A: Growth curve under LB culture conditions; B: Growth curve under M9 culture conditions.

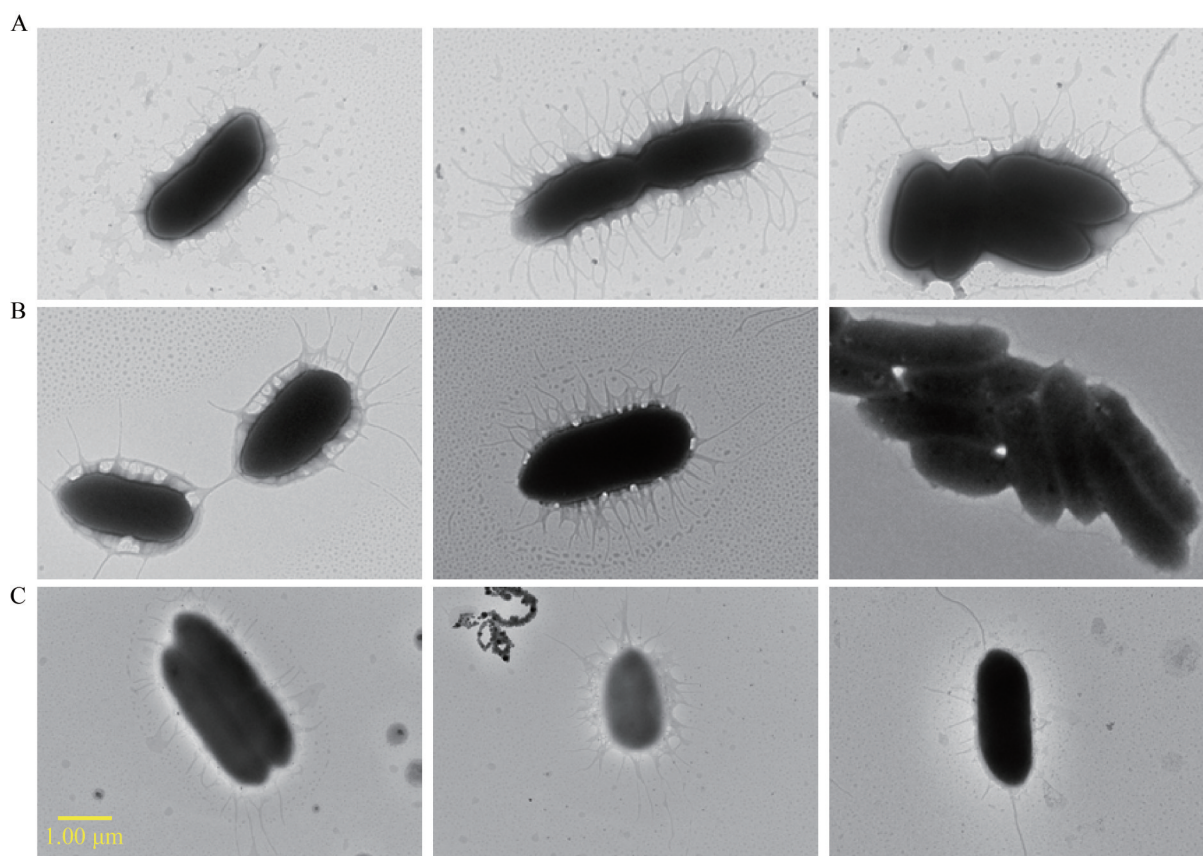


图4 透射电镜观察维氏气单胞菌WT (A)、 $\Delta vasH$ (B)和 $\Delta vasH/p-vasH$ (C)菌株的外部形态

Figure 4 Transmission electron microscopy images showing the surface morphology of *Aeromonas veronii* C4 WT (A), $\Delta vasH$ (B) and $\Delta vasH/p-vasH$ (C).

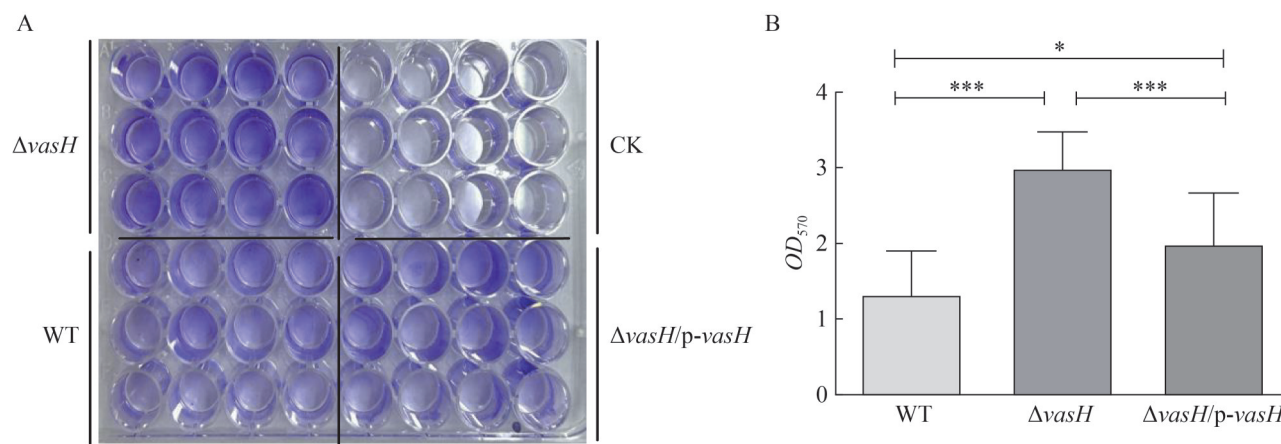


图5 结晶紫染色法检测维氏气单胞菌C4的WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株的生物膜形成能力(A)及统计分析结果(B)

Figure 5 Biofilm formation in *Aeromonas veronii* C4 WT, $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$. One-way ANOVA was used for statistical analysis. ***: $P < 0.001$; *: $0.01 < P < 0.05$.

实验检测 *vasH* 基因敲除对细菌种间竞争能力的影响。本实验室前期构建的 T6SS 激活菌株 $\Delta rsmA$ 和 T6SS 结构组装缺陷菌株 $\Delta tssB$ 分别作为阳性对照和阴性对照^[12]。采用滴板法(图 6A、6D)、

CFU 计数法(图 6B、6E)和流式细胞术(图 6C、6F)分别测定竞争处理后目标菌株的存活菌落数, 结果表明, 无论在攻击菌株与目标菌株数量比为 10:1 (图 6A–6C)还是 1:1 (图 6D–6F)的情况

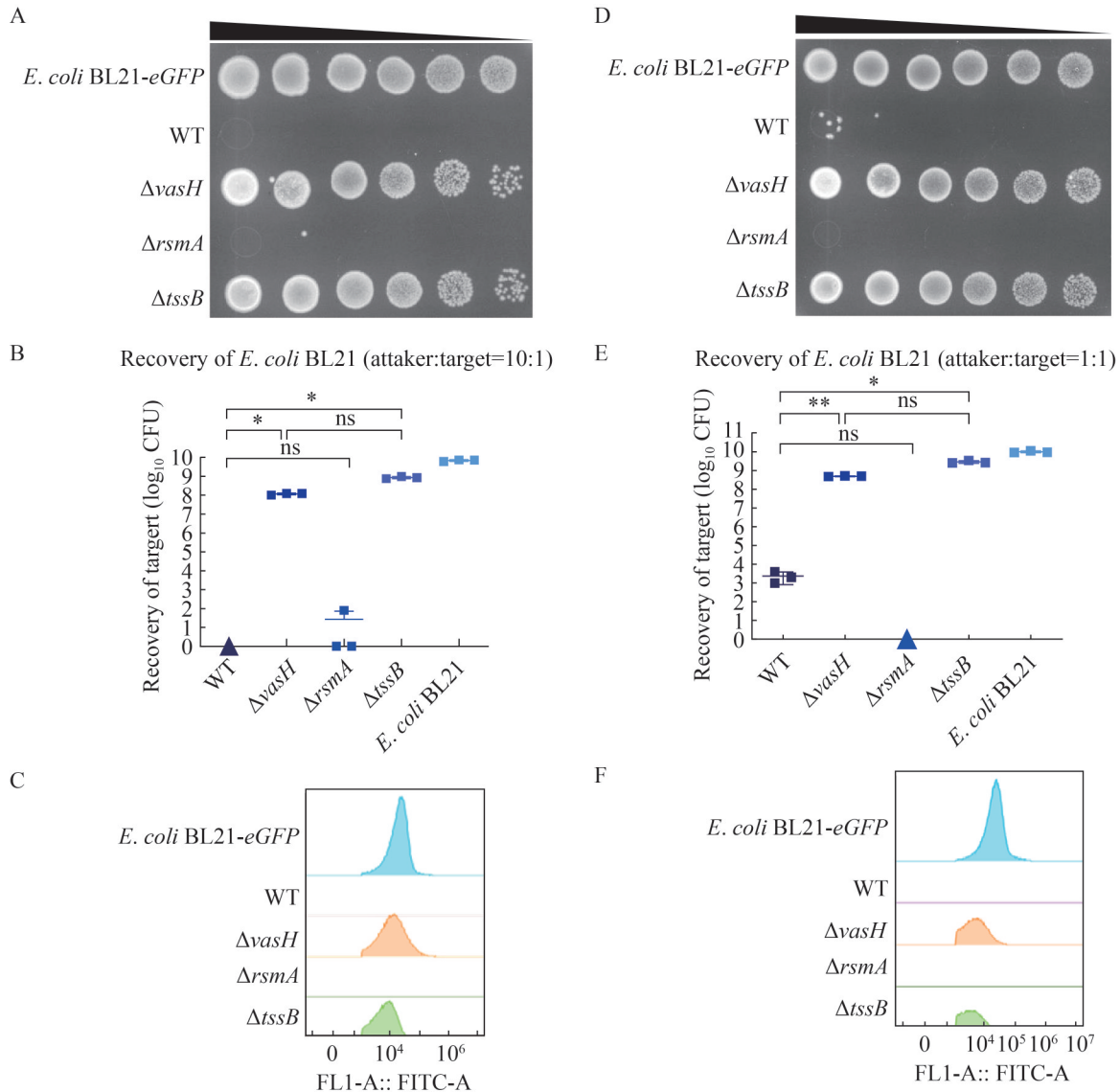


图6 体外种间竞争实验检测维氏气单胞菌C4的WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株的竞争能力

Figure 6 Interspecies competitive ability of *Aeromonas veronii* C4 WT, $\Delta vasH$, and $\Delta vasH/p-vasH$ strains assessed by *in vitro* competition assay. Survival of *E. coli* BL21 target was determined after 24 h co-culture on LB agar with WT, $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$ attacker strains at inoculation ratios of 10:1 (A–C) and 1:1 (D–F), using spot plating (A, D), CFU counting (B, E), and flow cytometry FITC fluorescent channel detection (C, F). ▲ : Below detection limit. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

下, 均获得一致的结果: 野生型及 $\Delta rsmA$ 菌株的 T6SS 功能正常, 能够有效抑制大肠杆菌 BL21 的生长; 而与 $\Delta vasH$ 或 $\Delta tssB$ 菌株共培养的大肠杆菌 BL21 生长未受到显著抑制, 经 10^5 倍稀释后仍可存活(图 6A、6D); CFU 计数结果进一步显示, 与 $\Delta vasH$ 或 $\Delta tssB$ 共培养组中大肠杆菌 BL21 的存活数量显著高于 WT 或 $\Delta rsmA$ 共培养组(图 6B、6E); 流式细胞术检测也观察到相应的荧光信号峰值变化(图 6C、6F)。上述结果表明, VasH 是调控维氏气单胞菌种间竞争能力所必需的蛋白。

2.6 VasH 蛋白介导维氏气单胞菌毒力

以斑马鱼幼鱼为感染模型, 探究 *vasH* 基因敲除对维氏气单胞菌毒力的影响。采用改良寇氏法^[13]计算 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株的半数致死浓度 LD₅₀, 结果显示 $\Delta vasH$ 菌株的 LD₅₀ 约为 WT 的 2.15 倍(表 3), 表明 *vasH* 基因敲除显著降低了维氏气单胞菌对斑马鱼幼鱼的致死能力。

进一步以 5×10^8 CFU/mL 浓度分别感染斑马鱼幼鱼, 绘制生存曲线并采用 Log-rank (Mantel-Cox)法进行统计分析。与野生型相比, $\Delta vasH$ 菌株的毒力显著减弱($P < 0.001$), 而 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 回补菌株感染组的斑马鱼死亡时间早于野生型组(图 7), 推测可能与回补菌株中 *vasH* 基因过表达(图 1F)导致 T6SS 功能过度激活有关, 但该差异未达显著水平($P > 0.05$)。

表3 维氏气单胞菌C4的WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ 菌株感染斑马鱼幼鱼的LD₅₀

Table 3 LD₅₀ for zebrafish larvae infected with WT, $\Delta vasH$, and $\Delta vasH/p\text{-}vasH$ strains of *Aeromonas veronii* C4

Dose of challenge/(CFU/mL)	Number of death/Total			Death rate/%		
	WT	$\Delta vasH$	$\Delta vasH/p\text{-}vasH$	WT	$\Delta vasH$	$\Delta vasH/p\text{-}vasH$
5×10^6	0	0	0	0.00	0.00	0.00
5×10^7	0	0	1	0.00	0.00	3.33
5×10^8	10	0	1	33.33	0.00	3.33
5×10^9	30	30	30	100.00	100.00	100.00
LD ₅₀	7.34×10^{10}	1.58×10^{11}	1.36×10^{11}			

3 讨论

本课题组前期研究表明, 维氏气单胞菌基因组中存在一套完整的 T6SS 基因簇, T6SS 可介导维氏气单胞菌种间竞争并调节其生态位适应性, 从而协同促进其致病性^[12]。在病原菌感染宿主的过程中, T6SS 的激活与功能表达受到精密调控^[18], 在不同细菌中存在环境信号激活^[18-22]、转录调控^[23-26]、转录后调控^[27-30]和翻译后调控^[31-32]等多种调控方式。然而, 维氏气单胞菌在何种条件下激活 T6SS 组装目前仍不清楚, 已知在实验室富营养培养条件下维氏气单胞菌 T6SS 处于非激活状态。维氏气单胞菌中存在 *rpoN* 基因编码的转录起始因子 σ^{54} , 且 σ^{54} 增强子结合蛋白 VasH 的编码基因位于 T6SS 基因簇中。结合现有研究^[10,33-35], 推测 T6SS 基因簇中的细菌增强子结合蛋白 VasH 可能参与维氏气单胞菌对 T6SS 的精密调控。

研究报道 VasH 蛋白是霍乱弧菌等细菌中 T6SS 表达和发挥功能所必需的元件, 能够调控细菌毒力^[10,34]。本研究从基因表达水平、体外竞争能力及宿主体内毒力 3 个层面证实, 在维氏气单胞菌中敲除 *vasH* 基因后 T6SS 活性及毒力显著下降。RT-qPCR 结果表明, *vasH* 缺失导致 T6SS 核心基因——包括重要结构蛋白 Hcp 和 VgrG 的编码基因, 以及本实验室前期鉴定的 3 个效应蛋白 Tse1、Tse2 和 Tse3 的编码基因^[12], 其相对表达量均较野生型显著下调(图 2), 表明 VasH 对维氏气单胞菌 T6SS 基因表达具有正调

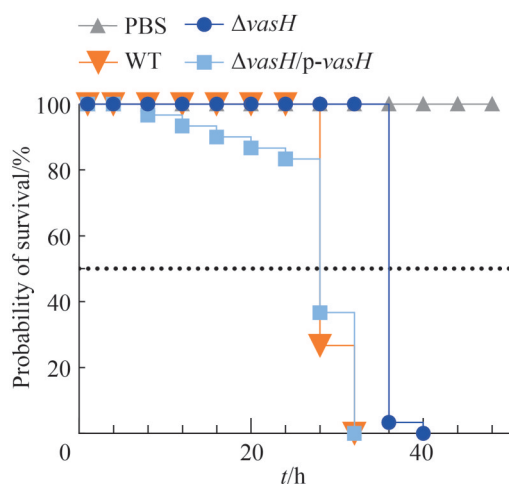


图7 维氏气单胞菌WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株感染斑马鱼幼鱼(5 dpf)的存活曲线

Figure 7 Survival curves of zebrafish larvae (5 dpf) infected with *Aeromonas veronii* WT, $\Delta vasH$ and $\Delta vasH/p-vasH$ strains. Zebrafish larvae were infected with *A. veronii* concentration of 5×10^8 CFU/mL, and survival was monitored every 4 h.

控活性。后续将进一步探究 VasH 是否通过直接结合 T6SS 启动子行使功能、其具体结合位点以及是否存在转录后调控等机制。在种间竞争方面, 体外竞争实验结果显示, VasH 缺失导致细菌的种间竞争能力显著降低至与 T6SS 结构组装缺陷菌株 $\Delta tssB$ 相近的水平(图 6)。尽管 VasH 本身并非 T6SS 结构蛋白, 但其缺失可能通过直接下调 T6SS 结构基因的表达而间接影响 T6SS 的组装及 T6SS 介导的细菌竞争能力。为进一步明确 VasH 蛋白缺失对维氏气单胞菌感染鱼类宿主毒力的影响, 本研究以斑马鱼幼鱼为感染模型, 比较了 WT、 $\Delta vasH$ 和 $\Delta vasH/p-vasH$ 菌株的 LD₅₀ 及其对斑马鱼存活率的影响。结果显示, $\Delta vasH$ 菌株的 LD₅₀ 为 WT 的 2.15 倍; 在感染浓度为 5×10^8 CFU/mL 时, $\Delta vasH$ 菌株感染导致斑马鱼的死亡率由 WT 感染时的 33.3% 降至 0, 表明 *vasH* 基因敲除显著降低了维氏气单胞菌的毒力(表 3、图 7)。生存曲线显示回补株导致斑马

鱼早期死亡, 这可能是由于构建回补株时采用了组成型启动子, 导致 VasH 过量表达而过度激活 T6SS 所致。后续将采用 *vasH* 基因自身启动子驱动或低拷贝表达载体进行回补以进一步验证其功能。T6SS 通常通过分泌不同效应蛋白杀伤邻近细胞、维持自身竞争优势^[36-40]。后续将进一步鉴定 VasH 缺失菌株分泌至胞外的效应蛋白种类及浓度变化, 以阐明其调控 T6SS 竞争能力及病原菌致病性的分子机制。

本研究还发现, $\Delta vasH$ 菌株在富营养培养基(LB 培养基)中的生长能力及外部形态与野生型相比无显著差异(图 3), 推测其原因可能是 VasH 调控的 T6SS 通路不参与细胞壁合成、营养物质转运等与生长及形态相关的基础代谢过程。现有研究也表明, 多数细菌的 T6SS 并不直接参与基础生长代谢或细胞形态的维持, 其核心功能集中于种内竞争、宿主互作等过程^[7-8,12], 本研究结果与之一致。

T6SS 作为接触依赖性竞争武器, 在生物膜这一密集的微生物群落中可能发挥关键作用, 在铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等细菌中 T6SS 某些结构蛋白或效应蛋白的缺失可导致生物膜形成能力发生改变^[14-17]。本研究在维氏气单胞菌中也观察到类似现象: $\Delta vasH$ 菌株的生物膜形成能力较野生型显著增强(图 5), 提示 VasH 可能负调控维氏气单胞菌的生物膜形成。其具体机制尚不明确, 有待后续实验进一步阐明 VasH 缺失是否通过影响 T6SS 效应蛋白的分泌, 进而干扰效应蛋白参与的碳代谢等生物膜形成相关通路, 最终促进细菌聚集与生物膜基质沉积。

4 结论

本研究成功构建了维氏气单胞菌 $\Delta vasH$ 菌株及其回补菌株, 从 T6SS 基因表达、细菌竞争能力及宿主感染能力 3 个层面证实 VasH 正调控维氏气单胞菌 T6SS 的表达与功能; 通过检测 $\Delta vasH$ 及其回补菌株的生长能力、生物膜形成能

力及细胞形态, 初步明确 VasH 的核心功能集中于调控 T6SS 活性。本研究为后续深入解析维氏气单胞菌 T6SS 介导的致病机制奠定了基础。

作者贡献声明

高士杰: 实验具体实施人, 完成实验操作、数据分析及论文初稿撰写; 马香: 获取资金资助并对实验进行总体设计及指导, 论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity[J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 129.
- [2] Egorov AI, Best JMB, Frebis CP, Karapondo MS. Occurrence of *Aeromonas* spp. in a random sample of drinking water distribution systems in the USA[J]. Journal of Water and Health, 2011, 9(4): 785-798.
- [3] Chen F, Sun JF, Han ZR, Yang XJ, Xian JA, Lv AJ, Hu XC, Shi HY. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas veronii* from diseased crucian carp (*Carassius auratus* Gibelio)[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2742.
- [4] Chen PL, Tsai PJ, Chen CS, Lu YC, Chen HM, Lee NY, Lee CC, Li CW, Li MC, Wu CJ, Ko WC. *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan of China: predominance of *Aeromonas veronii*[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2015, 48(6): 618-624.
- [5] Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease[J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(4): 371-388.
- [6] Lin JL, Zhong HB, Chen Q, Cui L, Xu F, Tang F. *Aeromonas veronii*-associated endogenous endophthalmitis: a case report[J]. Journal of Medical Case Reports, 2024, 18: 171.
- [7] Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 343-359.
- [8] Robitaille S, Trus E, Ross BD. Bacterial defense against the type VI secretion system[J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(3): 187-190.
- [9] Yadav SK, Magotra A, Ghosh S, Krishnan A, Pradhan A, Kumar R, Das J, Sharma M, Jha G. Immunity proteins of dual nuclease T6SS effectors function as transcriptional repressors[J]. EMBO Reports, 2021, 22(6): e51857.
- [10] Li JH, Wu ZH, Wu CS, Chen DD, Zhou Y, Zhang YA. VasH contributes to virulence of *Aeromonas hydrophila* and is necessary to the T6SS-mediated bactericidal effect[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 793458.
- [11] Manera K, Caro F, Li H, Pei TT, Hersch SJ, Mekalanos JJ, Dong TG. Sensing of intracellular Hcp levels controls T6SS expression in *Vibrio cholerae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(25): e2104813118.
- [12] Jiang XL, Li HZ, Ma JY, Li H, Ma X, Tang YQ, Li JJ, Chi X, Deng Y, Zeng S, Liu Z. Role of Type VI secretion system in pathogenic remodeling of host gut microbiota during *Aeromonas veronii* infection[J]. The ISME Journal, 2024, 18: wrac053.
- [13] 杨世洪. 半数致死量 LD₅₀ 速算方法[J]. 卫生研究, 1974, 3(5): 73-78.
- [14] Yang YT, Pan DM, Tang YN, Li JL, Zhu KX, Yu ZL, Zhu LF, Wang Y, Chen P, Li CF. H3-T6SS of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 contributes to environmental adaptation via secretion of a biofilm-promoting effector[J]. Stress Biology, 2022, 2: 55.
- [15] Fei NY, Ji WQ, Yang LL, Yu CY, Qiao P, Yan JP, Guan W, Yang YW, Zhao TC. Hcp of the type VI secretion system (T6SS) in *Acidovorax citrulli* group II strain Aac5 has a dual role as a core structural protein and an effector protein in colonization, growth ability, competition, biofilm formation, and ferric iron absorption[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9632.
- [16] Mohamed NA, Alrawy MH, Makbol RM, Mohamed AM, Hemdan SB, Shafik NS. Type VI secretion system (T6SS) in *Klebsiella pneumoniae*, relation to antibiotic resistance and biofilm formation[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2023: 601-608.
- [17] Zhang YB, Huang YP, Ding HY, Ma JB, Tong XY, Zhang YX, Tao Z, Wang QY. A σ^E -mediated temperature gauge orchestrates type VI secretion system, biofilm formation and cell invasion in pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. Microbiological Research, 2023, 266: 127220.
- [18] Hespanhol JT, Nóbrega-Silva L, Bayer-Santos E. Regulation of type VI secretion systems at the transcriptional, posttranscriptional and posttranslational level[J]. Microbiology, 2023, 169(8): 001376.
- [19] Ben-Yaakov R, Salomon D. The regulatory network of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(7): 2248-2260.
- [20] Dos Passos Lima L, de Santana ES, Lorenzetti APR, Lourenço RF, de Moraes Ceseti L, Riva L, Bayer-Santos E, Boechat AL, Baldini RL, Farah CS, Koide T, Alvarez-Martinez CE. The AraC-type transcription factor TagK is a new player in the signaling cascade that induces the anti-eukaryotic T6SS of *Xanthomonas citri*[J]. Molecular Microbiology, 2022, 118(5): 552-569.
- [21] Li JH, Wu ZH, Hou YT, Zhang YA, Zhou Y. Fur functions as an activator of T6SS-mediated bacterial dominance and virulence in *Aeromonas hydrophila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 1099611.

- [22] Lu WJ, Lu H, Huo XY, Wang CC, Zhang ZR, Zong BB, Wang GY, Dong WQ, Li XD, Li YY, Chen HC, Tan C. EvfG is a multi-function protein located in the Type VI secretion system for ExPEC[J]. Microbiological Research, 2024, 283: 127647.
- [23] Han YY, Wang TT, Chen GK, Pu QQ, Liu Q, Zhang YN, Xu LH, Wu M, Liang HH. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(12): e1008198.
- [24] Li CF, Wei ZY, He XQ, He HY, Liu YQ, Zuo YX, Xiao H, Wang Y, Shen XH, Zhu LF. OxyR-regulated T6SS functions in coordination with siderophore to resist oxidative stress[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(2): e03231-23.
- [25] Bervoets I, Charlier D. Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms: opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2019, 43(3): 304-339.
- [26] Zhang XX, Yin LW, Liu Q, Wang D, Xu CJ, Pan XL, Bai F, Cheng ZH, Wu WH, Jin YX. NrtR mediated regulation of H1-T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10: e01858-21.
- [27] Van Assche E, van Puyvelde S, Vanderleyden J, Steenackers HP. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 141.
- [28] Jørgensen MG, Pettersen JS, Kallipolitis BH. sRNA-mediated control in bacteria: an increasing diversity of regulatory mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2020, 1863(5): 194504.
- [29] Bhowmik S, Pathak A, Pandey S, Devnath K, Sett A, Jyoti N, Bhando T, Akhter J, Chugh S, Singh R, Sharma TK, Pathania R. *Acinetobacter baumannii* represses type VI secretion system through a manganese-dependent small RNA-mediated regulation[J]. mBio, 2025, 16(2): e03025-24.
- [30] Zammit T, Sy B, Shchepachev V, Mediati DG, Poudyal P, Norris D, Bang S, Alquethamy S, Wu W, Ullah A, McAteer S, Rowell K, Michie K, Gally D, Tollervey D, Tree J. The type 6 secretion system immunity protein RhsFI has been repurposed for small RNA regulation in pathogenic *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(14): gkaf749.
- [31] Wang J, Brodmann M, Basler M. Assembly and subcellular localization of bacterial type VI secretion systems[J]. Annual Review of Microbiology, 2019, 73: 621-638.
- [32] Liu YB, Zhou MQ, Bu YF, Qin L, Zhang YX, Shao S, Wang QY. Lysine acetylation regulates the AT-rich DNA possession ability of H-NS[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(4): 1645-1660.
- [33] Bernard CS, Brunet YR, Gavioli M, Lloubès R, Cascales E. Regulation of type VI secretion gene clusters by σ^{54} and cognate enhancer binding proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(9): 2158-2167.
- [34] Kitaoka M, Miyata ST, Brooks TM, Unterweger D, Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(23): 6471-6482.
- [35] Guckes KR, Cecere AG, Williams AL, McNeil AE, Miyashiro T. The bacterial enhancer binding protein VasH promotes expression of a type VI secretion system in *Vibrio fischeri* during symbiosis[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(7): e00777-19.
- [36] Ren AM, Jia ML, Liu JH, Zhou T, Wu LW, Dong T, Cai Z, Qu JX, Liu Y, Yang L, Zhang YD. Acquisition of T6SS effector TseL contributes to the emerging of novel epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11: e03308-22.
- [37] Sá-Pessoa J, López-Montesino S, Przybyszewska K, Rodríguez-Escudero I, Marshall H, Ova A, Schroeder GN, Barabas P, Molina M, Curtis T, Cid VJ, Bengoechea JA. A trans-Kingdom T6SS effector induces the fragmentation of the mitochondrial network and activates innate immune receptor NLRX1 to promote infection[J]. Nature Communications, 2023, 14: 871.
- [38] Ahmad S, Wang BY, Walker MD, Tran HR, Stogios PJ, Savchenko A, Grant RA, McArthur AG, Laub MT, Whitney JC. An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp[J]. Nature, 2019, 575(7784): 674-678.
- [39] Le NH, Pinedo V, Lopez J, Cava F, Feldman MF. Killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by a bifunctional cell wall-targeting T6SS effector[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(40): e2106555118.
- [40] Hespanhol JT, Sanchez-Limache DE, Nicastro GG, Mead L, Llontop EE, Chagas-Santos G, Farah CS, de Souza RF, da Silva Galhardo R, Lovering AL, Bayer-Santos E. Antibacterial T6SS effectors with a VRR-Nuc domain are structure-specific nucleases[J]. eLife, 2022, 11: e82437.