

文章编号: 1674-7054(2017)03-0255-12

两个溶藻弧菌胞外多糖合成基因簇的生物信息学分析

黄晓纯^{1,2,4}, 陈 偿^{1,2,3}, 李颖颖⁵, 田雨顺^{1,2,4}, 谢 媚⁵

(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 广州 510301; 2. 广东省中国科学院南海海洋研究所 应用海洋生物重点实验室 广州 510301; 3. 中国科学院南海海洋研究所 西沙深海海洋环境观测研究站, 广州 510301; 4. 中国科学院大学 北京 100049; 5. 暨南大学 生命科学技术学院 广州 510632)

摘 要: 溶藻弧菌是我国南方海水养殖最重要的病原菌之一。胞外多糖(EPSs)是细菌产生的一类具有复杂结构的多糖类物质,影响其致病性和环境适应力。基因组分析发现溶藻弧菌 ZJ-51 存在 4 个与胞外多糖合成有关的基因簇,笔者对其中 2 个基因簇 CPS1357 和 CPS4543 进行了生物信息学分析和实验验证。结果表明,基因簇 CPS4543 编码 3 个多糖外膜转运体系的同源蛋白 Wza-Wzb-Wzc,而 CPS1357 编码的 17 个蛋白与多糖合成、转运以及调控有关。但通过染色实验、菌落形态观察和运动性分析证实这 2 个基因簇的缺失并不影响 EPSs 的合成、生物膜的形成、菌落形态及运动性。这可能是这 2 个基因簇在当前测试条件下受到抑制或需要特殊的环境因子诱导表达,对溶藻弧菌 EPSs 合成调控机制的研究,能更好地了解该病原菌在环境中的适应性。

关键词: 溶藻弧菌; 生物信息学; 基因簇; 胞外多糖; 生物膜; 菌落形态

中图分类号: Q754

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.003

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一类广泛分布在河口、近岸及海水环境中的革兰氏阴性菌^[1],它是一种机会致病菌,常引起贝类、甲壳类和鱼类等水产品致病,给水产养殖业带来巨大的经济损失^[2]。此外,溶藻弧菌也是一种重要的食源性病原菌,能感染人类引起严重的胃肠炎、伤口感染和败血症等临床症状^[3]。生物膜(Biofilm)为细菌的生长繁殖提供良好的微环境,抵抗外界环境的胁迫,并保护细菌免受宿主免疫系统的攻击^[4-5]。生物膜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^[6]。胞外多糖(Extracellular polysaccharides, EPSs)是生物膜基质的主要组成成分之一,包括脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)及分泌到胞外的粘液(Slime)等^[7-9]。这些多糖对生物膜形成主要起以下作用:1)协助细菌粘附到固体表面;2)通过增强细胞之间作用形成复杂生物膜结构;3)通过降低细胞之间作用而分解生物膜^[10]。与这些多糖合成相关的基因通常散布在基因组中并聚合成簇^[11-12]。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,根据基因组成及多糖化学结构的不同,可将多糖分为常见的四大类:1)一型多糖合成的寡糖链重复单元通过 Wzx/Wzy-依赖的内膜转运系统合成 K-抗原,并通过 Wza/Wzc-依赖的外膜转运系统运输到细胞膜外表面,形成高分子量的荚膜多糖或荚膜异多糖(Colanic acid, CA);2)二型多糖和三型多糖具有相同的内膜转运系统 ABC-2 和外膜转运系统 KpsD/KpsE,合成的多糖包括聚唾液酸(Polysialic acid, PSA)和 K54 多糖等;3)四型多糖与一型多糖具有相同的内膜转运系统,合成的 O-抗原或 K-抗原连接到脂多糖的脂质 A-核心寡糖上,而形成与脂多糖或 K-抗原多糖(KLPS)^[13-16]。在自然环境下,细菌常发生菌落相变(Conoly phase variation)现象,即菌落形态

收稿日期: 2017-03-20

修回日期: 2017-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272697); 中国科学院战略试点技术专项基金项目(XDA13020302)

作者简介: 黄晓纯(1991-),女,中国科学院大学 2014 级硕士研究生. E-mail: swjshxc@163.com

通信作者: 陈偿(1976-),男,博士,研究员. E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

在粗糙 (Rugose ,R) /浑浊 (Opaque ,Op) 和光滑 (Smooth ,S) /透明 (Transparent ,T) 或半透明 (Translucent ,Tr) 之间互相转变^[17]。菌落相变与胞外多糖的合成密切相关^[17-20]。创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 菌落形态受荚膜多糖合成基因簇调控^[17] ,其荚膜多糖合成基因簇与大肠杆菌荚膜多糖合成基因簇同源^[21] ,并且基因簇中 *wza-wzb-wzc* 基因区域的缺失会导致荚膜多糖合成下降 ,引起细菌形态发生由 Op 到 Tr 不可逆的转变^[18]。在副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 存在 *cpsA-K* 基因簇与荚膜多糖合成有关的现象 ,在自然情况下 ,其关键激活因子 OpaR 发生自发突变 ,从而导致该基因簇表达受到抑制 ,引起菌落形态由 Op 变为 Tr 表型^[22-23]。同样 ,在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中 *vps* 基因簇合成的弧菌多糖 VPS^[20,24-26] 和 *cps* 基因簇合成的荚膜多糖 CPS^[19] 影响菌落形态和生物膜形成。此外 ,弧菌属细菌如霍乱弧菌 O1 ,O39 和溶藻弧菌 ATCC 17749 菌株在饥饿胁迫条件下分泌的粘液也参与了菌落相变和生物膜形成过程^[8-9]。

目前对溶藻弧菌胞外多糖合成机制的研究甚少。前期研究发现 ,在 LB 培养平板上 ,溶藻弧菌 ZJ-51 存在 2 种不同的菌落形态 ,一种是光滑透明型 (Tr) ,另一种为粗糙浑浊型 (Op) ,所对应的菌株分别命名为 ZJ-T ,ZJ-O。ZJ-T 和 ZJ-O 的生物膜形成能力及运动性存在很大差异^[27]。全基因组序列分析发现 ,溶藻弧菌 ZJ-51 至少存在 4 个可能与胞外多糖合成有关的基因簇 ,且分布于基因组的不同区域 ,然而这些基因簇与溶藻弧菌胞外多糖合成和相关表型的关系并不清楚。笔者对其中 2 个基因簇进行缺失突变 ,并比较了野生菌株与缺失菌株在菌落形态、生物膜形成和运动性等方面的差异 ,探讨这些基因簇可能的功能与表达机制 ,为水产养殖中弧菌病的防治提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 菌株 溶藻弧菌 ZJ-51 野生株: ZJ-T ,ZJ-O; CPS1357 基因簇缺失突变株: CPS1357-T ,CPS1357-O; CPS4543 基因簇缺失突变株: CPS4543-T ,CPS4543-O; 大肠杆菌: GEB802 ,GEB883 (表 1)。

表 1 实验所用菌株及质粒

Tab. 1 Bacterial strains and their plasmids used for test

菌株和质粒	基因型和表型	菌株来源
溶藻弧菌 ZJ-T	<i>Ap^r</i> 野生株 ,分离自患病石斑鱼 ,光滑透明型表型株 (Tr)	Change et al. ^[27]
ZJ-O	<i>Ap^r</i> 野生株 ,分离自患病石斑鱼 ,粗糙浑浊型表型株 (Op)	Change et al. ^[27]
ΔCPS1357-T	<i>Ap^r</i> ,CPS1357 基因簇 (<i>orf1357-orf1372</i>) Tr 表型框内缺失株	本研究
ΔCPS1357-O	<i>Ap^r</i> ,CPS1357 基因簇 (<i>orf1357-orf1372</i>) Op 表型框内缺失株	本研究
ΔCPS4543-T	<i>Ap^r</i> ,CPS4543 基因簇 (<i>orf4543-orf4545</i>) Tr 表型框内缺失株	本研究
ΔCPS4543-O	<i>Ap^r</i> ,CPS4543 基因簇 (<i>orf4543-orf4545</i>) Op 表型框内缺失株	本研究
大肠杆菌		
GEB802	LacI ^Q , thi1 , supE44 , endA1 , recA1 , hsdR17 , gyrA462 , ze1298::tn10 [Tc] , ΔthyA:: (erm-pir116) , Thy ⁻	Frederique le Roux
GEB883	WT E. coli k12 , ΔdapA::erm pir RP4-2 , ΔrecA , gyrA462 , ze1298::tn10 , DAP ⁻	Annick Lab
质粒		
pSW7848	T7 , oriT RP4 , araC , oriV R6K , cat ^r , Cm ^r	Annick Lab
pSW7848-CPS1357	Cm ^r 插入框内缺失 CPS1357 基因簇 (<i>orf1357-orf1372</i>) 片段的 pSW7848	本研究
pSW7848-CPS4543	Cm ^r 插入框内缺失 CPS4543 基因簇 (<i>orf4543-orf4545</i>) 片段的 pSW7848	本研究

1.2 主要试剂及培养基 分子实验用试剂: 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; 基因片段连接用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。细菌培养用试剂: 培养基 LB 购自 Invitrogen 公司; TSB、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 μg · mL⁻¹ 和 20 μg · mL⁻¹。表型分析用试剂及耗材: 结晶

紫购自广州威佳生物科技有限公司; 单宁酸媒染剂、品红试剂、亚甲基蓝染剂、硫酸铝钾均购自 sigma 公司; Casamino acids 购自广州环凯微生物科技有限公司; 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 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 70 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, FeSO_4 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 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 生物信息学分析 通过 NCBI 的 GenBank 对溶藻弧菌 ZJ-51 中 2 个基因簇 CPS1357 和 CPS4543 的碱基序列和氨基酸序列进行 Blast 分析, 并根据基因结构和排列绘制基因簇图谱。采用 MEGA6.0 软件对不同物种中的保守基因 *RecA* 进行碱基序列比对, 并通过最大似然法(Maximum Likelihood, ML) 算法和 Kimura 2-parameter 模型进行系统发育进化树构建。

1.4 溶藻弧菌 ZJ-51 CPS1357 及 CPS4543 基因簇缺失突变株的构建 溶藻弧菌 ZJ-51 基因簇突变株构建过程: 采用在线引物设计软件 NEBuilder (<http://nebuilder.neb.com/>) 设计基因簇 CPS1357 及 CPS4543 上下游片段和质粒 pSW7848 线性化片段扩增引物, 引物对见表 2。重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 GEB883 中, 并与溶藻弧菌野生株 ZJ-T 和 ZJ-O 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 LB 平板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, 最后挑选克隆若干进行 PCR 检测, 筛选出成功突变的菌株 Δ CPS1357-T 与 Δ CPS1357-O, Δ CPS4543-T 与 Δ CPS4543-O。

表 2 PCR 引物

Tab. 2 Primers used for PCR

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	GTCTGATTGCGTTACCAA ¹ TTATGACAAC	GAATTCGATATCAAGCTT ATCGATACT
Delete-Check-pSW7848	TCACTGTCCTTATTTCGCACC	CTGCTTTTGAGCACTACCCG
CPS1357-up	AAGCTTGATATCGAATTC GAAAGCGGCATTGCTACAC	GAAATCAACGAAGTCCA ² CGAATAAGAATGAGTC
CPS1357-down	TGGACTTCGTTGATTT CTGCTGAATCGAC	TTGGTAACGAATCAGAC TGAGAATCAGTCTCTTCTCAAATTC
CPS4543-up	ATAAGCTTGATATCGAATTC ACCTGCGCATTTACAAC	TGAAGCGAGGATCGTTAGCT CTCGGTGATC
CPS4543-down	AGCTAACGATCCTCGCTT CAAGAGCTTTG	TAATTGGTAACGAATCAGAC GATGTGGAATGCTCTGCTC
Δ CPS1357	GCGCTTCGCTATAGCTCAGT	CTGAGCCAAACCACTTCGAC
Δ CPS4543	GAATAGAGCTGGCGGACTGG	CAGAGTTGTTCTGCAAGCG

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

Notes: 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

1.5 生物膜形成实验 挑取单个克隆溶藻弧菌野生株 ZJ-T 与 ZJ-O, CPS1357 基因簇缺失突变株 Δ CPS1357-T 与 Δ CPS1357-O, CPS4543 基因簇缺失突变株 Δ CPS4543-T 与 Δ CPS4543-O 分别接种于 TSB 液体培养基中, 30 °C 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养过夜。调整培养液浓度至相同吸光度($OD_{600} = 1.00$), 取 10 μL 接种于 1 mL BFM 培养基中, 30 °C 静置培养, 间隔 2 h 取样测定生物膜生成量 OD_{562} 。结晶紫染色法操作参考文献 [27]。

1.6 胞外多糖染色实验 挑取单个克隆溶藻弧菌野生株 ZJ-T 与 ZJ-O, CPS1357 基因簇缺失突变株 Δ CPS1357-T 与 Δ CPS1357-O, CPS4543 基因簇缺失突变株 Δ CPS4543-T 与 Δ CPS4543-O 分别接种于 TSB 液体培养基中, 30 °C 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养 12 h, 采用单宁酸媒染法对溶藻弧菌胞外多糖进行染色。单宁酸媒染法参考文献 [28]。用 100 倍油镜观察细菌染色情况。

1.7 菌落形态分析实验 挑取单个克隆溶藻弧菌野生株 ZJ-T 与 ZJ-O, CPS1357 基因簇缺失突变株 Δ CPS1357-T 与 Δ CPS1357-O, CPS4543 基因簇缺失突变株 Δ CPS4543-T 与 Δ CPS4543-O 分别接种于 TSB 液体培养基中, 30 °C 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养过夜。倍比稀释菌液至合适的浓度, 取 100 μL 涂布于 2216E 平板上, 30 °C 静置培养 16 h, 在 50 倍倒置显微镜下观察单克隆的菌落形态。

1.8 运动性测定 挑取单个克隆溶藻弧菌野生株 ZJ-T 与 ZJ-O ,CPS1357 基因簇缺失突变株 ΔCPS1357-T 与 ΔCPS1357-O ,CPS4543 基因簇缺失突变株 ΔCPS4543-T 与 ΔCPS4543-O 分别接种于 TSB 液体培养基中 , 30 °C 200 r · min⁻¹ 摇床中振荡培养过夜。调整培养液浓度至相同吸光度(*OD*₆₀₀ = 1.00) ,取 5 μl 平行 3 次分别点样于 0.3% 软琼脂和 1.5% 琼脂 LBS 平板上 ,30 °C 静置培养 16 ~ 24 h ,观察细菌运动情况。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析及功能预测 通过 Blast 和 PSI-Blast 在线比对工具分别对 CPS1357 和 CPS4543 两个基因簇碱基序列(图 1 - A 和 1 - B) 以及各个基因功能域氨基酸序列进行比对分析(表 3) 。以保守基因 *RecA* 作为标记基因 ,采用 MAGE6.0 软件对细菌不同物种(或亚种) 之间进行序列比对 ,并作系统发育进化树分析(图 1 - C) [29] 。CPS1357 基因簇包含 17 个基因 ,除了 *orf1357* 外 ,其他基因的方向一致; 在弧菌

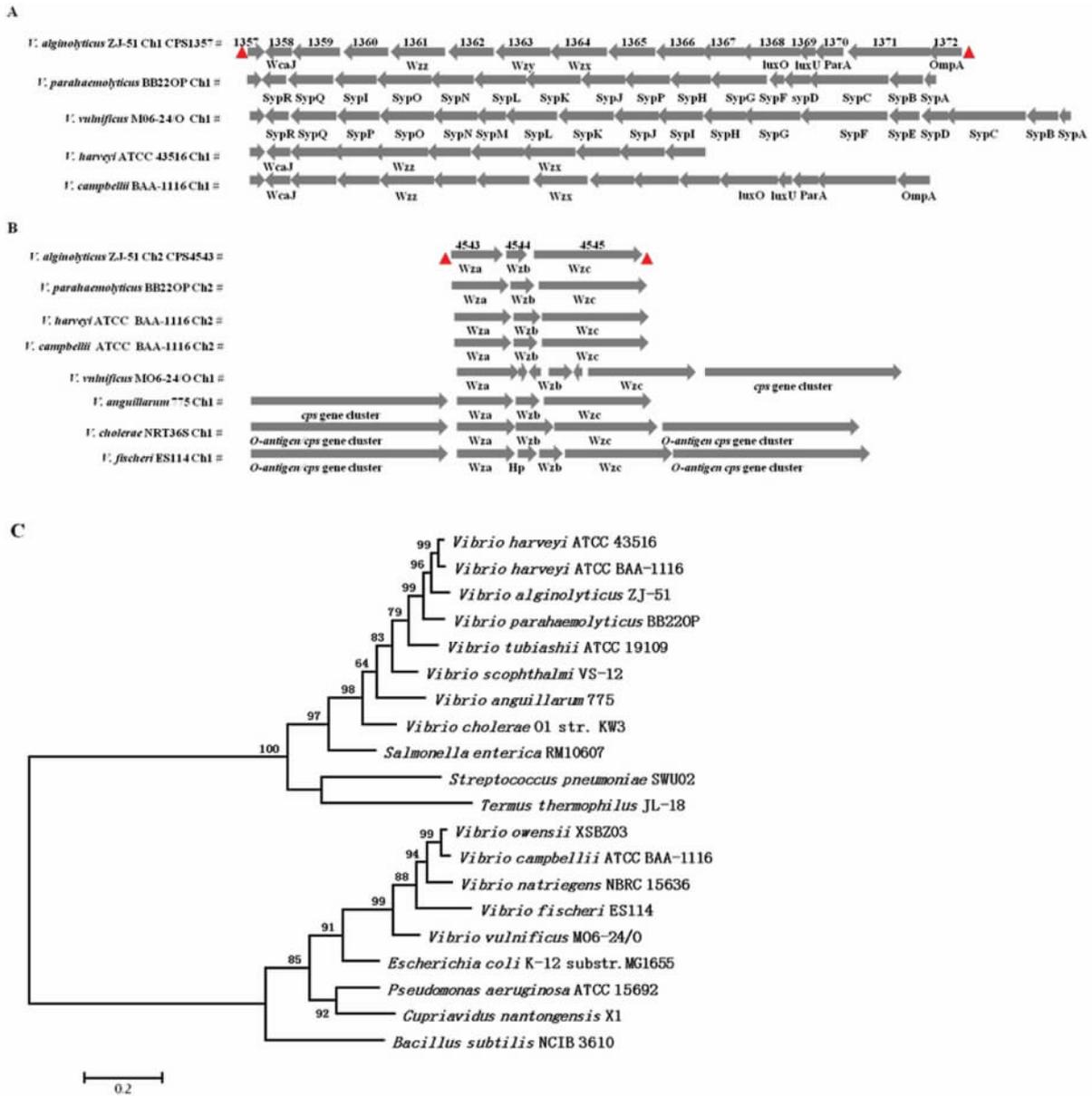


图 1 *V. alginolyticus* ZJ-51 基因组中 CPS1357 和 CPS4543 两个基因簇碱基序列及系统发育进化树

A: CPS1357 基因簇图谱分析(红色标记为缺失突变的始末位置) ; B: CPS4543 基因簇图谱分析(红色标记为缺失突变的始末位置) ; C: 不同物种间系统发育进化树分析

Fig. 1 The base sequences of two gene clusters of the genome of the strain *V. alginolyticus* ZJ-51 , and phylogenetic tree of the strain. A: The map of gene cluster CPS1357. B: The map of gene cluster CPS4543; C: The phylogenetic tree of different bacterial species.

表 3 溶藻弧菌 ZJ-51CPS1357 和 CPS4543 基因簇中各基因编码蛋白的生物学功能预测

Tab. 3 The biofunctional prediction of proteins encoded withCPS1357 and CPS4543 gene clusters in *V. alginolyticus* ZJ-51

基因名称 Gene	碱基序列/bp Base sequence	基因方向 Gene direction	氨基酸序列/aa Sequence of amino acids	同源蛋白 Homologous protein	蛋白名称 Protein	功能域 Functional area	相似性/% Similarity	蛋白编号 Protein code
CPS1357 基因簇								
<i>orf1357</i>	390	: +	130	shikimate kinase [V. alginolyticus]		AAA domain	100	WP_065274513.1
<i>orf1358</i>	639	: -	213	UDP-N-acetylgalactosamine-undecaprenyl-phosphate N-acetylgalactosaminephosphotransferase [Vibrio aerogenes CECT 7868]	WcaJ	Bac_transf	65	SHI21408.1
<i>orf1359</i>	1191	: -	397	glycosyl transferase [V. alginolyticus]		CESA_like_1	100	WP_065274514.1
<i>orf1360</i>	1119	: -	373	glycosyl transferase [V. alginolyticus]		GT1_WbnK_like	100	WP_065274515.1
<i>orf1361</i>	1374	: -	458	chain-length determining protein [V. alginolyticus]	Wzz	pepcterm ChnLen	99	WP_017820653
<i>orf1362</i>	1125	: -	375	glycosyl transferase [V. alginolyticus]		GT1_like_1	100	WP_065274517.1
<i>orf1363</i>	1365	: -	455	membrane protein [V. alginolyticus]	Wzy	Wzy_C superfamily	99	WP_064376587.1
<i>orf1364</i>	1431	: -	477	lipopolysaccharide biosynthesis protein [V. alginolyticus]	Wzx	MATE_like superfamily	99	WP_042522930.1
<i>orf1365</i>	1173	: -	391	glycosyl transferase [V. alginolyticus]		RfaB	100	WP_042522932.1
<i>orf1366</i>	1185	: -	395	glycosyl transferase [V. alginolyticus]		GT1_WabH_like	100	WP_065274519.1
<i>orf1367</i>	1071	: -	357	glycosyl transferase family 1 [V. alginolyticus]		Glycosyltransferase_GTB_type superfamily	100	WP_065274520.1
<i>orf1368</i>	1464	: -	488	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator [V. alginolyticus]	LuxO	P-loop_NT-Pase superfamily	100	WP_065274521.1
<i>orf1369</i>	381	: -	127	phosphorelay protein LuxU [V. alginolyticus]	LuxU	HPT superfamily	100	WP_065274522.1
<i>orf1370</i>	687	: -	229	chromosome partitioning ATPase [Vibrio]	ParA	P-loop_NT-Pase superfamily	100	WP_005377635.1
<i>orf1371</i>	2103	: -	701	sugar ABC transporter substrate-binding protein [V. alginolyticus]			100	WP_065274523.1
<i>orf1372</i>	819	: -	273	membrane protein [V. alginolyticus]	OmpA	OmpA_C-like	100	WP_042522939.1
CPS4543 基因簇								
<i>orf4543</i>	1017	: +	339	polysaccharide export protein Wza [V. alginolyticus]	Wza	Poly_export superfamily	100	WP_005384599.1
<i>orf4544</i>	375	: +	125	phosphotyrosine protein phosphatase [V. alginolyticus]	Wzb	LMWPC superfamily	100	WP_031780905.1
<i>orf4545</i>	2169	: +	723	tyrosine protein kinase [Vibrio Harvey group]	Wzc	Wzz superfamily/GNVR superfamily/P-loop_NT-Pase superfamily	100	WP_005374875.1

属的不同种之间,该基因簇的基因排列和结构均较保守,其核苷酸序列与副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus* BB22OP)和哈氏弧菌(*Vibrio harveyi* ATCC 43516)碱基序列相似性分别为74%和70%。而基因簇CPS4543仅包含3个基因,分别编码多糖转运蛋白复合体Wza-Wzb-Wzc,所有基因的转录方向一致。在弧菌中基因排列和结构也相对保守,其中与副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus* BB22OP)和哈氏弧菌(*V. harveyi* ATCC BAA-4116)的碱基序列相似性均达70%。有意思的是,CPS4543基因簇位于溶藻弧菌第II号染色体上,且上下游并没有其他多糖合成相关基因,在副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus* BB22OP)、哈氏弧菌(*V. harveyi* ATCC BAA-4116)和坎氏弧菌(*Vibrio campbellii* ATCC BAA-4116)中也存在类似的情况,但在其他弧菌中,这3个基因都位于I号染色体上,而且和一些多糖合成相关基因组成一个大的多糖合成基因簇(图1-B)。从系统发育进化树上看(图1-C),在弧菌属中,溶藻弧菌与哈氏弧菌(*V. harveyi* ATCC 43516和*V. harveyi* ATCC BAA-4116)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus* BB22OP)亲缘关系最近,鳗弧菌(*Vibrio anguillarum* 775)和霍乱弧菌(*V. cholerae* O1 str. KW3)次之,而与坎氏弧菌(*V. campbellii* ATCC BAA-4116)、创伤弧菌(*V. vulnificus* MO6-24/O)和费氏弧菌(*Vibrio fischeri* ES114)亲缘关系最远,处于进化树的不同分支。对于不同属的细菌,如大肠杆菌(*E. coli* K-12 substr. MG1655)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* NCIB 3610)等,与溶藻弧菌处在进化树的不同分支,亲缘关系远;而肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* RM10607)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae* SWU02)和极端嗜热菌(*Thermus thermophilus* JL-18)与溶藻弧菌亲缘关系相对来说较近。

在同源性分析基础上,笔者对CPS1357编码蛋白的生物学功能进行预测,结果显示这些蛋白可能参与胞外多糖合成的2个过程:1)寡糖链重复单元的合成。*orf1358*编码WcaJ同源蛋白,负责将第1个单糖分子(UDP-葡萄糖)转移到脂质载体Und-P上,参与一型多糖的合成^[30]。*orf1359*,*orf1360*,*orf1362*,*orf1365*,*orf1366*,*orf1367*等6个基因均编码糖基转移酶,催化核苷糖分子陆续加到Und-PP-sugar中间产物上,合成糖重复单元^[31]。2)多糖链的合成和转运。*orf1363*编码蛋白功能域与Wzy聚合酶(蛋白编号为WP_064376587.1)C-端功能域同源(相似性达99%)*orf1364*编码蛋白功能域与Wzx翻转酶(蛋白编号为WP_042522930.1)功能域同源(相似性达99%)*orf1361*编码蛋白的N-端(第1~86个氨基酸)与Wzz跨膜调控蛋白(蛋白编号为WP_017820653)功能域同源(相似性达99%)。在多糖链合成过程中,Wzx翻转酶负责将合成的糖重复单元从细胞膜的胞质面翻转到外周质空间,然后在聚合酶Wzy和链调控蛋白Wzz的作用下聚合成糖长链O-抗原或K-抗原^[32]。*orf1371*编码ABC-运蛋白,可实现多糖链跨越内膜的转位^[33]。通常,依赖Wzy-转运系统合成的多糖为一型和四型多糖,而依赖ABC-转运系统合成的多糖为二型和三型多糖^[13]。除此之外,*orf1368*和*orf1369*分别编码LuxO和LuxU,它们是细菌密度感应(Quorum Sensing)系统中信号传导的关键蛋白^[34-35]。

CPS4543编码蛋白则可能参与胞外多糖的转运过程:*orf4543*编码蛋白功能域与Wza蛋白(蛋白编号为WP_005384599.1)功能域同源(相似性达100%),形成环状的膜蛋白,负责将大分子多糖从细胞周质空间转运到细胞外,在转运过程中多糖链进一步聚合^[36]。而*orf4544*和*orf4545*编码蛋白功能域分别与Wzb蛋白(蛋白编号为WP_031780905.1)和Wzc蛋白(蛋白编号为WP_005374875.1)功能域同源,构成磷酸化系统,并与Wza一起形成多糖转膜复合物,负责一型和四型多糖的转运^[37]。

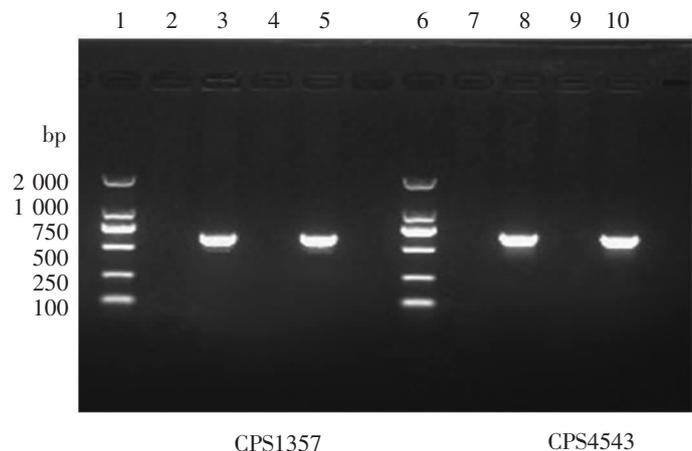


图2 基因簇突变株 ΔCPS1357-T/O 及 ΔCPS4543-T/O PCR 条带检测琼脂糖凝胶电泳图谱

点样孔 1,6 为 Marker DL2000;点样孔 2~5 分别对应样品基因组 ZJ-T,ΔCPS1357-T,ZJ-O,ΔCPS1357-O;点样孔 7~10 分别对应样品基因组 ZJ-T,ΔCPS4543-T,ZJ-O,ΔCPS4543-O

Fig. 2 Agarose gel eletrophoresis of the PCR products of gene cluster mutants ΔCPS1357-T/O and ΔCPS4543-T/O

Lines 1,6: Marker DL2000; Lines 2-5: ZJ-T, ΔCPS1357-T, ZJ-O, ΔCPS1357-O, respectively; Lines 7-10: ZJ-T,ΔCPS4543-T, ZJ-O, ΔCPS4543-O, respectively.

2.2 基因簇 CPS1357 及 CPS4543 缺失突变株的构建 通过特异性引物设计、重组载体构建以及细菌接合和筛选, 笔者成功构建 Tr 和 Op 表型的基因簇突变株: Δ CPS1357-T/O 及 Δ CPS4543-T/O。在基因簇序列的两侧分别设计引物 Δ CPS1357-F/R 及 Δ CPS4543-F/R, 突变株 PCR 条带检测结果见图 2: 引物对 Δ CPS1357-F/R 对 Δ CPS1357-T/O 进行检测, 扩增条带为 616 bp; 引物对 Δ CPS4543-F/R 对 Δ CPS4543-T/O 进行检测, 扩增条带为 654 bp; ZJ-T/O 均未扩增出相应条带。琼脂糖凝胶电泳结果表明 2 个基因簇缺失突变株已成功构建。

2.3 生物膜形成能力分析 胞外多糖是细菌生物膜的主要成分之一, 多糖合成水平影响生物膜形成能力^[10]。笔者对基因簇突变株 Δ CPS1357-T/O 及 Δ CPS4543-T/O 的生物膜形成能力进行测定, 结果见图 3。在 Tr 表型中, ZJ-T 在第 6 小时生物膜形成量达到最大值。 Δ CPS1357-T 生物膜曲线与 ZJ-T 基本重合, Δ CPS4543-T 生物膜形成最大值往后延 2 h, 但除了第 6 小时外, 其他时间点生物膜形成量与 ZJ-T 并无差异。在 Op 表型中, ZJ-O 在第 10 小时生物膜形成量达到最大值。 Δ CPS1357-O 生物膜曲线在前 12 h 与 ZJ-O 基本重合, 而在第 24 小时生物膜形成量比 ZJ-O 略高。 Δ CPS4543-O 在前 10 h 生物膜形成量比 ZJ-O 稍低, 但在后期生物膜形成比 ZJ-O 稍高。但总体来看, CPS1357 和 CPS4543 的缺失突变并不影响溶藻弧菌 ZJ-51 的生物膜形成能力。

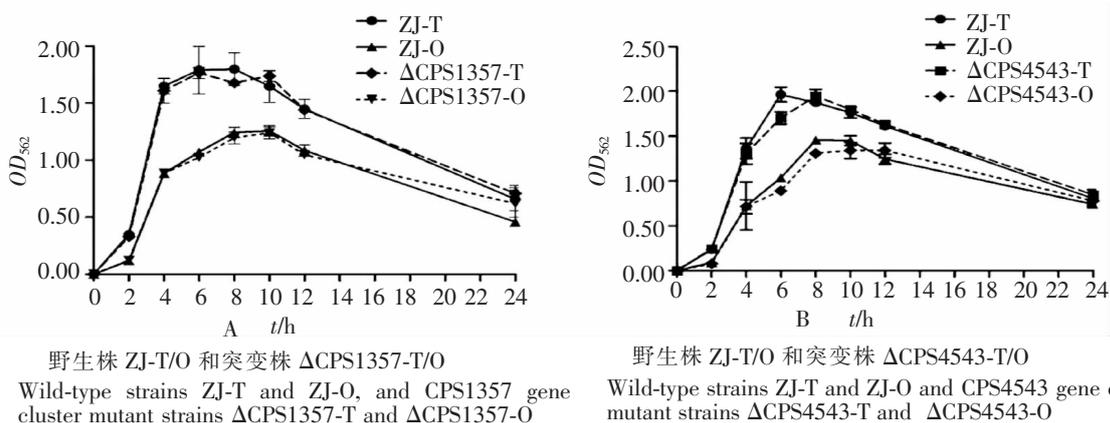


图 3 溶藻弧菌 ZJ-51 在 BFM 培养基条件下生物膜形成曲线测定
Fig. 3 The growth of biofilm formation of *V. alginolyticus* ZJ-51 when incubated in BFM

2.4 胞外多糖合成分析 细菌胞外多糖多为酸性多糖, 可通过单宁酸媒染剂染色, 胞外多糖包裹的菌体可染成紫色, 缺乏胞外多糖包裹的菌体则染成红色^[12]。笔者观察了在 BFM 和 TSB 培养基条件下 CPS1357 和 CPS4543 基因簇的缺失对胞外多糖合成的影响。图 4 表明, 在 2 种培养基条件下基因簇突变株 Δ CPS1357-T/O 及 Δ CPS4543-T/O 与野生株 ZJ-T/ZJ-O 均被染成紫色, 可见, 在这 2 种培养基条件下, 这 2 个基因簇的缺失并不影响溶藻弧菌 ZJ-51 胞外多糖的合成。

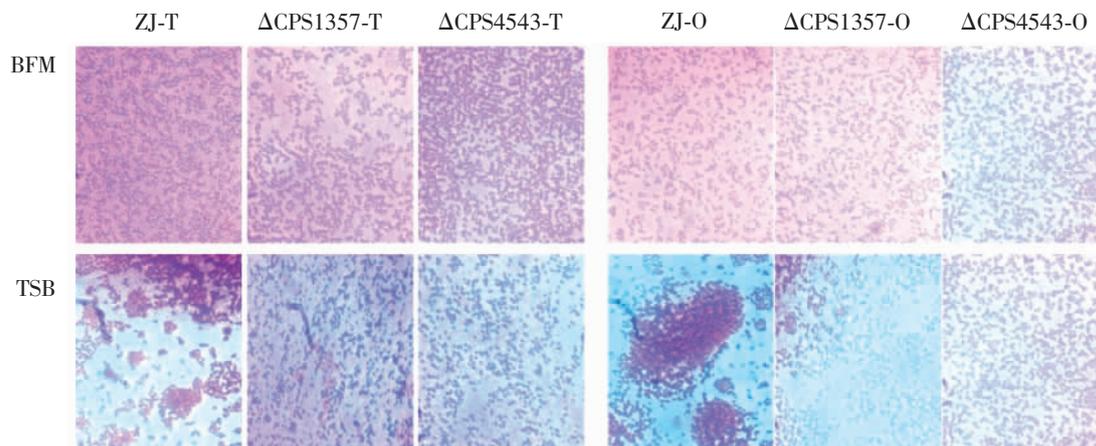


图 4 溶藻弧菌 ZJ-51 经单宁酸媒染剂染色后 100 倍油镜视野下的观察结果
Fig. 4 Light microscopic observation of mordant-stained cell colonies of *V. alginolyticus* ZJ-51. Magnified by 100

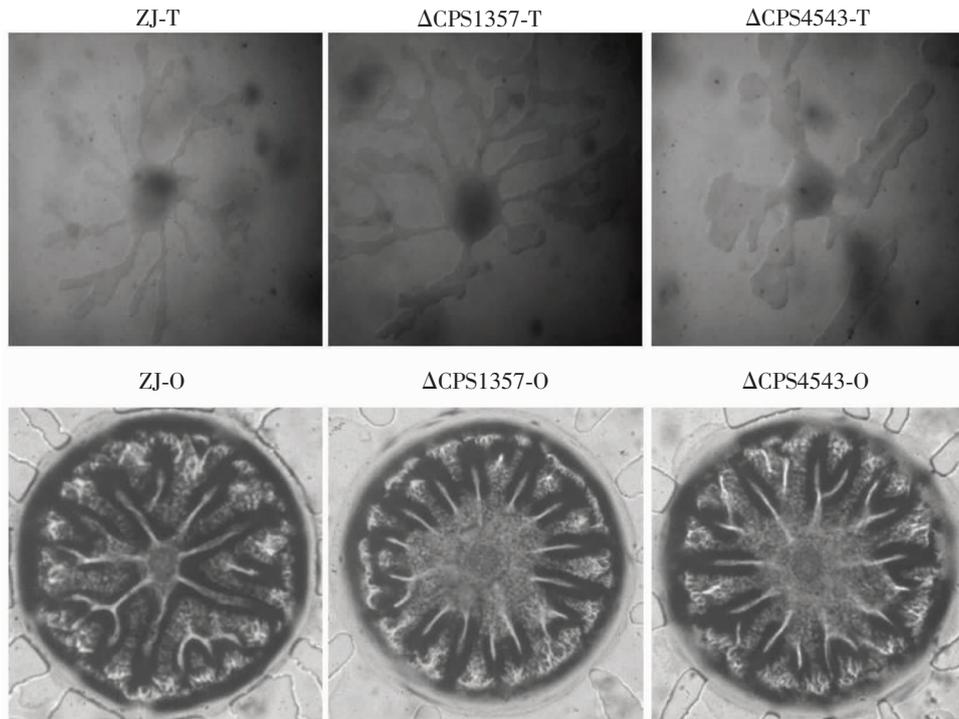


图 5 溶藻弧菌 ZJ-51 在 2216E 平板上菌落形态的观察结果
 Fig. 5 Morphological observation of colonies of *V. alginolyticus* ZJ-51 on 2216E plates

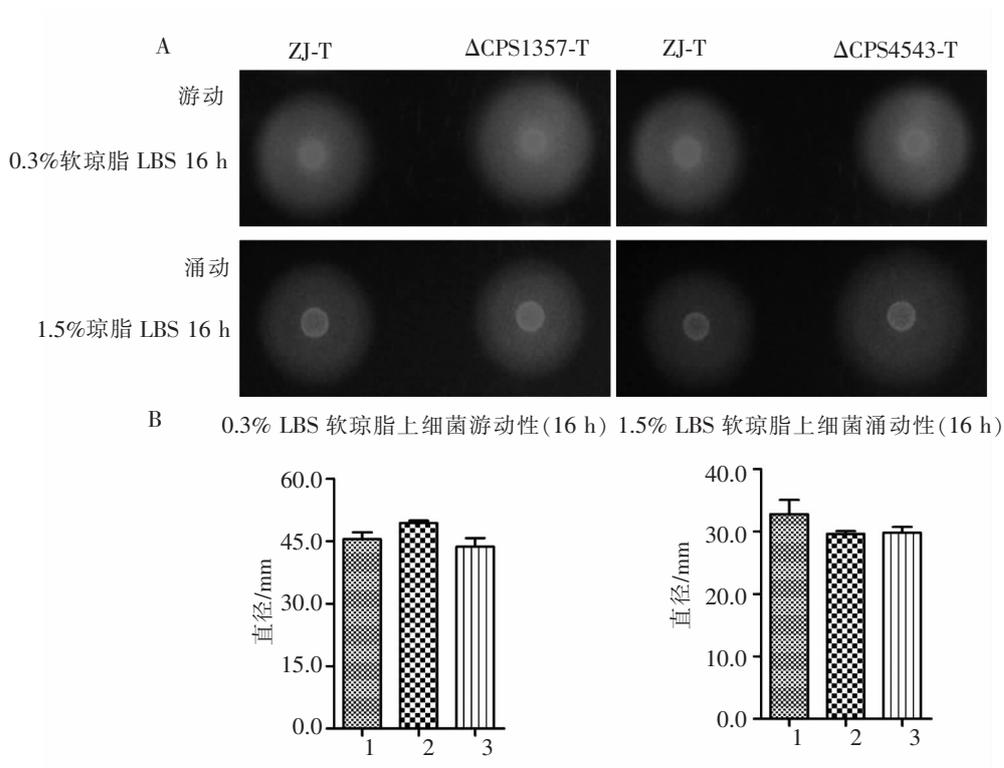


图 6 溶藻弧菌 ZJ-51T 表型菌株在 0.3% 软琼脂和 1.5% 琼脂 LBS 平板上的运动情况分析
 A: 平板上的观察结果; B: 统计分析。1: ZJ-T; 2: ΔCPS1357-T; 3: ΔCPS4543-T
 Fig. 6 The mobility of phenotypes of *V. alginolyticus* ZJ-51 on the plates of 0.3% soft agar and 1.5% agar LBS
 A; Observation of the mobility on the plates; B; Statistical analysis. 1: ZJ-T; 2: ΔCPS1357-T; 3: ΔCPS4543-T

2.5 菌落形态分析 在 2216E 培养基条件下,对野生株 ZJ-T/O 和基因簇突变株 Δ CPS1357-T/O 及 Δ CPS4543-T/O 的菌落形态进行分析,实验结果如图 5 所示。在 2216E 固体培养基上,野生株与突变株菌落形态并无差异,Tr 表型菌株均呈现不规则、光滑半透明型,而 Op 表型菌株均呈现粗糙浑浊型。这表明,CPS1357 和 CPS4543 基因簇的缺失并不影响溶藻弧菌 ZJ-51 在 2216E 固体培养基条件下的菌落形态。

2.6 运动性分析 在 0.3% 软琼脂及 1.5% 琼脂 LBS 平板上,Tr 表型菌株的运动情况见图 6。经统计分析,基因簇缺失突变株 Δ CPS1357-T、 Δ CPS4543-T 在 0.3% 软琼脂 LBS 平板上的游动能力与在 1.5% 琼脂 LBS 平板上的涌动能力和野生株 ZJ-T 之间并无明显的差异。这表明,溶藻弧菌 ZJ-51 中基因簇 CPS1357 和 CPS4543 的缺失并不影响细菌的运动性。

3 讨论

弧菌存在多种类型的多糖,其负责合成的基因位点具有十分复杂的多样性,如创伤弧菌中 *wza-wzb-wzc* 基因簇负责荚膜多糖合成和转运^[18],副溶血弧菌荚膜多糖合成基因簇与 *cpsA-K* 基因簇有关^[22],霍乱弧菌中也存在 2 个基因簇 *ups* (*ups I* 和 *ups II*) 和 *cps* 分别合成弧菌多糖 VPS^[20,24-26] 和荚膜多糖 CPS^[19]。

在革兰氏阴性细菌中,*Wza*、*Wzb* 和 *Wzc* 参与胞外多糖的合成和转运^[13]。*Wza* 是一个环状结构的外膜蛋白,负责将高分子量的荚膜多糖转运到膜外^[36]。*Wzb* 是酪氨酸磷酸激酶,属于多糖共聚酶 2a (PCP-2a) 亚家族中的一员^[38],而 *Wzc* 是对应的酪氨酸磷酸化酶,这 2 个蛋白构成 1 个完整的磷酸化系统,调控荚膜多糖的合成^[37]。大多数大肠杆菌及某些已报道的弧菌如创伤弧菌 MO6-24/O 和费氏弧菌中,*wza-wzb-wzc* 常位于多糖合成基因簇的上游区域^[17],仅有极少数情况下单独位于合成操纵子区域之外^[37,39]。笔者发现 *wza-wzb-wzc* 在弧菌基因组中存在 2 种截然不同的分布模式,一种模式是以溶藻弧菌、哈氏弧菌、副溶血弧菌、坎氏弧菌为代表,这 3 个基因单独位于 II 号染色体上,且临近区域无其他胞外多糖合成基因;而在其他弧菌中,它们位于 I 号染色体上,且和其他多糖合成基因连在一起形成 1 个大的多糖合成基因簇。有意思的是,从系统发育进化树分析看,溶藻弧菌、哈氏弧菌和副溶血弧菌在进化上亲缘关系很近,并形成 1 个称之为哈氏进化分支 (Harveyi clade) 的单独分支,因此 *wza-wzb-wzc* 在哈氏弧菌进化群中的特殊分布模式可能与这个类群特有的生物学特性有关,并且暗示它们的功能和表达调控方式可能与其他弧菌也有很大差别。已有研究表明,创伤弧菌和鳃弧菌的 *wza-wzb-wzc* 是细菌荚膜多糖合成的关键基因,缺失其中任何一个均能导致这 2 种细菌的荚膜多糖丧失,并引起菌落形态和生物膜等相关表型的变化^[18,40]。然而,溶藻弧菌 CPS4543 基因簇的突变并不影响胞外多糖的合成,其他相关的表型也无明显变化,笔者推测溶藻弧菌 ZJ-51 中 *wza-wzb-wzc* 的表达可能需要特定环境因子诱导。Carole 等曾经发现大肠杆菌 K-12 基因组中存在 1 个与 *wza-wzb-wzc* 同源的基因簇 *yccZ-etp-etk*,该基因簇单独存在并位于染色体第 22 min 区域位置,基因簇 *yccZ-etp-etk* 的缺失并不影响荚膜异多糖的合成,且其表达调控机制不同于 *wza-wzb-wzc*,只有在感染条件下才开启表达^[37,41]。

CPS1357 基因簇中有 7 个基因编码糖基转移酶,在多糖合成中它们负责寡糖链的合成,由于不同的酶底物特性不同,因此,它们的组合也决定了多糖的化学结构特异性。在这些糖基转移酶中,orf1358 编码 *WcaJ* 同源蛋白,负责将第 1 个单糖分子转移到脂质载体 Und-P 上,启动糖重复单元的合成,因此,在所有多糖合成路径中都起关键作用,缺失该基因在大肠杆菌和新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 中影响了荚膜异多糖的合成^[30]。除糖基转移酶外,该基因簇中还编码 2 种不同的糖链转运系统。第 1 种转移系统以 *Wzx/Wzy* 为代表,这 2 个蛋白与一型、四型多糖 K-抗原和脂多糖 O-抗原的合成有关。在 K-或 O-抗原合成过程中,由单糖聚合而成的重复单元通过 *Wzx* 从细胞质膜内表面翻转到外表面,并在 *Wzy* 作用下聚成长链 K-或 O-抗原,最后通过连接酶 *WaaL* 将 K-或 O-抗原连接到脂质 A 上,形成 K_{LPS} 或 $LPS^{[13,32,41]}$,*Wzx/Wzy* 组成的糖链运输体系也是一型多糖合成途径中的典型结构,因此,它们的缺失也往往导致多糖合成终止^[32]。在不同细菌中 *wzx* 和 *wzy* 一般成对出现,但是它们编码的氨基酸序列同源性很低(通常低于 50%)^[32]。在 CPS1357 基因簇中,还有 1 个编码糖链长度调控蛋白 *Wzz*,这个蛋白在 N-端和 C-端均含有跨膜区域^[42],与 *Wzy* 形成复合物参与一型、四型多糖链的转运与聚合^[43]。同时,该基因簇还编码 1 个 ABC-转运蛋白,它主要负责 *Wzy*-非依赖型的二型和三型多糖的合成^[33]。

但缺失 CPS1357 基因簇并不影响胞外多糖的合成和相关表型的变化。这可能是因为在基因组中存在这个系统的冗余拷贝,事实上在另外 1 个多糖合成基因簇上也发现 *wzx/wzy* 以及 *wcaJ* 的同源基因,尽管它们的氨基酸序列相似性并不高,但是其二级结构都具有类似的功能域,因此,该基因簇的缺失可能由其他基因簇编码的合成途径补充。另外有 1 种可能是该多糖基因簇在本实验的测试条件下受到抑制,或者需要特定的条件才能诱导表达,1 个可能的证据就是这个基因簇编码的蛋白中还包含了 2 个密度感应系统的 2 个重要的信号传导与调控蛋白 LuxO 和 LuxU,这 2 个蛋白似乎与多糖合成无直接关系,但是大量的研究证明,密度感应在很多细菌中都是多糖合成基因表达的决定性调控因子^[34-35],本实验室的前期研究也证明了溶藻弧菌中密度感应核心调控蛋白 LuxR 同源体 ValR 的缺失导致了胞外多糖合成的减少,并大大降低了细菌生物膜的形成能力^[44]。

在生物体中,胞外多糖的合成和转运是一个复杂的过程,在细菌中常存在 1 个或多个多糖合成基因簇和转运系统^[13],因此,这也可能是仅单独敲除 CPS1357 或 CPS4543 基因簇后并不影响溶藻弧菌 ZJ-51 表型变化的原因之一。在溶藻弧菌 ZJ-51 的基因组中还存在除 CPS1357 和 CPS4543 基因簇外的多个基因簇与胞外多糖合成和转运相关,并且其序列和基因组上分布的多样性显示它和其他弧菌的多糖合成机制有很大的差异,因此,对这些基因簇的真正功能及其表达调控机制进行全面深入研究,将有助于更好地了解溶藻弧菌在环境中的适应性,为水产养殖中弧菌病的防治提供理论指导。

参考文献:

- [1] Baross J, Liston J. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State [J]. *Applied Microbiology*, 1970, 20(2): 179-186.
- [2] Xie Z Y, Hu C Q, Chen C, et al. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41(2): 202-207.
- [3] Hiratsuka M, Saitoh Y, Yamane N. The isolation of *Vibrio alginolyticus* from a patient with acute enterocolitis [J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1980, 132(4): 469-472.
- [4] 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.
- [5] Watnick P I, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm [J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(3): 586-595.
- [6] 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.
- [7] Limoli D H, Jones C J, Wozniak D J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function [J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(3): 2104.
- [8] Wai S N, Mizunoe Y, Takade A, et al. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3648-3655.
- [9] Mizunoe Y, Wai S N, Takade A, et al. Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholerae* O139 strain MO10 [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(2): 958-963.
- [10] Vu B, Chen M, Crawford R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation [J]. *Molecules*, 2009, 14(7): 2535-2554.
- [11] Aydanian A, Tang L, Morris J G, et al. Genetic diversity of O-antigen biosynthesis regions in *Vibrio cholerae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7): 2247-2253.
- [12] Reid A N, Whitfield C. Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(15): 5470-5481.
- [13] Whitfield C, Roberts I S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(5): 1307-1319.
- [14] Kalynych S, Morona R, Cygler M. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen [J]. *FEMS Microbiol*

- ology Reviews ,2014 ,38(5) : 1048 – 1065.
- [15] Raetz C R H , Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. Annual Review of Biochemistry ,2002 ,71(1) : 635 – 700.
- [16] Whitfield C , Paiment A. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria [J]. Carbohydrate Research ,2003 ,338(23) : 2491 – 2502.
- [17] Hilton T , Rosche T , Froelich B , et al. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus* [J]. Applied and Environmental Microbiology ,2006 ,72(11) : 6986 – 6993.
- [18] Chatzidaki-Livanis M , Jones M K , Wright A C. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon [J]. Journal of Bacteriology ,2006 ,188(5) : 1987 – 1998.
- [19] Johnson J A , Panigrahi P , Morris J G. Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology , serum resistance , and virulence in mice [J]. Infection and Immunity ,1992 ,60(3) : 864 – 869.
- [20] Rashid M H , Rajanna C , Ali A , et al. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae* [J]. FEMS Microbiology Letters ,2003 ,227(1) : 113 – 119.
- [21] Wright A C , Powell J L , Kaper J B , et al. Identification of a group 1-like capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus* [J]. Infection and Immunity ,2001 ,69(11) : 6893 – 6901.
- [22] Güvener Z T , McCarter L L. Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology ,2003 ,185(18) : 5431 – 5441.
- [23] McCarter L L. OpaR , a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR , controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology ,1998 ,180(12) : 3166 – 3173.
- [24] Casper-Lindley C , Yildiz F H. VpsT is a transcriptional regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor [J]. Journal of Bacteriology ,2004 ,186(5) : 1574 – 1578.
- [25] Yildiz F H , Dolganov N A , Schoolnik G K. VpsR , a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems , Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPSETr-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor [J]. Journal of Bacteriology ,2001 ,183(5) : 1716 – 1726.
- [26] Yildiz F H , Schoolnik G K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type , exopolysaccharide production , chlorine resistance , and biofilm formation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences ,1999 ,96(7) : 4028 – 4033.
- [27] Chang C , Jin X , Chaoqun H. Phenotypic and genetic differences between opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus* [J]. Biofouling ,2009 ,25(6) : 525 – 531.
- [28] Ren G , Wang Z , Li Y , et al. Effects of lipopolysaccharide core sugar deficiency on colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology ,2016 ,198(11) : 1576 – 1584.
- [29] Thompson C C , Thompson F L , Vandemeulebroecke K , et al. Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ,2004 ,54(3) : 919 – 924.
- [30] Patel K B , Toh E , Fernandez X B , et al. Functional characterization of UDP-glucose: undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferases of *Escherichia coli* and *Caulobacter crescentus* [J]. Journal of Bacteriology ,2012 ,194(10) : 2646 – 2657.
- [31] Stevenson G , Andrianopoulos K , Hobbs M , et al. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid [J]. Journal of Bacteriology ,1996 ,178(16) : 4885 – 4893.
- [32] Islam S T , Lam J S. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway [J]. Canadian Journal of Microbiology ,2014 ,60(11) : 697 – 716.
- [33] Cuthbertson L , Kos V , Whitfield C. ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews ,2010 ,74(3) : 341 – 362.
- [34] Freeman J A , Bassler B L. Sequence and Function of LuxU: a Two-Component Phosphorelay Protein That Regulates Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* [J]. Journal of Bacteriology ,1999 ,181(3) : 899 – 906.
- [35] Zhu J , Miller M B , Vance R E , et al. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences ,2002 ,99(5) : 3129 – 3134.
- [36] Drummelsmith J , Whitfield C. Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane [J]. The EMBO Journal ,2000 ,19(1) : 57 – 66.
- [37] Vincent C , Duclos B , Grangeasse C , et al. Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria [J]. Journal of Molecular Biology ,2000 ,304(3) : 311 – 321.
- [38] Cuthbertson L , Mainprize I L , Naismith J H , et al. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysac-

- charide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(1): 155–177.
- [39] Chen C Y, Wu K M, Chang Y C, et al. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen [J]. *Genome research*, 2003, 13(12): 2577–2587.
- [40] Croxatto A, Lauritz J, Chen C, et al. *Vibrio anguillarum* colonization of rainbow trout integument requires a DNA locus involved in exopolysaccharide transport and biosynthesis [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 370–382.
- [41] Hong Y, Reeves P R. Model for the Controlled Synthesis of O-Antigen Repeat Units Involving the WaaL Ligase [J]. *MSphere*, 2016, 1(1): e00074–15.
- [42] Goldman R C, Hunt F. Mechanism of O-antigen distribution in lipopolysaccharide [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(9): 5352–5359.
- [43] Bastin D A, Stevenson G, Brown P K, et al. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length [J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 7(5): 725–734.
- [44] Chang C, Jing-Jing Z, Chun-Hua R, et al. Deletion of *valR*, a homolog of *Vibrio harveyis* *luxR* generates an intermediate colony phenotype between opaque/rugose and translucent/smooth in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Biofouling*, 2010, 26(5): 595–601.

Identification of the Functions of Two Gene Clusters Putatively Involved in Extracellular Polysaccharides Biosynthesis in *Vibrio alginolyticus* ZJ-51

HUANG Xiaochun^{1 2 4}, CHEN Chang^{1 2 3}, LI Yingying⁵, TIAN Yushun^{1 2 4}, XIE Mei⁵

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301; 3. Xisha Deep Sea Marine Environment Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 5. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* is one of the most important pathogens for seafood-borne infection in South China. Extracellular polysaccharides (EPSs) are a type of polysaccharides produced by bacteria with a complex structure, and affect the pathogenicity and environmental adaptability of pathogens. Genomic analysis shows that about four gene clusters related to the synthesis of exopolysaccharides exist in *V. alginolyticus* ZJ-51. In this study, bioinformatic analysis and verification experiment were used to find out the potential functions of two gene clusters of them, i. e. CPS1357 gene cluster and CPS4543 gene cluster. The results show that the gene cluster CPS4543 encoded three homologous proteins Wza–Wzb–Wzc forming an outer membrane transport system for polysaccharides synthesis, while CPS1357 encoded 17 proteins which were responsible for the synthesis, transportation and regulation of polysaccharides. However, the loss of these two gene clusters resulted in no change of EPSs biosynthesis, biofilm formation, colony morphology and mobility. This may be due to the fact that these two gene clusters were inhibited under the current test conditions or that some of special environmental factors were required to induce their expression. More studies of EPSs synthesis mechanism in *V. alginolyticus* should be taken to help better understand the adaptability of this species of bacteria in the environments.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; bioinformatics; gene cluster; exopolysaccharides; biofilm formation colony morphology