

文章编号: 1674-7054(2020)03-0266-08

溶珊瑚弧菌 *hapR* 基因的敲除及功能研究

谢 媚^{1,2}, 杨艺滢^{1,2}, 陈 偿¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所/热带海洋生物资源与生态重点实验室/应用海洋生物重点实验室/西沙深海海洋环境观测研究站, 广州 510301; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 溶珊瑚弧菌 (*Vibrio coralliilyticus*) 是多种珊瑚的致病菌。*hapR* 是弧菌群体感应系统核心的泛调控基因。前期实验中发现, 溶珊瑚弧菌在感染佳丽鹿角珊瑚时, 致病力与其接种密度密切相关, 推测溶珊瑚弧菌的群体感应系统可能是调控其毒力的关键因子。笔者利用同源重组技术成功构建了溶珊瑚弧菌 *hapR* 缺失株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450, 表型测试结果表明, *hapR* 的缺失影响溶珊瑚弧菌的菌落形态, 但不影响细菌的运动性和鞭毛结构; *hapR* 缺失后, 细菌最大生长量明显减少, 但生物膜的形成量显著增加; 用溶珊瑚弧菌人工感染鹿角珊瑚, 结果显示, *hapR* 缺失后菌株毒力增加, 表明 *hapR* 在溶珊瑚弧菌中可能具有与霍乱弧菌 *hapR* 相似的功能, 可以抑制毒力基因的级联激活。

关键词: 溶珊瑚弧菌; *hapR*; 群体感应系统; 毒力基因; 珊瑚白化

中图分类号: Q 178.53; Q 754

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.03.002

溶珊瑚弧菌 (*Vibrio coralliilyticus*) 是一种革兰氏阴性、杆状的病原菌, 它能引起印度洋和太平洋中普遍存在的鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*) 的白化和组织裂解^[1], 研究显示, 溶珊瑚弧菌也是柳珊瑚科的 *Pseudopterogorgia americana*, 鹿角珊瑚科的 *Acropora cytherea* 等白化的病原^[2]。溶珊瑚弧菌还能感染多种海洋生物, 如诱发东方牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 和太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 幼体大量死亡^[3], 也可导致虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 患病^[4]。群体感应 (Quorum Sensing) 是细菌通过感应种群密度的波动来调节自身基因表达的一种机制。群体感应细菌产生并释放被称为自诱导分子 (Autoinducer) 的化学物质来传递信号, 其浓度随着细胞密度的增加而增加。通过感应这种信号分子的浓度, 细菌可以调节多种生理活动, 包括共生、竞争、毒力因子表达、接合、抗生素的合成、细菌运动、孢子形成以及生物膜形成^[5]。弧菌一直以来都是研究群体感应系统的重要模型, 因为在弧菌中, 群体感应被证实可以参与调控多种基因的表达^[6]。HapR 家族蛋白作为响应种群密度变化的泛调控因子 (global regulator), 控制着上百个基因的表达, 其中包括细胞的定殖、生物膜的形成、分泌系统和 c-di-GMP 信号传导、细胞毒素等基因^[7]。HapR 蛋白最早发现于哈维氏弧菌^[8], 后来相继在霍乱弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌和溶藻弧菌中被发现^[8-13], 但尚未见 HapR 在溶珊瑚弧菌中的报道。在前期实验中, 笔者发现, 溶珊瑚弧菌的接种浓度必须达到 10^7 cfu·mL⁻¹ 时才能引起珊瑚的急性感染, 推测群体感应系统可能是溶珊瑚弧菌毒力的调控因子。本研究中, 笔者构建了溶珊瑚弧菌 *hapR* 基因缺失株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450, 对溶珊瑚弧菌野生株 Vc450, *hapR* 缺失突变株和回补株的菌落形态、鞭毛结构、细菌运动性、生长代谢情况及生物膜的形成量进行了实验分析, 同时比较了它们感染鹿角珊瑚的毒力, 旨在探讨 *hapR* 在溶珊瑚弧菌中可能的生物学功能及其与毒力相关的机制, 为珊瑚病害防治提供理论指导。

收稿日期: 2019-12-25

修回日期: 2020-03-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31272697); 中国科学院战略性先导科技专项 (A 类) (XDA13020302)

第一作者: 谢媚 (1995-), 女, 中国科学院大学 2017 级硕士研究生. E-mail: xiemei95@gmail.com

通信作者: 陈偿 (1973-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 海洋生物技术. E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒 溶珊瑚弧菌野生株: Vc450; *hapR* 缺失突变株: $\Delta hapR$ -Vc450; *hapR* 回补株 *ChapR*-Vc450; 大肠杆菌: GEB802, GEB883(表 1)。

表 1 实验菌株及质粒

Tab. 1 Bacterial strains and plasmids used for test

菌株或质粒 Strain or plasmid	基因型或表型 Genotype or phenotype	参考或来源 Reference or source
大肠杆菌		
GEB802	LacIQ, thil, supE44, endA1, recA1, hsdR17, gyrA462, zei298::tn10[Tc], $\Delta thyA::$ (<i>erm</i> pir116), <i>Thy</i> ⁻ , intermediate host of suicide plasmid pSW7848	Annick Lab
GEB883	WT <i>E. coli</i> K12 $\Delta dapA::erm$ pir RP4-2 $\Delta recA$ gyrA462, zei298::tn10, donor strain for conjugation	Annick Lab
溶珊瑚弧菌		
Vc450	Isolate from diseased coral <i>Pocillopora damicornis</i> in Mawi Island, Indian Ocean	美国菌种保藏中心 ATCC
$\Delta hapR$ -Vc450	<i>hapR</i> 基因缺失株	本研究构建
<i>ChapR</i> -Vc450	<i>Cm</i> ^r ; <i>hapR</i> 基因完整开放阅读框回补株	本研究构建
Plasmid		
pSW7848	<i>Cm</i> ^r , T7, oriT RP4, araC, oriV R6K, cat ^r	Annick Lab
pMMB207	Apr, <i>Cm</i> ^r , MobA, RecpA, RepC, lacI	赵哲实验室

1.2 主要试剂及培养基 分子实验试剂: PCR 反应试剂 (高保真酶 PrimeSTAR、常规 *rTaq* DNA 聚合酶及 DNA marker) 均购自 TaKaRa 公司; 基因片段连接试剂购自诺唯赞生物科技有限公司; 基因组提取试剂盒购自天根生物有限公司; PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 凝胶纯化试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Macherey nagel 公司。细菌培养试剂: 培养基 LB 购自 Invitrogen 公司; TCBS 培养基购自广州环凯微生物科技有限公司; 2216E 培养基购自 BD 公司; 三氟胸腺嘧啶核苷 (*Thy*)、二氨基庚二酸 (DAP)、氯霉素、IPTG 诱导剂、D-(+)-葡萄糖 (D-Glucose)、L-(+)-阿拉伯糖 (L-(+)-Arabinose) 均购自 sigma 公司; 氯霉素 (*Cm*) 使用浓度为 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。表型分析用试剂及耗材: Agar 琼脂粉、NaCl 购自生工生物工程上海 (股份) 有限公司 (简称: 生工生物); 5% 苯酚溶液、甲醇、冰醋酸等常规试剂均为国产分析纯; 24 孔板购自美国 Costar 公司; 染色制片用防脱载玻片及常规盖玻片均购自生工生物。常用培养基: LBS 培养基为添加 2% NaCl 的 LB 培养基。BFM (Biofilm Formation Medium) 培养基: KH_2PO_4 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, FeSO_4 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Thiamine $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Casamino acids $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Glucose $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。FASW (Filtered Artificial Sea Water) 是用珊瑚盐配制的人工海水, 盐度 32, 用 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤灭菌。

1.3 溶珊瑚弧菌 Vc450 *hapR* 基因敲除突变株及回补株的构建 溶珊瑚弧菌 Vc450 敲除突变株构建过程: 采用在线引物设计软件 NEBuilder (<http://nebuilder.Neb.com/>) 设计基因 *hapR* 上下游片段和质粒 pSW7848 线性化片段扩增引物, 引物见表 2。将上述纯化好的上下游同源臂片段和 pSW7848 线性载体进行重组片段的连接, 重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 GEB883 中, 并与溶珊瑚弧菌野生株 Vc450 进行接合。在添加 0.2% 葡萄糖的 TCBS 平板和添加 0.2% 阿拉伯糖的 TCBS 平板上进行缺失突变菌株筛选, 将可疑阳性克隆进行 PCR 和测序检验, 最后挑选若干个单克隆进行 PCR 检测, 筛选出成功突变的菌株 $\Delta hapR$ -Vc450。溶珊瑚弧菌 Vc450 敲除回补株构建过程: 根据溶珊瑚弧菌 Vc450 基因组中的 *hapR* 基因序列, 设计线性化回补载体 pMMB207 引物以及 *hapR* 基因回补序列扩增引物, 引物见表 2。将已纯化的 *hapR* 基因片段与 pMMB207 线性载体进行重组连接, 将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 GEB883 中, 并与溶珊瑚弧菌 *hapR* 缺失株 $\Delta hapR$ -Vc450 进行接合。在添加 0.2% 葡萄糖的 TCBS 平

表2 缺失突变株及回补株构建用引物

Tab. 2 Nucleotide sequences of primers used for construction of deletion mutants

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	
	上游引物(5'→3') Sense primer	下游引物(5'→3') Antisense primer
pSW7848	<u>GTCTGATTCGTTACCAATTA</u> TGACAAC	<u>GAATTCGATATCAAGCTT</u> ATCGATAC
Del-check-pSW7848	TCACTGTCCCTTATTTCGCACC	CTGCTTTTGAGCACTACCCG
<i>hapR</i> -UP	<u>aagcttgatatcgaattc</u> TACGCTGCTCAAGTAGAG	<i>catatctaggggtctcttag</i> GGTCTCTTAGCTATA GAATCC
<i>hapR</i> -DOWN	<i>ctaagagaccctagatgatg</i> CCTAGATATGCTTTGCATC	<u>taattgtaacgaatcagac</u> ACAGTTTACCAGT CACTAG
Del-check- <i>hapR</i>	CAGCAGGAGAAACGTTTGCT	TATCCACGCTCACCCAACT
pMMB207	<u>AGAAGCGGTCTGATAAA</u> ACAGAATTTGC	<u>GCGCAACGCAATTAAT</u> GTAAGTTAG
Vc- <i>hapR</i>	<u>attaattgcgttgcgc</u> GTCATGAAATCAACTGGGTGAG	<u>tttatcagaccgttct</u> ACGGTGGCGAACTACT AG
com-PMMB207-check	CTACTGAGCGCTGCCGCACA	TCGTTTTATTGATGCCTGGCAG

注:下划线加粗序列为上下游同源臂与质粒片段连接时重叠互补序列;斜体加粗序列为上下游同源臂之间连接时重叠互补序列。

Note: The sequences, underlined and bold, were overlapping fragments between up/down-segments and plasmid, and the sequences in italics and bold were overlapping fragments between up-segment and down-segment of target genes.

板进行回补株筛选,将可疑阳性克隆进行PCR和测序检验,最后挑选若干个单克隆进行PCR检测,筛选出成功突变的菌株*ChapR*-Vc450。

1.4 菌落和细胞形态观察 挑取溶珊瑚弧菌野生株 Vc450 和突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 单菌落至 LBS 液体培养基中,将回补株 *ChapR*-Vc450 挑取至 LBS+5 mg·L⁻¹ Cm 液体培养基中,在 30 °C 200 r·min⁻¹ 摇床中振荡过夜。连续稀释过夜培养的菌液至适当的浓度,取 100 μ L 涂布于 TCBS 平板上,30 °C 静置培养 16 h,在 BIO-RAD 图像系统 Gel DocTM XR+下观察单个菌落形态。通过透射显微镜(Hitachi H-7650 TEM)观察细菌细胞形态及鞭毛结构。

1.5 细菌生长曲线测定 将溶珊瑚弧菌 Vc450 和突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 单菌落挑取至 2216E 液体培养基中,将回补株 *ChapR*-Vc450 挑取至 2216E+5 mg·L⁻¹ Cm 液体培养基中,在 30 °C 200 r·min⁻¹ 摇床中振荡过夜。为了测试细菌在富营养条件下的生长情况,将培养过夜的菌液以 1 : 100 的比例(体积比)接种至 2216E 液体培养基中,30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养,用分光光度计测定 OD_{600} 。

1.6 细菌运动性分析将溶珊瑚弧菌 Vc450 和突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 单菌落挑取至 LBS 液体培养基中,将 *ChapR*-Vc450 挑取至 LBS+5 mg·L⁻¹ Cm 液体培养基中,以 30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡过夜。调整培养液浓度至 $OD_{600}=1.00$,取 5 μ L 平行 3 次点样于 0.3% 和 1.5% 琼脂的 LBS 半固体培养基上,30 °C 静置培养 16 h,观察细菌的运动情况。

1.7 生物膜形成能力检测 将溶珊瑚弧菌 Vc450 和突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 单菌落挑取至 LBS 液体培养基中,将 *ChapR*-Vc450 挑取至 LBS+5 mg·L⁻¹ Cm 液体培养基中,以 30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡过夜。添加 1 mL BFM 培养基于 24 孔板中。调整菌液浓度至 $OD_{600}=1.00$ 后,取 10 μ L Vc450, $\Delta hapR$ -Vc450 接种于含 1 mL BFM 培养基中,10 μ L *ChapR*-Vc450 接种于含 5 mg·L⁻¹ Cm 的 BFM 培养基中,30 °C 静置培养,取样测定生物膜生成量 OD_{562} ,生物膜生成量测定方法参照文献 [14]。

1.8 鹿角珊瑚的感染 将溶珊瑚弧菌野生株 Vc450,突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 单菌落接种于 LBS 液体培养基中,将回补株 *ChapR*-Vc450 挑取单菌落至 LBS+5 mg·L⁻¹cm 液体培养基中,30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养过夜。再以 1:100 的体积比接种至 200 mL 2216E 液体培养基中,30 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h。感染浓度为 10⁶ cfu·mL⁻¹。感染方法:准备 5 个消毒后的 10 L 玻璃缸,添加 9.5 L ASW 并添置加热棒以维持水温在 24 °C,每个水缸配备 1 根温度计;每个水缸中分别放置 6 枝 4~5 cm 的珊瑚枝,以 12 h : 12 h 光照/黑暗暂养 2 d;将培养 12 h 的菌液以 3 800 r·min⁻¹ 离心 15 min,去上清;用 10 mL FASW 重悬,3 800 r·min⁻¹

离心 15 min, 去上清; 用 3 mL FASW 过滤海水重悬添加至 9.5 L ASW 的玻璃缸中, 对照组添加 3 mL 过滤海水; 浸泡感染 8 h 后, 换新鲜海水; 观察并记录珊瑚状态。

2 结果与分析

2.1 溶珊瑚弧菌 Vc450 *hapR* 基因敲除突变株及回补株的构建 通过特异性引物设计、重组载体构建以及细菌接合和筛选, 本实验成功构建了溶珊瑚弧菌 Vc450 *hapR* 基因敲除突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450。在 *hapR* 的两侧设计引物 Del-check-*hapR*-F/R, 突变株 PCR 检测电泳结果如图 1。成功缺失掉 *hapR* 基因的突变株检测片段的大小为 492 bp, 而野生株检测片段大小为 1 047 bp (*hapR* 序列长度为 555 bp), 将条带大小吻合的可疑突变株送测, 测序结果表明, *hapR* 基因已被成功缺失。用检测引物 com-PMMB207-check-F/R 对回补株进行 PCR 检测验证, 扩增得到约 1 711 bp 的片段(图 2), 测序结果表明, *hapR* 回补株已被成功构建。

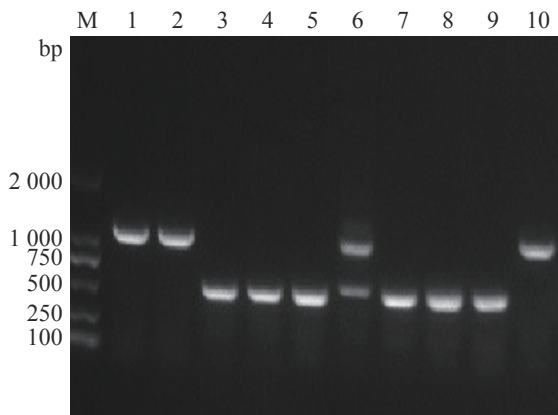


图 1 *hapR* 缺失株 $\Delta hapR$ -Vc450 PCR 条带检测琼脂糖凝胶图谱

M: DNA Marker DL2000; 泳道 1/2/6/10: 野生型 Vc450; 泳道 3/4/5/7/8/9: *hapR* 缺失株。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the deletion mutant strain $\Delta hapR$ -Vc450

M: DNA Marker DL2000; Lanes 1/2/6/10: wild type Vc450; Lanes 3/4/5/7/8/9: *hapR* deletion candidates.

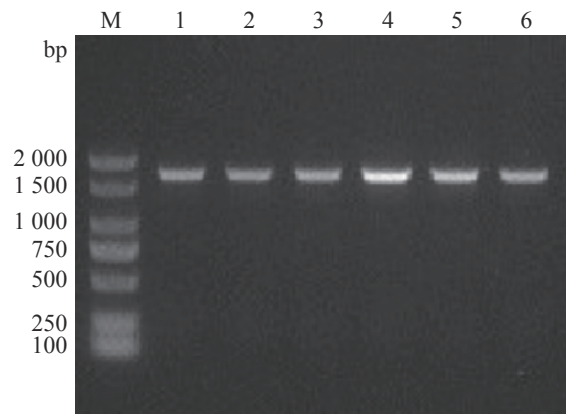


图 2 回补株 *ChapR*-Vc450 PCR 条带检测琼脂糖凝胶图谱 M: DNA Marker DL2000; 泳道 1~6: 回补菌株的鉴定。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the complementary strain *ChapR*-Vc450

M: DNA Marker DL2000; Lanes 1~6: Identification of the complementary strain candidates.

2.2 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌菌落及细胞形态的影响 溶珊瑚弧菌野生株 Vc450, 突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450 在 TCBS 平板上的菌落形态如图 3。野生株 Vc450 在 TCBS 平板上的菌落表现不透明/光滑, *hapR* 缺失株的菌落则表现为透明/光滑, 当 *hapR* 基因回补后, 菌株表型得到回补。

透射电镜结果如图 4, 图片显示, 突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450 具有与野生株一样的细胞形态和鞭毛结构, 说明 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌的细胞形态和鞭毛结构没有影响。

2.3 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌生长代谢的影响 从图 5 可知, *hapR* 敲除突变株与野生株在潜伏期及对数

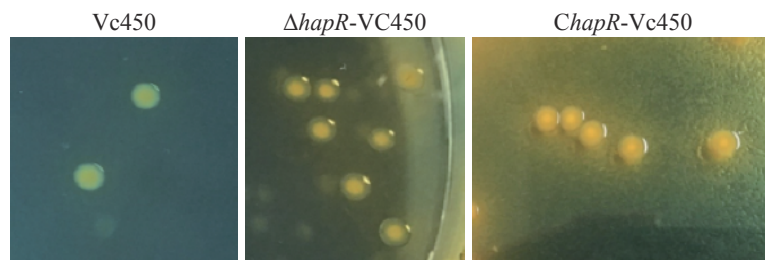


图 3 溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株在 TCBS 平板上的菌落形态

Fig. 3 The colonial morphology of Vc450, mutant strain $\Delta hapR$ -Vc450 and complementary strain *ChapR*-Vc450 of *Vibrio coralliilyticus*

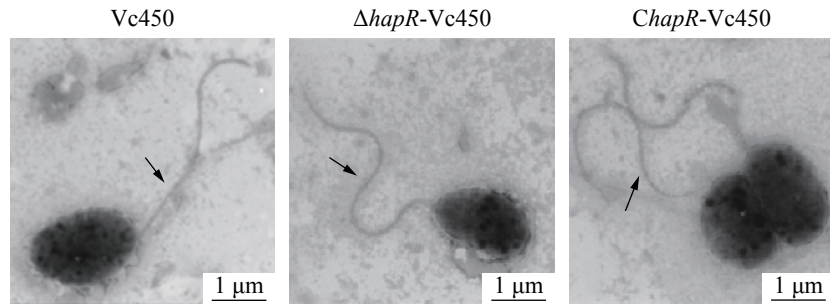


图4 透射显微镜观察溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株的细胞形态及鞭毛结构
箭头指向鞭毛。

Fig. 4 Observation of cellular morphology and flagella under Hitachi H-7650 TEM in Vc450, $\Delta hapR$ -Vc450 and ChapR-Vc450 of *Vibrio coralliilyticus*

Black arrow points at bacterial flagellum.

期并无显著差异,但在平台期,突变株的最大生长量明显减少;回补株在早期潜伏期及对数期的生长稍慢于突变株与野生株,到达平台期的最大生长量相较于突变株得到部分回补,说明 *hapR* 基因的缺失会影响溶珊瑚弧菌的最大生长量。

2.4 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌运动性的影响 从图6可知,突变株与回补株在2种平板上的运动性,相较于野生株均无明显差异;而相比起1.5% Agar LBS 涌动性,3株菌在0.3% Agar LBS 表现出较强的游动性,但彼此间无明显差异,说明 *hapR* 基因不影响溶珊瑚弧菌的运动性。

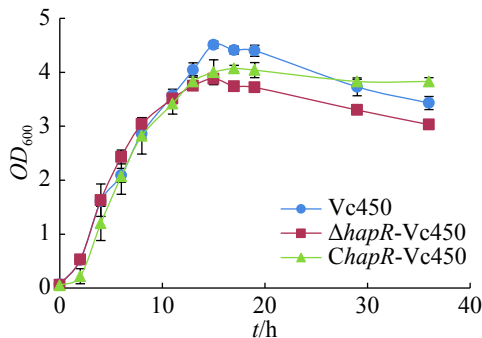


图5 *hapR* 缺失对溶珊瑚弧菌生长的影响

Fig. 5 Effect of *hapR* deletion in Vc450 on growth of *Vibrio coralliilyticus* in 2216E medium

2.5 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌生物膜形成的影响

本研究采用结晶紫染色法定量测定溶珊瑚弧菌野生株 Vc450, 突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 ChapR-Vc450 在 30 °C 静置培养条件下生物膜的形成量(图7)。从图7可知,在生物膜形成的起始阶段(0~6 h),3株菌生物膜的形成量无显著差异;在8 h后, $\Delta hapR$ -Vc450 的生物膜形成速度显著高于野生株和回补株,并在14 h后形成量达到最大值;14 h后,回补株生物膜的形成量亦高于野生株,并在12~14 h时生物膜形成量达到最大值;野生株在12~14 h达到最大值。结果表明, *hapR* 基因的缺失会显著影响溶珊瑚弧菌的生物膜形成能力,且主要参与了生物膜形成过程的起始阶段。

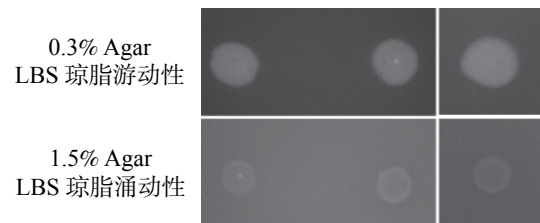


图6 溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株在0.3%和1.5% LBS 琼脂平板上的运动情况

Fig. 6 The mobility of the Vc450 wild type, mutant and complementary strain of *V. coralliilyticus* on 0.3% Agar and 1.5% Agar LBS

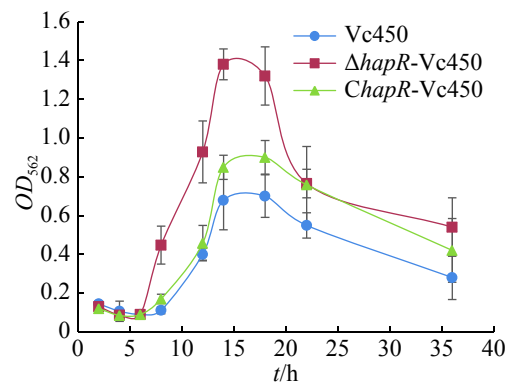


图7 溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株的生物膜生成量的测定

Fig. 7 Detection of biofilm formation of the wild-type strain Vc450, mutant strain $\Delta hapR$ -Vc450 and complementary strain ChapR-Vc450 of *Vibrio coralliilyticus*

2.6 *hapR* 基因对溶珊瑚弧菌毒力的影响 本研究用溶珊瑚弧菌对鹿角珊瑚进行感染。珊瑚的白化情况如图 8 及表 3。实验结果表明, 突变株 $\Delta hapR$ -Vc450 和回补株 *ChapR*-Vc450 的感染能力相对于野生株 Vc450 的感染能力较强。回补株感染后在第 2 天开始出现白化, 在第 5 天, 珊瑚白化和死亡的比例达到了 83%; 突变株感染则在第 3 天才出现白化, 到第 5 天时, 83% 的珊瑚白化死亡; 而野生株感染后, 在感染 5 天后, 只有 17% 的珊瑚白化死亡; 空白对照组在观察期内未出现白化情况。这说明 *hapR* 基因突变之后, 溶珊瑚弧菌毒力增强。

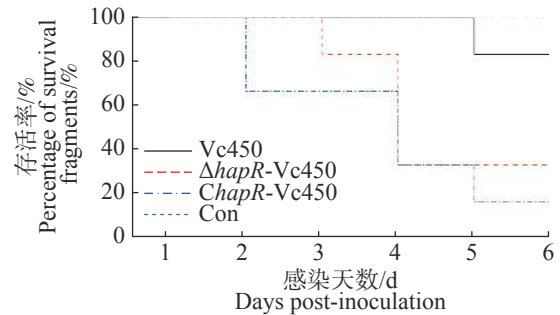


图 8 溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株感染鹿角珊瑚后的珊瑚白化情况

Fig. 8 The percentage of survival fragments after inoculation of the Vc450, $\Delta hapR$ -Vc450 and *ChapR*-Vc450 of *Vibrio coralliilyticus*

表 3 溶珊瑚弧菌野生株、突变株和回补株对鹿角珊瑚的感染

Tab. 3 Infection of *Acropora pulchra* with the wild-type strain Vc450, $\Delta hapR$ -Vc450 and *ChapR*-Vc450 of *Vibrio coralliilyticus*

处理 Treatment	感染浓度/ (cfu·mL ⁻¹) Concentration	温度/°C Temp	被感染的枝条数/总测试枝条数 Number of infected fragments/total tested fragments					
			第1天Day1	第2天Day2	第3天Day3	第4天Day4	第5天Day5	第6天Day6
Vc450	4.17×10 ⁶	24	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6
$\Delta hapR$ -Vc450	3.17×10 ⁶	24	0/6	0/6	1/6	4/6	4/6	5/6
<i>ChapR</i> -Vc450	5.17×10 ⁶	24	0/6	2/6	2/6	4/6	5/6	5/6
Con	—	24	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

3 讨论

细菌的群体感应是细菌调控细胞密度和基因表达的一种细胞间的通讯方式, 通过分泌信号分子协调细菌的基因表达及菌群的行为, 如菌落相变、生物膜形成、生物发光和毒力因子表达等^[5]。大多数细菌在细胞密度低时, 通过群体感应系统抑制毒力或生物发光基因的表达, 从而不产生毒力; 在高于一定浓度后, 细菌群体感应系统结合自诱导分子, 启动 *hapR* 的表达, 从而激活包括鞭毛合成、毒力因子基因等的转录, 由此开启感染的过程。然而, 在霍乱弧菌中, HapR 能结合到 *aphA* 启动子结合区而抑制毒力基因的级联调控, 最终阻止弧菌毒力岛上 *tcpPH* 启动子的激活^[15], 因此, 在细胞密度低时, 霍乱弧菌的 *hapR* 不表达, 反倒激活了毒力因子如霍乱毒素 CTX 的表达; 而在高细胞密度时, *hapR* 被激活表达, 从而抑制毒素的产生, 但可促进细胞从生物膜中的脱离, 从而开启快速的传染过程^[16]。在本研究中, 缺失 *hapR* 后溶珊瑚弧菌对鹿角珊瑚的毒力比野生型更高, 显示溶珊瑚弧菌的群体感应系统对毒力基因的调控方式可能与霍乱弧菌相似, 在 *hapR* 被敲除后, 群体感应系统中细胞定殖和毒力基因被激活。此外, 有报道显示, 霍乱弧菌在自然环境中可以通过自发的 *hapR* 基因移码突变失活来抑制群体感应系统, 获得较强的毒力, 从而占据有利的生态位^[17], 但是在感染过程中, 回补株 *ChapR*-Vc450 和突变株表现出同样的毒力, 这可能是由于回补质粒上基因启动子是 IPTG 诱导性启动子, 在感染的环境下由于没有 IPTG 诱导, 从而不能表达 HapR 蛋白。

细菌的生物膜(Biofilm)是细胞分泌胞外基质的聚集体, 包括细胞外多糖、蛋白质、核酸和脂质等^[18], 可以为细菌生长繁殖提供良好的微环境, 保护细菌免受宿主免疫系统的攻击和外界环境的胁迫^[19-20]。在霍乱弧菌中, *hapR* 可以通过增强 c-di-GMP 的降解或直接抑制生物膜转录激活因子 *vpsT* 的表达来降低生物膜的合成量^[21]。本研究中, 溶珊瑚弧菌 *hapR* 基因缺失后, 生物膜合成量增加, 也证明了溶珊瑚弧菌中 *hapR* 的功能与霍乱弧菌 *hapR* 相类似。

参考文献:

- [1] BEN-HAIM Y, THOMPSON F L, THOMPSON C C, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis* [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 309 – 315.
- [2] USHIJIMA B, VIDEAU P, BUGER A H, et al. *Vibrio coralliilyticus* strain OCN008 is an etiological agent of acute Montipora white syndrome [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(7): 2102 – 2109.
- [3] RICHARDS G P, WATSON M A, NEEDLEMAN D S, et al. Mortalities of Eastern and Pacific oyster larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 292 – 297.
- [4] AUSTIN B, AUSTIN D, SUTHERLAND R, et al. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia Nauplii* [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1488 – 1495.
- [5] MILLER M B, BASSLER B L. Quorum sensing in bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 165 – 199.
- [6] ALYSSA S B, RYAN R C, JULIA C, et al. Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in *Vibrios* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(19): JB.00105 – 17.
- [7] LENZ D H, MILLER M B, ZHU J, et al. *CsrA* and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(4): 1186 – 1202.
- [8] BASSLER B L, WRIGHT M, SHOWALTER R E, et al. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence [J]. *Mol Microbiol*, 1993(9): 773 – 786.
- [9] JOBLING M G, HOLMES R K. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene [J]. *Mol Microbiol*, 1997, 26: 1023 – 1034.
- [10] MCDUGALD D, RICE S A, KJELLEBERG S. The marine pathogen *Vibrio vulnificus* encodes a putative homologue of the *Vibrio harveyi* regulatory gene, *luxR*: a genetic and phylogenetic comparison [J]. *Gene*, 2000, 248: 213 – 221.
- [11] MCCATER L L. *OpaR*, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180: 3166 – 3173.
- [12] ZHANG Y, QIU Y, TAN Y, et al. Transcriptional regulation of *opaR*, *qrr2–4* and *aphA* by the master quorum-sensing regulator *OpaR* in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34622.
- [13] FIDOPIASTIS P M, MIYAMOTO C M, JOBLING M G, et al. LitR, a new transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 45: 131 – 143.
- [14] CHEN C, ZHAO J J, REN C C, et al. Deletion of *valR*, a homolog of *Vibrio harveyi luxR* generates an intermediate colony phenotype between opaque/rugose and translucent/smooth in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Biofouling*, 2010, 26: 595 – 601.
- [15] LIN W, KOVACIKOVA G, SKORUPSKI K. The quorum sensing regulator HapR down-regulates the expression of the virulence gene transcription factor AphA in *Vibrio cholerae* by antagonizing *Lrp*- and *VpsR*-mediated activation [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(4): 953 – 967.
- [16] MILLER M B, SKORUPSKI K, LENZ D H, et al. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae* [J]. *Cell*, 2002, 110: 303 – 314.
- [17] HAMMER B K, BASSLER B L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(5): 101 – 104.
- [18] PARK J H, JO Y, JANG S Y, et al. The *cabABC* operon essential for biofilm and rugose colony development in *Vibrio vulnificus* [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005192.
- [19] DANG H, LOVELL C R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 91 – 138.
- [20] WATNICK P I, KOLTER R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm [J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(3): 586 – 595.
- [21] WATERS C M, LU W, RABINOWITZ J D, et al. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of *vpsT* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(7): 2527 – 2536.

Knockout and Functional Analysis of *hapR* in *Vibrio coralliilyticus*

XIE Mei^{1,2}, YANG Yiyang^{1,2}, CHEN Chang¹

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences/Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences/Xisha Deep Sea Marine Environment Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract: *Vibrio coralliilyticus* is pathogenic to many species of marine animals. *HapR* is a global regulator in *Vibrio* quorum sensing system. Our previous experiment showed that the pathogenicity of *V. coralliilyticus* was closely related to its inoculating concentration when *Acropora* species were infected with *V. coralliilyticus* under an artificial condition. Therefore, quorum sensing system of *V. coralliilyticus* is presumed to be essentially associated with its virulence. In this study, a deletion mutant strain $\Delta hapR$ -Vc450 and a complementary strain *ChapR*-Vc450 were successfully constructed in *V. coralliilyticus*. Phenotypic observation showed that loss of *hapR* resulted in change of colony morphology but not in the motility and flagellar structure of *V. coralliilyticus*. The loss of *hapR* caused lower maximum growth of *V. coralliilyticus*, but obvious formation of biofilm. When *Acropora* species was artificially infected with *V. coralliilyticus*, the deletion mutant strain and the complementary strain of *V. coralliilyticus* increased their virulence as compared with the wild type. This may be due to the fact that *hapR* has a similar function in *V. coralliilyticus* like in *V. cholera*, inhibiting cascade activation of virulence genes, and that the loss of *hapR* would activate the colonization and virulence of the genes through quorum sensing system.

Keywords: *Vibrio coralliilyticus*; *hapR*; quorum sensing; virulence; coral bleaching

(责任编辑: 潘学峰)