

文章编号: 1000-0615(2018)09-1473-08

DOI: 10.11964/jfc.20170710890

## 嗜水气单胞菌AraC家族转录调控因子AetY的功能

汪瑶, 董雨豪, 刘锦, 王楠楠, 陆承平, 刘永杰\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 为研究嗜水气单胞菌中国流行菌株NJ-35的AraC家族转录调控因子AetY(U876\_01475)的功能, 本实验采用同源重组技术构建了该基因的缺失株 $\Delta aetY$ 及互补株C $\Delta aetY$ , 并对野生株、缺失株及互补株生物被膜形成能力、自凝集活性、对恩诺沙星的耐药性和对斑马鱼的致病力进行检测。结果显示, 与野生株相比,  $\Delta aetY$ 生物被膜形成能力、自凝集活性、对恩诺沙星的最小抑菌浓度(MIC)均显著降低, 对斑马鱼致病力明显降低, 半数致死量(LD<sub>50</sub>)增加400余倍。C $\Delta aetY$ 各项指标均恢复至野生株水平。本研究首次针对嗜水气单胞菌AraC家族成员进行了基因功能分析, 为进一步探究该菌的致病机理提供参考。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; AraC家族; 转录调控因子; 基因缺失; 致病力

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种重要的人—兽—鱼共患的病原菌, 属革兰氏阴性菌, 主要引起淡水鱼出血性败血症, 人类感染可引发败血症和胃肠炎以及继发性伤口感染。该菌能产生毒性很强的外毒素(气溶素、溶血素、细胞毒性肠毒素等)和胞外蛋白酶(淀粉酶、蛋白酶、核酶等)<sup>[1]</sup>。嗜水气单胞菌NJ-35株于2010年5月分离自江苏省南京市的发病鲫(*Carassius auratus*), 属中国流行株ST251型<sup>[2]</sup>。胡萌等<sup>[3]</sup>对其进行了溶血性、溶蛋白性、外膜蛋白图谱、ERIC-PCR图谱及其对斑马鱼(*Danio rerio*)致病性等生物学特性分析。然而, 关于该菌株毒力调控的机制目前尚不清楚。

转录调控因子是一类可以控制DNA转录成RNA, 即基因表达第一阶段的蛋白质。其通过特异性结合调控区域的DNA序列来调控靶基因的转录过程<sup>[4]</sup>。AraC家族转录调控因子在细菌中广泛存在, 家族成员约有100个。不同的AraC家族成员调控的靶基因各异, 在不同种类细菌中的功能也存在差别, 主要涉及常见的碳代谢、

应激反应和发病机制等<sup>[5]</sup>。目前, 该家族转录调控基因在嗜水气单胞菌中鲜有报道。为探讨嗜水气单胞菌流行菌株NJ-35的一个AraC家族转录调控因子AetY(U876\_01475)的功能, 本实验采用同源重组技术构建了基因缺失株及互补株, 并研究该基因敲除后对细菌的生物被膜形成能力、自凝集活性、恩诺沙星耐药性及对斑马鱼致病力的影响。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料

嗜水气单胞菌NJ-35株由本实验室分离保存, 大肠杆菌SM10购自上海北诺生物科技有限公司。自杀性质粒pYAK1、pMMB207均由浙江大学方维焕教授馈赠。

PrimeSTAR Max DNA聚合酶、限制性内切酶、DNA Marker、SYBR premix Ex Taq™ Kit、反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Kit)、DNA Gel Purification Kit均购自大连TaKaRa公司; 细菌质粒提取试剂盒、E. Z. N. A.™细菌RNA提取试剂盒购自

收稿日期: 2017-07-03 修回日期: 2017-09-20

资助项目: 国家自然科学基金(31372454); 江苏省水产三新工程(D2015-13)

通信作者: 刘永杰, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

OMEGA公司；2×PCR PreMix购自南京诺唯赞生物科技有限公司；氨苄青霉素(AMP)、氯霉素(CH)购自Invitrogen公司。实验中基因缺失株、互

补株构建验证所需引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成，实时荧光定量PCR(qRT-PCR)引物由昆泰锐生物技术有限公司合成(表1)。

表1 引物信息

Tab. 1 Primers information

目标基因 target genes	目的片段长度/bp product length	引物 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<b><i>aetY</i>基因缺失株构建引物</b> primers for construction of <i>aetY</i> deletion mutant			
<i>aetY</i> 基因上游片段 <i>aetY</i> -upstream	895	A-P1	CAGGTCGACTCTAGAGGATCC CGACGGCATTGAACAG
		A-P2	GGCCGTACGC TCATGGCCGGATCCT
<i>aetY</i> 基因下游片段 <i>aetY</i> -downstream	565	A-P3	CCGGCCATGA GCGTACGGCCATAAAAC
		A-P4	GAGCTCGGTACCCGGGGATCC GCGTCACCGAGGATTT
<i>aetY</i> 基因内部片段 <i>aetY</i> -internal	389	A-P5	GTTTCGCAGTGACAAGAGC
		A-P6	AACGGGACTGGGCATAA
<b><i>aetY</i>基因互补株构建引物</b> primers for construction of <i>aetY</i> complemented mutant			
<i>aetY</i>	858	A-P7	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGATCGACTACCGCCG
		A-P8	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTAGCGCACGCTGGAG
<b>荧光定量PCR引物</b> primers for qRT-PCR			
<i>aetY</i> -RT	101	<i>aetY</i> -RT-S	ATCAGCAAGGAGCAACAC
		<i>aetY</i> -RT-A	AGACGGCATCATAACCCT
<i>recA</i> -RT	182	<i>recA</i> -RT-S	CGACCCCATCTATGCCGC
		<i>recA</i> -RT-A	CCATCTCACCTTCGATTCCG

80日龄的AB品系斑马鱼购自南京夫子庙动物市场，体长2~3 cm，体质量约3 g。

## 1.2 基因缺失株构建

参考已报道的方法<sup>[6]</sup>，以NJ-35株基因组为模板，用目的基因上游片段引物(P1/P2)和下游片段引物(P3/P4)分别扩增上下游同源臂。通过融合PCR，以上下游片段PCR扩增产物为模板，使用P1/P4引物，融合上下游同源臂。常规酶切、连接、转化，将融合PCR产物连接到pYAK1载体(宿主为大肠杆菌SM10)，测序鉴定无突变后进行下一步实验。

以含有基因敲除质粒的大肠杆菌SM10为供体菌，以嗜水气单胞菌NJ-35株为受体菌，通过接合的方式将基因敲除质粒从大肠杆菌SM10转移到NJ-35中。具体操作：供体菌SM10和受体菌NJ-35分别培养至对数期，5 000 r/min离心5 min收集菌体，无菌PBS (10 mmol/L, pH 7.2)缓冲液洗

2遍，两种菌均调至 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL (OD<sub>600</sub>值为0.2)，将SM10与NJ-35按不同比例(2 : 1、3 : 1、4 : 1)均匀混合。直径0.45 μm无菌滤膜贴在普通LB固体培养基上，取200 μL混合菌液点加在滤膜上，培养基正放于28 °C温箱培养20 h。

无菌镊子取出带菌滤膜，用1 mL新鲜的LB液体培养基冲洗细菌，5 000 r/min离心5 min，弃去800 μL上清液，保留200 μL重悬后涂布于AMP (100 μg/ mL)/CH (34 μg/ mL)双抗平板，于28 °C倒置培养36~48 h，挑取单菌落于含有AMP/CH的LB液体培养基中培养过夜，粗提基因组进行PCR验证，筛选发生第1次同源重组的菌株，即单交换菌株。

单交换菌株转接至不含NaCl的LB培养基，传2代后，转接至蔗糖浓度为20%的不含NaCl的LB液体培养基中培养30 h，菌液10倍比稀释涂布于蔗糖浓度为20%不含NaCl的LB固体培养基。培

养24 h后, 挑取单菌落至普通LB液体培养基中培养过夜, 粗提基因组进行PCR验证, 筛选发生第2次同源重组并丢失目的基因的菌株, 即基因缺失株。

### 1.3 基因互补株构建

以NJ-35株基因组为模板, 用互补片段引物进行PCR扩增获得含有目的基因的PCR产物片段, 通过常规酶切、连接、转化及PCR验证, 将该片段连接到质粒pMMB207(宿主为大肠杆菌SM10), 提取互补质粒送至金唯智生物科技公司进行测序, 确定连接片段无突变后进行下一步实验。

以含有互补质粒的大肠杆菌SM10为供体菌, 以嗜水气单胞菌NJ-35株基因缺失株为受体菌, 通过接合的方式将互补质粒转移至缺失株。接合完成后, 用无菌镊子取出带菌滤膜, 1 mL新鲜的LB液体培养基冲洗细菌, 5 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 重悬后根据浓度倍比稀释, 200  $\mu$ L涂布于AMP/CH双抗平板, 28  $^{\circ}$ C温箱中倒置培养36~48 h, 挑取单菌落于含有AMP/CH的LB液体培养基中培养过夜, 粗提基因组进行PCR验证, 筛选含有互补质粒的菌株, 即基因互补株<sup>[6]</sup>。

### 1.4 荧光定量PCR检测目的基因转录水平

取培养至对数生长期的嗜水气单胞菌NJ-35野生株、 $\Delta aetY$ 和 $C\Delta aetY$ 分别提取细菌总RNA, 用反转录试剂盒(PrimeScript<sup>TM</sup> RT Kit)反转录为cDNA, 应用SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> Kit进行荧光定量PCR, 采用两步法以 $recA$ 基因作为内参检测野生株、 $\Delta aetY$ 和 $C\Delta aetY$ 的缺失基因mRNA水平。实验独立重复3次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析检测结果<sup>[6-7]</sup>。

### 1.5 生长曲线绘制

分别挑取野生株、 $\Delta aetY$ 和 $C\Delta aetY$ 单菌落于LB培养液中, 28  $^{\circ}$ C 180 r/min振荡培养过夜。调整各菌株OD<sub>600</sub>值至0.5, 按1:100的比例转接至含有20 mL新鲜LB培养液的锥形瓶中, 每个样本设置3个重复, 28  $^{\circ}$ C 180 r/min振荡培养。测定菌液OD<sub>600</sub>值, 取各个时间点3个平行样本的均值绘制成生长曲线。

### 1.6 生物被膜形成能力检测

挑取单菌落于LB培养基中, 28  $^{\circ}$ C 180 r/min培养过夜, 取菌液按1:100的比例接种于新鲜的

LB培养基中, 在28  $^{\circ}$ C 180 r/min条件下培养至OD<sub>600</sub>值为0.6~0.8后, 用紫外分光光度计测定其OD<sub>600</sub>值, 并用LB液体培养基调节至1.0, 将菌液按1:1 000的比例用新鲜的LB培养基进行稀释。在平底96孔细胞板中, 每孔加入200  $\mu$ L制备好的菌悬液, 每株菌重复接8孔, 阴性对照孔仅加入200  $\mu$ L LB液体培养基, 将96孔细胞板放置于28  $^{\circ}$ C温箱静置培养24 h。培养结束后, 弃去培养物上清液, PBS清洗3次以除去浮游菌体, 然后用200  $\mu$ L甲醇固定15 min。室温干燥15 min后, 加入200  $\mu$ L结晶紫染色10 min, ddH<sub>2</sub>O重复冲洗5次。待完全干燥后, 每孔加入200  $\mu$ L 95%酒精溶解结晶紫, 10 min后通过测定其OD<sub>595</sub>的值<sup>[8]</sup>来确定各菌株生物被膜形成能力。

### 1.7 细菌自凝集实验

从LB平板挑取单菌落接种于LB培养液中, 28  $^{\circ}$ C 180 r/min振荡培养过夜, 离心收集菌体, 无菌PBS洗2次, 调节各菌悬液至OD<sub>600</sub>值为0.8, 室温静置, 16 h后测定上层悬浮液的吸光度值。按照公式计算各菌株自凝集活性: 自凝集活性(%)=(A<sub>0</sub>-A<sub>16</sub>)/A<sub>0</sub>×100。

### 1.8 恩诺沙星最小抑菌浓度(MIC)检测

MIC检测采用美国临床和实验室标准协会(CLSI)规定的肉汤稀释法。使用MH肉汤培养基在28  $^{\circ}$ C 180 r/min条件下培养新鲜菌液, 12 h后取菌液按1:100的比例转接于MH肉汤新鲜培养基中再次进行培养, 培养至菌液OD<sub>600</sub>数值介于0.6~0.8时用紫外分光光度计测定其OD<sub>600</sub>数值, 并用MH肉汤培养基调节浓度使OD<sub>600</sub>达到1.0。再用MH肉汤稀释到1:1 000备用。药物用ddH<sub>2</sub>O在EP管中连续2倍比稀释, 稀释终浓度分别为16、8、4、2、1、0.5……0.001 562 5  $\mu$ g/mL。取稀释好的药物加入96孔板中, 各浓度10  $\mu$ L, 再在含有药物的孔中加入稀释好的菌液, 每孔100  $\mu$ L。轻微振荡混匀, 置于28  $^{\circ}$ C温箱, 20~24 h之内观察结果。

### 1.9 对斑马鱼LD<sub>50</sub>的测定

观察1周, 确认斑马鱼健康后进行实验。实验期间, 水温为25~28  $^{\circ}$ C。各菌株于LB液体培养基中28  $^{\circ}$ C过夜培养后, 1:100转接至新鲜LB培养基中, 培养6 h, 5 000 r/min离心5 min收集菌体, 无菌PBS洗3次, 依次调整菌液浓度至

$5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 和 $5 \times 10^3$  CFU/mL。每个浓度均腹腔注射斑马鱼，每组10尾，每尾0.02 mL，同时设等量PBS为空白对照。观察1周记录结果，按照加权回归法(Bliss法)<sup>[9]</sup>计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)。

统计分析采用Microsoft Excel 2015 和SPSS Statistics v20.0软件进行分析处理。 $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 *aetY*基因缺失株及互补株PCR鉴定

重组缺失质粒、互补质粒送至苏州金唯智生物科技公司测序后，NCBI BLAST在线比对确认了序列正确无误，且不存在碱基突变。

用引物A-P1/A-P4对野生株和 $\Delta aetY$ 进行PCR验证，结果显示在野生株检测到长度为2 138 bp的产物，即由目的基因上游片段、目的基因及目的基因下游片段构成的长片段；在 $\Delta aetY$ 中检测到的产物长度则为1 460 bp，即由目的基因上游片段与下游片段构成的小片段。同时，使用目的基因内部引物A-P5/A-P6对野生株和 $\Delta aetY$ 进行PCR验证，结果显示在野生株中检测到了目的基因扩增产物，在 $\Delta aetY$ 中未检测到目的基因扩增产物，以上结果说明成功构建了*aetY*基因缺失株(图1-a)。用互补引物A-P7/A-P8对 $C\Delta aetY$ 进行PCR验证，结果显示在互补株中重新检测到目的基因，说明缺失基因成功回补(图1-b)。

### 2.2 实时荧光定量PCR验证

采用qRT-PCR对野生株、 $\Delta aetY$ 及 $C\Delta aetY$ 的目的基因转录情况进行验证。结果显示， $\Delta aetY$ 中无目的基因的转录，野生株、 $C\Delta aetY$ 均能检测到目的基因的转录(图1-c)。

### 2.3 生长特性分析

各菌株生长曲线测定结果表明在28 °C条件下， $\Delta aetY$ 、 $C\Delta aetY$ 的生长速率稍快于野生株，差异不显著，即*aetY*基因的敲除对该菌在LB培养基中的生长能力无明显影响(图2)。

### 2.4 生物被膜形成能力及自凝集活性比较

检测结果显示，与野生株相比， $\Delta aetY$ 株的生物被膜形成能力(图3-a)及自凝集活性(图3-b)均显著下调( $P < 0.05$ )， $C\Delta aetY$ 株恢复至野生株水

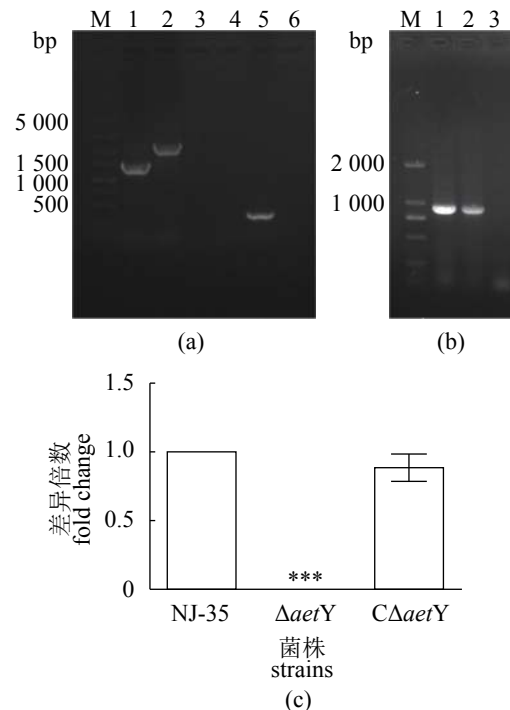


图1 基因缺失株及互补株鉴定

(a)基因缺失株PCR鉴定，M. Marker 5 000；1~3. A-P1/A-P4引物；4~6. A-P5/A-P6引物；1、4. 缺失株 $\Delta aetY$ ；2、5. 野生株NJ-35；3、6. 阴性对照；(b)基因互补株PCR鉴定，M. Marker 2 000；互补引物1~3. A-P7/A-P8；1. 野生株NJ-35；2. 互补株 $C\Delta aetY$ ；3. 阴性对照；(c)qRT-PCR检测目的基因转录，野生株转录水平设为1.0，以*recA*基因作为内参，检测*aetY*基因转录水平； $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析结果。\*\*\*表示与野生株相比差异极显著( $P < 0.01$ )

Fig. 1 Identification of the gene-deleted and gene-complemented strains

(a) PCR identification of the gene-deleted strain, M. Marker 5 000; lane 1-3. primers A-P1/A-P4; lane 4-6. primers A-P5/A-P6; lane 1, 4. *aetY*-deleted strain; lane 2, 5. the wild-type strain; lane 3, 6. negative control; (b) 1-3 PCR identification of the gene-complemented strain, M. Marker 2 000; primers A-P7/A-P8; lane 1. the wild-type; lane 2. *aetY*-complemented strain; lane 3. negative control; (c) the transcription level of target gene deleted by qRT-PCR. The value of the target genes in WT as 1.0, the relative changes in gene transcription ratios of *aetY* gene were normalized to the transcription of a single housekeeping gene (*recA*), and calculated as described by  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. \*\*\*represent significantly statistical difference compared with the wild-type strain ( $P < 0.01$ )

平。提示该基因可能与细菌凝集黏附特性有关，并参与调控生物被膜的形成。

### 2.5 恩诺沙星MIC值检测

根据CLSI规定的MIC结果判定方法，当MIC检测值在3个连续的浓度梯度范围内结果为有效。按此原则测得NJ-35野生株恩诺沙星MIC值为0.125 0  $\mu\text{g/mL}$ ，缺失株 $\Delta aetY$ 为0.031 3~0.062 5  $\mu\text{g/mL}$ ，较野生株下调；互补株 $C\Delta aetY$ 为

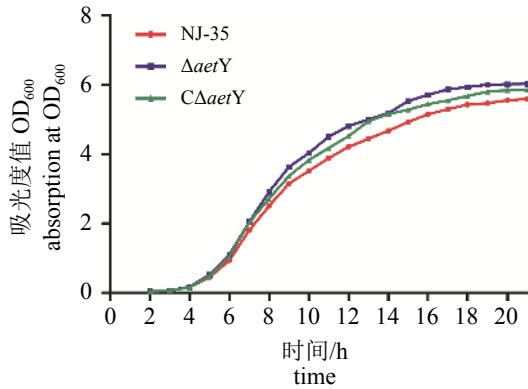


图2 ΔaetY菌株、CΔaetY菌株及野生株生长曲线  
Fig. 2 Growth curve of ΔaetY, CΔaetY and the wild-type strain

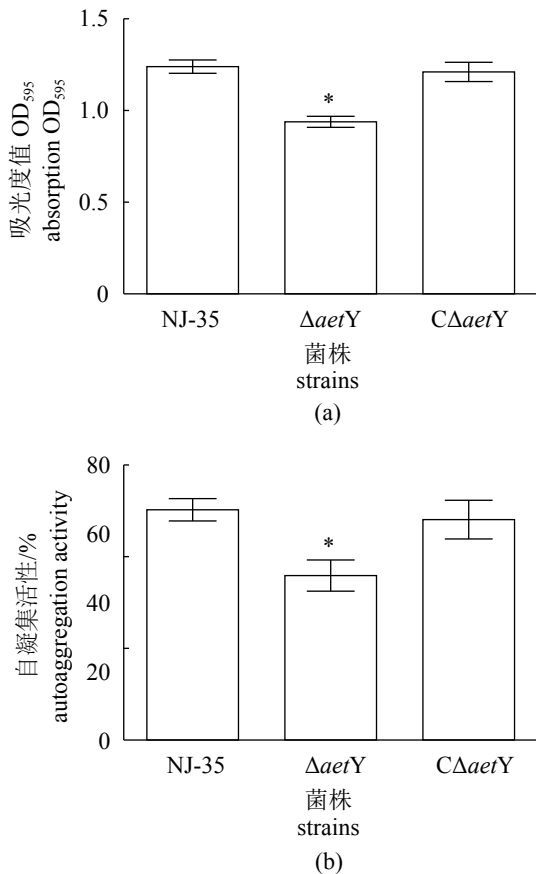


图3 野生株、缺失株、互补株生物被膜形成能力与自凝集活性

\*与野生株相比差异显著(P<0.05)

Fig. 3 Biofilm formation and autoaggregation activity of the wild-type strain, gene-deleted strain and gene-complemented strain

\*represents significantly statistical difference compared with the wild-type strain(P<0.05)

0.062 5~0.125 0 μg/mL, 恢复至野生株水平。

### 2.6 对斑马鱼致病力的比较

发病斑马鱼初期表现为游动缓慢, 后期出现身体侧翻、失去平衡、腹部红肿及鳍条基部充血出血等临床症状, 继而死亡。实验组注射菌液后24 h开始出现死亡现象, PBS对照组斑马鱼在实验过程中均活动正常, 未出现临床症状和死亡情况。

统计各实验组斑马鱼在1周内的死亡数量(表2), 按照Bliss法计算得出野生株NJ-35的LD<sub>50</sub>约为7.39×10<sup>2</sup> CFU, 缺失株ΔaetY约为3.21×10<sup>5</sup> CFU, 互补株CΔaetY约为3.16×10<sup>3</sup> CFU(表2)。结果显示, aetY基因缺失使细菌对斑马鱼的致死率显著下降, 提示该基因对嗜水气单胞菌NJ-35株的毒力具有重要的调控作用。

表2 斑马鱼致病性实验

Tab. 2 The virulence assay in *D. rerio*

注射菌量/CFU dose of bacteria injected	斑马鱼死亡数量/尾 no. of dead <i>D. rerio</i>		
	NJ-35	ΔaetY	CΔaetY
1×10 <sup>6</sup>	10	8	10
1×10 <sup>5</sup>	10	2	10
1×10 <sup>4</sup>	9	0	8
1×10 <sup>3</sup>	5	0	2
1×10 <sup>2</sup>	2	0	0

### 3 讨论

近年来, 嗜水气单胞菌给水产养殖业带来了很大的经济损失, 阐明其致病机制对防控该细菌感染具有十分重要的意义。本实验成功构建了嗜水气单胞菌NJ-35株一个AraC家族转录调控因子AetY(U876\_01475)的基因缺失株及相应互补株, 并初步分析了该基因的功能。结果显示, 敲除该基因后细菌对斑马鱼的半数致死量提高了3个数量级, ΔaetY毒力显著下降, 且生物被膜形成能力和自凝集活性均呈现下调, 对恩诺沙星的MIC值降低。从各菌株的生长曲线分析, 该基因的敲除并未影响细菌在LB培养基中的生长。

目前关于AraC家族转录调控因子功能的研究在很多细菌中均有报道, 主要涉及细菌毒力、生物被膜形成、耐药性和新陈代谢等。Frota等<sup>[10]</sup>发现AraC家族转录调控因子rv1931c能

够影响结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的毒力, 敲除该基因的突变株在巨噬细胞和小鼠体内生存和复制能力下降。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)AraC家族成员Rsp、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)AraC家族成员Rbf均通过调控多糖细胞间黏附素(PIA)的产生来控制细菌生物膜表型<sup>[11-12]</sup>。霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)AraC家族转录调控因子ToxT可直接调控毒力基因*ctxAB*和*tcpA*, 还可调节霍乱弧菌定殖因子甘露糖敏感血凝素(MSHA), 进而影响霍乱弧菌在宿主内定殖<sup>[13-16]</sup>。除了直接调控表型相关基因, 该家族调控因子还可能在细菌的整个调控网络中与其他系统相互作用, 进而间接影响细菌各方面的特性, AraC家族基因在多种细菌中被证明是III型分泌系统(T3SS)的主调节器<sup>[17]</sup>。福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)AraC家族转录激活因子VirF直接激活下游的2个毒力基因*VirB*和*ICSA*的转录, 进而激活其他毒力基因如*ipaB*、*ipaC*和*ipaD*的转录, 从而参与III型分泌系统的构建和宿主防御系统逃避<sup>[18]</sup>。在嗜水气单胞菌中, AraC家族功能研究鲜有报道, Zhao等<sup>[19]</sup>研究发现, 嗜水气单胞菌AH3株的AraC家族成员ExsA对T3SS具有调节作用, 还能够影响细菌的侧鞭毛系统。目前, 转录调控因子*aetY*的功能尚未见在其他细菌中有报道。本实验中, 嗜水气单胞菌NJ-35株AraC家族成员*aetY*基因敲除后, 细菌生物被膜形成能力和对斑马鱼的致病力均下降, 提示该基因可能直接调控某些与毒力、生物被膜形成相关的基因, 也有可能通过某种机制与其他调控系统相互影响, 在细菌的整个调控网络中发挥作用, 进而导致了细菌特性的改变。

恩诺沙星是水产养殖业常用的氟喹诺酮类药物。已有研究表明, 嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物耐药性产生的分子机制主要包括药物靶位基因突变、抗性质粒介导及外排泵系统介导的耐药性<sup>[20-21]</sup>。目前证实AraC家族对一些细菌的耐药性有影响, 如淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)AraC家族成员MtrA通过结合到MtrCDE外排泵的启动子序列从转录水平调节细菌对抗生素的耐药性<sup>[22]</sup>。Jiménez-Castellanos等<sup>[23]</sup>发现肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)AraC家族转录调控因子MarA、SoxS、RarA和RamA分别不同程度地调控细菌外膜通透性和对抗生素的敏感性。大肠杆菌(*Escherichia coli*)AraC家族成员通过上调AcrAB-TolC多药外排泵和外膜孔蛋白OmpF抑制

因子MicF的表达介导多重耐药性<sup>[24]</sup>。本实验中, AraC家族基因*aetY*缺失后, 在细菌生物被膜形成能力降低的同时, 对恩诺沙星MIC值降低, 提示该基因可能通过下调NJ-35株生物被膜的形成, 影响细菌外膜通透性, 进而改变细菌对药物的耐受能力, 也有可能该基因直接参与影响药物外排泵系统的功能发挥, 其中的分子机制有待进一步研究。

综上, 嗜水气单胞菌NJ-35株AraC家族转录调控因子*aetY*的缺失导致了细菌毒力的显著降低及生物学特性的改变, 说明该基因在细菌感染宿主过程中发挥了重要作用, 可能属于嗜水气单胞菌NJ-35株的毒力及耐药性调控基因。本实验为进一步探究AraC家族在嗜水气单胞菌毒力调控方面的作用机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李绍戊, 卢彤岩. 嗜水气单胞菌毒力因子研究进展[J]. 水产学杂志, 2013, 26(5): 61-64.  
Li S W, Lu T Y. Research advances of virulence factors in bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(5): 61-64(in Chinese).
- [2] Pang M D, Jiang J W, Xie X, *et al.* Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9833.
- [3] 胡萌, 潘子豪, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌流行菌株的生物学特性[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(5): 441-445.  
Hu M, Pan Z H, Lu C P, *et al.* Biological characterization of epidemic *Aeromonas hydrophila* strains[J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 43(5): 441-445(in Chinese).
- [4] 任良云. 基于转录因子结合位点的特性对转录因子分类的新方法[D]. 济南: 山东大学, 2012.  
Ren L Y. A novel method for classification of transcription factors based on properties of transcription factor binding sites[D]. Ji'nan: Shandong University, 2012 (in Chinese).
- [5] Tobes R, Ramos J L. AraC-XyIS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 318-321.
- [6] 庞茂达. 嗜水气单胞菌流行株基因组特征及毒力相关基因研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.  
Pang M D. Genomic characteristics and virulence-associated genes analysis of *Aeromonas hydrophila*[D].

- Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [ 7 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [ 8 ] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40(2): 175-179.
- [ 9 ] 吴亚锋, 王旭远, 庞茂达, 等. 水族箱气单胞菌的鉴定及致病特性分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(4): 573-579.  
Wu Y F, Wang X Y, Pang M D, *et al.* Identification and pathogenic characteristics of *Aeromonas aquariorum*, a new member of the genus *Aeromonas*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 573-579(in Chinese).
- [10] Frota C C, Papavinasasundaram K G, Davis E O, *et al.* The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(9): 5483-5486.
- [11] Rowe S E, Campbell C, Lowry C, *et al.* AraC-type regulator Rbf controls the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype by negatively regulating the *icaAD-BC* repressor SarR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(21): 2914-2924.
- [12] Li T M, He L, Song Y, *et al.* AraC-type regulator Rsp adapts *Staphylococcus aureus* gene expression to acute infection[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(3): 723-734.
- [13] Krukonis E S, Yu R R, Dirita V J. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(1): 67-84.
- [14] Withey J H, DiRita V J. Activation of both *acfA* and *acfD* transcription by *Vibrio cholerae* ToxT requires binding to two centrally located DNA sites in an inverted repeat conformation[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 1062-1077.
- [15] Lowden M J, Skorupski K, Pellegrini M, *et al.* Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(7): 2860-2865.
- [16] Hsiao A, Liu Z, Joelsson A, *et al.* *Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(39): 14542-14547.
- [17] Schwiesow L, Lam H, Dersch P, *et al.* *Yersinia* Type III secretion system master regulator LcrF[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(4): 604-614.
- [18] Emanuele A A, Garcia G A. Mechanism of action and initial, *in vitro* SAR of an inhibitor of the *Shigella flexneri* virulence regulator VirF[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137410.
- [19] Zhao Y H, Shaw J G. Cross-talk between the *Aeromonas hydrophila* Type III secretion system and lateral flagella system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1434.
- [20] 崔佳佳. 淡水鱼源嗜水气单胞菌耐药机制初探[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.  
Cui J J. Study on drug resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish species[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [21] 方一风, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制[J]. *微生物学报*, 2014, 54(2): 174-182.  
Fang Y F, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Molecular mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(2): 174-182(in Chinese).
- [22] Zalucki Y M, Dhulipala V, Shafer W M. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *mBio*, 2012, 3(6): e00446-12.
- [23] Jiménez-Castellanos J C, Wan Ahmad Kamil W N I, Cheung C H P, *et al.* Comparative effects of overproducing the AraC-type transcriptional regulators MarA, SoxS, RarA and RamA on antimicrobial drug susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(7): 1820-1825.
- [24] Duval V, Lister I M. MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli*-Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response[J]. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2013, 2(3): 101-124.

## Functional analysis of *Aeromonas hydrophila* AraC-family transcriptional factor AetY

WANG Yao, DONG Yuhao, LIU Jin, WANG Nannan, LU Chengping, LIU Yongjie\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to investigate the function of AraC-family transcriptional factor AetY (U876\_01475), we constructed the *aetY* deletion mutant strain  $\Delta aetY$  using homologous recombination with *Aeromonas hydrophila* Chinese epidemic strain NJ-35 as a parental strain. The corresponding gene-complemented strain  $C\Delta aetY$  was also constructed. Biofilm formation ability, auto-aggregation activity, drug resistance to enrofloxacin and pathogenicity were detected in NJ-35,  $\Delta aetY$  and  $C\Delta aetY$  strains. The inactivation of *aetY* caused a significant decrease in biofilm formation, auto-aggregation and MIC value for enrofloxacin. The virulence of  $\Delta aetY$  to *Danio rerio* was significantly reduced, and the LD<sub>50</sub> value had an increase of more than 400 times. The above characteristics of  $C\Delta aetY$  were restored to the same level of the wide type strain. This study for the first time investigated the function of AraC-family transcriptional factor AetY in *A. hydrophila*, which will provide a basis for further exploration of AetY role in pathogenic mechanism.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; AraC-family; transcriptional factor; gene deletion; pathogenicity

**Corresponding author:** LIU Yongjie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

**Funding projects:** National Nature Science Foundation of China (31372454); Aquatic Three New Projects in Jiangsu Province (D2015-13)