嗜水气单胞菌*hfq2*基因对生物被膜形成的影响

王贵宾, 蔡奇岚, 李泽琦, 赵怡扬, 林镇平, 林向民*

福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

* 联系人, E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

2018-12-12 收稿, 2019-01-25 修回, 2019-01-25 接受, 2019-04-01 网络版发表

国家自然科学基金(31670129)资助

摘要 Hfq蛋白是一种进化上保守的sRNA分子伴侣蛋白, 在转录后水平调控RNA翻译, 涉及细菌重要生理功能的调节. 嗜水气单胞菌ATCC 7966基因组中含有两个*hfq*基因拷贝(*AHA_0924*与*AHA_3797*), 目前对*AHA_3797*(简称*hfq2*)基因功能的研究比较少. 本研究首先利用同源重组技术敲除该基因, 发现*hfq2*缺失后形成生物膜的能力显著降低($P<0.001$), 进一步通过SWATH(sequential window acquisition of all theoretical spectra)定量蛋白质组学技术比较野生型与 $\Delta hfq2$ 在生物膜状态下的蛋白表达差异, 共鉴定出1538个蛋白, 其中131个蛋白表达上调, 140个蛋白表达下调. 生物信息学分析表明, 生物被膜状态下 $\Delta hfq2$ 导致细菌铁离子转运相关蛋白表达上调, 趋化作用相关蛋白则大幅度下调. 进一步利用Western Blotting对部分差异蛋白的表达进行了验证. 最后通过铁离子螯合剂添加试验证实, Hfq2蛋白可以通过影响铁离子动态平衡过程来影响细菌生物被膜的形成. 了解Hfq2蛋白在细菌生物被膜形成过程的调控机理, 对病原菌的防治以及新型抑菌策略的研发具有重要的科学意义.

关键词 嗜水气单胞菌, *hfq2*, 生物被膜, SWATH, 定量蛋白质组学

Hfq蛋白(host factor for Q β replicase)广泛存在于细菌中, 早期研究发现它是大肠杆菌噬菌体Q β 进行有效复制所必需的一种宿主因子, 现在普遍认为其是一种重要的sRNA分子伴侣蛋白, 亦是全局性转录后调控因子. 它可促进不同sRNA分子与其靶标mRNA分子间的相互作用, 参与细菌的各种重要生理活动, 并涉及直接调控某些mRNA的表达^[1]. 研究表明, Hfq蛋白在分解代谢物阻遏、感应细胞压力、铁离子动态平衡、细菌耐药性及致病性等多个重要生理活动中起着关键性作用^[2,3]. 大多数细菌只携带一个Hfq蛋白, 而有报道有些细菌含有多个拷贝, 例如伯克霍尔德氏菌J2315基因组中编码2个具有不同的Hfq蛋白, Hfq1(79个氨基酸)和Hfq2(188个氨基酸)^[4]; 炭疽芽孢杆菌染色体上有两个Hfq拷贝(*hfq1*和*hfq2*基因), 第3个拷贝(*hfq3*基因)则

由pXO1毒力质粒编码, 涉及细菌毒素的分泌^[5]. Hfq1是常见的调控蛋白, 其结构与功能在模式微生物中研究较为广泛, 因此目前对Hfq蛋白的分子机制理论大多是在对Hfq1蛋白的研究基础上的. 而Hfq2蛋白由于在大肠杆菌等模式生物中不存在, 其聚体形成形式与生理功能的研究较为缺乏^[6].

嗜水气单胞菌是淡水养殖中三大重要病原菌之一, 除了感染多种鱼类、贝类等水产动物以外, 该菌还可以感染禽类、爬行动物、两栖动物和哺乳动物, 对人类的公共卫生与食品安全造成了严重的威胁^[7,8]. 对嗜水气单胞菌ATCC 7966(NC_008570.1)分析发现, 其基因组中也存在两个Hfq蛋白编码序列: 一个是常见的Hfq, 其基因名是*AHA_0924*, 是一个含有88个氨基酸残基(9.6 kDa)的Sm家族RNA分子伴侣蛋白, 与广泛研究

引用格式: 王贵宾, 蔡奇岚, 李泽琦, 等. 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: 1506–1514

Wang G B, Cai Q L, Li Z Q, et al. Effect of *hfq2* gene in *Aeromonas hydrophila* on biofilm formation (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1506–1514, doi: [10.1360/N972018-01225](https://doi.org/10.1360/N972018-01225)

的大肠杆菌和溶藻弧菌Hfq具有较高的同源性^[9]；而另一个Hfq家族蛋白，简称为Hfq2，其基因名是*AHA_3797*，是一个含有121个氨基酸残基(13.3 kDa)的Sm家族RNA分子伴侣蛋白。魏选明^[9]研究发现，嗜水气单胞菌的Hfq蛋白影响胞外蛋白酶的分泌以及细菌的毒力，但目前尚未发现对Hfq2蛋白功能的研究报道。

本研究通过基因敲除方法构建嗜水气单胞菌*hfq2*基因缺失菌株，进一步利用基于SWATH(sequential window acquisition of all theoretical spectra)的定量蛋白质组学技术，比较Δ*hfq2*基因的缺失对生物膜状态下细菌蛋白表达的差异，分析Hfq2蛋白在生物膜形成中的功能与调节机制，为更好地认识细菌生理功能调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

(i) 材料。本实验所需的菌株和质粒均为实验室保存。嗜水气单胞菌和大肠杆菌培养温度分别为30和37℃，且均用LB培养基培养。抗生素浓度分别为氨苄青霉素(Amp)100 μg/mL，氯霉素(Cm)30 μg/mL。本研究所用试剂均为分析纯。胶回收和质粒提取试剂盒购买于OMEGA；总DNA提取试剂盒购买于北京康为世纪生物技术公司；限制性内切酶购买于Thermo Fisher Scientific；DNA定向克隆试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司；Taq plus聚合酶和高保真酶(Primer STAR Mix)购买于Takara公司；氯霉素和氨苄青霉素购买于上海拜力生物科技有限公司。

(ii) *hfq2*缺失菌株的构建。以嗜水气单胞菌ATCC 7966(*A.h*)的基因组DNA为模板，根据同源重组的原理设计基因敲除引物^[10]。首先利用DNA定向克隆技术将

目的基因上下游各500 bp基因片段融合到pRE112载体后转化至MC1061感受态细胞中。提取阳性克隆的质粒，转入S17感受态细胞；将携带目的基因片段pRE112载体的S17菌与嗜水气单胞菌按1:4的比例在滤纸片上结合培养16~18 h，进行第一次同源重组，然后将无菌LB培养液洗涤下来的混合菌液涂布于含氨苄和氯霉素抗性的LB平板上，获得阳性克隆；将过夜培养的筛选菌株涂布于含有20%蔗糖的LB平板上，然后挑取单克隆，分别点在氯霉素和正常LB平板上。最后选取在氯霉素板上不长的阳性克隆测序验证，获得*hfq2*敲除菌株，稳定遗传20代后，-80℃保菌。以上步骤根据表1设计对应引物进行PCR验证并测序。

(iii) 生物被膜的测定。利用结晶紫染色的96孔微量板法检测嗜水气单胞菌生物被膜的形成能力^[11]。具体操作如下：将过夜菌(*A.h*和Δ*hfq2*)按1%转接至新鲜LB液体培养液30℃，200 r/min震荡至A_{600nm}~1.0，再按5%转接至96孔微量板中30℃静置培养24 h；弃去菌液，用双蒸水缓慢洗涤3次后晾干；每孔中加入等量0.1% (w/v)结晶紫溶液后室温静置染色20 min；弃去结晶紫溶液，再用双蒸水缓慢洗涤3次晾干；最后每孔加入等量的95%(v/v)的乙醇溶液，用SpectraMax® i3多功能酶标仪(molecular devices)检测其A_{595nm}波长下的吸光值，每个样品做8孔重复，并做3次生物学重复，最终数据用*t*检验做显著性差异分析。铁离子限制条件下生物被膜的测定方法除在5%转接至微量板时，加入终浓度为200 μmol/L的铁离子螯合剂2,2'-联吡啶(DIP)以外，其他步骤与常规方法相同。

(iv) 细菌生物被膜状态下蛋白的提取。将*A.h*和Δ*hfq2*的过夜菌1:100接种于含有LB液体培养基的培养

表1 *AHA_3797*基因缺失以及验证引物列表^{a)}

Table 1 The Primer used for gene deletion and verification in this study^{a)}

引物名称	序列5'→3'	用途
P1	catgaattccgggagagctcACAGCCCCGAGGAACAGG- <i>SacI</i>	左臂上游引物
P2	gaccaggcaagtgcAAAATTATTGTCCCGCGAAAA	左臂下游引物
P3	attTGCACTTGCTGGGTCACC	右臂上游引物
P4	cgatccaagcttcttagaCGAACACTACGTGGCCAACC- <i>XbaI</i>	右臂下游引物
P5	ATGACAACCTGAATCCCCAAGCT	目的基因验证引物上游引物
P6	CTGCTCGCTGCTACCGCC	目的基因验证引物下游引物
P7	TGATGGAACCGATATAGACCAGCGG	左臂外侧验证引物上游引物
P8	TCTATGAGCTGGGCGGCATGCCGAG	右臂外侧验证引物上游引物

a) 下画线部分为酶切位点

皿中, 30℃下静置24 h; 弃掉上清用PBS缓慢清洗3次后, 加入一定量的PBS缓冲液, 刮取培养皿壁上的菌体, 4℃, 6000×g, 离心10 min, 收集菌体, 用预冷的PBS清洗3次. 经过超声破碎后, 取约100 μg蛋白样品加入50 mmol/L DTT, 56℃孵育40 min, 然后加入25 mmol/L碘乙酰胺室温避光静置1 h. 处理后的样品加入1:50的胰蛋白酶37℃孵育过夜获得酶解多肽, 并在C18除盐柱(Waters)上除盐^[12].

(v) LC/MSMS建库与SWATH-MS质谱鉴定. 酶解后的多肽样品用A液(0.1%甲酸, 2%乙腈)进行溶解, 在Eksigent nanoLC 425(SCIEX) 色谱系统上由自动进样器上样至预柱上, 以3 μL/min的流速平衡10 min. 随后以600 nL/min的流速在分析柱上进行分离. 色谱分离的梯度为: 0~80 min, B液(含0.1%甲酸的乙腈)从8%到25%线性上升; 80~105 min B液从25%~45%线性上升; 105~110 min B液从45%~80%线性上升. 质谱数据的采集通过TripleTOF 5600质谱仪(SCIEX)完成.

DDA模式具体参数设置如下: 气帘气: 30 psi; 离子源雾化器: 15 psi; 离子喷雾电压: 2400 V; 离子源温度: 150℃; 一级(MS)扫描范围(m/z): 350~1500, 累积时间0.25 s, 二级采用IDA 扫描模式: 高灵敏度模式, 累积时间0.05 s, 扫描范围(m/z)100~1500, 一个MS1图谱最多选择40个最强的母离子进行串联扫描, 母离子动态排除时间为18 s, 碰撞能量选择“rolling collision energy (CE)”.

SWATH-MS模式下二级采用SWATH扫描模式: 每25 Da一个窗口, 将400~1200 m/z 分为32个窗口进行扫描, 采用高灵敏度模式, 每个窗口累积时间为0.1 s, 扫描范围(m/z)100~1500, 碰撞能量选择“rolling collision energy (CE)”.

(vi) 蛋白质定性定量分析. DDA模式产生的原始数据wiff和scan文件通过ProteinPilot 5.0(SCIEX)进行定性分析. 搜库参数如下: Sample Type: Identification; Cysteine Alkylation: Iodoacetamide; Digestion: Trypsin; Instrument: TripleTOF 5600; 数据库为嗜水气单胞菌蛋白质数据库. 最终生成group文件用于SWATH定量分析.

SWATH扫描获取的文件通过SWATH Acquisition MicroApp 2.0结合PeakView® V 2.1 software(AB SCIEX, 美国)进行定量分析. 首先将DDA产生的group文件导入进行建库来获取蛋白, 肽段出峰时间以及碎片离子等信息, 然后将SWATH原始文件导入并选择信

号较高的肽段进行保留时间校正. 分析参数如下: 每个蛋白质肽最大段数为5, 每个肽段的碎片离子数为5, 肽段置信度≥90%, 假阳性率<1%.

(vii) 生物信息学分析. 选取肽段匹配数大于1, $P<0.05$, 且蛋白比值差异(FC)1.5倍以上的蛋白为差异蛋白进行生物信息学分析. 利用在线网站DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)分析差异蛋白GO与KEGG功能, 并利用GOplot R语言包编程绘图^[13,14].

(viii) Western Blotting. 蛋白SDS-PAGE电泳检测结束后, 用半干转仪(trans-blot turbo)将蛋白转移至PVDF膜上, 在5%(w/v)脱脂牛奶的PBST溶液中室温封闭1 h后, 加入一抗(1:5000)室温孵育1 h; 用PBST洗5次后, 再加入二抗(1:4000)室温孵育1 h; 最后用PBST洗5次后, 将处理过的PVDF膜进行ECL曝光显色^[15].

2 结果与分析

2.1 目的基因的敲除

根据嗜水气单胞菌基因组序列, 设计引物, 分别扩增 AHA_3797 基因上下游各500 bp(P1P2与P3P4)DNA序列, 扩增结果如图1所示: 扩增出的DNA片段单一, 片段大小与预期一致(图1(a), 泳道1, 2). 上下游片段融合到自杀载体pRE112上后, 在MC1061与S17细胞中扩增, 并经过两次同源重组过程筛选后, 获得 $hfq2$ 无痕敲除的菌株. 利用验证引物(P5P6)扩增, 与野生株(WT)相比目的基因缺失, 初步证实 $hfq2$ 基因已被敲除(图1(a), 泳道3, 4). 同时制备Hfq2特异性鼠抗进行Western Blotting验证, 结果如图1(b)所示: 野生株在其对应位置有明亮的条带, 而 $\Delta hfq2$ 突变菌株则没有, 证明 $hfq2$ 基因确实敲除成功.

2.2 生物被膜测定结果

进一步利用96孔微量板结晶紫染色定量检测法比较野生菌与 $hfq2$ 突变菌株生物膜形成的能力. 结果如图2所示, $A.h$ 和 $\Delta hfq2$ 都能形成典型的生物膜, 当 $hfq2$ 缺失后, 其生物膜形成能力显著下降, 提示 $hfq2$ 基因参与调控生物被膜的形成过程.

2.3 定量蛋白质组学及生物信息学分析

为了解Hfq2蛋白对细菌生物膜形成的影响, 本试验提取生物被膜状态下 $\Delta hfq2$ 及野生型细菌的3次生物学重复蛋白样品, 经过烷基化、还原处理, 酶解成多肽

图 1 (网络版彩色) *AHA_3797(hfq2)* 基因的敲除验证. (a) PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测; M, DL2000 Marker; 1, P1P2(500 bp); 2, P3P4(500 bp); 3, *WT*-P5P6(363 bp); 4, $\Delta hfq2$ -P5P6; (b) 野生菌株(*WT*)与敲除菌株的Western Blotting验证, 上图为野生菌株*WT*与*hfq2*敲除菌株的上样量比较, 下图为相对应的Western Blotting结果

Figure 1 (Color online) Confirmation of the knockout strain $\Delta AHA_{3797}(\Delta hfq2)$. (a) Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products. M, DL2000 Marker; 1, P1P2(500 bp); 2, P3P4(500 bp); 3, *WT*-P5P6(363 bp); 4, $\Delta hfq2$ -P5P6. (b) The verification of wild type (*WT*) and mutant strain by Western Blotting; the figure above shows the sample loading control of *WT* and $\Delta hfq2$ strain, and the figure below shows the result of Western Blotting

图 2 生物膜形成能力的测定($P<0.001$)

Figure 2 Determination of biofilm formation ability ($P<0.001$)

后, 进行SWATH定量蛋白质组学比较分析. 蛋白质谱信号强度的相关性分析显示各组样品具有很高的相关性($r^2>0.890$), 表明质谱仪器的准确性和稳定性良好(图3(a)). 本研究共鉴定到1538个蛋白(肽段匹配数 ≥ 2 , FDR $<1\%$), 与对照相比, 共发现271个差异蛋白, 其中

131个蛋白表达上调, 140个蛋白表达下调(当差异倍数 ≥ 1.5 (上调)或 ≤ 0.667 (下调), t 检验 $P<0.05$ 时为差异表达蛋白质), 差异蛋白占总鉴定蛋白数的17.6%, 其差异蛋白的火山图分布情况如图3(b)所示.

进一步的GO注释富集分析发现, 分子功能聚类中, 上调蛋白主要涉及受体活性, 转氨酶活性和金属离子结合功能(图4(a)), 而下调蛋白则主要参与氧化还原酶活性过程(图4(b)). 在KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)代谢途径富集中, 上调蛋白主要以抗生素的生物合成为主, 下调蛋白则以细菌趋化性为主. 以上分析表明, *hfq2*基因参与了嗜水气单胞菌多个重要生物学功能的调节.

2.4 免疫印迹验证

为验证定量蛋白质组学数据的可靠性, 本实验选取了实验室已有的5个差异蛋白特异性抗体进行Wes-

图 3 (网络版彩色) $\Delta hfq2$ 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(a)与差异蛋白的火山图(b)

Figure 3 (Color online) Quantitative proteomics analysis the correlations among three biological repeats (a) and volcano plot of differential expression proteins (b) between $\Delta hfq2$ and wild-type *A. hydrophila*

表2 $\Delta hfq2$ 与野生型嗜水气单胞菌SWATH-MS定量分析部分差异蛋白列表Table 2 SWATH-MS quantitative analysis of partial altered proteins between $\Delta hfq2$ and wild type *A. hydrophila*

蛋白名	基因名	蛋白描述	匹配肽段数	平均比值	P
A0KNS2	AHA_3434	TonB系统生物聚合物运输蛋白	12	12.89	1.41×10^{-6}
A0KQ46	AHA_3963	大肠杆菌素I受体	17	3.04	7.71×10^{-6}
A0KIU8	AHA_1663	血红素受体	4	2.10	2.57×10^{-3}
A0KQW7	AHA_4251	TonB系统生物聚合物运输蛋白	6	1.87	3.11×10^{-2}
A0KGW8	hgpB	血红素外膜蛋白受体	33	1.78	1.45×10^{-4}
A0KEB9	AHA_0054	铁蛋白	5	1.78	2.11×10^{-2}
A0KLG8	AHA_2610	寡肽ABC转运蛋白, ATP结合蛋白OppD	12	1.74	9.42×10^{-4}
A0KFK1	AHA_0494	TonB依赖性铜离子受体	18	1.70	4.67×10^{-5}
A0KG09	AHA_0652	铁(III)ABC转运蛋白, ATP结合蛋白	4	1.56	5.70×10^{-5}
A0KI25	motA	趋化蛋白MotA	2	0.66	1.64×10^{-2}
A0KJB5	AHA_1832	未知蛋白	2	0.64	2.78×10^{-2}
A0KIY6	fliD	鞭毛钩相关蛋白	8	0.64	3.04×10^{-3}
A0KCLK1	AHA_2643	甲基受体趋化蛋白传感蛋白	19	0.61	2.57×10^{-5}
A0KHR9	AHA_1279	主要外膜蛋白OmpAII	11	0.61	1.79×10^{-5}
A0KI09	fliL-2	鞭毛蛋白FliL	5	0.60	7.33×10^{-4}
A0KHA1	AHA_1110	DPS家族蛋白	6	0.55	5.47×10^{-4}
A0KP90	AHA_3621	甲基受体趋化蛋白	16	0.53	4.62×10^{-4}
A0KN33	pilN	IV型菌毛生物合成蛋白PilN	2	0.53	2.03×10^{-3}
A0KG57	luxS	S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶	6	0.45	1.25×10^{-5}
A0KFW8	AHA_0611	甲基受体趋化蛋白	8	0.44	5.34×10^{-5}
A0KMT3	AHA_3082	甲基受体趋化蛋白	4	0.43	2.06×10^{-2}
A0KID1	AHA_1494	甲基受体趋化蛋白	7	0.37	1.20×10^{-3}
A0KH30	AHA_1038	趋化蛋白CheY	3	0.28	3.76×10^{-6}
A0KH27	AHA_1035	甲基受体趋化蛋白	6	0.24	2.84×10^{-4}
A0KH25	AHA_1033	甲基受体趋化蛋白	12	0.22	6.40×10^{-6}
A0KPA4	AHA_3649	甲基受体趋化蛋白	6	0.09	1.18×10^{-2}

tern Blotting验证. 验证的差异蛋白包括2个上调(OppD和Colicin I receptor)和3种下调蛋白(OmpA II, A0KJB5和LuxS). 结果显示在缺失 $hfq2$ 后, 目的蛋白的差异与蛋白质组学的结果基本一致, 证实蛋白质组学数据的可靠性(图5).

2.5 Hfq2调控细菌铁稳态并影响生物被膜的形成

为进一步研究金属离子在Hfq2介导的生物被膜形成过程中的作用, 本试验比较了野生型菌株与 $\Delta hfq2$ 敲除菌株在缺铁条件下生物被膜的形成能力. 如图6所示, 当加入铁离子螯合剂DIP后, *A. h*菌生物被膜的生长下降, 而 $\Delta hfq2$ 的生长则显著升高, 说明Hfq2可能通过调

控铁离子相关蛋白来影响生物膜的形成.

3 讨论

Hfq作为分子伴侣蛋白, 促进了sRNA分子与靶标mRNA之间的不完全配对作用, 参与细菌的各种重要生理活动, 被认为是一个核心的转录后调控全局因子. 已有研究表明, hfq 基因在不同的细菌中的功能具有多样性^[16]. 当 hfq 基因缺失后, 单核细胞增生李斯特菌的毒力、溶血能力以及形成生物被膜的能力都会显著减弱^[17]; 产酶溶杆菌 OH11 hfq 基因缺失后表现为对SDS的耐受能力下降以及不能水解几丁质, 表明 hfq 可能参与耐受SDS与几丁质酶生物合成或者外泌的过程^[18].

图 4 (网络版彩色) $\Delta hfq2$ 与野生型嗜水气单胞菌差异蛋白 GOplot 生物信息学分析. (a) GO 注释的分子功能聚类分析; (b) KEGG 代谢途径的聚类分析. 外圈显示不同 GO/KEGG 注释富集的差异蛋白表达水平 (logFC), 内圈条形图的高度显示 GO/KEGG 的显著性 (log10 adjusted *P* 值)
Figure 4 (Color online) Bioinformatics analysis of differential expression proteins between $\Delta hfq2$ and wild type *A. hydrophila* by GOplot software. (a) The cluster analysis of GO annotation in molecular function; (b) the cluster analysis of KEGG metabolic pathway

图 5 (网络版彩色) 蛋白质印迹验证野生型嗜水气单胞菌和 $\Delta hfq2$ 之间差异表达的蛋白质. (a) Western Blotting 结果; (b) 相应样品考马斯亮蓝染色为上样量对照
Figure 5 (Color online) Western Blotting analysis of the proteins differentially expression between WT and $\Delta hfq2$. Western Blotting results (a) and the loading controls stained by Coomassie blue (b)

细菌基因组的比较发现, 少数细菌带有两个 *hfq* 基因拷贝, 一个是与其他细菌高度同源的 *hfq* 基因, 另一个则是同源性相对较低的 *hfq2* 基因. 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 基因组内含有两个不同的 *hfq* 基因拷贝, 前人已对第一个常见基因拷贝的功能进行了系统地研究^[9], 而目前尚未有其 Hfq2 蛋白生物学功能的相关研究.

本研究通过同源重组方法成功构建了嗜水气单胞菌 ATCC 7966 $\Delta hfq2$ 突变株. 通过比较缺失株与野生型菌株之间生物被膜形成能力的差异, 发现 *hfq2* 的缺失导致细菌生物被膜形成显著下降, 进而通过基于 SWATH 的定量蛋白质组学技术对其差异蛋白进行比较, 探讨

图 6 铁离子限制条件下 $\Delta hfq2$ 和野生型菌株生物被膜形成能力的比较. *, *P* < 0.05, ***, *P* < 0.001
Figure 6 Comparison of biofilm formation activity in $\Delta hfq2$ and wild type strains under iron starvation. *, *P* < 0.05, ***, *P* < 0.001

Hfq2 对细菌生物膜的调控机制. 生物信息学分析首先发现, Colicin I receptor, TonB-dependent copper receptor 等金属离子结合相关蛋白表达普遍上调, 这与课题组前期报道的嗜水气单胞菌在铁离子限制条件下蛋白表达行为相似^[19], 也有文献报道, 在培养基中添加铁离子螯合剂后, 可以显著降低金黄色葡萄球菌生物被膜的形成, 提示铁离子动态平衡与细菌生物膜的形成紧密相关^[20]. 为验证这一设想, 我们比较了在铁离子限制条件下, $\Delta hfq2$ 与对照株的生物膜形成情况. 结果显示, 添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 铁离子螯合剂 DIP 后, 对照菌株的生物

膜形成明显下降,而 $\Delta hfq2$ 则显著升高,说明Hfq2蛋白负调控细菌胞内铁稳态,并影响生物被膜的形成。此外,文献报道大肠杆菌的Hfq蛋白可以与铁吸收调控因子*fur*的mRNA结合,通过调控*fur*的转录水平,来影响大肠杆菌的铁稳态过程^[21],但本文中*hfq2*的缺失,并未引起Fur蛋白表达差异,提示嗜水气单胞菌中的Hfq2蛋白在铁稳态中的调控机制,可能与大肠杆菌不同。

研究还发现, CheY等细菌趋化作用相关蛋白在 $\Delta hfq2$ 突变株中普遍表达下调。目前已有许多研究报道证明趋化作用促进细菌生物被膜的形成,如Reuter等人^[22]发现空肠弯曲杆菌趋化作用相关基因(*cheA*, *cheY*, *cheV*与*cheW*)的敲除并未改变细菌鞭毛的合成,却显著影响其生物被膜形成;又如Oliveira等人^[23]利用微流体技术发现单细胞的铜绿假单胞菌在趋化物的作用下,更有利于形成生物被膜。提示本研究中趋化相关蛋白在 $\Delta hfq2$ 中下调,可能是导致嗜水气单胞菌生物被膜减少的重要原因之一。此外,已有多篇文献报道如枯草芽孢杆菌、赭型嗜壳菌及粪肠球菌等细菌的S-核糖高半胱氨酸裂解酶(LuxS)可以通过调控群体感应2型信号分子来影响生物被膜的形成^[24-26]。本文的蛋白质组学分

析发现嗜水气单胞菌LuxS蛋白在 $\Delta hfq2$ 中表达的下调,可能也导致生物被膜减少。有意思的是,*hfq2*的缺失并未导致其同源的Hfq蛋白表达发生显著变化,说明两者在嗜水气单胞菌的生物被膜形成过程的作用有所不同。

4 结论

综上所述,分子伴侣Hfq蛋白是微生物研究领域的热点,本文证实嗜水气单胞菌*hfq2*基因的缺失影响生物被膜的形成能力,提示该基因并不是一个假基因,而是在细菌生物被膜形成过程起重要的调节作用。进一步的定量蛋白质组学分析发现Hfq2蛋白涉及对群体感应、趋化作用、铁稳态平衡等细菌多个重要生理功能的调控。课题组最新研究还发现Hfq2除了影响生物被膜形成以外,还影响嗜水气单胞菌的胞外蛋白酶活性、泳动、抗逆性以及细菌耐药性等多个生理功能,充分说明Hfq2蛋白是一个重要的全局性转录调控因子^[27]。通过对该蛋白生物学功能及调节机制的深入研究,将有助于我们提高对嗜水气单胞菌毒性及生理功能的了解,为预防与控制该病原菌提供理论基础,也为今后新型药物的研发提供靶点。

参考文献

- Vogel J, Luisi B F. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 578–589
- Robert A G, Huis in't Veld R, Kramer G, et al. The Hfq regulon of *Neisseria meningitidis*. *FEBS Openbio*, 2017, 7: 777–788
- Panja S, Santiago-Frangos A, Schu D J, et al. Acidic residues in the Hfq chaperone increase the selectivity of sRNA binding and annealing. *J Mol Biol*, 2015, 427: 3491–3500
- Ramos C G, Sousa S A, Grilo A M, et al. The second RNA chaperone, Hfq2, is also required for survival under stress and full virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J Bacteriol*, 2011, 193: 1515–1526
- Panda G, Tanwer P, Ansari S, et al. Regulation and RNA-binding properties of Hfq-like RNA chaperones in *Bacillus anthracis*. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2015, 1850: 1661–1668
- Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol Microbiol*, 2010, 51: 1525–1533
- Fang H M, Ge R, Sin Y M. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 645–658
- Zhang X Y. Detection of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* by PCR method (in Chinese). *Mod Agricultural Technol*, 2018, 22: 238–239, 244 [张新艳. 嗜水气单胞菌和温和气单胞菌快速PCR方法检测. 现代农业科技, 2018, 22: 238–239, 244]
- Wei X M. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* and functional characterization of Hfq on its bioprocess (in Chinese). Master Thesis. Xi'an: Shanxi University of Science and Technology, 2016 [魏选明. 嗜水气单胞菌的分离鉴定及其Hfq功能的研究. 硕士学位论文. 西安: 陕西科技大学, 2016]
- Yao Z J, Guo Z, Wang Y Q, et al. Integrated succinylome profiling and metabolomics reveal crucial role of S-ribosylhomocysteine lyase in quorum sensing and metabolism of *Aeromonas hydrophila*. *Mol Cell Proteom*, 2019, doi: 10.1074/mcp.RA118.001035
- Wang N. Comparative proteomic analysis between biofilm and planktonic cells of *Aeromonas hydrophila* and characteristics of related proteins (in Chinese). Doctor dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 [王娜. 嗜水气单胞菌浮游态和生物被膜状态比较蛋白质组学及相关蛋白特性分析. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2012]
- Li W, Yao Z, Sun L, et al. Proteomics analysis reveals a potential antibiotic cocktail therapy strategy for *Aeromonas hydrophila* infection in biofilm. *J Proteome Res*, 2016, 15: 1810–1820

- 13 Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOpot: An R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, 2015, 31: 2912–2914
- 14 Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009, 4: 44–57
- 15 Yao Z, Sun L, Wang Y, et al. Quantitative proteomics reveals antibiotics resistance function of outer membrane proteins in *Aeromonas hydrophila*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 390
- 16 Fan B, Chen C, Li Y L. Structure, function and mechanisms of bacterial protein Hfq (in Chinese). *J Nanjing Forest Univ (Nat Sci Ed)*, 2016, 40: 155–162 [樊奔, 陈晨, 李昱龙. 细菌Hfq蛋白的结构、功能及作用机制. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2016, 40: 155–162]
- 17 Lu H T, Qiao J, Meng Q L, et al. Effect of chaperone Hfq gene deletion on *Listeria monocytogenes* virulence and biofilm formation (in Chinese). *North China Agric J*, 2017, 32: 94–98 [卢海亭, 乔军, 孟庆玲, 等. 分子伴侣Hfq基因缺失对单核细胞增生李斯特菌毒力及生物被膜生成的影响. *华北农学报*, 2017, 32: 94–98]
- 18 Zhao Y X. Cloning and characterization of the RNA chaperone Hfq in *Lysobacter enzymogenes* (in Chinese). Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014 [赵玉鑫. 产酶溶杆菌RNA伴侣蛋白Hfq的鉴定及功能研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2014]
- 19 Yao Z, Wang Z, Sun L, et al. Quantitative proteomic analysis of cell envelope preparations under iron starvation stress in *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiol*, 2016, 16: 161
- 20 Lin M H, Shu J C, Huang H Y, et al. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2012, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0034388
- 21 Večerek B, Moll I, Afonyushkin T, et al. Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: Direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2010, 50: 897–909
- 22 Reuter M, Ultee E, Toseafa Y, et al. Role of the *Campylobacter jejuni* cheVAWY chemotaxis genes in chemotactic motility and biofilm formation. *BioRxiv*, 2018, doi: 10.1101/449850
- 23 Oliveira N M, Foster K R, Durham W M. Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 6532–6537
- 24 Duanisassaf D, Steinberg D, Chai Y, et al. The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol*, 2016, 6: 1517
- 25 Hosohama-Saito K, Kokubu E, Okamoto-Shibayama K, et al. Involvement of *luxS* in biofilm formation by *Capnocytophaga ochracea*. *PLoS One*, 2016, 11: e0147114
- 26 Yang Y, Li W Z, Hou B X, et al. Quorum sensing LuxS/autoinducer-2 inhibits *Enterococcus faecalis* biofilm formation ability. *J Appl Oral Sci*, 2018, 26: e20170566
- 27 Cai Q L, Wang G B, Li Z Q, et al. SWATH based quantitative proteomics analysis reveals Hfq2 play an important role on pleiotropic physiological functions in *Aeromonas hydrophila*. *J Proteom*, 2019, 195: 1–10

Summary for “嗜水气单胞菌*hfq2*基因对生物被膜形成的影响”

Effect of *hfq2* gene in *Aeromonas hydrophila* on biofilm formation

Guibin Wang, Qilan Cai, Zeqi Li, Yiyang Zhao, Zhenping Lin & Xiangmin Lin^{*}

Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

^{*}Corresponding author, E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

The RNA-binding protein Hfq is an evolutionarily conserved sRNA chaperone protein that can regulate the RNA translation at the post-transcription level and is involved in the regulation of important physiological functions in bacteria. The *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 genome contains two copies of the *hfq* gene (*AHA_0924* and *AHA_3797*). *AHA_0924* has been found to share pronounced homology with many popular bacterial species and its biological functions was well documented. However, only few bacterial species carry the second *hfq* gene copy and its role remains largely unknown. To better understand the physiological function of *AHA_3797* (*hfq2*), we first successfully knocked out *hfq2* using homologous recombination technology and found that its biofilm formation capability was significantly reduced in this study ($P < 0.001$). A sequential window acquisition of all theoretical fragment ion (SWATH)-based quantitative proteomics technique was used to show the differences in protein expression between wild-type and $\Delta hfq2$ in biofilm status. Our results showed a total of 1538 proteins, including 131 proteins that were up-regulated and 140 proteins that were down-regulated. Selected altered proteins were validated by Western blot analysis, which indicated the proteomics results were reliable. The following Gene Ontology (GO) annotation enrichment analysis in molecular functional clustering showed that up-regulated proteins were mainly involved in receptor activity, transaminase activity, and metal ion binding function, while down-regulated proteins were mainly involved in oxidoreductase activity. In the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis, the most plentiful up-regulated proteins tended to be involved in the biosynthesis of antibiotics, while the down-regulated proteins mainly involved chemotaxis of bacteria. We also found $\Delta hfq2$ caused much of the up-regulation of bacterial iron transport-related proteins, such as colicin I receptor and TonB-dependent copper receptor, and down-regulation of chemotaxis-associated proteins, such as CheY, in the biofilm. The deletion of *hfq2* did not result in a significant change in the expression of homologous Hfq protein, suggesting that the roles of both Hfq in the biofilm formation process of *A. hydrophila* are different.

To verify the role of iron homeostasis during *hfq2*-mediated biofilm formation, we compared the biofilm formation between $\Delta hfq2$ and the wide-type strain under iron limitation conditions. The results showed that the biofilm formation of the control strain decreased, whereas that of $\Delta hfq2$ increased significantly after the addition of 200 $\mu\text{mol/L}$ ferrous iron chelating 2,2'-dipyridyl (DIP), suggesting that Hfq2 protein negatively regulates intracellular iron homeostasis and affects biofilm formation.

In general, this is the first work to confirm that the deletion of the *hfq2* gene of *A. hydrophila* affects the formation of biofilm, suggesting that this gene is not a pseudogene, but rather it plays an important regulatory role in the formation of bacterial biofilm. Establishing the mechanism by which Hfq2 protein regulates bacterial biofilm formation would be of considerable scientific significance and may be helpful in the prevention and control of pathogenic bacteria and the development of new antibacterial strategies in the future.

***Aeromonas hydrophila*, *hfq2*, biofilm, sequential window acquisition of all theoretical spectra, quantitative proteomics**

doi: [10.1360/N972018-01225](https://doi.org/10.1360/N972018-01225)