

群体感应相关调控子对副溶血弧菌磷酸二酯酶 GepA 的表达调控

刘超, 李雪, 罗茜, 张义全, 张苗苗*, 陆仁飞*

南通市第三人民医院, 南通大学附属南通第三医院检验科, 江苏 南通

刘超, 李雪, 罗茜, 张义全, 张苗苗, 陆仁飞. 群体感应相关调控子对副溶血弧菌磷酸二酯酶 GepA 的表达调控[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1167-1177.

LIU Chao, LI Xue, LUO Xi, ZHANG Yiquan, ZHANG Miaomiao, LU Renfei. Quorum sensing regulators control the expression of phosphodiesterase GepA in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(3): 1167-1177.

摘要:【目的】研究群体感应系统(quorum sensing, QS)相关调控子 AphA、ToxR 和 QsvR 对副溶血弧菌磷酸二酯酶 GepA 编码基因 *gcpA* 表达的调控关系。【方法】提取野生株(wild type, WT)和 *aphA*、*toxR*、*qsvR* 突变株的总 RNA, 通过实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)初步分析 QS 相关调控子对 *gcpA* 的转录影响; 将 *gcpA* 上游调控区 DNA 序列克隆入 pBBRlux 质粒无启动子区的表达生物冷光基因 *luxCDABE* 上游, 并将 *lux* 重组质粒分别导入 WT 和突变株中, 采用 *lux* 报告基因融合实验进一步研究 QS 相关调控子对 *gcpA* 的调控作用; 采用引物延伸(primer extension)法定位 *gcpA* 的转录起始位点和核心启动子区, 并根据引物延伸产物丰度判断 QS 相关调控子对 *gcpA* 的调控关系; 将 *gcpA* 的调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中 β -半乳糖苷酶基因上游获得 LacZ 重组质粒, 将 LacZ 重组质粒分别转化入含有 pBAD33 或 pBAD33-*qsvR* 的大肠杆菌 EC100 λ pir 中, 采用 LacZ 报告基因融合实验研究在异体宿主中 QS 相关调控子对 *gcpA* 转录的调控方式; PCR 扩增 *gcpA* 上游调控区 DNA 序列, 同时表达并纯化 QS 相关调控子的 His 重组蛋白, 采用凝胶阻滞实验(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)研究 QS 相关调控子是否直接调控 *gcpA* 的表达。【结果】低密度条件下, qPCR 结果显示 Δ *aphA* 和 Δ *toxR* 中 *gcpA* 的转录水平明显低于 WT, 表明 AphA 和 ToxR 激活 *gcpA* 的转录; *lux* 报告基因融合实验显示, Δ *aphA* 和 Δ *toxR* 中 *gcpA* 的启动子区转录活性明显低于 WT, 进一步表明 AphA 和 ToxR 促进 *gcpA* 的转录; 引物延伸结果显示, *gcpA* 的转录起始位点位于起始密码子 ATG 上游第 30 bp 的 A, 且其转录活性受到 AphA 的激活; EMSA 结果显示, His-AphA 和 His-ToxR 均不能与 *gcpA* 的调控区 DNA 序列结合。高密度条件下, qPCR 和引物延伸实验结果均显示 QsvR 抑制 *gcpA* 的转录; EMSA 实验结果显示, His-QsvR 直接结合在 *gcpA* 的启动子区 DNA 序列上; 双质粒报告基因融合实验显示,

资助项目: 南通市自然科学基金(JCZ2025004)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Nantong (JCZ2025004).

*Corresponding authors. E-mail: LU Renfei, rainman78@163.com; ZHANG Miaomiao, zm2860015024@163.com

Received: 2025-10-07; Accepted: 2025-12-09; Published online: 2025-12-29

QsvR 可以抑制 EC100 λ pir 中 *gpaA* 的启动子区转录活性。【结论】AphA 和 ToxR 间接激活，而 QsvR 直接抑制 *gpaA* 的转录。因此，*gpaA* 在低密度条件下转录水平较高，高密度时转录水平明显下降。

关键词：副溶血弧菌；群体感应系统；GepA；转录调控

Quorum sensing regulators control the expression of phosphodiesterase GepA in *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Chao, LI Xue, LUO Xi, ZHANG Yiquan, ZHANG Miaomiao*, LU Renfei*

Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nantong Hospital 3 of Nantong University, Nantong Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the transcriptional regulation of quorum sensing (QS) regulators AphA, ToxR, and QsvR on the expression of the phosphodiesterase (GepA) gene *gpaA* in *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] Total RNAs were extracted from the wild type (WT) and the mutant strains of *aphA*, *toxR*, and *qsvR*. Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out to calculate the transcriptional variation of *gpaA* between WT and mutant strains. The regulatory DNA region of *gpaA* was cloned into the upstream region of promoterless *luxCDABE* reporter gene in the pBBRlux plasmid. The recombinant plasmid was respectively transferred into the WT and mutant strains. Luminescence assay was used to test the regulatory effect of QS regulators on the expression of *gpaA*. The primer extension assay was employed to detect the transcription start site and the promoter activity of *gpaA*. The effects of QS regulators on *gpaA* were evaluated based on the abundance of primer extension products. The regulatory DNA region of *gpaA* was cloned into the upstream region of *lacZ* in the pHRP309 plasmid. The LacZ recombinant plasmid was transformed into EC100 λ pir harboring pBAD33 or pBAD33-*qsvR*. Two-plasmid LacZ reporter assay was conducted to investigate the regulatory effects of QS regulators on the transcription of *gpaA* in EC100 λ pir. The regulatory DNA region of *gpaA* was amplified by PCR, and the His recombinant proteins of QS regulators were purified. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed to investigate whether QS regulators directly regulated the expression of *gpaA*. [Results] At low cell density, the qPCR results showed that expression of *gpaA* in Δ *aphA* and Δ *toxR* were significantly lower than that in WT, indicating that AphA and ToxR activated the transcription of *gpaA*. The luminescence assay showed that the transcriptional activity of the promoter region of *gpaA* in Δ *aphA* and Δ *toxR* was significantly lower than that in WT, further indicating that AphA and ToxR promoted the transcription of *gpaA*. The primer extension assay detected that the transcription start site of *gpaA* was located at the A nucleotide 30 bp upstream of the start codon ATG, and its transcriptional activity was activated by AphA. The EMSA result indicated that His-AphA and His-ToxR were unable to bind the promoter DNA region of *gpaA*. At high cell density, both the qPCR and primer extension assay indicated that QsvR inhibited the

transcription of *gpaA*. The EMSA result demonstrated that His-QsvR directly bound to the promoter DNA region of *gpaA*. Two-plasmid lacZ reporter assay demonstrated that QsvR inhibited the transcriptional activity of the promoter region of *gpaA* in EC100 λ pir. **[Conclusion]** AphA and ToxR indirectly activate while QsvR directly inhibits the transcription of *gpaA*. Therefore, the transcription level of *gpaA* is higher at low cell density and significantly decreases at high cell density.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; quorum sensing; GepA; transcriptional regulation

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是弧菌属的一种革兰氏阴性嗜盐菌,可引发海产品和人类感染,是世界范围内海产品相关性食物中毒的重要致病菌^[1]。副溶血弧菌可表达多种毒力因子,如耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、TDH 相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)、III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)、VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)等,这些因子参与细菌致病过程^[1-3]。副溶血弧菌具有较强的表面生物膜形成能力,能够逃避宿主免疫反应,并抵抗外界不利生存环境^[4]。成熟生物膜的形成依赖于胞外多糖、IV型菌毛、荚膜多糖、鞭毛等特殊物质和结构^[4-5]。此外,生物膜形成过程受到一些信号通路,如群体感应系统(quorum sensing, QS)和环二鸟苷酸(c-di-GMP)等的严格调控^[4]。

c-di-GMP 是一种在细菌中广泛存在的第二信使,由含有 GGDEF 结构域的鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)催化 2 分子 GTP 合成,可被含有 EAL 或 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)降解为 2 分子 GMP 或线性 pGpG^[6-7]。c-di-GMP 可调控细菌的毒力因子表达、运动能力、生物膜形成和细胞周期等多种生物学行为^[8]。细菌体内 c-di-GMP 浓度升高有助于生物膜形成,但会抑制运动能力和毒力因子表达^[8]。副溶血弧菌 RIMD2210633 可编码 63 种含有 GGDEF 和/或 EAL 结构域的蛋白质,目前仅有少数蛋白质的功能得到证实,其中 ScrC、ScrG、TpdA 和 VopY 等可促进细菌运动,但降低生物膜形成能力;而 GefA、

ScrO、ScrJ、ScrL、GefB 和 VPA0198 等则抑制细菌运动,但提高生物膜形成能力^[9-17]。

群体感应系统是指细菌响应周围菌体密度变化,合成并分泌自诱导因子,通过一系列信号传递,最终调节菌体基因表达和生物学行为的过程^[18]。在副溶血弧菌中, AphA 和 OpaR 分别在低密度和高密度条件下发挥主要调控作用,是群体感应系统的核心调控子^[18]。低密度条件下 AphA 发挥调控作用,促进胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的产生和 T3SS1 的表达,抑制 TDH 和 T3SS2 的表达,从而增强副溶血弧菌的生物膜形成和侵袭能力^[19-20]; QsvR 是 AraC 家族转录调控子,由操纵子 *vpa0607-qsvR* 编码, VPA0607 蛋白具有核糖核酸酶 II 活性,能在转录后抑制 QsvR 的表达^[21]。AphA 激活 *vpa0607-qsvR* 的转录,而 OpaR 抑制其转录,因此 QsvR 在高密度时表达水平最高,从而与 OpaR 共同发挥调控作用,抑制 EPS 的产生和 T3SS1 的表达,激活 TDH 和 T3SS2 的表达^[20-22]。此外, QsvR 对极鞭毛和 T6SS1 相关基因也具有抑制作用^[20,23]。ToxR 是一种膜结合调控蛋白,其自身基因的转录受到 AphA 的抑制,在低密度条件下转录水平最高^[24]。ToxR 与 AphA 和 OpaR 协同作用抑制 T6SS1 的表达,同时抑制 T3SS1 的表达,促进 T3SS2 和 TDH2 的表达以及生物膜的形成^[24-26]。可见, QsvR 和 ToxR 与 AphA 和 OpaR 组成了复杂的调控网络,使 QsvR 和 ToxR 参与到群体感应系统的调控机制中。

群体感应系统相关调控子均参与调控 c-di-GMP 的代谢, AphA 促进 c-di-GMP 的合

成, 而 ToxR、QsvR 和 OpaR 抑制其合成, 但其具体调控机制尚未完全阐明^[22,27-28]。近期研究发现 GepA (VP0117)同时含有 GGDEF 和 EAL 结构域, 但仅具有 PDE 活性, 具有降解 c-di-GMP、抑制生物膜形成但促进运动能力的作用^[29]。同时也有研究表明, OpaR 直接抑制 *gcpA* 的转录, 其他群体感应系统相关调控子对 *gcpA* 的转录是否有调控作用尚不清楚^[30]。因此, 本研究旨在探究 AphA、ToxR 和 QsvR 对 *gcpA* 的转录调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血弧菌 RIMD2210633 (野生型, WT)及其 *aphA* 非极性突变株($\Delta aphA$)、*toxR* 非极性突变株($\Delta toxR$)、*qsvR* 非极性突变株($\Delta qsvR$)、重组蛋白表达菌等由南通大学附属南通第三医院检验科保存^[20,24]。

1.1.2 主要试剂和仪器

HI 培养基(2.5% Bacto heart infusion), BD Bioscience 公司; TRIzol Reagent, Invitrogen 公司; Primer Extension System、 β -galactosidase Enzyme Assay System, Promega 公司; AccuPower and Top DNA Sequencing Kit, Bioneer 公司; 2 \times Taq PCR MasterMix、SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版(SYBR Green)、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂、普通 DNA 产物纯化试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

恒温摇床、恒温细菌培养箱、紫外分光光度计和酶标仪, ThermoFisher Scientific 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 细菌培养

取 10 μ L 甘油菌种接种于 5 mL 的 HI 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。将培养产物

1:50 接种至 5 mL 新鲜 HI 肉汤中, 培养至 OD_{600} 约为 1.4。再将培养产物 1:100 接种至 5 mL 新鲜 HI 肉汤中, 培养至 OD_{600} 约为 0.2 (低密度)或 OD_{600} 约为 0.8 (高密度), 收集菌体^[20]。在某些情况下还需添加阿拉伯糖和抗生素, 其工作浓度如下: 阿拉伯糖为 0.1%、氯霉素为 20 μ g/mL、庆大霉素为 100 μ g/mL。

1.3 实时定量 PCR

采用 TRIzol 试剂提取细菌的总 RNA。分别取 1 μ g 的总 RNA, 利用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒制备 cDNA, 进而采用 SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版(SYBR Green)进行实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)分析。以 16S rRNA 基因的表达量为内参, 采用经典的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 *gcpA* 的转录水平进行相对定量^[31]。所用引物列于表 1 中。

1.4 lux 报告基因融合实验(luminescence assay)

将 *gcpA* 的上游调控区 DNA 序列克隆入 pBBRLux 质粒中无启动子区的自发光基因 LuxCDABE 上游, 构建 Lux-*gcpA* 重组质粒, 并将其分别导入 WT 和突变株中, 获得 *lux* 实验菌株。按照 1.2 节方法培养 *lux* 实验菌株, 测定不同菌株的冷光值(Lux), 并计算相对平均冷光单位(relative light unit, RLU), 如公式(1)所示。

$$RLU=Lux/OD_{600}^{[23]} \quad (1)$$

1.5 引物延伸(primer extension)

将能与 *gcpA* mRNA 互补的特异性引物(表 1)的 5'-末端用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5 000 Ci/mmol)进行放射性标记。分别以等量的 WT 和突变株总 RNA 为模板, 利用 Primer Extension System 进行引物延伸实验, 将 *gcpA* 的 mRNA 逆转录成 cDNA。将逆转录产物与 Sanger 测序条带进行 6% 聚丙烯酰胺变性胶凝胶电泳, -20 $^{\circ}$ C 放射自显影后分析结果^[20]。

表1 本研究所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Targets	Primer sequences (5'→3')
qPCR	
<i>gcpA</i>	GACCACCTCAATAGTTATCTG/TAAGTAGGCTTGGACATCTC
16S rRNA	GACACGGTCCAGACTCCTAC/GGTGCTTCTTCTGTGCGCTAAC
Lux	
<i>gcpA</i>	GCGCGAGCTCCTCACACAACACTTTCTG/GCGCGGATCCAGACAATCACACCGATAG
Primer extension	
<i>gcpA</i>	CACACTAAAGGTCACAAGCAAG/AGACAATCACACCGATAG
LacZ fusion	
<i>gcpA</i>	GCGCTCTAGACTCACACAACACTTTCTG/GCGCGAATTCAGACAATCACACCGATAG
EMSA	
<i>gcpA</i>	GCGCTCTAGACTCACACAACACTTTCTG/GCGCGAATTCAGACAATCACACCGATAG
<i>vp1687</i>	GCGCGTCGACGCATTATTGACGCCAGTATCG /GCGCTCTAGAGGCAACGGTGAGCAAAAATC

1.6 双质粒报告基因融合实验

将 *gcpA* 上游调控区 DNA 序列克隆入 pHRP309 质粒中无启动子的 β -半乳糖苷酶基因上游, 构建 LacZ 质粒, 并将其分别转入携带 pBAD33 和 pBAD33-*qsvR* 重组质粒的大肠杆菌 100 λ pir (EC100 λ pir) 中, 获得双质粒报告基因融合实验菌株。采用 LB 肉汤培养基(1.0% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物和 1.0% NaCl)在 37 °C 下培养双质粒报告基因融合实验菌株, 收集对数中期 (OD_{600} 约为 1.2) 的细菌培养产物。采用 β -galactosidase Enzyme Assay System 检测不同菌株中的 β -半乳糖苷酶活性。 β -半乳糖苷酶活性用 Miller units 表示, 其计算如公式(2)所示。

β -半乳糖苷酶活性=

$$10^6 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600}) \quad (2)$$

式中: T 表示反应时间(min), V 表示反应体系的体积(μ L)。通过比较 Miller units 数值差异, 可以判断 *gcpA* 启动子区在不同菌株中的活性^[32]。

1.7 凝胶阻滞实验 (electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

PCR 扩增 *gcpA* 上游调控区 DNA 序列(引物见表 1), 并用 T4 多聚核苷酸激酶和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5 000 Ci/mmol) 对其 5'-末端进行放射性标记,

制备 EMSA 探针。表达并纯化 His 重组蛋白, 并将不同浓度的 His 重组蛋白与 EMSA 探针在 10 μ L 结合体系(1 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl, 0.05 mg/mL 鲑鱼精 DNA, EMSA 探针)中共孵育 20 min (室温条件下), 而后进行 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, -20 °C 放射自显影后分析结果^[26]。

1.8 统计学分析方法

引物延伸和 EMSA 至少重复 2 次, 并获得相似或相同的实验结果。qPCR 和 LacZ 报告基因融合实验至少重复 3 次, 每次至少包含 3 个生物学重复, 结果用平均值 \pm 标准差(standard deviation, SD)表示, 利用双尾 t 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.01$ 为依据, 认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 AphA 正调控 *gcpA* 的转录

提取低密度条件下细菌的总 RNA, 采用 qPCR 实验研究 AphA 对 *gcpA* 的调控关系。结果显示(图 1A), 在 Δ *aphA* 中检测到的 *gcpA* mRNA 丰度明显低于在 WT 中检测到的, 表明 AphA 对 *gcpA* 的转录具有促进作用。构建

Lux-*gcpA* 重组质粒，并将其分别导入 WT 和 Δ *aphA* 中，采用 *lux* 报告基因融合实验进一步研究 AphA 对 *gcpA* 的调控关系。与 WT 相比，在 Δ *aphA* 中检测到的 RLU 明显降低，表明 AphA 正调控 *gcpA* 的转录(图 1B)。引物延伸实验显示(图 1C)，*gcpA* 的转录起始位点位于起始密码子

ATG 上游第 30 bp 的 A 处，且在 Δ *aphA* 中检测到的引物延伸产物丰度显著低于在 WT 中检测到的，这进一步表明 AphA 正调控 *gcpA* 的转录。PCR 扩增 *gcpA* 的调控区 DNA 序列，并用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5 000 Ci/mmol)对其 5'-末端进行放射性标记，采用 EMSA 实验验证 His-AphA 与

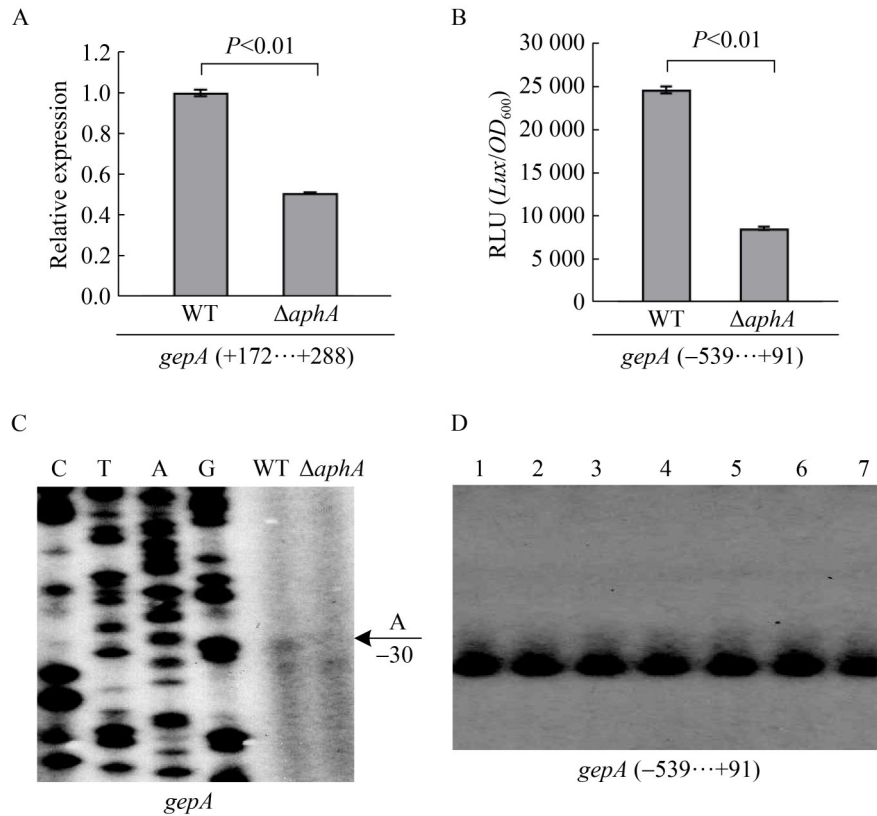


图1 AphA正调控*gcpA*的转录

Figure 1 Positive regulation of *gcpA* by AphA. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of the first base of the start codon, respectively. **A**: qPCR (The relative mRNA level of *gcpA* was compared between Δ *aphA* and WT); **B**: Luminescence assay [The regulatory DNA region of *gcpA* was cloned into the pBBRLux vector, and then introduced into Δ *aphA* and WT, to test the luminescence activity of each strain. The luminescence activity (RLU) was calculated as light units/*OD*₆₀₀]; **C**: Primer extension (Lanes C, T, A, and G represent the Sanger sequencing reactions. The transcriptional start sites were indicated by arrows with nucleotides and positions); **D**: EMSA [The *gcpA* DNA fragments were radioactively labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5 000 Ci/mmol), and then incubated with increasing amounts of His-AphA, followed by 4% (W/V) polyacrylamide gel electrophoresis. Results were analyzed by autoradiography after exposure to Fuji Medical X-ray film. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 contain 0, 19.5, 29.3, 39.0, 39.0, 39.0 and 0 pmol of His-AphA, respectively, and then lane 5 contains 2 pmol cold probe, lane 6 contains 2 pmol negative probe, and lane 7 contains 2 pmol unrelated protein].

gcpA 的调控区 DNA 序列是否具有结合作用。如图 1D 所示, 无论加入依次递增的 His-AphA (第 1-4 泳道), 还是额外加入未标记的核酸探针作为竞争 DNA (第 5 泳道), 或者加入无关蛋白 (第 7 泳道) 时均未出现阻滞条带, 表明 His-AphA 不能与 *gcpA* 的调控区 DNA 结合, 因此 AphA 是间接调控 *gcpA* 转录的。16S rRNA 作为阴性对照, 不能与 His-AphA 结合^[20]。上述结果表明, AphA 间接正调控 *gcpA* 的转录。

2.2 ToxR 正调控 *gcpA* 的转录

在低密度条件下 qPCR 结果显示(图 2A), 在 $\Delta toxR$ 中检测到的 *gcpA* mRNA 丰度明显低于 WT, 这表明 ToxR 促进 *gcpA* 的转录。采用 *lux* 报告基因融合实验研究 ToxR 对 *gcpA* 的调控关系(图 2B), 与 WT 相比, 在 $\Delta toxR$ 中检测到的 RLU 明显降低, 表明 ToxR 正调控 *gcpA* 的转录。EMSA 结果显示(图 2C), His-ToxR 与 *gcpA* 上游调控区序列未出现阻滞条带, 表明 ToxR 间接调控 *gcpA* 的转录。16S rDNA 作为阴性对照, 不能与 His-ToxR 结合^[24]。上述结果表明, ToxR 间接正调控 *gcpA* 的转录。

2.3 QsvR 负调控 *gcpA* 的转录

高密度条件下 qPCR 结果显示(图 3A), 在 $\Delta qsvR$ 中检测到的 *gcpA* mRNA 丰度明显高于在 WT 中检测到的, 说明 QsvR 抑制 *gcpA* 的转录。引物延伸实验显示(图 3B), 与上述结果一致, *gcpA* 转录起始位点仍位于起始密码子 ATG 上游第 30 bp 的 A 处, 且在 $\Delta qsvR$ 中检测到的引物延伸产物丰度显著高于在 WT 中检测到的, 这进一步表明 QsvR 负调控 *gcpA* 的转录。PCR 扩增 *gcpA* 的调控区 DNA 序列, 采用 EMSA 实验验证在体外条件下 His-QsvR 与 *gcpA* 的调控区 DNA 是否具有结合作用。如图 3C 所示, 随着 His-QsvR 用量依次递增(第 2-7 泳道), 与 *gcpA* 的调控区 DNA 序列的阻滞条带强度明显增强, 表明 His-QsvR 能与 *gcpA* 的调控区 DNA 结合, 且呈浓度依赖性。*vp1687* 作为阴性对照, 其上游调控区 DNA 序列不能与 His-QsvR 结合, 未出现阻滞条带。由于在体外条件下, QsvR 可以和 *gcpA* 的调控区 DNA 结合, 因此将 *gcpA* 的 LacZ 重组质粒分别转入携带 pBAD33 和 pBAD33 重组质粒的大肠杆菌 100 λ pir 中, 采用 LacZ 实验研究异源宿主中表达的 QsvR 是否能

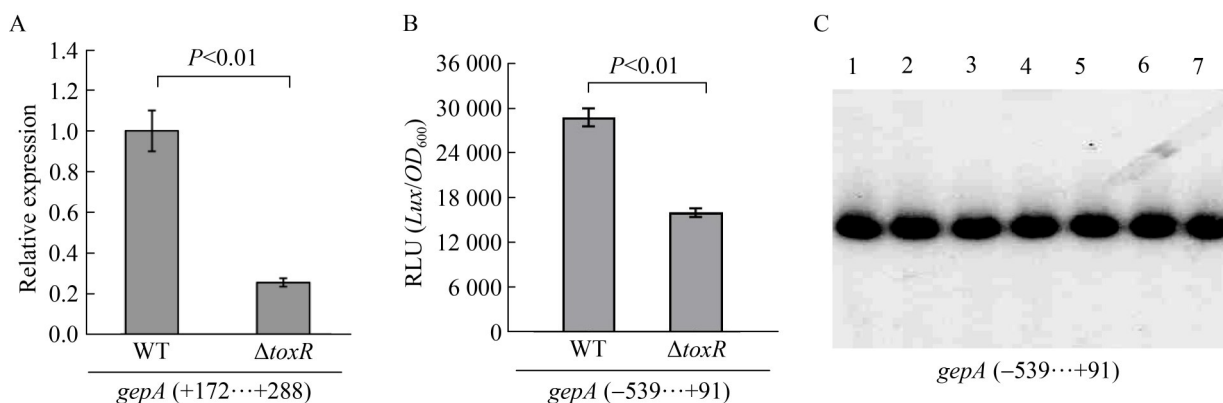


图2 ToxR正调控*gcpA*的转录

Figure 2 Positive regulation of *gcpA* by ToxR. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of the first base of the start codon, respectively. A: qPCR; B: Luminescence assay; C: EMSA (lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 contain 0, 0.15, 0.45, 0.60, 0.60, 0.60 and 0 pmol of His-ToxR, respectively, and then lane 5 contains 2 pmol cold probe, lane 6 contains 2 pmol negative probe, and lane 7 contains 2 pmol unrelated protein).

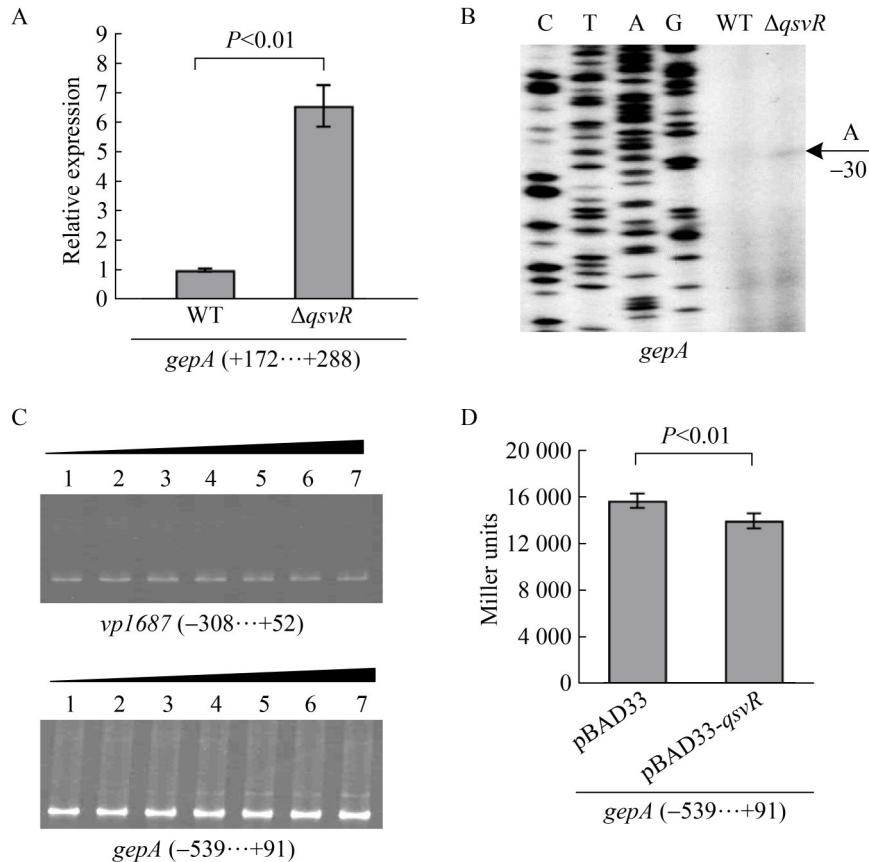


图3 QsvR负调控 $gepA$ 的转录

Figure 3 Negative regulation of $gepA$ by QsvR. The negative and positive numbers represent the nucleotide positions upstream and downstream of the first base of the start codon, respectively. A: qPCR; B: Primer extension; C: EMSA [The regulatory DNA region of $gepA$ was incubated with increasing amounts of purified His-QsvR, and then subjected to 6% (*W/V*) polyacrylamide gel electrophoresis. The DNA bands were visualized by the EB staining. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 contain 0, 0.021, 0.042, 0.063, 0.083, 0.110 and 0.130 pmol of His-QsvR, respectively]; D: Two-plasmid reporter assay [The pBAD33- $qsvR$ plasmid or the empty pBAD33 vector and a recombinant $lacZ$ plasmid were simultaneously introduced into the *E. coli* 100 λ pir (Epicentre), and then the promoter activities (represented by Miller units) of each target gene in the cellular extracts were determined by a β -galactosidase Enzyme Assay System according to the manufacturer's instructions].

调控靶基因启动子区活性。如图 3D 所示，在 EC100/pBAD33- $qsvR$ 中检测到的 β -半乳糖苷酶活性显著低于在 EC100/pBAD33 中检测到的，这说明在异源宿主中 QsvR 的过表达也可以抑制 $gepA$ 的启动子区活性。由于大肠杆菌和副溶血弧菌的遗传背景差异较大，图 3D 的结果也说明 QsvR 对 $gepA$ 的启动子区 DNA 序列具有直接的结合活性。上述结果表明，QsvR 直接负调控

$gepA$ 的转录。

2.4 $gepA$ 呈密度依赖性转录

采用 lux 报告基因融合实验测定 $gepA$ 在不同生长时期的转录情况(图 4)。结果表明，在 OD_{600} 值为 0.02–0.30 的范围内，随着细胞密度的增加， $gepA$ 启动子区活性显著升高，在 OD_{600} 值为 0.3–0.4 时达到最高水平， OD_{600} 值大

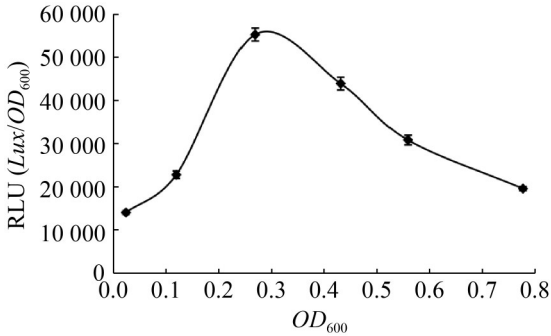


图4 *gepA*呈密度依赖性转录

Figure 4 Cell density-dependent transcription of *gepA*. The WT strain was grown in HI broth at 37 °C, and then the luminescence activity of bacterial cells was tested at different OD₆₀₀ values.

于 0.4 时下降。这表明 *gepA* 的转录水平与菌体密度相关。

3 讨论与结论

细菌内 c-di-GMP 的合成与降解是一个受到严格调控的过程。在副溶血弧菌中 QS 核心调控子及其相关调控子均可参与调控 c-di-GMP 代谢, AphA 间接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录, 从而促进 c-di-GMP 的合成和生物膜形成^[27]; OpaR 和 QsvR 协同作用抑制 *scrABC* 而激活 *scrG* 的转录, 进而抑制 c-di-GMP 的合成和生物膜形成^[22]; 此外, OpaR 也直接抑制 VPA0198、VPA1176、VP0699 和 *gepA*, 并间接激活 VP2979 的转录^[30]。ToxR 通过直接抑制 *scrA* 和 *scrG* 的转录, 以及间接抑制 *vpa0198* 的转录来抑制 c-di-GMP 的合成^[28]。H-NS 对 *scrA*、*gepA*、VPA0198、VPA1176、VP0699、*scrG* 和 VP2979 的转录也具有直接抑制作用, 从而降低胞内 c-di-GMP 浓度, 抑制生物膜形成^[33]。此外, 低盐生长条件抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的转录, 进而抑制 c-di-GMP 的降解, 促进生物膜形成^[34]。

c-di-GMP 的合成和降解分别受鸟苷酸环化酶和磷酸二酯酶的催化, 这 2 种酶分别具有 GGEEF 结构域和 EAL 结构域^[35]。菌体内

c-di-GMP 浓度升高有利于细菌生物膜的形成, 但会抑制细菌的运动能力^[35]。近期研究发现, 具有 GGDEF 和 EAL 结构域的 GepA 在菌体内具有降解 c-di-GMP、抑制生物膜形成以及促进运动能力的功能^[29]。本研究主要探究 *gepA* 的转录调控机制, 结果表明在低密度条件下 AphA 和 ToxR 间接激活 *gepA* 的转录; 而在高密度条件下 QsvR 直接抑制 *gepA* 的转录(图 5)。先前研究发现, OpaR 也能够直接抑制 *gepA* 的转录^[30]。*gepA* 的转录水平与菌体密度密切相关, 低密度时 *gepA* 启动子区活性随着细胞密度的增加显著升高, 当 OD₆₀₀ 值为 0.3–0.4 时达到最高水平, 而当 OD₆₀₀ 值大于 0.4 时则逐渐下降(图 4)。

前期研究表明, QsvR 直接抑制 *toxR* 和 *aphA* 的转录, 同时直接激活 *opaR* 的转录; 此外, AphA 间接抑制 *qsvR* 的转录, 而 OpaR 直接激活其转录^[30,32]。AphA 间接抑制 *toxR* 的转录^[24]。由此可见, 副溶血弧菌 *gepA* 的表达受 QS 系统(AphA 和 OpaR)及其他相关调控子(QsvR 和 ToxR)组成的调控网络紧密调控。然而, *gepA* 在转录水平最高的低细菌密度条件下

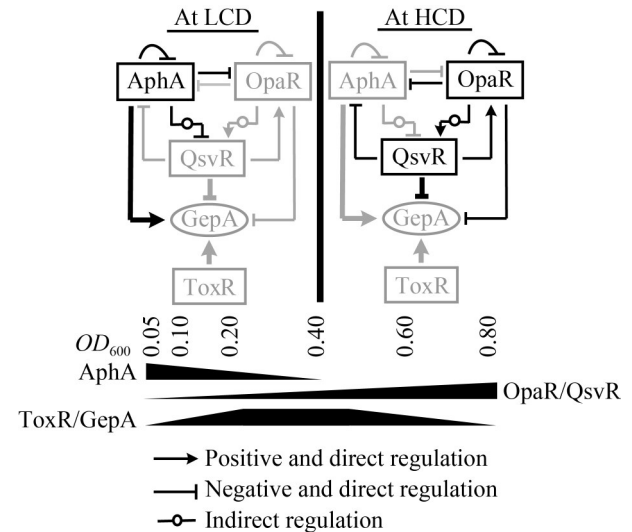


图5 QS相关调控子对*gepA*的转录调控模式图

Figure 5 The transcriptional regulatory model of *gepA* regulated by QS-related regulatory elements.

如何发挥作用, 以及 *gcpA* 与 QsvR 的结合位点还有待进一步实验研究。

作者贡献声明

刘超: 提出研究思路、设计整体框架、获得关键实验数据; 李雪: 优化实验方案、承担实验操作; 罗茜: 验证结果可靠性; 张义全: 梳理研究现状, 记录实验报告; 张苗苗: 分析实验数据、撰写文章并投稿; 陆仁飞: 提供基金支持, 审阅文章, 监督管理。

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] ZAKARIA NH, ABD RAHIM NDE, ROSILAN NF, SUNG YY, WAIHO K, HARUN S, ZAINAL ABIDIN RA, AFIQAH-ALENG N. Global landscape of *Vibrio parahaemolyticus* research: a bibliometric analysis[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2025, 41(2): 45.
- [2] SHIMOHATA T, TAKAHASHI A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Medical Investigation*, 2010, 57(3/4): 179-182.
- [3] HIYOSHI H, KODAMA T, IIDA T, HONDA T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772-1780.
- [4] ASHIKUR RAHMAN M, AKTER S, ASHRAFUDOULLA M, ANAMUL HASAN CHOWDHURY M, UDDIN MAHAMUD AGMS, PARK SH, HA SD. Insights into the mechanisms and key factors influencing biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* in the food industry: a comprehensive review and bibliometric analysis[J]. *Food Research International*, 2024, 175: 113671.
- [5] ASHRAFUDOULLA M, MIZAN MFR, PARK SH, HA SD. Current and future perspectives for controlling *Vibrio* biofilms in the seafood industry: a comprehensive review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(11): 1827-1851.
- [6] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271-284.
- [7] KALIA D, MEREY G, NAKAYAMA S, ZHENG Y, ZHOU J, LUO YL, GUO M, ROEMBKE BT, SINTIM HO. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 305-341.
- [8] HOMMA M, KOJIMA S. Roles of the second messenger c-di-GMP in bacteria: focusing on the topics of flagellar regulation and *Vibrio* spp.[J]. *Genes to Cells*, 2022, 27(3): 157-172.
- [9] TRIMBLE MJ, McCARTER LL. Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP-linked quorum sensing controls swarming in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(44): 18079-18084.
- [10] KIM YK, McCARTER LL. ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4094-4107.
- [11] MARTÍNEZ-MÉNDEZ R, CAMACHO-HERNÁNDEZ DA, SULVARÁN-GUEL E, ZAMORANO-SÁNCHEZ D. A trigger phosphodiesterase modulates the global c-di-GMP pool, motility, and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(13): e0004621.
- [12] WU X, ZHOU LT, YE C, ZHA ZZ, LI CC, FENG C, ZHANG Y, JIN Q, PAN JY. Destruction of self-derived PAMP via T3SS2 effector VopY to subvert PAMP-triggered immunity mediates *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(11): 113456.
- [13] ZHONG XJ, LU Z, WANG F, YAO N, SHI MT, YANG MH. Characterization of GefA, a GGDEF domain-containing protein that modulates *Vibrio parahaemolyticus* motility, biofilm formation, and virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(6): e0223921.
- [14] KIMBROUGH JH, CRIBBS JT, McCARTER LL. Homologous c-di-GMP-binding scr transcription factors orchestrate biofilm development in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(6): e00723-19.
- [15] KIMBROUGH JH, McCARTER LL. Identification of three new GGDEF and EAL domain-containing proteins participating in the scr surface colonization regulatory network in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(4): e00409-20.
- [16] ZHOU YN, CHANG JY, ZHANG MM, LI X, LUO X, LI WP, TIAN ZK, ZHANG N, NI B, ZHANG YQ, LU RF. GefB, a GGDEF domain-containing protein, affects motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and is regulated by quorum sensing regulators[J]. *Gene*, 2025, 933: 148968.
- [17] ZHOU YN, CHANG JY, ZHANG MM, LI X, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, NI B, LU RF, ZHANG YQ. VPA0198, a GGDEF domain-containing protein, affects the motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and is regulated by quorum sensing associated regulators[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2024, 195: 106882.
- [18] GODE-POTRATZ CJ, McCARTER LL. Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4224-4237.
- [19] CHEN L, ZHANG MM, LI X, WU QM, XUE XF, ZHANG TT, LU RF, ZHANG YQ. *AphA* directly activates the transcription of polysaccharide biosynthesis gene *scvE* in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Gene*, 2023,

- 851: 146980.
- [20] ZHANG YQ, HU LH, QIU Y, OSEI-ADJEI G, TANG H, ZHANG Y, ZHANG R, SHENG XM, XU SG, YANG WH, YANG HY, YIN Z, YANG RF, HUANG XX, ZHOU DS. QsvR integrates into quorum sensing circuit to control *Vibrio parahaemolyticus* virulence[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(3): 1054-1067.
- [21] ZHANG YQ, XUE XF, SUN FJ, LI X, ZHANG MM, WU QM, ZHANG TT, LUO X, LU RF. Quorum sensing and QsvR tightly control the transcription of *vpa0607* encoding an active RNase II-type protein in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1123524.
- [22] ZHANG MM, XUE XF, LI X, WU QM, ZHANG TT, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. QsvR and OpaR coordinately repress biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1079653.
- [23] ZHANG MM, XUE XF, LI X, LUO X, WU QM, ZHANG TT, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. QsvR represses the transcription of polar flagellum genes in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 174: 105947.
- [24] ZHANG YQ, HU LF, OSEI-ADJEI G, ZHANG Y, YANG WH, YIN Z, LU RY, SHENG XM, YANG RF, HUANG XX, ZHOU DS. Autoregulation of ToxR and its regulatory actions on major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 291.
- [25] ZHANG YQ, GAO H, OSEI-ADJEI G, ZHANG Y, YANG WH, YANG HY, YIN Z, HUANG XX, ZHOU DS. Transcriptional regulation of the type VI secretion system 1 genes by quorum sensing and ToxR in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2005.
- [26] OSEI-ADJEI G, GAO H, ZHANG Y, ZHANG LY, YANG WH, YANG HY, YIN Z, HUANG XX, ZHANG YQ, ZHOU DS. Regulatory actions of ToxR and CalR on their own genes and type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Oncotarget, 2017, 8(39): 65809-65822.
- [27] 黄倩, 张义全, 胡小许, 王丽, 杨瑞馥, 钟青萍, 周冬生, 黎晓敏. *AphA* 蛋白促进副溶血弧菌 c-di-GMP 合成和生物膜形成[J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 525-531.
- HUANG Q, ZHANG YQ, HU XX, WANG L, YANG RF, ZHONG QP, ZHOU DS, LI XM. *AphA* is an activator of c-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 525-531 (in Chinese).
- [28] 张苗苗, 薛星帆, 孙君芳, 吴齐敏, 李雪, 周冬生, 倪斌, 陆仁飞, 张义全. ToxR 负调控副溶血弧菌中 c-di-GMP 的合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4719-4730.
- ZHANG MM, XUE XF, SUN FJ, WU QM, LI X, ZHOU DS, NI B, LU RF, ZHANG YQ. ToxR represses the synthesis of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4719-4730 (in Chinese).
- [29] ZHANG MM, ZHU YR, LI X, LUO X, SUN H, XIONG SH, LU RF, ZHANG YQ. GepA, a GGDEF-EAL protein, regulates biofilm formation and swimming motility in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Archives of Microbiology, 2025, 207(5): 99.
- [30] ZHANG YQ, QIU Y, GAO H, SUN FJ, LI X, ZHANG MM, XUE XF, YANG WH, NI B, HU LF, YIN Z, LU RF, ZHOU DS. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 676436.
- [31] MA YJ, SUN XH, XU XY, ZHAO Y, PAN YJ, HWANG CA, WU VCH. Investigation of reference genes in *Vibrio parahaemolyticus* for gene expression analysis using quantitative RT-PCR[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144362.
- [32] ZHANG YQ, QIU Y, XUE XF, ZHANG MM, SUN FJ, LI X, HU LF, YIN Z, YANG WH, LU RF, ZHOU DS. Transcriptional regulation of the virulence genes and the biofilm formation associated operons in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Gut Pathogens, 2021, 13(1): 15.
- [33] XUE XF, ZHANG MM, SUN FJ, LI X, WU QM, YIN Z, YANG WH, NI B, HU LF, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. H-NS represses biofilm formation and c-di-GMP synthesis in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2022, 35(9): 821-829.
- [34] LI X, SUN FJ, ZHANG MM, XUE XF, WU QM, YANG WH, YIN Z, ZHOU DS, LU RF, ZHANG YQ. The effect of salinity on biofilm formation and c-di-GMP production in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Current Microbiology, 2021, 79(1): 25.
- [35] LIU C, SHI R, JENSEN MS, ZHU JR, LIU JW, LIU XB, SUN D, LIU WJ. The global regulation of c-di-GMP and cAMP in bacteria[J]. mLife, 2024, 3(1): 42-56.