

Hfq 对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 毒力的调控分析*

邓益琴^{1,2,4} 赵晶晶^{1,2} 刘松林^{1,4} 赵哲^{1,2} 陈 偿^{1,2,3}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广州 510301; 2. 中国科学院南海海洋研究所 广东省应用海洋生物学重点实验室 广州 510301; 3. 中国科学院南海海洋研究所 西沙、南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)

摘要 为探讨分子伴侣 Hfq 对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)毒力的调控作用, 本文分析了溶藻弧菌 ZJ-T 野生株、*hfq* 突变株及回补株各项与毒力相关的生理生化指标。研究结果显示: 在半固体和固体 LBS 平板中, 缺失株游动和涌动力显著降低($P < 0.001$); *hfq* 缺失株生物膜合成速度及合成量降低, 但解离速度增加; 在限铁环境下, 缺失株生长有所减弱; 缺失株胞外蛋白酶分泌增强($P < 0.01$); 同野生株和突变株相比, 缺失株对小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞几乎不致死, 且其对石斑鱼的半数致死量提高 3 个数量级。实验结果表明: Hfq 对溶藻弧菌毒力具有重要调控作用, 并通过调控其运动、生物膜形成、铁代谢、胞外蛋白酶分泌等生理生化过程从而调控其毒力。本研究可为溶藻弧菌病害暴发的防治提供重要理论依据。

关键词 溶藻弧菌; Hfq; 毒力

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyh20160100022

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是海洋环境中普遍存在的革兰氏阴性菌。它是海水养殖中最常见和危害最严重的细菌性病原之一(Campanelli *et al*, 2008; 赖迎迢等, 2014), 其引起的“弧菌病”的发病率在近年来呈现逐渐上升趋势(Newton *et al*, 2012)。同时, 溶藻弧菌也是人类的机会致病菌, 可通过食源途径引起人类患病(Feingold *et al*, 2004; Austin 2010)。其致病性与相关致病因子的表达调控密切相关, 因此深入研究溶藻弧菌的分子致病机理, 对溶藻弧菌病害暴发的防控非常重要。

分子伴侣 Hfq 在细菌环境适应过程以及毒力等多种生命活动中具有重要调控作用(Sousa *et al*, 2010; Berghoff *et al*, 2011; Cui *et al*, 2013)。因此, *hfq* 基因的缺失通常引起细菌许多表型变化(Cui *et al*, 2013; Arce-Rodríguez *et al*, 2015)。如副溶血弧菌中 *hfq* 缺失

导致菌株超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性下调, 从而抗氧化能力增强(Su *et al*, 2010); 致病菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在缺失 *hfq* 基因后, 不但影响到生长速度和环境适应因子 σ^S 的表达量, 而且与致病力相关的颤搐(twitching)、涌动(swarming)的能力也大为下降, 各种毒素如弹性蛋白酶、过氧化氢酶的合成甚至下降 80% 以上(Sonnleitner *et al*, 2006)。但 Hfq 蛋白在不同细菌中的调控作用不同, 如 Hfq 作为协助 sRNAs 的分子伴侣, 参与细菌群体感应(quorum sensing, QS)系统的调控, 在霍乱弧菌中, QS 系统控制着毒力、生物膜合成、蛋白酶分泌等(Nielsen *et al*, 2006; Joëlsson *et al*, 2007); 而在鳗弧菌中, QS 系统负责调控生物膜合成、丝氨酸合成、色素的产生及 EmpA 金属蛋白酶的合成(Weber *et al*, 2008)。但是, 目前通过研究 Hfq 对溶藻弧菌生

* 国家自然科学基金项目, 31272697 号, 41276163 号; 广州市珠江科技新星项目, 2013J2200094 号; 广东省省级科技计划项目, 2014B030301064 号。邓益琴, 博士研究生, E-mail: yiqindd@163.com

通讯作者: 陈偿, 博士, 研究员, E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

收稿日期: 2016-01-29, 收修改稿日期: 2016-03-30

生物学特性的影响来分析其毒力的系统性研究还较少。

本研究以溶藻弧菌 ZJ-T 为研究对象, 探讨 *hfq* 基因对溶藻弧菌运动、生物膜形成、铁代谢、胞外蛋白酶分泌等与毒力相关生理生化过程, 进而研究 Hfq 对其毒力的调控作用, 从而揭示 Hfq 在溶藻弧菌疾病暴发中的作用, 同时也为控制溶藻弧菌病害的暴发提供新的思路和防治靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验所用菌株: 溶藻弧菌野生株 ZJ-T, *hfq* 突变株 Δhfq -T, *hfq* 回补株 hfq^+ -T 及大肠杆菌 DH5 α 见表 1。

1.1.2 主要试剂 NaCl、葡萄糖、MgSO₄、结

晶紫等生化试剂购自广州威佳公司。脱脂奶粉、2-2'-联吡啶购至生工生物工程上海股份有限公司。小牛血清购至 Gibco 公司。

1.1.3 主要培养基 TSB (Tryptic Soy Broth) 培养基购自 BD 公司。LB (Luria-Bertani) / LBS (3% NaCl) 培养基的组分蛋白胨、酵母粉和琼脂粉购自广东环凯公司。DEME 培养基购至 Gibco 公司。

1.1.4 实验用细胞和石斑鱼 试验用小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞由本研究所“海洋生物技术与遗传学科组”赵密博士提供。实验用石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 购至海口水产市场, 每尾 15—20g, 在室内实验室 2m³ 水箱内暂养 1 周后用于实验。

表 1 实验所用菌株

Tab.1 Strains of *V. alginolyticus* used in this study

Strain	Genotypes	Source
<i>Vibrio alginolyticus</i>		
ZJ-T	Ap ^r ; translucent/smooth variant of wild strain ZJ51 (Xie <i>et al</i> , 2005); isolated from diseased grouper fish off the Southern China coast	(Chen <i>et al</i> , 2009)
Δhfq -T	Ap ^r ; ZJ-T carrying an in-frame deletion of <i>hfq</i> gene	This study
hfq^+ -T	Ap ^r , Cm ^r ; Δhfq -T complemented with intact <i>hfq</i> gene	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 phoA	This lab

Ap^r: 氨苄青霉素抗性; Cm^r: 氯霉素抗性

1.2 方法

1.2.1 游动性和涌动性测定 将单个克隆的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30°C 200r/min 振荡培养过夜; 调整培养液浓度至相同吸光度(OD_{600nm}=1.0), 取 5 μ L 平行三次点样到 0.3%琼脂半固体 LBS 平板测试其游动性, 同时取 5 μ L 平行三次点样到 1.5%琼脂固体 LBS 平板测试其涌动性, 分别 30°C 静置培养 16h 和 24h, 测量菌斑直径。

1.2.2 生物膜形成实验 将单个克隆的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30°C 200r/min 振荡培养过夜。按 1mL/孔用量于 24 孔培养板中加入 BF 培养基(Biofilm growth medium)。调整培养液浓度至相同吸光度(OD_{600nm}=1.0), 同一菌株平行三次分别将 10 μ L 调试菌液加到 1 mL BF 培养基, 30°C 静置培养。每 2h 间隔取样, 利用结晶紫染色法定量测定生物膜生成量 OD_{590nm}。结晶紫染色法操作参见 Chen 等(2009)。

1.2.3 限铁环境下生长能力测试 将单个克隆的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30°C 200r/min 振荡培养过夜。调整培养液浓度至相同吸光度(OD₆₀₀=5.0), 同时 10 倍倍比稀释各菌株菌液至最高稀释倍数为 10⁶, 然后将倍比稀释菌液依次取 5 μ L 平行三次点样到 TSB 平板以及 TSB 添加 120 μ mol/L 2-2'-联吡啶平板上, 30°C 静置培养 24h, 观察细菌生长情况。

1.2.4 细菌胞外蛋白酶活性检测 将单个克隆的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30°C 200r/min 振荡培养过夜; 调整培养液浓度至相同吸光度(OD_{600nm}=5.0), 取 5 μ L 平行三次点样到 LBS 添加 1%脱脂奶粉平板上。30°C 静置培养 24h, 测量蛋白分解圈直径以及克隆直径。

1.2.5 细胞感染实验 C2C12 细胞在 37°C 下培养于 DEME 添加 10%小牛血清培养液中。将单个克隆的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 分别接种至 LBS 液体培养基, 于 30°C 200r/min 振荡至对数期。同时,

接种没有细胞毒性的大肠杆菌 DH5 α 单克隆至 LB 液体培养基, 于 37°C 200r/min 振摇至对数期作为阴性对照。室温下, 4000g 3min 离心收集细菌, 细菌沉淀用无血清 DEME 培养液洗涤两次后以感染复数 MOI=100 的量加入到单层 C2C12 细胞中。分别在感染 0.5、1.0、2.0 以及 3.0h 后, 于显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.6 石斑鱼致死性实验 石斑鱼每组 5 尾, 分别于 5L 的容器中 25—28°C 条件下饲养, 定期喂食。细菌于 LBS 液体培养基上培养过夜, 用灭菌的生理盐水洗脱, 并稀释成不同浓度的菌体悬液。分别取 100 μ L 不同浓度的溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 菌液腹腔注射石斑鱼, 对照注射等体积的生理盐水。注射的石斑鱼相同条件下饲养一周, 记录死亡数, 计算半数

致死量(LD₅₀)。

1.2.7 数据处理与分析 所有试验重复三次以上, 使用统计分析软件 IBM SPSS Statistics 19 进行单因素方差 LDS 分析, $P < 0.05$ 被认为显著差异。

2 结果与分析

2.1 Hfq 对溶藻弧菌运动性的调控

在 0.3% 琼脂半固体 LBS 平板及 1.5% 琼脂固体 LBS 平板上, hfq 缺失均造成溶藻弧菌运动能力极显著下降 ($P < 0.001$); 在 hfq^+ -T 中, 运动能力的缺失得到回补 (图 1A, 1B)。以上结果表明, hfq 基因正调控溶藻弧菌的运动性。

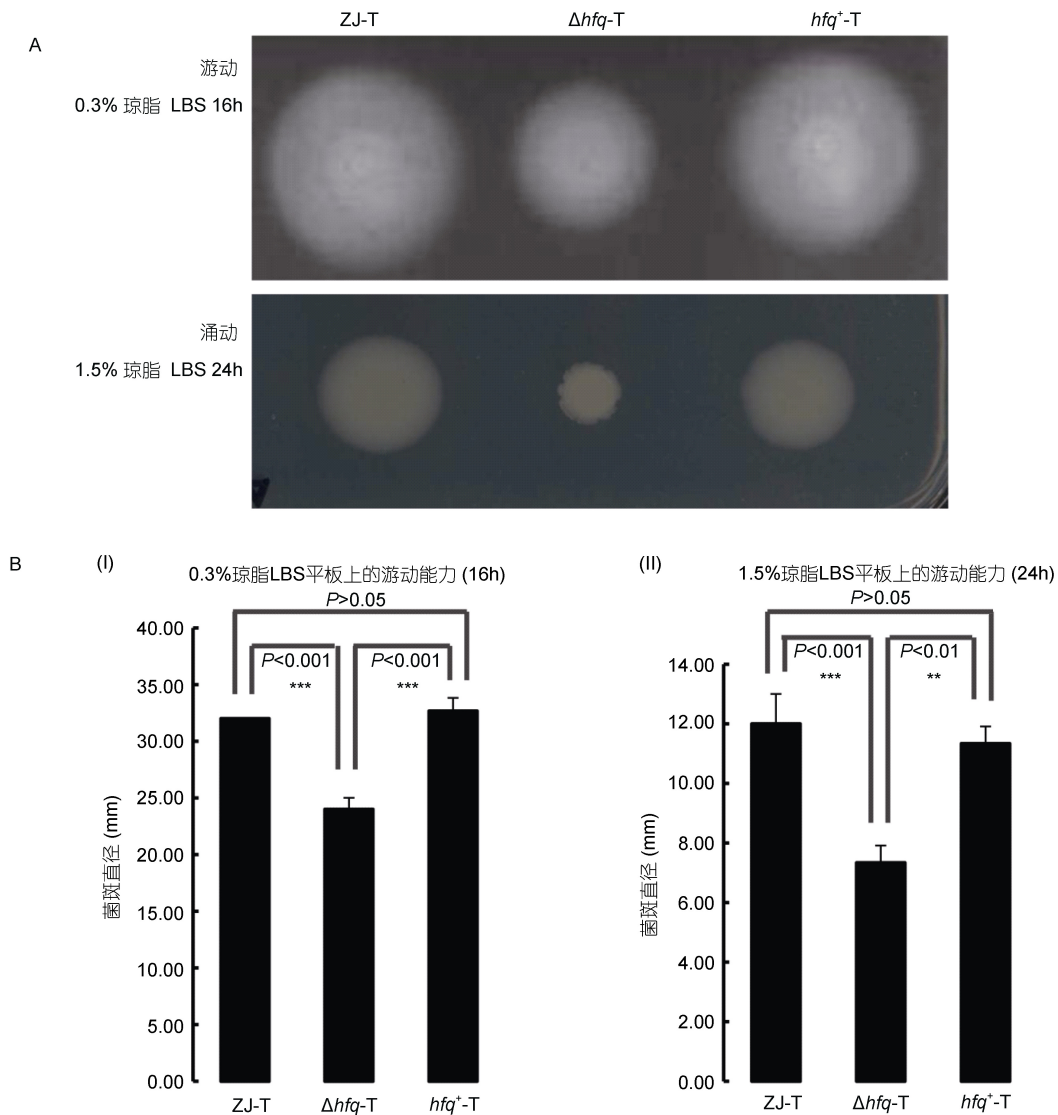


图 1 溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 在 0.3% 和 1.5% 琼脂 LBS 平板上的运动性(A)及统计分析(B)

Fig.1 Motility of ZJ-T, Δhfq -T and hfq^+ -T on 0.3% and 1.5% LBS agar plates (A) and statistical analysis (B)

2.2 *hfq* 缺失对溶藻弧菌生物膜形成的影响

在细菌生物膜形成的动态曲线中, 可见 *hfq* 缺失后并不影响生物膜成熟的时间, 仍可在 BF 培养基中, 30°C 静置培养 6 h 后到达顶峰, 且 *hfq* 的缺失并没有对成熟期生物膜的密度造成影响, 但其前期的合成速度明显下降, 而后期的解离速度上升(图 2)。以上结果说明, *hfq* 基因同时调控溶藻弧菌生物膜的形成和解离。

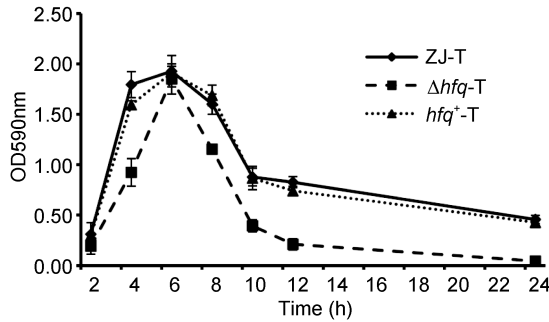


图 2 溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 细胞生物膜形成动力学曲线

Fig.2 Kinetic biofilm formation of ZJ-T, Δhfq -T and hfq^+ -T

2.3 *hfq* 缺失对溶藻弧菌铁离子代谢及胞外蛋白酶分泌的影响

摄铁系统和胞外蛋白酶是溶藻弧菌两个重要致病因子。从图 3 中可以看出, *hfq* 缺失后, 细菌在铁离子螯合剂 2-2'-联吡啶存在情况下生长有所减弱, 说明 *hfq* 的缺失, 减弱溶藻弧菌的摄铁能力; 此外从图 4 中看出, *hfq* 缺失后, 溶藻弧菌胞外蛋白酶的分泌显著增加($P < 0.01$)。

2.4 C1C12 细胞感染实验

经野生菌株 ZJ-T(图 5, e—h)和回补菌株 hfq^+ -T(图 5, m—p)感染的细胞, 在感染 1.0h 后即出现细胞变圆脱落; 并且随着感染时间延长, 变圆脱落的细胞逐渐增加。而 *hfq* 缺失后, 随着感染时间延长, 细胞变圆脱落现象几乎不发生(图 5, i—l), 与阴性对照组 DH5 α (图 5, a—d)表现一致。

以上结果说明, Hfq 正调控溶藻弧菌的细胞毒性。

2.5 石斑鱼致死性实验

为测定 *hfq* 突变后对溶藻弧菌毒力的影响, 用注射石斑鱼的方法对其进行动物毒力实验。结果显示(表 2), *hfq* 缺失后造成溶藻弧菌毒力丧失, 半数致死量 LD₅₀ 达到 2.8×10^9 CFU, 相比野生株和回补株提高了 3 个数量级。

3 讨论

hfq 缺失使得溶藻弧菌游动能力和涌动力都显

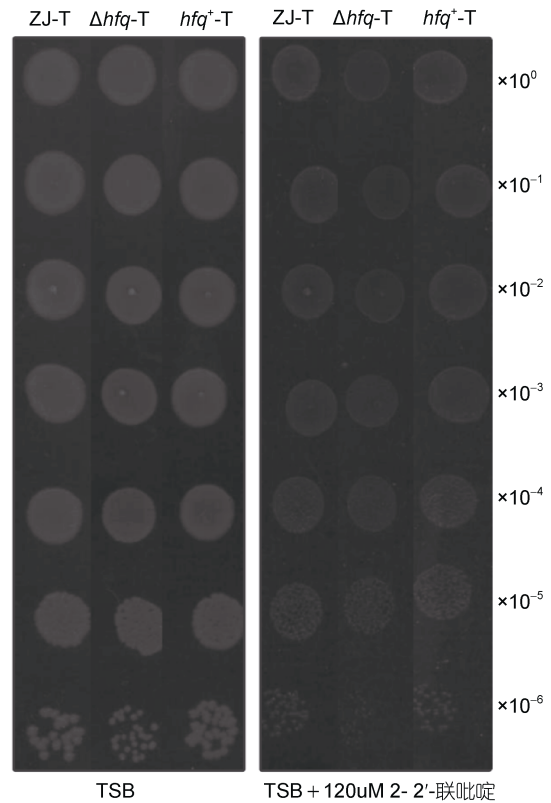


图 3 溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 在 TSB 以及 TSB 添加 120 μ mol/L 2-2'-联吡啶平板上的生长情况

Fig.3 Growth ability of ZJ-T, Δhfq -T and hfq^+ -T on TSB agar plate and TSB agar plate supplemented with 120 μ mol/L 2,2'-Bipyridyl

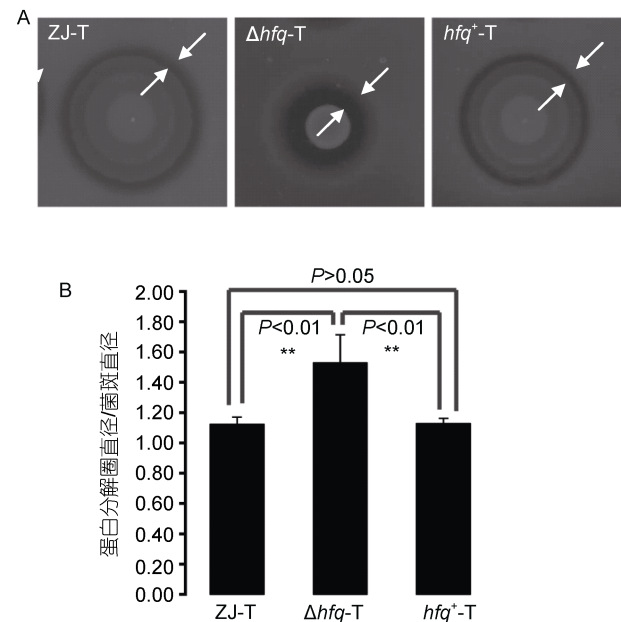


图 4 溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 在 LBS+1%脱脂奶粉平板上胞外蛋白酶的分泌(A)以及统计分析(B)

Fig.4 The extracellular protease activities of ZJ-T, Δhfq -T and hfq^+ -T on LBS agar plates containing 1% skimmed milk (A) and statistical analysis (B)

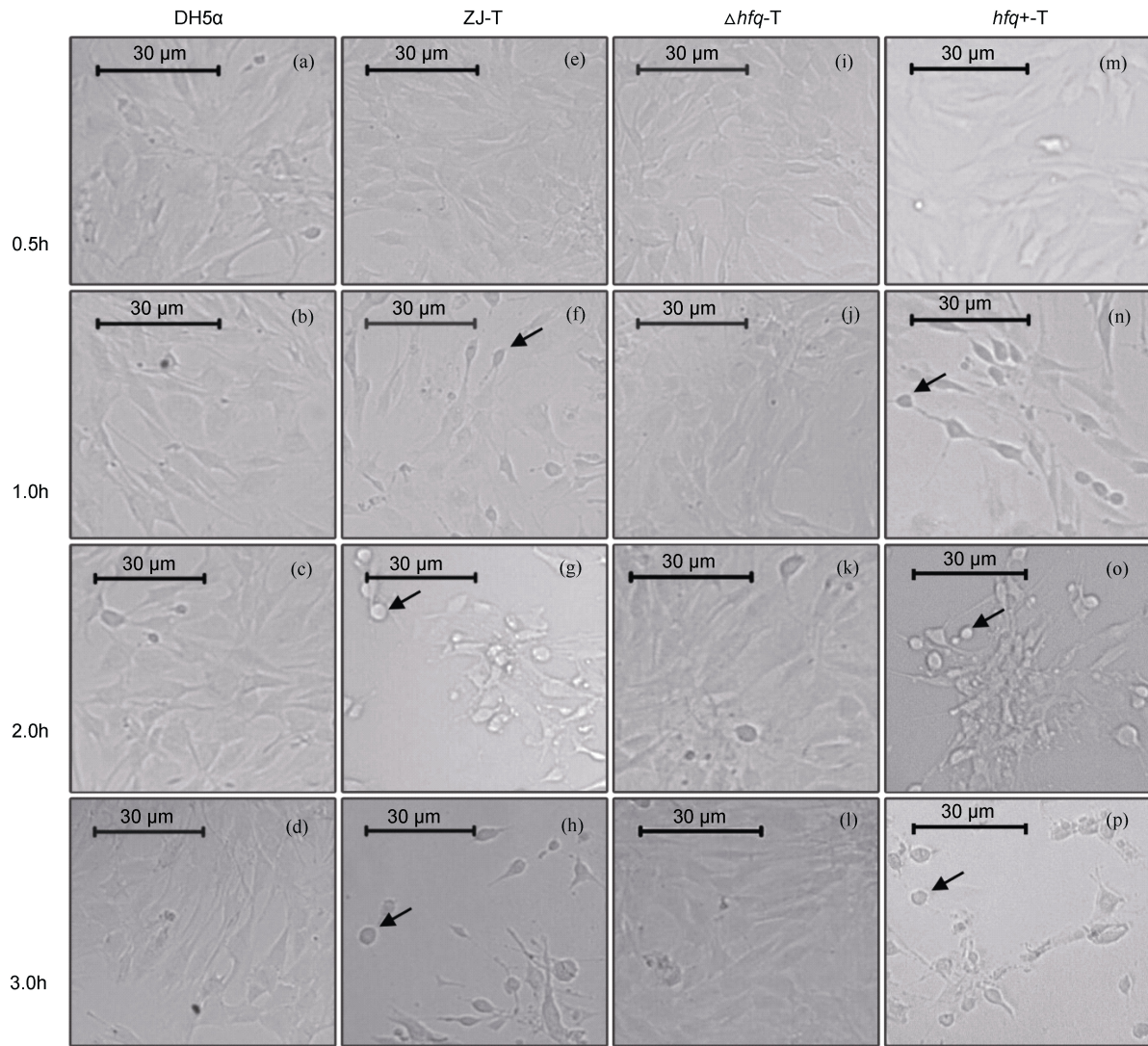


图 5 Hfq 正调控溶藻弧菌对 C2C12 的细胞毒性

Fig.5 Hfq positively regulated the cytotoxicity to C2C12 in *V. alginolyticus*

ZJ-T (e—h)、 Δhfq -T (i—l)、 hfq^+ -T (m—p), 并设置 DH5 α (a—d) 作为阴性对照。箭头指示变圆脱落细胞。比例尺=30 μ m

表 2 溶藻弧菌 ZJ-T、 Δhfq -T 和 hfq^+ -T 对石斑鱼的致死性
Tab.2 Virulence to *Epinephelus coioides* of ZJ-T, Δhfq -T and hfq^+ -T

Groups	Dose (CFU/fish)	No. of fish	No. of dead fish	Mortality (%)	LD ₅₀ (CFU/fish)
ZJ-T	3.3×10^7	5	5	100.00	2.3×10^6
	6.5×10^6	5	4	80.00	
	3.3×10^6	5	3	60.00	
	6.5×10^5	5	0	0.00	
Δhfq -T	3.1×10^9	5	3	60.00	2.8×10^9
	1.6×10^9	5	0	0.00	
	6.2×10^8	5	0	0.00	
	3.1×10^8	5	0	0.00	
hfq^+ -T	1.8×10^7	5	5	100.00	2.4×10^6
	9.0×10^6	5	5	100.00	
	9.0×10^5	5	1	20.00	
Sterile saline	100 μ L	5	0	0.00	—

著下降 ($P < 0.001$) (图 1A, 1B), 这与致肾盂肾炎大肠埃希菌 (*Uropathogenic Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中研究结果类似 (Sonnleitner *et al*, 2003; Sittka *et al*, 2007; Kulesus *et al*, 2008)。Hfq 缺失株很可能改变了溶藻弧菌鞭毛的生长 (Liu *et al*, 2011)。生物膜的形成在 Hfq 缺失的情况下减弱 (图 2), 这与霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 以及嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的结果相似 (Chao *et al*, 2010; Roscetto *et al*, 2012)。但与卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中的研究结果相悖 (Attia *et al*, 2008; Chao *et al*, 2010)。这是因为细菌的生物膜形成模式多样, 参与因子也各有不同

(Davey *et al*, 2000), 如大肠杆菌需要鞭毛的游动、I 型菌毛及外膜蛋白 Ag43 参与前期的附着, 而胞外多糖参与成熟; 在绿脓杆菌中初期附着即需要鞭毛、脂多糖(LPS)及外膜蛋白, 在生物膜成熟阶段, 则需要胞间通讯信号分子高丝氨酸类脂(acyl-HSLs, AHLs)及海藻酸钠(Alginate)的参与。因此, 这里 Hfq 很可能通过改变溶藻弧菌运动能力, 从而参与调控了前期的细胞附着过程。而成熟过程还可能受到分泌的胞外多糖、外膜蛋白以及各种信号分子的影响。

细胞毒性实验和石斑鱼感染实验都表明 *hfq* 缺失后, 溶藻弧菌毒力显著下降甚至消失(图 5, 表 2)。溶藻弧菌的主要毒力因子包括摄铁系统、粘附素、胞外产物、生物膜等(滕勇勇等, 2014; Wyckoff *et al*, 2015)。本研究发现, *hfq* 缺失株在限铁环境中生长减弱(图 3), 因此, Hfq 可能通过辅助相关 sRNAs 从而调控铁代谢相关基因的表达(Mellin *et al*, 2010; Deng *et al*, 2012), 达到调控溶藻弧菌毒力的作用。此外, 细菌感染宿主的第一步是粘附, 这主要通过粘附素来完成。前人研究表明溶藻弧菌对 Hep-2 细胞, 上皮细胞, 黑鲷的肠粘膜、鳃、表皮等都有较强的粘附作用(Baffone *et al*, 2001; Balebona *et al*, 2001)。其中鞭毛是溶藻弧菌菌毛粘附素之一, 本研究中 *hfq* 缺失株的运动性下降也可能导致其毒力下降。Berg 等(1995)和 Liang 等(2007)研究发现霍乱弧菌运动功能缺失后不仅影响其在肠道内定殖能力, 而且霍乱毒素、溶血素等毒力因子表达缺失(Berg *et al*, 1995; Liang *et al*, 2007)。因此, 溶藻弧菌很可能与霍乱弧菌存在一套相同的运动性调控致病性的系统, 即 Hfq 通过调控溶藻弧菌的运动能力, 从而调控其对宿主的粘附能力, 影响其在宿主体内的定殖, 并且调控其相关毒力因子的表达, 进而影响溶藻弧菌对宿主的致病性(Josenhans *et al*, 2002; Liang *et al*, 2007)。致病菌粘附定殖宿主后很容易形成生物膜, 与外界隔离并适应宿主环境, 起到自我保护作用。细菌形成生物膜主要通过减少宿主机体细胞因子产生、酶解宿主细胞因子等抗免疫机制以及对抗生素等的抗药性机制致病。从生物膜形成动态曲线(图 2)看出: 6h 后生物膜形成量达到最多; 24h 后 *hfq* 缺失株生物膜基本解离完全, 且此过程中 *hfq* 缺失株生物膜形成速度以及生物膜量均低于野生株和回补株, 因此, 在溶藻弧菌中生物膜的形成也与其毒力密切相关。此外, 本研究发现, *hfq* 缺失株胞外蛋白酶分泌显著增强($P < 0.01$) (图 4A, 4B)。因此, 溶藻弧菌胞外蛋白酶对所测试的 C2C12 细胞以及石斑鱼红细胞可

能不具有溶解作用, 而其溶血素、碱性丝氨酸蛋白酶(Alkaline serine exoprotease, AspA)等胞外产物调控其毒力作用(Toranzo *et al*, 1983; Chen *et al*, 2000)。

4 结语

Hfq 调控溶藻弧菌的运动、生物膜形成、铁代谢、胞外蛋白酶分泌等生理生化过程, 从而改变其对宿主的侵染粘附以及摄铁能力等, 并对宿主产生毒性。Hfq 作为分子伴侣, 协助相关 sRNAs 转录后调控相关基因表达, 而这些基因中很有可能存在毒力基因, 因此下一步通过研究 Hfq 依赖型 sRNAs 对溶藻弧菌致病性的调控, 寻找新的毒力相关基因, 这为控制溶藻弧菌病害暴发提供理论指导具有重要意义。

参 考 文 献

- 赖迎迢, 陶家发, 孙承文等, 2014. 鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察. 微生物学报, 54(11): 1378—1384
- 滕勇勇, 王 琪, 吴 雷等, 2014. 致病性弧菌的生物学特性和致病因子研究进展. 热带医学杂志, 14(10): 1396—1398
- Arce-Rodríguez A, Calles B, Nikel P I *et al*, 2015. The RNA chaperone Hfq enables the environmental stress tolerance super-phenotype of *Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology, <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13052>
- Attia A S, Sedillo J L, Wang W *et al*, 2008. *Moraxella catarrhalis* expresses an unusual Hfq protein. Infection and Immunity, 76(6): 2520—2530
- Austin B, 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology, 140(3—4): 310—317
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E *et al*, 2001. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. Food Microbiology, 18(5): 479—488
- Balebona M, Moriñigo M A, Borrego J, 2001. Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of *Vibrio* strains isolated from infected fish. International Microbiology, 4(1): 21—26
- Berg P, Singer M F, 1995. The recombinant DNA controversy: twenty years later. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(20): 9011—9013
- Berghoff B A, Glaeser J, Sharma C M *et al*, 2011. Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. Molecular Microbiology, 80(6): 1479—1495
- Campanelli A, Sanchez-Politta S, Saurat J H, 2008. Cutaneous ulceration after an octopus bite: infection due to *Vibrio alginolyticus*, an emerging pathogen. Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 135(3): 225—227
- Chao Y J, Vogel J, 2010. The role of Hfq in bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology, 13(1): 24—33
- Chen C, Xie J, Hu C Q, 2009. Phenotypic and genetic differences between opaque and translucent colonies of *Vibrio*

- alginoliticus*. Biofouling, 25(6): 525—531
- Chen F R, Liu P C, Lee K K, 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zeitschrift für Naturforschung C, 55(1—2): 94—99
- Cui M Q, Wang T K, Xu J *et al*, 2013. Impact of Hfq on global gene expression and intracellular survival in *Brucella melitensis*. PLoS One, 8(8): e71933
- Davey M E, O'toole G A, 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4): 847—867
- Deng Z L, Meng X R, Su S C *et al*, 2012. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar *microtus* expressed *in vivo* have differential Hfq-dependent stability. Research in Microbiology, 163(6—7): 413—418
- Feingold M H, Kumar M L, 2004. Otitis media associated with *Vibrio alginolyticus* in a child with pressure-equalizing tubes. The Pediatric Infectious Disease Journal, 23(5): 475—476
- Joelsson A, Kan B, Zhu J, 2007. Quorum sensing enhances the stress response in *Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology, 73(11): 3742—3746
- Josenhans C, Suerbaum S, 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. International Journal of Medical Microbiology, 291(8): 605—614
- Kulesus R R, Diaz-Perez K, Slechta E S *et al*, 2008. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 76(7): 3019—3026
- Liang W L, Pascual-Montano A, Silva A J *et al*, 2007. The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. Microbiology, 153(9): 2964—2975
- Liu H, Wang Q Y, Liu Q *et al*, 2011. Roles of Hfq in the stress adaptation and virulence in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* and its potential application as a target for live attenuated vaccine. Applied Microbiology and Biotechnology, 91(2): 353—364
- Mellin J R, McClure R, Lopez D *et al*, 2010. Role of Hfq in iron-dependent and -independent gene regulation in *Neisseria meningitidis*. Microbiology, 156(8): 2316—2326
- Newton A, Kendall M, Vugia D J *et al*, 2012. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996—2010: review of surveillance data from 2 systems. Clinical Infectious Diseases, 54(S5): S391—S395
- Nielsen A T, Dolganov N A, Otto G *et al*, 2006. RpoS controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. PLoS Pathogens, 2(10): e109
- Roschetto E, Angrisano T, Costa V *et al*, 2012. Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Bacteriology, 194(21): 5864—5874
- Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K *et al*, 2007. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology, 63(1): 193—217
- Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F *et al*, 2003. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. Microbial Pathogenesis, 35(5): 217—228
- Sonnleitner E, Schuster M, Sorger-Domenigg T *et al*, 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, 59(5): 1542—1558
- Sousa S A, Ramos C G, Moreira L M *et al*, 2010. The *hfq* gene is required for stress resistance and full virulence of *Burkholderia cepacia* to the nematode *Caenorhabditis elegans*. Microbiology, 156(3): 896—908
- Su Z H, Nakano M, Koga T *et al*, 2010. Hfq regulates anti-oxidative ability in *Vibrio parahaemolyticus*. The Journal of General And Applied Microbiology, 56(3): 181—186
- Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R *et al*, 1983. Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast. FEMS Microbiology Letters, 18(3): 257—262
- Weber B, Croxatto A, Chen C *et al*, 2008. RpoS induces expression of the *Vibrio anguillarum* quorum-sensing regulator VanT. Microbiology, 154(3): 767—780
- Wyckoff E E, Allred B E, Raymond K N *et al*, 2015. Catechol Siderophore Transport by *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology, 197(17): 2840—2849
- Xie Z Y, Hu C Q, Chen C *et al*, 2005. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Letters in Applied Microbiology, 41(2): 202—207

ROLE OF HFQ IN VIRULENCE REGULATION OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

DENG Yi-Qin^{1,2,4}, ZHAO Jing-Jing^{1,2}, LIU Song-Lin^{1,4}, ZHAO Zhe^{1,2}, CHEN Chang^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 3. Xisha/Nansha Ocean Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract To understand the role of Hfq in the virulence of *Vibrio alginolyticus*, we studied a series of virulence-related physiological and biochemical pathways comparatively among *V. alginolyticus* wild type strain ZJ-T, *hfq* mutant strain Δhfq -T, and the complementary strain *hfq*⁺-T. The results show that the swimming and swarming abilities of *hfq* null strain were significantly reduced ($P < 0.001$). Deletion of *hfq* decreased the biofilm formation while promoted the deattachment of *V. alginolyticus*. Hfq positively regulated iron metabolism and negatively regulated the secretion of extracellular proteases (ECPs) ($P < 0.01$). Compared to the wild type and complementary strains, the *hfq* deficient strain completely lost the ability for inducing C2C12 cell death, and increased lethal dose (LD₅₀) to *Epinephelus awoara* by three orders of magnitude. Therefore, Hfq is crucial in the virulence of *V. alginolyticus* by regulating motility, biofilm formation, iron metabolism, and secretion of ECPs. This study may provide an insightful theoretical basis for the prevention of vibriosis.

Key words *Vibrio alginolyticus*; Hfq; virulence