

Tad 型菌毛促胰液素 CpaC 对副溶血弧菌的运动性、生物被膜形成及致病性的影响

白雪瑞¹, 郭蓉², 卢淑淇², 范冰冰², 张权², 方维焕³, 蒋蔚^{2*}

1 上海农林职业技术学院 动物科学技术系, 上海

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海

3 浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安

白雪瑞, 郭蓉, 卢淑淇, 范冰冰, 张权, 方维焕, 蒋蔚. Tad 型菌毛促胰液素 CpaC 对副溶血弧菌的运动性、生物被膜形成及致病性的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1278-1293.

BAI Xuerui, GUO Rong, LU Shuqi, FAN Bingbing, ZHANG Quan, FANG Weihuan, JIANG Wei. The Tad pilus secretin CpaC is associated with motility, biofilm formation, and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1278-1293.

摘要: 【目的】Tad 菌毛广泛分布于革兰氏阴性菌, 与多种病原体的毒力相关。目前, 关于副溶血弧菌 Tad 菌毛的研究极少。本研究旨在揭示 Tad 菌毛促胰液素 CpaC (VP2419)对副溶血弧菌生物学功能的影响。【方法】以副溶血弧菌野生株 SH112 为基础, 构建 *cpaC* 基因缺失株($\Delta cpac$)及互补株($C\Delta cpac$), 比较各菌株的生物被膜形成能力、细菌竞争力、集群与泳动能力、细胞黏附与毒性、小鼠毒力、组织定殖及病变情况的差异。【结果】在细菌环境适应方面, 与野生株(WT 株)相比, 缺失株 $\Delta cpac$ 的细菌竞争力、运动性和生物被膜形成能力均显著下降。在致病性方面, 缺失株 $\Delta cpac$ 在细胞黏附、细胞毒性, 以及小鼠毒力、组织定殖和病变程度上较 WT 株均显著降低。【结论】CpaC 作为副溶血弧菌 Tad 菌毛的组分, 参与多种关于环境适应与致病性的功能, 包括竞争能力、生物被膜形成、运动性, 以及细胞黏附与毒性、组织定殖等, 为深入理解 Tad 菌毛的生物学功能提供了重要依据。

关键词: 副溶血弧菌; Tad 型菌毛; 生物被膜; 运动性; 致病性

资助项目: 国家自然科学基金(32473039); 上海农林职业技术学院科研课题(KY6-0000-25-02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32473039) and the Research Project of Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry (KY6-0000-25-02).

*Corresponding author. E-mail: jiangwei@shvri.ac.cn

Received: 2025-10-19; Accepted: 2025-12-18; Published online: 2026-01-04

The Tad pilus secretin CpaC is associated with motility, biofilm formation, and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*

BAI Xuerui¹, GUO Rong², LU Shuqi², FAN Bingbing², ZHANG Quan², FANG Weihuan³, JIANG Wei^{2*}

1 Department of Animal Science and Technology, Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai, China

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

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

Abstract: [Objective] Tad pili are widely distributed in Gram-negative bacteria and are associated with the virulence of various pathogens. However, the studies about the Tad pili in *Vibrio parahaemolyticus* remain limited. This study aimed to elucidate the role of the Tad pilus secretin CpaC (VP2419) in the biological functions of *V. parahaemolyticus*. **[Methods]** The *cpaC*-deleted mutant ($\Delta cpac$) and complemented strain ($C\Delta cpac$) were constructed from the wild-type (WT) strain (SH112) of *V. parahaemolyticus*. The strains were compared in terms of biofilm formation, competitiveness, swarming and swimming motility, cell adhesion, cytotoxicity, as well as virulence, tissue colonization, and pathology in mice. **[Results]** Regarding environmental adaptation, compared with the WT strain, $\Delta cpac$ exhibited significantly decreased competitiveness, motility, and biofilm formation. In terms of pathogenicity, $\Delta cpac$ demonstrated significantly reduced cell adhesion, cytotoxicity, as well as attenuated virulence, tissue colonization, and pathological damage in mice, compared with the WT strain. **[Conclusion]** As the Tad pilus secretin in *V. parahaemolyticus*, CpaC participates in multiple functions related to environmental adaptation and pathogenicity, including competitiveness, biofilm formation, motility, cell adhesion, cytotoxicity, and tissue colonization. These findings provide important insights for a deeper understanding of the biological functions of Tad pili.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; Tad pilus; biofilm; motility; pathogenicity

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于弧菌属, 是其中一种重要的嗜盐食源性细菌, 该菌广泛分布于淡水、海水及水产品中, 已成为全球海鲜产品致腹泻病的主要病原体^[1]。副溶血弧菌感染主要与食用未煮熟或生的受污染海鲜有关, 例如牡蛎、虾、鱼和贻贝等^[2]。感染副溶血弧菌的患者通常在 2–10 d 内出现胃肠炎症状, 如水样腹泻、胃痉挛、腹痛、呕吐、寒战和低热等症状, 而伴有糖尿病、肝病、酗酒等合并症的患者易引发败血症甚至死亡^[3]。此外, 副溶

血弧菌可致鱼类患眼疾、败血症等疾病, 以及虾类患肝胰坏死病, 对海水养殖动物的健康产生直接影响^[4]。目前, 副溶血弧菌被认为是一种全球分布的新兴病原体, 其引发的感染率呈稳步上升趋势, 对鱼类养殖业和公共卫生安全等方面构成日益严峻的挑战^[5–6]。因此, 研究细菌生物学对于深入理解副溶血弧菌的发病机制, 以及开发疾病预防和治疗策略至关重要。

IV 型菌毛(type IV pili, T4P)广泛存在于原核生物(细菌和古细菌)中, 作为一种表面黏附素,

直接参与多种功能,包括表面感应、黏附、生物膜形成、抽搐运动、蛋白质分泌和 DNA 摄取^[7-8]。近期, T4P 被证实对许多革兰氏阴性病原菌的毒力与致病性至关重要^[8-11]。根据蛋白质组成和结构的不同, T4P 可分为 IVa 型菌毛 (T4aP)、IVb 型菌毛 (T4bP) 和 IVc 型菌毛^[8]。其中, IVc 型菌毛因被证实具有促进细菌与表面紧密黏附的作用, 又被称为紧密黏附 (tight adherence, Tad) 菌毛^[12]。同一时期, IVc 型菌毛的蛋白合成被证实与粗糙的菌落形态有关, 相关蛋白被命名为粗糙菌落蛋白 (rough colony protein, Rcp)^[13]。此外, 在新月柄杆菌中也鉴定出了菌毛系统, 并将相关遗传位点命名为柄杆菌菌毛组装 (caulobacter pilus assembly, Cpa) 基因^[14]。因此, 关于细菌 Tad 相关基因或蛋白的命名方法有多种, 如 *cpa/rcp* 或 *tad*^[15]。Tad 菌毛对于抽搐运动、细菌表面传感、DNA 摄取及生物膜形成至关重要, 因此获得 Tad 菌毛的细菌具有广泛的适应性优势^[16-17]。此外, Tad 菌毛通过多种功能促进不同细菌病原体的毒力作用, 如细胞黏附和定殖^[18-20]。

Tad 菌毛广泛分布于弧菌科, 是一种由细丝、马达亚复合物、外膜孔组成的多亚基跨膜纳米机器, 包含 12-14 种核心蛋白成分^[8,21]。细丝主要由单蛋白质亚基 (Flp/PilA) 聚合而成。在聚合前, 肽酶 TadV/CpaA 负责将不成熟的 Flp 前体加工成用于组装的成熟菌毛蛋白 Flp^[22]。此外, 细丝生产需要一个或多个次要菌毛蛋白, 如 CpaJ (TadE)、CpaK (TadF)、CpaL (TadG), 它们通常位于菌毛尖端, 占细丝的极小部分^[15]。研究表明次要菌毛蛋白均具有特定功能, 如黏附或 DNA 摄取^[23]。马达亚复合物负责为细丝聚合提供能量, 其成分包括细胞溶质、六聚体 ATP 酶 CpaF (TadA) 和内膜平台蛋白 CpaG (TadB) 和 CpaH (TadC)^[23]。其中, CpaF 作为 ATP 酶在 2 个平台蛋白 CpaG 和 CpaH 辅助下催

化菌毛延伸和回缩^[8]。此外, 由促胰液素 CpaC (RcpA) 形成的多聚体外膜分泌通道主要负责菌毛穿过外膜孔, 并转移到外部环境中^[24]。研究证实蛋白 CpaC 缺失易阻碍亚基 PilA 的动态伸展和退缩动力^[25]。关于新月柄杆菌的研究表明, 在细丝亚基 PilA 合成和聚合之前, 外膜分泌通道的 CpaC 蛋白在细胞周期中的极化定位至关重要^[26]。因此, CpaC 对 Tad 菌毛的形成与活动较为关键。此外, 促胰液素 CpaC 对刺激 DNA 复制启动和细胞周期进展起关键作用^[25]。

关于副溶血弧菌 IV 型菌毛的研究主要集中在 T4aP 甘露糖敏感血凝素 (mannose-sensitive haemagglutinin, MSHA) 菌毛和新型的 (chitin-regulated pili, ChiRP) 型菌毛, 并证实这 2 种 IV 型菌毛是生物膜形成和病原体在宿主体内持久性所必需的^[27-28]。目前, 已有数据提示 Tad 菌毛与副溶血弧菌的致病能力有关^[29]。Zhu 等^[30]研究发现 *rcpA* (*cpaC*) 基因对副溶血弧菌的生物膜形成、运动性和毒力方面具有显著作用。本研究利用副溶血弧菌 SH112 临床株 *cpaC* (*vp02419*) 基因缺失株与互补株, 进一步较为全面地研究 CpaC 蛋白对副溶血弧菌环境适应性及致病性的影响, 旨在为进一步探究副溶血弧菌 Tad 型菌毛的发病机制和疾病防治提供重要资料。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及引物

本研究使用的细菌菌株和质粒见表 1。副溶血弧菌 SH112 临床分离株 (血清型 O3:K6) 由中国农业科学院上海兽医研究所实验室保存。大肠杆菌在 LB 肉汤 (Luria-Bertani broth) 中生长; 副溶血弧菌在含 3% NaCl 的 LB (简称 3% NaCl-LB) 中生长。硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖 (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose, TCBS) 琼脂平板用于鉴别副溶血弧菌, 其上呈现绿色菌落。含 0.01 g/L 氯霉素的 LB 或 TCBS (简称 Cm⁺-LB

表1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant characteristics description	Source or reference
<i>V. parahaemolyticus</i> strains		
SH112	Wild type, <i>tdh</i> ⁺ , Cm ^s	[31]
Δ <i>cpaC</i>	Mutation in <i>cpaC</i> gene of strain SH112	This study
C Δ <i>cpaC</i>	Δ <i>cpaC</i> with plasmid pMMB207- <i>tssL2</i>	This study
<i>E. coli</i> strains		
CC118 λ pir	Apir lysogen of CC118 Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i>	[31]
DH5 α	F ⁻ Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA, endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻</i>	[31]
Plasmids		
pYAK1	R6K-ori suicide vector with <i>sacB</i> gene, Cm ^r	[31]
pMMB207	RSF1010 derivative, <i>IncQ IacI^r Cm^r P_{tac} oriT</i>	[31]

或 Cm⁺-TCBS)、200 g/L 蔗糖 LB (简称 G-LB)用于筛选突变菌株。含 0.3% 琼脂和 3% NaCl 的 LB 平板(简称泳动平板)用于检测细菌泳动;含 1.5% 琼脂的脑心浸液(brain heart infusion, BHI)肉汤平板(简称群集平板)用于检测细菌群集运动。

此外,基于 RIMD2210633 副溶血弧菌株 *cpaC* (*vp2419*)序列,参考郭容^[32]设计方法合成所需引物。

1.2 主要试剂、仪器

TCBS、BHI 等培养基,广东环凯微生物科技有限公司;细菌质粒、DNA 提取试剂盒、DNA 内切酶与连接酶等试剂,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;CytoTox 96[®]细胞毒性试剂盒, Promega 公司;DMEM 细胞培养液、FBS 胎牛血清, Gibco 公司。

PCR、低温高速离心机, Eppendorf 公司;自动细胞计数仪, Bio-Rad 公司;超微量紫外分光光度仪, Thermo 公司;T12 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), FEI 公司。

1.3 实验动物

Institute of cancer research (ICR)雌性小鼠,上海雷根达科技有限公司。本研究所有动物实

验获得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 *cpaC* 基因缺失株与互补株的构建

参考文献[32]的研究方法,将副溶血弧菌 WT 培养至对数期($OD_{600}=0.2$),提取其 DNA 备用。通过 PCR 获取 *cpaC* 基因的上、下游片段 AB 和 CD,再将其通过融合 PCR 形成 *cpaC* 基因缺失片段 *cpaC*-AD (引物 *cpaC*-A/B、*cpaC*-C/D、*cpaC*-A/D,见表 2)。将基因缺失片段插入含有对蔗糖敏感的 *sacB* 基因的自杀质粒 pYAK1,再转入大肠杆菌 CC118 λ pir 细胞。以含阳性质粒的 CC118 λ pir 为供体菌,WT 为受体菌进行质粒转移,经 Cm⁺-TCBS 和 G-LB 平板传代筛选,并进行 PCR 鉴定(引物 *cpaC*-E/F、*sacB*-F/R,见表 2),将阳性基因缺失株命名为 Δ *cpaC*。

通过 PCR 获得 WT 的 *cpaC* 完整基因(引物 *cpaC*-pMMB-F/R,见表 2),将其连接到 pMMB207 质粒中,然后转入 CC118 λ pir 细胞。以含阳性互补质粒的 CC118 λ pir 为供体菌, Δ *cpaC* 株为受体菌进行质粒转移,经传代与 Cm⁺-TCBS 筛选,并进行 PCR 鉴定(引物 *cpaC*-pMMB-F/R,见表 2),将含有阳性质粒的互补株命名为 C Δ *cpaC*。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme	Fragment length (bp)	Reference
<i>cpaC</i> -A	ACCCTGCAGAAACCAGCCAACAGTAGAAC	<i>Pst</i> I	484	[32]
<i>cpaC</i> -B	AATTCACCTAATTACTGACTCGGACAC			
<i>cpaC</i> -C	GTAATTAGGTGAATTATGGAGAGCAAGAT		431	[32]
<i>cpaC</i> -D	ATTCCCAGGGCATTCTGTAGGCGTGT	<i>Sma</i> I		
<i>cpaC</i> -E	CAAAAGATTTATTGGGCATT		Wide type: 3 326 Mutant: 1 862	[32]
<i>cpaC</i> -F	CCGCACCGCTATTGCCAGTC			
<i>cpaC</i> -pMMB-F	GGCCGCCTGCAGATGAAAACAATAATATT	<i>Pst</i> I	1 482	[32]
<i>cpaC</i> -pMMB-R	CATGAGCTCTTATAGACTGTGCCCAAAC	<i>Sac</i> I		
<i>sacB</i> -F	ACGGCACTGTCGCAAACATA		600	[32]
<i>sacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT			

Restriction enzyme sites are underlined.

1.5 生长曲线测定

将3种菌(WT、 Δ *cpaC*及C Δ *cpaC*)均培养至对数期($OD_{600}=0.2$),各取50 μ L菌液加至5 mL无菌培养基中稀释混匀,再取100 μ L加入酶标板孔中,每种菌液重复10个孔,对照孔为无菌培养基。最后,将酶标板置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育12 h,每间隔1 h记录1次600 nm处的相应光密度值(OD_{600}),绘制细菌生长曲线图。

1.6 生物被膜的测定

同1.4节方法,取3种菌各200 μ L菌液至酶标板孔中,每菌10个重复孔,对照孔为无菌培养基,将无盖的酶标板静置于37 $^{\circ}$ C温箱,培养48 h。参考白雪瑞等^[33]的生物被膜测定方法,使用酶标仪检测各细菌生物被膜在595 nm波长下的吸光度值(OD_{595} 值)。

1.7 细菌运动性检测

同1.4节方法,将3种菌均培养至 $OD_{600}=0.2$ 时,分别取1 μ L各菌液接种在泳动平板表面,经37 $^{\circ}$ C温箱培养4 h,观察并记录细菌菌苔泳动(swimming)直径。同理,分别取1 μ L 3种菌液($OD_{600}=0.2$)接种在群集平板表面,在30 $^{\circ}$ C温箱中作用16 h,观察并记录细菌菌苔群集运动(swarming)直径。

1.8 透射电镜试验

参考白雪瑞等^[34]的方法,将WT、 Δ *cpaC*及C Δ *cpaC*菌株分别接种于泳动平板表面,经37 $^{\circ}$ C培养3.5 h,用PBS将细菌单菌落轻柔稀释。各菌液经2%磷钨酸负染法固定后,使用透射电镜观察细菌微观结构。

1.9 细菌竞争试验

将副溶血弧菌WT、 Δ *cpaC*及C Δ *cpaC*和大肠杆菌DH5 α 培养至 $OD_{600}=0.2$,按菌量4:1比例(副溶血弧菌:大肠杆菌)混合形成WT组、 Δ *cpaC*组及C Δ *cpaC*组菌液,每组设置3次重复,1个重复组平均2份。1份经倍比稀释,分别涂于TCBS板和含氨苄西林LB板上培养,检测0 h时各副溶血弧菌和大肠杆菌的细菌浓度(CFU/mL)。另1份混合液于30 $^{\circ}$ C条件作用4 h时,经倍比稀释,在TCBS板和含氨苄西林LB板上培养,检测4 h时各细菌浓度(CFU/mL)。以同样的方法,检测37 $^{\circ}$ C条件下3种副溶血弧菌和大肠杆菌DH5 α 的细菌竞争试验。

1.10 细胞黏附试验

参考郭容^[32]的方法,将HeLa细胞培养至单细胞层铺满,洗涤2次待用。将WT、 Δ *cpaC*及C Δ *cpaC*菌株培养至 $OD_{600}=0.2$,以10:1(活菌

数:细胞数)的感染率(multiplicity of infection, MOI)作用 1 h, 每菌重复 4 孔。感染的 HeLa 细胞经 2 次洗涤, 在含 0.5% Triton X-100 的无菌 PBS 中裂解。最后, 将裂解液稀释并接种至 3% NaCl-LB 平板, 通过计数各菌株 CFU 确定黏附率。

1.11 细胞毒性检测

根据 CytoTox 96[®] 细胞毒性检测试剂盒说明书操作, 测定 HeLa 细胞释放的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。将 WT、 Δ *cpaC* 及 $C\Delta$ *cpaC* ($OD_{600}=0.2$) 分别以 MOI=10:1 感染 HeLa 细胞 1.5 h, 每种菌重复 4 个孔, 并设置相应对照孔。

1.12 小鼠毒力试验

参考文献[32]的研究方法, 选 3 周龄 SPF 级 ICR 雌性小鼠分成 WT 组、 Δ *cpaC* 组、 $C\Delta$ *cpaC* 组和对照组(生理盐水), 每组 8 只。将各菌液培养至 OD_{600} 值为 0.2, 用无菌 PBS 洗 2 次, 并重悬于 PBS 至终体积为 100 μ L/只(3×10^8 CFU/mL)。各组 ICR 小鼠腹腔注射后, 监测其 7 d 的存活率, 每隔 2 h 记录 1 次, 绘制小鼠存活率图。

1.13 组织载量测定与病理检测

将 ICR 小鼠随机分成 4 组, 即 WT 组、 Δ *cpaC* 组、 $C\Delta$ *cpaC* 组和对照组, 每组 10 只。各细菌菌液同时培养至 $OD_{600}=0.2$, 用无菌 PBS 洗 2 次, 并重悬于 PBS 至终体积为 100 μ L/只(5×10^7 CFU/mL); 对照组为 100 μ L/只生理盐水。各小鼠腹腔注射 10 h 后, 每组随机选 5 只小鼠进行剖检, 取部分心、肝、脾、肾进行研磨与稀释, 稀释液涂于 TCBS 平板, 通过计数各菌株 CFU 确定细菌定殖数; 取部分心、肝、脾、肾送至武汉赛维尔生物科技有限公司, 制作组织病理切片, 分析各菌株致小鼠脏器病变的程度。

1.14 数据分析

所有试验均重复 3 次。数据使用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果与分析

2.1 成功构建 *cpaC* 基因缺失株与互补株

PCR 鉴定结果显示(图 1), WT 株 DNA 经 *cpaC*-E/F 引物扩增, 获得 *cpaC* 完整片段 3 326 bp (泳道 1), 而 Δ *cpaC* 和 $C\Delta$ *cpaC* 株均获得 *cpaC* 基因缺失片段 1 862 bp (泳道 2 和 3)。WT 和 $C\Delta$ *cpaC* 经 *cpaC*-pMMB-F/R 引物扩增基因后均获得 1 482 bp 片段(泳道 4 和 6), 而 Δ *cpaC* 未获得片段(泳道 5)。此外, Δ *cpaC* 基因经 *sacB*-F/R 引物扩增, 无条带(泳道 7)。上述结果表明副溶血弧菌 Δ *cpaC* 与 $C\Delta$ *cpaC* 株构建成功。

2.2 *CpaC* 未影响细菌生长能力

如图 2 所示, 各副溶血弧菌(WT、 Δ *cpaC* 和 $C\Delta$ *cpaC*)生长无显著差异($P>0.05$), 表明 Tad 型

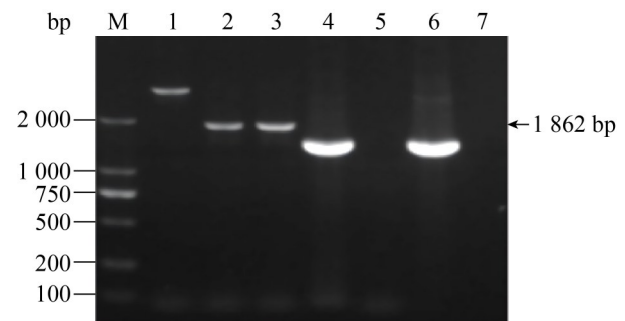


图1 副溶血弧菌 Δ *cpaC*与 $C\Delta$ *cpaC*的PCR检测结果。泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1-3: 引物*cpaC*-E/F分别检测WT、 Δ *cpaC*、 $C\Delta$ *cpaC*基因; 泳道4-6: 引物*cpaC*-pMMB-F/R分别检测WT、 Δ *cpaC*、 $C\Delta$ *cpaC*基因; 泳道7: 引物*sacB*-F/R检测 Δ *cpaC*。

Figure 1 PCR analysis of Δ *cpaC* and $C\Delta$ *cpaC* strains of *Vibrio parahaemolyticus*. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-3: The primers *cpaC*-E/F amplified *cpaC* genes of WT, Δ *cpaC*, $C\Delta$ *cpaC* strains, respectively; Lanes 4-6: The primers *cpaC*-pMMB-F/R amplified genes of WT, Δ *cpaC*, $C\Delta$ *cpaC* strains, respectively; Lane 7: The primers *sacB*-F/R amplified gene of Δ *cpaC*.

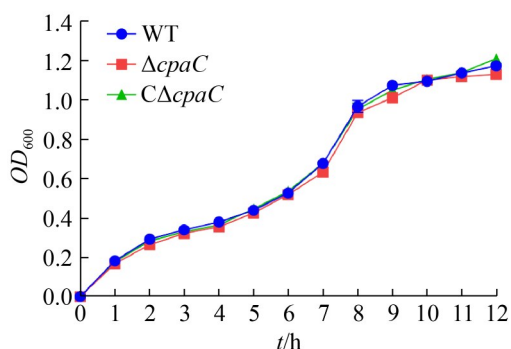


图2 各弧菌生长情况

Figure 2 Growth of the WT, $\Delta cpac$ and $C\Delta cpac$ of *Vibrio parahaemolyticus*. Bars represent mean \pm SD for 10 replications.

菌毛 *cpaC* 基因缺失对副溶血弧菌的生长无显著作用。

2.3 CpaC 影响副溶血弧菌细菌竞争能力

将 WT、 $\Delta cpac$ 与 $C\Delta cpac$ 副溶血弧菌分别与大肠杆菌混合培养，30 °C 作用下，当 3 种副溶血弧菌菌量一致时与 $\Delta cpac$ 菌株共培养的大肠杆菌存活率显著高于与野生株和互补株共培养的大肠杆菌(图 3A)，表明 $\Delta cpac$ 对大肠杆菌的抗菌力显著弱于 WT 和 $C\Delta cpac$ 。在 37 °C 时，各细菌菌量均等时 $\Delta cpac$ 组的大肠杆菌存活

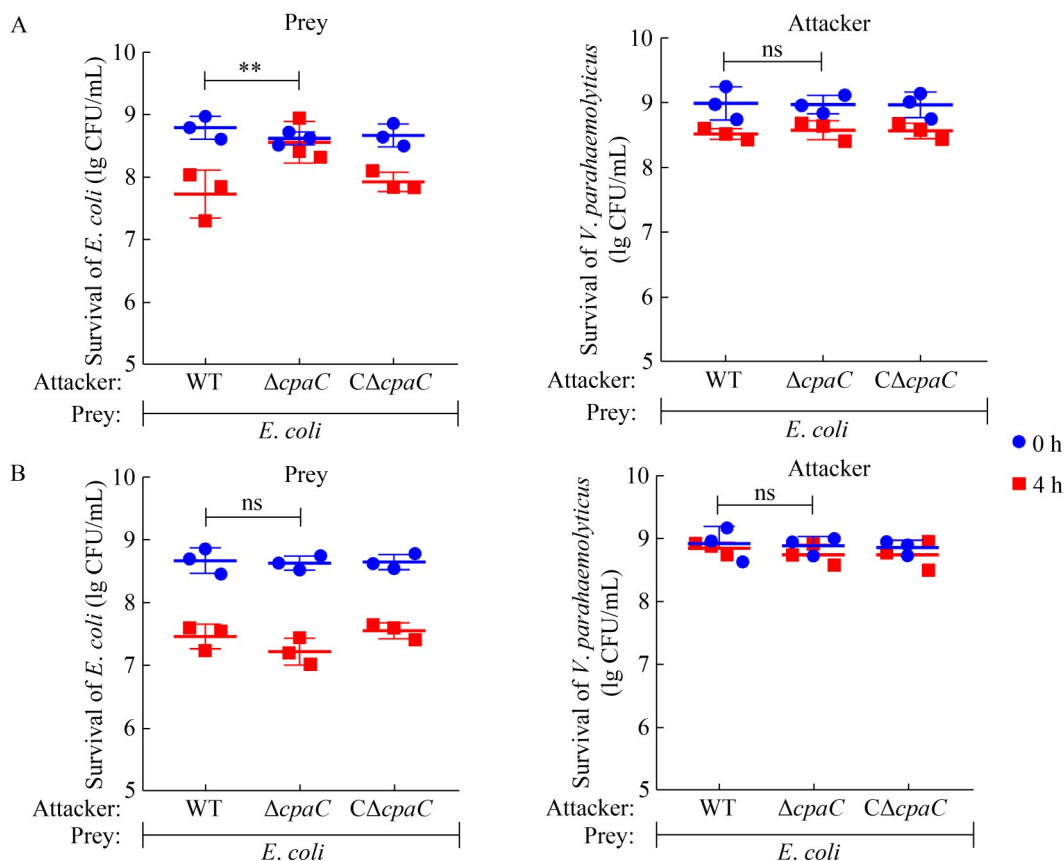


图3 副溶血性弧菌(攻击者)与大肠杆菌(猎物)的细菌竞争能力测定。A: 30 °C 共培养 0 h 和 4 h 时各弧菌和大肠杆菌的细菌存活数; B: 37 °C 共培养 0 h 和 4 h 时各弧菌与大肠杆菌的细菌存活数。

Figure 3 Assay for the competitiveness of each *Vibrio parahaemolyticus* strain (attacker) against *Escherichia coli* (prey). A: Viability counts of *E. coli* and *V. parahaemolyticus* were determined at 0 h and 4 h after co-culture at 30 °C; B: Viability counts of *E. coli* and *V. parahaemolyticus* were determined at 0 h and 4 h after co-culture at 37 °C. **: $P < 0.01$; ns: No significant.

数较 WT 组和 $C\Delta cpnC$ 组无显著差异 ($P>0.05$) (图 3B)。上述结果提示, 副溶血弧菌 $cpnC$ 基因在不同温度下影响细菌竞争能力的程度不同。在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, $cpnC$ 基因对副溶血弧菌的细菌竞争能力有一定影响 (图 3C); 而在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, $cpnC$ 基因对其细菌竞争能力无显著影响 (图 3D)。

2.4 CpaC 利于副溶血弧菌的泳动和群集运动

各菌株经 4 h 泳动培养的结果显示 (图 4A), WT 菌株呈现较大圆形泳动轨迹, 互补株 $C\Delta cpnC$ 为较小的泳动轨迹, 而缺失株 $\Delta cpnC$ 未见从中央向周围扩大的泳动轨迹。经直径测量

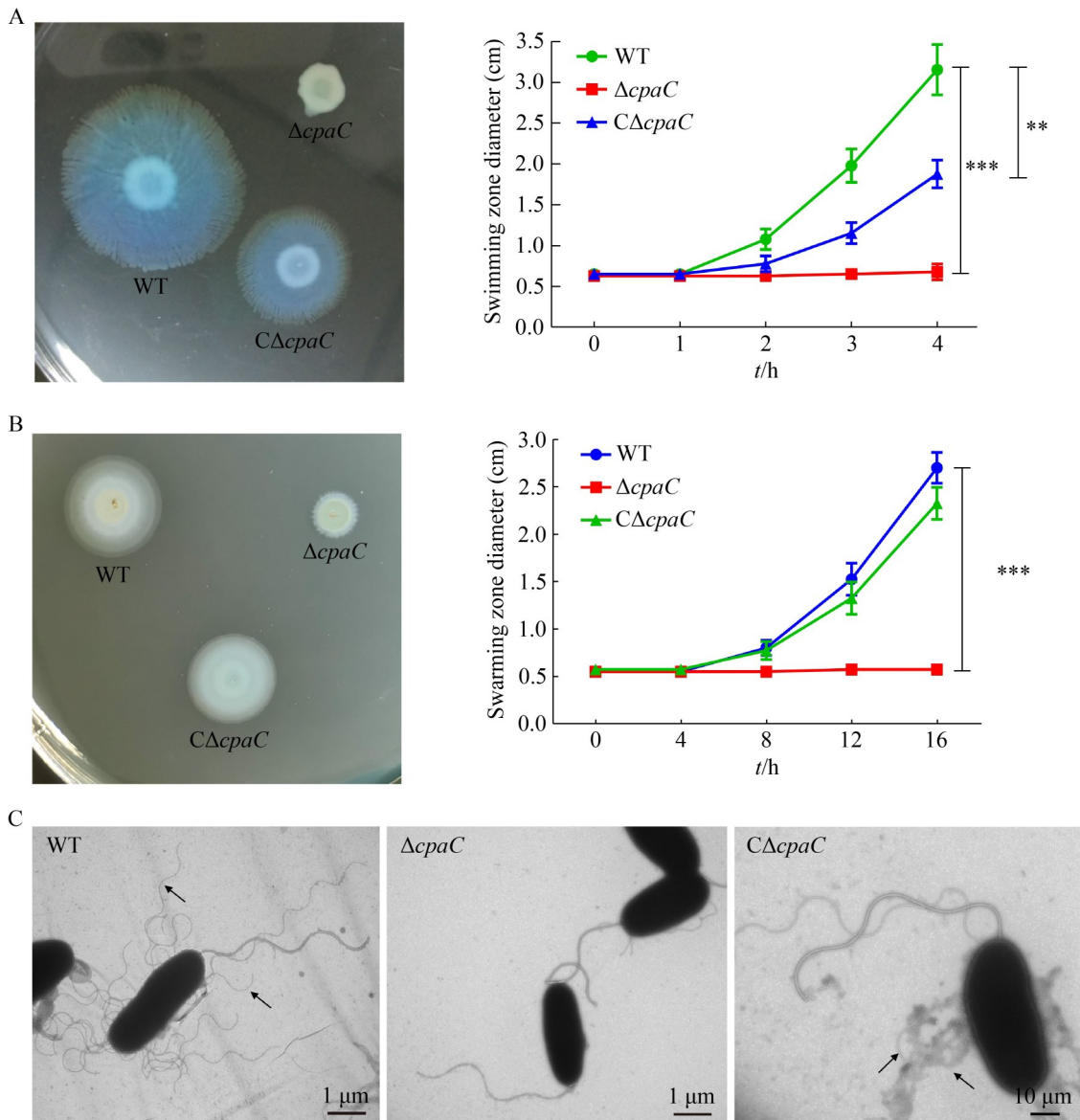


图4 各菌株运动性测定。A: 细菌泳动和直径测定; B: 细菌群集运动和直径测定; C: 细菌鞭毛观察。

Figure 4 Motility assay of the strains. A: The swimming motility and zone diameter determination (**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$); B: The swarming motility and zone diameter determination (***: $P<0.001$); C: The flagella observation of the WT, $\Delta cpnC$ and $C\Delta cpnC$ strains.

分析显示, $\Delta cpaC$ 株泳动直径较 WT 显著减小, 且 $C\Delta cpaC$ 与 WT 株的泳动直径呈现显著差异。群集平板运动的结果显示(图 4B), WT 和 $C\Delta cpaC$ 株均展示较大的运动轨迹, 而 $\Delta cpaC$ 未见扩大的运动轨迹。经直径测量统计, $\Delta cpaC$ 株的群集运动半径较 WT 株显著减小, 而 $C\Delta cpaC$ 与 WT 无显著差异($P>0.05$)。以上结果提示, $cpaC$ 基因在副溶血弧菌的泳动及群集运动中发挥重要作用。透射电镜试验结果表明(图 4C), 野生株 WT 侧身鞭毛较多(如箭头所示), $C\Delta cpaC$ 株侧身鞭毛的数量较 WT 株减少, 而缺失株 $\Delta cpaC$ 偶见侧身鞭毛。结果提示, $cpaC$ 基因缺失可通过影响副溶血弧菌的侧身鞭毛的数量, 进而减弱细菌的运动性。

2.5 CpaC 参与副溶血弧菌生物被膜形成

通过染色法比较 3 种菌株的生物被膜形成能力, 结果表明(图 5), 30 °C 和 37 °C 时 $\Delta cpaC$ 株的生物被膜形成能力较 WT 株均显著降低,

而 $C\Delta cpaC$ 的被膜形成能力均恢复至 WT 水平($P>0.05$)。结果表明, $cpaC$ 基因对副溶血弧菌生物被膜形成能力起促进作用。

2.6 CpaC 有助于副溶血弧菌的细胞黏附与毒性

细胞黏附结果显示(图 6A), 缺失株 $\Delta cpaC$ 感染 HeLa 细胞 1 h 后的黏附率较 WT 株显著下降, 互补株的细胞黏附作用恢复至 WT 株水平, 证明 $cpaC$ 基因有助于副溶血弧菌对细胞的黏附能力。细胞毒性结果显示(图 6B), 与 WT 株相比, $\Delta cpaC$ 株对 HeLa 细胞的毒性显著降低, 证实 $cpaC$ 参与副溶血弧菌的细胞毒性作用。

2.7 CpaC 影响副溶血弧菌对小鼠的毒力作用

以每只 3×10^7 CFU 的细菌量感染 3 周龄 ICR 小鼠, 临床症状表现为: WT 组小鼠在 2 h 出现精神低迷、被毛蓬乱、呼吸困难、腹泻等临床症状; 缺失株 $\Delta cpaC$ 组小鼠主要表现为精神低迷, 死亡时间较 WT 组延后; $C\Delta cpaC$ 组小

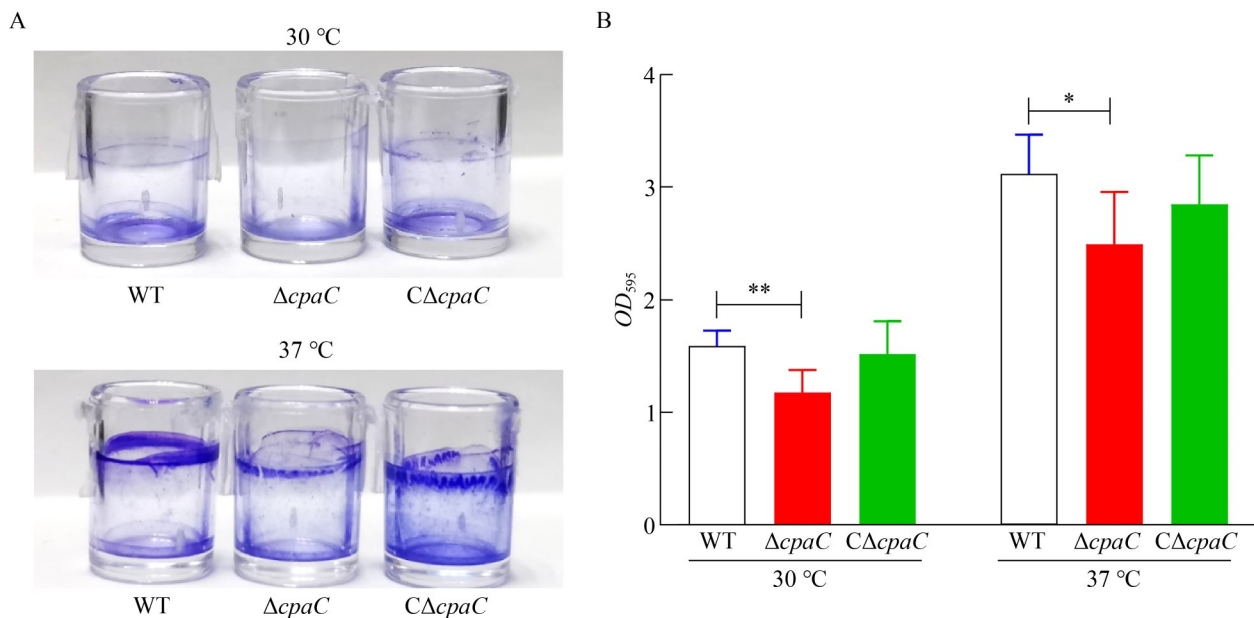


图5 各菌株在30 °C和37 °C条件下的生物被膜形成情况(A)与结晶紫检测结果(B)

Figure 5 Biofilm experiment (A) was performed at 30 °C and 37 °C, respectively, and the OD_{595} values (B) of crystal violet staining were analyzed (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

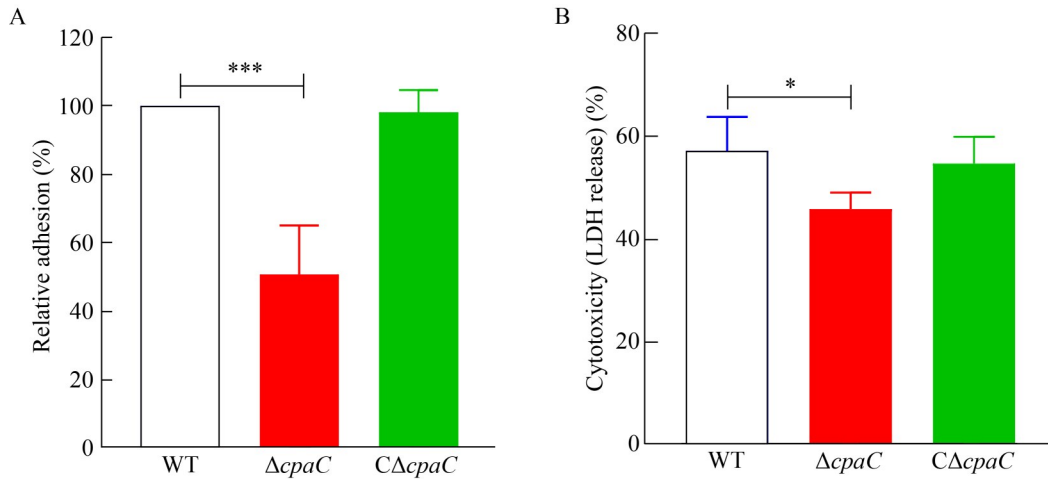


图6 细胞黏附(A)与毒性试验(B)

Figure 6 Adhesion (A) and cytotoxicity (B) test in HeLa cells at MOI of 10:1 (bacteria: cells). *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

鼠的临床症状与 WT 组相似；对照组小鼠未见异常临床症状。统计小鼠感染 7 d 内的存活率，结果显示(图 7)：WT 组、 $\Delta cpac$ 组、 $C\Delta cpac$ 组和对照组小鼠的存活率分别为 0、37.5%、12.5%、100.0%，且 $\Delta cpac$ 组与 WT 组呈现显著差异， $C\Delta cpac$ 组与 WT 组无显著差异，证实 *cpac* 缺失导致副溶血弧菌感染小鼠的毒力减弱。

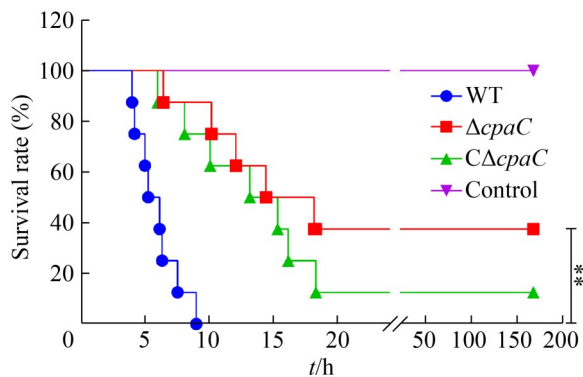


图7 各菌株感染小鼠的存活率

Figure 7 The survival rates of mice injected intraperitoneally with WT, $\Delta cpac$ and $C\Delta cpac$ strains (3×10^7 CFU/animal) and physiological saline (control group). **: $P<0.01$.

2.8 CpaC 参与副溶血弧菌的组织定殖能力

以 5×10^6 CFU/只的剂量感染 ICR 小鼠，WT 组 10 只小鼠中有 3 只死亡， $C\Delta cpac$ 组有 1 只死亡， $\Delta cpac$ 组均未出现死亡。每组随机挑选感染 10 h 的 5 只活小鼠进行剖检，组织载量测定结果显示(图 8)：缺失株 $\Delta cpac$ 在 ICR 小鼠肝、脾、心、肾的细菌定殖数均显著低于亲本株，同时互补株在小鼠相应脏器的细菌定殖恢复至亲本株水平。结果说明 *cpac* 基因与副溶血弧菌在小鼠组织脏器的定殖能力有关。

2.9 CpaC 参与副溶血弧菌感染的组织病变

对比各组鼠肝组织病理切片，结果显示(图 9A)：WT 组可见肝区域坏死灶，出现肝细胞核固缩、核碎裂、核溶解(黑色箭头)，较多肝细胞发生细胞肿胀，较多肝血窦被挤压消失(蓝色箭头)，较多中央静脉瘀血(红色箭头)； $\Delta cpac$ 组仅见肝血窦轻度瘀血(红色箭头)，肝细胞未见异常； $C\Delta cpac$ 组广泛肝窦明显瘀血(红色箭头)，肝血窦炎性细胞轻微增多(黄色箭头)。比较 3 组脾脏病理切片显示(图 9B)：WT 组可见动脉周围

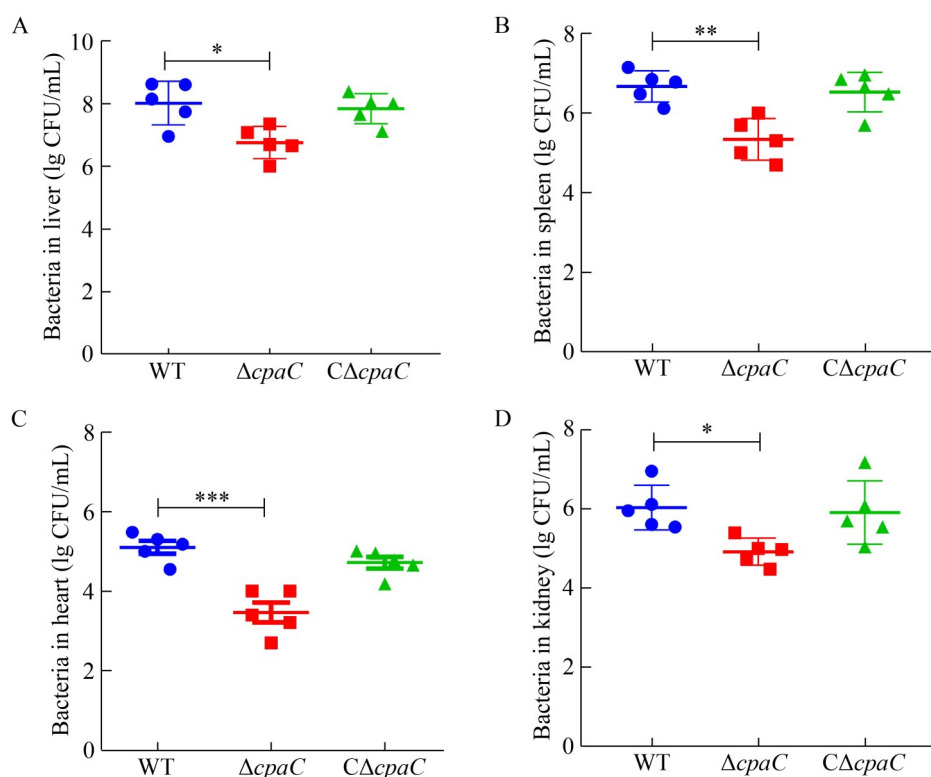


图8 各菌株感染小鼠肝(A)、脾(B)、心(C)、肾(D)的细菌载量

Figure 8 The bacterial loads in the liver (A), spleen (B), heart (C), kidney (D) tissues of mice infected by each strain (5×10^6 CFU/animal). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

淋巴鞘淋巴细胞明显减少(黑色箭头), 骨髓形状不规则, 骨髓重度瘀血且明显扩张(红色箭头); $\Delta cp a C$ 组见淋巴细胞轻微减少; $C \Delta cp a C$ 组淋巴组织明显萎缩, 骨髓轻微扩张(红色箭头)。比较心脏病理切片显示(图 9C): WT 组见局部心肌细胞灶性坏死, 胞核固缩、碎裂、溶解, 中心可见蓝紫色的颗粒坏死物质(黑色箭头); $\Delta cp a C$ 组无明显的病理变化; $C \Delta cp a C$ 组出现较多淡染的心肌变性(黑色箭头)。比较肾脏病理切片显示(图 9D): WT 组见较多肾小管内皮细胞坏死消失, 管腔扩张(黑色箭头), 肾小管间质毛细血管瘀血(红色箭头), 肾小管内皮细胞发生广泛变性(蓝色箭头); $\Delta cp a C$ 组偶见肾小管内皮细胞发生变性(蓝色箭头), 肾小管间质毛细血管轻度瘀血(红色箭头); $C \Delta cp a C$ 组见肾小管轻度扩张(黑色箭头), 肾小管内皮细胞轻度变性(蓝色箭头),

间质毛细血管轻度瘀血(红色箭头)。综合以上病变, WT 组和 $C \Delta cp a C$ 组小鼠的心、肝、脾、肾组织出现细胞变性或坏死等病变较为明显, 而 $\Delta cp a C$ 组出现组织病变较为轻微。

3 讨论与结论

副溶血弧菌通过调控一系列复杂机制参与环境适应与致病性过程, 其中涉及 Tad 型菌毛。Tad 菌毛参与多种生物过程, 包括 DNA 摄取、抽搐运动、生物膜形成、细胞黏附、组织定殖和毒力等^[17,35-37]。此外, Tad 菌毛已被证实与细菌诱导宿主细胞死亡有关^[38]。Tad 菌毛在弧菌科中广泛存在, 但目前对其生物学功能的研究较少。仅创伤弧菌的 Tad 菌毛被证实参与菌体表面附着、生物膜生成和抵抗机械清除等过程^[21], 而关于其在副溶血弧菌中的功能研究则更为

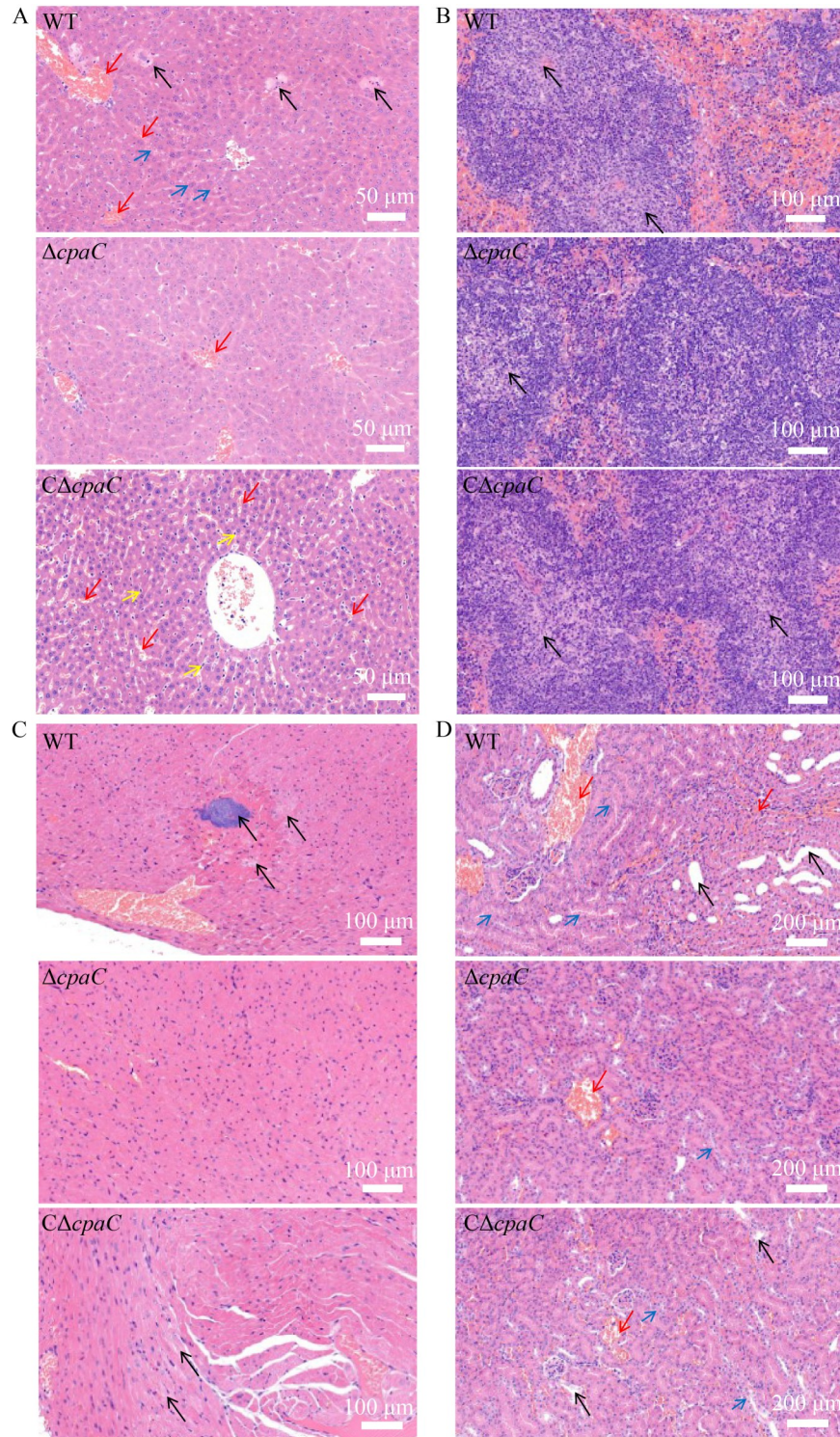


图9 各菌株感染小鼠肝(A)、脾(B)、心(C)、肾(D)的组织切片

Figure 9 The tissue sections from liver (A), spleen (B), heart (C), kidney (D) in mice infected by each strain. Black, blue, red, and yellow arrows indicate necrosis or reduction in cell numbers, degeneration, congestion, and inflammatory cells, respectively.

匮乏。本研究通过对副溶血弧菌的 *cpaC* 基因在生物学特性和致病性等多方面进行分析, 为深入理解 Tad 菌毛在致病菌中的功能机制提供了重要的实验依据。

由于环境营养稀缺且空间有限, 细菌通常与不同菌株或物种展开竞争活动, 并演化出多种杀伤机制, 主要包括释放扩散化合物和接触依赖性作用 2 种^[39-40]。其中, 接触依赖性机制是通过细胞间的直接接触完成毒素递送, 从而杀伤竞争者, 这通常与 T4P 菌毛有关^[40]。此外, T4P 菌毛的天然多样性决定细胞间接触的可能性, 进而影响 VI 型分泌系统(T6SS)介导的细菌竞争程度^[40]。橙黄色黏球菌在细菌竞争过程中, Tad 菌毛对接触依赖性杀伤宿主起着关键作用^[41]。本研究显示, 在 30 °C 条件下, Tad 菌毛的 *cpaC* 基因缺失会导致副溶血弧菌杀伤大肠杆菌的能力显著降低, 这提示在接近自然环境的条件下副溶血弧菌的 Tad 菌毛可能通过调节细胞间直接接触, 或影响 T6SS 介导的细菌竞争能力, 从而提高副溶血弧菌对其他细菌的杀伤作用。

弧菌具有较强的生物被膜形成能力, 进而在环境生存和致病机制方面具备优势^[42]。Tad 菌毛作为细菌表面初始附着的关键黏附因子, 可通过增强细胞间作用和聚集促进生物膜的发育和成熟^[43]。在放线菌中, Tad 菌毛的 *cpaC* (*rcpA*) 基因的表达对其生物被膜的形成具有关键调控作用^[44]。副溶血弧菌的 *rcpA* 缺失会削弱细菌在不同表面的生物膜形成能力^[30]。与该结果一致, 本研究发现副溶血弧菌的 *cpaC* 缺失会导致生物膜产量显著下降, 表明 Tad 菌毛的 CpaC 在副溶血弧菌生物膜形成过程中同样发挥着重要作用。

弧菌拥有强大的双鞭毛系统完成菌体运动, 从而适应多样环境, 并在定位最佳宿主位点、黏附细胞或表面、组织定殖、维持感染及增强毒力等过程中发挥关键作用^[45-46]。其中, 单根极性鞭毛主要负责细菌在液体环境中的泳动,

而多根侧身鞭毛负责在黏稠表面进行群集运动^[31]。Zhu 等^[30]研究表明, 副溶血弧菌的 *rcpA* 缺失会导致细菌泳动和群集运动减弱。本研究结果与之一致, Tad 菌毛的 *cpaC* 缺失显著减弱副溶血弧菌在液体环境中的泳动和在高黏度表面的群集运动。电镜观察进一步发现, *cpaC* 缺失株的侧身鞭毛数量明显减少, 提示 CpaC 缺失可能通过影响细菌鞭毛合成, 从而削弱细菌的运动能力。霍乱弧菌的 MSHA 菌毛被证实可通过与鞭毛相互作用, 调控其运动模式转换和表面位点附着^[47]。此外, 细菌通过鞭毛运动感知表面, 升高细胞内 c-di-GMP 水平, 进而调控 Tad 菌毛活性^[19]。在副溶血弧菌中, *rcpA* 缺失可显著下调群体感应(quorum sensing, QS)系统基因表达, 间接影响鞭毛功能^[30]。综上所述, 细菌菌毛与鞭毛系统之间存在较为复杂的关联。然而, 关于 Tad 菌毛对鞭毛系统的具体调控机制仍有待进一步阐明。

IV 型菌毛作为一种黏附素, 在细菌致病过程中起着重要作用, 如参与细胞黏附、细胞毒性、组织定殖及小鼠毒力等^[43,48]。其中, 细菌与靶细胞接触可诱导 *tad* 菌毛基因转录及蛋白表达, 从而增强其对宿主细胞的黏附能力^[36]。在副溶血弧菌中, MSHA 菌毛具有较强的细菌-宿主细胞黏附与定殖能力, 对肠上皮细胞变性、坏死裂解及炎症因子释放等致病过程发挥着重要作用^[49]。与 MSHA 菌毛相似, 副溶血弧菌的 Tad 菌毛 *rcpA* 缺失显著减弱了细菌在小鼠体内的定殖能力和对肠道组织的损伤程度, 并降低了血清促炎因子水平^[30]。本研究结果显示, Tad 菌毛组分 CpaC 缺失不仅显著削弱副溶血弧菌的细胞黏附能力, 同时降低了细胞毒性, 且在小鼠模型中也表现出组织定殖能力下降和死亡率降低。此外, *cpaC* 缺失导致小鼠心、肝、脾、肾等多个组织的坏死程度减轻。综上结果推测, 副溶血弧菌的 Tad 菌毛 CpaC 可能通过增强细菌对宿主细胞的黏附与定殖能力加剧细胞毒性及坏死程度, 从而在感染与致病机制中

起到关键作用。

本研究表明, Tad 菌毛组分 CpaC 可显著影响副溶血弧菌的环境适应能力, 包括细菌竞争、生物膜形成和运动能力, 并参与调控细菌的致病过程, 包括细胞黏附与毒性、组织定殖和小鼠毒力。前期实验结果显示, CpaC 是副溶血弧菌 T6SS1 的潜在效应因子, 提示 Tad 菌毛 CpaC 与 T6SS1 存在功能关联。然而, *cpaC* 基因缺失是否影响 T6SS1 功能及其介导的细菌竞争与致病性仍需进一步研究。已有研究指出, CpaC 是由 12-15 个拷贝的多肽链构成的外膜分泌通道, 在毒素、DNA 及菌毛丝等大分子穿过细胞包膜转运至外界环境的过程中发挥着关键作用^[24]。因此, Tad 菌毛 CpaC 对细胞毒性的影响是否依赖于毒素或其他毒力因子的分泌仍有待深入研究, 这为后续研究提供重要方向。总之, 本研究结果拓展了对 Tad 菌毛组分在细菌毒力与环境适应中作用的理解, 为进一步揭示副溶血弧菌的感染致病机制及其对宿主免疫反应的影响奠定了基础。

作者贡献声明

白雪瑞: 研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改; 郭蓉: 协助实验操作、数据收集和处理; 卢淑淇: 协助实验操作、论文讨论; 范冰冰: 协助实验操作; 张权: 协助实验操作; 方维焕: 实验技术支持; 蒋蔚: 研究构思、论文修改和项目技术支持。

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] KARAN S, GARG LC, CHOUDHURY D, DIXIT A. Recombinant FimH, a fimbrial tip adhesin of *Vibrio parahaemolyticus*, elicits mixed T helper cell response and confers protection against *Vibrio parahaemolyticus* challenge in murine model[J]. *Molecular Immunology*, 2021, 135: 373-387.
- [2] FEARNLEY E, LEONG LEX, CENTOFANTI A, DOWSETT P, COMBS BG, DRAPER ADK, HOCKING H, HOWDEN B, HORAN K, WILMOT M, LEVY A, COOLEY LA, KENNEDY KJ, WANG QN, ARNOTT A, GRAHAM RMA, SINCHENKO V, JENNISON AV, KANE S, WRIGHT R. *Vibrio parahaemolyticus* foodborne illness associated with oysters, Australia, 2021 - 2022[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2024, 30(11): 2271-2278.
- [3] 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.
- [4] YU LH, TEH CSJ, YAP KP, THONG KL. Diagnostic approaches and contribution of next-generation sequencing technologies in genomic investigation of *Vibrio parahaemolyticus* that caused acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(6): 2547-2559.
- [5] GAVILAN RG, CARO-CASTRO J, BLONDEL CJ, MARTINEZ-URTAZA J. *Vibrio parahaemolyticus* epidemiology and pathogenesis: novel insights on an emerging foodborne pathogen[M]//*Vibrio* spp. Infections. Cham: Springer International Publishing, 2023: 233-251.
- [6] ABANTO M, GAVILAN RG, BAKER-AUSTIN C, GONZALEZ-ESCALONA N, MARTINEZ-URTAZA J. Global expansion of Pacific northwest *Vibrio parahaemolyticus* sequence type 36[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 323-326.
- [7] DENISE R, ABBY SS, ROCHA EPC. Diversification of the type IV filament superfamily into machines for adhesion, protein secretion, DNA uptake, and motility[J]. *PLoS Biology*, 2019, 17(7): e3000390.
- [8] ELLISON CK, WHITFIELD GB, BRUN YV. Type IV pili: dynamic bacterial nanomachines[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(2): fuab053.
- [9] OZANIC M, MARECIC V, KNEZEVIC M, KELAVA I, STOJKOVÁ P, LINDGREN L, BRÖMS JE, SJÖSTEDT A, ABU KWAIK Y, SANTIC M. The type IV pili component PilO is a virulence determinant of *Francisella novicida*[J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0261938.
- [10] MARTINI AM, MORICZ BS, WOODS LJ, JONES BD. Type IV pili of *Streptococcus sanguinis* contribute to pathogenesis in experimental infective endocarditis[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0175221.
- [11] OUYANG ZR, ZHAO HL, ZHAO M, YANG YX, ZHAO JH. Type IV pili are involved in phenotypes associated with *Clostridioides difficile* pathogenesis[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2024, 50(6): 1011-1019.
- [12] BHATTACHARJEE MK, KACHLANY SC, FINE DH, FIGURSKI DH. Nonspecific adherence and fibrillogenesis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: TadA protein is an ATPase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 5927-5936.
- [13] HAASE EM, ZMUDA JL, SCANNAPIECO FA. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(6): 2901-2908.
- [14] SKERKER JM, SHAPIRO L. Identification and cell

- cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(13): 3223-3234.
- [15] WHITFIELD GB, BRUN YV. The type IVc pilus: just a Tad different[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2024, 79: 102468.
- [16] ELLISON CK, KAN JB, CHLEBEK JL, HUMMELS KR, PANIS G, VIOLLIER PH, BIAIS N, DALIA AB, BRUN YV. A bifunctional ATPase drives tad pilus extension and retraction[J]. *Science Advances*, 2019, 5(12): eaay2591.
- [17] CAI LL, JAIN M, SENA-VÉLEZ M, JONES KM, FLEITES LA, HECK M, GABRIEL DW. Tad pilus-mediated twitching motility is essential for DNA uptake and survival of *Liberibacter*s[J]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0258583.
- [18] PU M, DURIEZ P, ARAZI M, ROWE-MAGNUS DA. A conserved tad pilus promotes *Vibrio vulnificus* oyster colonization[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(2): 828-841.
- [19] SANGERMANI M, HUG I, SAUTER N, PFOHL T, JENAL U. Tad pili play a dynamic role in *Caulobacter crescentus* surface colonization[J]. *mBio*, 2019, 10(3): e01237-19.
- [20] NYKYRI J, MATTINEN L, NIEMI OT, ADHIKARI S, KÖIV V, SOMERVUO P, FANG X, AUVINEN P, MÄE A, PALVA ET, PIRHONEN M. Role and regulation of the Flp/Tad pilus in the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and *Pectobacterium wasabiae* SCC3193[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73718.
- [21] PU M, ROWE-MAGNUS DA. A Tad pilus promotes the establishment and resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to mechanical clearance[J]. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2018, 4: 10.
- [22] TOMICH M, FINE DH, FIGURSKI DH. The TadV protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a novel aspartic acid prepilin peptidase required for maturation of the Flp1 pilin and TadE and TadF pseudopilins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(19): 6899-6914.
- [23] GILTNER CL, NGUYEN Y, BURROWS LL. Type IV pilin proteins: versatile molecular modules[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(4): 740-772.
- [24] TASSINARI M, RUDZITE M, FILLOUX A, LOW HH. Assembly mechanism of a Tad secretion system secretin-pilolin complex[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5643.
- [25] SNYDER RA, ELLISON CK, SEVERIN GB, WHITFIELD GB, WATERS CM, BRUN YV. Surface sensing stimulates cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(30): 17984-17991.
- [26] VIOLLIER PH, STERNHEIM N, SHAPIRO L. A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins[J]. *EMBO Journal*, 2002, 21(17): 4420-4428.
- [27] SHIME-HATTORI A, IIDA T, ARITA M, PARK KS, KODAMA T, HONDA T. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1): 89-97.
- [28] SUN JF, LI X, QIU Y, XUE XF, ZHANG MM, YANG WH, ZHOU DS, HU LF, LU RF, ZHANG YQ. Quorum sensing regulates transcription of the pilin gene *mshA1* of MSHA pilus in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Gene*, 2022, 807: 145961.
- [29] CHUNG HY, LEE B, NA EJ, LEE KH, RYU S, YOON H, LEE JH, KIM HB, KIM H, JEONG HG, KIM BS, CHOI SH. Potential survival and pathogenesis of a novel strain, *Vibrio parahaemolyticus* FORC₀₂₂, isolated from a soy sauce marinated crab by genome and transcriptome analyses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1504.
- [30] ZHU WX, LIU JX, ZHANG YY, ZHAO DY, LI SG, DOU HZ, WANG HS, XIA XD. The role of *rcpA* gene in regulating biofilm formation and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 418: 110714.
- [31] 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.
- [32] 郭容. 副溶血弧菌T6SS1潜在效应因子的功能和作用机制研究[D]. 上海: 中国农业科学院, 2021.
- GUO R. The study on the functions and mechanisms of the potential effectors of T6SS1 of *Vibrio parahaemolyticus*[D]. Shanghai: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [33] 白雪瑞, 王权, 陈永军, 万莹, 凌娇, 王亚磊, 蒋蔚. 副溶血弧菌ompA基因缺失株的生物学特性及致病性分析[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 902-910.
- BAI XR, WANG Q, CHEN YJ, WAN Y, LING J, WANG YL, JIANG W. Biological characteristics and pathogenicity of an ompA mutant of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 902-910 (in Chinese).
- [34] 白雪瑞, 王权, 刁润南, 凌娇, 孙卫东, 蒋蔚. 副溶血弧菌极性鞭毛超微结构的电镜观察[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(8): 68-71.
- BAI XR, WANG Q, XI RN, LING J, SUN WD, JIANG W. Observation on ultrastructures of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus* by transmission electron microscopy[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(8): 68-71 (in Chinese).
- [35] ANGELOV A, BERGEN P, NADLER F, HORNBERG P, LICHEV A, ÜBELACKER M, PACHL F, KUSTER B, LIEBL W. Novel Flp pilus biogenesis-dependent natural transformation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 84.
- [36] ALTERI CJ, RIOS-SARABIA N, deLa CRUZ MA, GONZÁLEZ-Y-MERCHAND JA, SORIA-BUSTOS J, MALDONADO-BERNAL C, CEDILLO ML, YÁÑEZ-SANTOS JA, MARTÍNEZ-LAGUNA Y, TORRES J, FRIEDMAN RL, GIRÓN JA, ARES MA. The Flp type IV pilus operon of *Mycobacterium tuberculosis* is expressed upon interaction with macrophages and

- alveolar epithelial cells[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 916247.
- [37] DUONG-NU TM, JEONG K, HONG SH, PUTH S, KIM SY, TAN WZ, LEE KH, LEE SE, RHEE JH. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(8): e1007767.
- [38] THIERY S, TUROWSKI P, BERLEMAN JE, KAIMER C. The predatory soil bacterium *Myxococcus xanthus* combines a Tad- and an atypical type 3-like protein secretion system to kill bacterial cells[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(11): 111340.
- [39] GHOUL M, MITRI S. The ecology and evolution of microbial competition[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(10): 833-845.
- [40] OTTO SB, SERVAJEAN R, LEMOPOULOS A, BITBOL AF, BLOKESCH M. Interactions between pili affect the outcome of bacterial competition driven by the type VI secretion system[J]. *Current Biology*, 2024, 34(11): 2403-2417.e9.
- [41] SEEF S, HERROU J, de BOISSIER P, MY L, BRASSEUR G, ROBERT D, JAIN R, MERCIER R, CASCALES E, HABERMANN BH, MIGNOT T. A Tad-like apparatus is required for contact-dependent prey killing in predatory social bacteria[J]. *eLife*, 2021, 10: e72409.
- [42] ZHANG YQ, ZHANG TT, QIU Y, ZHANG MM, LU XH, YANG WH, HU LF, ZHOU DS, GAO B, LU RF. Transcriptomic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* during biofilm formation[J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(12): 371.
- [43] TEKEDAR HC, PATEL F, BLOM J, GRIFFIN MJ, WALDBIESER GC, KUMRU S, ABDELHAMED H, DHARAN V, HANSON LA, LAWRENCE ML. Tad pili contribute to the virulence and biofilm formation of virulent *Aeromonas hydrophila*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1425624.
- [44] SAITO T, ISHIHARA K, RYU M, OKUDA K, SAKURAI K. Fimbriae-associated genes are biofilm-forming factors in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains[J]. *Bulletin of Tokyo Dental College*, 2010, 51(3): 145-150.
- [45] ZEGADŁO K, GIEROŃ M, ŻARNOWIEC P, DURLIK-POPIŃSKA K, KRĘCISZ B, KACA W, CZERWONKA G. Bacterial motility and its role in skin and wound infections[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1707.
- [46] QIAO Y, FENG LJ, JIA R, LUO YQ, YANG Q. Motility, biofilm formation and associated gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* impaired by co-culture with live *Ulva fasciata*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(1): 101-112.
- [47] UTADA AS, BENNETT RR, FONG JCN, GIBIANSKY ML, YILDIZ FH, GOLESTANIAN R, WONG GCL. *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4913.
- [48] PARANJPYE RN, LARA JC, PEPE JC, PEPE CM, STROM MS. The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice[J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(12): 5659-5668.
- [49] O'BOYLE N, HOUEIX B, KILCOYNE M, JOSHI L, BOYD A. The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(8): 563-573.