

副溶血弧菌 *uvrY* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析

卢淑淇^{1#}, 芮闯^{2#}, 郭容¹, 吴佩洁³, 邱索平³, 方维焕⁴, 李婷婷²,
韩先干^{1*}, 蒋蔚^{1*}

1 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海

2 上海健康医学院, 上海

3 从化海关综合技术服务中心, 广东 广州

4 浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安

卢淑淇, 芮闯, 郭容, 吴佩洁, 邱索平, 方维焕, 李婷婷, 韩先干, 蒋蔚. 副溶血弧菌 *uvrY* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4162-4173.

LU Shuqi, RUI Chuang, GUO Rong, WU Peijie, QIU Suoping, FANG Weihuan, LI Tingting, HAN Xiangan, JIANG Wei. Biological characteristics and pathogenicity of a *uvrY*-deleted mutant of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 4162-4173.

摘要: UvrY 是 BarA/UvrY 双组分系统的关键反应调节因子, 在调控细菌毒力与环境适应性中起重要作用。【目的】探究 UvrY 对副溶血弧菌 SH112 株的生物学特性及致病性的调控作用。【方法】通过同源重组技术构建 *uvrY* 基因缺失株($\Delta uv r Y$)及其互补株($C\Delta uv r Y$), 并采用生长曲线测定、运动能力(泳动和群集运动)、生物被膜形成、细菌竞争、HeLa 细胞黏附能力与毒性实验, 以及小鼠感染模型(组织载菌量和致死率分析)等多方面实验, 系统比较野生株、缺失株和互补株的表型差异。【结果】与野生株相比, $\Delta uv r Y$ 菌株在指数生长后期表现出显著的生长缺陷; 运动能力明显下降, 其中泳动和群集运动分别降低了 33% 和 70%, 但生物被膜形成能力未受到显著影响。此外, $\Delta uv r Y$ 菌株对大肠杆菌的竞争抑制能力减弱, 对 HeLa 细胞的黏附率降低了 36.7%, 细胞毒性下降了 15.8%。小鼠感染实验进一步表明, $\Delta uv r Y$ 菌株的组织定殖能力显著降低, 致病性减弱了 75%。【结论】本研究揭示了 UvrY 通过调控副溶血弧菌的生长、运动性、竞争能力和宿主互作等过程在其致病机制中发挥关键作用, 为深入理解 BarA/UvrY 双组分系统的调控网络提供了重要依据。

资助项目: 国家自然科学基金(32473039); 上海市自然科学基金(21ZR1477000)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32473039) and the Shanghai Natural Science Foundation of China (21ZR1477000).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: JIANG Wei, jiangwei@shvri.ac.cn; HAN Xiangan, hanxgan@163.com

Received: 2025-03-06; Accepted: 2025-04-18; Published online: 2025-05-13

关键词: 副溶血弧菌; UvrY; 双组分系统; 致病性; 毒力调控

Biological characteristics and pathogenicity of a *uvrY*-deleted mutant of *Vibrio parahaemolyticus*

LU Shuqi^{1#}, RUI Chuang^{2#}, GUO Rong¹, WU Peijie³, QIU Suoping³, FANG Weihuan⁴, LI Tingting², HAN Xiangan^{1*}, JIANG Wei^{1*}

1 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China

2 Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, China

3 Conghua Customs Comprehensive Technical Service Center, Guangzhou, Guangdong, China

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

Abstract: UvrY is a key response regulator of the BarA/UvrY two-component system (TCS) and plays an important role in regulating bacterial virulence and environmental adaptability. **[Objective]** To investigate the regulatory role of UvrY in the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* SH112. **[Methods]** The *uvrY*-deleted mutant ($\Delta uv r Y$) and its complementary strain ($C\Delta uv r Y$) were constructed by homologous recombination. Phenotypes were systematically compared among the wild type, mutant, and complementary strains by growth curve plotting, motility (swimming and swarming) assays, biofilm formation assay, bacterial competition assay, HeLa cell adhesion and cytotoxicity assays, as well as a mouse infection model (analysis of bacterial loads in tissues and lethality). **[Results]** Compared with the wild type strain, $\Delta uv r Y$ exhibited significant growth defects during the late exponential phase and weakened motility, with swimming and swarming reduced by 33% and 70%, respectively, while the biofilm formation of the mutant remained unaffected. Additionally, $\Delta uv r Y$ showed weakened competitive inhibition against *Escherichia coli*, a 36.7% reduction in HeLa cell adhesion, and a 15.8% decrease in cytotoxicity. Mouse infection experiments further demonstrated that $\Delta uv r Y$ had significantly reduced tissue colonization capacity and the attenuation of 75% in pathogenicity. **[Conclusion]** This study reveals that UvrY plays a crucial role in the pathogenicity of *V. parahaemolyticus* by regulating the growth, motility, competitive ability, and interaction with the host, giving insights into the regulatory network of the BarA/UvrY two-component system.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; UvrY; two-component system; pathogenicity; virulence regulation

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性菌,广泛分布在气候条件温暖的海洋和河口环境中^[1-2]。自1950年首次分离鉴定以来,副溶血弧菌已逐渐成为全球食源性海产品中中毒事件的首要致病因子,并引起虾等水产动

物的急性坏死性肝胰腺炎,对水产养殖业造成经济损失,严重威胁公共卫生安全^[3]。截至目前,其主要毒力因子包括黏附素、溶血素、III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)以及VI型分泌系统(type VI secretion system,

T6SS)^[4-6]。然而副溶血弧菌的致病机制仍未被完全阐明。因此深入研究副溶血弧菌的致病机理,尤其是关键信号转导系统的功能,将为开发精准防控策略提供理论依据。

在细菌适应宿主环境的过程中,信号转导系统通过感知外界刺激并协调毒力因子表达调控致病作用。其中,双组分系统在原核生物中广泛存在,调控多种细胞过程^[7-8]。UvrY 作为 BarA/UvrY 双组分系统的反应调节因子,在细菌中发挥转录因子的作用^[9]。BarA/UvrY 双组分系统是信号转导的关键,由跨膜感应激酶蛋白 BarA 及其协同调控的胞内反应调节蛋白 UvrY 构成^[10]。BarA 通过感知环境信号发生自磷酸化,随后将磷酸基团转移至 UvrY,调控非编码 RNA 控制下游基因表达^[11]。该调控模块在大肠杆菌、副溶血弧菌、沙门氏菌等革兰氏阴性病原菌中的毒力调控具有高度保守性^[12-14]。BarA/UvrY 双组分系统精密调控细菌的运动性、生物被膜形成、黏附、定殖及毒力因子表达等关键生理过程^[15-17]。例如,UvrY 可正向调控大肠杆菌 I 型菌毛的转录,增强其肠道定殖能力^[18]。在气单胞菌中,UvrY 通过调控一系列毒力因子来影响病原体的毒力^[19]。此外,研究表明 BarA/UvrY 是副溶血弧菌的重要毒力因子,能够调控 III 型和 VI 型分泌系统等毒力因子,在致病过程中发挥关键作用^[13]。BarA/UvrY 系统在许多细菌的毒力调控中发挥了核心作用。然而副溶血弧菌的 BarA/UvrY 双组分系统与毒力之间的密切关系目前尚不完全清楚。

本研究成功构建了副溶血弧菌 SH112 株 *uvrY* 基因缺失株及互补株,并对各菌株的生物学特性进行了深入分析,以期为揭示 BarA/UvrY 双组分系统与副溶血弧菌生物学特性和毒力调控之间关联性的研究提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

本研究所用菌株及质粒均由本实验室保存:

副溶血弧菌 SH112 (*tdh*⁺, 血清型 O3:K6)、携带 pRK2013 质粒的大肠杆菌 HB101、大肠杆菌 CC118λpir、含 pBAD33-Gm 质粒的大肠杆菌 DH5α、自杀质粒 pYAK1、互补质粒 pMMB207、HeLa 细胞。

1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒, Promega 公司; BamH I、Pst I、Sac I 内切酶与 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; Triton X-100, 国药集团化学试剂有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清, Gibco 公司。

全波长酶标仪、PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.3 实验动物

Institute of Cancer Research (ICR)小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司。本研究所有动物实验经中国农业科学院上海兽医研究所动物伦理委员会批准,编号为 SYXK (沪) 2020-0027。

1.4 引物设计与合成

根据 GenBank 中副溶血弧菌 RIMD2210633 标准株的 *uvrY* 基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。其中, *sacB*-F/R 引物特异性靶向质粒 pYAK1 多克隆位点两侧的 *sacB* 标记基因,通过 PCR 特异性检测同源重组后质粒在宿主菌中的丢失情况。该筛选策略利用 *sacB* 基因编码的果聚糖蔗糖酶特性,当质粒成功切除时 *sacB* 基因随载体同步丢失,从而实现重组菌株的精准筛选。

1.5 *uvrY* 基因缺失株与互补株的构建

参考文献[20]构建 *uvrY* 基因缺失株及互补株。以副溶血弧菌 SH112 株为野生株(wild type strain, WT),并提取全基因组作为扩增模板,所用引物见表 1。分别使用引物 *uvrY*-A/B 和 *uvrY*-C/D 扩增同源臂 AB、CD 片段,通过重叠 PCR 获得缺失 *uvrY* 基因的融合片段 *uvrY*-AD。将该片段经 BamH I/Pst I 酶切后连接至自杀质粒

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme	Product size (bp)
<i>uvrY</i> -A	ACCGGATCCTTGCGAGTAAGTAGGAAAC	<i>Bam</i> H I	548
<i>uvrY</i> -B	ACTTGTATCTCCACACTTTTTATTGGC		
<i>uvrY</i> -C	TGTGGAGATACAAGTTGTGAATCCTCCTTTC		606
<i>uvrY</i> -D	ACCCTGCAGCGTCTTATCGCTTGTATCTG	<i>Pst</i> I	
<i>uvrY</i> -E	TTCTGGATACGATGAAAGCC		Wide type: 2 461
<i>uvrY</i> -F	TACCTCTTGTGGCTCGTGT		Mutant: 1 816
<i>uvrY</i> -pMMB-F	CGCGGCCTGCAG TTGATTAATGTTTTCTTGT	<i>Pst</i> I	663
<i>uvrY</i> -pMMB-R	AATGAGCTCCTAAAGGGTCTCGGTGTCCA	<i>Sac</i> I	
<i>sacB</i> -F	ACGGCACTGTCGCAAACATA		600
<i>sacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT		

pYAK1, 获得重组质粒 pYAK1- Δ *uvrY*。通过接合转移(供体菌: CC118 λ pir/pYAK1- Δ *uvrY*; 受体菌: SH112; 辅助菌: pRK2013-HB101)将重组质粒导入 SH112。用含 10 μ g/mL 氯霉素的 TCBS 平板和含 20% 蔗糖的 LB 平板筛选结合子。将筛选到的疑似缺失株用相应引物进行鉴定, PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析, 经鉴定正确的缺失株命名为 Δ *uvrY*。经过 20 代传代后, 用引物 *uvrY*-E/F 和 *sacB*-F/R 进行鉴定, 确定自杀质粒已丢失, 保存菌株并用于后续实验。

参考构建缺失株的方法获得互补质粒 pMMB207-*uvrY*, 并通过结合转移的方法导入副溶血弧菌 SH112, 分别使用 *uvrY*-E/F 和 *uvrY*-pMMB-F/R 特异性引物进行 PCR 验证, 经电泳检测将阳性菌株命名为互补株 $C\Delta$ *uvrY*。

1.6 生长曲线的测定

将过夜培养的 WT、 Δ *uvrY* 及 $C\Delta$ *uvrY* 菌株分别接种至含 3% NaCl 的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至对数生长期 (OD_{600} 为 0.20 ± 0.02)。采用无菌 96 孔板进行动态监测, 每组设置 3 个平行重复, 按 100 μ L/孔定量接种菌悬液, 使用酶标仪测定 OD_{600} (间隔 1 h), 持续监测 12 h。最终通过生长曲线比较分析各菌株间的增殖差异。

1.7 运动性测定

根据 Li 等^[21]的方法, 分别检测菌株的泳动和群集运动能力。泳动运动 (swimming): 将 WT、 Δ *uvrY* 及 $C\Delta$ *uvrY* 培养至对数生长期, 各取 1 μ L 的菌液垂直接种于泳动平板 (含 0.3% 琼脂、3% NaCl 的 LB 培养基) 上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 4 h 后观察扩散圈; 群集运动 (swarming): 用含 1.5% 琼脂的 HIB 培养基制备运动平板, 接种 1 μ L 对数期菌液后置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中持续孵育 16 h。拍照记录泳动和群集运动情况, 并测量直径。

1.8 生物被膜的测定

采用结晶紫染色法评估细菌生物被膜形成能力^[15]。将各菌株培养至对数生长期, 取 200 μ L 菌液加入 96 孔板中, 分别在 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 静置孵育 48 h。用 PBS 洗涤 3 次, 甲醇固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, PBS 洗涤并晾干后, 加入 95% 乙醇溶解, 测量 OD_{595} 值。

1.9 细菌竞争试验

参照文献[22]进行细菌竞争试验。将 WT、 Δ *uvrY* 及 $C\Delta$ *uvrY* 与大肠杆菌 DH5 α (含 pBAD33 质粒) 按 4:1 的比例混合 (副溶血弧菌为攻击者, 大肠杆菌为猎物)。取其中 1 份倍比稀释后分别涂布于 TCBS 培养基和含有庆大霉素的 LB 平板上, 以确定共培养 0 h 时攻击者和猎物的菌体浓

度(CFU/mL); 另外 2 份混合菌液分别在 30 °C 和 37 °C 共培养 4 h 后稀释至 10^{-4} – 10^{-6} , 涂布于相应平板上, 获得共培养 4 h 时各副溶血弧菌和大肠杆菌的菌体浓度(CFU/mL)。

1.10 细胞黏附试验

将 HeLa 细胞接种于 24 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至约 80% 汇合度。分别以 MOI=10:1 的 WT、 $\Delta uvrY$ 及 $C\Delta uvrY$ 感染细胞 1 h, 加入含 0.5% Triton X-100 的裂解液处理 20 min。裂解液经 PBS 梯度稀释后涂布于含 3% NaCl 的 LB 平板, 记录菌落数量, 计算相对黏附效率。

1.11 细胞毒性检测

将 HeLa 细胞接种于 96 孔细胞板中, 培养至约 80% 汇合度。将各菌株培养至对数生长期, 以 MOI=10:1 感染细胞, 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 1.5 h。按照 CytoTox96[®] 试剂盒说明书操作, 反应终止后通过酶标仪测定 OD₄₉₀, 并计算各菌株的细胞毒性率。

1.12 小鼠致病性分析

参照 Bai 等^[22]的方法, 将 3–4 周龄雌性 ICR 小鼠随机分为 4 组(WT 组、 $\Delta uvrY$ 组、 $C\Delta uvrY$ 组和空白组, $n=8$), 分别通过腹腔注射接种终浓度为 3×10^8 CFU/mL 的菌悬液或等体积无菌生理盐水。感染后连续监测 7 d, 每小时记录小鼠的存活状态。

1.13 组织载量测定

参考文献[23]将 5 周龄的小鼠分成 4 组, 每组 10 只, 分别通过腹腔注射接种终浓度为 5×10^7 CFU/mL 的对数生长期菌悬液和无菌生理盐水。感染 10 h 后无菌解剖取样, 用 PBS 倍比稀释, 涂布于 TCBS 琼脂平板上, 以评估细菌定植情况。

1.14 数据分析

连续变量以均值±标准差(mean±SD)形式表达; 采用 GraphPad Prism v8.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 作为差

异显著性阈值。

2 结果与分析

2.1 *uvrY* 基因缺失株和互补株的鉴定

采用菌株的基因组 DNA 作为扩增模板进行 PCR 验证(图 1)。以 WT 基因组为模板, 引物 *uvrY*-E/F 扩增出大小约为 2 500 bp 的特异性条带(图 1, 泳道 1), 而以 $\Delta uvrY$ 及 $C\Delta uvrY$ 基因组为模板, 均呈现约 1 800 bp 的扩增产物(图 1, 泳道 2、3)。PCR 产物经比对正确, WT 和 $\Delta uvrY$ 扩增出的目的片段大小分别是 2 461 bp 和 1 816 bp。用引物 *uvrY*-pMMB-F/R 扩增 WT 和 $C\Delta uvrY$ 基因组, 获得目的片段(图 1, 泳道 4、6), 而

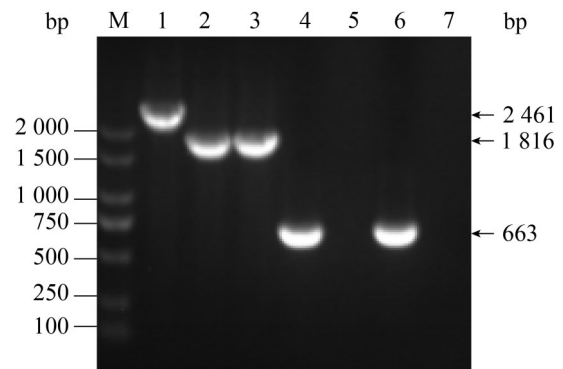


图1 *uvrY*基因缺失株及其互补株的PCR鉴定结果。M: DL2000 DNA marker; 泳道1–3: 以WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 为模板, 用*uvrY*-E/F引物扩增的目的片段; 泳道4–6: 以WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 为模板, 用*uvrY*-pMMB-F/R引物扩增的目的片段; 泳道7: 以 $\Delta uvrY$ 为模板, 用*sacB*-F/R引物扩增的目的片段。

Figure 1 PCR identification of the *uvrY* gene deletion strain and its complementation strain. M: DL2000 DNA marker; Lanes 1–3: Target fragments amplified with WT, $\Delta uvrY$ and $C\Delta uvrY$ as templates using *uvrY* E/F primers; Lanes 4–6: Target fragments amplified with WT, $\Delta uvrY$ and $C\Delta uvrY$ as templates, and the target fragment amplified with *uvrY*-pMMB-F/R primers; Lane 7: The target fragment of $\Delta uvrY$ amplified with *sacB*-F/R primers.

$\Delta uvrY$ 扩增不出目的条带(图 1, 泳道 5), 经测序比对表明目的片段为 663 bp, 表明互补株构建正确。多次传代后, 采用 *sacB*-F/R 引物对 $\Delta uvrY$ 进行自杀质粒的丢失情况进行筛查, 电泳未检测到 *sacB* 基因特异性条带(图 1, 泳道 7), 表明 $\Delta uvrY$ 与 $C\Delta uvrY$ 构建成功且传代稳定, 可用于后续实验。

2.2 *uvrY* 基因参与调控副溶血弧菌生长能力

如图 2 所示, 在相同的培养条件下(37 °C、含 3% NaCl 的 LB 培养基)培养 6 h 内 *uvrY* 基因的缺失对副溶血弧菌的生长无显著影响。从 7 h 开始, 缺失株 $\Delta uvrY$ 的生长速度低于 WT 和 $C\Delta uvrY$ (*: $P < 0.05$)。这表明 *uvrY* 基因参与调控副溶血弧菌的生长。

2.3 UvrY 参与副溶血弧菌的泳动及群集运动

各菌株在泳动平板上培养 4 h 时后, 均形成特征性半圆形扩散环; 定量分析显示, $\Delta uvrY$ 突变株的泳动直径较 WT 下降了 33% (****: $P < 0.0001$), $C\Delta uvrY$ 未恢复至 WT 水平(****: $P < 0.0001$) (图 3A、3B)。各菌株在群集平板上均表现出明显的运动性; $\Delta uvrY$ 的群集运动能力较 WT 下降了 70% (****: $P < 0.0001$), 而 $C\Delta uvrY$ 的群集运动能力恢复至 WT 水平(图 3C、3D)。上述结果证实 UvrY 对副溶血弧菌的泳动及群集

运动具有调控作用。为排除 $\Delta uvrY$ 生长缺陷对运动表型的干扰, 同步检测了泳动平板菌体的增殖情况(6 h 培养)。经菌落计数验证(图 3E), WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 在运动检测期间的生长能力无统计学差异($P > 0.05$), 确证运动表型变化是 *uvrY* 缺失的直接效应。上述结果表明, 作为双组分系统的调控枢纽, UvrY 对副溶血弧菌的泳动和群集运动具有差异性调控作用, 且该功能独立于其生长调控途径。

2.4 UvrY 不参与副溶血弧菌生物被膜的形成

采用结晶紫染色法定量评估 WT、 $\Delta uvrY$ 及 $C\Delta uvrY$ 的生物被膜形成能力。经 48 h 静态培养后, 染色分析显示(图 4A、4B)在 30 °C 和 37 °C 的培养条件下, $\Delta uvrY$ 菌株的生物被膜吸光度值与 WT 组无统计学差异($P > 0.05$), 提示 *uvrY* 基因不参与副溶血弧菌生物被膜的形成。

2.5 UvrY 参与副溶血弧菌细菌竞争过程

将各组副溶血弧菌与大肠杆菌进行混合孵育, 分别在 30 °C 和 37 °C 作用 4 h 后进行计数, 考察 *uvrY* 基因缺失后对副溶血弧菌杀伤大肠杆菌能力的影响。如图 5A 所示, 在 30 °C 时, 与大肠杆菌共孵育 4 h 后 $\Delta uvrY$ 组的大肠杆菌存活数显著高于 WT 组(***: $P < 0.001$), 表明 $\Delta uvrY$ 缺失株杀伤大肠杆菌的能力显著低于野生株。同时, 对共孵育 4 h 后的各组副溶血弧菌进行计数。结果显示, 各组活菌量均无显著差异, 排除了由于 *uvrY* 基因缺失导致副溶血弧菌生长变慢而引起的杀菌作用减弱的可能性(图 5B)。在 37 °C 时, 各组与大肠杆菌共孵育 4 h 后大肠杆菌和副溶血弧菌的浓度差异均不显著(图 5C、5D)。然而, 在 30 °C 和 37 °C 共孵育 4 h 后, $C\Delta uvrY$ 组的大肠杆菌存活数未能恢复至 WT 水平(****: $P < 0.0001$)。上述结果表明, 在 30 °C 时 *uvrY* 基因有助于副溶血弧菌对大肠杆菌的抗菌作用。

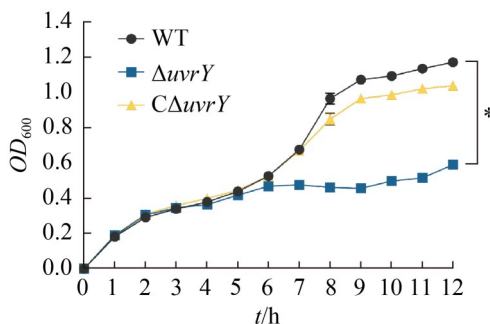


图2 WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 的生长曲线

Figure 2 The growth curves of the WT, $\Delta uvrY$ and $C\Delta uvrY$. *: $P < 0.05$.

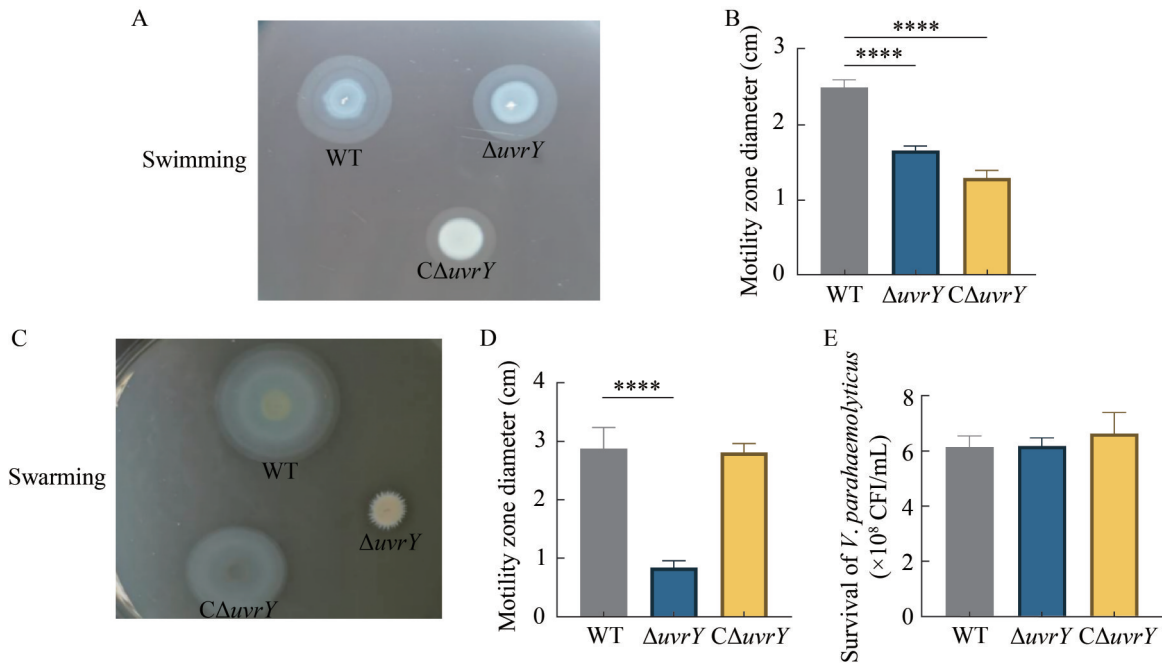


图3 运动性分析。A、B: 菌株的泳动运动; C、D: 菌株的群集运动; E: 各菌株在泳动过程中的生长情况。

Figure 3 Motility analysis. A, B: The swimming pattern of the strains; C, D: The swarming pattern of the strains; E: Growth of each strain during swimming motility. ****: $P < 0.0001$.

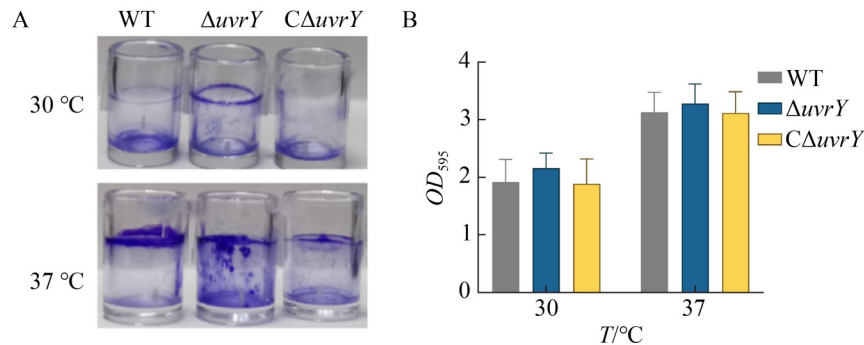


图4 生物被膜形成能力。通过结晶紫染色法观察菌株在48 h内形成生物被膜的能力(A)和测量数据(B)。

Figure 4 Biofilm forming capacity. Quantitative profiling of biofilm formation ability in bacterial strains using crystal violet assay: phenotypic morphology (A) and spectrophotometric quantification (B) following 48 h static incubation.

2.6 UvrY 参与副溶血弧菌对细胞的黏附过程

以 MOI 为 10 的条件感染 HeLa 细胞 1 h, 细胞黏附实验结果显示(图 6A): $\Delta uvrY$ 的黏附水

平较 WT 显著下降 36.7% (***: $P < 0.001$), 而 $C\Delta uvrY$ 则恢复至 WT 的细胞黏附水平。该结果证实 *uvrY* 基因正向调控副溶血弧菌对宿主细胞的黏附过程。为明确黏附缺陷是否源于细菌增

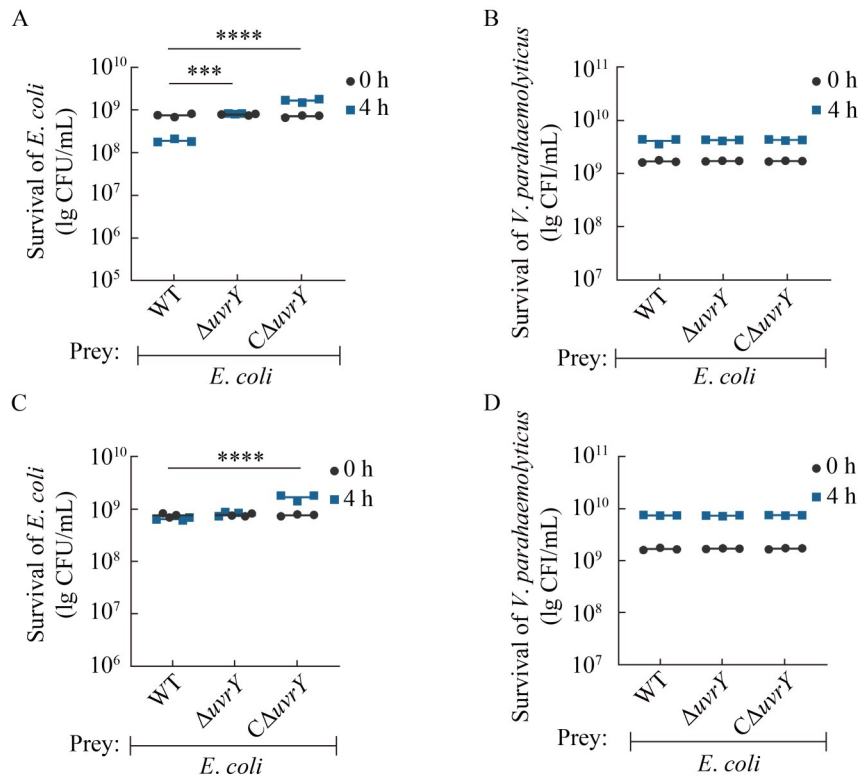


图5 副溶血弧菌菌株与大肠杆菌共培养时的抗菌作用。A、B: 30 °C下竞争前(0 h)和竞争后(4 h)大肠杆菌和副溶血弧菌的计数; C、D: 37 °C下竞争前(0 h)和竞争后(4 h) 大肠杆菌和副溶血弧菌的计数。***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

Figure 5 Antibacterial efficacy of *V. parahaemolyticus* against *E. coli* in co-culture systems. A, B: Comparative quantification of *E. coli* and *V. parahaemolyticus* populations at pre-interaction (0 h) vs. post-competitive (4 h) phases under 30 °C; C, D: Comparative quantification of *E. coli* and *V. parahaemolyticus* populations at pre-interaction (0 h) vs. post-competitive (4 h) phases under 37 °C. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

殖差异, 实验采用平行对照设计: 各菌株以 MOI=10:1 感染 HeLa 细胞 1 h 后裂解细胞, 接着连续 10 倍比稀释后涂布至 LB 平板上, 观察并记录菌落的生长情况。如图 6B 所示, 感染时各菌株活菌浓度无统计学差异($P > 0.05$), 排除了生长速率对黏附表型的潜在影响。UvrY 可能通过调控细菌表面黏附因子的表达, 而非影响基础生长特性, 来介导副溶血弧菌与宿主细胞的黏附作用。

2.7 *uvrY* 基因缺失影响副溶血弧菌对细胞的毒性作用

为了研究 UvrY 是否影响副溶血弧菌的毒

力, 本研究对感染 WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 菌株的 HeLa 细胞(MOI=10:1, 感染 1.5 h)的乳酸脱氢酶释放水平进行了定量分析。与 WT 相比, $\Delta uvrY$ 诱导的细胞毒性下降了 15.8% (**: $P < 0.01$)(图 7), 表明 UvrY 作为关键调控因子能够促进副溶血弧菌对宿主细胞的毒性作用。

2.8 UvrY 调控副溶血弧菌对小鼠的致病性作用

本研究利用小鼠腹腔感染模型系统评估了 UvrY 在哺乳动物感染模型中的毒力调控作用。WT 组小鼠在感染 2 h 后即出现精神萎靡、呼吸急促、眼球充血、粪便稀薄等临床症状,

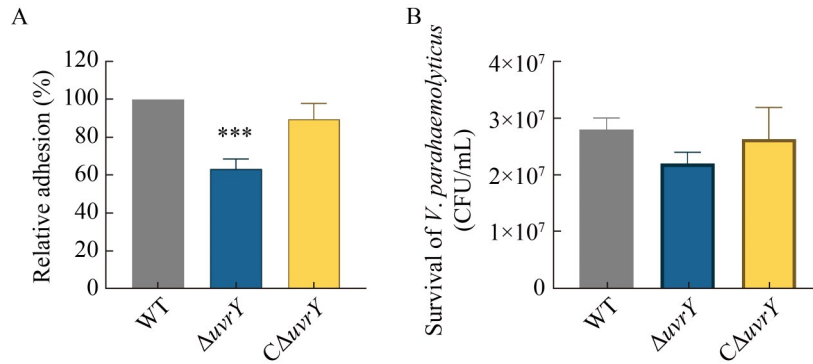


图6 各菌株对HeLa细胞的黏附作用。A: 菌株对HeLa细胞的黏附作用; B: 感染HeLa细胞1 h后各菌株的生长情况。

Figure 6 Adhesion of each strain to HeLa cells. A: Adhesion to HeLa cell monolayers of the strains; B: Growth of each strain 1 h after infection of HeLa cells. ***: $P < 0.001$.

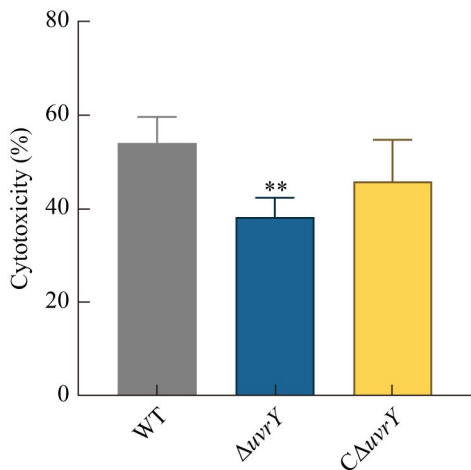


图7 WT、 $\Delta uvrY$ 和 $C\Delta uvrY$ 对HeLa细胞的毒性影响

Figure 7 Cytotoxic effects of the WT, $\Delta uvrY$, and $C\Delta uvrY$ on HeLa cells. **: $P < 0.01$.

并在 10 h 内全部死亡(图 8)。与 WT 组相比, $\Delta uvrY$ 组小鼠的临床症状显著减轻, 且死亡起始时间延迟, 最终存活率达 75%; $C\Delta uvrY$ 组小鼠的症状与 WT 组相似, 存活率为 25%; 空白对照组小鼠未出现上述临床症状, 存活率为 100%。该结果不仅证实 *uvrY* 基因缺失可显著降低副溶血弧菌对小鼠的致病性, 还为 BarA/UvrY 双组分系统的宿主体内功能研究提

供了依据。

2.9 UvrY 参与副溶血弧菌在小鼠组织的定殖过程

为了解 UvrY 对副溶血弧菌在宿主体内定殖的影响, 本研究进行了小鼠组织载菌量测定。结果显示(图 9), 接种 10 h 后 $\Delta uvrY$ 组菌株在小鼠心脏、肝脏、脾脏和肾脏的载菌量分别下降为 WT 组的 1/27、1/273、1/54 和 1/47 (**: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$), 表明 *uvrY* 基因参与副溶血弧菌在小鼠组织中的定殖过程。然而, $C\Delta uvrY$ 在各个组织中的定殖能力未能恢复到 WT 水平(****: $P < 0.0001$)。

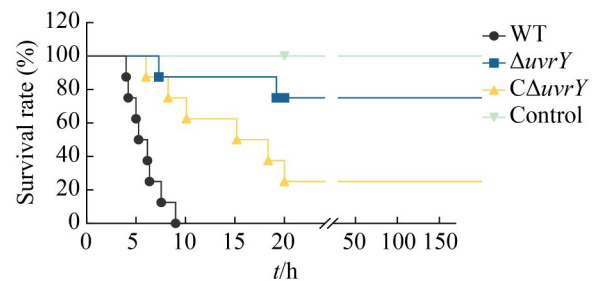


图8 各菌株感染ICR小鼠后的存活率

Figure 8 The survival rate of ICR mice infected with different strains.

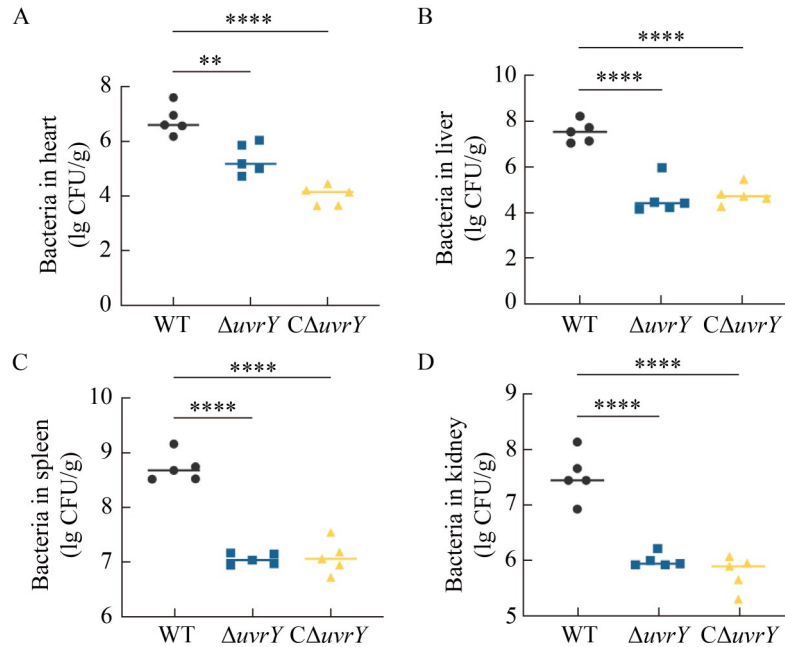


图9 各菌株的定殖能力。各菌株在小鼠心(A)、肝(B)、脾(C)、肾(D)组织的细菌载量。

Figure 9 The colonization ability of each strain. Bacterial loads in heart (A), liver (B), spleen (C), kidney (D) of infected mice. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨论与结论

UvrY 作为 BarA/UvrY 双组分系统的核心反调节因子，在多种致病菌的碳代谢、生物被膜形成、运动性和毒力过程中发挥调控作用^[13,24-25]。本研究通过构建 $\Delta uvrY$ 突变株系统解析了该调控因子对细菌生长、细菌竞争、运动性、对宿主的黏附和毒性以及致病性的影响，揭示了其在副溶血弧菌感染过程中的关键作用。

在生长特性方面， $\Delta uvrY$ 表现出独特的表型：在标准培养条件下，短周期培养(6 h 内)其生长能力与 WT 相当，但在后期出现生长迟滞。这一现象提示 UvrY 可能通过双相调控机制影响代谢通路，缺失 *uvrY* 可能阻碍了 BarA/UvrY 系统对碳代谢的调控，进而限制能量供应。早期通过非碳代谢依赖途径维持基础生长，而在对数生长期后期则通过激活碳代谢相关基因来优化能量分配，导致 $\Delta uvrY$ 在中后期出现生长缺陷。这种时序性调控模式拓展了对 BarA/UvrY

系统功能的认识。本研究还通过实验证实，在短周期培养下泳动检测(图 3E)及细胞黏附实验(图 6B)中生长未受影响。

UvrY 及其同源蛋白还影响大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌等的鞭毛基因表达和/或运动性^[24,26-28]。副溶血弧菌通过游动运动在液体中移动，并利用群集运动在表面上移动，这使得细胞能够到达有利的环境。UvrY 在副溶血弧菌的环境适应功能中扮演关键角色，*uvrY* 基因的缺失显著降低了副溶血弧菌的泳动和群集运动能力。此外，细菌竞争试验表明 UvrY 可增强副溶血弧菌在 30 °C 条件下的环境生存优势，这是揭示 BarA/UvrY 双组分系统对抗菌活性具有调控作用。运动能力作为细菌毒力的重要决定因素，结合已有研究^[29]，我们推测 UvrY 可能通过调控鞭毛基因的表达，从而协调运动性与抗菌活性以及致病性的关系，这一发现为理解病原体环境适应机制提供了新视角。

通过比较分析,本研究证实 UvrY 促进了副溶血弧菌对宿主细胞的黏附和毒性作用。黏附于宿主组织是微生物建立感染的基础,有助于避免被宿主的天然免疫机制清除^[30]。BarA/UvrY 双组分系统是禽致病性大肠杆菌黏附和毒力的决定因素^[31]。Zhang 等^[13]发现 UvrY 通过调控 T3SS2 和 T6SS 效应蛋白的分泌来促进副溶血弧菌的毒力。本研究表明, *uvrY* 基因的缺失显著削弱了副溶血弧菌对 HeLa 细胞的黏附能力及细胞毒性作用。值得注意的是,病原菌通过释放毒性因子介导的宿主细胞损伤过程是其突破宿主防御屏障实现体内定殖的重要病理机制。在肠出血性大肠杆菌中, UvrY 能够增加 T3SS 基因的表达,促进其在小鼠组织中的定殖能力^[12]。本研究证实 UvrY 通过多途径调控副溶血弧菌的黏附-定殖过程。小鼠感染实验进一步证实了 UvrY 在系统性毒力调控中的核心地位。*uvrY* 基因缺失导致临床症状延迟出现以及致死率显著降低,同时, $\Delta uv r Y$ 表现出的黏附率下降与组织载菌量降低存在显著相关性。这些结果提示, UvrY 为副溶血弧菌提供了生存优势,导致突变菌株的毒力、黏附和定殖能力下降,使病原菌更易被宿主清除,而 WT 在组织内持续存在,导致宿主死亡。这表明 UvrY 可能通过调控副溶血弧菌的系统性毒力因子显著影响其在哺乳动物宿主中的致病进程。

上述结果提示, UvrY 是副溶血弧菌重要的毒力因子,参与协调细菌生长、抗菌活性、运动性、毒力、黏附和定殖能力,进而影响副溶血弧菌的生物学特性和对宿主的致病性。这些发现不仅显著深化了对副溶血弧菌致病分子机制的理解,同时也为相关感染的防治开辟了新的思路,使其成为一个极具潜力的抗菌靶标。基于当前研究成果,未来我们将继续深入解析 UvrY 的精确调控网络,从而为开发针对副溶血弧菌的新型防控策略打下坚实的基础。

作者贡献声明

卢淑淇: 实验操作、数据分析和撰写文章; 芮闯: 数据收集和监督管理; 郭容: 实验操作、数据收集与分析; 吴佩洁、邱索平、方维焕、李婷婷: 软件程序、监督管理; 韩先干: 研究构思和设计; 蒋蔚: 获取基金、项目管理、论文审阅和修改。

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] De SILVA RS, KOVACIKOVA G, LIN W, TAYLOR RK, SKORUPSKI K, KULL FJ. Crystal structure of the virulence gene activator AphA from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(14): 13779-13783.
- [2] SHIMOHATA T, TAKAHASHI A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *The Journal of Medical Investigation*, 2010, 57(3/4): 179-182.
- [3] YU Y, YANG H, LI J, ZHANG PP, WU BB, ZHU BL, ZHANG Y, FANG WH. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(10): 827-835.
- [4] MARIE YEUNG PS, BOOR KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(2): 74-88.
- [5] PARK KS, ONO T, ROKUDA M, JANG MH, OKADA K, IIDA T, HONDA T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659-6665.
- [6] RAGHUNATH P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 805.
- [7] ALVAREZ AF, BARBA-OSTRIA C, SILVA-JIMÉNEZ H, GEORGELLIS D. Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3210-3226.
- [8] HU MJ, ZHOU ZA, LIU CQ, ZHAN ZQ, CUI Y, HE SK, SHI XM. Roles of response regulators in the two-component system in the formation of stress tolerance, motility and biofilm in *Salmonella enteritidis*[J]. *Foods*, 2024, 13(22): 3709.
- [9] ZERE TR, VAKULSKAS CA, LENG YY, PANNURI A, POTTS AH, DIAS R, TANG DJ, KOLACZKOWSKI B,

- GEORGELLIS D, AHMER BMM, ROMEO T. Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145035.
- [10] PERNSTIG AK, MELEFORS Ö, GEORGELLIS D. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(1): 225-231.
- [11] CONTRERAS FU, CAMACHO MI, PANNURI A, ROMEO T, ALVAREZ AF, GEORGELLIS D. Spatiotemporal regulation of the BarA/UvrY two-component signaling system[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(6): 104835.
- [12] WU P, WANG Q, YANG Q, FENG XH, LIU XM, SUN HM, YAN J, KANG CB, LIU B, LIU YT, YANG B. A novel role of the two-component system response regulator UvrY in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 pathogenicity regulation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2297.
- [13] ZHANG WW, XIE RQ, ZHANG XD, LEE LTO, ZHANG HJ, YANG MH, PENG B, ZHENG J. Organism dual RNA-seq reveals the importance of BarA/UvrY in *Vibrio parahaemolyticus* virulence[J]. FASEB Journal, 2020, 34(6): 7561-7577.
- [14] TEPLITSKI M, GOODIER RI, AHMER BMM. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(24): 7257-7265.
- [15] LIU PX, ZHANG XY, WANG Q, LI YY, SUN WD, QI Y, ZHOU K, HAN XG, CHEN ZG, FANG WH, JIANG W. Biological and transcriptional studies reveal VmeL is involved in motility, biofilm formation and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 976334.
- [16] PAZHANI GP, CHOWDHURY G, RAMAMURTHY T. Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival, host colonization, and infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 737299.
- [17] PALANIYANDI S, MITRA A, HERREN CD, LOCKATELL CV, JOHNSON DE, ZHU XP, MUKHOPADHYAY S. BarA-UvrY two-component system regulates virulence of uropathogenic *E. coli* CFT073[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31348.
- [18] MIKI T, HOSHINO Y, SUDO N, ITO M, HANEDA T, OKADA N. *uvrY* deletion and acetate reduce gut colonization of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* by decreasing expression of type 1 fimbriae[J]. Infection and Immunity, 2022, 90(3): e0066221.
- [19] CHEN YW, YEH WH, TANG HJ, CHEN JW, SHU HY, SU YC, WANG ST, KUO CJ, CHUANG YC, CHEN CC, KO WC, CHEN CS, CHEN PL. UvrY is required for the full virulence of *Aeromonas dhakensis*[J]. Virulence, 2020, 11(1): 502-520.
- [20] 白雪瑞, 王权, 凌娇, 万莹, 陈永军, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. T3SS1 和 T3SS2 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致病性的比较[J]. 微生物学报, 2018, 58(3): 455-466.
- BAI XR, WANG Q, LING J, WAN Y, CHEN YJ, FANG WH, SUN WD, JIANG W. Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS1 and T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(3): 455-466 (in Chinese).
- [21] LI GH, YAN CH, XU YF, FENG YQ, WU Q, LV XY, YANG BW, WANG X, XIA XD. Punicalagin inhibits *Salmonella* virulence factors and has anti-quorum-sensing potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(19): 6204-6211.
- [22] BAI XR, LIU PX, WANG WC, JIN YH, WANG Q, QI Y, ZHANG XY, SUN WD, FANG WH, HAN XG, JIANG W. TssL2 of T6SS2 is required for mobility, biofilm formation, wrinkly phenotype formation, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* SH112[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 537.
- [23] WANG WC, LI YY, LU SQ, LIU PX, HAN XG, SUN WD, WANG Q, FANG WH, JIANG W. BolA-like protein (IbaG) promotes biofilm formation and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1436770.
- [24] GOODIER RI, AHMER BM. SirA orthologs affect both motility and virulence[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(7): 2249-2258.
- [25] WONG SM, CARROLL PA, RAHME LG, AUSUBEL FM, CALDERWOOD SB. Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(12): 5854-5861.
- [26] MITRA A, PALANIYANDI S, HERREN CD, ZHU XP, MUKHOPADHYAY S. Pleiotropic roles of *uvrY* on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55492.
- [27] LIU X, XU DQ, WU DF, XU MX, WANG Y, WANG WW, RAN TT. BarA/UvrY differentially regulates prodigiosin biosynthesis and swarming motility in *Serratia marcescens* FS14[J]. Research in Microbiology, 2023, 174(3): 104010.
- [28] TEPLITSKI M, GOODIER RI, AHMER BMM. Pathways leading from *BarA/SirA* to motility and virulence gene expression in *Salmonella*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(24): 7257-7265.
- [29] BEN-YAAKOV R, SALOMON D. The regulatory network of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(7): 2248-2260.
- [30] SHARON N, OFEK I. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases[J]. Glycoconjugate Journal, 2000, 17(7): 659-664.
- [31] HERREN CD, MITRA A, PALANIYANDI SK, COLEMAN A, ELANKUMARAN S, MUKHOPADHYAY S. The BarA-UvrY two-component system regulates virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* O78: K80: H9[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(8): 4900-4909.