

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2023.02.002

# XapR 蛋白在嗜水气单胞菌抗生素耐药性中的功能

傅钰瑛

(福建船政交通职业学院安全与环境学院, 福建 福州 350007)

**摘要:** 研究嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) LysR 型转录调节因子中 XapR 蛋白抗生素耐药的调控机制。通过测定嗜水气单胞菌 ATCC 7966(野生型菌株)与嗜水气单胞菌 ATCC 7966 *xapR* 基因缺失株( $\Delta xapR$ )对 32 种抗生素的最低抑菌浓度,系统地评价 *xapR* 基因抗生素耐药性;进一步利用定量蛋白质组学技术,探讨 *xapR* 参与嗜水气单胞菌调控的生物过程。结果表明:*xapR* 基因缺失后细菌对头孢孟多的耐药性减弱;*xapR* 基因可调控细菌碳代谢、TCA 循环等多种代谢途径,此外还与外膜蛋白、TonB、ABC 转运系统等抗性基因的表达密切相关。综上,XapR 蛋白可通过调节细菌中心代谢途径以及多个抗性基因改变嗜水气单胞菌的耐药性。

**关键词:** XapR; 定量蛋白质组学; 细菌耐药; 嗜水气单胞菌; LTTRs

**中图分类号:** Q936; S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2023)02-0007-08

## The Function of XapR Protein in Antibiotic Resistance of *Aeromonas Hydrophila*

FU Yuying

(School of Safety and Environment, Fujian Chuazheng Communications College, Fuzhou, Anhui 350007, China)

**Abstract:** This paper studied the regulation mechanism on antibiotic resistance of LTTRs family protein XapR in *Aeromonas hydrophila*. The Minimum bactericidal concentration of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (wild-type strain) and *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 *xapR* gene deletion strain ( $\Delta xapR$ ) against 32 antibiotics were measured to evaluate the antibiotic resistance. Further, quantitative proteomics were used to investigate the effect of *xapR* deletion on the protein expression of *Aeromonas hydrophila*. The results showed that by contrast with wild-type strains in terms of antibiotics resistance, the minimum bactericidal concentration of cefamandole reduced by 2 times in  $\Delta xapR$ . Subsequently, omics analysis showed that *xapR* could regulate bacterial carbon metabolism, TCA cycle and other pathways, and also closely related to the expressions of outer membrane protein, TonB, and ABC transport system. In conclusion, XapR can change the drug resistance of *Aeromonas hydrophila* by regulating the central metabolic pathway and multiple resistance genes.

**Keywords:** XapR; quantitative proteomics; bacterial resistance; *Aeromonas hydrophila*; LTTRs

### 0 引言

LysR 型转录调节因子(LysR-type transcriptional regulators, LTTRs)是家族成员数量最多的转录调控因子,普遍存在于原核生物中<sup>[1]</sup>。其作为全局转录调节因子参与调节编码多种功能蛋白质基因的转录,尤其在细菌抗生素耐药的调控中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。Srinivasan 等<sup>[3]</sup>报道 LTTRs 中 OxyR 蛋白正向调控 RND 外排泵基因 *acrB*, 导致克雷伯氏肺炎菌对氯霉素、红霉素、萘啶酸和甲氧苄啶耐药。

XapR 属于 LTTRs 家族蛋白,参与黄嘌呤核苷的分解代谢。包括大肠杆菌在内的很多细菌能够摄取外源嘌呤和嘧啶核苷,在嘌呤核苷磷酸化酶的作用下,分解为可被细菌吸收利用的氮源和碳源以维持自身的生长。近年来,对 XapR 的研究主要集中在黄嘌呤核苷的分解代谢领域<sup>[4]</sup>,而对于其他生物学功能的研究较少报道。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是典型的人-畜-鱼共患的条件致病菌,可感染各种鱼类、蟹、蛙和贝壳类等水产品,出现细菌性败血症、溶血性

收稿日期:2023-01-13

基金项目:福建船政交通职业学院博士科研启动专项基金(20220105)。

作者简介:傅钰瑛(1989—),女,福建仙游人,讲师,博士,主要研究方向:病原微生物耐药与致病机制。

腹水病等疾病,最终造成巨大的经济损失<sup>[5]</sup>。经氨基酸序列比对分析预测,发现嗜水气单胞菌的 XapR 蛋白属于 LTTRs,目前关于其蛋白功能的研究鲜少报道。课题组前期曾利用分子生物学和蛋白质组学技术,发现嗜水气单胞菌 LTTRs 家族蛋白 YeeY、AHA\_1656、AHA\_1798 和 AHA\_3753 在细菌耐药中发挥重要作用,因 XapR 属于 LTTRs 家族蛋白,这提示 *xapR* 基因也可能参与嗜水气单胞菌细菌耐药性的调控<sup>[6-7]</sup>。因此本论文拟构建嗜水气单胞菌 *xapR* 基因缺失株,分析该基因缺失后细菌抗生素耐药性的变化,接着通过定量蛋白质组学技术分析 *xapR* 基因缺失株与野生型菌株差异蛋白的表达,并通过生物信息学分析初步揭示其耐药机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

1) 菌株及培养条件:嗜水气单胞菌 ATCC 7966 (野生型菌株)、嗜水气单胞菌 ATCC 7966 *xapR* 基因缺失株( $\Delta xapR$ )均来自福建农林大学林向民教授实验室,该菌以 LB 培养基为营养介质,最适宜的生长温度为 30 °C。

2) 主要试剂:本试验用到的抗生素信息如表 1 所示。胰蛋白胨、酵母粉、琼脂粉均购自上海翊圣生物科技有限公司;硫脲、二硫苏糖醇、碘乙酰胺购自 Sigma(St. Louis, MO);蛋白 RpoZ 和 A0KQS2 一抗为实验室制备的多克隆抗体;山羊抗小鼠二抗购自康为世纪生物科技股份有限公司。

3) 主要仪器:单人单面净化工作台(SW-CJ-1FD 型,苏州净化设备有限公司);PCR 仪(T100™, BIO-RAD);生化培养箱(SPX-60BSH-Ⅱ,上海精宏实验设备有限公司);化学发光凝胶成像仪(Fluorchem FC3, ProteinSimple);全自动生长曲线分析仪(FP-1100-C, Bioscreen C);核酸电泳仪(DYY-6D 型,北京六一生物科技股份有限公司);凝胶成像分析仪(Molecular Imager® Gel Doc™ XR+, BIO-RAD);高效液相色谱-质谱联用仪(Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, Thermo Scientific)。

### 1.2 野生型菌株和 $\Delta xapR$ 生长速率的测定

实验室一般采用紫外可见分光光度计等分析仪器测定 600 nm 波长处细菌培养液的吸光度( $OD_{600}$ )来确定细菌生长期。 $OD_{600}$ 是判定液体培养物中微生物生长的标准方法,本试验参照该方法并做稍微修改,具体如下:按照 1% 的比例分别转接野生型菌株和  $\Delta xapR$  的过夜菌至新鲜的 LB 培养基中,混匀,其中对照组为野生型菌株,接着按照每孔 350

$\mu\text{L}$  体积的菌液分装至生长曲线分析仪的微孔板中,每个样品设置 3 次生物学重复,接着将其放入全自动生长曲线分析仪,设置温度 30 °C,每间隔 1 h 测定一次 600 nm 的吸光度值,共测定 16 h,结束后导出数据并用 Prism 8 软件绘制生长曲线图谱。

### 1.3 $\Delta xapR$ 抗生素耐药性评价

首先采用琼脂平板 2 倍稀释法测定细菌对 32 种抗生素(表 1)的最低抑菌质量浓度,接着筛选出有明显效果的抗生素通过稀释点板法进一步分析,从而评价细菌的耐药性<sup>[8]</sup>。琼脂平板二倍稀释法:配制含 1.0 g/L 琼脂的 LB 固体培养基,灭菌后稍做冷却,立即将配制好的抗生素母液按照一定的比例分别单独加入培养基中,摇匀后倒至培养皿吹干,每种抗生素设置 6 个质量浓度梯度,测试范围如表 1 所示,不添加抗生素的 LB 固体平板为对照组;接着各取 2  $\mu\text{L}$  过夜菌液点在抗生素平板上吹干,30 °C 培养 24 h 后观察并记录试验结果。稀释点板法:按照 1% 的比例转接过夜菌,加入适宜质量浓度的具有明效果的抗生素,对照组不做任何处理,将试验组和对照组同时置于 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  $\mu\text{L}$  菌液接种于 LB 琼脂平板上,晾干后,30 °C 培养 16 h,记录试验结果。

### 1.4 野生型菌株和 $\Delta xapR$ 全蛋白的质谱鉴定

按照 1% 的比例转接过夜菌至 20 mL 液体 LB 中,于 30 °C 的恒温培养箱 200 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 1.0 后,4 °C 7 000 r/min 离心 15 min 弃上清,用 5 mL 预冷的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤菌体 3 遍;菌体悬于 0.5 mL 的细胞裂解液中,120 W,连续工作 6 s,暂停 9 s 的程序进行超声破碎至溶液接近澄清,4 °C 18 000 r/min 离心 15 min,收集上清,用 Bradford 试剂盒测定蛋白的浓度,参照 FASP (filter-aided sample preparation) 方法<sup>[9]</sup>进行酶解,操作步骤如下:取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品,依次加入 10 mmol/L 二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT),56 °C 孵育 40 min;500 mmol/L 吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),室温避光静置 30 min;然后按照 1:50 的质量比加入胰蛋白酶,37 °C 酶解 16~18 h 获得多肽样品,接着经 C18 除盐小柱除盐后,进行质谱鉴定。

质谱鉴定参照李碗芯等<sup>[10]</sup>的方法,依次使用数据依赖型采集和独立的数据采集 2 种模式采集数据。首先,将多肽样品溶于 25  $\mu\text{L}$  A 液(含 0.1% 甲酸的水溶液),载入 5  $\mu\text{L}$  样品并以 4.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流

表 1 抗生素信息

类型	名称	测试范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	公司名称
氨基糖苷类	妥布霉素	2.5~80	上海翊圣生物科技有限公司
	安普霉素	2.5~80	上海翊圣生物科技有限公司
	卡那霉素	1.562 5~50	北京索莱宝科技有限公司
	庆大霉素	0.312 5~10	上海翊圣生物科技有限公司
	链霉素	3.125~100	北京索莱宝科技有限公司
	巴龙霉素	2.5~80	上海翊圣生物科技有限公司
	新霉素	0.625~20	上海翊圣生物科技有限公司
	阿米卡星	0.78~25	上海翊圣生物科技有限公司
四环素类	多西环素	0.125~4	上海翊圣生物科技有限公司
	盐酸土霉素	0.625~20	北京索莱宝科技有限公司
	盐酸甲烯土霉素	0.312 5~10	上海翊圣生物科技有限公司
	四环素	0.312 5~10	Sigma 公司
喹诺酮类	环丙沙星	0.000 78~0.025	北京索莱宝科技有限公司
	左氧氟沙星	0.003 9~0.0625	上海翊圣生物科技有限公司
	培氟沙星	0.003 9~0.125	上海翊圣生物科技有限公司
	恩诺沙星	0.007 8~0.125	上海翊圣生物科技有限公司
	莫西沙星	0.003 9~0.125	上海翊圣生物科技有限公司
	依诺沙星	0.001 8~0.0625	上海源叶生物科技有限公司
	诺氟沙星	0.001 8~0.0625	上海源叶生物科技有限公司
头孢菌素类	头孢曲松钠	0.031 25~1	上海源叶生物科技有限公司
	拉氧头孢钠	0.125~4	上海源叶生物科技有限公司
	头孢孟多	0.5~16	上海源叶生物科技有限公司
	头孢美唑钠	1~32	上海源叶生物科技有限公司
$\beta$ 内酰胺类	美罗培南	0.007 8~0.25	上海源叶生物科技有限公司
	氨曲南	0.003 9~0.125	上海源叶生物科技有限公司
大环内酯类	阿奇霉素	1.25~40	上海源叶生物科技有限公司
	罗红霉素	4~128	上海源叶生物科技有限公司
氯霉素类	氯霉素	0.156 25~5	上海翊圣生物科技有限公司
利福霉素类	利福平	0.39~12.5	上海源叶生物科技有限公司
硝基咪唑类	呋喃唑酮	0.625~20	Sigma 公司
磺胺类	甲氧苄啶	0.195~3.125	上海源叶生物科技有限公司
四烯类	那他霉素	0.312 5~10	上海源叶生物科技有限公司

速流至 EASY-nano-LC 色谱系统的预柱上, 然后以 600 nL/min 的流速过柱分离。色谱分离梯度为: 0~18 min, B 液(含 0.1% 甲酸的乙腈溶液)6%~12% 线性上升; 18~77 min, B 液 12%~20%; 77~109 min, B 液

20%~32%; 109~110 min, B 液 32%~90%, 之后 90% B 液维持到 120 min。本次质谱仪的型号及参数设置如下: Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific), 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 300~1 400 m/z、分辨率为 120 K(@ m/z 200), AGC target 为 5e5, Maximum IT: 50 ms; 接着通过 DIA 模式进行二级扫描, 离子源喷雾电压为 2.1 kV, 扫描范围为 100~1 500 m/z、分辨率 30 K(@ m/z 200)、Isolation window 1.6 Th、AGC target 为 5e4、maximum IT 为 54 ms、MS2 Activation 为 HCD、碰撞能量为 30。

### 1.5 质谱数据分析

将数据依赖型采集模式下采集的质谱原始数据导入 Spectronaut Pulsar X 建立谱图库, 再将独立的数据采集模式下采集的原始数据导入 Spectronaut Pulsar X 进行蛋白质定性定量分析。建库参数: Peptides FDR\ PSMs FDR\ Proteins FDR 均为 1%, 每个 peptides 选择至少 3 个, 至多选择最优 6 个子离子生成库谱图。定量参数: iTR 标曲采取非线性拟合(Local (Non-Linear) Regression); 蛋白鉴定使用 Precursor Qvalue Cutoff 0.01 和 Protein Qvalue Cutoff 0.01; *P* 值校正 Kernel Density Estimator; 蛋白定量使用子离子峰面积, 至少选择 3 个子离子的平均强度定量; 差异分析使用 Students *t*-test。

### 1.6 生物信息学分析

按照肽段数目 > 1、*P* < 0.05、蛋白比值差异 > 1.5 倍的标准筛选差异蛋白, 作为后续生物信息学分析的依据。利用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行相关性分析, 分析结果利用 TBtool 软件进行可视化; 利用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行质谱数据火山图分析; 通过 David 在线软件对差异蛋白进行 GO (gene ontology) 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 并结合 R 语言软件中的 GOplot 程序包对结果进行可视化<sup>[11]</sup>。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/>) 对数据中的耐药基因筛选, 进一步用 TBtool 软件进行可视化。

### 1.7 蛋白质印迹法验证

本研究采取蛋白质印迹法 (Western blotting) 方法验证蛋白质组学数据的可靠性, 所用的抗体为实验室前期通过克隆、表达以及纯化获得的蛋白, 并将纯化的蛋白用于免疫小鼠获得鼠多克隆抗体。

Western blotting 实验步骤如下: 蛋白样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳分离后, 按照从下往上滤纸片-PVDF 膜-蛋白胶-滤纸片三明治夹心结构放入半干转仪, 设置电压为 25 V; 转膜 15 min 后, 取出聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用 PBST (含吐温-20 的磷酸盐缓冲液) 清洗 5 min, 接着依次进行封闭 (5% 的脱脂牛奶, 室温, 1 h), 一抗孵育 (室温, 1 h), 二抗孵育 (室温, 50 min); 最后, 用 PBST 清洗 PVDF 膜后, 利用 BIO-RAD 的化学发光成像系统进行 ECL 显色分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\Delta xapR$ 生长速率测定结果

为了更好地分析嗜水气单胞菌抗生素的耐药性, 本研究首先通过生长曲线的测定了解 *xapR* 基因对病原菌生长速率的影响, 结果显示,  $\Delta xapR$  的生长速率与野生型菌株相近 (图 1), 说明该基因并不是嗜水气单胞菌生长所必需的。

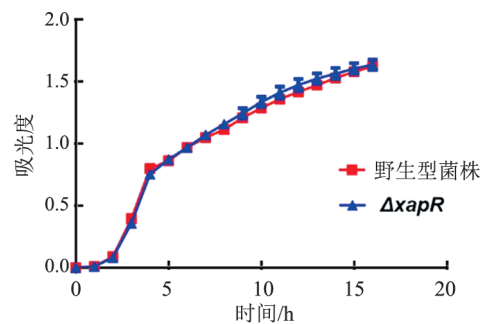


图 1  $\Delta xapR$  和野生型菌株的生长速率

### 2.2 $\Delta xapR$ 抗生素耐药性测定结果

抗生素最低抑菌质量浓度的测定结果表明, *xapR* 基因缺失后细菌对妥布霉素、安普霉素、卡那霉素等 31 种抗生素的敏感性不变, 仅对头孢孟多的 MBC 降低 2 倍, 说明 *xapR* 基因缺失后细菌对头孢孟多的耐受性降低。接着, 采用 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  头孢孟多对  $\Delta xapR$  和野生型菌株进行稀释点板, 发现  $\Delta xapR$  对头孢孟多更加敏感 (图 2)。

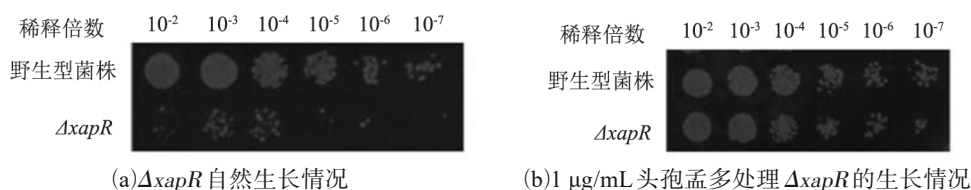
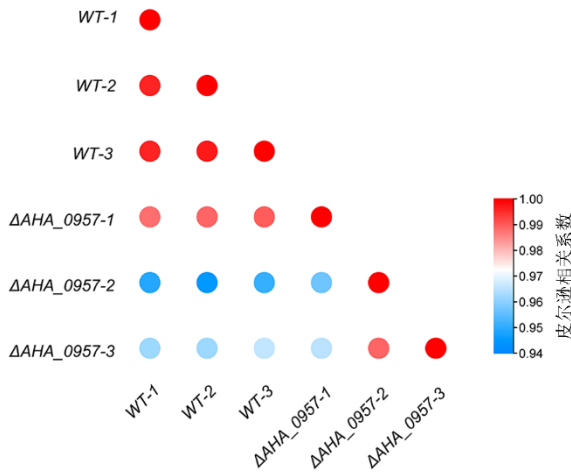


图 2  $\Delta xapR$  抗生素耐药性的测定

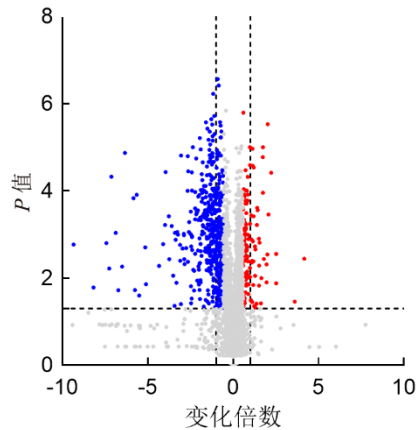
### 2.3 $\Delta xapR$ 和野生型菌株定量蛋白质组学的比较分析

为了进一步研究  $xapR$  基因的功能,本研究通过提取野生型菌株和  $\Delta xapR$  的全蛋白进行定量蛋白质组学分析。根据肽段匹配数大于等于 2 和错误发生率(FDR)小于 1% 双标筛选,共鉴定到 2 654 个蛋白。



(a) 蛋白丰度相关性分析

首先对本次定量蛋白质组学数组进行相关性分析,相关性均大于 0.9,表明样本 3 次重复性好,此次分析结果稳定(图 3(a))。随后以  $P < 0.05$ 、差异倍数  $\geq 1.5$  或  $\leq 0.667$  标准筛选差异蛋白,相对于野生型菌株,  $\Delta xapR$  中共鉴定到了 597 个差异蛋白,其中 127 个蛋白上调表达,470 个蛋白下调表达,如图 3(b)所示。



(b) 差异蛋白火山图分析

注: 每个点代表一个蛋白,蓝色点代表下调表达,红色点代表上调表达。

图 3 嗜水气单胞菌野生型和  $\Delta xapR$  蛋白质组学数据分析

### 2.4 蛋白质印迹法验证结果

本研究选取了 RpoZ 和 A0KQS2 这 2 个差异蛋白的特异性抗体进行蛋白质印迹法(Western blotting)验证,结果如图 4 所示。当  $xapR$  基因缺失后,RpoZ 上调表达,A0KQS2 则下调表达,且选择的 2 个蛋白表达的变化量与蛋白质组学测定结果一致,表明本次定量蛋白质组学结果可信度高。

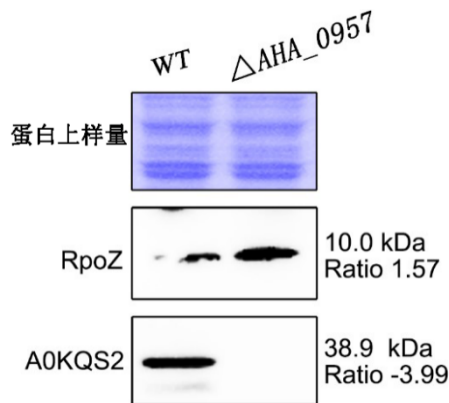


图 4 Western blotting 验证结果

### 2.5 $\Delta xapR$ 和野生型菌株定量蛋白质组学的生物信息学分析

为了深入研究  $xapR$  基因的功能,通过 David 在

线软件对差异蛋白进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析,结果如图 5 所示。生物学过程(biological process, BP)中,  $xapR$  主要参与调节单一生物过程、细胞分解代谢过程单生物代谢过程、羧酸分解代谢过程等(图 5(a));在分子功能(molecular function, MF)中,  $xapR$  主要参与调节氧化还原酶活性、水解酶活性、阳离子跨膜转运蛋白活性、糖跨膜转运蛋白活性等(图 5(b));细胞组分过程(cellular component, CC)中,显著富集到膜、细胞质膜、氧化还原酶复合体等(图 5(c))。此外,KEGG 代谢通路富集分析发现 597 个差异蛋白共富集到 8 个代谢通路,包括碳代谢、TCA 循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、氧化磷酸化、精氨酸的生物合成、次生代谢产物的生物合成等(图 5(d))。可见,  $xapR$  参与嗜水气单胞菌多个代谢途径的调节。

本研究发现  $xapR$  基因缺失会导致细菌对抗生素的耐药性发生变化,为了进一步了解该基因的生物学特性,通过在线综合抗生素耐药数据库进行耐药基因筛选,发现  $xapR$  参与 46 个抗性基因的调节,这些基因涉及头孢菌素类抗生素等抗性基因,主要通过抗生素外排泵的调控、抗生素靶点的改变和抗生素失活 3 种耐药机制调节细菌耐药性,其中有 33 个基因通过调节抗生素外排泵,10 个基因通过改

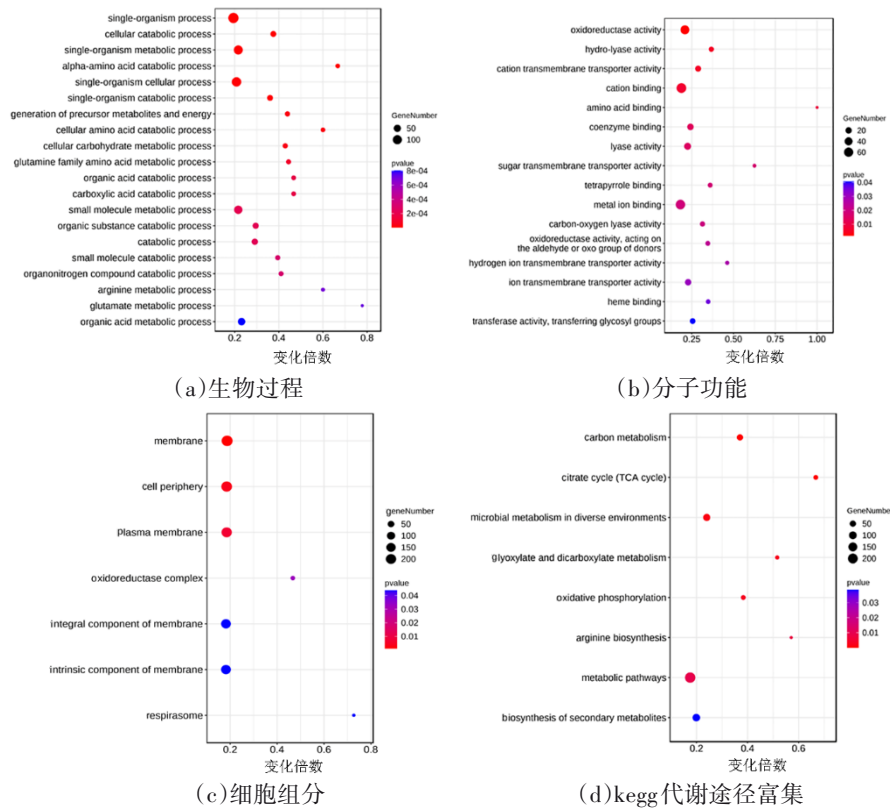
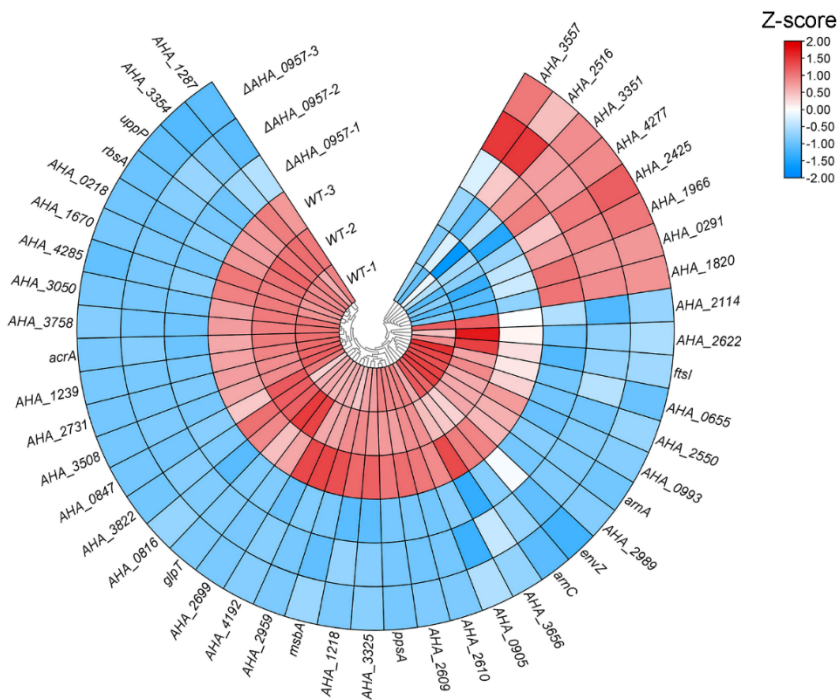


图5 嗜水气单胞菌  $\Delta xapR$  差异表达蛋白 GO 功能注释和 KEGG 代谢途径富集分析

变、保护或者替代抗生素作用靶点,仅3个基因通过抗生素的失活改变细菌的耐药性。耐药基因聚类分析结果显示这些耐药基因的表达趋势不一,与野

生型菌株相比,  $\Delta xapR$  的8个耐药基上调表达,38个基因下调表达,如图6所示。



注:在该环形热图中,颜色表示 z-score:红色为表达趋势上升,蓝色为下降;外圈为差异表达的基因。

图6  $\Delta xapR$  差异表达基因中46个耐药基因的聚类分析

### 3 讨论与结论

LTTRs 家族蛋白是原核生物中数量最多的一类转录调控因子,通常由 300 个氨基酸组成,可参与多种病原菌的毒性、致病性、生长及中心代谢过程的调节<sup>[12-15]</sup>。XapR 属于 LTTR 家族蛋白,参与黄嘌呤核苷的分解代谢,近年来对 XapR 的研究仅限于对大肠杆菌、沙门氏菌黄嘌呤核苷的分解代谢领域,其对其他生理表型的调控仍然未知,尤其在嗜水气单胞菌中 XapR 的功能鲜少报道<sup>[4,16-18]</sup>。每年由嗜水气单胞菌引发的鱼类爆发性流行疾病造成的损失不计其数,抗生素的滥用引发了生态环境污染等问题,因此对菌体耐药性的分析至关重要。本研究通过对嗜水气单胞菌 *xapR* 基因缺失株( $\Delta xapR$ )与野生型菌株抗生素耐药评价分析,发现  $\Delta xapR$  对头孢孟多的耐药性减弱。但是,转录因子 *xapR* 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对  $\Delta xapR$  的全蛋白表达谱进行分析,探讨 *xapR* 参与细菌调控的生物过程。差异表达蛋白分析发现 7 个 ABC 转运蛋白(AHA\_0218、AHA\_0655、AHA\_2425、AHA\_2609、AHA\_2610、AHA\_3557 和 AHA\_4285)显著差异表达, TonB 相关蛋白 AHA\_0461 上调表达,外膜蛋白 AHA\_1553 下调表达。有研究报道嗜水单胞菌中 ABC 转运蛋白可引起细胞内药物的积聚和拓扑异构酶 IV 表达量的增加,从而调节细菌对恩诺沙星耐

药<sup>[19]</sup>。众所周知,外膜蛋白因其可以控制小分子物质进入胞内,故在抗生素耐药中发挥重要作用<sup>[20-21]</sup>,而 TonB 已被证实调节细菌的多重耐药<sup>[22-23]</sup>。KEGG 代谢通路富集分析发现, *xapR* 可参与嗜水气单胞菌多种重要的代谢途径的调控,包括碳代谢、TCA 循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、氧化磷酸化、精氨酸的生物合成、次生代谢产物的生物合成等。此外,笔者还通过比对综合抗生素耐药数据库,发现转录调控因子 *xapR* 参与 46 个耐药基因的差异表达,其中 AHA\_1820 和 AHA\_2959 基因通过抗生素外排作用参与细菌对头孢菌素类抗生素耐药性的调节。可见,这些可能是 *xapR* 调节嗜水气单胞菌耐药的主要原因,但是具体的耐药调控机制有待进一步研究。

本研究通过最低抑菌浓度的测定以及稀释点半的方法来评价  $\Delta xapR$  对 32 种抗生素的耐药性,发现  $\Delta xapR$  对头孢孟多的耐药性减弱。接着,定量蛋白质组学分析发现 *xapR* 可参与碳代谢、TCA 循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、氧化磷酸化、精氨酸的生物合成、次生代谢产物的生物合成。综上所述,在嗜水气单胞菌中,LTTRs 家族蛋白 XapR 可参与细菌耐药性的调控。该研究不仅可以完善人们对 LTTRs 家族蛋白功能的认识,而且对病原菌的防治具有一定的指导意义,对水环境抗生素的污染具有一定程度的缓解作用。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG L, YU S Y, NING X N, et al. A LysR transcriptional regulator manipulates macrophage autophagy flux during brucella infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 858173.
- [2] KOENTJORO M P. Structural studies of transcriptional regulation by LysR-Type transcriptional regulations in bacteria[J]. Agricultural Science, 2018, 6: 105-118.
- [3] SRINIVASAN V B, MONDAL A, VENKATARAMAIAH M, et al. Role of *oxyRKP*, a novel LysR-family transcriptional regulator, in antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology, 2013, 159(7): 1301-1314.
- [4] SEEGER C, POULSEN C, DANDANELL G. Identification and characterization of genes (*xapA*, *xapB*, and *xapR*) involved in xanthosine catabolism in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol., 1995, 177(19): 5506-5516.
- [5] ABDUL K Z, WEE W, MOHAMAD S S A, et al. Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: a mini-review[J]. Front Vet Sci., 2022, 9: 1023784.
- [6] FU Y Y, CAI Q L, WANG Y Q, et al. Four LysR type transcriptional regulator family proteins (LTTRs) involved in antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35: 127.
- [7] FU Y Y, ZHANG L S, WANG G B, et al. Quantitative proteomics analysis reveals YeeY play an important role on furazolidone resistance in *Aeromonas hydrophila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 577376.
- [8] THERESE K L, BAGYALAKSHMI R, MADHAVAN H N, et al. In-vitro susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates [J]. Indian J Med Microbiol, 2006, 24(4): 273-279.
- [9] WISNIEWSKI J R. Filter aided sample preparation - a tutorial[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1090: 23-30.

- [10] 李碗芯, 赵怡扬, 林玲, 等. 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[J]. 微生物学报, 2021, 61(11):3594–3606.
- [11] ZHANG L S, LI W X, SUN L N, et al. Quantitative proteomics reveals the molecular mechanism of *Aeromonas hydrophila* in enoxacin stress[J]. J Proteomics, 2020, 211: 103561.
- [12] SUN W N, FAN Y L, WAN F, et al. Functional Irreplaceability of *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis* OxyRs is critically determined by intrinsic differences in *Oligomerization*[J]. mBio., 2022, 13(1): e0349721.
- [13] TIAN M X, LI Z C, QU J, et al. The novel LysR-family transcriptional regulator BvtR is involved in the resistance of *Brucella abortus* to nitrosative stress, detergents and virulence through the genetic regulation of diverse pathways[J]. Vet Microbiol., 2022, 267: 109393.
- [14] CHEN J D, BYUN H, SHE Q X, et al. S-Nitrosylation of the virulence regulator AphB promotes *Vibrio cholerae* pathogenesis[J]. PLoS Pathog., 2022, 18(6): e1010581.
- [15] MINODA A, WEBER A P, TANAKA K, et al. Nucleus-independent control of the rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*[J]. Plant Physiol, 2010, 154(3): 1532–1540.
- [16] JØRGENSEN C, DANDANELL G. Isolation and characterization of mutations in the *Escherichia coli* regulatory protein XapR[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(14): 4397–4403.
- [17] JØRGENSEN C, DANDANELL G. Isolation and characterization of mutations in the *Escherichia coli* regulatory protein XapR[J]. J Bacteriol., 1999, 181(14): 4397–403.
- [18] HANSEN M R, TRANEKJAER J J, DANDANELL G. Xanthosine utilization in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is recovered by a single aspartate-to-glycine substitution in xanthosine phosphorylase[J]. J Bacteriol., 2006, 188(11):4153–4157.
- [19] ZHU F J, YANG Z Y, ZHANG Y L, et al. Transcriptome differences between enrofloxacin-resistant and enrofloxacin-susceptible strains of *Aeromonas hydrophila*[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0179549.
- [20] NIE D, HU Y, CHEN Z, et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection[J]. J Biomed Sci., 2020, 27(1):26.
- [21] ROSAS N C, LITHGOW T. Targeting bacterial outer-membrane remodelling to impact antimicrobial drug resistance[J]. Trends Microbiol., 2022, 30(6):544–552.
- [22] LI W X, ZHAO Y Y, YU J, et al. TonB-dependent receptors affect the *Spontaneous* oxytetracycline resistance evolution in *Aeromonas hydrophila*[J]. J Proteome Res., 2021, 20(1):154–163.
- [23] DONG Y H, LI Q, GENG J Z, et al. The TonB system in *Aeromonas hydrophila* NJ-35 is essential for MacA2B2 efflux pump-mediated macrolide resistance[J]. Vet Res., 2021, 52(1): 63.