



嗜水气单胞菌中类组蛋白 HupB 生理功能的研究

卢金连^{1,2,3}, 张丽珊^{1,2,3}, 刘子秋^{1,2,3}, 宋欢欢^{1,2,3}, 吴昊炜^{1,2,3}, 林向民^{1,2,3*}

1 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

2 福建农林大学 作物生态与分子生理重点实验室, 福建 福州 350002

3 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

卢金连, 张丽珊, 刘子秋, 宋欢欢, 吴昊炜, 林向民. 嗜水气单胞菌中类组蛋白 HupB 生理功能的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2656-2667.

LU Jinlian, ZHANG Lishan, LIU Ziqiu, SONG Huanhuan, WU Haowei, LIN Xiangmin. Physiological function of histone-like HupB in *Aeromonas hydrophila*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2656-2667.

摘要:【目的】DNA 结合蛋白 HU 蛋白是一类组蛋白样蛋白, 其参与细菌 DNA 的重组与修复, 在细菌的转录调控中发挥重要作用, 但目前该蛋白对细菌生理功能的影响尚不完全清楚。为了更好地理解 HU 蛋白, 本研究探讨 HupB 的生理功能。【方法】以嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) ATCC 7966 为研究材料, 利用同源重组技术构建编码 HU 蛋白 β 亚基的 *hupB* 基因缺失菌株, 并对其常见生理表型进行测定。【结果】*hupB* 基因缺失菌株的溶血性、胞外蛋白酶活性和运动性均显著增强, 而生物被膜形成能力显著下降, 并且 $\Delta hupB::hupB$ 菌株中生物被膜形成能力恢复。进一步利用基于 label-free 的定量蛋白质组学技术比较了野生株和 $\Delta hupB$ 突变株的差异表达蛋白, 发现 235 个蛋白表达上升, 224 个蛋白表达下降。生物信息学分析显示 *hupB* 敲除后导致蛋白质翻译、生物被膜生成以及信号转导等多个生物过程相关蛋白表达发生变化。【结论】研究结果表明嗜水气单胞菌 HupB 蛋白能显著影响细菌生物被膜形成能力, 以上研究为更好地探究嗜水气单胞菌 HupB 蛋白对细菌生理功能的调控机制提供理论基础。

关键词: 嗜水气单胞菌; 定量蛋白质组学; HupB; 生理功能; 生物被膜生成

资助项目: 福建省自然科学基金(2020J02023)

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (2020J02023).

*Corresponding author. Tel: +86-591-83789494, E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

Received: 2022-10-10; Accepted: 2023-02-22; Published online: 2023-04-12

Physiological function of histone-like HupB in *Aeromonas hydrophila*

LU Jinlian^{1,2,3}, ZHANG Lishan^{1,2,3}, LIU Ziqiu^{1,2,3}, SONG Huanhuan^{1,2,3}, WU Haowei^{1,2,3}, LIN Xiangmin^{1,2,3*}

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

2 Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: [Objective] The DNA-binding protein HU is a histone-like protein involved in the recombination and repair of bacterial DNA and plays a regulatory role in the transcription of bacteria, whereas the role of this protein in the physiological activities of bacteria remains unknown. In order to learn more about the HU protein, we investigated the physiological function of HupB. **[Methods]** We constructed a *hupB*-deleted strain of *Aeromonas hydrophila* by using homologous recombination technology and then determined the physiological phenotype of the strain. **[Results]** The deletion of *hupB* gene significantly enhanced the hemolysis, extracellular protease activity, and motility, while it significantly reduced the biofilm formation. The biofilm formation was restored in $\Delta hupB::hupB$. Further, label-free quantitative proteomics analysis was performed to study the differentially expressed proteins between the wild type and $\Delta hupB$, which revealed 235 up-regulated proteins and 224 down-regulated proteins in $\Delta hupB$. The bioinformatics analysis showed that the differentially expressed proteins were involved in a variety of biological processes such as protein translation, biofilm formation, and signal transduction. **[Conclusion]** The HupB protein can remarkably affect the biofilm formation of *A. hydrophila*. The results provide a theoretical basis for better understanding the regulatory role of HupB in the physiological activities of *A. hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; quantitative proteomics; HupB; physiological function; biofilm formation

细菌类组蛋白(HU)在细菌中广泛分布,通过对细菌染色体 DNA 的压缩或者拓扑结构重排,参与 DNA 的复制、分离和转录过程,从而在多个生理功能中起重要的调节作用^[1]. HU 蛋白主要包括 α 和 β 两种亚基,分别由 *hupB* 和 *hupA* 编码,HupA 和 DNA 结合有关并能在 DNA 构象改变时对 DNA 进行重塑^[2],会损害艰难梭菌(*Clostridium difficile*)的生存能力,而 HupB 其

C 端结构域对 DNA 结合至关重要^[3]. 已有研究报道, HupB 在维持细菌正常生理功能中也起着重要的作用. 例如,柑橘溃疡病菌中 *hupB* 基因的缺失,导致细菌生物被膜生成能力以及细菌毒性感染能力显著下降^[4]. 此外,还有研究表明, HupB 蛋白在细菌的耐药性、抗 UV 辐射以及铁离子动态平衡调控中起重要的调控作用^[5-7]. 但是,目前该蛋白对细菌生理功能的影响尚不完全

清楚。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是水产养殖中的一种重要病原体,广泛存在于水生动物、水和土壤环境中^[8]。该菌作为一种条件致病菌,在淡水鱼养殖中可引起大规模淡水鱼败血症^[9],其引起的流行病爆发每年在全球造成数百万美元的经济损失,严重影响水产养殖业的健康发展^[10]。为了更好地理解 *hupB* 基因对嗜水气单胞菌生理功能的影响,本研究利用同源重组的原理构建了嗜水气单胞菌 ATCC 7966 敲除菌株 *hupB* (*AHA_2014*),以评估其对细菌生理表型的影响。进一步结合定量蛋白质组学技术,分析比较缺失菌株和野生型菌株之间的差异表达蛋白,最后通过生物信息学和表型差异的分析,探讨 HupB 蛋白在嗜水气单胞菌中可能参与的生物过程及其分子调控机制,为该病原菌的防控策略提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用菌株[嗜水气单胞菌 ATCC 7966 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)]及质粒均保存于本实验室,菌株均用 LB 培养基培养。本研究所用的化学试剂均为分析纯。绵羊血购于索莱宝生物科技公司;细菌基因组总 DNA 提取试剂盒、*Sac* I 和 *Xba* I 限制性内切酶均购于宝生生物工程(大连 TaKaRa)有限公司;细菌质粒提取试剂盒购买于 OMEGA;DNA 聚合酶、氯霉素(chloramphenicol, Chl)和氨苄青霉素(ampicillin, Amp)均购于上海翊圣生物科技有限公司;多片段无缝连接酶购于南京诺唯赞生物科技有限公司;核酸染料、甘油、蔗糖和琼脂糖(agarose B, Low EEO)均购于生工生物工程(福建)股份有限公司。

1.2 细菌培养和收集

从-80 °C冰箱中取出甘油管保存的细菌菌

株,划线于平板中,待长出单克隆菌株后,挑取单克隆至 5 mL LB 的试管中,放置在 30 °C 恒温摇床以 200 r/min 振荡培养 16 h;将该菌液按照 1% (体积分数)的比例转至含 5 mL LB 的试管中,于 30 °C 恒温摇床以 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 1.0 左右,12 000 r/min 高速离心 1 min 收集菌体,然后用 pH 7.4 的 1×磷酸缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤菌体 3 次。

1.3 敲除、补救和空载菌株的构建

本研究敲除菌株的构建利用同源重组的方法进行^[11]。在嗜水气单胞菌 ATCC 7966 野生型(wild type, WT)基因组中 *hupB* 基因(*AHA_2014*)上下游 500 bp 左右处设计引物 P1、P2、P3 和 P4(上游引物: P1/P2;下游引物: P3/P4)。将上下游各 500 bp 的片段扩增出来并连接到已双酶切好的质粒(酶切位点: *Xba* I、*Sac* I)中,转入大肠杆菌 MC1061 感受态细胞中,于 37 °C 恒温摇床以 200 r/min 振荡培养 1.0–1.5 h 后涂布于含有 Chl 的固体 LB 平板中。从验证正确的 MC1061 中提取质粒,再转入大肠杆菌 S17 中,于 37 °C 恒温摇床以 200 r/min 振荡培养 16 h。将含有质粒的 S17 细菌与嗜水气单胞菌 ATCC 7966 进行结合,通过 20%蔗糖培养基筛选,并在目的基因两端及上下游 600 bp 处设计引物,分别为 P5/P6 及 P7/P8,进行 PCR 验证,最后进行测序比对获得正确的敲除菌株 $\Delta hupB$ 。为了构建空载菌株($\Delta hupB::vector$),将 pBBR1-MCS1 质粒通过电穿孔将其转入到敲除菌株 $\Delta hupB$ 中;为了构建补救菌株($\Delta hupB::\Delta hupB$),首先在嗜水气单胞菌 *hupB* 基因 N 端构建 6×His 标签,并连接到 pBBR1-MCS1 质粒中,然后通过电穿孔将其转入到敲除菌株 $\Delta hupB$ 中,补救菌株和空载菌株均用 pBBR1-MCS1 通用引物(pBBR1-MCS1-F/pBBR1-MCS1-R)验证(研究中使用的各引物见表 1)。

表 1 *hupB* 基因敲除以及验证引物列表

Table 1 The primers used for gene deletion and verification in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
P1	CATGAATCCCGGGAGAGCTCTGATGTGGCCATGACGGG
P2	CCGGCTCTTATATTCCCCTTTTATCGAACATC
P3	AAGGGAATATAAGAGCCGGGCGCTGATATCAC
P4	CGATCCCAAGCTTCTTCTAGACTCATCGCTGACGCGCAG
P5	GCCATGGCTGATATCGGATCCGTGAATAAATCTCAACTGATTGAC
P6	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTAGTTGACAGCGTCTTTCAGGG
P7	GGATCTTCCAGAGATCCGACTTCTACGAGAAGCGC
P8	CTGCCGTTGACGATGGCGGATCAGCTGCAGATAG
<i>hupB</i> -F	GTCGACGGTATCGATAAGCTTCCGGTTCGCTGGATTGACG
<i>hupB</i> -R	CGCTCTAGAAGTAGTGGATCCGTTGAATGGTGATGGTGATGATGCAGCGTCTTTCAGGGCCTTACC
pBBR1-MCS1-F	GCGCGCAATTAACCCTCACTAAAG
pBBR1-MCS1-R	GCGCGCGTAATACGACTCAC

1.4 细菌溶血性和胞外蛋白酶活性的测定

配制含 0.8%或 1.0%琼脂粉的 LB 固体培养基, 121 °C 灭菌 20 min, 待培养基冷却至室温后, 向培养基中加入 7 mL 绵羊血或 1% (质量体积分数) 脱脂牛奶并混匀倒入平板中; 凝固后用 10 μL 移液枪吸头在每个平板中打 3 个孔, 而后将培养至 OD_{600} 为 1.0 的菌液吸取 10 μL 于孔中, 在 30 °C 培养箱中倒置平板培养 16 h, 进行细菌溶血性和细菌胞外蛋白酶活性的测定。测量以上蛋白酶或溶血环的大小直径, 并独立重复 3 次。

1.5 细菌生物被膜形成能力测定

利用结晶紫染色法检测细菌的生物被膜形成能力^[12]。将培养至 OD_{600} 为 1.0 的菌株用新鲜的 LB 培养基按 1:100 稀释, 取 200 μL 菌液加入 96 孔板中, 每个样品设置 8 个重复组, 30 °C 培养 24 h。次日取出 96 孔板, 去除培养液并用蒸馏水洗涤 3 次, 室温干燥。而后加入 200 μL 甲醇, 静置 15 min, 弃甲醇, 用蒸馏水洗涤 3 次, 室温风干。然后, 在每个孔中加入 200 μL 0.1% (质量体积分数) 结晶紫溶液, 室温下染色 20 min 后去除多余的染液, 并用蒸馏水洗涤 3 次, 室温干燥。最后每孔加入 220 μL 95% (体积分数) 乙醇溶液, 室温孵育 10 min。用 SpectraMax[®] i3 多功能微孔板检测 OD_{595} 处的吸光度, 最后导出数

据处理并进行显著性差异分析, 并独立重复 3 次。

1.6 细菌泳动和爬动能力检测

分别配制 0.3%和 0.6% (质量体积分数) 琼脂的 LB 培养基, 121 °C 灭菌 20 min, 待培养基冷却至室温后倒平板, 吹干, 用无菌移液枪吸头挑取相同大小的单克隆点在平板中, 于 30 °C 培养 6–8 h 后测量泳动和爬动圈的大小直径, 并独立重复 3 次。

1.7 菌体蛋白的质谱(LC-MS/MS)测定

按照 1% (V/V) 的比例转接过夜菌至 20 mL LB 液体培养基中, 于 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 1.0, 离心, 弃上清, 用 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次, 将菌体重悬于 0.5 mL 的细胞裂解液中, 超声破碎至溶液接近澄清, 4 °C、18 000×g 离心 15 min, 收集上清, 用 Broadford 试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司)测定蛋白的浓度, 然后参照过滤辅助样品制备(filter-aided sample preparation, FASP)方法进行酶解^[13]。将酶解得到的脱盐肽样品溶于含 0.1% 甲酸的乙腈中, 并通过 EasynLC 1200 (Thermo Scientific) 加入色谱柱, 然后利用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行蛋白的鉴定与定量, MS 扫描模式为数据相关采集(DDA)。MS/MS 采用 30% 的 HCD 碰撞能量和 375–1 600 的扫描范围(m/z)。对每个样本重复扫描 3 次。利用 MaxQuant 软件(2.0.3.1 版

本)分析原始 MS 数据,设置嗜水气单胞菌 ATCC 7966 为数据库进行搜索,多肽和蛋白质错误发现率(FDR)界限值均设置为 0.01,并且设定每种蛋白质鉴定至少有 2 个唯一的肽匹配。选择 $\Delta hupB$ 与 WT 的蛋白丰度比差异(ratio)>1.5 倍,且每个样品各 3 次生物学重复之间的 Student's *t* 检验 *P* 值<0.05 的蛋白作为差异表达蛋白(differential expression proteins, DEPs)。

1.8 生物信息学分析

利用在线网站 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)进行差异表达基因的基因本体论(gene ontology, GO)分析,并对结果进行可视化及绘图^[14];使用 Cytoscape (v3.9.1)软件中的 STRING 插件进行蛋白质间的相互作用网络预测,并利用 MCODE 插件按照默认设定进行聚类分析^[15-16]。

1.9 蛋白质印迹法(Western blotting)

利用实验室已有抗体,通过 Western blotting

方法对质谱数据中部分蛋白的差异表达进行验证。首先,通过 SDS-PAGE 胶对蛋白进行分离,将蛋白用 BIO-RAD (trans-blot turbo)半干膜转移仪(90 V, 35 min)转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。加入脱脂牛奶封闭后加入一抗(实验室制备的已有抗体, 1:5 000), 4 °C 孵育过夜,用 PBST 洗膜 5 次,每次 5 min;加入二抗(兔抗, 1: 5 000),室温孵育 1 h,用 PBST 洗膜 5 次,每次 5 min。最后用 Western ECL 底物(BioRad)检测通过蛋白质印迹形成的膜,并使用 Image Lab 软件(BioRad)在 ChemiDoc MP 成像系统(BioRad, Hercules)上曝光并进行可视化。

2 结果与分析

2.1 *hupB* 敲除、空载和补救菌株的构建

利用自杀质粒 pRE112 的两步同源重组方法构建了基因突变株 $\Delta hupB$ 。如图 1A 所示,泳道

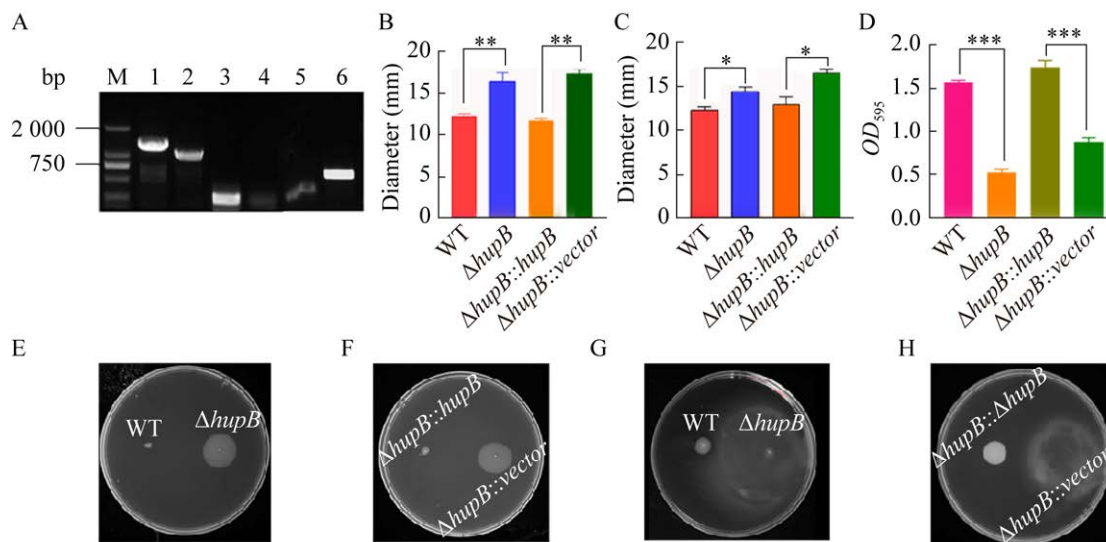


图 1 嗜水气单胞菌 *hupB* 基因敲除、空载和回复菌株的构建和常见生理表型评估

Figure 1 Construction of *hupB* gene knockout strain of *Aeromonas hydrophila* and the evaluation of its common physiological phenotypes. A: Construction of *hupB* gene knockout strain of *Aeromonas hydrophila*. M: DL 2000 marker; lane 1: WT-P7/P8 (1 486 bp); Lane 2: $\Delta hupB$ -P7/P8 (1 213 bp); Lane 3: WT-P5/P6 (273 bp); Lane 4: $\Delta hupB$ -P5/P6; Lane 5 and 6: pBBR1-MCS1 universal primers (pBBR1-MCS1-F/pBBR1-MCS1-R) were used to verify the no-load and rescue respectively. B–D: The determination of hemolytic, extracellular protease and biofilm formation activities, respectively. Data represent the mean±SEM of three independent replicates; Significant difference (*: *P*<0.05; ***: *P*<0.001). E–H: Measurement of swarming and swimming ability, respectively.

1 为 *hupB* 上下游引物 P7 和 P8 扩增片段, 与 WT 的总 DNA 相比(泳道 2), 扩增片段的长度相差约 300 bp, 泳道 4 显示 $\Delta hupB$ 中目的基因 P5/P6 的相应序列无法扩增, 测序结果表明 *hupB* 被成功敲除。泳道 5 和 6 分别显示回复和空载菌株构建成功。

2.2 $\Delta hupB$ 对嗜水气单胞菌溶血和细胞外蛋白酶(ECPase)活性的影响

嗜水气单胞菌的致病性与毒力因子密切相关, 可严重影响鱼类的健康, 而溶血活性和外毒素是嗜水气单胞菌的重要毒力因子。本研究的表型分析表明, 与野生型菌株相比, $\Delta hupB$ 菌株的溶血性(图 1B)和 ECPase 活性(图 1C)均显著升高, 而补救菌株 $\Delta hupB::hupB$ 的溶血性和 ECPase 活性均低于空载菌株 $\Delta hupB::vector$, 提示 *hupB* 可能对嗜水气单胞菌的毒力起负调控作用。

2.3 $\Delta hupB$ 对嗜水气单胞菌生物被膜形成的影响

嗜水气单胞菌是革兰氏阴性菌, 细胞膜结构比革兰氏阳性菌复杂, 其生物被膜由复杂的成分组成, 包括脂多糖、磷脂、外膜蛋白和脂蛋白, 虽然仅仅是一层薄膜, 但对细菌的生理生化起重要作用^[17]。本研究利用结晶紫染色法测定 WT 和 $\Delta hupB$ 菌株的生物被膜形成能力, 结果发现, 与对照相比, $\Delta hupB$ 的生物被膜形成能力显著降低了 12.4%, 而补救菌株 $\Delta hupB::hupB$ 生物被膜形成能力恢复(图 1D), 说明 *hupB* 基因参与调控细菌生物被膜的形成过程。

2.4 $\Delta hupB$ 对嗜水气单胞菌迁移能力的影响

细菌的爬行和游动主要由鞭毛的转动带动细菌向有利的生存环境移动, 而细菌的运动能力与嗜水气单胞菌的致病性密切相关。本研究利用

0.3%和 0.6%的半固体 LB 平板检测野生型和 *hupB* 基因缺失嗜水气单胞菌的泳动和集群运动能力。结果表明, 与 WT 相比, *hupB* 敲除后显著增强了细菌的爬动(图 1E)和游动能力(图 1F), 而补救菌株 $\Delta hupB::hupB$ 爬动和泳动能力与野生型相似, 提示 *hupB* 基因可能负调控嗜水气单胞菌的迁移能力。

2.5 利用 LC-MS/MS 比较 WT 与 $\Delta hupB$ 菌株的差异表达

为了更好地了解 *hupB* 基因对嗜水气单胞菌生物学功能的影响, 本研究提取了 WT 和 $\Delta hupB$ 突变菌株的蛋白质样品, 经过还原、烷基化处理, 酶解成多肽后, 进行定量蛋白质组学分析, 共鉴定出 2 654 个蛋白。热图(图 2A)显示, 每组样品各 3 个生物学重复之间存在较强的正相关性 ($R>0.94$), 表明本研究质谱定量分析结果稳定可靠。此外, 以 WT 为对照, 以 $P<0.05$, 差异倍数 $[\log_2(\Delta hupB/WT)]\geq 1.5$ 或 ≤ 0.667 为标准, 共筛选出 459 个差异表达蛋白, 其中上调表达 235 个, 下调表达 224 个(图 2B)。部分差异表达蛋白见表 2。

2.6 差异表达蛋白 GO 富集分析

本研究对差异表达蛋白 (differential expression proteins, DEPs) 进行进一步的 GO 富集分析, 发现差异表达的蛋白质主要集中在生物细胞过程、小分子代谢过程、有机酸代谢过程、含氧酸代谢过程等多个生物过程(BP)上, 其中主要集中于小分子、有机酸代谢过程(图 3A)。此外, 图 3B 显示差异蛋白在催化活性、杂环化合物结合、有机环化合物结合和小分子结合等分子功能(molecular function, MF)中富集, 说明 HupB 蛋白可能主要参与与催化活性相关蛋白的合成或生物学过程, 提示 HupB 蛋白涉及多个复杂生物学功能的调控。

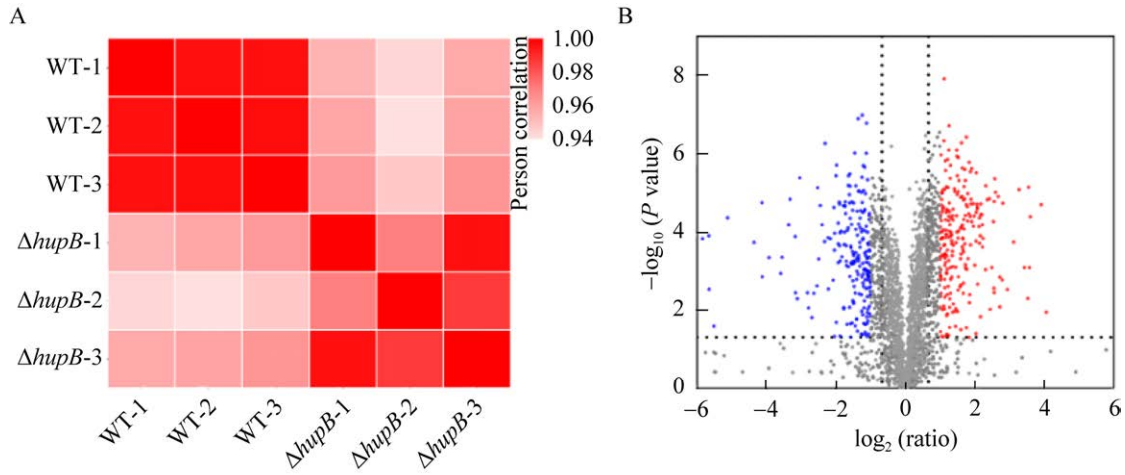


图 2 定量蛋白质组学数据分析 A: $\Delta hupB$ 与野生型嗜水气单胞菌蛋白质组学数据 3 次生物学重复相关性分析. B: 差异蛋白的火山图

Figure 2 Quantitative proteomics analysis. A: Quantitative proteomics analysis the correlations among three biological repeats between $\Delta hupB$ and wild-type *A. hydrophila*. B: Volcano plot of differential expression proteins.

表 2 本研究中定量蛋白质组学分析中部分差异蛋白列表

Table 2 Selected DEPs proteins using quantitative proteomics method in this study

Accession	Gene	Descriptions	P-value	$\log_2(\Delta hupB/WT)$
A0KJU4	<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU-beta	2.01E-17	-8.157 99
A0KLR0	<i>AHA_2703</i>	Glutamate synthase [NADPH] large chain	2.13E-13	-2.152 73
A0KJ51	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	1.04E-15	-1.780 56
A0KJK9	<i>AHA_1929</i>	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	3.16E-17	-1.564 59
A0KHC0	<i>AHA_1130</i>	Outer membrane protein	8.40E-18	-1.081 54
A0KLP2	<i>AHA_2685</i>	Outer membrane lipoprotein	3.00E-12	-1.078 58
A0KLLK9	<i>AHA_2651</i>	Inner membrane protein YoaE	1.55E-07	-1.033 92
A0KQV7	<i>AHA_4236</i>	Cytochrome c5	9.22E-14	-1.020 9
A0KQZ7	<i>yidC</i>	Membrane protein insertase YidC	1.22E-14	1.459 80
A0KP92	<i>pal</i>	Peptidoglycan-associated protein	4.80E-13	1.805 88
A0KFG8	<i>AHA_0461</i>	TonB-dependent siderophore receptor	2.42E-13	1.916 53
A0KQ97	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	6.60E-22	1.959 85
A0KF44	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	5.52E-20	1.965 40
A0KF34	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	3.99E-17	2.043 14
A0KF46	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	2.30E-16	2.045 46
A0KF28	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	2.43E-19	2.176 39
A0KF27	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	5.93E-18	2.360 40
A0KN14	<i>nifJ-2</i>	Flavodoxin oxidoreductase	0.000425	2.445 85
A0KF42	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	2.69E-21	2.561 21
A0KQ98	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	6.17E-15	3.125 98
A0KKP6	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	1.31E-16	3.277 27
A0KF24	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	1.39E-23	3.557 85

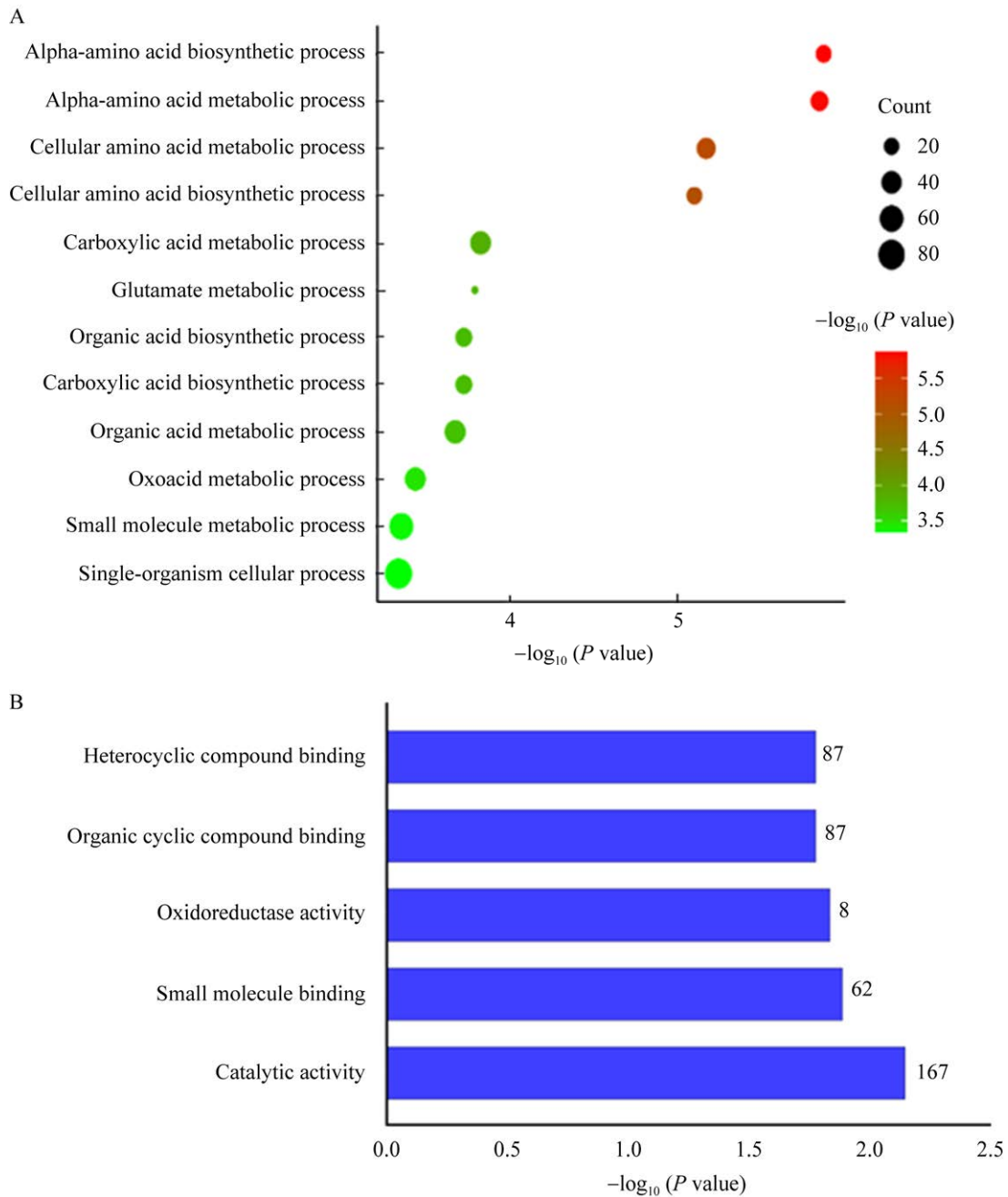


图 3 GO 生物信息学分析

Figure 3 GO based bioinformatics analysis of differential expression proteins between $\Delta hupB$ and WT. A: Clustering enrichment of biological processes. B: Clustering enrichment of molecular function.

2.7 差异蛋白质相互作用网络预测

为了更好地了解 DEPs 的蛋白质-蛋白质互作网络, 利用 Cytoscape 软件并结合 STRING 与 MCODE 插件, 进一步预测 DEPs 的蛋白质-蛋白

质相互作用(protein-protein interaction prediction, PPI)网络。图 4 显示具有代表性的 5 个 PPI 网络聚类, 包括核糖体亚基相关蛋白(38 个蛋白)、调控生物被膜形成蛋白(10 个)、信号传导蛋白

(8 个)、肽转运蛋白(7 个)与氧化磷酸化蛋白(6 个)。其中核糖体亚基相关蛋白大部分(定量蛋白质组学分析共鉴定到核糖体亚基相关蛋白 55 个, 其中 38 个表达上调, 17 个无明显差异)在 $\Delta hupB$ 中表达上升, 调控生物被膜形成蛋白、信号传导蛋白、肽转运蛋白和氧化磷酸化蛋白(除 AHA_2859 外)则在 $\Delta hupB$ 中表达下调。以上研究表明, *hupB* 的缺失可以引起涉及细菌蛋白质翻译、生物被膜生成等多个重要生物学功能蛋白的变化, 提示 HupB 对嗜水气单胞菌的生理功能具有重要的调控作用。

2.8 蛋白质组学数据验证

为了验证定量蛋白质组学数据的可靠性, 本研究使用了具有代表性的 6 种差异表达蛋白(A0KQV7、A0KJK9、A0KP92、A0KF42、A0KQZ7 和 A0KFG8)的特异性抗体进行蛋白免疫印迹验证。结果表明, 与对照菌株相比, *hupB* 突变株中 A0KQV7 和 A0KJK9 蛋白表达下调, 而 A0KP92、A0KF42、A0KQZ7 和 A0KFG8 均上调, 这与本研究的定量蛋白质组学结果基本一致(图 5), 这也证实质谱数据具有良好的可靠性。Western blotting 中的 6 种蛋白功能如表 2 所示。

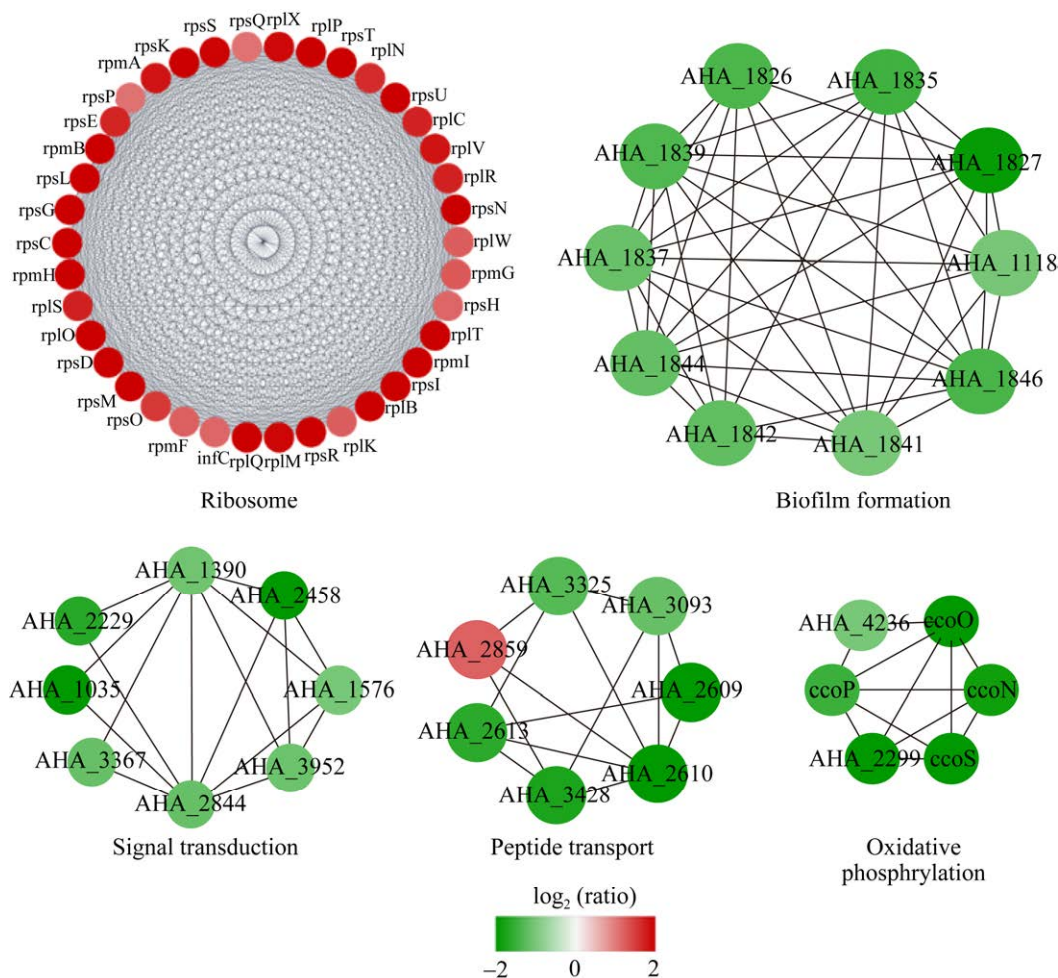


图 4 具有代表性的差异蛋白质相互作用预测网络

Figure 4 Selected protein-protein interaction prediction (PPI) networks of DEPs in this study. Different colors represent different protein abundance ratios (\log_2).

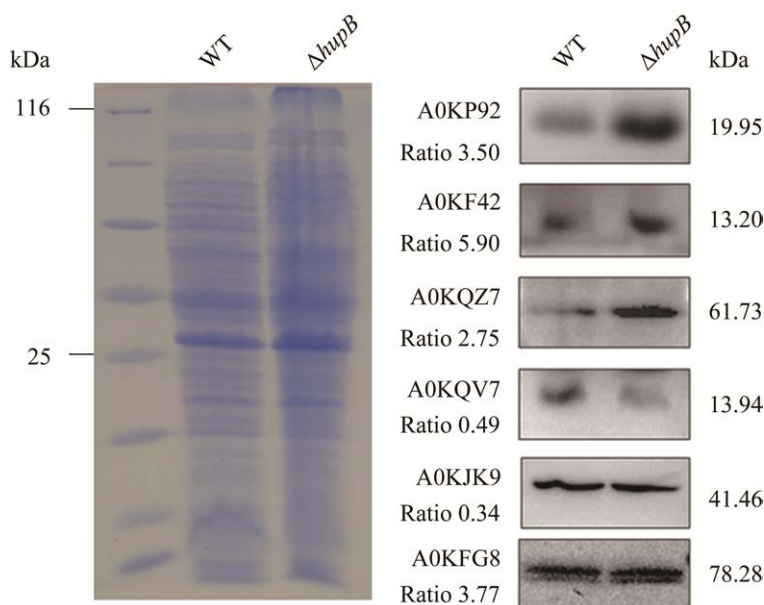


图5 蛋白质印迹验证蛋白质组学数据

Figure 5 The validation of proteomics analysis results by using Western blotting. The corresponding sample was stained with Coomassie brilliant blue as the control on the left, the Western blotting results are on the right. The ratios in the figure indicate the ratio in proteomics data.

3 讨论

嗜水气单胞菌 HupB 氨基酸序列与大肠杆菌 HU- β 亚基蛋白同源性较高, 同属于 DNABII 家族, 被称为核仁相关蛋白(NAPs)。Sharadamma 等^[18]的研究发现, 结核杆菌的 *hupB* 不仅可以保护 DNA 免受 Dnase I 和羟自由基的裂解, 而且当 *hupB* 基因缺失时, 其不能在巨噬细胞中存活^[7], 说明 HupB 基因可以显著影响细菌的生存能力。另有文献报道当土拉热弗朗西斯菌中 *hupB* 基因缺失时, 该菌在鼠体内和体外的毒力显著减弱, 提示 HupB 还可以调控细菌的毒力^[19]。为研究 *hupB* 基因的生物学功能, 本研究以嗜水气单胞菌为研究对象, 成功敲除了 *hupB* 基因并对其常见表型进行测定。通过比较野生型和 $\Delta hupB$ 的溶血性和 ECPase 活性, 发现该基因缺失导致细菌溶血圈和水解圈显著增大, 补救菌株的溶血性和 ECPase 活性与野生型基本一致, 提示 *hupB*

编码蛋白可能负调控细菌的溶血性外毒素和胞外蛋白酶的分泌, 与嗜水气单胞菌的毒性相关。进一步对差异蛋白的 GO 分析比较发现, *hupB* 编码的蛋白质与杂化化合物、有机环化合物、小分子化合物的结合以及多个代谢途径有关。

表型测定结果还表明, *hupB* 缺失突变菌株显著降低生物被膜的形成水平, 并且补救后生物被膜形成能力恢复。Conforte 等^[4]对柑橘黄单胞菌的生物被膜结构组织进行激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)扫描发现, $\Delta hupB$ 突变菌株附着到非生物表面的能力较野生型减少约 60%, 且与典型成熟生物被膜不同的是突变菌株只能观察到生长于物体表面上的单层细胞; 又有研究报道 HupB 在柑橘溃疡病菌生物被膜形成中发挥重要作用^[4], 这与本研究的观察结果一致。此外, 本研究中的蛋白质组学分析还发现嗜水气单胞菌 $\Delta hupB$ 突变株与野生型之间的 DEPs 中有 10 个生物被膜形成

相关蛋白表达下调,提示 HupB 蛋白可能通过正调控这些蛋白的表达,在嗜水气单胞菌的生物被膜形成过程中发挥作用。

4 结论

综上所述,本文构建了嗜水气单胞菌 *hupB* 的缺失菌株,通过比较发现缺失株与野生株之间的胞外蛋白酶活性、溶血活性、运动能力和生物被膜形成能力存在显著性的差异,并且比较发现补救菌株的生物被膜形成能力恢复,表明该基因的缺失可能影响嗜水气单胞菌的多个生理功能。进一步通过定量蛋白组学技术,研究 *hupB* 缺失后对细菌生物学功能的影响,并试图解释其影响生物被膜生成的分子机制。以上研究将有助于加深对嗜水气单胞菌 HupB 生物学功能及其分子调节机制的了解,并为预防与控制该病原菌提供理论基础。

参考文献

- [1] GUPTA M, SAJID A, SHARMA K, GHOSH S, ARORA G, SINGH R, NAGARAJA V, TANDON V, SINGH Y. HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases *in vivo*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(14): 2646-2657.
- [2] OLIVEIRA PAIVA AM, FRIGGEN AH, QIN L, DOUWES R, DAME RT, SMITS WK. The bacterial chromatin protein HupA can remodel DNA and associates with the nucleoid in *Clostridium difficile*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(4): 653-672.
- [3] HOŁÓWKA J, TROJANOWSKI D, GINDA K, WOJTAŚ B, GIELNIEWSKI B, JAKIMOWICZ D, ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J. HupB is a bacterial nucleoid-associated protein with an indispensable eukaryotic-like tail[J]. *mBio*, 2017, 8(6): e01272-e01217.
- [4] CONFORTE VP, MALAMUD F, YARYURA PM, TOUM TERRONES L, TORRES PS, de PINO V, CHAZARRETA CN, GODESBLAT GE, CASTAGNARO AP, R MARANO M, VOJNOV AA. The histone-like protein HupB influences biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* ssp. *citri* through the regulation of flagellar biosynthesis[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(4): 589-598.
- [5] SINGH N, SHARMA N, SINGH P, PANDEY M, ILYAS M, SISODIYA L, CHOUDHURY T, GOSAIN TP, SINGH R, ATMAKURI K. HupB, a nucleoid-associated protein, is critical for survival of *Mycobacterium tuberculosis* under host-mediated stresses and for enhanced tolerance to key first-line antibiotics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 937970.
- [6] BARTELS F, FERNÁNDEZ S, HOLTEL A, TIMMIS KN, de LORENZO V. The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(20): 16641-16648.
- [7] PANDEY SD, CHOUDHURY M, YOUSUF S, WHEELER PR, GORDON SV, RANJAN A, SRITHARAN M. Iron-regulated protein HupB of *Mycobacterium tuberculosis* positively regulates siderophore biosynthesis and is essential for growth in macrophages[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(10): 1853-1865.
- [8] QIN YX, LIN GF, CHEN WB, XU XJ, YAN QP. Flagellar motility is necessary for *Aeromonas hydrophila* adhesion[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 98: 160-166.
- [9] 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[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 759-765.
REN YL, LI Y, HAN G, ZHU F, LIU C, SONG JL. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(5): 759-765 (in Chinese).
- [10] DONG J, ZHANG LS, LIU YT, XU N, ZHOU S, YANG YB, YANG QH, AI XH. Luteolin decreases the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* via inhibiting the activity of aerolysin[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 165-176.
- [11] LI Z, ZHANG L, SUN L, WANG Y, CHEN J, TANG H, LIN L, LIN X. Proteomics analysis reveals the importance of transcriptional regulator slyA in regulation of several physiological functions in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 244: 104275.
- [12] PENG B, SU YB, LI H, HAN Y, GUO C, TIAN YM, PENG XX. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 21(2): 249-262.

- [13] WIŚNIEWSKI JR. Filter aided sample preparation-a tutorial[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1090: 23-30.
- [14] LIN XM, LIN L, YAO ZJ, LI WX, SUN LN, ZHANG DF, LUO J, LIN WX. An integrated quantitative and targeted proteomics reveals fitness mechanisms of *Aeromonas hydrophila* under oxytetracycline stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(3): 1515-1525.
- [15] SZKLARCZYK D, GABLE AL, LYON D, JUNGE A, WYDER S, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, DONCHEVA NT, MORRIS JH, BORK P, JENSEN LJ, von MERING C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [16] ZHANG LS, LI W, SUN L, WANG Y, LIN Y, LIN X. Quantitative proteomics reveals the molecular mechanism of *Aeromonas hydrophila* in enoxacin stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2020, 211: 103561.
- [17] 童金蓉, 张昭寰, 黄振华, 张旭, 史俊, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇. 革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运机制研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(6): 510-522.
- TONG JR, ZHANG ZH, HUANG ZH, ZHANG X, SHI J, LIU HQ, PAN YJ, ZHAO Y. Research progress on transmembrane transport mechanisms for the main components of the outer membrane in Gram-negative bacteria[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2020, 47(6): 510-522 (in Chinese).
- [18] SHARADAMMA N, KHAN K, KUMAR S, PATIL KN, HASNAIN SE, MUNIYAPPA K. Synergy between the N-terminal and C-terminal domains of *Mycobacterium tuberculosis* HupB is essential for high-affinity binding, DNA supercoiling and inhibition of RecA-promoted strand exchange[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(18): 3447-3462.
- [19] SPIDLOVA P, STOJKOVA P, SJÖSTEDT A, STULIK J. Control of *Francisella tularensis* virulence at gene level: network of transcription factors[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(10): 1622.