



## 嗜水气单胞菌 *zntR* 调控的生理功能及其机制研究

林月绪<sup>1,2#</sup>, 张丽珊<sup>1,2#</sup>, 陈加臻<sup>1,2</sup>, 农添植<sup>1,2</sup>, 邢方婷<sup>1,2</sup>, 林向民<sup>1,2</sup>, 谢小芳<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

<sup>2</sup> 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

**摘要:** 【目的】ZntR是一种金属调控蛋白,可催化锌外排基因的转录激活,防止细胞内二价Zn离子过量,但其对细菌生理功能的影响目前尚不清楚。【方法】本研究构建了嗜水气单胞菌ATCC7966 (*Aeromonas hydrophila*, *A.h*)的*zntR*缺失株及补救株,对菌株的生物被膜形成能力、溶血活性、运动能力和响应金属离子胁迫等生理表型进行评估。【结果】敲除*zntR*基因的菌株对锌和铬离子胁迫敏感、对钴离子胁迫耐受,并且生物被膜形成能力下降、运动能力增强,这些表型在其补救菌株中均能得到恢复。进一步利用DIA定量蛋白质组学技术比较野生株和*zntR*缺失株的蛋白表达差异,发现ZntR还可能参与双组分系统、细菌的趋化性等代谢通路的调控。【结论】该研究结果可为今后深入探讨*zntR*转录因子参与细菌生理功能的调控机制提供理论依据。

**关键词:** 嗜水气单胞菌, 转录调控因子, 同源重组

锌是大部分细菌所必需的微量元素,具有催化、氧化还原和调节等作用<sup>[1]</sup>。它的高结合亲和力可导致竞争性金属错配,过量时会使细胞中毒,因此胞内锌离子浓度的动态平衡对细菌的正常生长至关重要<sup>[2-4]</sup>。细菌中ZntR蛋白[Zn(II)-responsive transcriptional regulator]属于MerR家族,是7个主要金属响应蛋白家族-锌响应转录调节因子之一<sup>[5]</sup>。ZntR表达的蛋白能以类

似MerR蛋白的方式促进RNA聚合酶结合*znt*(zinc resistance operon *znt*)的启动子<sup>[6]</sup>。同时,ZntR蛋白还可以感应胞内锌离子浓度与ZntR蛋白结合,激活锌离子外排基因*zntA*将多余的锌泵出,从而维持胞内锌稳态<sup>[7-8]</sup>。研究发现,金属诱导的*zntA*的表达受*zntR*调节,并且*zntA*和*zntR*突变体对镉离子高度敏感,对钴离子的敏感性相对较小。*zntA*的失活会增加细胞内镉和钴的积累,

基金项目: 国家自然科学基金(31670129)

#并列第一作者。

\*通信作者。E-mail: 710579191@qq.com

收稿日期: 2020-11-05; 修回日期: 2020-12-10; 网络出版日期: 2021-02-07

导致细胞中毒甚至死亡<sup>[9-10]</sup>。但是由于细菌的种类不同, *zntR* 的作用可能也不尽相同甚至相反, 而目前对 *zntR* 操纵子对细菌生理功能影响的研究还鲜有报道。

嗜水气单胞菌是一种人-畜-鱼共患的重要病原菌, 其生存范围广, 可适应如淡水、土壤或者重金属污染等多种复杂环境。该菌可导致人体、水生和陆生动物感染并发生出血性疾病, 在温暖的淡水养殖鱼类中引起运动性气单胞菌败血症, 影响淡水养殖生产<sup>[11]</sup>。本研究利用同源重组的方法构建 *zntR* 敲除菌株及补救株  $\Delta zntR::zntR$ , 以野生型 *A.h* 和空载  $\Delta zntR::vector$  为对照, 对其生理功能进行测定, 并结合定量蛋白质组学技术比较野生株和 *zntR* 缺失株的蛋白表达差异, 最后结合生物信息学和生理表型分析 *zntR* 基因在细菌的生命活动中可能参与的调控机制, 为进一步探究嗜水气单胞菌的防治提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验使用的嗜水气单胞菌 ATCC7966 (*Aeromonas hydrophila*, *A.h*)、大肠杆菌及质粒均保存在本实验室。LB 培养基: 蛋白胨、胰酵母粉(购于北京拜尔迪生物技术有限公司)、氯化钠(购于国药集团化学试剂有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA marker (DL2000 和 DL5000)、*Sac* I 和 *Xba* I 限制性内切酶均购于宝生物工程(大连 TaKaRa)有限公司; DNA 聚合酶、氯霉素(chloramphenicol, Cm)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(上海)股份有限公司。

### 1.2 构建缺失菌株及回补株

对嗜水气单胞菌基因组中 *zntR* 基因上下游各 500 bp 序列设计 2 对引物, 分别为 P1P2、P3P4。将这 2 个上下游片段分别扩增出来, 并用无缝连接酶将酶切后的质粒与上下游片段连接起来, 再转入大肠杆菌 MC1061 感受态细胞中, 而后提取质粒再转入大肠杆菌 S17 感受态细胞中。将转化质粒成功的大肠杆菌 S17 与野生株(*A.h*)进行同源重组。再利用含有 20% 蔗糖的 LB 培养基进行筛选, 用引物 P5P6、P7P8 (目的基因两端设计引物分别为 P5、P6; P1 上游 100 bp、P4 下游 100 bp 设计引物分别为 P7、P8)进行 PCR 验证, 并以总 DNA 为阴性对照。经测序比对正确后获得敲除菌  $\Delta zntR$ 。

设计嗜水气单胞菌中 *zntR* 基因的克隆引物(命名为 *zntR*-F 和 *zntR*-R)进行扩增。以 pBBR1-MCS1 质粒为载体, 将目的片段与酶切回收后的质粒进行连接, 再将连接产物转化到感受态细胞 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。第 2 天从转化成功后的平板中挑取单克隆进行菌液 PCR 验证, 后提取质粒并测序比对。测序结果完全正确的质粒利用电转化法转化到  $\Delta zntR$  感受态细胞中, 挑取单克隆进行菌液 PCR 验证并测序比对。质粒成功转入  $\Delta zntR$  缺失菌株中(pBBR1-MCS1 通用引物: F 和 R), 获得回复和空载菌株。

### 1.3 泳动(Swimming)和群集运动(Swarming)能力检测

分别配制含 0.3% 琼脂粉和 0.6% 琼脂粉的 LB 培养基(分别为泳动培养基和群集运动培养基), 121 °C 灭菌 20 min 冷却至室温后分别倒入平板

中。将培养好的划在 LB 平板中的单克隆点在倒好的平板中, 做好标记, 正放平板置于 30 °C 培养箱中培养。泳动培养 4 h, 群集运动培养 12 h, 后取出拍照并记录实验结果。

**1.3.1 生物被膜生成的测定:** 将  $OD_{600}=1.0$  的菌株按 5% 转接至 96 孔微量板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 每个菌株做 4 个重复孔, 置于 30 °C 培养箱中培养 24 h, 后去除培养液, 用双蒸水洗涤 3 次, 每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  的 0.1% ( $W/V$ ) 结晶紫溶液, 染色 20 min 后, 去除染色液, 再用双蒸水洗涤 3 次后吹干, 每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  的 95% 乙醇溶液, 室温孵育 10 min 后用 SpectraMax<sup>®</sup> i3 多功能酶标仪 (molecular devices) 检测在  $OD_{595}$  波长下的吸光值, 并做 3 次生物学重复。

**1.3.2 溶血性检测:** 配制含有 0.8% 琼脂粉的 LB 培养基, 121 °C 灭菌 20 min 后冷却至室温, 加入 7 mL 绵羊血混匀后再倒入平板中。凝固后用 10  $\mu\text{L}$  枪头分别在每个平板中打 3 个小孔, 将  $OD_{600}=1.0$  的菌株各取 3 个 10  $\mu\text{L}$  菌液分别加入平板中的 3 个小孔中。倒置平板后置于 30 °C 培养箱中培养 16 h 后, 测量溶血圈直径大小。

**1.3.3 金属离子胁迫检测:** 配制含有 1.5% 琼脂粉的 M9 培养基 (0.5 g 的 NaCl, 1.0 g 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3.0 g 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17.1 g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4.0 g 的葡萄糖溶于 1 L 的双蒸水中) 灭菌 15 min 后冷却至室温, 分别加入不同浓度的金属离子: 氯化钴 ( $\text{CoCl}_2$ )、重铬酸钾 ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )、硫酸锌 ( $\text{ZnSO}_4$ ), 制备成含不同浓度的固体平板。将  $OD_{600}=1.0$  的菌株稀释 100 倍后, 各取 2  $\mu\text{L}$  分别点在不同浓度不同金属离子的平板中, 置 30 °C 的培养箱中培养 16 h 后取出记录其生长情况。

**1.3.4 蛋白样品制备:** 挑取 *A.h* 和  $\Delta zntR$  单克隆

至 5 mL LB 培养基中, 30 °C 摇床中过夜培养 16 h 至稳定状态后, 第 2 天按 1% 转接至 30 mL LB 培养基中, 30 °C 摇床中培养至  $OD_{600}=1.0$  时取出, 4 °C、8000 r/min 离心 10 min 收集菌体并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。后加入 1 mL 的 lysis buffer (6 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲溶解于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.6) 溶液, 并加入蛋白酶抑制剂) 混匀, 置于冰上并在超声波破碎仪中超声破碎 15 min 至呈现透明液体。最后  $10000 \times g$ 、4 °C 离心 20 min 取上清, 并取 5  $\mu\text{L}$  用于 Bradford 法进行蛋白浓度的测定, 剩余样品用于质谱鉴定。

**1.3.5 胰蛋白酶消化和 LC-MS/MS 鉴定:** 取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品至超滤管中, 用 50 mmol/L 二硫苏糖醇 DTT、56 °C 进行还原 40 min, 再用 25 mmol/L 碘乙酰胺 IAA、避光静置进行烷基化 30 min, 离心弃滤液按 1:20 加入胰蛋白酶, 37 °C 孵育过夜降解成多肽。将处理好的多肽样品用  $\text{C}_{18}$  柱 (Waters, Inc., Milford, MA) 除盐, 并使用 CentriVap Concentrator (Labconco, Inc., Kansas City, MO) 干燥。

酶解完的肽段用液相色谱流动相 A 相 (含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液) 溶解后使用 LC-20AB HPLC Pump system (Shimadzu, Kyoto, Japan) 色谱仪进行分离。分离液相梯度设置: 0–0.1 min, 流动相 B 液 (含 0.1% 甲酸和 80% 乙腈的水溶液) 从 2% 上升至 5%; 0.1–20.0 min, B 液从 5% 上升至 30%; 20–22 min, B 液从 30% 上升至 80%; 22–24 min, B 液维持在 80%; 24.0–24.1 min, B 液从 80% 到 5% 线性降低; 直到 30 min 后结束。其次, 反相液质联用 (RPLC-MS) 进行样品分析。利用 Eksigent nano LC425 (SCIEX, USA) 色谱系统串联 Thermo Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质

谱仪进行蛋白定量。离子源电压设置为 2.0 kV；离子源温度为 150 °C；循环时间设置为 3 s；GSI 设置为 4 以及帘气为 30 psi。一级质谱扫描范围设置为 350–1400  $m/z$ ，扫描分辨率设置为 60000；Orbitrap 扫描分辨率设置为 15000。数据采集模式使用数据依赖型扫描(DDA)程序，即在一级扫描后选择信号强度最高的前 20 肽段母离子依次进入 HCD 碰撞池使用 30%的碎裂能量进行碎裂，同样依次进行二级质谱分析。质谱采集到的 DDA 原始数据导入到 Spectronaut 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 Spectronaut Pulsar X 进行蛋白质定性定量分析。

**1.3.6 生物信息学分析：**以野生型为对照，筛选肽段数目大于 1， $P < 0.05$ ，且将蛋白比值大于 1.5 倍或小于 0.667 倍的蛋白作为差异表达蛋白进行生物信息学分析。首先通过 David (<https://david.ncifcrf.gov/>)在线软件对差异表达蛋白进行 KEGG 富集分析，并结合病原菌毒力因子数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>, VFDB)进行毒力基因筛选，再利用 Rstudio 软件进行可视化分析。

**1.3.7 Western blotting：**根据数据分析结果以及实验室现有抗体筛选差异蛋白，进行 Western blotting 验证。将相应蛋白样品跑 SDS-PAGE，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；转膜结束后利用 PBST 洗膜 5 min 后，加入封闭液室温孵育 1 h；封闭结束后，加入一抗，4 °C 孵育过夜，或者室温孵育 1 h；然后用 PBST 缓冲液洗 5 次，每次 5 min；加入二抗，室温孵育 1 h 后用 PBST 缓冲液洗 5 次，每次 5 min；ECL 显色。

## 2 结果和分析

### 2.1 基因缺失突变菌株的筛选和鉴定

以野生型嗜水气单胞菌为阳性对照，根据表 1 所示进行引物设计。实验结果如图 1-A 所示，泳道 3 和 4 是用 P5P6 引物分别以野生株和敲除株全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的产物，从图中可以看出泳道 3 在 250–500 bp 有目的条带，而泳道 4 则没有，说明敲除株的基因组中不含有目的基因。为了进一步验证同源重组成功，在嗜水气单胞菌基因组上邻近上下游同源臂的地方截取一对新的引物 P7P8，以野生菌和敲除菌的全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，分别如图 1-A 的泳道 1 和 2 所示，泳道 1 和 2 PCR 产物大小的差值约为 1200 bp，与预计值相符，进一步测序比对验证可靠性，从而获得敲除株  $\Delta zntR$ 。

以野生株全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增回复片段，利用电转化法，把构建好的质粒及 pBBR1-MCS1 质粒分别转化到  $\Delta zntR$  感受态细胞中，挑取单克隆进行菌液 PCR 验证，分别如图 1-B 的泳道 1 和 2 所示，泳道 1 和 2 PCR 产物大小的差值约为 438 bp，表明质粒成功转入  $\Delta zntR$  缺失菌株中，获得回复和空载菌株。

### 2.2 $\Delta zntR$ 对嗜水气单胞菌运动性的影响

细菌泳动和集群运动是细菌在液体环境和半固体环境中运动能力的指示，它们都是以鞭毛为导向的运动行为，而细菌的运动能力也与病原菌的致病性密切相关。本研究以野生株 *A.h* 为对照，使用 0.3%和 0.6%半固体 LB 平板分别检测 *zntR* 基因缺失后和补救后细菌的泳动和集群运动能力。结果发现，*zntR* 缺失后，在 0.3%和 0.6%半

表 1. *zntR* 基因敲除回复所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primer sequences (5'→3')	Purposes
P1: CGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGGCTGGCGGGATCCTCAG	Gene deletion
P2: TTCAACGGGAGAAAAGGCCTCCCTCGACGGCTTCATTG	Gene deletion
P3: AGGCCTTTTCTCCCGTTGAATTT	Gene deletion
P4: CATGAATCCCGGGAGAGCTCCGTTTCGTTGAGTGCCTTGGC	Gene deletion
P5: GCCATGGCTGATATCGGATCCTCAGTGCTCATGGTCGTGGTG	Gene deletion
P6: CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTATGTATCGGATCGGGGAGCT	Gene deletion
P7: GGATCTTCCAGAGATTCCTTGATGCGGTTGTGTGTT	Gene deletion
P8: CTGCCGTTTCGACGATGAGAATGCCGCCGTGGAC	Gene deletion
<i>zntR</i> -F: GTCGACGGTATCGATAAGCTTGTAGTGGTTTTTGTGAAACGTTTGTCTT	Complementary
<i>zntR</i> -R: CGCTCTAGAACTAGTGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGCTCATGGTCGTGGTGCT	Complementary
F: GCGCGCAATTAACCTCACT	Complementary
R: GGCGGCCGCTCTAGAACTAG	Complementary

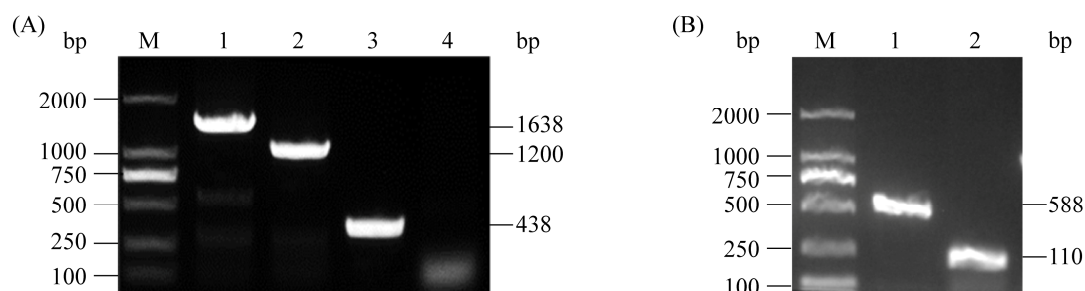
图 1. *zntR* 敲除菌株的构建

Figure 1. Construction of gene knockout. A: gene knockout verification. M: 2000 bp DNA marker; lane 1: *A.h* control; lane 2: *zntR*-p7p8 (1638 bp); lane 3: *A.h* control; lane 4: *zntR*-p5p6 (438 bp). B: PCR verification of the bacterial solution of the revertant strain. M: 2000 bp DNA marker; lane 1: reverting strain (588 bp); lane 2: empty carrier (110 bp).

固体 LB 平板上均形成明显的泳动圈，而在其补救菌株中泳动圈层又得到回复(图 2-A, B)，表明 *zntR* 基因的缺失增强嗜水气单胞菌的泳动能力和群集运动能力。

### 2.3 $\Delta zntR$ 对嗜水气单胞菌生物被膜生成的影响

生物被膜是由细菌及其分泌的胞外基质组成，生物被膜的形成可以保护细菌免受物理、化学或机体免疫反应的攻击。本研究以 *A.h* 野生株为对照组，利用 0.1%结晶紫染色方法对  $\Delta zntR$  敲

除株的生物被膜形成能力进行检测。结果发现，*zntR* 的缺失使嗜水气单胞菌生物被膜形成能力显著下降(图 2-C)。

### 2.4 $\Delta zntR$ 对嗜水气单胞菌溶血活性的影响

细菌的溶血活性与其致病性密切相关，为研究 *zntR* 基因是否会对致病菌嗜水气单胞菌的溶血活性产生影响，本研究以 *A.h* 野生株为对照组，利用含 5%绵羊血平板对  $\Delta zntR$  敲除株的溶血活性进行测定。发现  $\Delta zntR$  敲除株的溶血圈显著大

于野生株(图 2-D), 表明 *zntR* 的缺失可能对细菌的致病性具有一定的负调控作用。

## 2.5 $\Delta zntR$ 响应金属离子胁迫的影响

虽然金属离子在所有生物有机体中都发挥着重要作用, 但是高浓度的金属离子会对细胞产生很强的毒性。因此, 本研究检测嗜水气单胞菌野生型、*zntR* 缺失菌株、补救株和空载菌株在金

属离子胁迫下的生长情况, 进而探讨这些转录调控因子是否参与金属离子运输的调控。结果显示, 与野生型相比, *zntR* 对 1 mmol/L 的  $Zn_2SO_4$  和 50  $\mu mol/L$  的  $K_2Cr_2O_7$  表现出较强的耐受性, 对 300  $\mu mol/L$  的  $CoCl_2$  表现更为敏感, 其补救菌株则能恢复其表型(图 2-E), 表明转录调控因子 *zntR* 参与细菌应对金属离子胁迫的调控过程。

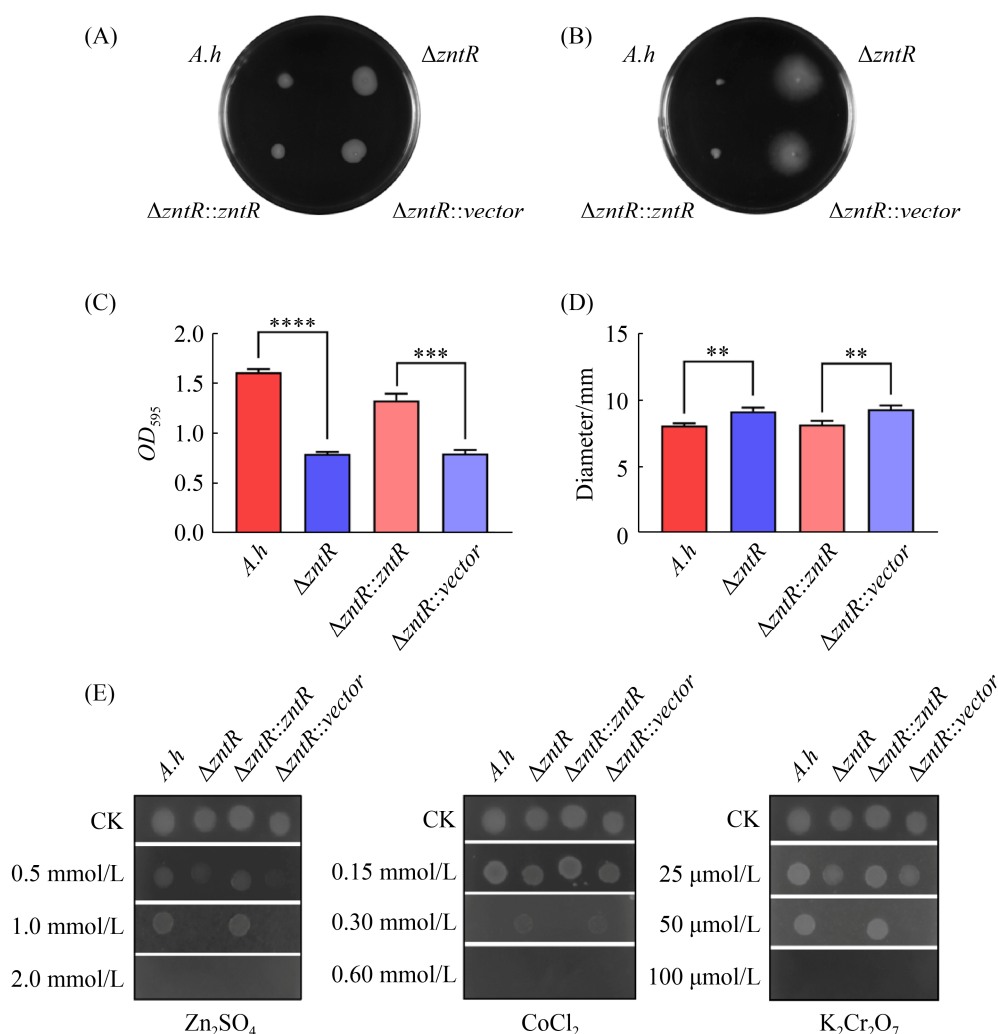


图 2. 野生菌 *A.h* 与  $\Delta zntR$  敲除菌及  $\Delta zntR::zntR$  补救株与  $\Delta zntR::vector$  的生理表型

Figure 2. Physiological phenotypes of wild-type bacteria *A.h* and  $\Delta zntR$  knockout strains, and  $\Delta zntR::zntR$  rescue strains and  $\Delta zntR::vector$ . A: the measurement of swimming ability; B: the measurement of cluster sports ability; C: the comparison of biofilm formation ability (\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*:  $P < 0.1$ ); D: in comparison of hemolysis *in vitro* (\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*:  $P < 0.1$ ); E: the result of heavy metal stress tolerance.

## 2.6 $\Delta zntR$ 对嗜水气单胞菌蛋白表达的影响

本研究利用 DIA 定量蛋白质组学技术, 研究嗜水气单胞菌 *zntR* 的缺失对嗜水气单胞菌蛋白表达丰度的影响。通过收集 *A.h* 野生株和  $\Delta zntR$  敲除株的全蛋白, 使用胰蛋白酶消化成多肽后再进行质谱鉴定。根据肽段匹配数  $\geq 2$  和错误发生率(FDR)  $< 1\%$  双标进行筛选, 共鉴定到 2655 个蛋白(表 2)。相关性分析发现各个样本的相关系数  $R$  均大于 0.98 (图 3-A), 表明此次蛋白组学数据稳定、可靠,  $\Delta zntR$  与 *A.h* 在生物学之间存在极相关。同时通过以野生菌 *A.h* 为对照且以  $P < 0.05$ 、差异倍数  $\geq 1.5$  或  $\leq 0.667$  标准筛选差异蛋白, 共鉴定到了 83 个差异蛋白, 其中 56 个蛋白上调表达, 27 个蛋白下调表达(图 3-B)。

## 2.7 $\Delta zntR$ 中差异蛋白生物信息学分析

为了更好地了解  $\Delta zntR$  对嗜水气单胞菌生理生化过程的调控作用。本研究利用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 在线网站对差异表达蛋白的 KEGG 代谢通路进行富集分析, 并结合 R 语言软件进行可视化分析。发现敲除 *zntR* 基因后共富集到 6 个代谢通路, 其中核糖体、双组分系统、细菌的趋化性、苯乙烯降解和  $\beta$ -内酰胺耐药代谢通路占主导位置, 且代谢通路相关蛋白大部分都是上调表达(图 4-A)。

通过病原菌毒力因子数据库对差异蛋白进行毒力基因的筛选, 结果共匹配到 15 个毒力因子, 其中 *AHA\_0388*、*AHA\_2809*、*pilF*、*AHA\_0389* 在敲除 *zntR* 基因后表达下调, 其余均表达上调(图 4-B)。

表 2. 定量蛋白质组学技术分析在  $\Delta zntR$  和 *A.h* 之间的部分差异表达蛋白

Table 2. Selected differential expression proteins between  $\Delta zntR$  and *A.h* using DIA-LC-MS/MS

Accessions	Genes	Descriptions	Matched peptides	P-value	$\log_2(\Delta zntR/A.h)$
A0KJ69	<i>AHA_1784</i>	Chemotaxis MotA protein	2	5.26E-03	2.47
A0KPA0	<i>cydB-2</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	2	4.31E-03	2.00
A0KIA7	<i>AHA_1470</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	5	5.08E-05	1.46
A0KQC2	<i>AHA_4048</i>	Cytochrome c-type protein	3	2.84E-03	1.29
A0KPA1	<i>cydA</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I	3	2.78E-05	1.22
A0KHD6	<i>AHA_1146</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	3	1.49E-02	1.12
A0KKF2	<i>AHA_2229</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	2	1.26E-02	1.06
A0KQF7	<i>AHA_4083</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	5	1.41E-02	1.02
A0KMV0	<i>AHA_3101</i>	Aerotaxis receptor Aer	4	7.36E-04	0.95
A0KL21	<i>AHA_2458</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	2	3.60E-02	0.92
A0KMN2	<i>AHA_3031</i>	Exopolysaccharide synthesis regulator RcsF	2	1.08E-03	0.88
A0KIN7	<i>AHA_1602</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	3	2.18E-05	0.80
A0KN47	<i>AHA_3207</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	3	5.56E-06	0.77
A0KGQ2	<i>AHA_0905</i>	Aerobic respiration control sensor protein	3	1.19E-02	0.76
A0KIZ4	<i>AHA_1709</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	6	1.54E-03	0.75
A0KNK5	<i>AHA_3367</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	4	6.76E-03	0.72
A0KKL7	<i>ccoN</i>	Cytochrome c oxidase, Cbb3-type, subunit I	2	9.95E-04	0.72
A0KKM0	<i>ccoP</i>	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	4	1.01E-02	0.71
A0KPY9	<i>AHA_3901</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	3	4.21E-03	0.66
A0KNT1	<i>AHA_3448</i>	Methyl-accepting chemotaxis transducer	3	3.54E-02	0.64
A0KHN3	<i>AHA_1243</i>	NAD-dependent malic enzyme	5	1.10E-02	0.60
A0KQX2	<i>AHA_4256</i>	Transcriptional regulatory protein CreB	5	4.13E-02	-0.69
A0KQR4	<i>AHA_4192</i>	Transcriptional regulatory protein RstA	2	1.11E-02	-1.03



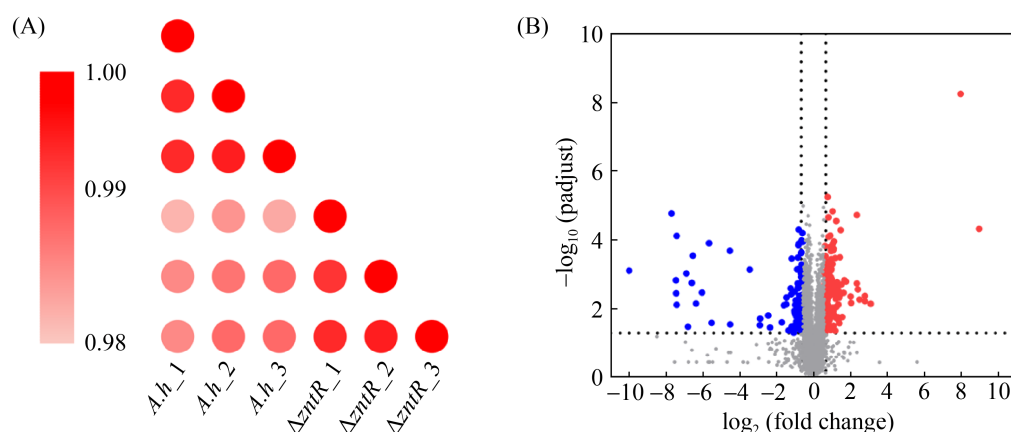


图 3. 定量蛋白质组学数据分析

Figure 3. Quantitative proteomics data analysis. A: analyze the correlation of protein intensities in three biological replicates through correlation coefficients; B: compare the abundance ratios of significantly differentially expressed proteins. Each point in the volcano map represents a protein, and the abscissa represents the logarithm of the difference between the expression levels of a certain protein in the two samples; the ordinate represents the  $t$ -test  $P$  value. The blue dots in the figure represent differentially expressed down-regulated proteins, the red dots represent differentially expressed up-regulated proteins, and the gray color represents non-differentially expressed proteins.

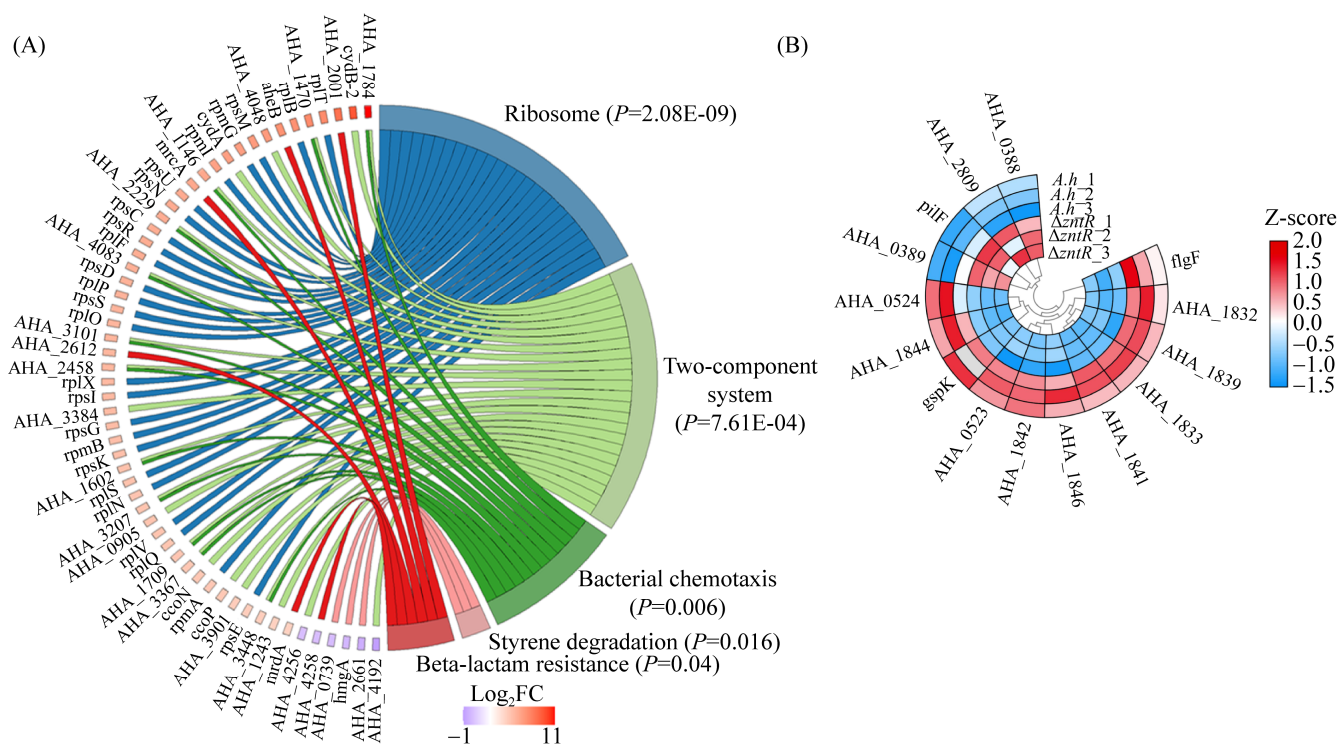


图 4.  $\Delta zntR$  差异表达蛋白 GOplot 生物信息学分析

Figure 4.  $\Delta zntR$  differentially expressed protein GOplot bioinformatics analysis. A: KEGG enrichment analysis; B: virulence factor expression analysis.



## 2.8 Western blotting 验证定量蛋白质组学结果

为了验证定量蛋白质组学数据的可靠性,利用课题组已有的 2 个差异蛋白特异性抗体进行 Western blotting 验证。结果显示,在转录调控因子 *zntR* 缺失菌株中,Western blotting 验证差异蛋白的表达情况与定量蛋白质组学的结果基本一致(图 5),证实了质谱数据的可靠性。

## 3 讨论

众所周知,转录调控因子参与调控细菌各种生理生化过程,以此响应复杂的外界胁迫环境<sup>[12-14]</sup>。人们对原核生物基因转录调控进行全局分析时发现原核生物具有复杂的调控机制,可通过转录因子的作用来调节基因转录过程<sup>[15-17]</sup>。ZntR 是一个 Zn(II)-反应性转录调节因子,也属于转录激活因子 MerR 家族蛋白<sup>[18]</sup>。在根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中, *zntR* 突变体对 CdCl<sub>2</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 高度敏感,对 CoCl<sub>2</sub> 的敏感性较低,但不影响细菌毒力<sup>[5]</sup>;在假结核耶尔森菌(*Yersinia*

*pseudotuberculosis*) 中 *zntR* 对 VI 型分泌系统 (T6SS) 有正向调节作用,参与对宿主细胞的毒力和细胞间的相互作用,且在维持胞内锌稳态、控制活性氧浓度以防止细菌在氧化应激下的死亡中起重要作用<sup>[19-20]</sup>。

本研究通过对嗜水气单胞菌 *zntR* 缺失菌株生理表型的分析,进一步利用基于 DIA 模式的定量蛋白质组学技术对  $\Delta zntR$  的差异蛋白进行比较分析,进而结合细菌毒力相关表型和响应环境胁迫的结果,探讨该转录调控因子可能参与调控细菌毒力和响应各种金属离子胁迫的内在机制。研究首先发现, *zntR* 基因缺失后对锌和铬离子胁迫敏感,对钴离子胁迫耐受,后续蛋白质组学数据中也发现 *zntR* 缺失导致锌离子外排 ZntA 蛋白显著下降,提示嗜水气单胞菌中 ZntR 也和以往研究结果类似,通过调控 ZntA 蛋白将多余金属离子泵出胞外<sup>[21-22]</sup>;此外,表型分析还发现缺失株的泳动和群集运动能力增强、生物被膜形成能力减弱、溶血活性增强,表明嗜水气单胞菌中的 *zntR* 除了参与金属离子的动态平衡以外,可能还参与调控细菌其他的生理功能;进一步通过 KEGG 代谢通路对差异蛋白进行生物信息学分析,结果发现 12 个细菌趋化性过程的相关蛋白(例如 *AHA\_1470*、*AHA\_1784*、*AHA\_1602* 等)均表达上调、23 个双调节系统相关蛋白(例如 *AHA\_4192*、*AHA\_3031*、*AHA\_4256*)表达上调或下调,而细菌趋化性和双调节系统与细菌运动能力和生物膜合成能力密切相关,这可能是 *zntR* 缺失导致泳动、群集、以及生物膜形成能力发生变化的原因之一<sup>[23]</sup>。此外缺失菌株与对照相比有 15 个毒力相关基因发生显著性差异,提示 *zntR* 调控胞内毒力因子相关蛋白的表达,可能参与细菌的毒性调控过程,并导致细菌溶血性发生改变。

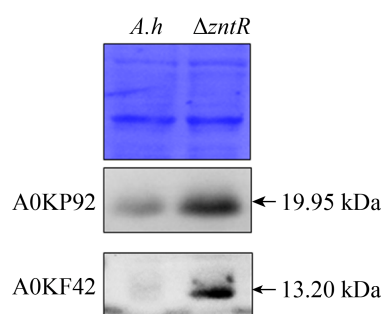


图 5. 野生菌和  $\Delta zntR$  之间部分差异表达蛋白的 Western blotting 印迹分析

Figure 5. Western blotting analysis of some differentially expressed proteins between wild bacteria and  $\Delta zntR$ . The upper part of the figure is the SDS-PAGE image of the whole protein of the strain, and the lower part is the result of Western blotting.

## 4 结论

本论文通过同源重组的方法成功构建了嗜水气单胞菌 ATCC7966 中的 *zntR* 敲除株。对 *A.h.*、 $\Delta zntR$ 、 $\Delta zntR::vector$  和  $\Delta zntR::zntR$  菌株之间响应金属离子胁迫进行检测比较, 发现存在显著性差异, 表明 *zntR* 基因可能在响应金属离子胁迫过程中发挥重要作用。此外, *zntR* 基因的缺失导致细菌的泳动和群集运动能力均显著增强, 生物被膜形成能力显著减弱。这些结果表明: *zntR* 基因可能参与嗜水气单胞菌生命活动中的多个调控机制。

## 参考文献

- [1] Riccardi G, Milano A, Pasca MR, Nies DH. Genomic analysis of zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 287(1): 1–7.
- [2] Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal preferences and metallation. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(41): 28095–28103.
- [3] Xu FF, Imlay JA. Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(10): 3614–3621.
- [4] Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(1): 25–35.
- [5] Zhu ZY, Hua YK, Hu TT, Zhang MJ, Yang Y, Gao Y. Advances in microbial metal response proteins. *Microbiology China*, 2018, 45(8): 1794–1803. (in Chinese)  
朱振宇, 华堃堃, 胡婷婷, 张梦君, 杨宇, 高宇. 微生物金属响应蛋白研究进展. *微生物学通报*, 2018, 45(8): 1794–1803.
- [6] Brocklehurst KR, Hobman JL, Lawley B, Blank L, Marshall SJ, Brown NL, Morby AP. ZntR is a Zn (II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(3): 893–902.
- [7] Wang D, Hosteen O, Fierke C A. ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 111: 173–181.
- [8] Pruteanu M, Neher SB, Baker TA. Ligand-controlled proteolysis of the *Escherichia coli* transcriptional regulator ZntR. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3017–3025.
- [9] Chaoprasid P, Nookabkaew S, Sukchawalit R, Mongkolsuk S. Roles of *Agrobacterium tumefaciens* C58 *ZntA* and *ZntB* and the transcriptional regulator *ZntR* in controlling  $Cd^{2+}/Zn^{2+}/Co^{2+}$  resistance and the peroxide stress response. *Microbiology*, 2015, 161(9): 1730–1740.
- [10] Singh VK, Xiong AM, Usgaard TR, Chakrabarti S, Deora R, Misra TK, Jayaswal RK. ZntR is an autoregulatory protein and negatively regulates the chromosomal zinc resistance operon *znt* of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(1): 200–207.
- [11] Zhao HJ, Wang Y, Guo MH, Mu MY, Yu HX, Xing MW. Grass carps co-exposed to environmentally relevant concentrations of cypermethrin and sulfamethoxazole bear immunodeficiency and are vulnerable to subsequent *Aeromonas hydrophila* infection. *Environmental Pollution*, 2020, 266: 115156.
- [12] Barroso KCM, Previato-Mello M, Batista BB, Batista JH, da Silva Neto JF. EmrR-dependent upregulation of the efflux pump EmrCAB contributes to antibiotic resistance in *Chromobacterium violaceum*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2756.
- [13] Zeng J, Deng WY, Yang WM, Luo HP, Duan XK, Xie LX, Li P, Wang R, Fu TW, Abdalla AE, Xie JP. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1152 is a novel GntR family transcriptional regulator involved in intrinsic vancomycin resistance and is a potential vancomycin adjuvant target. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 28002.
- [14] Jousselin A, Kelley WL, Barras C, Lew DP, Renzoni A. The *Staphylococcus aureus* thiol/oxidative stress global regulator Spx controls *trfA*, a gene implicated in cell wall antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(7): 3283–3292.
- [15] Zhou D, Yang R. Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(19): 2260–2290.
- [16] Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang XD, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 326–356.
- [17] Grove A. Regulation of metabolic pathways by MarR family transcription factors. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2017, 15: 366–371.
- [18] Pennella MA, Arunkumar AI, Giedroc DP. Individual metal ligands play distinct functional roles in the Zinc sensor *Staphylococcus aureus* CzrA. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 356(5): 1124–1136.
- [19] Wang TT, Chen KQ, Gao F, Kang YW, Chaudhry MT, Wang

- Z, Wang Y, Shen XH. ZntR positively regulates T6SS4 expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Microbiology*, 2017, 55(6): 448–456.
- [20] Caswell CC. The role of zinc in the biology and virulence of *Brucella* strains//Roop II R, Caswell C. Metals and the biology and virulence of *Brucella*. Cham: Springer, 2017: 63–72.
- [21] Hantke K. Bacterial zinc transporters and regulators//Maret W. Zinc Biochemistry, physiology, and homeostasis. Dordrecht: Springer, 2001: 53–63.
- [22] Rosen BP. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(3): 689–693.
- [23] Wu WL, Liao JH, Lin GH, Lin MH, Chang YH, 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.

## Physiological function and mechanism of *zntR* gene regulation in *Aeromonas hydrophila*

Yuexu Lin<sup>1,2#</sup>, Lishan Zhang<sup>1,2#</sup>, Jiazhen Chen<sup>1,2</sup>, Tianzhi Nong<sup>1,2</sup>, Fangting Xing<sup>1,2</sup>, Xiangmin Lin<sup>1,2</sup>, Xiaofang Xie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

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

**Abstract:** [Objective] ZntR is a metal regulatory protein, which can catalyze the transcriptional activation of zinc efflux genes, thus controlling the intracellular Zn(II) from toxic. However, the effect of *zntR* on bacterial biological function remains unclear. [Methods] In this study, we constructed *Aeromonas hydrophila* (*A.h*)  $\Delta zntR$  deletion strain and  $\Delta zntR::zntR$  rescued strain to evaluate the biofilm formation ability, hemolytic activity, motility ability, the characters of responding to metal ion stress and other physiological phenotypes. [Results] The results showed that *zntR* deletion strain was sensitive to zinc and chromium stress and tolerant to cobalt ion stress, meanwhile, the biofilm formation ability was decreased and the movement ability was enhanced. These phenotypes could be recovered in the rescue strains. Furthermore, the differential protein expression between wild-type strain and *zntR* deletion strain was compared by DIA based quantitative proteomics. Results showed that *zntR* may also be involved in the regulation of two-component system, bacterial chemotaxis and other metabolic pathways. [Conclusion] The above research can provide theoretical basis for further study on the regulation mechanism of ZntR transcription factors in bacterial physiological function.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, transcriptional regulator, homologous recombination

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670129)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: 710579191@qq.com

Received: 5 November 2020; Revised: 10 December 2020; Published online: 7 February 2021