

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200504001

http://www.yykxjz.cn/

王小鹿, 李杰, 李贵阳, 唐磊, 杨慧超, 莫照兰. *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

WANG X L, LI J, LI G Y, TANG L, YANG H C, MO Z L. The effect of *rpoS* on Hcp expression and bactericidal activity in *Vibrio anguillarum* MHK3. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 125-134

## *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株 Hcp 表达 和杀菌能力的影响\*

王小鹿<sup>1,2</sup> 李杰<sup>2</sup> 李贵阳<sup>2</sup> 唐磊<sup>1,3</sup> 杨慧超<sup>2,4</sup> 莫照兰<sup>1,2,3①</sup>

- (1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 中国海洋大学三亚海洋研究院 海南 三亚 572000; 4. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

**摘要** 溶血素共调节蛋白(Hcp)的合成和分泌是六型分泌系统(T6SS)行使功能的重要特征。RNA 聚合酶的 $\sigma$ 亚基 RpoS 参与调节细菌的生长和应激反应。为了探究 RpoS 对鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*) T6SS 的调控作用,本研究构建了 MHK3 $\Delta rpoS$  突变株,检测了部分表型特征的变化;利用 *lacZ* 半乳糖苷酶报告基因检测了突变株 *hcp1* 和 *hcp2* 在转录水平的变化;进行 Western blot 并定量分析突变株 Hcp 在翻译水平的变化;并通过细菌拮抗实验检测了突变株杀菌能力的变化。结果显示, MHK3 $\Delta rpoS$  突变株的生长情况、泳动性、明胶酶活性及酪蛋白酶活性与 MHK3 野生株相比无显著差异( $P>0.05$ ),而平台早期的菌膜形成能力有显著上升( $P<0.05$ );在各生长时期, MHK3 $\Delta rpoS$  的 *hcp1* 和 *hcp2* 在转录水平的表达量均较 MHK3 有显著上升( $P<0.01$ ),最高时分别为 MHK3 的 1.79 倍和 1.94 倍;在翻译水平上, MHK3 $\Delta rpoS$  在胞内和胞外 Hcp 的分泌均有显著升高( $P<0.05$ ),最高时分别为 MHK3 的 1.59 倍和 1.31 倍;同时, MHK3 $\Delta rpoS$  对大肠杆菌(*Escherichia coli*) E5 的杀菌能力约为 MHK3 的 1%。研究表明, *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株的生长情况、泳动性、明胶酶活性及酪蛋白酶活性均无显著调控作用,但对平台早期的菌膜形成能力具有一定的负调控作用,在转录和翻译水平上也负调控 Hcp 的表达。而在杀菌能力上, *rpoS* 发挥一定的正调控作用。说明菌株的杀菌能力强弱并非直接与 Hcp 的表达和分泌量正相关。本研究为进一步阐明 T6SS 的调控机制及其介导的杀菌作用机制提供了新思路,并丰富了其理论基础。

**关键词** 鳗弧菌; *rpoS*; Hcp; T6SS; 杀菌

**中图分类号** Q93.31 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0125-10

\* 国家重点研发计划(2019YFD0900103)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020XT0406)和海南重要水产养殖动物全基因组育种技术研发(SKJC-KJ-2019KY01)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900103), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020XT0406), and Research and Development of Whole Genome Breeding Technology for Hainan Economic Aquaculture Species(SKJC-KJ-2019KY01)]. 王小鹿, E-mail: wxiaolu907@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 教授, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-05-04, 收修改稿日期: 2020-07-05

细菌向外界环境或宿主进行物质输送是通过蛋白分泌系统跨膜转运蛋白实现的。在革兰氏阴性细菌(G)中已发现 6 种蛋白分泌系统(Holland, 2010)。其中, VI型分泌系统(T6SS)于 2006 年首次在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中发现(Pukatzki *et al*, 2006), 其结构类似于倒置的 T4 噬菌体(Boyer *et al*, 2009), 广泛存在于不同种类的细菌中。T6SS 的结构组成在不同细菌间存在差异, 但其核心结构均由至少 13 个蛋白组成, 组装成类似“注射器”的跨膜结构(Aksyuk *et al*, 2009)。其中, 溶血素共调节蛋白(Hcp)与缬氨酸-甘氨酸重复蛋白 G (VgrG)既是 T6SS 的结构蛋白, 也是 T6SS 的分泌蛋白, 它们形成“注射器”的针尖, 可刺穿靶细胞的细胞膜, 将效应蛋白释放进靶细胞或周围环境中(Pukatzki *et al*, 2009), 以实现 T6SS 在细菌的种间竞争(Pukatzki *et al*, 2009; Dana *et al*, 2010; Basler *et al*, 2013; Hood, 2010)、与其他细菌相互作用、提高自身环境适应性及适应外界环境变化等功能(Aschtgen *et al*, 2008; Weber *et al*, 2009; Schwarz *et al*, 2010; Murdoch *et al*, 2011)。因此, Hcp 或 VgrG 的分泌与否代表了 T6SS 是否发挥了功能。T6SS 功能的发挥受多种因素调控, 包括磷酸化机制、密度感应系统(quorum sensing, QS)、铁离子、 $\sigma$  因子、环境因子及胆盐(Hsu *et al*, 2009; Sheng *et al*, 2012; Casabona *et al*, 2013; Salomon *et al*, 2013; Burtnick *et al*, 2013; Shao *et al*, 2014; 王晓冉, 2017)等。

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)生存于各种海洋环境中, 同时也是多种海洋生物的正常菌群之一, 因此,

适应不同的海洋环境是其生存的重要机制。研究发现, 密度感应系统、RpoS 等因子在鳃弧菌的菌膜形成和存活中发挥作用(Croxatto *et al*, 2002; Buch *et al*, 2003; Weber *et al*, 2008)。进一步研究发现, T6SS 在调控鳃弧菌的 QS 和应激反应中发挥作用(Weber *et al*, 2009)。我们通过全基因组序列测定和分析, 发现不同的鳃弧菌菌株存在不同拷贝的 T6SS。比如, 致病株 M3 的基因组具有 2 套 T6SS, 分别分布在染色体 I 和染色体 II 上(Li, 2013), 而非致病株 MHK3 仅在染色体 II 上有 1 套 T6SS。在 M3 的胞内胞外均未检测到 Hcp (Li, 2013); 相反, 在 MHK3 的胞内胞外均可检测到 Hcp, 并发现 Hcp 的分泌影响 MHK3 对其他细菌的杀菌活力(Tang, 2016)。以上发现说明, 不同鳃弧菌菌株在 T6SS 的表达和功能上存在差异。*rpoS* 编码 RpoS 因子, 又叫  $\sigma^S$ , 是 RNA 聚合酶的  $\sigma$  亚基, 是一种广泛性调节因子, 在细菌的生长、应激反应中发挥重要作用(Tian *et al*, 2008)。研究发现, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组中, 23%的基因受到 RpoS 的调控(Wong *et al*, 2017)。在鳃弧菌和假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)中, RpoS 参与了 T6SS 的调控(Weber *et al*, 2009; Guan *et al*, 2015)。为了明确 RpoS 是否参与调控鳃弧菌 T6SS 的表达, 本研究构建了鳃弧菌 MHK3 的 *rpoS* 突变株, 检测了该突变株的表型特征及其 Hcp 在转录和翻译水平上的表达情况, 并探究了该突变株的杀菌活性, 以进一步认识 *rpoS* 的调控机制及鳃弧菌 T6SS 在环境适应中的作用机制。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Tab.1 The strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特点 Characteristics	来源 Source
MHK3	Wild-type <i>V. anguillarum</i> strain, Amp <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> , Cm <sup>s</sup>	本实验室 Lab collection
MHK3 $\Delta$ <i>rpoS</i>	MHK3 <i>rpoS</i> mutant with deletion from 25 bp to 859 bp, Amp <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> , Cm <sup>s</sup>	本研究 This study
MHK3 <i>lacZ::hcp1</i> $\Delta$ <i>rpoS</i>	MHK3 $\Delta$ <i>rpoS</i> with <i>lacZ</i> fusion into upstream of <i>hcp1</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	本研究 This study
MHK3 <i>lacZ::hcp2</i> $\Delta$ <i>rpoS</i>	MHK3 $\Delta$ <i>rpoS</i> with <i>lacZ</i> fusion into upstream of <i>hcp2</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	本研究 This study
MHK3 <i>lacZ::hcp1</i>	MHK3 with <i>lacZ</i> fusion into upstream of <i>hcp1</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	唐磊(2016)
MHK3 <i>lacZ::hcp2</i>	MHK3 with <i>lacZ</i> fusion into upstream of <i>hcp2</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	唐磊(2016)
DH5a	<i>Escherichia coli</i> , f80d <i>lacZ</i> DM15 <i>recA1 endA1 gyrA96 relA1 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>) supE44 deoR <math>\Delta</math> (lacZYA-argF)U169</i>	天合生物 Taihe Biotechnology
SM10( $\lambda$ <i>pir</i> )	<i>E. coli</i> , <i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA-Rp4-2-Tc-Mu Km<sup>r</sup> <math>\lambda</math>pir</i>	Miller 等(1988)
S17-1( $\lambda$ <i>pir</i> )	<i>E. coli</i> , <i>Tp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> recA, thi pro hsdR<sup>r</sup> M<sup>r</sup> RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7<math>\lambda</math>pir</i>	Simon 等(1983)
MC1061( $\lambda$ <i>pir</i> )	<i>E. coli</i> , <i>thi thr-1 leu6 proA2 his-4 argE2 lacY1 galK2 aral4 xyl5 supE44 <math>\lambda</math>pir</i>	Rubirés 等(1997)
E5	<i>E. coli</i> , Rif <sup>r</sup> , Amp <sup>s</sup>	本实验室 Lab collection
pRE112	pGp704 suicide plasmid, <i>oriT, oriV, sacB</i> , Cm <sup>r</sup>	Edwards 等(1998)
pVIK112	Plasmid with <i>lacZ</i> reporter, Km <sup>r</sup>	Kalogeraki 等(1997)

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株、质粒和培养条件** 本实验所使用的菌株和质粒及相关信息见表 1。大肠杆菌的培养基为 LB, 培养条件为 37℃、150 r/min; 鳗弧菌的培养基为 TSB 或 TSA, 培养条件为 28℃、150 r/min; 杀菌实验所用培养基为含 3% NaCl 的 LB 培养基。根据实验需要, 培养基中添加的抗生素浓度分别为氯霉素 (Cm) 10 μg/mL、氨苄青霉素 (Amp) 50 μg/mL、卡那霉素 (Km) 50 μg/mL、利福平 (Rif) 200 μg/mL。

**1.1.2 主要试剂和仪器** *Taq* 酶、限制性内切酶和 T4 连接酶等购自 TaKaRa; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 OMEGA; 戊二醛固定液和 ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 购自 Solarbio 公司; 2% 的磷钨酸购自北京中镜科仪; 大鼠抗 Hcp 抗体为本实验室前期制备, 小鼠抗 RNAP 购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗大鼠 IgG 购自中杉金桥。生物恒温培养箱购自上海一恒, 低温离心机购自德国 Eppendorf 公司, PCR 仪购自美国 Life 生物公司, 电转杯、电转仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 MHK3Δ*rpoS* 突变株的构建

通过 Overlap PCR (Ho *et al*, 1989) 获得 *rpoS* 基因缺失片段 *DrpoS*, 然后通过二次同源重组方法 (O'toole *et al*, 1997) 获得 Δ*rpoS* 突变株, 所用引物见表 2。首先, 以 MHK3 基因组 DNA 为模板, 用引物 MHK3-*rpoS*-dele-for/MHK3-*rpoS*-int-rev 和 MHK3-*rpoS*-int-for/MHK3-*rpoS*-dele-rev 分别进行 PCR 扩增获得 *rpoS* 的上游、下游同源臂片段。将上下游同源臂 PCR 产物混合作

为模板, 以引入 *KpnI* 酶切位点的引物 MHK3-*rpoS*-dele-for/rev 进行 PCR, 将上下游同源臂连接, 得到缺失 *rpoS* 基因内 25~859 bp 的片段 *DrpoS*。将该片段与自杀质粒 pRE112 连接, 得到 pRE112 重组子, 再将该重组子依次电转到感受态细胞 SM10 和 S17-1 中。S17-1 (pRE112-*DrpoS*) 作为接合供体菌株, 与受体菌 MHK3 进行接合实验。以蔗糖-氯霉素平板筛选阳性克隆, 最后以引物 MHK3-*rpoS*-dele-for/rev 对阳性克隆进行 PCR, 对产物测序, 确认突变株构建成功。

### 1.3 MHK3 *lacZ* 融合菌株的构建

通过携带 *lacZ* 报告基因的 pVIK112 质粒, 构建 MHK3Δ*rpoS* 的 *lacZ* 融合菌株: MHK3*lacZ*::*hcp1*Δ*rpoS* 和 MHK3*lacZ*::*hcp2*Δ*rpoS*。以 MHK3*lacZ*::*hcp1*Δ*rpoS* 的构建为例, 以 MHK3 基因组 DNA 为模板, 以引物 MHK3-*hcp1*-*lacZ*-for/rev 进行 PCR 扩增, 获得 *hcp1* 同源臂 DNA 片段, 将该同源臂 DNA 片段与 pVIK112 质粒连接, 得到 pVIK112 重组子。将该重组子依次电转至感受态细胞 MC1061 和 S17-1 中。S17-1 (pVIK112-*hcp1*) 作为接合供体菌株, 与受体菌 Δ*rpoS* 进行接合实验, 将 *lacZ* 插入到 Δ*rpoS* 的 *hcp1* 的启动子区域, 利用 pVIK112 载体的卡那霉素抗性 (Km<sup>r</sup>) 筛选阳性克隆。以引物 MHK3-*hcp1*-*lacZ*-for/*lacZ*-rev 对阳性克隆进行 PCR 并测序确认。用同样的方法构建了 MHK3*lacZ*::*hcp2*Δ*rpoS*。

### 1.4 MHK3 和 MHK3Δ*rpoS* 的表型检测

对鳗弧菌 MHK3 和 MHK3Δ*rpoS* 的生长情况、菌体形态、泳动性、胞外酶分泌及菌膜形成能力等表型特征进行检测。进行生长曲线测定时, 将过夜培养的 MHK3 和 MHK3Δ*rpoS* 的菌液调节至 OD<sub>540 nm</sub> = 0.5, 以 1:100 的比例转接至盛有 200 mL 新鲜 TSB 培养

表 2 本研究所用引物

Tab.2 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'~3')
MHK3- <i>rpoS</i> -dele-for	AAG <u>G</u> TACC GTTGATTCAA AAGGTAAGC ( <i>KpnI</i> 识别位点)
MHK3- <i>rpoS</i> -int-rev	GGGTTAAGTTAATTTTC'ATTGCTGATACTCATAGCG
MHK3- <i>rpoS</i> -int-for	GAAATTA ACTTAAACCCGTG
MHK3- <i>rpoS</i> -dele-rev	AAGG <u>TACC</u> TACCTCACTTAGCCAACG
MHK3- <i>hcp1</i> - <i>lacZ</i> -for	CCGGAATTCGTAATCTAAAA'GGGCTTATCGTG ( <i>EcoRI</i> 识别位点)
MHK3- <i>hcp1</i> - <i>lacZ</i> -rev	TGCTCTAGAGACGCGCTTTC AAGTTTAGTG ( <i>XbaI</i> 识别位点)
MHK3- <i>hcp2</i> - <i>lacZ</i> -for	CCGGAATTC CGTCATCACCTTCCCGTTAGTC
MHK3- <i>hcp2</i> - <i>lacZ</i> -rev	TGCTCTAGAAACGCGCTTTCGAGTG TAGTAGT
<i>lacZ</i> -rev	TTGAGGGGACGACGACAGTAT

注: 划线部分为限制性内切酶酶切位点

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites

基的三角瓶中,每株菌设3个平行,于28℃摇床培养。在不同时间点测定培养液的OD<sub>540 nm</sub>;每个平行取3个样品测量,将每个时间点测得的OD<sub>540 nm</sub>取平均值,绘制生长曲线。

进行透射电镜形态观察时,采用磷钨酸负染色法制备样品。将过夜培养的MHK3和MHK3 $\Delta$ rpoS的菌液于1000 r/min离心5 min,弃上清液后,以无菌PBS重悬菌体沉淀,滴入2~4 mL 0.5%戊二醛固定液,于4℃固定30 min。低速离心后,用无菌水轻轻吹洗,制成菌悬液。用倒置法将铜网倒扣在菌液上,静置数分钟,用滤纸吸去多余的液体,滴加2%的磷钨酸,染色1~2 min后,用滤纸吸去染液,待干后用于电镜观察。

以含0.3%琼脂的TSA平板测定细菌的泳动性,在接种后24 h和30 h测量泳动圈直径;以含1%明胶的2216E平板检测胞外明胶酶活性,在接种后24 h和48 h时测定明胶酶透明圈直径;以含1%脱脂奶粉的酪蛋白平板检测酪蛋白酶的产生(郭东升,2009)。在接种后48 h和72 h时,测定酪蛋白酶透明圈的直径。按照郝彬(2012)的方法,检测菌膜形成能力,使用96孔细胞培养板培养细菌,在培养至8 h和24 h时分别取出,吸弃培养基,得到粘附在培养板上的菌膜。依次进行固定、1%结晶紫染色、95%乙醇脱色,测定OD<sub>595 nm</sub>。上述实验每株菌至少设置3个平行,每个平行至少取样3次。

### 1.5 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定

用ONPG方法(Zheng *et al.*, 2007)对鳗弧菌MHK3lacZ::hcp1 $\Delta$ rpoS和MHK3lacZ::hcp2 $\Delta$ rpoS进行 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定。将过夜培养的菌液调节至OD<sub>540 nm</sub>=0.5,以1:100的比例转接至新鲜的TSB培养基中,于28℃摇床中培养,每株菌设3个平行。在培养至3、6、12、24、36、72和96 h时,取适量菌液,将菌液浓度调节至OD<sub>540 nm</sub>为0.5,用于检测 $\beta$ -半乳糖苷酶活性。每分钟水解ONPG的数量为酶活性单位。

### 1.6 Western blot 检测 Hcp

以Western blot检测鳗弧菌MHK3及MHK3 $\Delta$ rpoS的Hcp表达和分泌情况。菌液培养方法及取样时间同1.5。用TCA-丙酮沉淀法(Beuzón *et al.*, 1999)提取细菌的胞内蛋白(ICP)和胞外蛋白(ECP)。取10  $\mu$ L蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜上,以大鼠抗Hcp抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠IgG为二抗,进行蛋白杂交,检测Hcp。以RNAP(RNA polymerase)蛋白作为检测胞内蛋白的内参,检

测时用小鼠抗RNAP为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG为二抗。最后用ECL化学发光方法对PVDF膜进行显色曝光。采用ImageJ图像分析软件对蛋白条带结果进行分析。

### 1.7 抑菌检测

鳗弧菌野生株MHK3具有杀菌能力(Tang *et al.*, 2016)。为了确定 $\Delta$ rpoS突变株的杀菌能力是否受到影响,以大肠杆菌E5为靶细胞比较MHK3和MHK3 $\Delta$ rpoS的杀菌能力。参考Tang等(2016)的方法进行细菌接触抑制实验。将过夜培养的菌液调节至OD<sub>540 nm</sub>为0.5,按照鳗弧菌:大肠杆菌=4:1(V:V)的比例混合菌液,制备实验组共培养体系(MHK3+E5和MHK3 $\Delta$ rpoS+E5);按照鳗弧菌:PBS=4:1和PBS:大肠杆菌=4:1的比例混合菌液,制备空白组共培养体系(MHK3+PBS、MHK3 $\Delta$ rpoS+PBS和PBS+E5)。取各体系菌液25  $\mu$ L,点接于MLB平板上,于28℃培养4 h,用PBS洗下菌苔,混匀后进行梯度稀释,将适宜稀释度的菌液分别涂布于TSA+Amp和LB+Rif平板,测定鳗弧菌和大肠杆菌E5的数量。上述实验进行3次重复,每个共培养体系设置3组平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的构建和表型检测

**2.1.1 菌株的构建** 实验扩增得到了DrpoS,完成pRE112重组子的构建,通过电转化以及接合实验进行了二次同源重组,经PCR筛选得到突变株的阳性克隆并测序验证,最终得到rpoS基因的25~879 bp部分缺失的MHK3 $\Delta$ rpoS突变株。实验也扩增得到hcp1和hcp2同源臂DNA片段,分别与pVIK112质粒连接得到重组子,经电转化和接合实验,最终获得目的菌株MHK3lacZ::hcp1 $\Delta$ rpoS和MHK3lacZ::hcp2 $\Delta$ rpoS。

**2.1.2 生长曲线的测定** 在TSB培养基正常培养条件下,测定本实验构建的 $\Delta$ rpoS突变株、融合株与野生型MHK3的生长情况,统计结果绘制生长曲线(图1)。4株实验菌株在各生长阶段的生长趋势及速度非常接近,数据分析显示,菌株之间不具有显著性差异( $P>0.05$ )。说明在正常培养条件下,rpoS基因的敲除及lacZ报告基因的插入均未对MHK3的生长产生显著影响。

**2.1.3 电镜形态检测** 利用透射电镜观察菌株的细胞形态。电镜照片显示, $\Delta$ rpoS突变株的细胞形态和大小与MHK3野生菌株相比均无明显变化,均存

在正常的、单一的极性鞭毛, 单个菌体形态如图 2 所示。说明 *rpoS* 的缺失未对 MHK3 的细胞形态特征产生明显影响。

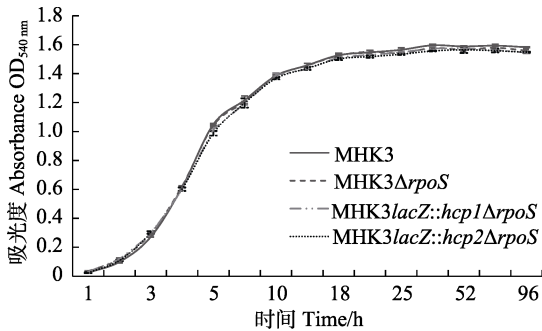


图 1 实验菌株的生长曲线  
Fig.1 The growth curves of strains

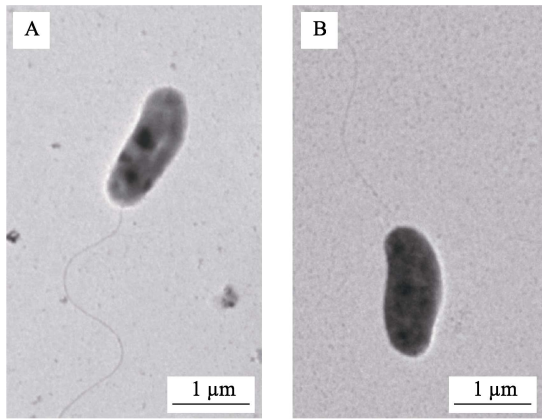


图 2 MHK3(A)及 MHK3ΔrpoS(B)的透射电镜照片  
Fig.2 Transmission electron micrographs of MHK3 (A) and MHK3ΔrpoS (B)

**2.1.4 泳动性、明胶酶和酪蛋白酶活性检测** 分别对鳗弧菌 MHK3 野生株和  $\Delta rpoS$  突变株的泳动圈直径、明胶酶透明圈直径及酪蛋白酶透明圈直径进行测量并进行数据统计。结果显示,  $\Delta rpoS$  突变株与 MHK3 野生株在泳动性、明胶酶活性和酪蛋白酶活性上均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 说明在鳗弧菌 MHK3 株中 *rpoS* 对这 3 种表型特征无显著影响。

**2.1.5 菌膜形成能力检测** 对野生株 MHK3 及  $\Delta rpoS$  突变株的菌膜形成能力检测结果如图 3 所示。在培养至 8 h 即对数生长期, 二者的菌膜形成情况无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 而在 24 h 即平台早期时,  $\Delta rpoS$  突变株的菌膜形成能力比野生株 MHK3 有显著上升 ( $P < 0.01$ )。说明在平台早期的鳗弧菌 MHK3 中, *rpoS* 对菌膜的形成发挥一定的负调控作用。

**2.2  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定**

对 MHK3lacZ::hcp1/hcp2 和 MHK3lacZ::hcp1/

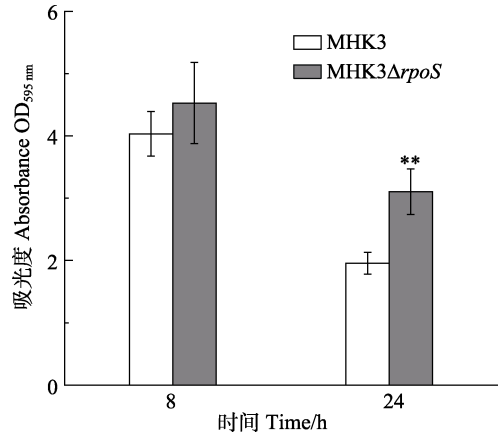


图 3 MHK3 及 MHK3ΔrpoS 的菌膜形成能力检测  
Fig.3 Test of biofilm production of MHK3 and MHK3ΔrpoS

\*\*代表差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同  
\*\* represents highly significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below

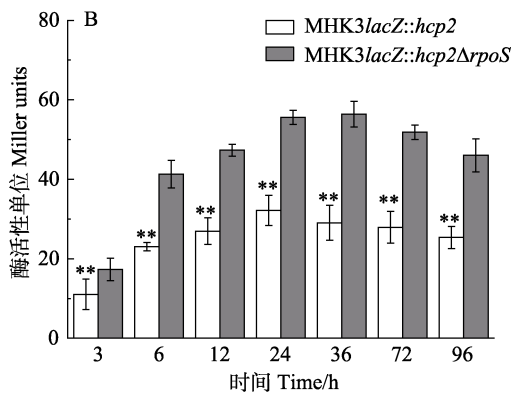
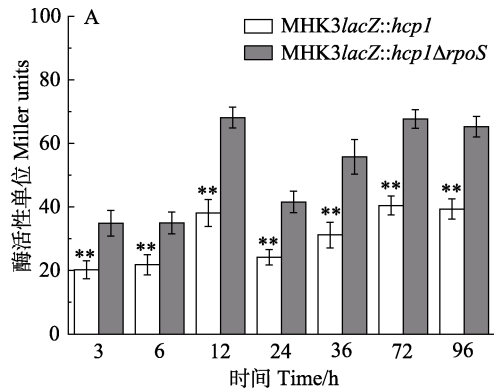


图 4  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定结果

Fig.4 Results of  $\beta$ -galactosidase activity assay

A: MHK3lacZ::hcp1 和 MHK3lacZ::hcp1ΔrpoS 的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性; B: MHK3lacZ::hcp2 和 MHK3lacZ::hcp2ΔrpoS 的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

A:  $\beta$ -galactosidase activity assay of MHK3lacZ::hcp1 and MHK3lacZ::hcp1ΔrpoS; B:  $\beta$ -galactosidase activity assay of MHK3lacZ::hcp2 and MHK3lacZ::hcp2ΔrpoS. \* represents significant difference ( $P < 0.05$ )

*hcp2ΔrpoS* 进行 β-半乳糖苷酶活性的测定结果见图 4。由图 4A 可看出, *MHK3lacZ::hcp1ΔrpoS* 在检测的每个时间点的 β-半乳糖苷酶活性均显著高于 *MHK3lacZ::hcp1* ( $P<0.01$ ), 在 12 h 和 36 h 时(对数生长期和平台期)均达到 1.79 倍。由图 4B 可看出, *MHK3lacZ::hcp2ΔrpoS* 在各时间点的 β-半乳糖苷酶活性也显著高于 *MHK3lacZ::hcp2* ( $P<0.01$ ), 在 36 h (生长平台期)时, 达到 1.94 倍。表明 *rpoS* 对鳃弧菌 *MHK3* 中 *hcp1* 和 *hcp2* 的转录发挥一定的负调控作用。

### 2.3 Western blot 检测蛋白水平的表达

通过 Western blot 检测鳃弧菌 *MHK3* 及 *MHK3ΔrpoS* 的 Hcp 胞内表达和胞外分泌情况, 结果如图 5 所示。图 5A 为胞内 Hcp 的检测结果, 在 6、12、24、36 和

72 h 时, *MHK3* 及 *MHK3ΔrpoS* 均有 Hcp 蛋白表达。在 3 h 即对数生长前期, 2 株菌的 Hcp 表达较少。随着细菌的生长, Hcp 的表达开始增多并趋于稳定, 在 72 h 即平台末期开始逐渐减少。定量分析结果见图 5C, 在 6、12 和 24 h (对数生长期, 平台早期), *ΔrpoS* 突变株的 Hcp 表达量显著高于野生株 *MHK3* ( $P<0.05$ ), 24 h 时达 1.59 倍。图 5B 为胞外分泌 Hcp 的检测结果, 在 6 和 12 h (对数生长期)分泌的 Hcp 较多, 细菌生长到 24 h (平台早期)后, 分泌的 Hcp 开始减少, 到 72 和 96 h (平台末期, 衰退期)几乎检测不到分泌的 Hcp。定量分析结果见图 5D, 在 6 和 12 h (对数生长期)时, *ΔrpoS* 突变株的 Hcp 表达量显著高于野生株( $P<0.05$ ), 12 h 时达 1.31 倍。以上结果表明, *rpoS* 对对数生长期和平台早期的鳃弧菌 *MHK3* 的 Hcp 蛋白表达和分泌具有一定的负调控作用。

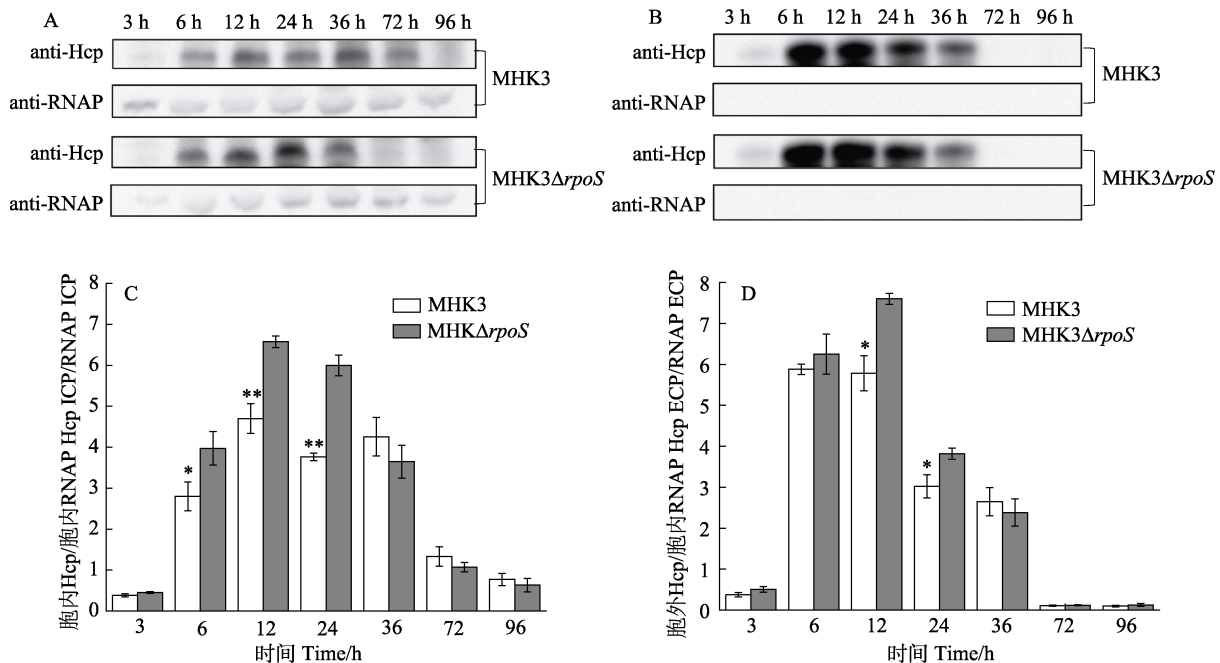


图 5 *rpoS* 对鳃弧菌 *MHK3* 不同生长时期 Hcp 表达的影响

Fig.5 Effects of gene *rpoS* on the expression of Hcp in different growth periods of *V. anguillarum* *MHK3*

A 和 C: 菌株不同生长时期的胞内 Hcp 蛋白含量; B 和 D: 菌株不同生长时期的胞外 Hcp 蛋白含量。

\*代表差异显著( $P<0.05$ )。下同

A and C: Hcp protein content in intracellular proteins of each strain during growth period; B and D: Hcp protein content in extracellular proteins of various growth stages of strains. The same as below

### 2.4 细菌拮抗实验

鳃弧菌 *MHK3* 株具备氨基青霉素抗性, 而对利福平敏感; 靶细菌大肠杆菌 E5 对氨基青霉素敏感, 而具备利福平抗性。故涂布于 TSA+Amp 平板上得到的是杀菌实验后鳃弧菌 *MHK3* 的数量, LB+Rif 平板上得到的是靶细菌大肠杆菌 E5 的数量, 结果如图 6 所示。在 *MHK3*+E5 的作用体系中, *MHK3* 杀菌后的

数量与对照组相比有极显著增长( $P<0.01$ ); 同时, 杀菌实验后, 靶细菌 E5 的数量与对照组相比极显著降低( $P<0.01$ ), 其存活率不到对照组的百万分之一(图 6A); 在 *MHK3ΔrpoS*+E5 的作用体系中, *MHK3ΔrpoS* 杀菌实验后的数量与对照组相比也有极显著增长( $P<0.01$ ), 同时, 靶细菌 E5 的数量也较对照组显著降低( $P<0.01$ ), 存活率为对照组的万分之一(图 6B)。



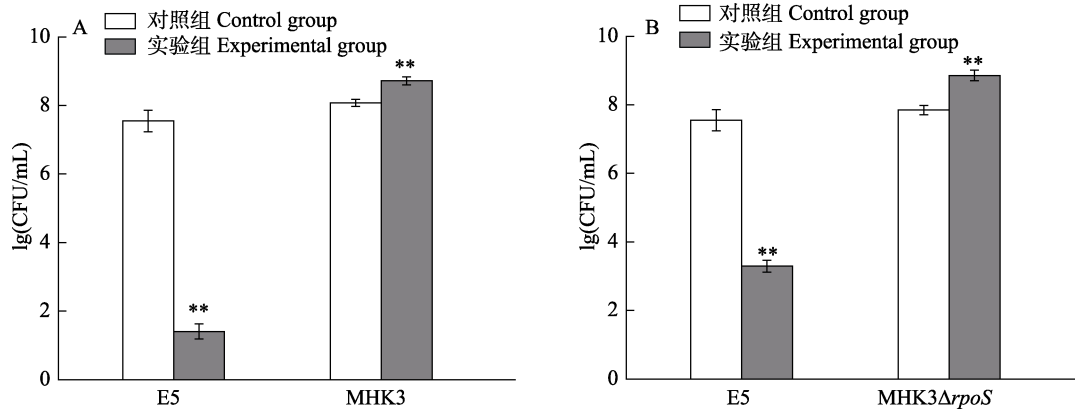


图 6 鳃弧菌对大肠杆菌 E5 的杀菌作用

Fig.6 *V. anguillarum* display bactericidal activity towards *E. coli* E5

A: 鳃弧菌野生株 MHK3+大肠杆菌 E5; B: 鳃弧菌突变株 MHK3ΔrpoS+大肠杆菌 E5

A: *V. anguillarum* wild-type strain MHK3+*E. coli* E5; B: *V. anguillarum* mutant MHK3ΔrpoS+*E. coli* E5

以上实验结果显示,在与大肠杆菌 E5 的混合培养体系中,鳃弧菌 MHK3 及突变株 MHK3ΔrpoS 对大肠杆菌 E5 均具有显著杀菌能力,且同时维持自身在混合培养体系的数量优势。但通过比较与野生株 MHK3 和突变株 MHK3ΔrpoS 混合培养的靶细菌 E5 的存活率,发现 *rpoS* 的缺失使鳃弧菌 MHK3 对靶细菌大肠杆菌 E5 的杀菌能力显著降低到原来的 1% ( $P < 0.01$ )。以上结果表明,*rpoS* 参与调控鳃弧菌 MHK3 的杀菌能力,并发挥一定的正调控作用。

### 3 讨论

鳃弧菌为革兰氏阴性菌,是海水环境中广泛存在的正常菌群,也是水生生物肠道微生物的正常组成部分。但在水产养殖中,当养殖密度过高或水体环境变差时,鳃弧菌极易被诱导成致病菌,可感染鱼类、双壳贝类及甲壳动物等(Paillard *et al*, 2004; Aguirre-Guzmán *et al*, 2004)。目前,对于鳃弧菌的具体致病机制和环境适应机制的探究还不够完善。唐磊(2016)研究发现,在鳃弧菌非致病株 MHK3 中具有一套正常表达的 T6SS。岳舒(2015)研究表明,环境因子(温度、盐度及 pH)对 MHK3 的 Hcp 合成及分泌具有调控作用,密度感应系统调节因子 *luxO* 正调控 Hcp 的分泌,但抑制 T6SS 的表达。而 *tsrA* 对 MHK3 中的 Hcp 和 T6SS 均具有负调控作用(唐磊, 2016)。以上 *luxO* 和 *tsrA* 对 MHK3 的 T6SS 的调控同在霍乱弧菌中的调控作用是相反的(Ma *et al*, 2009),表明不同弧菌、不同菌株为了提高自身对环境的适应性,对 T6SS 的调控机制也在不断进化,产生差异。

鳃弧菌 MHK3 中的 *rpoS* 含有 1002 bp 的开放阅

读框,编码 334 个氨基酸残基,蛋白质分子量约为 38 kDa。本研究构建了 MHK3ΔrpoS 及其 *lacZ* 融合菌株,检测了对菌株适应外界环境较重要的部分表型特征。结果显示,ΔrpoS 突变株与 MHK3 野生株相比并无显著性差异,而在鳃弧菌致病株 M3 中,*rpoS* 的缺失对细菌的生长速度、泳动性以及明胶酶、酪蛋白酶的活性等均出现不同程度的影响(郭东升, 2009; 郝彬, 2012)。Tian 等(2008)在溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的研究中也发现,*rpoS* 的缺失对细菌的明胶酶活性和酪蛋白酶活性等有影响。据此分析,本实验是在营养丰富、温度适宜的培养条件下进行,菌株不具有毒力作用,也未受到外界环境的胁迫,在这种情况下,*rpoS* 对部分表型特征的影响较小。但在菌膜形成能力上,平台早期的 MHK3ΔrpoS 较 MHK3 有显著上升,说明 *rpoS* 对平台早期的 MHK3 的菌膜形成能力发挥负调控作用。在大肠杆菌的研究中也同样发现,*rpoS* 对菌膜的形成能力具有负调控作用(Sheldon *et al*, 2012)。这仍然与郝彬(2012)在鳃弧菌致病株 M3 中的结果相反。以上分析说明,在不同菌株中,*rpoS* 对同种表型的调控有所不同,也表明了具有不同特性的菌株在适应不同或相同的环境时,会进化出不同的调控机制。

在 β-半乳糖苷酶活性实验中,鳃弧菌 MHK3ΔrpoS 的 *hcp1* 在 12 和 36 h 时(对数生长期,平台期)的转录水平是野生株 MHK3 的 1.79 倍,*hcp2* 在 36 h 时(生长平台期)的转录水平是野生株 MHK3 的 1.94 倍。说明 *rpoS* 对鳃弧菌 MHK3 中 *hcp1* 和 *hcp2* 的转录具有负调控作用。在翻译水平上,平台期的 MHK3ΔrpoS 在胞内和胞外 Hcp 的表达和分泌上均有显著增加,在 12 h (对数生长期)时,突变株胞外蛋白的分泌是野生株的 1.31 倍,在 24 h (平台早期)时,

突变株胞内蛋白表达量是野生株的 1.59 倍,表明 *rpoS* 对平台期 MHK3 的 Hcp 蛋白表达和分泌也具有负调控作用。而在杀菌实验中, MHK3 $\Delta$ *rpoS* 的杀菌能力仅为野生株 MHK3 的 1%, 说明 *rpoS* 对鳃弧菌的杀菌能力具有一定的正调控作用, 这与 *rpoS* 对 *hcp1/2* 的调控作用相反。结合唐磊(2016)的研究结果, 即 Hcp 是鳃弧菌 MHK3 发挥杀菌作用的必要条件, 在本研究中, *rpoS* 虽然对 Hcp 的转录和翻译发挥一定的负调控作用, 但并未完全抑制 Hcp 的表达和分泌, 菌株仍然具有发挥杀菌作用的条件, 但杀菌作用的强弱并非与 Hcp 的表达和分泌量正相关。故推测, 在鳃弧菌 MHK3 中杀菌作用的强弱变化更可能是 *rpoS* 通过对 T6SS2 基因簇的调控或对具有杀菌效应因子的调控实现的。有关机制还需进一步探究。

### 参 考 文 献

- AGUIRRE-GUZMÁN G, RUÍZ H M, ASCENCIO F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 2004, 35(15): 1395–1404
- AKSYUK A A, LEIMAN P G, KUROCHKINA L P, *et al.* The tail sheath structure of bacteriophage T4: A molecular machine for infecting bacteria. *EMBO Journal*, 2009, 28(7): 821–829
- ASCHTGEN M S, BERNARD C S, DE BENTZMANN S, *et al.* SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(22): 7523–7531
- BASLER M, HO B T, MEKALANOS J J. Tit-for-tat, type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 2013, 152(4): 884–894
- BEUZÓN C R, BANKS G, DEIWICK J, *et al.* pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(4): 806–816
- BOYER F, FICHANT G, BERTHOD J, *et al.* Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 2009, 10: 104
- BUCH C, SIGH J, NIELSEN J, *et al.* Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(3): 338–349
- BURTINICK M N, BRETT P J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* cluster 1 type VI secretion system gene expression is negatively regulated by iron and zinc. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76767
- CASABONA M G, SILVERMAN J M, SALL K M, *et al.* An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in post translational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(2): 471–486
- CROXATTO A, CHALKER V J, LAURITZ J, *et al.* VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6): 1617–1629
- EDWARDS R A, KELLER L H, SCHIFFERLI D M. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*, 1998, 207(2): 149–157
- GUAN J Y, XIAO X, XU S J, *et al.* Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(9): 633–642
- GUO D S. A study on the *rpoS* function of *Vibrio anguillarum*. Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009 [郭东升. 鳃弧菌 *rpoS* 功能的研究. 中国科学院海洋研究所硕士研究生学位论文, 2009]
- HAO B. Research on the function and regulation of type VI secretion system (T6SS) in *Vibrio anguillarum*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012 [郝彬. 鳃弧菌 VI 型分泌系统(T6SS)的功能及调控研究. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2012]
- HO S N, HUNT H D, HORTON R M, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain-reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51–59
- HOLLAND I B. The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 619: 1–20
- HOOD R D, SINGH P, HSU F S, *et al.* A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host and Microbe*, 2010, 7(1): 25–37
- HSU F S, SCHWARZ S, MOUGOUS J D. TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(5): 1111–1125
- KALOGERAKI V S, WINANS S C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene*, 1997, 188(1): 69–75
- LI G Y, MO Z L, LI J, *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio anguillarum* M3, a serotype O1 strain isolated from Japanese flounder in China. *Genome Announcements*, 2013, 1(5): e00769–13
- MA L S, LIN J S, LAI E M. An IcmF family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its walker a motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium*



- tumefaciens*. Journal of Bacteriology, 2009, 191(13): 4316–4329
- MACINTYRE D L, MIYATA S T, KITAOKA M, *et al.* The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(45): 19520–19524
- MILLER V L, MEKALANOS J J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. Journal of Bacteriology, 1988, 170(6): 2575–2583
- MURDOCH S L, TRUNK K, ENGLISH G, *et al.* The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. Journal of Bacteriology, 2011, 193(21): 6057–6069
- O'TOOLE R, MILTON D L, HORSTEDT P, *et al.* RpoN of the fish pathogen *Vibrio (Listonella) anguillarum* is essential for flagellum production and virulence by the water-borne but not intraperitoneal route of inoculation. Microbiology, 1997, 143(12): 3849–3859
- PAILLARD C, LEROUX F, BORREGO J J. Bacterial disease in marine bivalves, review of recent studies: Trends and evolution. Aquatic Living Resources, 2004, 17(4): 477–498
- PUKATZKI S, MA A T, STURTEVANT D, *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(5): 1528–1533
- PUKATZKI S, MCAULEY S B, MIYATA S T. The type VI secretion system: Translocation of effectors and effector-domains. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(1): 11–17
- RUBIRÉS X, SAIGI F, PIQUÉ N, *et al.* A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb-50* mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. Journal of Bacteriology, 1997, 179(23): 7581–7586
- SALOMON D, GONZALEZ H, UPDEGRAFF B L, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. PLoS One, 2013, 8(4): e61086
- SCHWARZ S, WEST T E, BOYER F, *et al.* *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. PLoS Pathogens, 2010, 6(8): e1001068
- SHAO Y, BASSLER B L. Quorum regulatory small RNAs repress type VI secretion in *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology, 2014, 92(5): 921–930
- SHELDON J R, YIM M S, SALIBA J H, *et al.* Role of *rpoS* in biofilm development and survival of *Escherichia coli* O157: H7 strain H32. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8331–8339
- SHENG L L, GU D, WANG Q Y, *et al.* Quorum sensing and alternative sigma factor RpoN regulate type VI secretion system I (T6SSVA1) in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. Archives of Microbiology, 2012, 194(5): 379–390
- SIMON R, PRIEFER U, PÜHLER A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Nature Biotechnology, 1983, 1(9): 784–791
- TANG L, YUE S, LI G Y, *et al.* Expression, secretion and bactericidal activity of type VI secretion system in *Vibrio anguillarum*. Archives of Microbiology, 2016, 198(8): 751–760
- TANG L. Expression regulation and bactericidal activity of T6SS in *V. anguillarum*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2016 [唐磊. 鳃弧菌 T6SS 的表达调控及其抗菌特性的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- TIAN Y, WANG Q Y, LIU Q, *et al.* Role of RpoS in stress survival, synthesis of extracellular autoinducer 2, and virulence in *Vibrio alginolyticus*. Archives of Microbiology, 2008, 190(5): 585–594
- WANG M, LUO Z, DU H, *et al.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Current Microbiology, 2011, 63(1): 22–31
- WANG X R. RpoN and its activator *vasH* regulate the type VI secretion system 2 in *Vibrio anguillarum*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2017 [王晓冉. *rpoN* 及其激活因子 *vasH* 对鳃弧菌 T6SS2 的调控. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WEBER B, CROXATTO A, CHEN C, *et al.* RpoS induces expression of the *Vibrio anguillarum* quorum-sensing regulator VanT. Microbiology, 2008, 154(3): 767–780
- WEBER B, HASIC M, CHEN C, *et al.* Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. Environmental Microbiology, 2009, 11(12): 3018–3028
- WONG G T, BONOCORA R P, SCHEP A N, *et al.* Genome-wide transcriptional response to varying RpoS levels in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 2017, 199(7): e00755-16
- YUE S. Functional expression of T6SS of *Vibrio anguillarum* MHK3 and its antibacterial properties. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [岳舒. 鳃弧菌 MHK3 T6SS 的表达及抗菌特性. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- ZHENG J, LI N, TAN Y P, *et al.* EscC is a chaperone for the *Edwardsiella tarda* type III secretion system putative translocon components EseB and EseD. Microbiology, 2007, 153(6): 1953–1962

## The Effect of *rpoS* on Hcp Expression and Bactericidal Activity in *Vibrio anguillarum* MHK3

WANG Xiaolu<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>2</sup>, LI Guiyang<sup>2</sup>, TANG Lei<sup>1,3</sup>, YANG Huichao<sup>2,4</sup>, MO Zhaolan<sup>1,2,3①</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Sanya Ocean Institute, Ocean University of China, Sanya, Hainan 572000, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** The type VI secretion system (T6SS), a protein secretion system generally found in gram-negative bacteria, plays an essential role in virulence, interspecific competition, and environmental adaptability. Hemolysin-coregulated protein (Hcp), an extracellular component of T6SS, is released into the medium and therefore may serve as a marker of a functional T6SS apparatus. RpoS, the  $\sigma$  subunit of RNA polymerase, is involved in the regulation of bacterial growth and stress response. To explore the regulatory effect of *rpoS* on *Vibrio anguillarum* T6SS, an MHK3 $\Delta$ *rpoS* mutant strain was constructed; phenotypic changes were detected using the *lacZ* reporter gene to construct fusion strains and the changes in *hcp1* and *hcp2* expression at the transcriptional level were detected using the ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) method. Western blotting was performed to quantitatively analyze the changes in the mutant Hcp expression at the translational level. The change in the bactericidal activity of the mutant strain was detected via a bacterial antagonistic experiment. The results showed that the growth, mobility, gelatinase activity, and caseinase activity of the MHK3 $\Delta$ *rpoS* mutant strain showed no significant difference compared with the wild-type strain MHK3 ( $P>0.05$ ). The biofilm-forming ability significantly increased at the prophase after mutation in *rpoS* ( $P<0.05$ ). The transcriptional levels of *hcp1* and *hcp2* in each growth phase were significantly higher in MHK3 $\Delta$ *rpoS* than in MHK3 ( $P<0.01$ ), with highest increases of 1.79-fold and 1.94-fold compared with MHK3, respectively. At the translational level, the secretion of both intracellular and extracellular Hcp in MHK3 $\Delta$ *rpoS* significantly increased ( $P<0.05$ ), with highest increases of 1.59-fold and 1.31-fold, respectively. Meanwhile, the bactericidal activity of MHK3 $\Delta$ *rpoS* against *Escherichia coli* E5 was about 1% of MHK3. Studies have shown that *rpoS* has no significant regulatory effect on some phenotypes of MHK3; however, it negatively regulates the biofilm-forming ability at the prophase. This is different from the results of the research on *V. anguillarum* M3 that posits that *rpoS*-mediated regulation of the same phenotype in different strains varies. Furthermore, at the levels of transcription and translation, *rpoS* negatively regulates the expression of Hcp; however, it shows a positive regulatory effect on the bactericidal activity of MHK3. This indicates that the strength of the bactericidal activity of the strain is not directly related to the expression and secretion of Hcp. This study provides innovative ideas and enriches the theoretical basis for further elucidating the regulatory mechanism of T6SS and T6SS-mediated bactericidal activity.

**Key words** *Vibrio anguillarum*; *rpoS*; Hcp; T6SS; Bactericidal activity

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mzl@ouc.edu.cn