



维氏气单胞菌 tmRNA 以 sRNA 形式特异调控的下游靶标筛选和鉴定

童园, 罗宸, 柏泰鹏, 唐燕琼, 刘柱, 马香*

海南大学 生命健康学院, 海南 海口 570228

童园, 罗宸, 柏泰鹏, 唐燕琼, 刘柱, 马香. 维氏气单胞菌 tmRNA 以 sRNA 形式特异调控的下游靶标筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3282-3294.

TONG Yuan, LUO Chen, BAI Taipeng, TANG Yanqiong, LIU Zhu, MA Xiang. Screening and identification of downstream targets specifically regulated by *Aeromonas veronii* tmRNA in the form of sRNA[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3282-3294.

摘要: 转移-信使 RNA (transfer-message RNA, tmRNA) 是细菌中普遍存在的稳定非编码 sRNA, 同时具备 tRNA 和 mRNA 双重特性, 主要介导反式翻译核糖体拯救机制, 对病原菌致病性和胁迫响应具有重要影响。【目的】从 tmRNA 功能研究入手, 揭示对水产养殖和人类公共安全造成严重危害的维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的致病分子机制。【方法】采用生物学信息学工具 IntaRNA 2.0 对维氏气单胞菌 tmRNA 可能结合的下游靶标进行预测, 通过基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析, 鉴定预测靶标参与的生物学过程及信号通路, 并使用 qPCR 技术验证候选靶标基因在维氏气单胞菌野生型、tmRNA 敲除株和 *smpB* 敲除株中的表达情况, 以初步鉴定维氏气单胞菌 tmRNA 以 sRNA 形式调控的潜在下游靶标。【结果】tmRNA 可以 sRNA 形式与下游 100 个潜在特异性靶标结合, 这些靶标基因主要结合于 tmRNA 的 3'端 tRNA 样结构域(tRNA-like domain, TLD)、H2 域及 PK3、PK4 域, 参与细菌基本代谢过程。qPCR 结果表明, 在特异性结合的靶标基因中, 基因 WP_201994931.1 以 SmpB 非依赖的方式受到 tmRNA 调节; WP_201954220.1、WP_005335875.1、WP_265062582.1、WP_265061484.1 和 WP_265061494.1 等基因的表达则受到 SmpB 蛋白调控。【结论】本研究初步鉴定基因 WP_201994931.1 有可能是 tmRNA 作为 sRNA 调控的下游靶标, 对拓展 tmRNA 功能研究领域有一定指导作用, 有助于后续进一步探究维氏气单胞菌的致病和环境适应等重要生命活动的分子机制。

资助项目: 海南省自然科学基金(320RC502)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (320RC502).

*Corresponding author. E-mail: 993034@hainanu.edu.cn

ORCID: MA Xiang (0000-0003-0103-861X)

Received: 2024-02-20; Accepted: 2024-05-31; Published online: 2024-06-04

关键词: 维氏气单胞菌; tmRNA; sRNA; 特异调控下游靶标

Screening and identification of downstream targets specifically regulated by *Aeromonas veronii* tmRNA in the form of sRNA

TONG Yuan, LUO Chen, BAI Taipeng, TANG Yanqiong, LIU Zhu, MA Xiang*

School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: Transfer-message RNA (tmRNA) is a ubiquitous and stable non-coding small RNA in bacteria, with characteristic regions similar with both tRNA and mRNA. tmRNA is known to mediate the ribosome rescue mechanism called *trans*-translation and has effects on the pathogenicity and stress responses of pathogenic bacteria. **[Objective]** To study the function of tmRNA in *Aeromonas veronii* causing threats to aquaculture and human public safety, so as to reveal the molecular mechanism for the pathogenicity of *A. veronii*. **[Methods]** IntaRNA 2.0 was used to predict the downstream targets binding to tmRNA. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted to predict the biological processes and signaling pathways involving the predicted targets. Real-time qPCR was employed to compare the expression levels of the candidate target genes among the wild type, tmRNA knockout strain, and *smpB* knockout strain of *A. veronii*, thus identifying the potential targets regulated by tmRNA in the form of sRNA. **[Results]** One hundred potential specific downstream targets might bind to tmRNA at the 3'-end tRNA-like domain (tRNA-like domain, TLD), H2 domain, and PK3 and PK4 regions, thus participating in the general metabolic pathways of the pathogen. The results of qPCR indicated that the expression of WP_201994931.1 was regulated by tmRNA in an SmpB-independent manner, while the expression of WP_201954220.1, WP_005335875.1, WP_265062582.1, WP_265061484.1, and WP_265061494.1 was regulated by SmpB. **[Conclusion]** We preliminarily identified that WP_201994931.1 might constitute a downstream target regulated by tmRNA as an sRNA. This study provides basic information for expanding the functions of tmRNA in the form of sRNA and facilitates the further studies regarding the molecular mechanisms of the pathogenicity and environmental adaptation of *A. veronii*.

Keywords: *Aeromonas veronii*; tmRNA; sRNA; specifically regulated targets

非编码小RNA (no-coding small RNA, sRNA)在细菌中普遍存在, 长度在 50–500 nt 之间, 具有基因表达调控活性^[1-2], 影响细菌响应

外界胁迫和发挥致病性^[3]。当前对于 sRNA 及其介导的基因表达调控的研究是阐释细菌致病性的重要切入点^[4-5]。转移-信使 RNA (transfer-message

RNA, tmRNA)是细菌中普遍存在的稳定非编码小RNA,由 *ssrA* 基因编码,长度约 260–430 bp^[6]。成熟 tmRNA 的二级结构由 tRNA 样结构域、mRNA 样结构域(MLD)、4 个伪结结构(PK1–PK4)以及 2 个螺旋结构域(H2 和 H5)组成^[7],其主要作为“反式翻译(trans-translation)”系统的核心成分,与核心蛋白 small protein B (SmpB)协同释放阻滞的核糖体,保障蛋白质合成^[8–9]。tmRNA 或 SmpB 的缺失都可导致反式翻译缺陷,引发细菌表型变化^[10],影响细菌的生长增殖、胁迫耐受、抗生素耐受和致病性等^[11–13]。近年的研究揭示,tmRNA 极有可能以 sRNA 形式发挥功能,通过靶向特定靶标调控细菌的环境适应力,如铁离子代谢、氧化应激管理^[14]等,还包括对抗生素^[15]和有机溶剂的耐受性^[16]。然而,关于 tmRNA 作为反义 sRNA 发挥功能的研究几乎空白。目前已在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中初步证明,tmRNA 通过调控 *lac* 操纵子转录活性而调节细菌的乳糖代谢^[17];同时,在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中,tmRNA 以不依赖于反式翻译系统的方式,靶向色素合成关键酶 crtMN mRNA,通过调控色素代谢而介导氧化耐受^[18]。以上研究暗示 tmRNA 以 sRNA 分子形式发挥功能调控细菌代谢的巨大潜力,一定程度上解释了在某些细菌中 tmRNA 和 SmpB 缺失导致表型不一致的原因^[10]。然而,tmRNA 如何在参与反式翻译与作为 sRNA 调控分子两种作用机制之间转换,以及其作为 sRNA 时调控的靶标基因还有待进一步研究。

细菌性疾病是危害鱼类养殖业发展的重要因素之一,其中由维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)引发的病害问题尤为显著^[19]。维氏气单胞菌属革兰氏阴性杆状细菌,广泛存在于淡水、污水等环境中^[20]。该致病菌的宿主范围十分广泛,包括鱼类、节肢动物和爬行类动物等,能够

引发多种感染病症^[19,21],对水产经济发展和人类健康构成严重威胁^[22–23]。为了深入解析维氏气单胞菌 C4 的环境适应和致病机制,本研究首先采用 sRNA 靶标预测软件,预测维氏气单胞菌 tmRNA 可能以 sRNA 形式结合的潜在下游靶标;接着,对预测出的靶标进行富集分析,成功筛选出 15 个候选靶标基因;随后,通过 qPCR 验证了维氏气单胞菌 C4 WT (野生型)、 $\Delta ssrA$ (*ssrA* 敲除株)及 $\Delta smpB$ (*smpB* 敲除株)中这些候选靶标的表达情况,从而鉴定了维氏气单胞菌 C4 中由 tmRNA 以 sRNA 形式调控的潜在下游靶标。

本研究结果不仅有助于后续进一步探索 tmRNA 以 sRNA 形式发挥的功能,拓展 tmRNA 功能研究领域,还有望深化 sRNA 调控机制的研究,对指导后续深入研究具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

核酸染料 Super Red、电泳上样缓冲液 6×DNA Loading Buffer,北京兰杰柯科技有限公司;GN5K DNA Marker,武汉赛维尔生物科技有限公司;2×Rapid Taq Master Mix、5×HiScript III qRT SuperMix、2×ChamQ SYBR Color Master Mix,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Sodium Lauryl Sulfate (SDS)、卡那霉素(kanamycin)、氨苄青霉素(ampicillin),北京索莱宝科技有限公司;细菌总 RNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

全温培养摇床,宁波江南仪器厂;生化培养箱,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;超净工作台,上海精密科学仪器有限公司;qPCR 仪,Roche Diagnostics 公司。

1.2 菌株

本研究所用菌株 *A. veronii* C4 (野生型,氨苄青霉素抗性)、 $\Delta ssrA$ (*tmRNA* 基因敲除株,氨苄青

霉素与卡那霉素抗性)及 $\Delta smpB$ (*smpB* 基因敲除株, 氨基青霉素抗性)均为本实验室保存菌株。

1.3 RNA 提取及逆转录

使用细菌总 RNA 快速试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取菌株 RNA: 取 1 mL 对数生长期的细菌置于 1.5 mL 离心管中, 4 °C、8 000 r/min 离心 1 min, 弃培养基, 加入 100 μ L 溶菌酶(浓度为 400 μ g/mL), 振荡混匀; 加入 900 μ L Buffer Rlysis-B 振荡混匀, 室温放置 3 min 后, 向裂解样品中加入 200 μ L 氯仿, 充分混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清; 向上清液中加入 250 μ L 无水乙醇, 混匀, 室温放置 3 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 取 700 μ L 的 75%乙醇(用 DEPC-treated ddH₂O 与无水乙醇配制)洗涤离心管底部沉淀, 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 倒置离心管 10 min, 尽可能使离心管中残留的乙醇彻底挥发; 最后加入 30–50 μ L DEPC-treated ddH₂O 溶解离心管底部沉淀的 RNA; 检测 RNA 浓度后(进行凝胶电泳验证提取的 RNA 质量), 立即使用或放置–80 °C 冰箱中长期保存。

利用 RT-PCR 扩增提取的 RNA 基因序列。RT-PCR 反应体系(10 μ L): 5 \times HiScript III qRT SuperMix 2 μ L, RNA 模板 500 ng, DEPC-treated ddH₂O 补足至 10 μ L。RT-PCR 反应条件: 50 °C 逆转录 15 min, 85 °C 稳定 30 s。逆转录获得的 cDNA 置于 4 °C 短期保存, 长期保存则置于–80 °C。

1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR)

以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 qPCR。引物序列见表 1, 以梯度稀释的 cDNA 为模板, 验证所使用引物的扩增效率。qPCR 反应体系: 2 \times ChamQ SYBR Color Master Mix 5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 3.2 μ L (体系中所用 cDNA 模板均取用 100 μ L

DEPC-treated ddH₂O 稀释)。qPCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 & 延伸(采集荧光信号) 30 s, 40 个循环; 使用 qPCR 仪采集引物溶解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量^[24]。

1.5 tmRNA 靶标基因预测

使用 sRNA 靶标预测软件 IntaRNA 2.0 进行维氏气单胞菌 tmRNA 靶标预测, sRNA 靶标基因预测网址(IntaRNA 2.0): <http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA>; 基因序列获取网址(NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60844631>。

1.6 GO 和 KEGG 富集分析

使用 OmicShare 基迪奥生物信息云平台进行预测靶标的基因本体论(gene ontology, GO)富集分析与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。GO 富集分析网址: <https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/gogseasenor>; KEGG 富集分析网址: <https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/pathwaygseasenor>。

1.7 统计学分析

统计分析用 SPSSAU 软件进行, 使用独立样本 *t* 检验分析实验结果的差异显著性, 并用 WPS 绘制柱状图。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, *表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ns 表示差异无统计学意义。

2 结果与分析

2.1 tmRNA 特异调控下游靶标预测

本研究获得了 100 个潜在靶标。表 2 列出按照 *P*-value 值排序的前 25 个潜在靶标, 并参考维氏气单胞菌(*A. veronii*) C4 的基因组序列(GenBank 登录号为 CP110364.1)标注预测的靶标基因编号。通过分析上述潜在靶标在 tmRNA 结构上的预测结合区域, 发现潜在靶标虽有可能

结合于 tmRNA 的各区段, 但互作位点主要集中在 tmRNA 核苷酸序列的 200–360 bp 之间(图 1); 进一步观察其二级结构发现, 主要的结合位点分布在 tmRNA 的 3'端 tRNA 样域、H2

域及 PK3、PK4 区域(图 2)。预测靶标的结合能及 *P*-value 数值越低, 表明结合后的稳定性相对越高, 结合能力也越强。结合表 2 中的数据, 表明 tmRNA 与其预测靶标之间存在较强的结合力。

表 1 本研究所用的扩增引物

Table 1 Primers used for qPCR in this study

引物 Primers	核酸序列 Nucleotide sequences (5'→3')	qPCR 产物 Products of qPCR
1-F	CGGTACTGGCAAGATCGGTCTG	WP_265061909.1
1-R	TGATGTCGGATTGGCGAACAG	
2-F	GCAACCTGGTGGCAGTCATCT	WP_201954220.1
2-R	CTGGCTGGTCTCGTGCTTCA	
3-F	TGCTCTGGTTGCCGCTGTTC	WP_005335875.1
3-R	ACCTGACCTATGGTGCCGATGG	
4-F	ATGGCGGTGGATCTGGAGGT	WP_265062582.1
4-R	GCGGTCTTGAGGCTGATGGT	
5-F	GCAGCAATGACTTCGTGACCAA	WP_265062605.1
5-R	CGGCAATCTCACCAGACTCTTC	
6-F	AAGACCGTCATTCGTGCCAACT	WP_265061092.1
6-R	GCCAGCTTCTCTACCAGCAGTT	
7-F	GTGTCTGGCAAGAGAAGTGGCT	WP_167566591.1
7-R	GCGTCGTGAGTGGCGTGATA	
8-F	GCGGGACATCCTCTATGCCATA	WP_040066712.1
8-R	ATGGAACAGGCTGCTGTCACA	
9-F	CCACCTGCGTTACACCTTCCA	WP_265061310.1
9-R	CAGTGCTTGCCAGCCATCGT	
10-F	AGCCACACCAGCGTGATCCT	WP_265061484.1
10-R	CGCCTTGTTCCAGCATGATGA	
11-F	GCAAGCCTGTTTCGTGGTGGTAT	WP_265061494.1
11-R	CAAGCGTGCCATCAGCGTGA	
12-F	CCCCTGGCGAACAGGTTTG	WP_033136990.1
12-R	GAGGTGCGCAGGCTCAATCT	
13-F	ACAACCTGCTGGTGGTGGATGAA	WP_204481558.1
13-R	AGGCAAGGTGGCGGAGAAGA	
14-F	ACGGTGACATTCTGGTGTGGAA	WP_201994931.1
14-R	ATCCTCGTCGCCTGTGATAGC	
15-F	TGAAGATGGTGTGCTGGACAA	WP_203119821.1
15-R	CGGAAAGGATGGTCTCGCTGTA	

表 2 tmRNA 以 sRNA 形式结合的靶标预测结果(前 25)

Table 2 Target prediction results of tmRNA binding in sRNA form (top 25)

靶标 Target	结合区域 Interaction regions	结合能 Energy	P 值 P-value	功能 Function
WP_040066712.1	253-337	-21.54	0.000 097 8	Cation symporter-2 family protein
WP_167566591.1	255-282	-20.72	0.000 227 0	Hypothetical protein
WP_204481558.1	271-337	-20.56	0.000 265 4	DEAD/DEAH box helicase
FOB40_RS11515 ^a	193-336	-20.09	0.000 414 3	- ^a
WP_005339652.1	299-337	-20.04	0.000 433 9	PfkB family carbohydrate kinase
WP_265062582.1	253-296	-19.41	0.000 763 3	Alpha-2-macroglobulin
WP_124929292.1	216-317	-19.29	0.000 847 0	Glutathione peroxidase
WP_265062250.1	266-294	-19.18	0.000 930 8	Methylated-DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase
WP_265061484.1	191-221	-18.95	0.001 130 7	ATP-dependent helicase HrpB
WP_265061867.1	313-337	-18.92	0.001 159 4	Glycosyltransferase family 9 protein
FOB40_RS04270 ^b	303-336	-18.87	0.001 208 8	- ^b
WP_201994931.1	271-322	-18.74	0.001 346 1	Aspartate-ammonia ligase
FOB40_RS17420 ^c	251-266	-18.62	0.001 485 0	- ^c
FOB40_RS07355 ^d	261-281	-18.53	0.001 597 6	- ^d
WP_191966279.1	136-162	-18.50	0.001 636 8	Rhombosortase
FOB40_RS05245 ^e	288-341	-18.16	0.002 145 4	- ^e
WP_108612743.1	271-325	-18.05	0.002 338 0	MarC family NAAT transporter
FOB40_RS01440 ^f	315-338	-17.57	0.003 373 3	- ^f
WP_265061975.1	198-219	-17.56	0.003 398 7	DgaE family pyridoxal phosphate-dependent ammonia lyase
WP_265062605.1	314-337	-17.48	0.003 607 9	Inositol-1-monophosphatase
WP_005348017.1	215-259	-17.44	0.003 716 8	GMP reductase
WP_265062619.1	37-63	-17.39	0.003 857 1	Alkene reductase
WP_005336914.1	290-338	-17.37	0.003 914 5	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuC
WP_265060904.1	213-323	-17.24	0.004 306 8	NADH-quinone oxidoreductase subunit H
WP_033136990.1	208-225	-17.07	0.004 872 9	Phage tail assembly protein

^{a-f}: Genes FOB40_RS11515, FOB40_RS04270, FOB40_RS17420, FOB40_RS07355, FOB40_RS05245, and FOB40_RS01440 match none of genes in *A. veronii* C4; -^{a-f}: The biological functions of genes FOB40_RS11515, FOB40_RS04270, FOB40_RS17420, FOB40_RS07355, FOB40_RS05245, and FOB40_RS01440 are not annotated.

2.2 tmRNA 特异调控下游靶标 GO 和 KEGG 富集分析

将 100 个潜在的维氏气单胞菌 tmRNA 特异性调控下游靶标进行 GO 和 KEGG 富集分析后, 发现预测的靶标基因主要参与调控维氏气单胞菌的基本代谢、催化酶的代谢以及结合功能(图 3)。进一步对显著富集的靶标基因进行分析发现, 其主要集中于维氏气单胞菌的代谢通路中(图 4)。为了进行后续验证分析, 从显著富集的各通路中选择了具有代表性的靶标基因, 并结合

参考预测的 *P*-value 值, 最终筛选出 15 个候选靶标基因(表 3)。

2.3 实时荧光定量 PCR (qPCR)检测候选靶标基因表达特异性

参考维氏气单胞菌(*A. veronii*) C4 的基因组序列(GenBank 登录号为 CP110364.1), 为表 5 中列出的 15 个候选靶标基因设计了特异性 qPCR 引物。以细菌基因组为模板, 通过 PCR 验证上述引物的有效性[附图 1 (S1), 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0000291]。

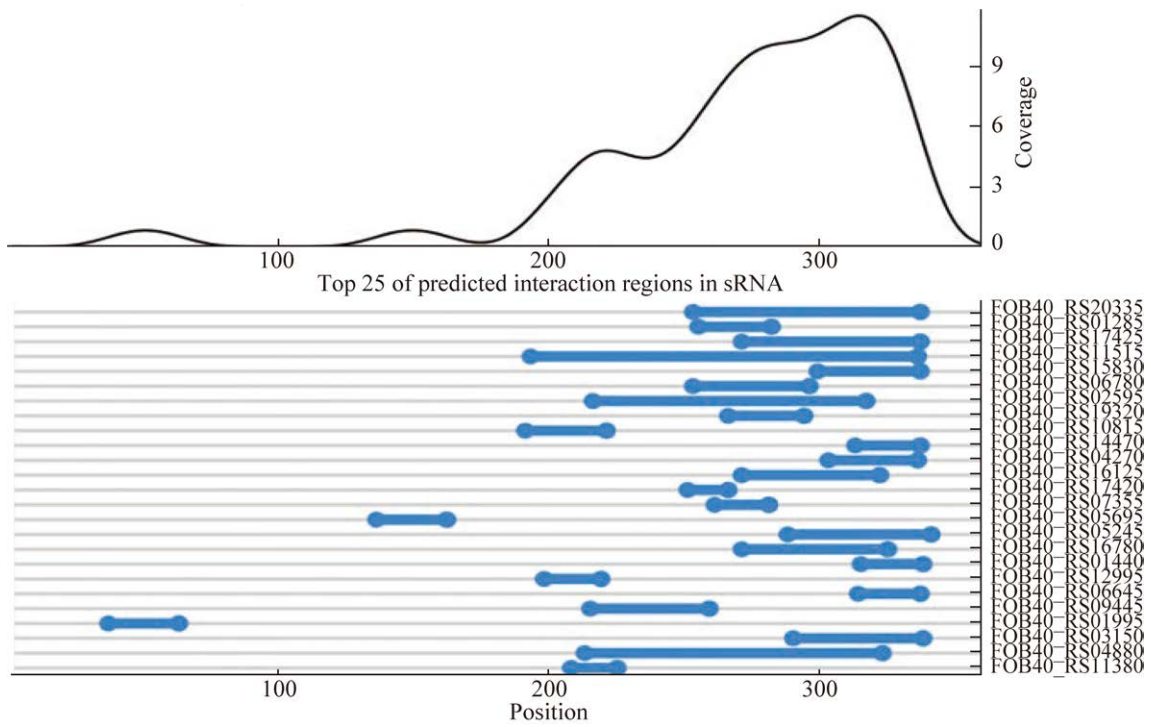


图 1 排序前 25 的预测靶标在 tmRNA 核苷酸上的拟结合位点

Figure 1 Prediction of the binding sites of top 25 targets on the nucleotides of tmRNA.

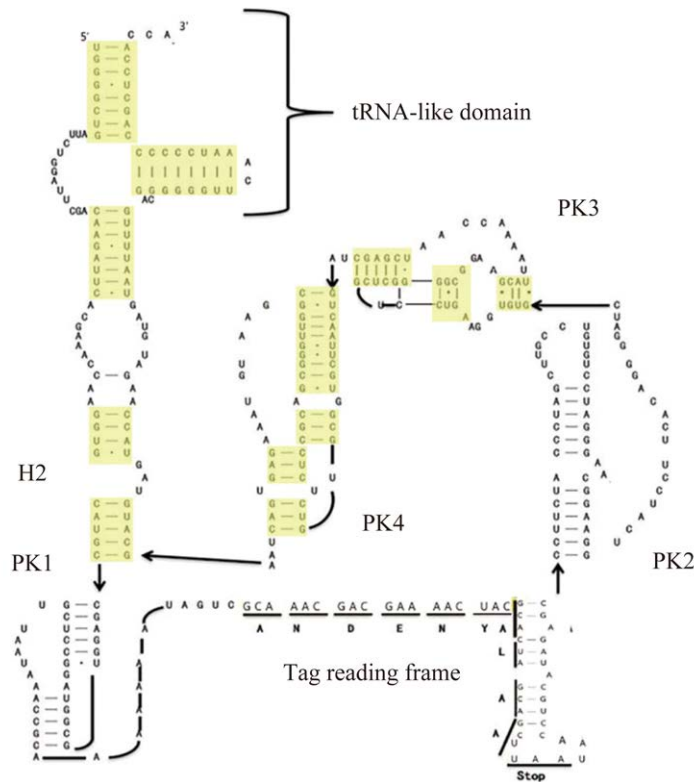


图 2 排序前 25 的预测靶标在 tmRNA 二级结构上的拟结合区域(黄色标注)

Figure 2 Prediction of the binding sites of top 25 targets in the secondary structure of tmRNA (marked in yellow).

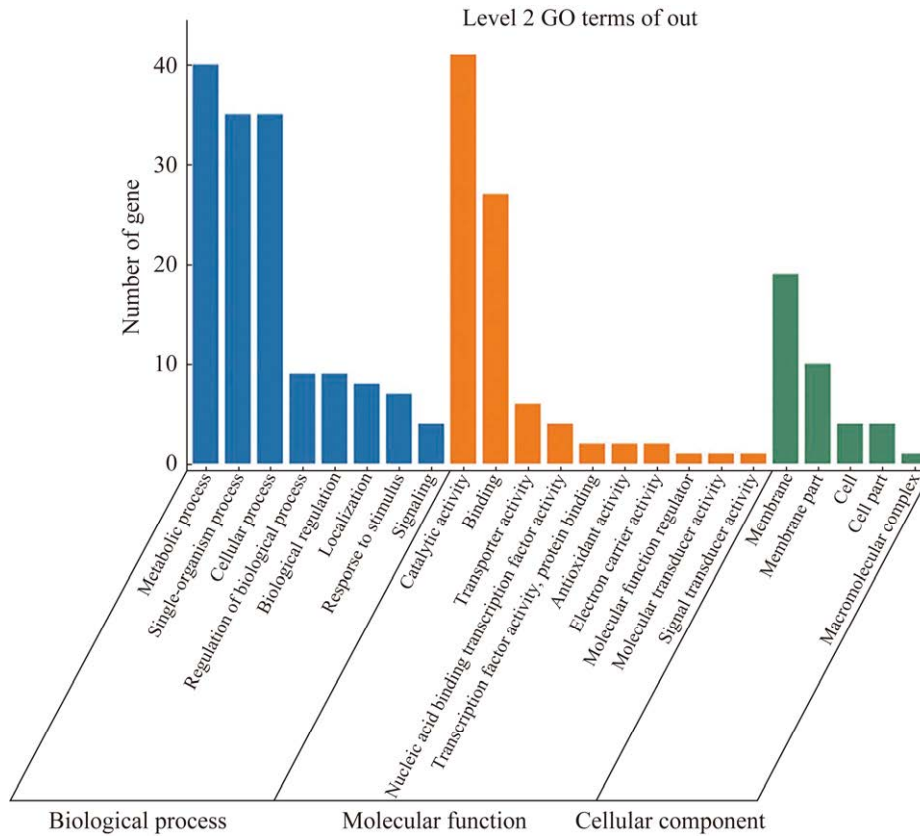


图 3 预测的 100 个 tmRNA 特异调控下游靶标基因 GO 分类柱状图

Figure 3 Histogram of GO classification of 100 predicted downstream target genes specifically regulated by tmRNA.

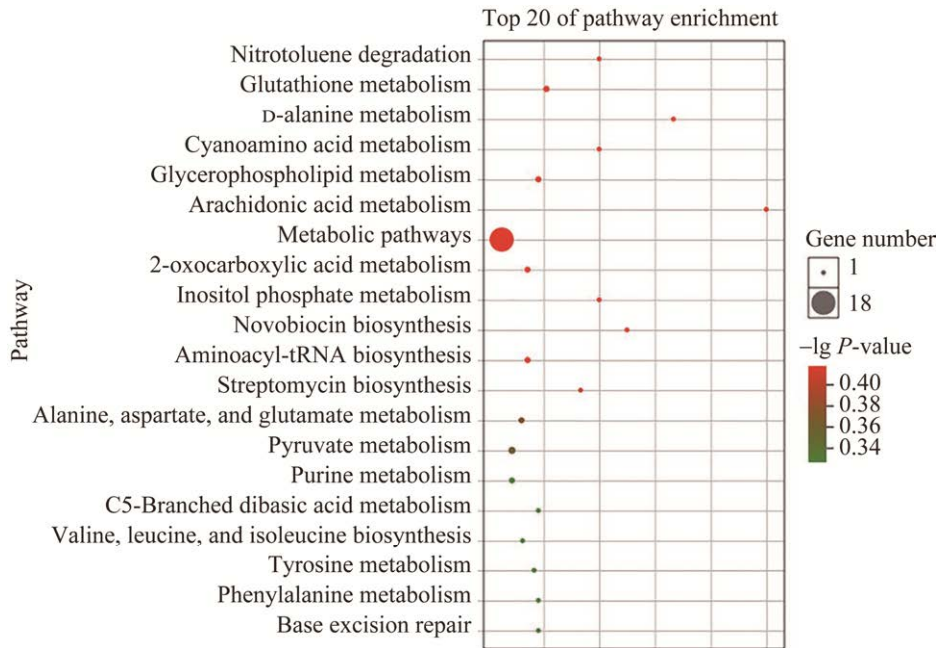


图 4 预测的 100 个 tmRNA 特异调控下游靶标基因 KEGG 富集显著性气泡图

Figure 4 Bubble map of KEGG enrichment of 100 predicted downstream target genes specifically regulated by tmRNA.

表 3 qPCR 验证的 15 个候选 tmRNA 特异调控靶标基因

Table 3 15 tmRNA-regulated candidate genes that were verified by qPCR

靶标基因	注释
Target gene	Annotation
WP_265061909.1	2-hydroxyacid dehydrogenase
WP_201954220.1	Malate dehydrogenase
WP_005335875.1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
WP_265062582.1	Penicillin-binding protein 1C
WP_265062605.1	Inositol-1-monophosphatase
WP_265061092.1	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase
WP_167566591.1	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: protein homology.
WP_040066712.1	Nucleobase: cation symporter-2 family protein
WP_265061310.1	Bifunctional metallophosphatase/5'-nucleotidase
WP_265061484.1	ATP-dependent helicase HrpB
WP_265061494.1	D-hexose-6-phosphate mutarotase
WP_033136990.1	Phage tail assembly protein
WP_204481558.1	DEAD/DEAH box helicase
WP_201994931.1	Aspartate-ammonia ligase
WP_203119821.1	Acetolactate synthase 2 small subunit

为后续进行 qPCR 验证, 提取了质量优良的稳定 RNA [附图 2 (S2), 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0000292]; 以逆转录获得的 cDNA 梯度稀释样品为模板, 验证了 15 对 qPCR 引物(表 1)的扩增效率。结果表明, 这 15 对引物的扩增效率较高, 均达到了 90%–110%的范围[附图 3 (S3), 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0000293]。

鉴于 tmRNA 以不依赖于 SmpB 的方式特异调控下游靶标^[18], 通过 qPCR 实验比较了候选基因在维氏气单胞菌 WT、 Δ ssrA 及 Δ smpB 菌株中的表达差异, 以初步鉴定 tmRNA 特异调控的下游靶标。如图 5 所示, 以 16S rRNA 编码基因为内参, 与 WT 相比, Δ ssrA 中基因

WP_201994931.1 的表达水平显著上调 2.0 倍, 而在 Δ smpB 中, 该基因表达量与 WT 相对一致, 表明基因 WP_201994931.1 极有可能是 tmRNA 以 sRNA 形式、不依赖于 SmpB 蛋白所调控的下游靶标。

qPCR 结果表明, 敲除 smpB 基因后, 基因 WP_201954220.1、WP_265062582.1、WP_265061484.1 与 WP_265061494.1 的表达水平分别显著上调 2.4、2.3、3.5 和 4.7 倍, 基因 WP_005335875.1 的表达水平极显著上调 3.3 倍, 而基因 WP_265061092.1 的表达水平极显著下降, 为野生型的 0.3 倍, 相较于 Δ ssrA, 上述基因与 WT 的相对表达量差异并不显著。上述结果表明, 大部分与 tmRNA 特异结合的靶标基因的表达都具有 SmpB 依赖性(图 5, 表 4)。

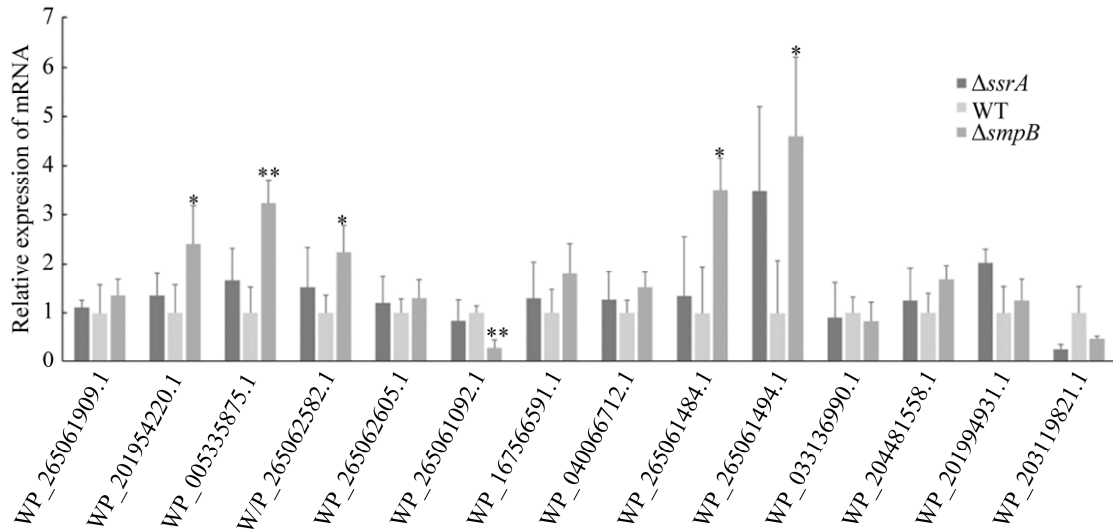


图5 维氏气单胞菌 WT、 $\Delta ssrA$ 及 $\Delta smpB$ 菌株中候选靶标基因 qPCR 结果 基因 WP_265061310.1 无法获得 qPCR 产物, 推测可能是由于该基因在细菌中表达量过低. 误差棒表示 4 次独立重复实验的标准差; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, *表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ns 表示差异无统计学意义

Figure 5 The qPCR results of candidate target genes in *Aeromonas veronii* strains WT, $\Delta ssrA$, and $\Delta smpB$. The gene WP_265061310.1 could not obtain qPCR products, which might be due to the low expression of this gene in bacteria. Error bar represents the standard deviation of four independent repeated experiments; $P < 0.05$ means statistically significant difference, * means $0.01 < P < 0.05$, ** means $P < 0.01$, *** means $P < 0.001$, ns means no statistically significant difference.

表4 候选靶标基因 qPCR 检测表达量对比

Table 4 Comparison of expression levels of candidate target genes detected by qPCR

基因编号 Gene ID	注释 Annotation	$\Delta ssrA$ vs. WT (fold change)	$\Delta smpB$ vs. WT (fold change)
WP_201994931.1	Aspartate-ammonia ligase	2.0	—*g
WP_201954220.1	Malate dehydrogenase	—*a	2.4
WP_265062582.1	Penicillin-binding protein 1C	—*b	2.3
WP_265061484.1	ATP-dependent helicase HrpB	—*c	3.5
WP_265061494.1	D-hexose-6-phosphate mutarotase	—*d	4.7
WP_005335875.1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	—*e	3.3
WP_265061092.1	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	—*f	0.3

WT indicates wild type, $\Delta ssrA$ indicates tmRNA knockout strain, $\Delta smpB$ indicates *smpB* knockout strain, —*a-g indicates no significant difference.

3 讨论与结论

研究提示, tmRNA 以 sRNA 的形式独立于反式翻译系统的另一核心元件 SmpB, 通过碱基

互补配对原则特异性结合其靶基因, 形成分子调控网络, 参与细胞的代谢过程。Liu 等研究表明, tmRNA 作为反义 RNA, 通过调节 crt-MN 的表达来抑制金黄色葡萄球菌类胡萝卜素的合成^[17]。

本课题组 Wang 等的研究发现,在维氏气单胞菌 $\Delta ssrA$ 菌株中存在不需要 SmpB 参与的 tmRNA 介导的生理过程:在 $\Delta ssrA$ 菌株中,次黄嘌呤合成和鸟苷代谢相关酶的表达显著提高,最终导致代谢产物次黄嘌呤的增加,从而影响细菌对甲氧苄啶的耐药性;同时, *ssrA* 的敲除也使外排泵 AcrA/AcrB 的表达下调,这可能导致菌株对甲氧苄啶更为敏感,但在 $\Delta smpB$ 菌株中并未观察到相同的现象^[25]。这些报道与本研究的 GO 和 KEGG 富集分析结果一致,说明 tmRNA 的靶基因在细菌代谢过程中发挥重要作用。

根据本研究的 qPCR 结果分析,相较于 WT,基因 WP_201994931.1 (*asnA*)在 $\Delta ssrA$ 中表达量显著提高,而在 *smpB* 缺失的情况下无显著变化,表明 WP_201994931.1 以非依赖 SmpB 的方式受到 tmRNA 调控^[26]。已知 SmpB 蛋白是 tmRNA 介导的反式翻译过程所必需的,上述结果则暗示 tmRNA 可能以独立于反式翻译机制的 sRNA 形式负调控 WP_201994931.1 的表达。WP_201994931.1 编码天冬酰胺合成酶 A (asparagine synthetase A, AS-A),该酶能够调节天冬氨酸的生物合成,并通过激活 ATP 依赖性氨基转移酶催化天冬氨酸及谷氨酰胺的生物合成^[27-28]。AsnA 参与调控氨基酸生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、氰基氨基酸代谢等代谢通路,而 tmRNA 可能以 sRNA 形式参与调控上述生物过程。

本研究还发现部分预测与 tmRNA 结合的靶标基因表达量在 $\Delta smpB$ 菌株中的表达量显著变化,但在 tmRNA 缺失的情况下这些变化不受影响。基因 WP_265061743.1、WP_005335875.1、WP_265062582.1、WP_265061484.1 与 WP_265061494.1 在 $\Delta smpB$ 菌株中表达水平显著上调,而 WP_265061092.1 基因在 $\Delta smpB$ 菌株中的表达水平极显著下降。然而,在 $\Delta ssrA$ 菌株中,这些基

因的表达量并未观察到显著差异。这一结果可能是由于维氏气单胞菌中 *smpB* 基因在稳定期的表达量较指数期升高,而 tmRNA 表达量在指数期和稳定期均保持稳定,这暗示反式翻译系统主要通过改变 SmpB 蛋白的合成量而调控自身功能活性。研究表明, SmpB 蛋白可能通过直接或间接方式调控沙门氏菌属 (*Salmonella*) 中至少 4% 的下游基因表达,从而影响病原菌的毒力^[29-30]。因此,维氏气单胞菌中的 SmpB 蛋白也可能以独立于反式翻译的机制调控上述基因表达。当然,由于本研究仅通过 qPCR 检测了靶标基因的 mRNA 水平的变化,其编码蛋白产物的变化情况待通过制备抗体或添加标签进行免疫印迹实验进一步验证。

在本研究中,基因 WP_201954220.1 编码的苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 是三羧酸循环的关键氧化还原酶,参与调控 C4 循环、糖异生、脂肪酸氧化、氮同化和氨基酸生物合成等生理生化反应^[31]。基因 WP_005335875.1 编码的 1-酰基甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases, AGPATs) 是甘油磷脂 (glycerophospholipid, GPL) 和三酰基甘油 (triacylglycerol, TAG) 生物合成途径的中间酶,参与甘油磷脂及甘油脂代谢,与人类的糖尿病等疾病相关^[32]。基因 WP_265061494.1 编码的 D-己糖-6-磷酸变旋酶能催化 3 种 6-磷酸己糖 (glucose 6-phosphate, Glc6P; galactosamine 6-phosphate, Gal6P; mannose 6-phosphate, Man6P) 的 α 和 β 异构体之间的相互转换,参与糖酵解、糖异生作用^[33]。基因 WP_265061092.1 编码一种芳香族氨基酸转氨酶 (aromatic amino acid transaminase, ARAT), 通过催化苯丙氨酸、酪氨酸、天冬氨酸和亮氨酸的氨基转移,参与氨基酸合成与分解、碳氮吸收、次级代谢等重要代谢过程^[34]。上述基因的表达量均受到 *smpB*

特异性调控, 表明 SmpB 可能通过反式翻译或独立于反式翻译外的其他方式调控相关的代谢通路, 进而影响细菌的正常生命活动。

本研究的结果对于指导后续深入研究 tmRNA 以 sRNA 形式调控的特异性下游靶标, 或 SmpB 单独或依赖反式翻译调控的下游靶标及其功能和通路, 进而进一步解析维氏气单胞菌的基本生命活动和致病机制等, 均具有重要理论意义。

参考文献

- [1] FELDEN B, BOULOC P. Regulatory RNAs in bacteria: from identification to function[J]. *Methods*, 2017, 117: 1-2.
- [2] BRANTL S, MÜLLER P. *Cis*- and *trans*-encoded small regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1865.
- [3] PAPENFORT K, MELAMED S. Small RNAs, large networks: posttranscriptional regulons in gram-negative bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2023, 77: 23-43.
- [4] SCHNOOR SB, NEUBAUER P, GIMPEL M. Recent insights into the world of dual-function bacterial sRNAs[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2023, 15(1): e1824.
- [5] YANG Y, WANG L, LIU L, ZOU J, HUANG DM, LI YQ. Small noncoding RNA in *Streptococci*: from regulatory functions to drug development[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2023, 38(4): 251-258.
- [6] GUYOMAR C, GILLET R. When transfer-messenger RNA scars reveal its ancient origins[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2019, 1447(1): 80-87.
- [7] CAMPOS-SILVA R, D'URSO G, DELALANDE O, GIUDICE E, MACEDO AJ, GILLET R. *Trans*-translation is an appealing target for the development of new antimicrobial compounds[J]. *Microorganisms*, 2021, 10(1): 3.
- [8] RAE CD, GORDIYENKO Y, RAMAKRISHNAN V. How a circularized tmRNA moves through the ribosome[J]. *Science*, 2019, 363(6428): 740-744.
- [9] MACÉ K, GILLET R. Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis?[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(17): 8041-8051.
- [10] KEILER KC. Mechanisms of ribosome rescue in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13: 285-297.
- [11] LIU ZB, HU K, TANG YQ, LI H, TANG HQ, HU XW, MA X, LIU Z. SmpB down-regulates proton-motive force for the persister tolerance to aminoglycosides in *Aeromonas veronii*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 507(1/2/3/4): 407-413.
- [12] 徐一轲, 孙愉宸, 盛强龙, 李宏, 马香, 唐燕琼, 刘柱. 维氏气单胞菌的 *smpB*、*tmRNA* 及 *hfq* 敲除菌株减毒活疫苗筛选[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 50(2): 186-190.
- XU YK, SUN YC, SHENG QL, LI H, MA X, TANG YQ, LIU Z. Screening out live attenuated vaccine from *Aeromonas veronii* strain without *smpB*, *tmRNA* or *hfq*[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2019, 50(2): 186-190 (in Chinese).
- [13] GHOSH S, DUREJA C, KHATRI I, SUBRAMANIAN S, RAYCHAUDHURI S, GHOSH S. Identification of novel small RNAs in *Burkholderia cenocepacia* KC-01 expressed under iron limitation and oxidative stress conditions[J]. *Microbiology*, 2017, 163(12): 1924-1936.
- [14] BRITO L, WILTON J, FERRÁNDIZ MJ, GÓMEZ-SANZ A, deLa CAMPA AG, AMBLAR M. Absence of tmRNA has a protective effect against fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2164.
- [15] JONES AJ, VENKATARAMANAN KP, PAPOUTSAKIS T. Overexpression of two stress-responsive, small, non-coding RNAs, 6S and tmRNA, imparts butanol tolerance in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(8): fnw063.
- [16] ABO T, INADA T, OGAWA K, AIBA H. SsrA-mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of lac operon[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(14): 3762-3769.
- [17] LIU Y, WU N, DONG J, GAO YP, ZHANG X, SHAO NS, YANG G. SsrA (tmRNA) acts as an antisense RNA to regulate *Staphylococcus aureus* pigment synthesis by base pairing with crtMN mRNA[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(20): 4325-4329.
- [18] 康元环, 张冬星, 杨滨瑾, 张贺亮, 孙武文, 单晓枫, 钱爱东. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(5): 452-459, 465.
- KANG YH, ZHANG DX, YANG BT, ZHANG HL,

- SUN WW, SHAN XF, QIAN AD. Latest research progress on *Aeromonas veronii*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(5): 452-459, 465 (in Chinese).
- [19] ZHANG L, YU WJ, TANG YQ, LI H, MA X, LIU Z. RNA chaperone hfq mediates persistence to multiple antibiotics in *Aeromonas veronii*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 124-128.
- [20] 戴瑜来, 戴杨鑫, 马恒甲, 黄辉, 林启存, 许宝青. 气单胞菌对水生动物的危害及噬菌体防控研究进展[J]. 水产养殖, 2019, 40(2): 48-50.
- DAI YL, DAI YX, MA HJ, HUANG H, LIN QC, XU BQ. Research progress on harm of *Aeromonas* to aquatic animals and phage control[J]. Journal of Aquaculture, 2019, 40(2): 48-50 (in Chinese).
- [21] 赵良炜, 张振国, 徐赟霞, 王禹, 张丽. 2022 年天津地区鱼源气单胞菌耐药性分析[J]. 河北渔业, 2023(10): 21-27.
- ZHAO LW, ZHANG ZG, XU YX, WANG Y, ZHANG L. Analysis on the antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. separated from the fish of Tianjin area in 2022[J]. Hebei Fisheries, 2023(10): 21-27 (in Chinese).
- [22] 熊广泽, 张焱. 鱼源维氏气单胞菌的研究进展[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(9): 76-80.
- XIONG GZ, ZHANG Y. Advance of research in *Aeromonas veronii* from fishes[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2021, 67(9): 76-80 (in Chinese).
- [23] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [24] MANN M, WRIGHT PR, BACKOFEN R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W435-W439.
- [25] WANG D, LI H, KHAN WU, MA X, TANG HQ, TANG YQ, HUANG DY, LIU Z. SmpB and tmRNA orchestrate purine pathway for the trimethoprim resistance in *Aeromonas veronii*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 239.
- [26] HIMENO H, NAMEKI N, KURITA D, MUTO A, ABO T. Ribosome rescue systems in bacteria[J]. Biochimie, 2015, 114: 102-112.
- [27] ZHANG SS, FENG HC, LIU JL. ASNS disruption shortens CTPS cytoophidia in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. G3, 2021, 11(1): jkaa060.
- [28] LOMELINO CL, ANDRING JT, McKENNA R, KILBERG MS. Asparagine synthetase: function, structure, and role in disease[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(49): 19952-19958.
- [29] 刘栓栓, 刘柱. SmpB 蛋白结构与功能研究进展[J]. 生命的化学, 2014, 34(3): 398-403.
- LIU SS, LIU Z. Research progress of the structure and function of SmpB protein[J]. Chemistry of Life, 2014, 34(3): 398-403 (in Chinese).
- [30] ANSONG C, YOON H, PORWOLLIK S, MOTTAZ-BREWER H, PETRITIS BO, JAITLY N, ADKINS JN, McCLELLAND M, HEFFRON F, SMITH RD. Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4809.
- [31] 肖景惠, 张庆芳, 于爽, 逢飞, 迟乃玉, 王梦雨. 微生物中苹果酸脱氢酶研究现状及展望[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 14-18.
- XIAO JH, ZHANG QF, YU S, PANG F, CHI NY, WANG MY. Research status and prospect of malate dehydrogenase in microorganisms[J]. China Brewing, 2018, 37(8): 14-18 (in Chinese).
- [32] AGARWAL AK, SUKUMARAN S, CORTÉS VA, TUNISON K, MIZRACHI D, SANKELLA S, GERARD RD, HORTON JD, GARG A. Human 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase isoforms 1 and 2: biochemical characterization and inability to rescue hepatic steatosis in Agpat2 (-/-) gene lipodystrophic mice[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(43): 37676-37691.
- [33] GRAILLE M, BALTAZE JP, LEULLIOT N, LIGER D, QUEVILLON-CHERUEL S, van TILBEURGH H. Structure-based functional annotation: yeast ymr099c codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 30175-30185.
- [34] 唐红梅, 周丽丽, 张奇, 邵丽丽, 王立梅. *L. paracasei* W2 芳香族氨基酸转氨酶基因克隆与序列分析[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(8): 86-90.
- TANG HM, ZHOU LL, ZHANG Q, SHAO LL, WANG LM. Clone and sequence analysis of aromatic aminotransferase gene from *Lactobacillus paracasei*[J]. Food Research and Development, 2013, 34(8): 86-90 (in Chinese).