

## 水产品腐败希瓦氏菌 CsrA 蛋白序列特征及应激响应的 基因表达分析

李秋莹<sup>1,2</sup>, 周文萱<sup>1,2</sup>, 崔方超<sup>1,2</sup>, 檀茜倩<sup>1,2</sup>, 孙彤<sup>1,2</sup>, 励建荣<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

**摘要** 目的:探究水产品腐败希瓦氏菌中重要转录后调控蛋白 CsrA 的序列特征及基因表达模式。方法:克隆腐败希瓦氏菌 *csrA* 基因,采用生物信息学手段分析 CsrA 结构及蛋白互作网络等,利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *csrA* 对冷热、高盐、饥饿、乙醇和群体感应信号分子的应激响应表达特性。结果:CsrA 为高度保守的亲水蛋白,含 9 个磷酸化位点,含 1 个  $\alpha$ -螺旋和 5 个  $\beta$ -折叠,活性结构以二聚体形式存在,预测其互作蛋白涉及参与蛋白合成、鞭毛组装与运动、生物膜形成及群体感应调控等。4℃培养 5 h 显著诱导 *csrA* 基因的表达,而 45℃培养 1 h 会立即诱导 *csrA* 基因的表达;高盐浓度能显著诱导 *csrA* 基因的表达;*csrA* 基因在营养缺失培养基中的表达均呈逐渐升高趋势,5 h 时显著高于对照组;5%乙醇处理组 *csrA* 基因表达量持续上调而 10%乙醇会使 *csrA* 表达水平下降;群体感应信号分子可诱导 *csrA* 基因表达上调。结论:CsrA 与腐败希瓦氏菌致腐密切相关,在其应对不同环境条件时发挥重要作用,研究结果可为进一步解析 CsrA 的生物学功能提供参考。

**关键词** 腐败希瓦氏菌; CsrA; 基因表达; 互作蛋白; 应激

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0050-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.006

海水鱼肉质鲜美,营养丰富,是深受消费者喜爱的健康美食。然而,在微生物及内源性酶的作用下极易引起鱼肉蛋白质分解、脂肪氧化及酶促反应等问题,最终造成鱼肉的腐败变质<sup>[1]</sup>。腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)是冷藏海水鱼中常见的特定腐败菌,对鱼肉的致腐性强,可将氧化三甲胺还原为三甲胺,同时生成硫化氢、甲基硫烷和二甲硫等生物胺,产生恶臭的鱼腥味<sup>[2]</sup>。开展腐败希瓦氏菌生长致腐的分子机制研究有助于该腐败菌的靶向控制。近年来,已鉴定出调节因子 RpoS 参与希瓦氏菌应激抗性应答;RpoN 因子协调鞭毛组装、参与氮和氨基酸代谢,可利用群体感应信号分子 AHLs 介导生物膜的形成<sup>[3-4]</sup>;Hfq 参与希瓦氏菌致腐相关代谢活动<sup>[5]</sup>。

CsrA,又被称为全局调控因子,是革兰氏阴性细菌生长和代谢的重要调节因子。CsrA 可与

mRNA 中保守的 GGA 碱基部位结合调节翻译、RNA 稳定性及转录的延伸,进而扩大对细胞生理的影响,表现在参与碳代谢、群体感应、生物膜形成、运动性及致病性等各项生命活动中<sup>[6]</sup>。研究表明 CsrA 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中是高度丰富的分子<sup>[7]</sup>;CsrA 的细胞水平在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的生长稳定期增加了 3 倍<sup>[8]</sup>;在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中,CsrA 与多个编码调控蛋白的 mRNA 结合,并正向调控毒力调节因子 *aphA* 的产生<sup>[9]</sup>;在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中,CsrA 协同 sRNA (SR1)和 *ahrC* mRNA 结合,调节精氨酸的分解代谢<sup>[10]</sup>,展现了 CsrA 参与的调控系统的复杂多样。然而,作为重要调控因子,CsrA 在腐败希瓦氏菌中的生物学功能尚不清楚。

本文克隆了腐败希瓦氏菌 SP22 株 *csrA* 基因,采用生物信息学手段分析 CsrA 蛋白性质、序列及结构特征、蛋白互作网络等,利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *csrA* 对冷热、高盐、饥饿、消毒剂 and 群体感应信号分子的应激响应的表达特性,旨在初步探究 CsrA 在腐败希瓦氏菌中的表达模式,

收稿日期: 2022-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202141);辽宁省自然科学基金项目(2020-MS-288)

第一作者: 李秋莹,女,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lij6491@163.com

为进一步解析其生物学功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

LB 营养肉汤购于青岛海博生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、GeneRed 核酸染料购于天根生化科技(北京)有限公司; 2×Easy-Taq PCR SuperMix、DNA Marker 购于北京全式金生物技术有限公司; EZ-10 总 RNA 小量提取试剂盒、RNase-Free DNA 清除试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)、2×SYBR Green Abstar PCR Mix 购于宝生物工程(大连)有限公司。腐败希瓦氏菌 SP22 株分离于腐败的大菱鲆, 保藏于本实验室的-80 °C 冰箱。

### 1.2 仪器及设备

Applied Biosystems StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪、Legend Micro21R 微量冷冻离心机、NanoDrop One 超微量紫外-可见光分光光度计, 美国 Thermo 公司; 防蒸发梯度 PCR 仪, 美国 Eppendorf 公司; Ge1Doc XR+ 全自动凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 全局调控因子 CsrA 序列特征与功能预测

1.3.1 *csrA* 基因的克隆 基于 NCBI 数据库中检索到的腐败希瓦氏菌基因组序列 (GenBank ID: CP028435.1), 设计 *csrA* 基因的引物(上游引物: CATTACCAAGCCTTGTTAGC; 下游引物: ACTCTTCTGTCCGGTAA)。将腐败希瓦氏菌 SP22 株活化后接种至 LB 营养肉汤培养基, 于 28 °C 振荡培养至对数期。根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作方法提取基因组 DNA。PCR 扩增程序设置为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 终延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后移交至上海生工生物有限公司测序。得到的双向测序结果使用软件 DNAMAN 进行拼接后, 提交至 Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对, 获得 *csrA* 基因序列。序列经 Genomatix: DNA Sequence Toolbox (<https://www.genomatix.de/cgi-bin/tools/tools.pl>) 的 Create sequence statistics 工具统计 *csrA* 基因的 GC 含量。

1.3.2 CsrA 的序列保守性分析 在 NCBI 数据库下载腐败希瓦氏菌 WS13、奥奈达希瓦氏菌 (*S. oneidensis*) MR-1、波罗的海希瓦氏菌 (*S. baltica*) OS678、大肠杆菌的 CsrA 蛋白氨基酸序列。将腐败希瓦氏菌 SP22 同以上菌株的 CsrA 蛋白氨基酸序列使用软件 MEGAX 的 Muscle 算法进行比对。

1.3.3 CsrA 蛋白理化性质预测 在服务器 ExPASy 中的 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 中输入腐败希瓦氏菌蛋白 CsrA 的序列, 计算各项理化参数, 分析其理化性质。利用 ProtScale 工具 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析其亲疏水性。利用在线服务器 NetPhos 3.1 预测蛋白的磷酸化位点。

1.3.4 CsrA 蛋白的结构及互作蛋白预测 将 CsrA 氨基酸序列输入到在线工具 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 中, 预测该蛋白结构域。使用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 分析蛋白的二级结构。运用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 模拟其蛋白三级结构并进行模型质量评估 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), 然后使用 Discovery Studio 预测 CsrA 蛋白活性结合位点。用 STRING (<https://string-db.org/>) 预测与 CsrA 蛋白存在相互作用的蛋白。

### 1.4 全局性调控因子 CsrA 在不同环境应激响应下的基因表达分析

1.4.1 细菌的培养 将过夜活化的腐败希瓦氏菌以 2% 接种量接种于新鲜的 LB 肉汤培养基中, 在 28 °C、160 r/min 的摇床中培养至对数生长期(约 6 h)。

1.4.2 温度胁迫 将 1.4.1 节培养的腐败希瓦氏菌分别置于 28、4 °C 和 45 °C 培养箱中静置培养 1、3、5 h, 以 1.4.1 节培养的腐败希瓦氏菌(记为 0 h) 为对照, 收集菌体备用。

1.4.3 营养胁迫 使用无菌水将 1.4.1 节培养腐败希瓦氏菌的 LB 肉汤培养基稀释, 使最终培养基体积分数分别为 100%、75%、65% 和 50%, 继续置于 28 °C 振荡培养 1、3、5 h, 以 1.4.1 节培养的腐败希瓦氏菌(记为 0 h) 为对照, 收集菌体备用。

1.4.4 消毒剂胁迫 将无水乙醇添加至 1.4.1 节培养腐败希瓦氏菌的培养基中, 使得乙醇体积分

数为0%,5%和10%,继续置于28℃振荡培养1,3,5 h,以1.4.1节培养的腐败希瓦氏菌(记为0 h)为对照,收集菌体备用。

1.4.5 渗透压胁迫 将NaCl添加至1.4.1节培养腐败希瓦氏菌的培养基中,使得NaCl质量浓度为0.05,0.1 g/mL和0.15 g/mL,与未额外添加NaCl的腐败希瓦氏菌悬液共同置于28℃振荡培养1,3,5 h,以1.4.1节培养的腐败希瓦氏菌(记为0 h)为对照,收集菌体备用。

1.4.6 群体感应信号分子诱导 分别添加10 μmol/L的C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL和C<sub>14</sub>-HSL信号分子至1.4.1节培养腐败希瓦氏菌的培养基中,与未添加信号分子的腐败希瓦氏菌悬液共同置于28℃振荡培养1,3,5 h,并以1.4.1节培养的腐败希瓦氏菌(记为0 h)为对照,收集菌体备用。

1.4.7 细菌总RNA的提取与反转录反应 采用EZ-10总RNA小量提取试剂盒提取腐败希瓦氏菌总RNA,并组合使用RNase-Free DNA清除试剂盒以去除基因组中的DNA。采用琼脂糖凝胶电泳及微量紫外-可见分光光度计,检测RNA质量和浓度。按照试剂盒PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time)的操作步骤,进行反转录反应。反应程序:37℃反应15 min,85℃反应5 s,4℃预冷。

1.4.8 实时荧光定量PCR 以16S rRNA为内参基因(上游引物:GGAGGAAGGTGGGACG;下游

引物:GACTACGACGAGCTTTGTGAGATTA),*csrA*为目的基因(上游引物:GTTGGCCAAACACTGATGATTGGTG;下游引物:AACACCGATACGCACCTGATTTCC),以1.4.7节得到的cDNA为模板,使用2×SYBR Green Abstart PCR Mix试剂盒进行实时荧光定量PCR反应。反应程序设定为:95℃预变30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,循环40次,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行基因相对表达量分析。

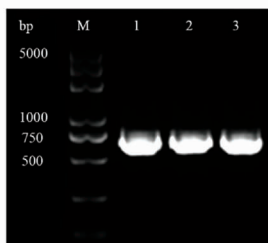
1.4.9 数据分析 每组试验均进行3次重复,采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计算分析获得数据的平均值和标准偏差,当P<0.05数值具有显著性差异。另外,采用Origin 9图像分析软件生成所需图表。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CsrA蛋白的序列特征分析

#### 2.1.1 CsrA蛋白序列保守性及理化性质分析

PCR扩增产物的凝胶电泳结果如图1a所示,该片段长度在500~750 bp之间。测序结果经DNAMAN软件上拼接和BLAST后,获得*csrA*基因序列,其大小为198 bp,GC含量为43.94%,编码65个氨基酸。序列比对结果如图1b所示,SP22同希瓦氏菌属其它3株菌的序列一致性为100%,与大肠杆菌(*E. coli*)序列一致性为94.92%,表明CsrA在腐败希瓦氏菌长期进化过程中具有高度保守性,并且在不同物种之间同源性较高。



(a)腐败希瓦氏菌 *csrA* 基因 PCR 扩增产物



(b)CsrA 氨基酸序列比对

注:M. DNA maker;1~3. 目的基因 *csrA*。

图1 腐败希瓦氏菌 *csrA* 基因 PCR 扩增产物(a)和 CsrA 氨基酸序列比对(b)

Fig.1 PCR amplification products of *csrA* gene of *Shewanella putrefaciens* (a) and amino acid sequence alignment of CsrA (b)

蛋白的理化性质是其功能研究的基础。表1为腐败希瓦氏菌 CsrA 蛋白理化性质的基本信息。

CsrA 蛋白的理论等电点为6.56,接近于中性;脂肪族指数较高推测 CsrA 具有一定的耐热性<sup>[11]</sup>;

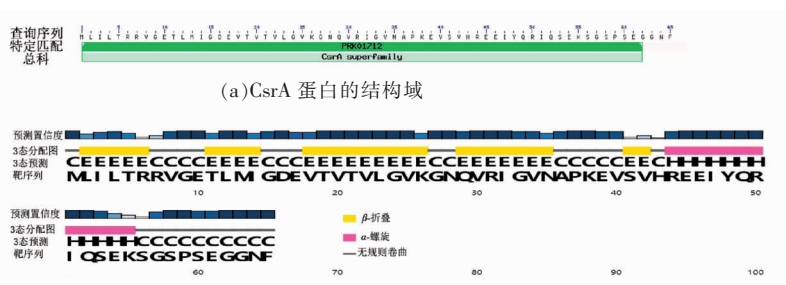
CsrA 蛋白不稳定指数为 42.80,该指数小于 40 时定义为稳定蛋白,故可推断为轻度不稳定蛋白<sup>[12]</sup>。该蛋白为亲水性蛋白,在第 52 位氨基酸位点处是亲水性最强位点,39~61 区域内的氨基酸是明显的亲水性区域。蛋白质磷酸化是其翻译后修饰的重要方式之一,氨基酸残基的化学修饰可以改变蛋白质的活性<sup>[13]</sup>。分析 CsrA 共有 9 个超过阈值的磷酸化位点,其中包含 5 个丝氨酸(Serine)位点,3 个苏氨酸(Threonine)位点,1 个酪氨酸(Tyrosine)位点。

2.1.2 CsrA 蛋白的结构分析 腐败希瓦氏菌 CsrA 蛋白的结构域分析结果如图 2a 所示,CsrA 隶属于全局调节蛋白超家族,该家族蛋白是相当保守性的二聚体 RNA 结合蛋白,可以和 mRNA 结合后发生丰富的相互作用:直接或间接的抑制 mRNA 的翻译;间接控制 mRNA 的稳定性;间接控制转录终止<sup>[14]</sup>。CsrA 的二级结构含 1 个  $\alpha$ -螺旋和 5 个  $\beta$ -折叠,其中, $\beta$ -折叠占 41.5%, $\alpha$ -螺旋结构

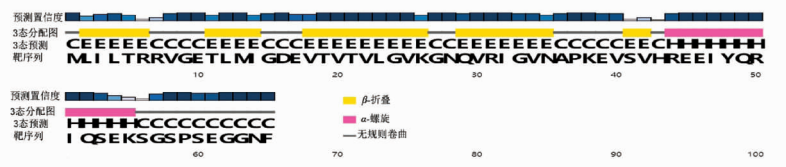
表 1 CsrA 蛋白理化性质

理化性质	CsrA
分子式	C <sub>307</sub> H <sub>513</sub> N <sub>91</sub> O <sub>98</sub> S <sub>2</sub>
分子质量/u	7 111.12
脂肪族指数	95.69
不稳定指数	42.80
半衰期(大肠杆菌中)/h	>10
总平均亲水性	-0.262
氨基酸数量	65
等电点	6.56
带正电荷氨基酸/%	12.3
带负电荷氨基酸/%	12.3

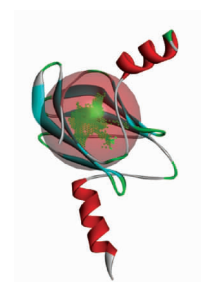
占全序列 18.5%,无规则卷曲占 40.0%(图 2b)。SWISSMODEL 服务器中具有 20 个 CsrA 蛋白同源建模的模板,选取其中质量评估得分最高且序列相似度为 93.33%的 2bti.1.A 模板预测 CsrA 三级结构(图 2c)。PROCHECK 以着重分析氨基酸



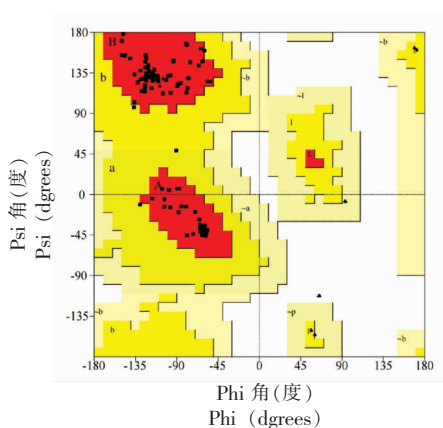
(a)CsrA 蛋白的结构域



(b)CsrA 蛋白的二级结构



(c)CsrA 蛋白的三级模型及活性位点



(d)CsrA 蛋白的拉氏构象图

图 2 CsrA 蛋白的结构域(a)、二级结构(b)、三级模型及活性位点(c)及拉氏构象图(d)  
Fig.2 Structural domain (a), secondary structure (b), tertiary model and active site (c),  
Ramachandran diagram (d) of CsrA protein

C $\alpha$  原子的扭转角度来评估蛋白质模型<sup>[15]</sup>。如图 3d 所示, PROCHECK 检验 96.9% 的氨基酸残基落在了最有利区域, 表明以 2bti.1.A 模板预测的 CsrA 同源蛋白模型具有良好质量, 可以反映出腐败希瓦氏菌中全局调控因子 CsrA 的立体构象。利用 Discovery Studio 预测 CsrA 蛋白三级模型的活性位点, 结果如图 2c 所示, CsrA 蛋白的活性结构形式是以二聚体结构形式存在的<sup>[14]</sup>。

**2.1.3 CsrA 的蛋白互作网络** 采用 STRING 共预测到 10 个 CsrA 的互作蛋白, 互作网络如图 3 所示。其中, RNA 伴侣分子(Hfq)、RNA 聚合酶 sigma 因子(RpoS)、RNA 聚合酶 sigma 因子(FliA)、整合宿主因子亚基(IhfA)及 LuxR 家族双组份转录调控因子(ABP75364.1)均是细菌生命活动中重要的调控因子; 16S rRNA 小亚基甲基转移酶 A (RsmA)与丙酰胺-tRNA 合成酶(AlaS)在细菌蛋白质合成中具有重要作用, 其中 RsmA 涉及核糖体小亚基组装和 rRNA 的甲基化<sup>[16]</sup>, 而 Alas 参与氨基酸转运<sup>[17]</sup>; 组氨酸激酶(ABP76854.1)是细菌双组份信号传导系统的成员之一, 而 CheA 信号传导组氨酸激酶(ABP76277.1)是一类趋化受体, 可能参与鞭毛的运动<sup>[18-19]</sup>。在这些调控因子中, FliA 是细菌鞭毛组装的核心调节因子, 对细菌的运动和生物被膜形成至关重要<sup>[20]</sup>; LuxR 是细菌群体感应调控中的重要组分, 因此, LuxR 家族双组份转录调控因子与群体感应调控有关<sup>[21]</sup>; RpoS 蛋白在波罗的海希瓦氏菌(*S. baltica*)中影响生物被膜、胁迫性和致病能力, 在荧光假单胞菌中还参与调控群体感应系统<sup>[4, 22]</sup>; Hfq 是细菌转录后调控因子, 不仅影响 sRNA 和靶 mRNA 结合效率, 还发挥调控 RNA 稳定性和翻译的作用, 在希瓦氏菌中参与致病和群体感应相关通路的调控<sup>[5, 23]</sup>。综上所述, CsrA 的互作蛋白分别参与蛋白质合成、鞭毛组装与运动、生物膜形成及群体感应系统调控等, 这些均与细菌的致病能力密切相关, 因此推测 CsrA 与其它关键调控蛋白协同参与调控腐败希瓦氏菌致病能力。

## 2.2 *csrA* 在不同环境应激响应下的基因表达分析

**2.2.1 *csrA* 基因在不同温度下的表达特性分析** 食品腐败菌在食品贮藏及加工环境中经常面对温度的变化。为分析 *csrA* 在腐败希瓦氏菌应对冷、

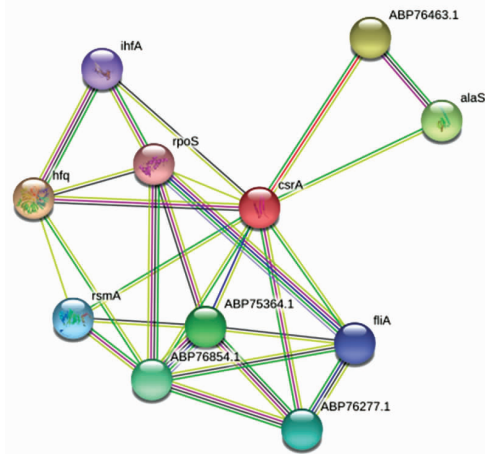
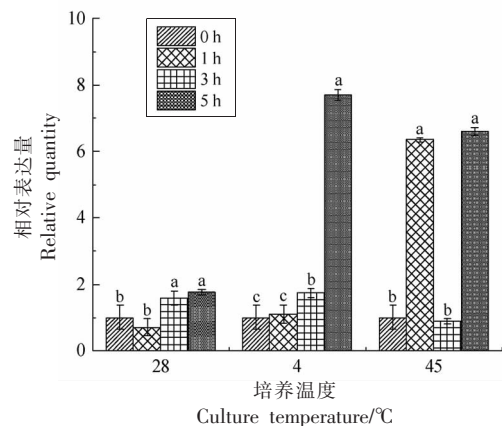


图 3 CsrA 的蛋白互作网络

Fig.3 The protein interaction network of CsrA

热胁迫时的应激响应, 对该基因在不同温度下的表达水平进行测定。结果如图 4 所示, 4℃培养条件下, 0~3 h, *csrA* 基因的表达量呈逐渐升高趋势。然而, 在 5 h 时, *csrA* 基因的表达量显著增加, 约是 3 h 的 4 倍, 对照组 5 h 的 4 倍。然而, 在高温环境下, *csrA* 基因在 1 h 表达量即显著增加, 立即做出应激响应, 是对照组 1 h 的 5 倍。*csrA* 基因在低温培养初期表达量并未立即增加, 这可能由于腐败希瓦氏菌作为耐冷菌, 在转入低温培养初期, 首先要以启动耐冷调节机制来维持细胞的代谢活动为主, 例如表达受低温诱导的冷激蛋白以及脂肪酸合成相关基因<sup>[24-25]</sup>。在度过初期的生长阻滞后,



注: 不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图 4 *csrA* 基因在不同温度下的表达量变化

Fig.4 Changes of *csrA* gene expression at different temperatures

作为参与转录后调控的 *csrA* 基因大量表达,参与调控腐败希瓦氏菌在低温下生命活动。研究发现,CsrA 对鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 在低温下的生长能力的具有重要影响<sup>[26]</sup>。杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyicr*) 的 *csrA* 突变后,其耐受热休克的能力显著降低<sup>[27]</sup>。*csrA* 基因受高温诱导表达,表明其在腐败希瓦氏菌耐热调控中具有重要作用。

### 2.2.2 *csrA* 基因在饥饿胁迫下的表达特性分析

通过稀释培养基来测定腐败希瓦氏菌遭受饥饿时 *csrA* 基因应激表达情况。如图 5 所示,*csrA* 基因在 LB 培养基中和营养缺失培养基中的表达均呈逐渐升高趋势。与 LB 培养基培养相比,*csrA* 基因在 75%、65% 和 50% 稀释培养基中培养至 5 h 时表达水平分别上调了 10、2 倍和 1.5 倍。由于 65% 和 50% 稀释培养基提供营养成分过少,可能严重影响细菌整体生长,进而 *csrA* 基因表达水平较 75% 稀释培养基低。5 h *csrA* 基因表达量更旺盛,这可能由于培养至对数期的腐败希瓦氏菌继续培养 5 h,此时菌体进入生长的稳定期,该时期营养物消耗更加严重,表明 CsrA 在腐败希瓦氏菌应对饥饿时发挥重要的调控作用。已发现在大肠杆菌中,CsrA 的表达会减少糖原的生物合成,促进碳饥饿

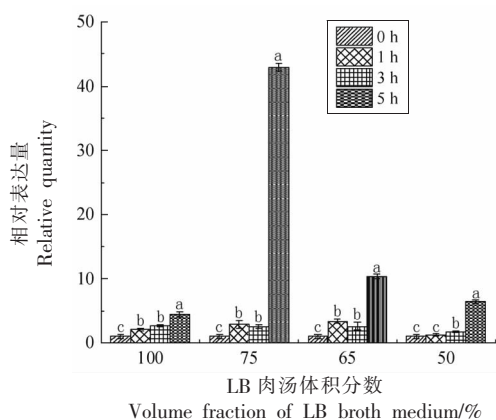


图 5 *csrA* 基因在饥饿胁迫下表达量变化

Fig.5 Changes of *csrA* gene expression levels in hunger stress

2.2.4 *csrA* 基因消毒剂胁迫刺激应激表达 将乙醇作为消毒剂,分析腐败希瓦氏菌 *csrA* 基因在其消毒剂耐受中的表达情况,结果如图 7 所示。5% 乙醇处理组 *csrA* 基因的表达量在 0~5 h 的培养过

基因的翻译,对大肠杆菌从环境捕获营养物质发挥重要作用<sup>[28]</sup>。菌体需要依靠鞭毛的摆动在液体环境中运动以获取营养因子,在 STRING 分析中发现 CsrA 的互作蛋白包括与调控鞭毛元件组装的 FliA 蛋白和参与鞭毛运动的 CheA 信号传导组氨酸激酶,推测 CsrA 也可能通过影响鞭毛组装及运动进而参与腐败希瓦氏菌抵抗饥饿胁迫。

### 2.2.3 *csrA* 基因在高渗透压胁迫下的表达特性分析

盐胁迫对 *csrA* 基因的表达的影响如图 6 所示。与对照组相比,0.05、0.1 g/mL 质量浓度的 NaCl 未显著诱导 *csrA* 基因表达上调。然而,0.15 g/mL 质量浓度的 NaCl 处理,在培养 1~5 h 时 *csrA* 基因表达较对照组、0.05 g/mL 和 0.1 g/mL 处理组显著升高,表明 *csrA* 基因在腐败希瓦氏菌耐高渗胁迫时发挥重要作用。CsrA 可能会影响某种信号通路,协调细菌对渗透压信号的反应。研究发现,*csrA* 基因的缺失会导致小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 在高 NaCl 质量浓度培养基中生长能力衰减,表明 CsrA 影响细菌对环境渗透压的反应<sup>[29]</sup>。此外,高渗透压会破坏生物体的细胞膜,研究表明 CsrA 参与调控了维持细胞膜完整性的基因而抵抗外界损害<sup>[28]</sup>。

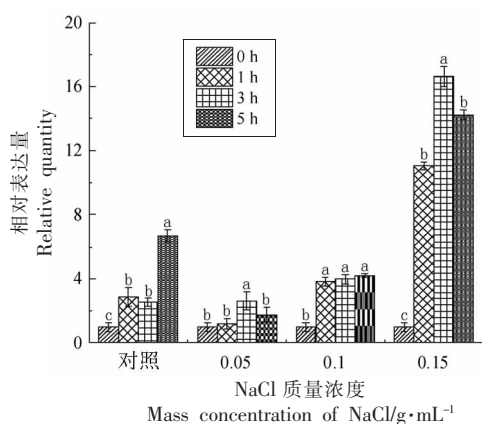


图 6 *csrA* 基因在渗透压胁迫刺激下的表达量变化

Fig.6 *csrA* gene expression changes under osmotic stress stimulation

程中呈显著升高趋势,且相较于对照组显著上调,特别在 5 h 时上调了约 3 倍,表明 *csrA* 基因对乙醇胁迫有显著地正向响应。乙醇的添加可能影响细菌蛋白质及细胞膜完整性。5%乙醇显著诱导了

*csrA* 基因表达,可能与 CsrA 调控维持细胞膜完整性的基因来重组细胞膜应对外界压力有关<sup>[28]</sup>;10%乙醇条件下,*csrA* 基因的表达量呈先上升后下降的趋势,且在处理 3 h 后与对照组相比显著下调,这可能是随着培养时间延长,乙醇对细菌细胞影响加大进而无法诱导 *csrA* 上调表达。

2.2.5 *csrA* 基因响应不同群体感应信号分子的表达特性分析 *N*-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)是研究最广泛的细菌群体感应信号分子<sup>[30]</sup>。研究发现腐败希瓦氏菌虽极少产生 AHLs,但可以利用环境中的 AHLs,其 AHLs 受体基因 *luxR* 会受 C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL 和 C<sub>14</sub>-HSL 信号分子诱导表达<sup>[21,31]</sup>。已报道,CsrA 在其它细菌中参与群体感应现象<sup>[8,32]</sup>,因此本文分析不同信号分子处理对 *csrA* 基因的表

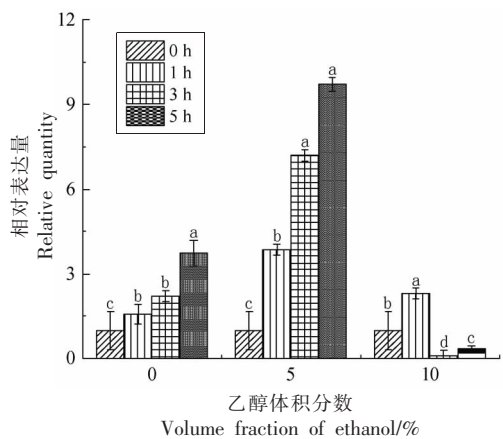


图7 *csrA* 基因在乙醇刺激下的表达量变化

Fig.7 Changes of *csrA* gene expression levels under ethanol stimulation

### 3 结论

腐败希瓦氏菌 CsrA 蛋白在进化过程中高度保守,为亲水性蛋白,分子质量 7 111.12 u;二级结构包含 1 个  $\alpha$ -螺旋和 5 个  $\beta$ -折叠,以同源二聚体结构发挥其生物活性,其活性位点的预测可以为该蛋白活性的靶向抑制提供参考。腐败希瓦氏菌 CsrA 的蛋白互作网络中包含了涉及蛋白质合成、鞭毛组装与运动、生物膜形成及群体感应系统调控等方面与调控腐败希瓦氏菌致腐能力有关的多种调控因子和酶。腐败希瓦氏菌在冷热、高盐、饥饿、消毒剂 and 群体感应信号分子等条件下,*csrA* 基因参与应激响应,不同条件下的表达量和表达

达的影响,结果如图 8 所示。在 C<sub>6</sub>-HSL 的诱导下,*csrA* 基因表达量逐渐升高;在 C<sub>12</sub>-HSL 和 C<sub>14</sub>-HSL 诱导下,*csrA* 表达量呈先上升后下降的趋势。与对照组相比,C<sub>6</sub>-HSL 处理 3 h 和 5 h,*csrA* 基因表达量约是对照组的 2 倍;C<sub>12</sub>-HSL 处理 1 h 和 3 h,*csrA* 基因表达量约是对照组的 2 倍。*csrA* 基因对不同群体感应信号分子的表达响应差异可能与腐败希瓦氏菌对不同信号分子的利用程度不同有关。前面 STINNG 分析也预测到 CsrA 的互作蛋白包括 LuxR 家族转录因子,而 AHLs 依赖于 LuxI/LuxR 信号反应分泌系统<sup>[30]</sup>。因此,可以推测 CsrA 在腐败希瓦氏菌利用群体感应信号分子的过程中发挥重要作用。

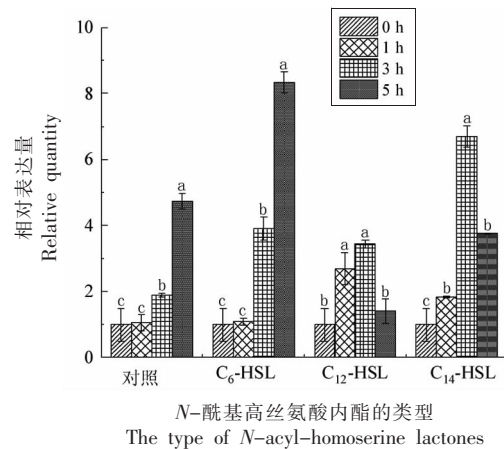


图8 *csrA* 基因在不同信号分子刺激下的表达量变化

Fig.8 *csrA* gene expression changes under different signal molecules stimulation

模式不同,表明 *csrA* 基因的表达在腐败希瓦氏菌应对不同环境条件时发挥重要作用。本研究为进一步解析腐败希瓦氏菌在应激条件下的抗性机制及致腐机制提供了参考依据。

### 参考文献

- [1] SOCACIU M I, SEMENIUC C, VODNAR D. Edible films and coatings for fresh fish packaging: Focus on quality changes and shelf-life extension[J]. Coatings, 2018, 8(10): 366.
- [2] AUAWITHOOTHIJ W, NOOMHORM A. *Shewanella putrefaciens*, a major microbial species related to

- tetrodotoxin(TTX) - accumulation of puffer fish *Lagocephalus lunaris*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(2): 459-465.
- [3] ZHANG C, WANG C, JATT A N, et al. Role of RpoS in stress resistance, biofilm formation and quorum sensing of *Shewanella baltica* [J]. Lett Appl Microbiol, 2021, 72(3): 307-315.
- [4] FENG L F, BI W W, CHEN S, et al. Regulatory function of sigma factors RpoS/RpoN in adaptation and spoilage potential of *Shewanella baltica*[J]. Food Microbiology, 2021, 97: 103755.
- [5] 江京洋, 韦旭航, 朱军莉, 等. 大黄鱼来源波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株的 *hfq* 基因功能分析[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 135-141.
- JIANG J Y, WEI X H, ZHU J L, et al. The function of *hfq* gene in *Shewanella baltica* SB-19 strain isolated from large yellow croaker[J]. Food Science, 2022, 43(8): 135-141.
- [6] POURCIAU C, LAI Y J, GORELIK M, et al. Diverse mechanisms and circuitry for global regulation by the RNA-binding protein CsrA[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 601352.
- [7] ISHIHAMA Y, SCHMIDT T, RAPPILBER J, et al. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol[J]. BMC, 2008, 9(1): 102.
- [8] PESS G, WILLIAMS F, HINDLE Z, et al. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Bacteriol, 2001, 183(22): 6676-6683.
- [9] BUTZ H A, MEY A R, CIOSEK A L, et al. Regulatory effects of CsrA in *Vibrio cholerae*[J]. mBio, 2021, 12(1): e03380-20.
- [10] MÜLLER P, GIMPEL M, WILDENHAIN T, et al. A new role for CsrA: Promotion of complex formation between an sRNA and its mRNA target in *Bacillus subtilis* [J]. RNA Biology, 2019, 16(7): 972-987.
- [11] VERMA A, SINGH V K, GAUR S. Computational based functional analysis of *Bacillus phytases* [J]. Computational Biology and Chemistry, 2016, 60: 53-58.
- [12] PRAMANIK K, SOREN T, MITRA S, et al. *In silico* structural and functional analysis of *Mesorhizobium* ACC deaminase[J]. Computational Biology & Chemistry, 2017, 68: 12-21.
- [13] 周俊朝. 杨树蛋白质二级结构和磷酸化位点预测[D]. 郑州: 河南农业大学, 2020.
- ZHOU J Z. Poplar protein secondary structure and phosphorylation sites prediction[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural Nongye University, 2020.
- [14] SOBRERO P M, VALVERDE C. Comparative genomics and evolutionary analysis of RNA-binding proteins of the CsrA family in the genus *Pseudomonas*[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2020, 7: 127.
- [15] PATRA P, MONDAL N, PATRA B C, et al. Epitope-based vaccine designing of *Nocardia Asteroides* targeting the virulence factor mce-family protein by immunoinformatics approach[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(2): 1165-1176.
- [16] LIU Y, ZHU Y, TENG M, et al. Crystallographic analysis of RsmA, a ribosomal RNA small subunit methyltransferase A from *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Crystallographica, 2015, 71(Pt 8): 1540.
- [17] KELLY P, KAVOOR A, IBBA M. Fine-tuning of alanyl-tRNA synthetase quality control alleviates global dysregulation of the proteome[J]. Genes, 2020, 11(10): 122.
- [18] ZU Y, LI W, WANG Q, et al. ComDE two-component signal transduction systems in oral *Streptococci*: Structure and function[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2019, 32(1): 201-258.
- [19] FRUTOS-GRILLO E, MARSAL M, IRAZOKI O, et al. The interaction of RecA with both CheA and CheW is required for chemotaxis[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 583.
- [20] LO Y L, CHEN C L, SHEN L, et al. Characterization of the role of global regulator FliA in the pathophysiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. Research in Microbiology, 2018, 169(3): 135-144.
- [21] 韩云燕, 李渐鹏, 于红雷, 等. *luxR* 基因对希瓦氏菌群体感应特性的影响研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 27-32.
- HAN Y Y, LI J P, YU H L, et al. Effect of *luxR* gene on the quorum-sensing characteristics of *Shewanella baltica* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(3): 27-32.
- [22] 毕伟伟. RpoS/RpoN 蛋白对两种鱼源致腐菌调控作用探究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.



- BI W W. Regulation of RpoS/RpoN protein in *Shewanella* and *Pseudomonas* isolated from the fish[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [23] DOS SANTOS R F, ARRAIANO C M, ANDRADE J M. New molecular interactions broaden the functions of the RNA chaperone Hfq[J]. *Current Genetics*, 2012, 65(6): 1313–1319.
- [24] 李秋莹, 徐瑾秀, 朱金帅, 等. 水产品腐败希瓦氏菌冷激蛋白的结构与功能分析[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 19–27.
- LI Q Y, XU J X, ZHU J S, et al. Structural and functional analysis of cold shock protein in *Shewanella putrefaciens* from aquatic products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 19–27.
- [25] 杨胜平, 章缜, 程颖, 等. 培养温度对腐败希瓦氏菌 DSM6067 生长动力学及细胞膜理化特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 228–236.
- YANG S P, ZHANG Z, CHENG Y, et al. Effects of culture temperature on the growth parameters of *Shewanella putrefaciens* DSM6067 and its membrane physico-chemical properties[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(2): 228–236.
- [26] KNUDSEN G M, NIELSEN M B, THOMSEN L E, et al. The role of ClpP, RpoS and CsrA in growth and filament formation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at low temperature[J]. *Bmc Microbiology*, 2014, 14(1): 208.
- [27] GANGAIAH D, LI W, FORTNEY K R, et al. Carbon storage regulator a contributes to the virulence of *Haemophilus ducreyi* in humans by multiple mechanisms[J]. *Infection & Immunity*, 2013, 81(2): 608–617.
- [28] POTTS A H, VAKULSKAS C A, PANNURI A, et al. Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1596.
- [29] LEGRAND K, PETERSEN S, ZHENG Y, et al. CsrA impacts survival of *Yersinia enterocolitica* by affecting a myriad of physiological activities[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 31.
- [30] ZHANG C, ZHU S, JATT A N, et al. Proteomic assessment of the role of *N*-acyl homoserine lactone in *Shewanella putrefaciens* spoilage[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65(5): 388–394.
- [31] ZHU S Q, WU H H, ZENG M Y, et al. The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 192: 26–33.
- [32] COCOTL-YANEZ M, SOTO-ACEVES M P, GONZALEZ-VALDEZ A, et al. Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in lasR[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(12): fnaa092.

### Protein Sequence Characteristics and Gene Expression Analysis of Stress Response of CsrA in *Shewanella putrefaciens* from Aquatic Products

Li Qiuying<sup>1,2</sup>, Zhou Wenxuan<sup>1,2</sup>, Cui Fangchao<sup>1,2</sup>, Tan Xiqian<sup>1,2</sup>, Sun Tong<sup>1,2</sup>, Li Jianrong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

**Abstract** Objective: The sequence characteristics and gene expression pattern of CsrA, an important post-transcriptional regulatory protein, in *Shewanella putrefaciens* from aquatic products were investigated in this study. Method: The *csrA* gene of *S. putrefaciens* was cloned, and the structural characteristics and interaction protein network of *CsrA* were analyzed by bioinformatics methods. Moreover, the expression characteristics of *csrA* gene in response to cold, heat, high salt, starvation, ethanol and quorum sensing signal molecules were analyzed by real-time PCR. Results: CsrA is a highly conserved hydrophilic protein with nine phosphorylation sites, consisting of two  $\alpha$ -helices and five  $\beta$ -sheet, and active structure exists as a dimer. CsrA was predicted to interact with proteins that involved in protein synthesis, flagellar assembly and movement, biofilm formation, and quorum sensing regulation. In addition, *csrA* gene expression was signifi-

cantly induced at 4 °C for 5 h, while immediately induced at 45 °C for 1 h. High salt concentration significantly induced *csrA* gene expression. The expression of *csrA* gene increased gradually in nutrient deficiency medium, which was significantly higher than that in the control group at 5 h. The expression of *csrA* gene was continuously up-regulated in the 5% ethanol group, while 10% ethanol reduced the expression of *csrA*. Quorum-sensing signal molecules induced the up-regulated expression of *csrA* gene. Therefore, CsrA is closely related to the spoilage caused by *S. putrefaciens* and plays an important role in its response to different environmental conditions, which can provide reference for further analysis of the biological function of *CsrA*.

**Keywords** *Shewanella putrefaciens*; CsrA; gene expression; interacting protein; stress