

TetR 转录因子 Ms2583 对分枝杆菌 异烟肼敏感性的影响

林 健 胡利华

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室/蛋白质组学平台(中心), 武汉 430070

摘要 转录因子在细菌适应胁迫环境中发挥重要作用,但是参与药物胁迫的转录因子还知之甚少。本研究以耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)为研究对象,通过在药物平板上筛选转录因子超表达文库,发现 MSMEG_2583(Ms2583)影响耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)对抗结核药物异烟肼(Isoniazid, INH)的敏感性。超表达 Ms2583 使耻垢分枝杆菌对 INH 的敏感性增强;基因保守结构域分析表明 Ms2583 编码一个 TetR 家族的转录调节蛋白;凝胶迁移率阻滞实验和细菌单杂交实验证明 Ms2583 能够与自身启动子特异结合。

关键词 耻垢分枝杆菌; TetR 家族转录因子; Ms2583; 敏感性; INH

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0054-07

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是一种典型的胞内致病菌,它感染引起的结核病严重危害人畜健康,威胁公共卫生安全。在过去的 200 年里,结核病已累计造成全世界约 10 亿人死亡。全球约有三分之一的人口感染过结核杆菌,每年 150 万人死于结核病^[1]。结核病难以预防和治疗的根本原因在于耐药和多重耐药结核分枝杆菌的出现^[2]。因此,寻找分枝杆菌的耐药性相关基因已成为结核病防治领域的首要问题。

转录因子在介导分枝杆菌耐药性中发挥着重要的调控作用^[3]。如 *gfcR* (Ms2173) 编码一个 GntR/FadR 家族的转录调节因子,调控着分枝杆菌对异烟肼的敏感性,超表达 Ms2173 使耻垢分枝杆菌对异烟肼(Isoniazid, INH)更敏感^[4]; Ms6508 是 MarR 家族的转录调节因子,调控着分枝杆菌对利福平(Rifampicin, RFP)的抗性,超表达 Ms6508 使耻垢分枝杆菌对利福平敏感性降低,表现出利福平抗性^[5]; *EthR* 编码 CamR 家族的转录因子,控制着分枝杆菌对乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)的抗性^[6-7]; TetR 家族的转录因子 Rv3066 影响了结核分枝杆菌对溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)的耐受性^[8]。可见,不同家族的转录因子几乎都参与了细菌对药物的耐受性,有些转录因子还参与了多药抗性,如 OmpR 家族的转录调节因

子 MtrA,影响了分枝杆菌对异烟肼、利福平和链霉素(Streptomycin, SM)3 种药物的耐受性^[9]; WhiB7 家族的转录调节因子 WhiB7,至少调控分枝杆菌对 4 种不同的抗生素如异烟肼、氯霉素(Chloromycetin)、红霉素(Erythromycin)和四环素(Tetracycline)的敏感性^[10]。TetR 家族是分枝杆菌中分布最广泛的转录因子,然而该家族大部分的功能还不是十分清楚,其中参与或直接介导药物耐受性的转录因子还知之甚少^[11]。

本研究以病原性结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的模式菌株耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)为研究对象,通过在药物平板上筛选耻垢分枝杆菌转录因子超表达文库,寻找与药物耐受性相关的转录因子,旨在为进一步研究该转录因子的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

耻垢分枝杆菌 mc²155 菌株、大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)和 XR 菌株以及表达载体 pET28a、单杂交载体 pBX 和 pTRG、分枝杆菌穿梭载体 pMV261 均为农业微生物学国家重点实验室蛋白质

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2016T90699)

林 健, 硕士研究生. 研究方向: 分子微生物学. E-mail: 1018856624@qq.com

通信作者: 胡利华, 博士, 工程师. 研究方向: 分子微生物学. E-mail: hulihua@mail.hzau.edu.cn

组学平台保存。本研究所使用的酶类以及相关试剂,包括 T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶、*rTaq* 聚合酶、DNA Marker、dNTP 等购自 TaKaRa 公司。本研究使用的质粒见表 1。

表 1 本研究使用的质粒

Table 1 The plasmids used in this study

质粒名称 Plasmid	抗性 Resistance	特征 Feature	来源 Source
pET28a-Ms2583	Kan	Ms2583 in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pET28a	本研究构建 This study
pBX-Ms2583p	Chlo	Ms2583p in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pBX	本研究构建 This study
pBX-Ms2476p	Chlo	Ms2476p in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pBX	本研究构建 This study
pBX-Rv2031p	Chlo	Rv2031p in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pBX	[12]
pTRG-Ms2583	Tet	Ms2583 in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pTRG	本研究构建 This study
pTRG-Rv3133c	Tet	Rv3133c in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pTRG	[12]
pMV261-Ms2583	Kan	Ms2583 in <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> sites of pMV261	本研究构建 This study

1.2 蛋白质的保守结构域和 3D 结构分析

使用 NCBI-CDD 工具分析蛋白质的保守结构域特征。使用 SWISS MODEL 工具分析蛋白质的 3D 结构。

1.3 目的基因的克隆、蛋白表达和纯化

以 *M. smegmatis* mc²155 基因组 DNA 为模板,以 Ms2583f (ATCAGAATTCATGCCACGC-CAACGCTCAC) 和 Ms2583r (ATAATCTAGAT-CAGATCTGGAGGCCCGC) 为特异性引物 PCR 扩增 Ms2583 基因片段,产物经琼脂糖凝胶电泳检测正确后,与表达载体 pET28a 分别进行 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切及酶连接反应,构建带 His 标签的重组蛋白表达质粒 pET-Ms2583。将重组质粒 pET-Ms2583 转化进入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 中,筛选正确的转化子,于 LB 培养液活化培养 (37 °C, 180 r/min) 至对数生长期 (OD₆₀₀ ≈ 1.2), 加入 1 mmol/L IPTG 诱导培养 (25 °C, 180 r/min) 4 h, 离心收集菌体。随后用 Binding buffer (0.5 mol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-base, pH 7.5) 重悬菌体,超声波破碎细胞,离心收集上清液。将离心收集的上清液流经 Ni²⁺ 亲和胶珠纯化柱, 0 ~ 100 mmol/L 咪唑梯度清洗杂蛋白, 250 mmol/L 咪唑洗脱并收集目标蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.4 凝胶迁移率阻滞实验

凝胶迁移率阻滞实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 具体步骤参考文献 [13] 进行。以 *M. smegmatis* mc²155 基因组 DNA 为模板,以 Ms2583p-f (CCGCCTGGCTGACGCAGCGA) 和 Ms2583p-r (GACGTTGACAGCGTACGCCG) 为特异性引物 PCR 扩增 Ms2583 上游 DNA 片段

Ms2583p。在 10 μL 体系中,将不同浓度的目标蛋白 Ms2583 (0 ~ 6 μmol/L) 与 5' 端 FITC 标记的 Ms2583p (10 ng) 和非标记的 Ms2583p 或 Ms2476p (20 ~ 100 ng) 于缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT 和 50 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中 4 °C 共孵育 30 min。随后样品经 4% 丙烯酰胺非变性凝胶电泳分离 (150 V, 1 ~ 2 h, 具体时间由 DNA 片段的大小决定),通过荧光自显影观察结果。

1.5 细菌单杂交实验

细菌单杂交实验以及相关试剂的配制主要参考细菌单杂交试剂盒说明书和文献 [12] 进行。将 Ms2583 基因克隆到文库载体 pTRG 上,将检测的启动子片段 (Ms2583p) 克隆到报告载体 pBX 上,同时以不相关的启动子片段 (Ms2476p) 作阴性对照,构建本研究所需要的双质粒组合。将双质粒组合分别共转化至 *E. coli* XR 化学感受态细胞中,挑选正确的共转化子,分别在单杂交筛选培养基 (20 mmol/L 3AT, 16 μg/mL Str, 15 μg/mL Tet, 34 μg/mL Chlo, 30 μg/mL Kan, 简写 +3AT+Str^r) 和 LB 培养基 (15 μg/mL Tet, 34 μg/mL Chlo, 30 μg/mL Kan, 简写 -3AT-Str^r) 中 30 °C 恒温培养 2 ~ 3 d, 观察 2 种固体培养基上细菌的生长状况。

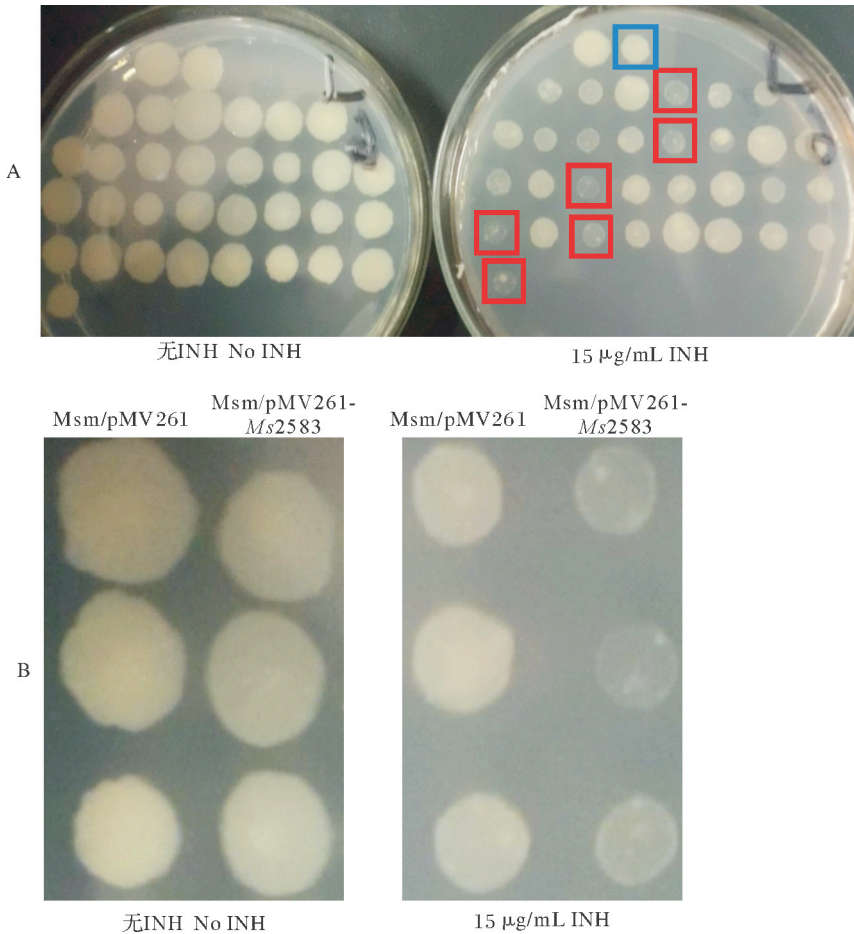
2 结果与分析

2.1 分枝杆菌中药物敏感性转录因子的筛选与鉴定

INH、RFP 和 EMB 是抗结核的一线药物,为了筛选和鉴定耻垢分枝杆菌中调控抗结核药物敏感性的转录因子,构建了耻垢分枝杆菌转录因子超表达文库 [14],并将此文库电转化入野生型耻垢分枝杆菌

感受态中,活化培养,挑取单菌落,分别在含有 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RFP 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMB 的 7H10 培养基上培养,发现在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH 的 7H10 培养基上,有几个菌株相对于空载体菌株 Msm/pMV261 生长速度明显变慢(图 1A)。抽提质粒并进行测序分析,发现其中某一菌株对应的基因是 *Ms2583*。

为验证 *Ms2583* 基因的功能,本研究构建了 *Ms2583* 超表达菌株 Msm/pMV261-*Ms2583*。结果发现,在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IHN 的 7H10 培养基中,Msm/pMV261-*Ms2583* 的生长明显弱于 Msm/pMV261,而未加 IHN 的 7H10 培养基中二者的生长趋势相似(图 1B)。但在其他药物 RFP(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 EMB(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)胁迫下并没有发现 *Ms2583* 超表达菌株



A:INH 敏感性菌株的筛选。蓝框表示对照菌株 Msm/pMV261,红框表示生长缓慢的菌株。B: Msm/pMV261 和 Msm/pMV261-*Ms2583* 在有或无 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH 的 7H10 培养基中生长情况。A: Screen the INH-sensitive strains on the 7H10 medium. Control is blue-boxed and clones growing slowly are red-boxed. B: Growth of Msm/pMV261 and Msm/pMV261-*Ms2583* in 7H10 medium containing 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH or 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH.

图 1 *Ms2583* 超表达菌株的异烟肼敏感性分析

Fig.1 Assays for the INH sensitivity of the *M. smegmatis* strain overexpressing *Ms2583*

与野生型的生长差异(结果未展示)。以上结果说明,超表达 *Ms2583* 后使耻垢分枝杆菌对 INH 更加敏感。

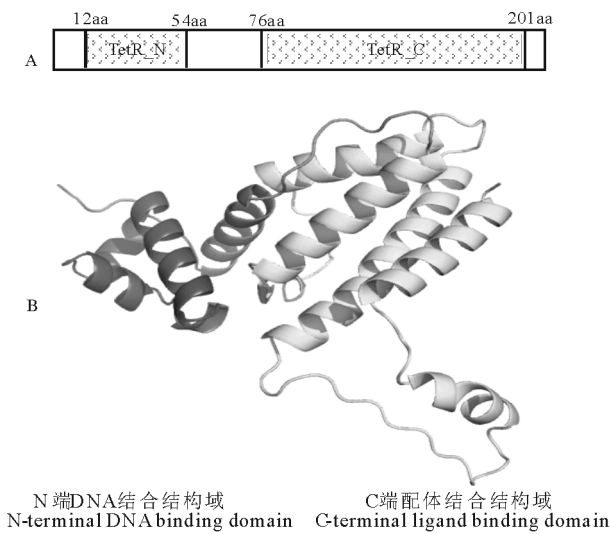
2.2 *Ms2583* 保守结构域分析

Ms2583 基因编码一个由 202 个氨基酸组成的蛋白质,通过 BLAST 结构域分析,发现其 N 端含有一个 TetR_N 结构域,C 端含有一个 TetR_C 结构

域(图 2A)。进一步使用 SWISS MODEL 工具模拟 *Ms2583* 的三维结构,发现 N 端是 DNA 结合结构域,C 端是配体结合结构域(图 2B),推测 *Ms2583* 属于 TetR 家族的转录调节蛋白。

2.3 *Ms2583* 的克隆与表达

为了进一步研究 *Ms2583* 基因的功能,对 *Ms2583* 进行克隆和体外表达。通过 PCR 扩增得



A: Ms2583 的结构域特征。B: Ms2583 的三维结构。A: The structural characteristics of Ms2583. B: 3D structure of Ms2583.

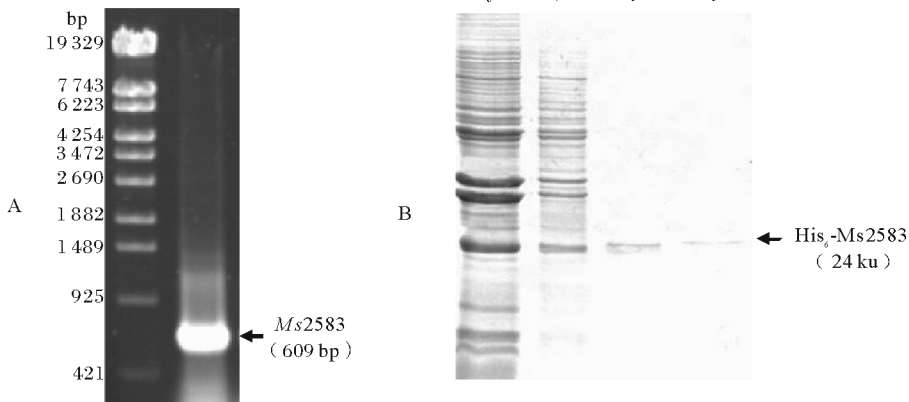
图 2 Ms2583 保守结构域鉴定

Fig.2 Identification the conserved domain of Ms2583

到 Ms2583 的基因片段对应 Marker 第 10 条带(421 bp),与预期的片段大小 609 bp 相符(图 3A),表明 Ms2583 基因扩增成功。通过 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化 His 标签融合蛋白的大小也与预期蛋白的大小(24 ku)一致,并且图谱上几乎没有其他杂带(图 3B),表明得到了纯净的目标蛋白质。

2.4 Ms2583 的 DNA 结合活性分析

基因组定位分析显示, Ms2583 基因与邻近基因 Ms2582(预测为编码假想蛋白)共享一段上游 DNA 序列,约 90 bp,将其命名为 Ms2583p(图 4A)。为了鉴定 Ms2583 转录因子的靶启动子,采用 EMSA 检测了 Ms2583 结合其上游 DNA 区域的可能性。研究发现,转录因子 Ms2583 与 FITC 标记的 Ms2583p 共孵育时,可以清楚观察到一条特异的迁移带(图 4B:泳道 2),且迁移带随着 Ms2583 蛋白浓度升高而增多(图 4B:泳道 3~5)。此外,非标记的 Ms2583p 可以竞争性地抑制 Ms2583 结合



A: Ms2583 基因 PCR 扩增产物的鉴定。B: His₆-Ms2583 蛋白纯化。A: Identification for PCR amplification of Ms2583 gene by agarose gel electrophoresis. B: Purification of His₆-Ms2583.

图 3 Ms2583 基因扩增产物鉴定和蛋白纯化

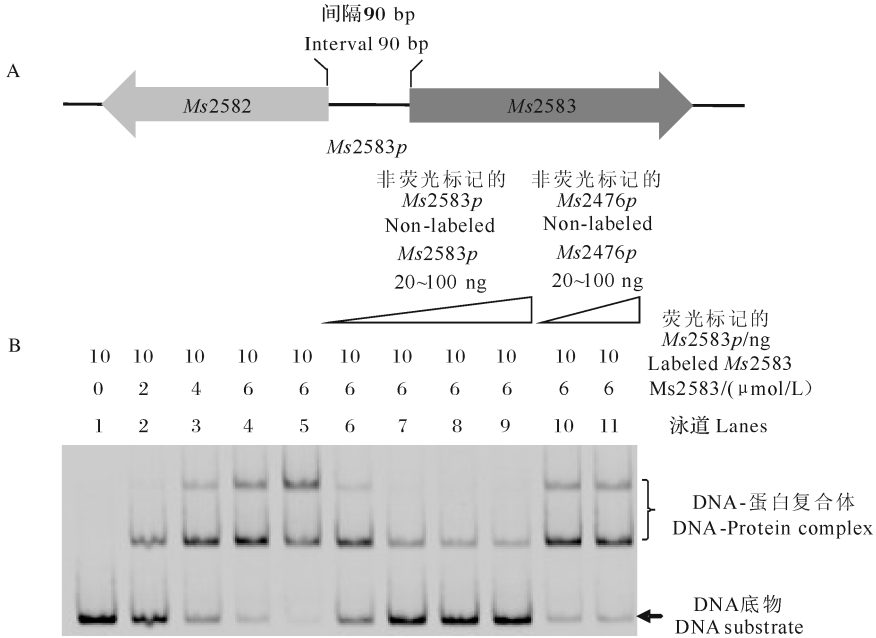
Fig.3 Identification for PCR amplification of Ms2583 gene and purification of Ms2583 protein

FITC 标记的 Ms2583p(图 4B:泳道 6~9),而其他不相关基因 Ms2476 的启动子 DNA 片段(Ms2476p)则不能(图 4B:泳道 10~11)。这些结果表明 Ms2583 特异结合自身上游 DNA 区域。

2.5 Ms2583 与自身启动子结合的特异性分析

采用细菌单杂交实验进一步确认 Ms2583 与自身启动子相互作用的特异性。研究发现,在 LB 培养基(-3AT-Str)上所有菌株都生长正常,但在单

杂交筛选培养基(+3AT+Str)上,只有 pBX-Ms2583p/pTRG-Ms2583 载体的实验菌株与正对照菌株(pBX-Rv2031p/pTRG-Rv3133c)一样生长良好,而相应的自激活菌株(pBX-Ms2583p/pTRG和 pBX/pTRG-Ms2583)以及负对照菌株(pBX-Ms2476p/pTRG-Ms2583)和空载体菌株(pBX/pTRG)均无生长迹象(图 5)。以上结果表明, Ms2583 可与其自身启动子 Ms2583p 特异性结合。



A: *Ms2583* 的基因组定位。B: EMSA 检测 *Ms2583* 的 DNA 结合活性。A: Genomic location of *Ms2583*. B: EMSA for detection of DNA-binding activity of *Ms2583*.

图 4 *Ms2583* 的基因组定位以及 *Ms2583* 的 DNA 结合活性分析

Fig.4 Analysis of genomic location of *Ms2583* and DNA-binding activity of *Ms2583*

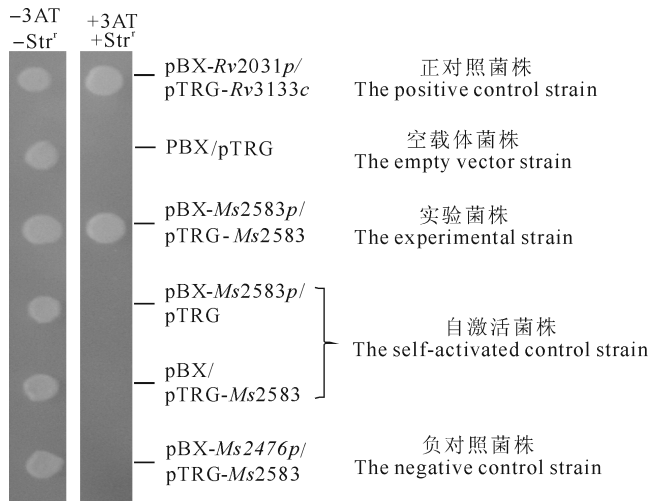


图 5 细菌单杂交实验检测 *Ms2583* 与自身启动子相互作用

Fig.5 Bacterial one-hybrid assays for detection of the interaction between *Ms2583* and its own promoter

3 讨论

转录因子在细菌适应环境胁迫中发挥重要作用。随着基因组大规模测序工作的开展,大量的转录因子得到鉴定,但是参与药物胁迫的转录因子还知之甚少。本研究通过药物胁迫实验发现,TetR 家族的转录因子 *Ms2583* 调控分枝杆菌对一线抗结核

药物 INH 的敏感性,但对其他 2 种一线药物 RFP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 EMB(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的耐受性没有影响。已有研究发现,TetR 家族转录因子影响细菌对多种药物的耐受性^[15-20]。如 InbR(Rv0275c)和 LtmA (*Ms6479*)均调控分枝杆菌对 2 种药物 INH 和 RFP 的耐受性^[16-17];LfrR 直接影响耻垢分枝杆菌对氟喹诺酮类等多种药物的敏感性^[18-19];TetR 家族的转录

因子 RaaS(Rv1219c)至少调控了分枝杆菌对4种不同的抗生素如异烟肼、乙胺丁醇、链霉素和浅蓝菌素的敏感性^[21]。这些转录因子介导的多药抗性与其调控的靶基因有关,如 LfrR 调控的靶基因是多药物外排泵 LfrA。本研究发现 Ms2583 仅调控分枝杆菌对 INH 的敏感性,推测其调控的靶基因可能特异地与 INH 相关。

TetR 家族的转录因子通常也为自调控蛋白,调节自身基因表达^[22]。本研究通过细菌单杂交实验和 EMSA 实验证实 Ms2583 与自身启动子特异结合,推测 Ms2583 是一个自调控蛋白,但具体是激活还是抑制作用有待基因表达相关实验证实。另外,多数 TetR 家族转录调节因子的 DNA 结合结构域的保守性很高,后续可以分析 Ms2583 结合自身启动子的保守模体,进而鉴定其调控的靶基因并研究其调控机制。

参 考 文 献

- [1] LAURA A, HANNAH M D, DENNIS F, et al. Global tuberculosis control WHO report 2016 [M]. Switzerland: World Health Organization (WHO) Press, 2016.
- [2] GOLDMAN R C, PLUMLEY K V, LAUGHON B E. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control[J]. Infect disord drug targets, 2007, 7: 73-91.
- [3] ALMEIDA P E, PALOMINO J C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs[J]. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2011, 66: 1417-1430.
- [4] RAO M, LIU H, YANG M, et al. A copper-responsive global repressor regulates expression of diverse membrane-associated transporters and bacterial drug resistance in *Mycobacteria* [J]. Journal of biological chemistry, 2012, 287: 39721-39731.
- [5] ZHANG H, GAO L, ZHANG J, et al. A novel *marRAB* operon contributes to the rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis* [J]. PLoS ONE, 2014, 9: e106016.
- [6] ENGOHANG-NDONG J, BAILLAT D, AUMERCIER M, et al. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator [J]. Molecular microbiology, 2004, 51: 175-188.
- [7] CRAUS C, WILLAND N, VILLEMAGNE B, et al. Unconventional surface plasmon resonance signals reveal quantitative inhibition of transcriptional repressor EthR by synthetic ligands [J]. Analytical biochemistry, 2014, 452: 54-66.
- [8] BOLLA J R, DO S V, LONG F, et al. Structural and functional analysis of the transcriptional regulator Rv3066 of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nucleic acids research, 2012, 40: 9340-9355.
- [9] LI Y, ZENG J, ZHANG H, et al. The characterization of conserved binding motifs and potential target genes for *M. tuberculosis* MtrAB reveals a link between the two-component system and the drug resistance of *M. smegmatis* [J]. BMC microbiology, 2010, 10: 242-254.
- [10] BOWMAN J, GHOSH P. A complex regulatory network controlling intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Molecular microbiology, 2014, 91: 121-134.
- [11] BALHANA R J, SINGLA A, SIKDER M H, et al. Global analyses of TetR family transcriptional regulators in *Mycobacteria* indicates conservation across species and diversity in regulated functions [J]. BMC genomics, 2015, 16: 479-492.
- [12] GUO M, FENG H, ZHANG H J, et al. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system [J]. Genome research, 2009, 19: 1301-1308.
- [13] MILLER J H. Experiments in molecular genetics [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972, 58: 352-359.
- [14] WANG Y, HUANG Y, XUE C, et al. ClpR protein-like regulator specifically recognizes RecA protein-independent promoter motif and broadly regulates expression of DNA damage-inducible genes in *mycobacteria* [J]. Journal of biological chemistry, 2011, 286: 31159-31167.
- [15] HU J, ZHAO L, YANG M. A GntR family transcription factor positively regulates *Mycobacterial* isoniazid resistance by controlling the expression of a putative permease [J]. BMC microbiol 2015, 15: 214-222.
- [16] CUTHBERTSON L, NODWELL J R. The TetR family of regulators [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2013, 77(3): 440-475.
- [17] YANG M, GAO C H, HU J, et al. InbR, a TetR family regulator, binds with isoniazid and influences multidrug resistance in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. Scientific reports, 2015, 5: 13969-13982.
- [18] LI W, HE Z G. LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Nucleic acids research, 2012, 40: 11292-11307.
- [19] LIU J, TAKIFF H E, NIKAIDO H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump [J]. Journal of bacteriology, 1996, 178: 3791-3795.
- [20] BURONI S, MANINA G, GUGLIERAME P, et al. LfrR is a repressor that regulates expression of the efflux pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Antimicrobial agents chemotherapy, 2006, 50: 4044-4052.

- [21] KUMAR N, RADHAKRISHNAN A, WRIGHT C C, et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Protein science*, 2014, 23: 423-432.
- [22] RAMOS J L, MARTINEZ-BUENO M, MOLINA-HENARES A J, et al. The TetR family of transcriptional repressors[J]. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2005, 69: 326-356.

Effects of a TetR family transcription factor Ms2583 on isoniazid sensitivity in *Mycobacterium smegmatis*

LIN Jian HU Lihua

*National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/Center for Proteomics Research
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract Bacteria use transcriptional regulation to respond to environmental stresses. However, only a few transcription factors regulating drug resistance have been reported. In this study, a transcriptional factor library of *Mycobacterium smegmatis* was screened on drug plates. A novel transcriptional factor, encoded by the *MSMEG_2583* (*Ms2583*) gene directly affecting *M. smegmatis* Isoniazid (INH) sensitivity was characterized. Over-expressing Ms2583 caused a significant increase in INH sensitivity of the transformed cells. Results of analyzing structural characteristics of Ms2583 showed that Ms2583 is a TetR family transcription factor. The bacterial one-hybrid assays and electrophoretic mobility shift assays demonstrated that Ms2583 could directly bind to its own promoter with specific interaction. These findings will provide a clue for studying the regulatory mechanism of TetR family transcription factor Ms2583.

Keywords *Mycobacterium smegmatis*; TetR transcriptional regulator; Ms2583; sensitivity; INH

(责任编辑:张志钰)