DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230404002 http://www.yykxjz.cn/

王利莹, 董宣, 王国浩, 王德浩, 谢景媚, 罗婧斐, 王显伟, 黄倢. *opaR* 基因缺失对 AHPND 致病菌生物学特性及毒力质粒接合转移的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(4): 155–165

WANG L Y, DONG X, WANG G H, WANG D H, XIE J M, LUO J F, WANG X W, HUANG J. Effects of *opaR* mutation on the biological characteristics and conjugative transfer of the virulence plasmid of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(4): 155–165

opaR 基因缺失对 AHPND 致病菌生物学特性及毒力质粒接合转移的影响*

王利莹[1,2] 董 宣[1,2①] 王国浩[2] 王德浩[2] 谢景媚[2,3]
罗婧斐[1,2] 王显伟[4] 黄 倢[1,2,5]

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306；2. 海水养殖育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071；3. 天津农学院水产学院 天津 300392；4. 山东大学生命科学学院 山东 青岛 266237；5. 亚太水产养殖中心网 泰国 曼谷 10900)

摘要 急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)严重影响了我国乃至全球对虾养殖业的发展。近期研究发现，致病菌毒力质粒携带 *trb* 型Ⅳ型分泌系统(type Ⅳ secretion system, T4SS)可在高菌体密度下介导毒力质粒发生接合转移，从而导致 AHPND 致病菌多样性。为探究群体感应与 T4SS 表达以及毒力质粒接合转移的关系，本研究以副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)群体感应系统的高密度调控子 OpaR 为研究对象，在致 AHPND 副溶血弧菌 20130629002S01::*cat*(*Vp*2S01::*cat*)菌株基础上，利用同源重组技术构建 *opaR* 基因缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*。比较了出发菌株和缺失株在生长性能、运动性和生物被膜形成能力等方面的差异，分析了 *opaR* 基因对 T4SS 基因表达量以及质粒接合转移效率的影响。结果显示，*opaR* 基因缺失不影响细菌的生长特性和群集运动，但泳动能力显著增加，生物被膜形成能力显著下降；接合转移实验显示，*opaR* 基因缺失显著提高 T4SS 表达水平和接合转移效率。本研究为解析群体感应系统调控 AHPND 致病菌 T4SS 表达以及毒力质粒接合转移机制提供了基础数据，可为控制 AHPND 致病菌毒力质粒传播提供技术支撑。

关键词 副溶血弧菌；*opaR* 基因；生物学特性；Ⅳ型分泌系统；水平转移

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)04-0155-11

急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是影响我国乃至全球对虾养殖业的细菌性疾病，临床病症为肝胰腺发白、萎缩和空肠空胃等(Lightner *et al*, 2012)。AHPND 自 2010 年暴发以来，每年给全球多国的对虾养殖业造成超过约 70 亿美元的经济损失(张宝存等, 2012; Tran *et al*, 2013; Gomez-Gil *et al*, 2014; de la Peña *et al*, 2015; Dabu *et al*, 2017; Tang *et al*, 2020; FAO, 2013)。研究表明，

* 国家自然科学基金(31802342)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022022005)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39)共同资助。王利莹，E-mail: 1810060249@qq.com

① 通信作者：董 宣，副研究员，E-mail: dongxuan@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-04-04, 收修改稿日期: 2023-05-22

AHPND 病原菌的毒力源于其携带的约 70 kb 的可编码二元毒力蛋白 PirAB 的毒力质粒(pVA1 型毒力质粒)(Lee *et al*, 2015; Tinwongger *et al*, 2016; Han *et al*, 2017)。AHPND 的致病菌存在多样性，包括副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (张宝存等, 2012)、欧文氏弧菌(*V. owensii*) (Liu *et al*, 2015)、坎贝氏弧菌(*V. campbellii*) (Dong *et al*, 2017)、普纳弧菌(*V. punensis*) (Restrepo *et al*, 2018)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*) (Muthukrishnan *et al*, 2019)和鳗弧菌(*V. anguillarum*) (Shen *et al*, 2021)等，这些病原菌中均含有 pVA1 型毒力质粒。

已有研究发现，pVA1 型毒力质粒可通过接合转移引起 AHPND 致病菌多样性(Dong *et al*, 2019a、b)。与 pVA1 型毒力质粒接合转移有关的功能基因簇被注释为 *trb* 型Ⅳ型分泌系统(type Ⅳ secretion system, T4SS) (Dong *et al*, 2019b; Wang *et al*, 2022)。革兰氏阴性菌中的 T4SS 重要组分包括通道复合物(Darbari *et al*, 2015; Low *et al*, 2014; Costa *et al*, 2021)、Ⅳ型偶联蛋白及松弛酶复合体(Grohmann *et al*, 2018)等。供受体菌通过碰撞接触形成接合通道(Costa *et al*, 2021)，松弛酶复合体被激活后识别质粒 *oriT* 序列上的 *nic* 位点，将质粒一条链切割为线性单链 DNA (T 链)，单链 DNA 与松弛酶形成蛋白质-DNA 复合体，在 T4 偶联蛋白作用下将单链 DNA 通过接合转移通道转移至受体菌中。受体菌中 T 链滚环复制合成第 2 条 DNA 链形成完整质粒，至此完成质粒水平转移(Llosa *et al*, 2002; Draper *et al*, 2005; Garcillán-Barcia *et al*, 2007)。副溶血弧菌 20130629002S01 (*Vp*2S01)菌株已被证明携带新的 *trb* 型 T4SS，且仅在高细菌密度(10^{12} CFU/mL)条件下检测到接合转移发生(Wang *et al*, 2022)。细菌高细胞密度可增加供受体菌间相互接触的概率，同时也能激活细菌群体感应(quorum sensing, QS)的高密度调控因子 OpaR，因此，推测接合转移可能与群体感应系统的高密度调控子相关。

群体感应系统也称密度感应系统，是指细菌细胞间的信息交流过程，可调控多种基因的表达，以响应周围环境中自诱导剂(autoinducer, AI)信号分子的浓度变化(Ng *et al*, 2009)。副溶血弧菌的群体感应的 2 个中心调控子为 AphA 和 OpaR，分别在低细胞密度(low cell density, LCD)和高细胞密度(high cell density, HCD)下发挥作用。在 LCD 时，胞外信号分子启动受体蛋白 LuxN 和 LuxU 的级联磷酸化通路，促进 AphA 的表达，同时抑制 OpaR 表达(Ball *et al*, 2017)；在 HCD 时，高浓度群体感应信号分子抑制受体蛋白 LuxN 和 LuxU 的级联磷酸化通路，从而解除对 OpaR 的抑制，OpaR 得以正常表达(Lenz *et al*, 2004)。研究表明，OpaR 参与副溶血弧菌中的多种生物学过程，如 OpaR 可参与激活副溶血弧菌荚膜多糖产生和 T6SS2 系统的表达(王丽, 2014)，促进生物被膜的形成(Zhang *et al*, 2021)，抑制泳动运动(Lu *et al*, 2021)和群集运动(Lu *et al*, 2019)，抑制 T3SS (Henke *et al*, 2004)和 T6SS1 (Ma *et al*, 2012; 董新波, 2015)的表达。但 OpaR 对 AHPND 致病菌中 T4SS 的调控研究目前尚未见报道。

本研究以高密度调控子 *opaR* 基因作为研究对象，构建副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 株 *opaR* 基因敲除株(*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*)，通过生长性能、生物被膜形成及接合转移等结果，探究高密度调控子 OpaR 对副溶血弧菌生物学特性以及 T4SS 的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

副溶血弧菌 *Vp*2S01 分离自中国广西 AHPND 患病对虾，*Vp*2S01:*cat* 是由同源重组技术在 pVPGX1 质粒上插入氯霉素抗性基因所得(Dong *et al*, 2019b)。坎贝氏弧菌 *Vc*LMB29 分离自深圳美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)皮肤溃疡样品，由河海大学海洋学院赵哲教授惠赠。菌株现均保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室；质粒 pMAD、自杀质粒 pCVD442 和自杀质粒中间宿主大肠杆菌(*Escherichia coli*) β2155 均为实验室质粒和菌株(表 1)。

1.2 主要试剂和仪器

超保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max Premix (2×)和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司，细菌质粒小量提取试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司，胶回收试剂盒购自莫纳生物科技有限公司，氯霉素(chloramphenicol, Chl)和利福平(rifampicin, Rif)购自北京索莱宝科技有限公司，红霉素(erythromycin, Em)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，第 1 链合成试剂盒和 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒购自山东思科捷生物技术有限公司，8%红色 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自 Genscript (中国)金斯瑞生物科技有限公司，脱氧核糖核酸酶 DNase Ⅰ(无 RNase)购自 New England Biolabs。

表 1　本研究所使用的菌株和质粒

Tab.1　Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/plasmids	特征 Characteristics	识别号 Identification
*Vp*2S01	携带 pVPGX1 质粒的野生菌株	PMID：29051747
*Vp*2S01::*cat*	*Vp*2S01 的 pVPGX1 质粒上插入氯霉素抗性基因	PMID：31231618
*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*	用红霉素抗性基因(*erm B*)替换 *Vp*2S01::*cat* 株的 *opaR* 基因	本研究构建 This study
E. coli β2155	二氨基亚胺营养缺陷型菌株	实验室菌株 Laboratory strain
pCVD442	携带氨苄西林耐药基因的自杀质粒	实验室质粒 Laboratory plasmid
pMAD	携带红霉素抗性基因的表达载体	实验室质粒 Laboratory plasmid
*Vc*LMB29	具有利福平(Rif)抗性的坎贝氏弧菌	PMID: 29109705

1.3　*opaR* 基因缺失株的构建

基因缺失株的构建参考王小鹿等(2021)的实验方法。通过同源重组技术在 *Vp*2S01::*cat* 基础上，以红霉素抗性基因(*ermB*)替代 *opaR* 基因构建缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*。以副溶血弧菌 *Vp*2S01 基因组和 pMAD 质粒为模板，使用引物 *opaR*-5F/5R、*opaR*-3F/3R、*opaR*-*ermB*F/*ermB*R (表 2)分别进行扩增得到 *opaR* 基因上、下游同源臂及红霉素抗性基因，并通过融合 PCR 技术将 3 个片段按照上游同源臂–红霉素抗性基因–下游同源臂的顺序连接并克隆入自杀质粒 pCVD442，获得打靶质粒 pCVD442-Δ*opaR*::*ermB*。将重组质粒电转化至 *E. coli* β2155，获得供体菌 β2155/pCVD442-Δ*opaR*::*ermB*。以 *Vp*2S01::*cat* 为受体菌进行接合实验，在红霉素抗性平板上筛选获得抗性的阳性克隆，称为 *Vp*/pCVD442-Δ*opaR*::*ermB*。取数个 *Vp*/pCVD442-Δ*opaR*::*ermB* 克隆菌液铺在含 10%蔗糖的 LB 平板上，培养至单克隆形成。通过 PCR 技术筛选获得 *opaR* 基因被 *ermB* 基因取代的克隆，将其命名为 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*。

表 2　*opaR* 缺失突变株构建所使用的引物

Tab.2　Primers used in the construction of *opaR* mutation

引物 Primer	序列 Sequence (5′~3′)
opaR-5F	GTTCTAGTTGCTATCGGTCGTGTACCA
opaR-5R	AATCGCGAACACTAAAGCTCCAATTTGAATAC
opaR-3F	AGTTCTAGGTCTCTTTGCAATTGAGTCCATATC
opaR-3R	GATCTCGAAACCAATCCAATCAACTGGC
opaR-*ermB*F	GTATTCAAATTGGAGCTTTAGTGTTCGCGATTTTACTTATTAAATAATTTATAGCTATTGAAAAGAG
opaR-*ermB*R	GATATGGACTCAATTGCAAAGAGACCTAGAACTTAACCAAATTAAAGAGGGTTATAATGA
opaR-outF	CACCAAGCGTATCAAAGACAAGTTCAAG
opaR-outR	CACCAAGCGTATCAAAGACAAGTTCAAG
opaR-inF	GTGTTCTGAATCGTGTTGATCACACAC
opaR-inR	CAACTCGCGAAGATTTGGTTGATGAAG

1.4　生长曲线测定

将 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 单菌落转接至 2216E 液体培养基中，28 ℃、180 r/min 震荡培养至对数生长期，以 1%接种量转接至 200 mL 新鲜的 2216E 液体培养基，每隔 2 h 取样后使用全波长酶标仪测定在 600 nm 处的吸光值(OD_{600})，绘制各菌株的生长曲线并进行差异性分析。

1.5　生物被膜形成能力测定

参考杨金龙等(2021)报道的方法检测菌株的生物被膜形成能力。将 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 培养至 OD_{600} 为 0.5 左右后分别稀释 100 倍。以 96 孔酶标板为实验容器，每个孔内加入 180 μL 2216E 液及 20 μL 稀释菌液，放置于 28℃培养箱中静置培养 24 h，无菌 2216E 培养液作为阴性对照，每个菌株平行对照 9 组。培养完成后，将酶标板从培养箱中取出，吸出每个孔中的菌液后，加入 200 μL 的 1×PBS 缓冲液洗涤 3 次，晾干约 20 min，加入 1%的结晶紫(crystal violet, CV)染液 200 μL，染色 15 min。将酶标孔中的结晶紫染液吸净，再加入 200 μL 的 1×PBS 轻轻洗涤 3 次。吸净 PBS，每孔中加入 200 μL 无水乙醇后常温静置 10 min 以洗脱生物被膜，待结晶紫完全溶解后，检测 595 nm 处的吸光值(OD_{595})。

特异性生物膜形成(SBF)指数=

$$(\text{CV adherence} - \text{CV control})/G$$

式中，G 为细胞在 600 nm 处的吸光值。

1.6　运动性测定

运动性实验参考邓益琴等(2019)和李洋洋等

(2021)的实验方法。

泳动运动(swimming motility)：将 *Vp*2S01::*cat* (Chl 20 μg/mL)和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* (Chl 20 μg/mL、Em 100 μg/mL)转接至含对应抗生素的 2216E 液体培养基中，28 ℃、180 r/min 振荡培养至对数生长期，调整各菌液浓度为 OD_{600}=0.3 左右，吸取 2 μL 菌液垂直点样于 0.3%的 LB 半固体泳动平板中。将其置于 28 ℃培养箱中静置培养约 8 h，测量细菌泳动圈直径，并对菌株泳动能力进行分析。

群集运动(swarming motility)：菌株培养条件同泳动运动实验，吸取 2 μL 菌液垂直点样于 1.5%的 LB 固体群集平板中，将其放置于 28 ℃培养箱中培养约 12 h，测量细菌圆形运动直径并进行拍照记录，实验平行 3 次。

1.7 *opaR* 基因缺失对毒力质粒接合转移的影响

参考 Dong 等(2019b)的接合转移实验方法，分别检测 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的接合转移效率。将 *Vp*2S01::*cat*、*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 和 *Vc*LMB29 (Rif 20 μg/mL)在 28 ℃、180 r/min 分别培养至 OD_{600} 为 0.5 时，收集菌体。将 *Vp*2S01、*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 分别与 *Vc*LMB29 混合，4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液，5 mL 无抗 2216E 液体相同条件洗涤 1 次，100 mL 混合菌体加入 5 mL 2216E 液体(含 DNase Ⅰ: 20 U/mL)，相同条件洗涤后，用 100 μL 2216E (含 DNase Ⅰ：200 U/mL)液体重悬于铺有 0.22 μm 滤膜的 2216E 平板上，28℃进行接合，培养时间为 12、24 和 48 h，每个时间点 3 组平行。将滤膜上的菌体洗脱后进行梯度稀释至 10^{-9}，吸取 100 μL 高浓度菌液(10^{-1}、10^{-2} 和 10^{-3})涂布于双抗平板，低浓度(10^{-7}、10^{-8} 和 10^{-9})涂布于单抗平板，28 ℃培养至单克隆形成，并进行计数和检测。

1.8 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)鉴定

将 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 培养至 OD_{600} 为 0.5 左右，使用细菌总 RNA 试剂盒提取细菌总 RNA，利用第 1 链合成试剂盒将其逆转录为 cDNA。以 *gyrB* 为内参引物，利用 *aphA*-qRT (张义全, 2014)、*opaR*-qRT 以及 T4SS-qRT 引物(表 3)，按照 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒在罗氏 LC96 荧光定量 PCR 仪中进行 RT-qPCR，每个反应重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *opaR*、*aphA* 和 T4SS 基因的相对表达量(王旭江等, 2022)。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物

Tab.3 Real-time quantitative PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5′~3′)
gyrB-qRT-F	CGGCACTAACACGTACGCTA
gyrB-qRT-R	GTCAAACCTTCACGCGCATC
aphA-qRT-F	AGCATCGGTTACTTCTGGAAAG
aphA-qRT-R	GTTGAACAGCACAAGCCATAAG
opaR-qRT-F	TCATCACGAGTTGATGCGCT
opaR-qRT-R	CACGCTCGAGAAAACATCGC
$trbB_1$-qRT-F	CGCATCATGGTGGGAGAAGT
$trbB_1$-qRT-R	GAATCGGCATGAATGGTGGC
$trbB_2$-qRT-F	GGCCGTTTAGTGGTGATGGA
$trbB_2$-qRT-R	TGCGCGATTTACAGTGGTCT
trbC-qRT-F	CCCTTAGAGCGCATTGTGGA
trbC-qRT-R	CATCTCGCCACCGAAGATCA
trbD-qRT-F	CTTTTTAGTCATGGGCGCGG
trbD-qRT-R	TAACTGCGCGTCGTTTTTGG
trbE-qRT-F	GCCCAGCGACTCGTTATACA
trbE-qRT-R	TACACATCATCATCGGCGGG
trbF-qRT-F	CGCAAATCTCACAGGCGTTC
trbF-qRT-R	TCGACCCATTCCATTTGCCA
trbG-qRT-F	CGGTTCGCGTCTACAACAAC
trbG-qRT-R	ACCACAAATTTCCCGTTGCG
trbH-qRT-F	CAGCTACGAGCCCGATCAAT
trbH-qRT-R	ATCGGACTGGCGAAGGAATG
trbI-qRT-F	CTCTTCGGTCAAGCCACCTT
trbI-qRT-R	ATCAGCAACGGACTCACCTG
trbJ-qRT-F	AAGCCTATCAGGGCCAATCG
trbJ-qRT-R	GCCAGTGCCAGTGAACTTTG
trbL-qRT-F	AGCAACAGTCGCTCTGTACC
trbL-qRT-R	ATGTTTTGCGTGGCTTGCTT
trbN-qRT-F	CTTTTGGGGTCAGCATTGCC
trbN-qRT-R	AGCGCAATGCTTGGTTTTGA
traF-qRT-F	CGCCTCCTAGTGCGGTTATT
traF-qRT-R	AAAAGAGAGATGGTCGCCCG
traG-qRT-F	AGGTGCAGTGGTGGAAAACA
traG-qRT-R	TCATCCACCAAGATGGTGCC

1.9 数据分析

所有实验均设置 3 个生物学重复。所有实验数据使用 SPSS 28.0 统计软件和 Excel 软件中的独立样本 *T* 检验进行统计学差异分析，数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示，$P<0.05$ 表示具有显著性差异，$P<0.01$ 表示具有极显著性差异。使用 Origin 2022 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 基因缺失突变株的鉴定结果

通过特异性引物设计、重组载体构建及细菌的转化与筛选，成功构建了副溶血弧菌基因缺失突变株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*。在 *opaR* 基因序列的内侧设计引物 *opaR*-in-F/R，突变株的 PCR 检测电泳结果见图 1。出发菌株 *Vp*2S01::*cat* 的检测片段大小为 311 bp (图 1A，泳道 22)，阴性对照株无条带(图 1A，泳道 23)，成功突变株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 无条带(图 1A，泳道 1~21)。选取 21 号菌株，利用 *opaR* 的外侧引物 *opaR*-out-F/R 进行 PCR 扩增验证，突变株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 扩增片段大小为 2 535 bp (图 1B，泳道 1)。将外侧引物扩增条带送测序，测序结果表明，基因突变株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 成功构建。

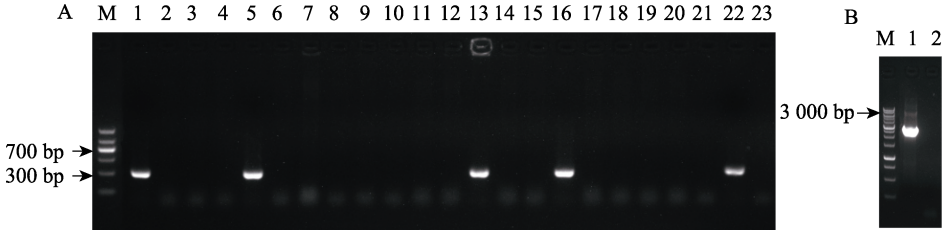

图 1　*opaR* 基因缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的 PCR 鉴定结果

Fig.1　PCR identification results of mutant strain *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*

A：*opaR* 基因内部引物 *opaR*-in-F/R 扩增结果；M：DNA Marker DL1 200；1~21：第 1~21 号菌落；22：*Vp*2S01::*cat* 菌株，产物长度：311 bp；23：阴性对照。B：*opaR* 基因外部引物 *opaR*-out-F/R 鉴定；M：DNA Marker DL10 000；1：第 21 号菌落；2：阴性对照。

A: Amplification results of the internal primer *opaR*-in-F/R of *opaR* gene; M: DNA Marker DL1 200; 1–21: The colony of No.1–21; 22: *Vp*2S01::*cat*, and the product length is 311 bp; 23: Negative control. B: Amplification results of the external primer *opaR*-out-F/R of *opaR* gene; M: DNA Marker DL10 000; 1: The colony of No.21; 2: Negative control.

2.2　*opaR* 基因缺失对副溶血弧菌生长能力的影响

对 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生长曲线进行分析，结果表明，出发菌株 *Vp*2S01::*cat* 与缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生长情况无显著差异(图 2)，表明 *opaR* 基因缺失不影响副溶血弧菌的生长。

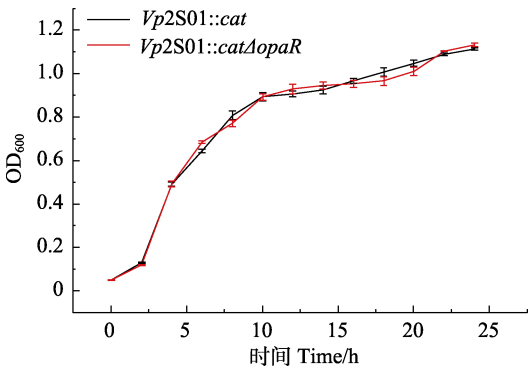

图 2　菌株 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生长曲线

Fig.2　The growth curves of the *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*

图中各取样时间点中 2 菌株生长曲线均无显著性差异(P>0.05)。

There was no significant difference in the growth curves of the two strains at each sampling time (P>0.05).

2.3　*opaR* 基因缺失对副溶血弧菌生物被膜形成能力和运动能力的影响

以 96 孔酶标板为实验容器，采用结晶紫染色法比较 *Vp*2S01::*cat* 和缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生物被膜形成能力的差异。结果显示，基因缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* (0.04±0.03)的生物被膜形成指数极显著降低，仅为 *Vp*2S01::*cat* (0.95±0.16)的 3.90% (图 3A)，表明 *opaR* 基因可参与调控副溶血弧菌生物被膜的形成。

为探究 *opaR* 基因是否影响细菌运动性，通过 LB 半固体培养基和固体培养基对菌株运动能力进行测定。泳动实验结果显示，培养约 8 h 左右，缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的泳动圈直径[(9.17±0.09) cm]大于 *Vp*2S01::*cat* 的泳动圈直径[(3.43±0.08) cm]，泳动能力显著增加了约 2.67 倍(图 3B)。群集运动实验结果表明，培养约 12 h 左右，*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生长圈直径(1.10 cm)与 *Vp*2S01::*cat* [(1.03±0.02) cm]相比无显著性差异，但 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的生长圈边缘多缺刻(图 3C、D)。综上所述，*opaR* 基因缺失不影响副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 的群集运动能力，但可显著提高其泳动运动能力。

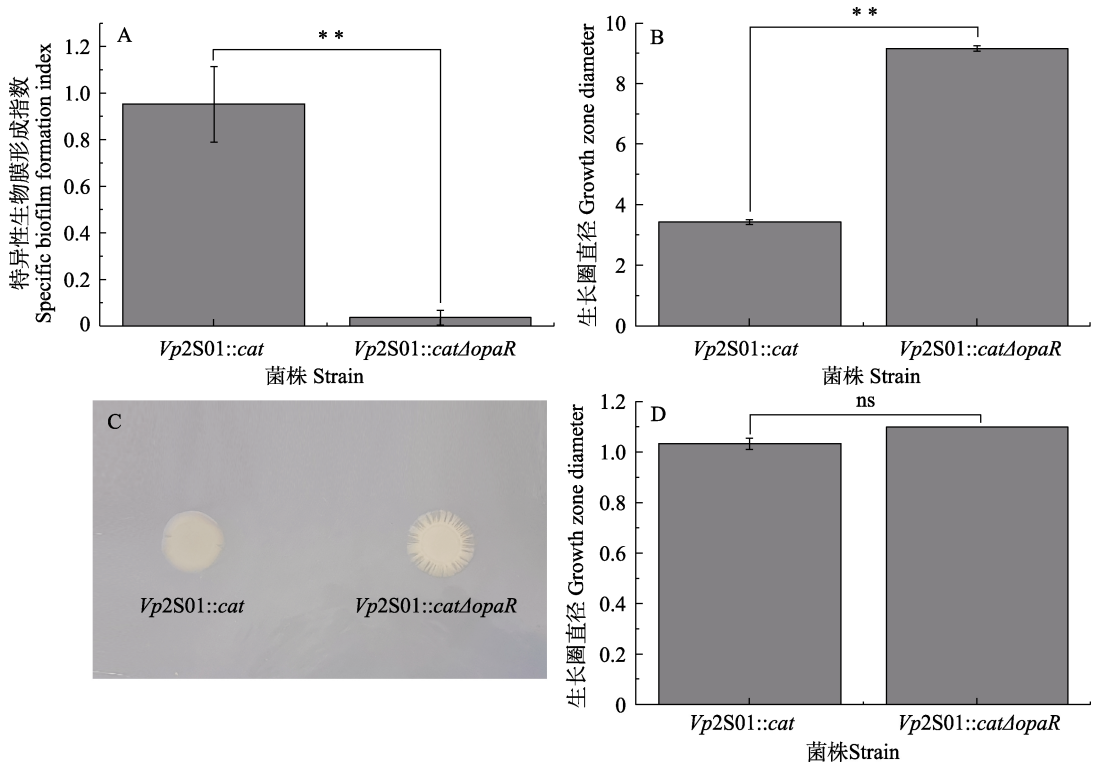

图 3 菌株 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*catΔopaR* 的生物被膜形成能力和运动能力的差异分析

Fig.3 Analysis of differences in biofilm formation and motility of *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*catΔopaR*

A：菌株的生物被膜形成能力差异；B：菌株的泳动直径差异；C：群集平板菌落；D：菌株的群集直径差异。*: $P<0.05$；**: $P<0.01$；ns：无显著差异。下同。

A: The difference in biofilm-forming ability; B: The difference in growth zone diameter of swimming; C: The colony of strains in the 1.5% LB plate; D: The difference in growth zone diameter of swarming. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ns: No significant difference. The same below.

2.4 *opaR* 基因缺失对毒力质粒接合转移和Ⅳ型分泌系统基因表达的影响

使用接合转移模型对不同时间点的接合转移效率进行测定。实验结果显示，在 12 h 时，*Vp*2S01::*catΔopaR* 转移效率 [(8.77±3.82)×10^{-8}] 较 *Vp*2S01::*cat* [(1.55±0.42)×10^{-8}]增加约 5.66 倍。在 24 h 时，*Vp*2S01::*catΔopaR* 的转移效率[(1.01±0.40)×10^{-7}]较 *Vp*2S01::*cat* [(1.10±0.48)×10^{-9}]增加约 96.20 倍。但在 48 h时，未检测到 *Vp*2S01::*catΔopaR* 实验组存在接合子(图 4A)。

使用相对定量法检测接合转移 24 h 后菌体的 T4SS 基因的转录水平(图 4B)。在基因缺失株 *Vp*2S01::*catΔopaR* 中，*opaR* 基因无表达，T4SS 基因的相对表达水平比菌株 *Vp*2S01::*cat* 增加了约 1.13~3.21 倍。其中，接合转移关键基因 *traF*、*trbE* 和 *traG* 的相对表达水平分别显著提高 1.96、1.92 和 3.21 倍。综上所述，*opaR* 基因可通过调控 T4SS 基因的表达进而调控接合转移效率。

3 讨论与结论

AHPND 致病菌的 pVA1 型毒力质粒上携带新型 *trb* 型 T4SS，可介导毒力质粒的接合转移引起 AHPND 致病菌多样性(Dong *et al*, 2019a、b; Wang *et al*, 2022)，本团队前期研究发现，接合转移效率与细菌密度密切相关(Wang *et al*, 2022)。*opaR* 基因编码的高细胞密度调控子 OpaR 可参与调控多种基因表达，在副溶血弧菌致病过程中发挥重要作用(Zhong *et al*, 2013; Wu *et al*, 2019; Lu *et al*, 2021)。本研究以 *opaR* 基因为研究对象构建了缺失株，并探索其对副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 生物学功能和 pVA1 型毒力质粒接合转移效率的影响。

副溶血弧菌的生物被膜能够保护细菌细胞免受环境变化及降低对抗生素的敏感度，促进其在宿主中的定殖和生存(Yildiz *et al*, 2009; Li *et al*, 2020)。成熟生物被膜的形成受鞭毛、菌毛和荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)等多因素的影响。群体感应高密

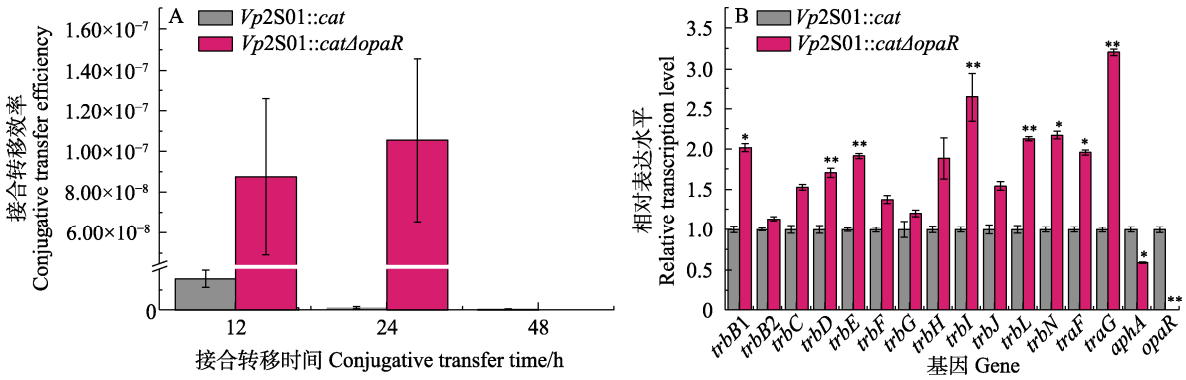

图 4　菌株 *Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 不同时间点的接合转移效率(A)和接合转移 24 h 时Ⅳ型分泌系统基因的表达水平(B)

Fig.4　The conjugative transfer efficiency at different time points (A) and the relative transcription level at conjugative transfer 24 h of *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* (B)

度调控子 OpaR 可通过激活 CPS 操纵子以抑制生物被膜形成量(McCarter, 1998; Boles *et al*, 2002; Kim *et al*, 2007; Kalburge *et al*, 2017)；且 Zhang 等(2021)研究发现，OpaR 可通过降低环鸟苷二磷酸(cyclic-di-GMP, c-di-GMP)的浓度以抑制副溶血弧菌 RIMD2210633 中生物被膜形成量。但 Zhong 等(2021)研究发现，副溶血弧菌 HZ 株的 Δ*opaR* 菌株的生物被膜形成弱于野生菌株。这些结果表明，高密度调控子 OpaR 是副溶血弧菌生物被膜形成的重要调控因子，但其对生物被膜形成的调控机制存在菌株差异性。本研究中，*opaR* 基因缺失株的生物被膜形成能力显著下降，表明 *opaR* 基因可能参与调控副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 生物被膜形成，但 OpaR 对 AHPND 致病菌生物被膜形成的调控机制还有待研究。

副溶血弧菌的极生鞭毛(polar flagella, Pof)和侧生鞭毛(lateral flagella, Laf)可帮助其在不同环境中运动，以适应周围环境帮助弧菌定殖(Stewart *et al*, 2003)。极生鞭毛与泳动运动相关，可推动副溶血弧菌在液体介质中运动；侧生鞭毛与群集运动相关，使弧菌在固体介质中移动(McCarter, 1995)。本研究发现，*opaR* 基因缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的泳动能力显著增强，但群集能力无显著改变。Lu 等(2021)发现，OpaR 是副溶血弧菌泳动运动和 *pof* 基因转录的负调控因子；泳动实验结果与其研究结果一致，表明 OpaR 是 *Vp*2S01::*cat* 泳动运动的负调控因子。当菌体处于固体介质时，侧生鞭毛合成且细胞达到阈值时产生群集运动，细菌间连接形成圆形微菌落(Aagesen *et al*, 2013)。已有研究表明，OpaR 可通过抑制 *laf* 基因表达以调控群集运动，但在 *opaR* 基因缺失情况下，群集运动仍受到严格表型调控(Jaques *et al*, 2006)。研究结果显示，OpaR 不影响 *Vp*2S01::*cat* 的群集运动能力，但缺失株 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* 的群集菌落多缺刻。因此，*opaR* 基因对于 *Vp*2S01::*cat* 侧生鞭毛和菌落缺刻的相关影响机制还需进一步研究。

接合转移是基因水平转移的重要方式之一，前期已被证实是 AHPND 致病菌多样性的重要原因(Liu *et al*, 2015; Dong *et al*, 2017、2019a、2019b)。已有的研究显示，OpaR 可参与调控副溶血弧菌 T3SS 和 T6SS 等多种分泌系统(Zhong *et al*, 2013; Henke *et al*, 2004; 王丽, 2014)，但目前尚未有关于 OpaR 对副溶血弧菌 T4SS 的调控研究的报道。接合转移实验以及 RT-qPCR 检测结果表明，当 *opaR* 基因缺失时，T4SS 基因表达率和 pVA1 型毒力质粒接合转移效率增加。与大部分单一菌的群体感应实验相比，本研究中使用的接合转移模型含有 2 种菌，供体菌为副溶血弧菌(*Vp*2S01::*cat* 和 *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*)，受体菌为坎贝氏弧菌(*Vc*LMB29)，供体菌和受体菌中均含有高细胞密度调控子。因此，*opaR* 基因对 T4SS 基因表达和接合转移的关系还需构建 *opaR* 基因回补株或以更多 AHPND 致病菌的接合转移实验来进行确认。

研究结果表明，高细胞密度调控基因 *opaR* 对副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 的生长特性及群集运动能力无显著影响，但对 *Vp*2S01::*cat* 的泳动能力、生物被膜形成能力、Ⅳ型分泌系统基因的表达水平及接合转移效率均有显著影响，由此揭示，OpaR 是副溶血弧菌 *Vp*2S01::*cat* 毒力质粒接合转移的重要调控因子。但细菌的调控通路极为复杂，目前尚未有研究报道群体感应与 pVA1 型毒力质粒接合转移的调控关系，后续将结合基因回补株、原核转录组测序技术及蛋白表达等实验以厘清高密度调控子 OpaR 对 pVA1 型毒力质粒 pVA1 型毒力质粒接合转移的调控通路及机制。本研究为解析群体感应系统调控致 AHPND 致病菌

T4SS 表达以及毒力质粒接合转移机制提供了基础数据，可为控制 AHPND 致病菌毒力质粒传播提供技术支撑。

参 考 文 献

AAGESEN A M, PHUVASATE S, SU Y C, *et al*. Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a multifactorial process involving pili and flagella but not type Ⅲ secretion systems or phase variation. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(10): 3303–3305

BALL A S, CHAPARIAN R R, VAN KESSEL J C, *et al*. Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in *Vibrios*. Journal of Bacteriology, 2017, 199(19): e00105–17

BOLES B R, MCCARTER L L. *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. Journal of Bacteriology, 2002, 184(21): 5946–5954

COSTA T R D, HARB L, KHARA P, *et al*. Type Ⅳ secretion systems: Advances in structure, function, and activation. Molecular Microbiology, 2021, 115(3): 436–452

DABU I M, LIM J J, ARABIT P M T, *et al*. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 792–799

DARBARI V C, WAKSMAN G. Structural biology of bacterial type Ⅳ secretion systems. Annual Review of Biochemistry, 2015, 84(1): 603–629

DE LA PEÑAL D, CABILLON N A, CATEDRAL D D, *et al*. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 116(3): 251–254

DENG Y Q, CHEN C, SU Y L, *et al*. Construction and characterization of the sRNA srvg23535 knock-out mutant of *Vibrio alginolyticus* ZJ-T. Microbiology China, 2019, 46(4): 829–841 [邓益琴, 陈偲, 苏友禄, 等. 溶藻弧菌 ZJ-T 小 RNA srvg23535 基因突变株的构建及其功能初探. 微生物学通报, 2019, 46(4): 829–841]

DONG X B, Quorum sensing-dependent regulation of type Ⅵ secretion system Ⅰ in *Vibrio parahaemolyticus*. Master′s Thesis of Anhui Agricultural University, 2015 [董新波. 副溶血性弧菌中密度感应系统依赖的 T6SS1 调控机制研究. 安徽农业大学硕士研究生学位论文, 2015]

DONG X, CHEN J Y, SONG J P, *et al*. Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. Aquaculture, 2019a, 503: 396–402

DONG X, SONG J P, CHEN J Y, *et al*. Conjugative transfer of the pVA1-type plasmid carrying the $pirAB^{vp}$ genes results in the formation of new AHPND-causing *Vibrio*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019b, 9(1): 195

DONG X, WANG H L, XIE G S, *et al*. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the pir^{VP} gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. Emerging Microbes and Infections, 2017, 6(1): e2

DRAPER O, CÉSAR C E, MACHÓN C, *et al*. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(45): 16385–16390

FAO. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPND) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304): FAO Fisheries and Aquaculture Report, Hanoi, Vietnam, 2013

GARCILLÁN-BARCIA M P, JURADO P, GONZÁLEZ-PÉREZ B, *et al*. Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. Molecular Microbiology, 2007, 63(2): 404–416

GOMEZ-GIL B, SOTO-RODRIGUEZ S, LOZANO R, *et al*. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. Genome Announcements, 2014, 2(2): e00055-14

GROHMANN E, CHRISTIE P J, WAKSMAN G, *et al*. Type Ⅳ secretion in gram-negative and gram-positive bacteria. Molecular Microbiology, 2018, 107(4): 455–471

HAN J E, TANG K F J, ARANGUREN L F, *et al*. Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, $pirAB_{vp}$ (–) *V. parahaemolyticus*, and $pirAB_{vp}$ (+) *V. campbellii* strains. Aquaculture, 2017, 470: 84–90

HENKE J M, BASSLER B L. Quorum sensing regulates type Ⅲ secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12): 3794–3805

JAQUES S, MCCARTER L L. Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2625–2635

KALBURGE S S, CARPENTER M R, ROZOVSKY S, *et al*. Quorum sensing regulators are required for metabolic fitness in *Vibrio parahaemolyticus*. Infection and Immunity, 2017, 85(3): e00930-16

KIM Y K, MCCARTER L L. SCRG, a GGDEF-EAL Protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 2007, 189(11): 4094–4107

LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, *et al*. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(34): 10798–10803

LENZ D H, MOK K C, LILLEY B N, *et al*. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. Cell, 2004,

118(1): 69–82

LI W, WANG J J, QIAN H, *et al*. Insights into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 813

LI Y Y, WANG Q, GUO R, *et al*. Effects of VPA1500 gene deletion on biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 3937–3951 [李洋洋, 王权, 郭容, 等. VPA1500 基因缺失对副溶血弧菌生物学特性和致病性的影响. 微生物学报, 2021, 61(12): 3937–3951]

LIGHTNER D V, REDMAN R M, PANTOJA C R, *et al*. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate, 2012, 15(1): 40

LIU L Y, XIAO J Z, XIA X M, *et al*. Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. Genome Announcements, 2015, 3(6): e01395-15

LLOSA M, GOMIS-RÜTH F X, COLL M, *et al*. Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. Molecular Microbiology, 2002, 45(1): 1–8

LOW H H, GUBELLINI F, RIVERA-CALZADA A, *et al*. Structure of a type Ⅳ secretion system. Nature, 2014, 508(7497): 550–553

LU R F, SUN J F, QIU Y, *et al*. The quorum sensing regulator OpaR is a repressor of polar flagellum genes in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Microbiology, 2021, 59: 651–657

LU R F, TANG H, QIU Y, *et al*. Quorum sensing regulates the transcription of lateral flagellar genes in *Vibrio parahaemolyticus*. Future Microbiology, 2019, 14(12): 1043–1053

MA L Z, ZHANG Y Q, YAN X J, *et al*. Expression of the type Ⅵ secretion system 1 component Hcp1 is indirectly repressed by OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. The Scientific World Journal, 2012, 1: 982140

MCCARTER L L. OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3166–3173

MCCARTER L L. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 1995, 177(6): 1595–1609

MUTHUKRISHNAN S, Defoirdt T, INA-SALWANY M Y, *et al*. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. Aquaculture, 2019, 511: 734227

NG W, BASSLER B L. Bacterial quorum-sensing network architectures. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 197–222

RESTREPO L, BAYOT B, ARCINIEGAS S, *et al*. PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. Scientific Reports, 2018, 8(1): 13080

SHEN H Y, SONG T T, LU J Q, *et al*. Shrimp AHPND causing *Vibrio anguillarum* infection: Quantitative diagnosis and identifying antagonistic bacteria. Marine Biotechnology, 2021, 23(6): 964–975

STEWART B J, MCCARTER L L. Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. 2003, 185(15): 4508–4518

TANG K F J, BONDAD-REANTASO M G, ARTHUR J R, *et al*. Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. FAO Fisheries and Aquaculture Circular NFIA/C1190 (En), Rome, FAO, 2020

TINWONGGER S, NOCHIRI Y, THAWONSUWAN J, *et al*. Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(6): 1755–1765

TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, *et al*. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting *Penaeid* shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(1): 45–55

WANG D H, WANG L Y, BI D X, *et al*. Conjugative transfer of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing pVA1-type plasmid is mediated by a novel self-encoded type Ⅳ secretion system. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): e01702-22

WANG L. Quorum sensing-dependent regulation of type Ⅲ secretion system 1 and type Ⅵ secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. Doctoral Dissertation of Chongqing Medical University, 2014 [王丽. 副溶血性弧菌中密度感应系统依赖的 T3SS1 和 T6SS2 调控机制研究. 重庆医科大学博士研究生学位论文, 2014]

WANG X J, YAO Z L, LAI Q F, *et al*. Transcriptomic analysis of gene expression of *Litopenaeus vannamei* during long-term exposure to high alkaline water. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 22–32 [王旭江, 么宗利, 来琦芳, 等. 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 22–32]

WANG X L, LI J, LI G Y, *et al*. The effect of *rpoS* on *Hcp* expression and bactericidal activity in *Vibrio anguillarum* MHK3. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 125–134 [王小鹿, 李杰, 李贵阳, 等. *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株 *Hcp* 表达和杀菌能力的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 125–134]

WU K, ZHENG Y Y, WU Q P, *et al*. *Vibrio parahaemolyticus cqsA* controls production of quorum sensing signal molecule 3-hydroxyundecan-4-one and regulates colony morphology. Journal of Microbiology, 2019, 57(12): 1105–1114

YANG J L, DUAN Z H, DING W Y, *et al*. Effects of VB7 and VB12 on biofilm formation and larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*. 2021, 42(5): 113–123 [杨金龙, 段志鸿, 丁文扬, 等. 维生素 B7 和 B12 对细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫变态的影响. 渔业科学进展, 2021,

42(5): 113–123]

YILDIZ F H, VISICK K L. *Vibrio* biofilms: So much the same yet so different. Trends in Microbiology, 2009, 17(3): 109–118

ZHANG B C, LIU F, BIAN H H, *et al*. Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(2): 56–62 [张宝存, 刘飞, 边慧慧, 等. 一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 56–62]

ZHANG Y Q. Transcriptional regulation of the genes associated with quorum sensing system by AphA and OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. Doctoral Dissertation of Academy of Military Medical Sciences, 2014 [张义全. AphA 和 OpaR 对副溶血弧菌密度感应系统相关基因的转录调控机制研究. 中国人民解放军军事医学科学院博士研究生学位论文, 2014]

ZHANG Y, QIU Y, GAO H, *et al*. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus*. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 676436

ZHONG X J, LU R R, LIU F W, *et al*. Identification of LuxR family regulators that integrate into quorum sensing circuit in *Vibrio parahaemolyticus*. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 691842

(编辑 马璀艳)

Effects of *opaR* Mutation on the Biological Characteristics and Conjugative Transfer of the Virulence Plasmid of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-Causing *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Liying[1,2], DONG Xuan[1,2①], WANG Guohao[2], WANG Dehao[2], XIE Jingmei[2,3], LUO Jingfei[1,2], WANG Xianwei[4], HUANG Jie[1,2,5]

(1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*;
2. *State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao* 266071, *China*;
3. *Fisheries School, Tianjin Agriculture College, Tianjin* 300392, *China*;
4. *College of Life Science, Shandong University, Qingdao* 266237, *China*;
5. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok* 10900, *Thailand*)

Abstract Acute hepatopancreatic necrosis (AHPND) is a bacterial disease caused by *Vibrio* bacteria that severely affects the Pacific white shrimp farming industry. Since AHPND was first identified in China and Vietnam in 2010, it was subsequently identified in Malaysia (2011), Thailand (2012), Mexico (2013), the Philippines (2014), South Korea (2016), Bangladesh (2017), the United States (US) (2017), and Japan (2020). AHPND causes significant economic losses of more than 7 billion US$ annually to the global shrimp farming industry. It has severely restricted the development of the global shrimp farming industry. Many studies have shown that the pathogens of AHPND are *Vibrio* spp., including *V. parahaemolyticus*, *V. owensii*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. punensis*, and *V. anguillarum*. The virulence of these pathogenic strains was derived from a 70 kb virulent plasmid (pVA1-type plasmid). The pVA1-type plasmid carries *pirAB* genes encoding the binary toxin pirAB homologous to the insecticidal protein of *Photobacterium phosphoreum*. The pVA1-type plasmid has been confirmed to carry a novel *trb* type Ⅳ secretion system (T4SS). *Trb*-T4SS can mediate the conjugative transfer of the pVA1-type plasmid at high cell density for interspecific horizontal transfer.

The quorum sensing (QS) system is also known as the density-sensing system. In the

① Corresponding author: DONG Xuan, E-mail: dongxuan@ysfri.ac.cn

surrounding environment, the QS system allows bacteria to regulate the expression of multiple genes by sensing changes in the concentration of autoinducer signaling molecules. At high cell density, high concentrations of autoinducer signaling molecules bind to receptor proteins to inhibit phosphorylation cascades and high cell density master regulator OpaR is normally expressed. OpaR is involved in the regulation of various biological processes, such as biofilm-forming ability, motility, and the expression of the type Ⅲ and type Ⅳ secretion systems. Reportedly, high concentrations of signaling molecules in the QS system regulate the expression of key genes of the T4SS to increase the conjugative transfer efficiency of drug-resistant plasmids. However, the regulation of the T4SS by opaR in AHPND is not yet reported.

In this study, OpaR, the high cell density master regulator of the QS system in *V. parahaemolyticus*, was selected to explore the relationship between the QS system and T4SS expression, as well as the conjugative transfer of the pVA1-type plasmid. The *V. parahaemolyticus* 20130629002S01::*cat* (*Vp*2S01::*cat*) strain, a pathogenic strain of AHPND, was used as the starting strain. The *opaR* gene was replaced with the erythromycin resistance gene (*ermB*) by homologous recombination and electroporation. The *opaR* mutant strain (*Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*) was successfully constructed. The effects of OpaR on *Vp*2S01::*cat* were explored by performing growth curve and motility assays.

*Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* were cultured continuously for approximately 24 h in a shaking bed at 28 ℃ and 180 r/min. OD_{600} was measured every 2 h to compare the difference in growth. The results showed that there were no significant differences in the growth curves for *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*. Biofilm-forming ability was detected using a crystal violet staining assay. The results showed that the biofilm-forming ability of *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* was significantly reduced. Growth zone diameter was recorded in 0.3% (swimming) LB agar plates at 28 ℃ for 8 h to analyze the difference in swimming ability. We found that the swimming ability of *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* increased significantly by 2.67 times compared with that of *Vp*2S01::*cat*. Growth zone diameter was recorded in 1.5% (swarming) LB agar plates at 28 ℃ for 12 h to analyze the difference in swarming ability. The results showed that there was no significant difference in swarming ability between *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR*. However, *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* had more missing colonies. Using *Vc*LMB29 as the receptor strain, the conjugative transfer efficiency of *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* was compared at different time points. We found that the conjugative transfer efficiency of *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* increased after 12 and 24 h. The conjugative transfer efficiency after 24 h was increased by a factor of 265.43. RNA of *Vp*2S01::*cat* and *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* was extracted after 24 h of conjugative transfer and reverse-transcribed into cDNA for real-time quantitative fluorescence PCR (RT-qPCR). *GyrB* was used as the reference gene. *AphA*-qRT, *opaR*-qRT, and T4SS-qRT primers were used for RT-qPCR. The relative expression levels of genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The results showed that the relative expression levels of *T4SS* in the *Vp*2S01::*cat*Δ*opaR* experimental group were significantly increased by 1.13–3.21 times and that the relative expression levels of the key conjugative transfer genes *traF, trbE*, and *traG* were significantly increased by 1.96, 1.92, and 3.21 times, respectively.

In conclusion, the *opaR* gene does not affect the growth and swarming motility but does affect the biofilm-forming and swimming ability of *Vp*2S01::*cat*. The high cell density master regulator OpaR may affect the conjugative transfer efficiency of the virulent plasmid by regulating the expression levels of T4SS. This study provides fundamental data for analyzing the mechanism by which the QS system regulates the expression of T4SS and the conjugative transfer of the pVA1-type plasmid in AHPND pathogenic bacteria, offering technical support for the control of the horizontal transfer of the virulent plasmid in AHPND-causing bacteria.

Key words　*Vibrio parahaemolyticus*; *opaR* gene; Biological characteristics; Type Ⅳ secretion system; Horizontal transfer