



嗜水气单胞菌中转录因子 *AHA_1581* 对细菌生理功能调控机制的研究

李碗芯^{1,2,3}, 赵怡扬^{1,2}, 林玲^{1,2*}, 林向民^{1,2,3*}

¹ 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

² 福建农林大学福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建 福州 350002

³ 福建农林大学福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002

摘要: 【目的】LuxR家族转录因子能够抑制或刺激不同功能类型基因的表达, 来维持细胞功能的稳定性。嗜水气单胞菌是水产养殖中重要的致病菌之一, 目前对该菌中的LuxR家族转录因子功能的研究还较少。【方法】本研究利用含有*sacB*标记的自杀载体pRE112和同源重组技术敲除LuxR家族转录因子*AHA_1581*基因。【结果】生理表型测定结果发现, ΔAHA_1581 的运动与胞外蛋白的酶活增强、生物被膜形成能力降低, 且耐受低温、卡那霉素、庆大霉素胁迫, 但是对 $K_2Cr_2O_7$ 更加敏感。进一步对野生型*Ah*和 ΔAHA_1581 的定量蛋白质组学分析, 共鉴定到2654个蛋白, 其中59个蛋白下调表达, 142个蛋白上调表达。生物信息学分析表明*AHA_1581*参与调控双组分调节系统、丙酮酸代谢、碳代谢、TCA循环等细菌重要生理过程, 以及细菌耐药基因和毒力因子的差异表达。【结论】了解*AHA_1581*基因在调控细菌毒力以及生物过程中所起的重要作用, 对预防和控制嗜水气单胞菌引起疾病的发生和传播可能具有重要的科学意义。

关键词: 嗜水气单胞菌, LuxR 家族转录因子, *AHA_1581*, 定量蛋白质组学, 生理功能

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛分布于淡水环境中, 是水产养殖动物中的重要病原菌之一, 水产动物尤其是经济鱼类感染该菌

容易出现皮肤溃疡和急性出血性败血症等进而造成鱼类死亡, 给全球水产养殖业造成严重的经济损失^[1-2]。此外, 嗜水气单胞菌亦可感染人

基金项目: 国家自然科学基金(31802343); 福建省海洋生物技术重点实验室基金(2020MB04)

*通信作者。E-mail: 林玲, linling0033@fafu.edu.cn; 林向民, xiangmin@fafu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-04; 修回日期: 2021-04-25; 网络出版日期: 2021-08-19

类并引起各种疾病, 例如急性胃肠炎、腹泻等, 对人类健康造成严重后果^[3-4]。当前, 嗜水气单胞菌表现出很强的耐药性, 出现耐药谱广、耐药率高的特点, 导致抗生素防控该菌的方法逐渐失效^[5-6]。因此, 寻求有效的预防和控制该菌的靶点至关重要。

AHA_1581 编码的蛋白由 212 个氨基酸组成, 其 C 端存在类似 LuxR 家族蛋白的 DNA 结合域, 被注释为 LuxR 家族转录调节因子。LuxR 家族转录因子广泛存在于细菌中, 是多功能转录因子, 能够抑制或者刺激不同类型基因的表达, 从而维持细胞功能的稳定性^[7-8]。

1983 年, Engebrecht 首次描述了 LuxR 家族蛋白与群体感应(quorum sensing, QS)相关, 此后其在 QS 中的重要作用备受关注, 其还参与生物发光、细菌毒力因子产生、生物被膜形成、运动能力等重要生理过程^[9-11], 对于细菌的生存和繁殖至关重要。之前有研究通过 RNA 干扰技术研究嗜水气单胞菌 B11 中的 6 个 LuxR 家族蛋白, 发现它们在细菌耐药、生长、生物被膜形成、运动、胞外蛋白酶活中发挥重要作用^[12], 但是关于 LuxR 家族基因 *AHA_1581* 的功能还没有相关的研究。因此, 本研究通过自杀载体 pRE112 和同源重组技术在嗜水气单胞菌中成功敲除 LuxR 家族转录因子 *AHA_1581*, 并研究其在嗜水气单胞菌中的生理功能; 进一步通过定量蛋白质组学技术分析转录因子 *AHA_1581* 参与调控的代谢通路。研究结果将有助于对 LuxR 家族转录因子 *AHA_1581* 更加全面的理解, 并为防控嗜水气单胞菌提供一个有效靶点, 从而达到预防和控制该菌引起的细菌疾病。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 (*Ah*), 最适培养温度为 30 °C; 自杀载体 pRE112, 大肠杆菌 MC061(pir)和 S17-1(pir)最适培养温度均为 37 °C, 以上菌株和质粒均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和配方: 细菌基因组提取试剂盒、DNA marker、蛋白酶抑制剂、*Sac* I 和 *Xba* I 限制性内切酶购自宝生物(TaKaRa)工程有限公司; 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自美基生物; DNA 聚合酶和核酸染料购自上海翊圣生物技术有限公司; 多片段无缝连接试剂盒购自南京诺唯赞生物技术有限公司; 蛋白 Marker 购自 Thermo Fisher Scientific 公司(Rochester, USA); PVDF 膜购自 Millipore 公司(Bedford, USA); 半干转膜缓冲液、滤纸和 ECL 显色液购自 BIO-RAD 公司(Hercules, USA); 胰蛋白酶购自 Promega 公司(Madison, USA); 蛋白 A0KIL6、A0KK68 和 P55870 一抗为本实验室自己免疫小鼠制备的多克隆抗体, 山羊抗小鼠二抗购自康为世纪; 尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)购自 Sigma (St. Louis, MO)等。

LB 培养基含 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 胰蛋白胍, 10 g/L NaCl (*M/V*), 调 pH 约等于 7.2; 固体 LB 平板含 1.5%的琼脂粉; 蔗糖平板为含 20%的蔗糖的固体 LB 平板; 检测胞外蛋白酶活性平板含 1%的脱脂牛奶。配制氨苄青霉素(Amp) 100 mg/mL、氯霉素(Cm) 30 mg/mL、卡那霉素(Kan) 10 mg/mL、庆大霉素(Gen) 10 mg/mL、重

铬酸钾溶液(K₂Cr₂O₇), 以上试剂在超净工作台里经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后-20 °C 保存备用。蛋白裂解液含 6 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲溶于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.6)溶液, 并加入蛋白酶抑制剂。以上试剂和质谱分析相关试剂均为分析纯, 其他试剂为化学纯。

1.2 *ΔAHA_1581* 敲除菌株的构建

AHA_1581 基因的敲除方法参照本课题之前的研究^[13]。首先, 在 NCBI 上找到 *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 的全基因组序列并导入 Snapgene 软件。从 *Ah* 基因组中找到 *AHA_1581* 基因的上下游片段约 500 bp 左右, 利用 CE Design V1.03 软件设计缺失引物, 引物送福州尚亚生物技术有限公司合成, 引物见表 1。其次, 提取 *Ah* 的总 DNA 作为模板, 利用引物 P1P2 和 P3P4 扩增出 *AHA_1581* 基因的上下游片段并回收目的片段, 用多片段无缝连接试剂盒把 P1P2 和 P3P4 片段连接到经过 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后的自杀载体 pRE112 质粒上, 构建重组质粒 pRE-1581, 转化到 MC1061(pir) (图 1-A)。挑取 Cm^R 单克隆

进行 PCR 验证(引物 P1P4)并送铂尚生物技术有限公司测序。验证序列正确后, 提取质粒再次转化到 S17-1(pir)中, 同样挑取 Cm^R 单克隆进行 PCR 验证(引物 P1P4)以及送测序。测序正确的 S17-1(pir)-pRE-1581 与野生型 *Ah* 按照 1 : 4 的体积比混合进行接合实验, 把重组质粒 pRE-1581 转入野生型 *Ah* 中进行同源重组, 通过 Amp (100 μg/mL) 和 Cm (30 μg/mL) 双抗平板筛选出 Amp^RCm^R 菌株进行 PCR 验证(引物 P1P4)以及送测序, 测序正确的菌株在含 20% 的蔗糖平板上连续筛选出 Cm^SSacB^R 表型菌株(图 1-B), 利用引物 P7P8 和 P5P6 进行验证, 条带大小符合并送测序结果正确的即为成功敲除菌株 *ΔAHA_1581*。

1.3 *ΔAHA_1581* 生理表型的测定

1.3.1 运动能力检测:

本研究利用泳动和集群运动来观察细菌的运动能力^[14]。配制 0.3% (泳动) 和 0.6% (集群运动) 的半固体 LB 平板; 将 *Ah* 和 *ΔAHA_1581* 菌株的单克隆点在平板上, 30 °C 培养, 泳动结果于培养 4-5 h 内观察, 集群运动培养 12-14 h 后观察。

表 1. *AHA_1581* 基因缺失引物

Table 1. *AHA_1581* gene knockout primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Application
P1	cgatccaagcttctctagaGGGATACGGTCAAAGCCGA	Amplify the upstream homology arm fragment of <i>AHA_1581</i>
P2	cgatccaagcttctctagaGGGATACGGTCAAAGCCGA	
P3	agcctaacaagagatgctgCGCCCTCCCATCCAGCAA	Amplify the downstream homology arm fragment of <i>AHA_1581</i>
P4	catgaattcccgggagagctcATACTTCCCGCAGTCGGGTC	
P5	atateggatccATGGACGAGATGAAATATAGTGTCTG	<i>AHA_1581</i> verification primer
P6	gccgcaagcttTTAGTTGCGCTGCTCCAGGT	<i>AHA_1581</i> verification primer on the outer side of the homology arm
P7	ggatctccagagatGCTGCACGACTCGCTGGC	
P8	ctgccgttcacgatCGGGCCGCTTCGCTATTT	

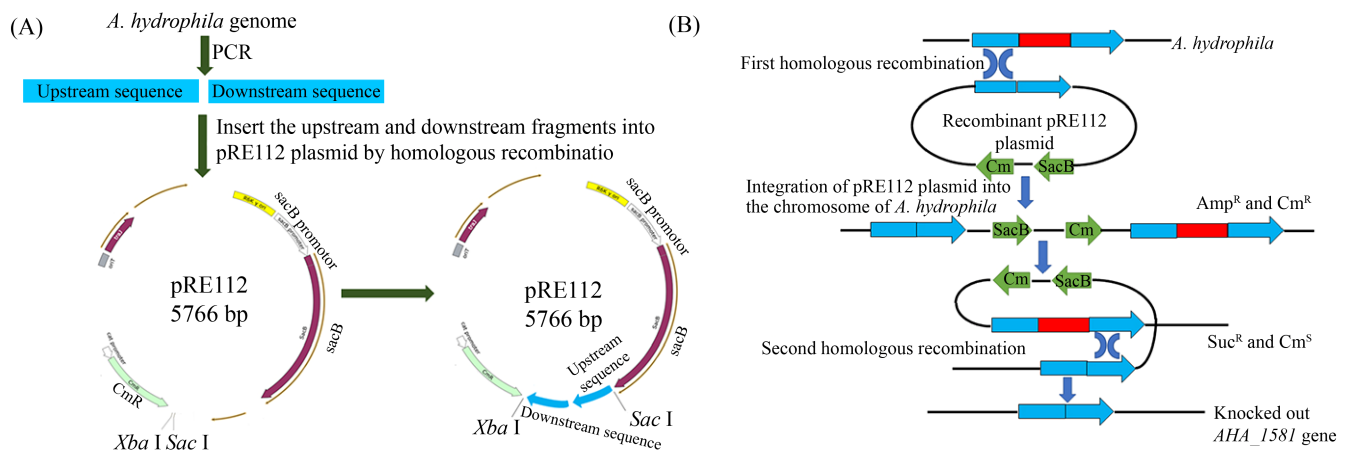


图 1. *AHA_1581* 基因缺失菌株构建示意图

Figure 1. The construction of *AHA_1581* gene mutant strain. A: construction of recombinant plasmid; B: the diagram of homologous recombination.

1.3.2 生物被膜的测定: 生物被膜的测定参考王贵宾等的方法利用 96 孔板微量板法和结晶紫染色法^[15]。细菌培养至 $OD_{600} \approx 1.0$ 时, 按照 5% 转接到 96 孔微孔板中, 30 °C 静置培养 24 h 后, 弃去菌液, 利用 0.1% 的结晶紫染色后, 用 95% 的乙醇溶液洗脱样品, 利用 SpectraMax[®] i3 酶标仪检测波长 595 nm 下的吸光值, 每个样品做 8 个复孔、3 次生物学重复, 最后利用 GrapPad Prism 8 软件生成图形, *T* 检验做显著性分析。

1.3.3 胞外蛋白酶活性检测: 利用酪蛋白酶水解法检测细菌胞外蛋白酶活性。配制含 1% 脱脂牛奶的固体平板, 凝固后在板上打 6 个 2 mm 的小孔, 在每个小孔中加入 5 μ L 过夜培养的菌液, 晾干倒置于 30 °C 培养 14–16 h 后, 测量酶解圈的大小, 进行 3 次生物学重复。最后也利用 GrapPad Prism 8 软件生成图形, *T* 检验做显著性分析。

1.4 *Δ AHA_1581* 耐受性的检测

本研究利用稀释点板检测细菌的耐受性。过夜培养的 *Ah* 和 *Δ AHA_1581* 菌液按照 1% 转接到

新鲜的 LB 培养基中, 并加入终浓度为 25 μ g/mL 的 Kan、5 μ g/mL 的 Gen 以及 2 mmol/L 的 $K_2Cr_2O_7$, 置于 30 °C、200 r/min 摇床培养 1 h 后, 10 倍梯度稀释样品, 然后各取 2 μ L 的样品点在空白的 LB 平板上, 晾干后, 倒置于 30 °C 培养箱中培养 14–16 h 后, 观察实验结果, 并拍照保存。低温胁迫为未处理样品梯度稀释点板后置于 4 °C 冰箱培养 3 d 后观察实验结果。

1.5 *Ah* 和 *Δ AHA_1581* 全蛋白的质谱鉴定

将 *Ah* 和 *Δ AHA_1581* 过夜培养 16 h 后的菌液按照 1% 转接到 30 mL 新鲜的 LB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 1.0$ 时, 4 °C、8000 \times g 离心 10 min, 收集菌体, 用预冷的 PBS 清洗 2 次。样品中加入 1 mL 的蛋白裂解液后, 进行超声破碎 15 min (功率为 30%, 工作 6 s, 暂停 9 s) 直至样品澄清。4 °C、12000 \times g 离心 30 min, 取上清到新的 EP 管中即为提取的细菌可溶性全蛋白。利用 Bradford 法进行蛋白浓度的检测。取 50 μ g 的蛋白样品利用 FASP (filter-aided sample preparation) 法进行蛋白的酶解, 加入 50 mmol/L

的 DTT, 56 °C 水浴处理 40 min 和 50 mmol/L 的 IAA 避光处理 30 min 后, 加入胰蛋白酶 37 °C 酶解过夜, 获得多肽样品, 并利用 C₁₈ 除盐小柱对样品除盐后, 用于质谱鉴定。

质谱鉴定方法参照王贵宾等的方法进行细微的修改^[15]。首先, 通过数据依赖性采集模式 (data-dependent acquisition, DDA) 进行分析。除盐后的样品用 A 液(含 0.1% FA 和 2% CAN, pH=10)溶解, 在 EASY-nano-LC 色谱系统上上样, 随后以 600 nL/min 的流速在分析柱上进行分离。色谱分离梯度为: 0–77 min, B 液(含 0.1% FA 的乙腈)从 6%到 20%线性上升; 77–109 min, B 液从 20%到 32%线性上升, 然后在 1 min 内上升至 90%并维持到 120 min。质谱数据的采集使用 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Scientific)。具体参数设置如下: 离子源喷雾电压为 2.0 kV、循环时间为 3 s、一级扫描范围为 300–1400 *m/z*、分辨率为 120 K、AGC target 为 5e⁵、Maximum IT 为 50 ms。二级使用 DIA (data independent acquisition)扫描模式, 离子源喷雾电压为 2.1 kV、累计时间为 0.05 s、扫描范围为 100–1500 *m/z*、一个 MS1 图谱最多与 45 个最强母离子进行串联扫描, 碰撞能量选择“rolling collision energy”。

1.6 质谱数据分析

首先, 质谱采集到的 DDA 原始数据导入到 Spectronout Pulsar X (Biognosys, Schlieren, Switzerland)建立 DDA 谱图库, 默认最优参数“BGS factory setting”进行建库。然后将 DIA 原始数据导入到 Spectronout Pulsar X 进行蛋白质定性定量分析。建库参数包括: Peptides FDR (最大错误发生率)、PSMs FDR 和 Proteins FDR 均设

置为 1%, 至多选择最优 6 个子离子生成库谱图。定量参数: iTR 标曲采用非线性拟合; 蛋白鉴定使用 Precursor *q*value cutoff \leq 0.01, Protein *q*value cutoff \leq 0.01, *P* 值校正用 Kernel Density Estimator; 蛋白定量使用的是离子峰面积, 至少选择 3 个子离子的平均强度定量。

1.7 生物信息学分析

首先对定性定量获得的原始数据以 *Ah* 为对照, 计算 ΔAHA_{1581} 中各蛋白丰度的比值, 以及进行 *T* 检验。取蛋白丰度比值差异 (fold change, FC) \geq 2 和 \leq 0.5、*P*-value $<$ 0.05 的蛋白作为差异表达蛋白进行生物信息学分析。利用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行样品间的相关性分析, 并利用 TBtool 软件生成结果图形; 质谱数据火山图分析利用 GraphPad Prism 8.0 软件; 利用在线软件 OmicsBean (<http://www.omicsbean.cn/>) 对差异蛋白进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 功能分析并结合 GOplot R 语言包编程绘图^[16]。进一步, 利用综合抗生素耐药数据库(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) 和毒力因子数据库 (Virulence Factors Database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) 对数据中的耐药基因和毒力因子进行筛选^[17–18], 进一步利用 Cytoscape 3.7.1 软件生成图形。

1.8 Western blotting 验证

制备 *Ah* 和 ΔAHA_{1581} 菌株的全蛋白样品, 首先蛋白样品进行 SDS-PAGE 分离, 然后利用 BIO-RAD 半干转膜仪(程序: 25 V, 15 min)将蛋白胶里的蛋白样品转移到 PVDF 膜上。利用含

5% (W/V)脱脂牛奶的 PBST 室温下封闭 1 h 后, 加入对应的一抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h, 用 PBST 洗膜 5 次, 每次 5 min。结束后加入二抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h 后, 用 PBST 洗膜 5 次, 每次 5 min。最后, 利用 BIO-RAD 的化学发光成像系统(ChemiDoc MP)进行 ECL 显色。

2 结果和分析

2.1 ΔAHA_{1581} 菌株的鉴定

对经过 2 次同源重组筛选获得的敲除菌株利用目的基因引物 P5P6 和同源臂外侧引物 P7P8 进行 PCR 验证, 结果如图 2-A 显示, 与野生型相比, 目的基因验证引物 P5P6 在 ΔAHA_{1581} 模板中 639 bp 的位置上没有目的条带, 而同源臂外侧引物 P7P8 的条带大小也明显较小; 进一步利用 A0KIL6 (AHA_{1581})蛋白的特异性抗体进行 Western blotting 验证, 结果如图 2-B 显示, 在野生型菌株相对应位置有明显的目的条带, 而在 ΔAHA_{1581} 中则没有。以上结果说明 AHA_{1581}

基因在嗜水气单胞菌中被成功敲除。

2.2 ΔAHA_{1581} 生理表型结果

本研究中, 测定 Ah 和 ΔAHA_{1581} 的运动、生物被膜形成能力以及胞外蛋白酶活性。结果发现, 在嗜水气单胞菌中敲除 AHA_{1581} 基因后, 细菌的泳动圈和集群运动圈明显大于野生型(图 3-A), 说明 ΔAHA_{1581} 运动能力高于野生型。利用结晶紫染色法比较 Ah 和 AHA_{1581} 突变株生物被膜形成能力, 发现在 Ah 中缺失 AHA_{1581} 基因后, 其生物被膜形成能力降低(图 3-B)。而胞外蛋白酶活性检测结果发现, 缺失 AHA_{1581} 基因后, 细菌的水解圈明显变大(图 3-C)。

2.3 ΔAHA_{1581} 耐受性检测结果

利用点板稀释法测定 ΔAHA_{1581} 菌株的耐受性, 结果如图 4 显示。与 Ah 相比, ΔAHA_{1581} 菌株在低温(4 °C)、Kan 和 Gen 胁迫下生长得更好, 其耐受性更高; 而对 Cr^{6+} 离子的敏感性更高, 生长状况明显低于野生型。

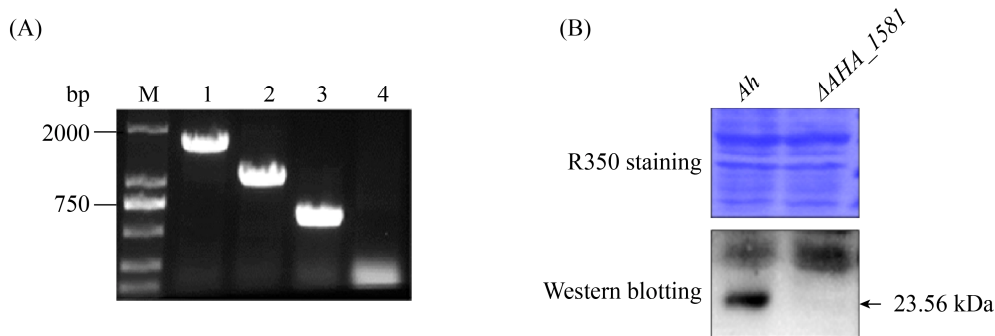


图 2. ΔAHA_{1581} 菌株的验证

Figure 2. Verification of the knockout ΔAHA_{1581} . A: PCR validation; B: Western blotting verification. Coomassie R-350 staining of the membrane indicated equal loading of the protein samples. 1: Primer P7P8, Ah template, 1802 bp; 2: Primer P7P8, ΔAHA_{1581} template, 1163 bp; 3: Primer P5P6, Ah template, 639 bp; 4: P5P6, ΔAHA_{1581} template.

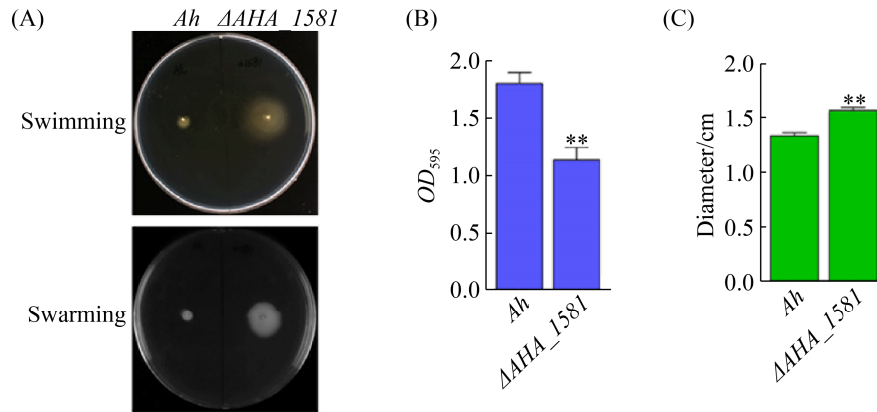


图 3. ΔAHA_{1581} 生理表型测定结果

Figure 3. The results of ΔAHA_{1581} physiological phenotype. A: swimming and swarming activities; B: biofilm formation ability ($P < 0.05$); C: extracellular protease activity ($P < 0.05$).

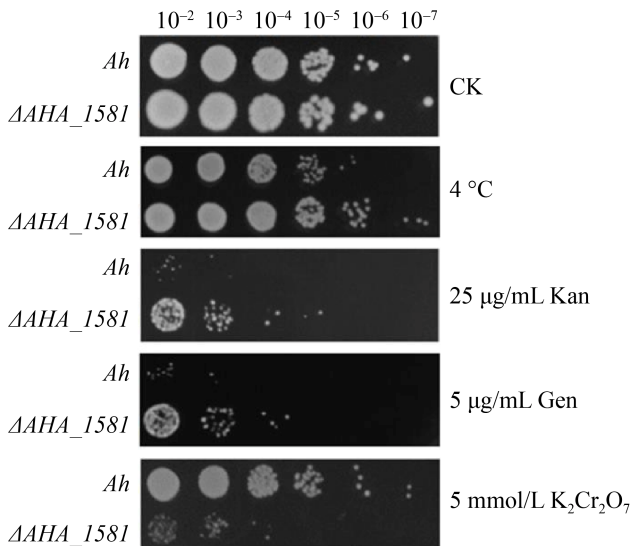


图 4. ΔAHA_{1581} 耐受性检测结果

Figure 4. The tolerance of *A. hydrophila* wild-type and ΔAHA_{1581} strains.

2.4 ΔAHA_{1581} 和野生型嗜水气单胞菌定量蛋白质组学的比较分析

为了进一步研究 AHA_{1581} 基因的功能, 本研究提取了 *Ah* 和 ΔAHA_{1581} 的全蛋白样品进行定量蛋白质组学研究。样品进行 3 次生物学重复, 利用 IBM SPSS Statistics 19 软件结合

TBtool 软件对样品间的相关性进行分析, 结果显示样品的生物学重复高度相似, 回归系数均大于 0.9, 表明本研究中的质谱定量分析结果稳定可靠(图 5-A)。本研究中, 共鉴定到 2654 个蛋白(置信度 $\geq 95\%$, 肽段数 ≥ 2 和 FDR $< 1\%$), 以蛋白丰度比值差异(FC) ≥ 2 (上调表达)和 ≤ 0.5 (下调表达)、*T* 检验 P -value < 0.05 的蛋白作为差异表达蛋白。与 *Ah* 相比, 共鉴定到 201 个(占总蛋白 7.573%)差异表达蛋白, 其中 59 个下调表达, 142 个上调表达, 利用火山图分布情况展示差异蛋白见图 5-B, 部分差异较为明显的蛋白见表 2。

2.5 Western blotting 验证结果

为了验证定量蛋白质组学数据的可靠性, 利用 2 个(P55870 和 A0KK68)差异蛋白特异性抗体进行 Western blotting 验证。结果如图 6 显示, 在嗜水气单胞菌中缺失 AHA_{1581} 基因后, P55870 和 A0KK68 蛋白的表达量上调与定量蛋白质组学数据结果基本一致, 表明质谱数据结果具有可靠性。

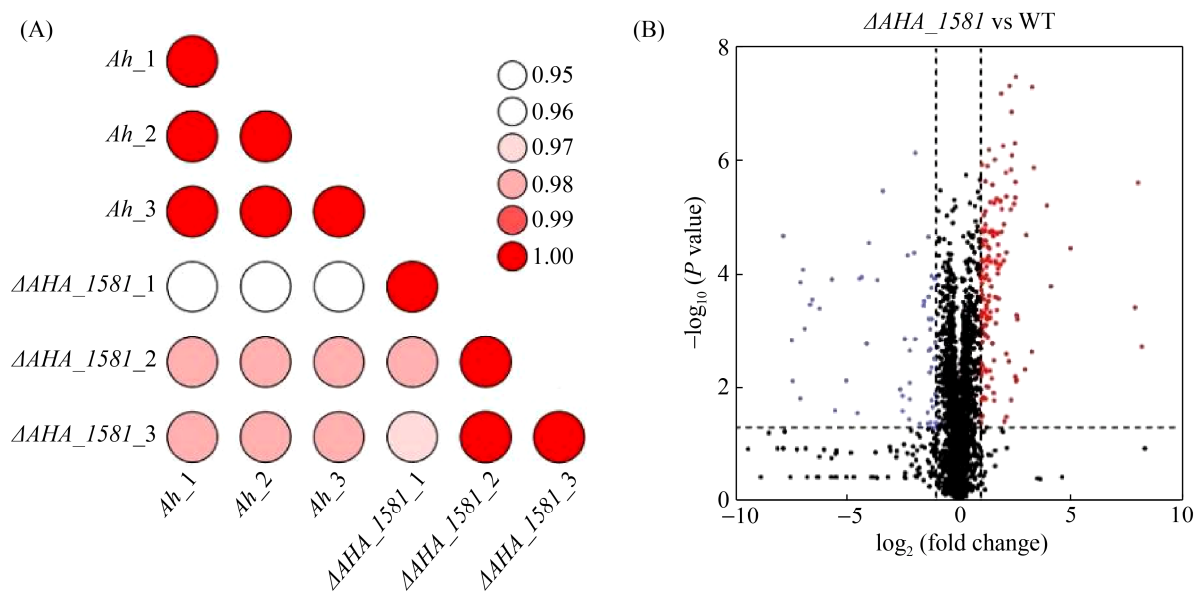


图 5. 嗜水气单胞菌野生型和 ΔAHA_{1581} 蛋白质组学数据分析

Figure 5. *A. hydrophila* wild type and ΔAHA_{1581} of quantitative proteomic analysis. A: correlation analysis of protein abundance; B: the Volcano plots of the significantly differentially expressed proteins. Each dot represents a protein, purple dot represents down regulated expression, red dot represents up regulated expression.

表 2. ΔAHA_{1581} 与野生型嗜水气单胞菌定量蛋白质组学分析部分差异表达蛋白列表

Table 2. Quantitative proteomic analysis of some differentially expressed proteins between ΔAHA_{1581} and wild-type *A. hydrophila*

Protein	Gene	Protein description	Log ₂ (Ratio)	-log ₁₀ (P)
A0KI69	<i>AHA_1431</i>	Pts system, fructose-specific iabc component	10.88	9.37
A0KLW8	<i>AHA_2761</i>	4Fe-4S binding domain protein	8.20	2.73
A0KKK3	<i>rmf</i>	Ribosome modulation factor	8.03	5.61
A0KL26	<i>AHA_2463</i>	Type I secretion target ggxgdxxxx repeat (2 copies) domain protein	7.89	3.42
A0KFX8	<i>AHA_0621</i>	Pyruvate formate lyase activating enzyme	5.01	4.46
A0KLP4	<i>AHA_2687</i>	Microbial serine proteinase	4.14	3.78
A0KIE7	<i>AHA_1510</i>	Uncharacterized protein	3.95	5.21
A0KQG5	<i>arcC-2</i>	Carbamate kinase	3.37	5.88
A0KFX7	<i>AHA_0620</i>	Uncharacterized protein	3.28	7.30
A0KIA0	<i>AHA_1463</i>	1,3-propanediol dehydrogenase	3.27	8.14
A0KK68	<i>AHA_2145</i>	Long-chain fatty acid transport protein	1.04	4.08
P55870	<i>AHA_1512</i>	Hemolysin ahh1	1.03	3.34
A0KIM0	<i>napD</i>	Chaperone NapD	-6.64	3.47
A0KPB0	<i>AHA_3655</i>	Uncharacterized protein	-6.88	3.03
A0KPJ7	<i>AHA_3750</i>	Uncharacterized protein	-6.96	4.08
A0KLJ7	<i>rmfE</i>	Ion-translocating oxidoreductase complex subunit E	-7.07	3.85
A0KNS1	<i>AHA_3433</i>	Outer membrane protein	-7.08	1.81
A0KI48	<i>AHA_1410</i>	Conserved domain protein	-7.41	2.12
A0KK11	<i>AHA_2082</i>	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	-7.46	2.84
A0KIM2	<i>AHA_1587</i>	MauM/NapG ferredoxin-type protein	-7.84	4.67
A0KIL9	<i>napF</i>	Ferredoxin-type protein NapF	-11.62	5.05
A0KJ12	<i>arsC-2</i>	Arsenate reductase	-13.07	5.11

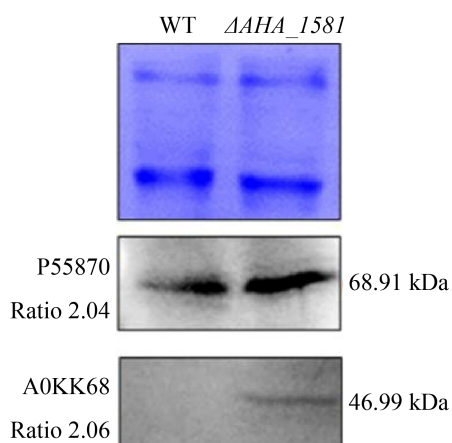


图 6. Western blotting 验证定量蛋白质组学结果
Figure 6. Western blotting verification. Coomassie blue R350 membrane staining showed the amount of protein sample loaded; ratio showed the change multiple of the protein in quantitative proteomic data.

2.6 ΔAHA_{1581} 和野生型嗜水气单胞菌定量蛋白质组学的生物信息学分析

为了研究转录因子 AHA_{1581} 对嗜水气单胞菌生理生化过程的调控作用, 进一步对定量蛋白质组学数据进行 GO 和 KEGG 分析, 结果如图 7 显示。分子功能聚类中, 结果发现转录因子 AHA_{1581} 参与调控 7 种分子功能, 主要涉及阳离子结合(GO: 0043169, cation binding)、铁硫团簇结合(GO: 0051536, iron-sulfur cluster binding)、转移酶活性和转移酰基(GO: 0016746, transferase activity, transferring acyl groups); 而水解酶活性, 作用于糖基键(GO: 0016798, hydrolase activity, acting on glycosyl bonds), 相关蛋白全部上调表达(图 7-A)。在 KEGG 代谢通路富集结果中发现, 转录因子 AHA_{1581} 主要参与调控次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、不同环境下的微生物代谢(microbial metabolism in diverse environments)、

双组分系统(two-component system)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)和碳代谢(carbon metabolism)等相关通路, 且各代谢通路相关蛋白大部分是上调表达的(图 7-B)。

进一步还分析了转录因子 AHA_{1581} 参与调控的耐药基因和毒力因子, 结果如图 8 显示。结果发现转录因子 AHA_{1581} 参与调控 13 个耐药基因, 其中 5 个下调表达 8 个上调表达, 还参与调控 5 个毒力因子的差异表达, 其中 AHA_{0389} 、 $pilF$ 和 $ahh1$ 上调表达, AHA_{0523} 和 AHA_{0524} 下调表达。但是, 这些耐药基因和毒力因子在嗜水气单胞菌中的功能还不清楚, 有待进一步研究验证。

3 讨论

LuxR 家族蛋白通常由 250 个氨基酸组成, 具有 2 个功能域, 一个用于 AHL 结合的 N 端 DNA 结合域和一个用于转录调控的 C 端 DNA 结合域, 从而调控下游基因的表达以调节某些功能^[19]。LuxR 型转录因子控制革兰氏阴性细菌中基于酰基高丝氨酸内酯的群体感应(AHL-QS), 其还参与协调包括编码毒力因子和抗生素的生物合成、运动和生物被膜形成等多种基因的表达^[10,20]。有研究还发现在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中突变 LuxR 型转录因子相关基因能够降低细菌的存活率和致病性^[21]。本研究中, 我们对以前从未报道过的 LuxR 家族转录调节因子 AHA_{1581} 的功能进行研究, 成功敲除 AHA_{1581} 基因(ΔAHA_{1581})后, 细菌的存活率没有明显的差异, 但是细菌的运动能力增强、生物被膜形成能力降低以及胞外蛋

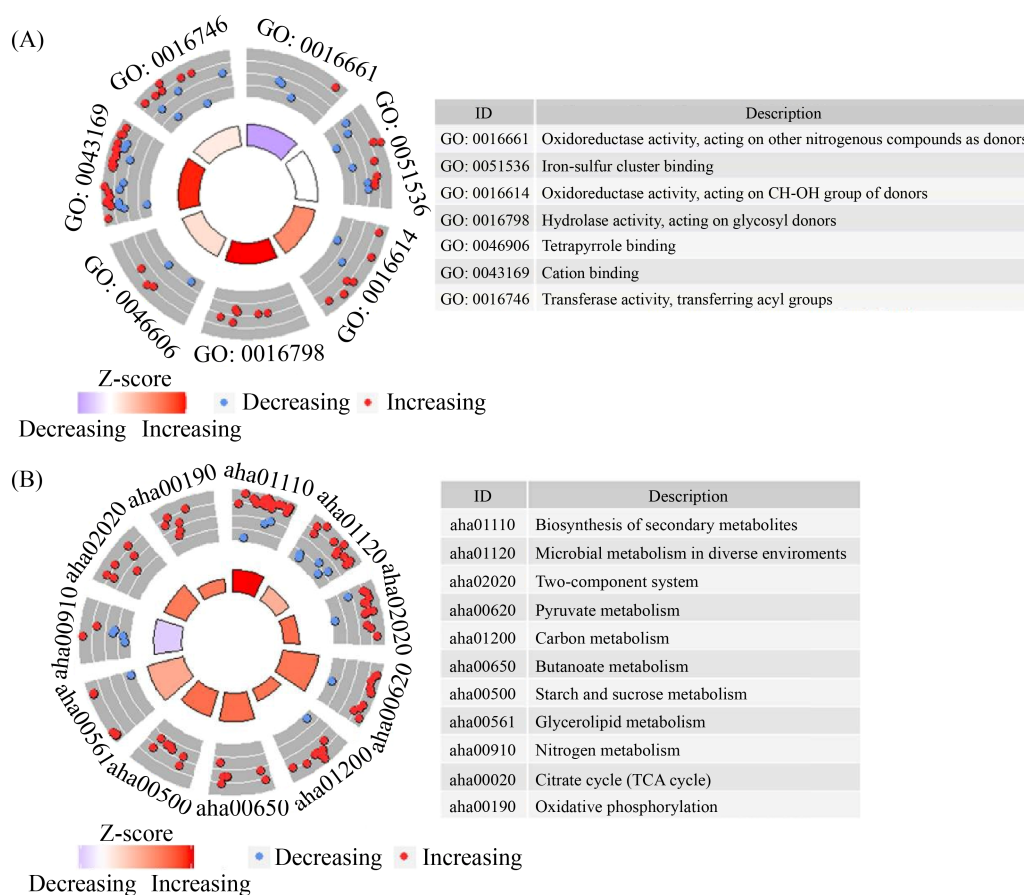


图 7. 嗜水气单胞菌野生型与 ΔAHA_{1581} 差异蛋白的生物信息学分析

Figure 7. *A. hydrophila* wild type and ΔAHA_{1581} bioinformatics analysis of expressed differential proteins. A: Molecular function analysis of GO annotation; B: KEGG metabolic pathway analysis. The outer circle shows a scatter plot of the expression levels ($\log_{10}FC$) for the proteins in each GO/KEGG term. The inner ring is a bar plot where the bar height indicated the significance of the GO/KEGG term ($-\log_{10} P$ value) and the color indicated the Z-score.

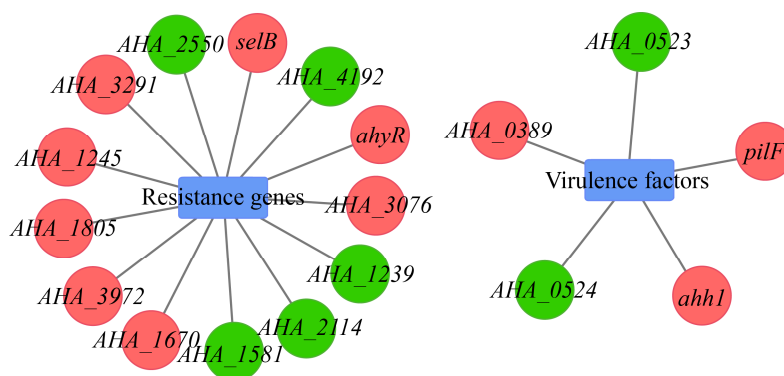


图 8. 转录因子 AHA_{1581} 参与调控的耐药基因和毒力因子

Figure 8. Drug resistance genes and virulence factors regulated by transcription factor AHA_{1581} . The red circle represents the upregulation expression, and the green circle represents the downregulation expression.

白酶活性增强,说明转录因子 *AHA_1581* 可能与细菌致病性密切相关;耐受性检测结果还发现其可能参与调控细菌的耐药性以及低温和 Cr^{6+} 的胁迫。但是,转录因子 *AHA_1581* 如何参与调控的机制还有待进一步研究。

接下来利用定量蛋白质组学技术对 ΔAHA_1581 蛋白表达谱进行分析,探讨转录因子 *AHA_1581* 参与调控的生物过程。通过毒力因子数据库的筛检,首先发现在 ΔAHA_1581 中,溶血素 *Ahh1* 蛋白上调表达,粘附因子 MSHAIV型菌毛(*AHA_0389*)、Tap IV型菌毛(*pilF*)和 I型菌毛(*AHA_0523* 和 *AHA_0524*)等毒力因子发生显著变化。之前的研究报道,在嗜热栖热菌 HB27 中,*PilF* 是IV型菌毛生物发生必不可少的关键组分,与细菌粘附和生物被膜的形成密切相关^[22],在 *Shewanella oneidensis* 菌株中 *Msh* 菌毛相关基因发生突变,可促进细菌在斑马鱼中定殖,增加细菌泳动,减少表面黏附^[23]。因此,*AHA_1581* 可能参与调控嗜水气单胞菌的致病性。进一步代谢通路富集分析发现,能量生成相关途径如丙酮酸代谢、TCA 循环、淀粉和蔗糖代谢过程等发生显著变化,表明 *AHA_1581* 还参与调控胞内能量生成相关代谢途径。此外,通过综合抗生素耐药数据库的分析,发现转录因子 *AHA_1581* 参与调控 13 个耐药基因的差异表达,其中 *AHA_3076*、*AHA_4192* 和 *AHA_2550* 基因通过抗生素外排作用(antibiotic efflux)来调控细菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性。组学分析还发现,2 个内膜蛋白(*yebE* 和 *yoaE*)、3 个外膜蛋白(*AHA_3433*、*ompW* 和 *ompA*)以及 4 个 TonB 系统相关蛋白(*AHA_4275*、*AHA_3434*、*AHA_0461* 和 *AHA_0494*)在敲除菌中发生显著变化。众所周

知,膜蛋白通过控制小分子溶质进入细胞内部,在抗生素耐药中发挥重要作用,而先前的研究报道 TonB 系统参与细菌多药耐药^[24-25]。本课题组前期的研究中也发现在耐土霉素的嗜水气单胞菌中 TonB 系统相关蛋白显著上调表达^[26]。这些可能是导致 ΔAHA_1581 对 KAN 和 GEN 更加耐药、对高浓度的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 更加敏感的原因,但其调控机制还有待进一步的研究。

4 结论

本研究通过基因敲除技术,在嗜水气单胞菌中成功构建了 *AHA_1581* 菌株,并测定了其生理表型和耐受性,结果发现 *AHA_1581* 基因影响细菌运动、生物被膜、胞外蛋白酶活性、耐低温、耐 KAN 和 GEN,以及对高浓度 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 敏感。进一步的定量蛋白质组学分析发现,*AHA_1581* 参与调控双组分调节系统、丙酮酸代谢、碳代谢、TCA 循环等细菌重要代谢过程以及细菌耐药基因和毒力因子的表达。综上所述,嗜水气单胞菌中的转录因子 *AHA_1581* 在调控细菌致病性以及生物过程中起着重要的作用,其可以作为预防和控制嗜水气单胞菌的一个有效靶点。

参考文献

- [1] Lu ZJ, Yang MX, Zhang K, Zhan FB, Li FL, Shi F, Li YN, Zhao LJ, Li J, Lin L, Qin ZD. *Aeromonas hydrophila* infection activates death receptor apoptosis pathway in the red blood cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 2021, 532: 735956.
- [2] Rasmussen-Ivey CR, Figueras MJ, McGarey D, Liles MR. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1337.
- [3] Vasaikar S, Saraswathi K, De A, Varaiya A, Gogate A. *Aeromonas* species isolated from cases of acute

- gastroenteritis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2002, 20: 107–109.
- [4] Zhang Q, Shi GQ, Tiang GP, Zou ZT, Yao GH, Zeng G. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2012, 3(4): 39–43.
- [5] Ren YL, Li Y, Han G, Zhu F, Liu C, Song JL. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(5): 759–765. (in Chinese)
任亚林, 李耘, 韩刚, 朱锋, 刘畅, 宋金龙. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 759–765.
- [6] Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: a mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 2016, 9(5): 535–544.
- [7] van Kessel JC, Ulrich LE, Zhulin IB, Bassler BL. Analysis of activator and repressor functions reveals the requirements for transcriptional control by LuxR, the master regulator of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *mBio*, 2013, 4(4): e00378-13.
- [8] Zeng LR, Xie JP. Molecular basis underlying LuxR family transcription factors and function diversity and implications for novel antibiotic drug targets. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(11): 3079–3084.
- [9] Engebrecht J, Neilson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 1983, 32(3): 773–781.
- [10] Chen J, Xie JP. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(10): 2694–2702.
- [11] Tang R, Zhu JL, Feng LF, Li JR, Liu XX. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297: 60–71.
- [12] Mao LL, Qin YX, Kang JP, Wu B, Huang LX, Wang SY, Zhang MM, Zhang JH, Zhang RX, Yan QP. Role of LuxR-type regulators in fish pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(2): 215–225.
- [13] Li WX, Ali F, Cai QL, Yao ZJ, Sun LN, Lin WX, Lin XM. Quantitative proteomic analysis reveals that chemotaxis is involved in chlortetracycline resistance of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Proteomics*, 2018, 172: 143–151.
- [14] Pan YR, Zhang CL, Zhu SQ, Zeng MY. Inhibition of brominated furanone to quorum sensing regulating behaviors of *Vibrio anguillarum*. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 231–237. (in Chinese)
潘玉荣, 张彩丽, 朱素芹, 曾名湧. 溴化呋喃酮对鳃弧菌群体感应调控行为的抑制研究. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 231–237.
- [15] Wang GB, Cai QL, Li ZQ, Zhao YY, Lin ZP, Lin XM. Effect of hfq2 gene in *Aeromonas hydrophila* on biofilm formation. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(14): 1506–1514. (in Chinese)
王贵宾, 蔡奇岚, 李泽琦, 赵怡扬, 林镇平, 林向民. 嗜水气单胞菌 hfq2 基因对生物被膜形成的影响. *科学通报*, 2019, 64(14): 1506–1514.
- [16] Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2912–2914.
- [17] McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, de Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJV, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang WL, Yan M, Yu T, Wright GD. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(7): 3348–3357.
- [18] Liu B, Zheng DD, Jin Q, Chen LH, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D687–D692.
- [19] Subramoni S, Florez Salcedo DV, Suarez-Moreno ZR. A bioinformatic survey of distribution, conservation, and probable functions of LuxR solo regulators in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 16.
- [20] Lau YY, How KY, Yin WF, Chan KG. Functional characterization of quorum sensing LuxR-type transcriptional regulator, EasR in *Enterobacter asburiae* strain L1. *PeerJ*, 2020, 8: e10068.
- [21] Fang HH, Yu D, Hong YZ, Zhou XD, Li CY, Sun BL. The LuxR family regulator Rv0195 modulates *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and virulence. *Tuberculosis*, 2013, 93(4): 425–431.
- [22] Wu WL, Liao JH, Lin GH, Lin MH, Chang YC, Liang SY, Yang FL, Khoo KH, Wu SH. Phosphoproteomic analysis reveals the effects of PilF phosphorylation on type IV Pilus and biofilm formation in *Thermus thermophilus* HB27. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(10): 2701–2713.
- [23] Lebov JF, Bohannon BJM. Msh Pilus mutations increase the ability of a free-living bacterium to colonize a piscine host. *Genes*, 2021, 12(2): 127.

- [24] Ghai I, Ghai S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11: 523–530.
- [25] Zhao QX, Li XZ, Mistry A, Srikumar R, Zhang L, Lomovskaya O, Poole K. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(9): 2225–2231.
- [26] Li WX, Zhao YY, Yu J, Lin L, Ramanathan S, Wang GB, Lin XM, Pang HY. TonB-dependent receptors affect the spontaneous oxytetracycline resistance evolution in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(1): 154–163.

Study on the transcription factor *AHA_1581* in *Aeromonas hydrophila* on the regulation mechanism of bacterial physiological functions

Wanxin Li^{1,2,3}, Yiyang Zhao^{1,2}, Ling Lin^{1,2*}, Xiangmin Lin^{1,2,3*}

¹ School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

² Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

³ Fujian Key Laboratory of Marine Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: LuxR family transcription factors can inhibit or stimulate the expression of various functional genes to maintain the stability of cell function. **[Objective]** To study the role of LuxR family transcription factors in *Aeromonas hydrophila*. **[Methods]** In this study, we have knocked out the *AHA_1581* gene by homologous recombination technology to understand their role in virulence and drug resistance. **[Results]** The deletion of *AHA_1581* gene not only enhanced the extracellular protease enzyme activity, the tolerance of *A. hydrophila* to survive under low temperature, different antibiotic stress, but also reduced the biofilm formation capability. Further the quantitative proteomic and bioinformatics analysis showed that the deletion of *AHA_1581* gene 59 proteins were down-regulated and 142 proteins were up-regulated, which affected several important biological processes and virulence pathways in *A. hydrophila*. **[Conclusion]** Overall, the outcome of this study on the role of transcription factor *AHA_1581* in the biological processes and virulence of *A. hydrophila* may pay the way for controlling their infections.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, LuxR family transcription factor, *AHA_1581*, quantitative proteomics, physiological function

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31802343) and by the Fujian Provincial Marine Biotechnology Key Laboratory Fund (2020MB04)

*Corresponding authors. E-mail: Ling Lin, linling0033@fafu.edu.cn; Xiangmin Lin, xiangmin@fafu.edu.cn

Received: 4 February 2021; Revised: 25 April 2021; Published online: 19 August 2021