

TetR/AcrR 转录因子 Ms3469 对耻垢分枝杆菌 异烟肼抗药性的调控

李玲艳 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 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_4369 (Ms3469)影响耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)对抗结核一线药物异烟肼(Isoniazid, INH)的敏感性。进一步研究发现超表达 Ms3469 能增强耻垢分枝杆菌的 INH 抗性;基因保守结构域分析表明 Ms3469 编码一个 TetR/AcrR 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 Ms3469 能够与自身启动子直接特异结合。

关键词 耻垢分枝杆菌; TetR 家族转录因子; Ms3469; 抗药性; INH

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0061-07

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的一种慢性传染病,是全球面临的主要传染病之一^[1]。耐药和多重耐药菌株的不断出现是结核病防控面临的巨大挑战^[2-4]。因此,研究结核分枝杆菌的抗药机制已成为结核病防治领域的重大问题。

转录因子是一种具有特殊结构、行使调控基因表达功能的蛋白质。根据序列的相似性、结构和功能特征等将原核生物转录因子分为不同的家族,其中, TetR 家族转录因子是一种普遍存在于细菌中的转录调控蛋白,它的命名来源于大肠杆菌四环素抗性阻遏蛋白(tetracycline repressor, TetR),调控四环素运输泵的表达^[5]。TetR 家族转录因子可参与各种生理生化过程,包括抗生素合成途径、分解代谢途径中相关酶的合成以及细菌的多药耐药性^[6-9]。

耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)是病原性结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的模式菌株。基因组分析显示耻垢分枝杆菌含有 514 个编码 TetR 家族转录调控蛋白的基因,但只有少数几个基因的功能得到详细研究^[10]。Ms6564 通过调控 339 个潜在靶基因的表达影响耻垢分枝杆菌的突变率^[11]; BkaR 控制分枝杆菌的支链酮酸代谢^[12]; LfrR 通过抑制多药物外排泵 LfrRA 操纵子的表

达,影响细菌对氟喹诺酮类等多种药物的敏感性^[13-14]。最近发现 TetR 调控因子 Ms4022 可激活转运相关基因来调控耻垢分枝杆菌对利福平(Rifampicin, RFP)的抗性^[15]。TetR 家族具有单纯的转录因子功能,也有作为第二信使受体的报道,如 DarR 作为 c-di-AMP 受体参与转录调控细胞生长^[16]。本研究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,挖掘调控分枝杆菌药物敏感性的转录因子,旨在为探索结核分枝杆菌的抗药机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株耻垢分枝杆菌 mc²155 菌株为华中农业大学蛋白质组学平台保存和提供,大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)和 XR 菌株购买于 Stratagene。本研究所使用的限制性核酸内切酶、T4-DNA 连接酶、修饰酶、DNA Marker、抗生素和 PCR 反应所需试剂(2.5 mmol/L dNTP, rTaq DNA 聚合酶, 10 \times PCR buffer)均购自宝生物(大连)生物公司。DNA 纯化试剂盒 BioFlux 和 TIANGEN RNA 抽提试剂盒购自北京百泰克(Bioteke)公司。PCR 反应所需引物、寡核苷酸底物均由 Invitrogen 公司合成。分枝杆菌专用液

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2016T90699)

李玲艳, 硕士研究生, 研究方向: 分子微生物学, E-mail: 971689916@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

体培养基 7H9(Difco™ Middlebrook 7H9 Broth)和固 公司,培养基的配制与灭菌方法按说明书进行。本研究体培养基 7H10(Difco™ Middlebrook 7H10)购自 BD 究用到的载体和引物分别见表 1 和表 2。

表 1 本研究用到的质粒

Table 1 The plasmids used in the study

质粒 Plasmid	表型或特征 Phenotype or feature	来源 Source
pET28a	Kan ^r , T7 lac promoter, N-terminal His ₆	Novagen
pET-Ms3469	Ms3469 in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I of pET28a	本研究构建 This study
pBX	Chlo, p15A replicon, lac-UV5 promoter	Stratagene
pBX-Rv2031p	Rv2031p in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pBXcmT	[17]
pBX-Ms3469p	Ms3469p in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pBXcmT	本研究构建 This study
pBX-Ms3488p	Ms3488p in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pBXcmT	本研究构建 This study
pTRG	Tet, ColE1 replicon, lpp/lac-UV5 promoter	Stratagene
pTRG-Ms3469	Ms3469 in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pTRG	本研究构建 This study
pTRG-Ms3488	Ms3488 in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pTRG	本研究构建 This study
pTRG-Rv3133c	Rv3133c in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pTRG	[17]
pMV261	Kan ^r , pAL5000 replicon	[18]
pMV261-Ms3469	Ms3469 in <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I sites of pMV261	本研究构建 This study

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence	用途 Usage
Ms3469f	GATCGAATTCATGAGTCGTTGGGAGCCCGAT	克隆和表达 Clone and expression
Ms3469r	GACTACTCTAGATCACCCGGCAACGAACAGGTT	克隆和表达 Clone and expression
Rv2031cf	AGATGAATTCTCGCGTAAAGCACCCGATCC	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Rv2031cr	GCGCTCTAGATTGATGCCTCCTAATCGATG	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Rv3133f	TATAGCGGCCGAATGGACTACGCGTTCTTACC	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Rv3133r	ACCTCTAGAACTCAAGGTGGAGTGCCAGCGG	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3469pf	ATATGAATTCTTCCGACAGGCGTGGGAACC	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3469pr	AGACTCTAGAGTGCCGATCGTAGGGGAATA	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3488f	GCTCGAATTCGTATGGCACATGCTCCGAACCGG	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3488r	GTATTCTAGATCAGTTCTGGCCGCGGTGCGGA	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3488pf	GATCGAATTCATCGACCTCGAAACGAACGCC	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid
Ms3488pr	GCAGTCTAGATCGCCATTGTGTGCTTCTTGT	细菌单杂交 Bacteria one-hybrid

注:带下划线为引物酶切位点,“f”代表正向引物,“r”代表反向引物。Notes: Restriction enzyme sites are underlined. f: Forward primer; r: Reverse primer.

1.2 细菌生长曲线测定

将活化好的待测菌株按照 1%接种量转接至新鲜的 7H9 培养液中,通过紫外分光光度计 600 nm 波长处调整所有待测菌液的起始光密度值 $D_{600} = 0.1$,然后 37 °C、180 r/min 培养至细菌生长对数后期。期间每隔 3 h 取 3 个重复样,测各个样品的 D_{600} 值,绘制生长曲线。

1.3 蛋白质保守结构域分析

蛋白质功能结构域保守性分析采用 BLAST 软件,氨基酸序列比对分析采用 BioEdit 软件。

1.4 目的基因的克隆、蛋白表达和纯化

以 *M. smegmatis* mc² 155 基因组 DNA 为模板,以 Ms3469f/Ms3469r 为特异性引物 PCR 扩增 Ms3469 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 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,纯化后进行酶连接,构建带 His 标签的重组蛋白表达载体 pET-Ms3469。将 pET-Ms3469 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 D_{600} 接近 1.2,然后加入 1 mmol/L IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside,IPTG)16 °C、180 r/min 诱导培养 8 h,离心收集菌体。随后用 Binding buffer(5 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-base,pH 7.5)重悬细胞,超声波破碎,离心收集上清液 4 °C 备用。蛋白纯化步骤按照 GE 公司 Ni²⁺-nitrilotriacetate 亲和纯化说明书操作,蛋白质样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测分析。

1.5 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[19]进行。在 10 μL 体系中,将 5'端 FITC 标记的 Ms3469p (10 ng) 和非标记 Ms3469p 或 Ms3488p (20~100 ng) 与浓度梯度的目标蛋白 Ms3469 (0~6 $\mu\text{mol/L}$) 在缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, pH 7.5)中冰上孵育 20 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(或 EB 染色)观察结果。

1.6 细菌单杂交实验

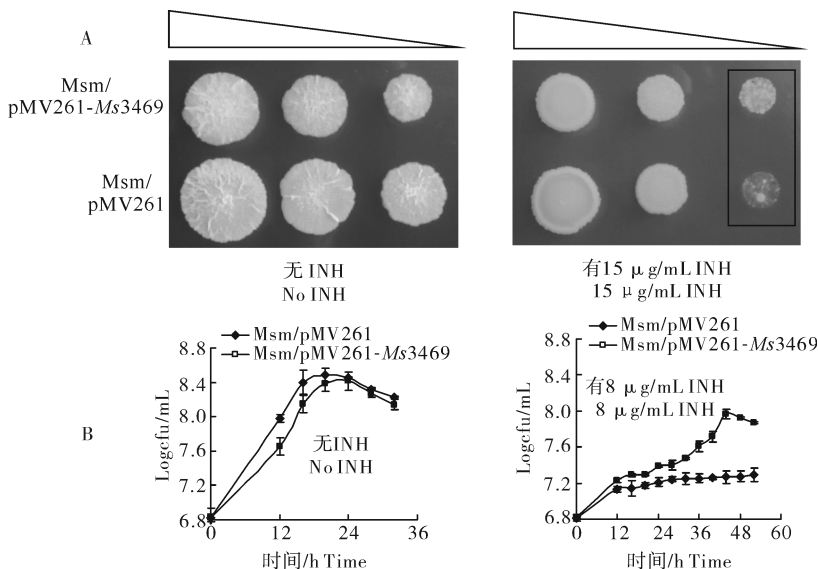
用 Primer Premier 5.0 设计基因特异性引物(表 2),以 *M. smegmatis* mc²155 基因组 DNA 为模板扩增目的片段,产物经琼脂糖凝胶电泳检测正确后,与细菌单杂交载体 pBX 和 pTRG 分别进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,纯化后将目的基因的启动子序列克隆到报告载体 pBX 中 *HIS3-aadA* 的上游,将目的基因的编码序列克隆到文库载体 pTRG 上,构建本研究所需的双质粒组合。将双质粒组合

分别共转化至 *E. coli* XR 感受态细胞,挑选正确的共转化子,分别在 LB 固体培养基(15 $\mu\text{g/mL}$ Tet, 34 $\mu\text{g/mL}$ Chlo, 30 $\mu\text{g/mL}$ Kan, 简写-3AT-Str^r)和单杂交筛选培养基(20 mmol/L 3AT, 16 $\mu\text{g/mL}$ Str, 15 $\mu\text{g/mL}$ Tet, 34 $\mu\text{g/mL}$ Chlo, 30 $\mu\text{g/mL}$ Kan, 简写+3AT+Str^r)中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d,观察细菌在 2 种培养基上的生长状况。

2 结果与分析

2.1 Ms3469 超表达菌株的 INH 抗性分析

在前期分枝杆菌药物敏感性转录因子的筛选研究中,发现 1 个菌株相比对照菌株生长速度明显增强,分析对应的转录因子是 Ms3469。为验证该转录因子的功能,构建了 Ms3469 超表达菌株 Msm/pMV261-Ms3469。结果发现,在 15 $\mu\text{g/mL}$ INH 的 7H10 固体培养基中, Msm/pMV261-Ms3469 菌株长势明显优于 Msm/pMV261(图 1A 右),而未加 INH 的 7H10 培养基中二者的生长趋势相似(图 1A 左)。进一步研究发现,在 8 $\mu\text{g/mL}$ INH 的 7H9 液体培养基中, Msm/pMV261-Ms3469 的生长速度明显比 Msm/pMV261 快(图 1B 右),而未加



A: Ms3469 超表达菌株产生异烟肼抗性。Msm/pMV261 和 Msm/pMV261-Ms3469 菌株以接种浓度 2 倍梯度稀释成 3 个不同的浓度培养在无(左)或有(右)15 $\mu\text{g/mL}$ INH 的 7H10 固体培养基中的生长情况。B: Msm/pMV261 和 Msm/pMV261-Ms3469 菌株在无(左)或有(右)8 $\mu\text{g/mL}$ INH 的 7H9 液体培养基中的生长曲线。A: INH resistance of the Ms3469-overexpressing strain. Freshly grown recombinant strains of *M. smegmatis* Msm/pMV261 and *M. smegmatis* Msm/pMV261-Ms3469 were two-fold diluted to three different concentrations, and equal amounts of culture were spotted on 7H10 plates with Kan (30 $\mu\text{g/mL}$) in the absence (left panel) or presence of 15 $\mu\text{g/mL}$ INH (right panel). B: Growth curves of the Msm/pMV261 and Msm/pMV261-Ms3469 in 7H9 medium in the absence (left panel) or presence (right panel) of 8 $\mu\text{g/mL}$ INH.

图 1 Ms3469 超表达菌株的异烟肼抗性分析

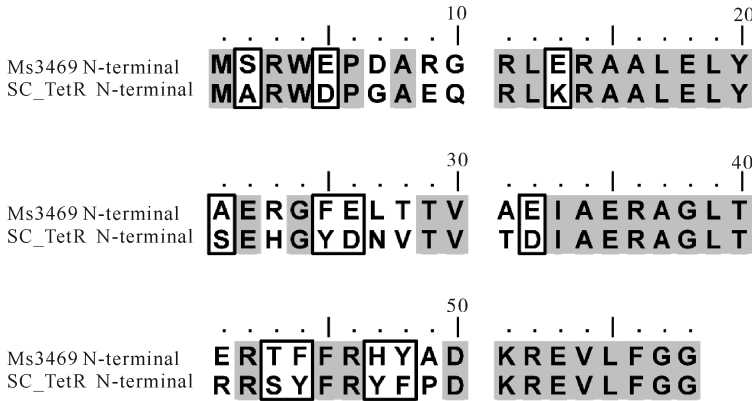
Fig.1 Assays for the INH sensitivity of the *M. smegmatis* strain overexpressing Ms3469

INH 的 7H9 培养基中二者的长势基本一致(图 1B 左)。以上结果说明,超表达 *Ms3469* 能使耻垢分枝杆菌产生一定的 INH 抗性。

2.2 *Ms3469* 结构域保守性分析

Ms3469 基因编码一个由 195 个氨基酸组成的蛋白质。BLAST 结构域分析发现其 5~195 氨基酸处是 AcrR 类结构域, N 端是一段典型的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)的 TetR 类结构域 PF00440 (TetR_N)。 *Ms3469* 与蓝色链霉菌

(*Streptomyces coelicolor*) 的 TetR 基因 SCO0337 (SC_TetR) 的三维结构最相似, 蛋白质序列对位分析显示, *Ms3469* 与 SC_TetR 共享一段高度保守的 N 端 DNA 结合结构域, 有 66% 的一致性和 85% 的相似性(图 2)。由于 TetR 家族转录因子具有 N 端保守特征性的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH) DNA 结合结构域和 C 端高度变化的配体结合结构域, 推测 *Ms3469* 编码 TetR/AcrR 家族的转录调节蛋白。



SC_TetR, 蓝色链霉菌的 TetR 基因 SCO0337 A TetR family transcription regulator SCO0337 in *Streptomyces coelicolor*.

图 2 *Ms3469* 的序列对位分析

Fig.2 Sequence alignment analysis of *Ms3469*

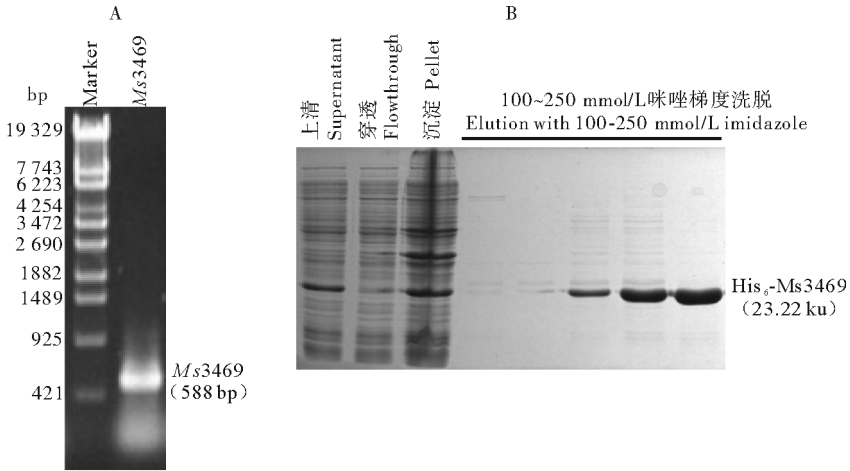
2.3 *Ms3469* 蛋白的纯化

为了进一步研究 *Ms3469* 基因的功能, 对 *Ms3469* 进行克隆和体外表达。图 3A 是用 *Ms3469* 特异性引物, 以 *M. smegmatis* mc²155 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳图, 片段条带对应 Marker 第 10 条带(421 bp)和第 9 条带(925 bp)之间, 与预期的片段大小(609 bp)一致, 表明 *Ms3469* 基因扩增成功。随后构建表达载体并纯化重组蛋白, 图 3B 是在 BL21 (DE3)/pET28a-*Ms3469* 的细胞上清中检测目的蛋白的胶图, *Ms3469* 蛋白对应的分子质量为 21.22 ku, 表达后的融合蛋白包含 6 个组氨酸的 Tag 和一段连接序列, 理论上总的分子质量为 23.22 ku。

2.4 *Ms3469* 蛋白的 DNA 结合活性分析

分析 *Ms3469* 在基因组中的位置, 发现 *Ms3469* 与处于同一操纵子的 *Ms3467* (预测为假想蛋白) 重叠 4 个碱基, 与反向的 *Ms3470* (NAD-依赖的差向

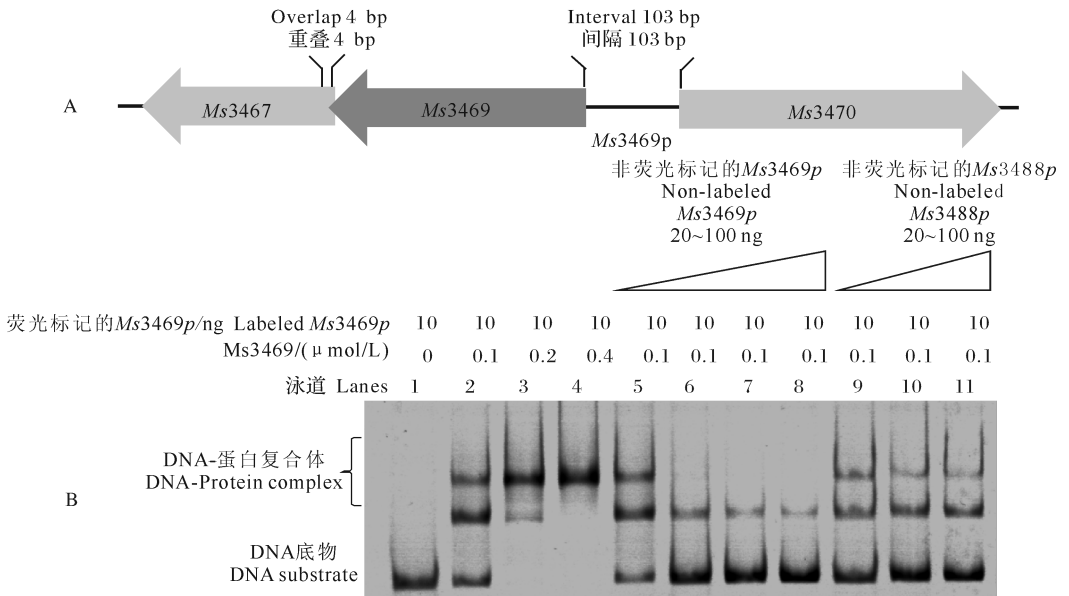
异构酶/脱水酶) 间隔 103 个碱基, 也即 3 个基因共用一段启动子序列, 将此序列命名为 *Ms3469p* (图 4A)。为了鉴定转录因子 *Ms3469* 的靶启动子, 我们利用 EMSA 检测了 *Ms3469* 结合 *Ms3469p* 的可能性。研究发现, 转录因子 *Ms3469* 可与荧光标记的 *Ms3469p* 形成复合体而产生滞后条带(图 4B: 泳道 2), 随着 *Ms3469* 蛋白质浓度增加, 体系中游离的 DNA 底物越来越少, 同时 DNA-蛋白质复合物形成的滞后带浓度逐渐增大(图 4B: 泳道 3~4), 表明 *Ms3469* 能很好地结合其自身启动子 *Ms3469p*。此外, 非荧光标记的 *Ms3469p* 可与荧光标记的 *Ms3469p* 竞争性结合 *Ms3469* 蛋白质(图 4B: 泳道 5~8), 而其他基因的启动子如 *Ms3488p* 则不能与 *Ms3469p* 竞争性结合 *Ms3469* (图 4B: 泳道 9-11)。以上结果说明 *Ms3469* 蛋白结合自身启动子 *Ms3469p* 具有特异性。



A: Ms3469 基因片段的 PCR 扩增鉴定。B: His₆-Ms3469 蛋白纯化。A: PCR amplification of Ms3469 gene and the PCR products was separated by agarose gel electrophoresis. B: Purification of His₆-Ms3469.

图 3 Ms3469 基因的 PCR 扩增和重组蛋白的纯化

Fig.3 PCR amplification of Ms3469 gene and the purification of Ms3469 protein



A: Ms3469 的基因组定位。B: EMSA 检测 Ms3469 的 DNA 结合活性。A: Genomic location of Ms3469. B: EMSA for detection of DNA-binding activity of Ms3469.

图 4 Ms3469 的基因组定位以及 Ms3469 的 DNA 结合活性分析

Fig.4 Analysis of genomic location of Ms3469 and DNA-binding activity of Ms3469

2.5 Ms3469 与自身启动子结合的特异性分析

利用细菌单杂交实验进一步确认 Ms3469 与自身启动子相互作用的特异性。本研究发实验菌株 (pTRG-Ms3469/pBX-Ms3469p) 与正对照菌株 (pTRG-Rv3133c/pBX-Rv2031p) 在单杂交筛选平板 (+3AT+Str) 上同样生长良好, 而其相对应的自

激活菌株 (pTRG-Ms3469/pBXp 和 TRG/pBX-Ms3469p) 以及负对照菌株 (pTRG-Ms3469/pBX-Ms3488p 和 pTRG-Ms3488/pBX-Ms3469p) 与空载体菌株 (pTRG/pBX) 均无生长迹象 (图 4B)。以上结果表明, Ms3469 可与其自身启动子 Ms3469p 特异性结合。

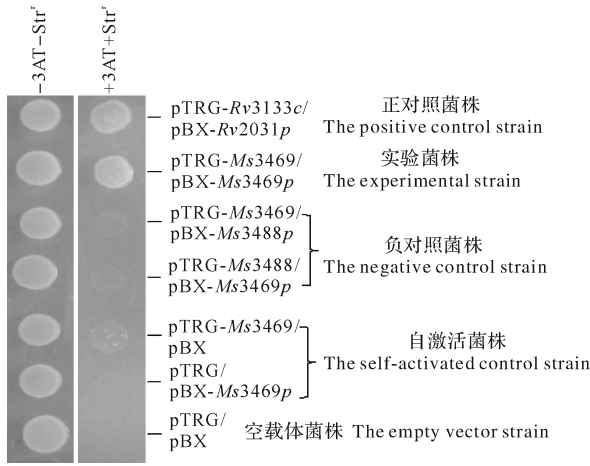


图 5 细菌单杂交实验检测 Ms3469
与自身启动子的相互作用

Fig.5 Bacterial one-hybrid assays for detection of
the interaction between Ms3469 and its own promoter

3 讨论

本研究通过结构域分析发现, Ms3469 的 N 端 15~55 氨基酸处含有典型的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)结构域 PF00440(TetR_N), 与蓝色链霉菌的 SCO0337 基因(SC_{TetR})进行蛋白质序列对位分析, 发现 N 端的 DNA 结合结构域高度保守, 可将 Ms3469 定义为 TetR 家族转录因子。值得指出的是, 通常 TetR 家族转录因子的 C 端结构域相似性非常低, 无法依据常规的分类方法将 TetR 家族转录因子进一步分类。但对 Ms3469 的 C 端氨基酸序列的分析发现, 该蛋白含有一个 AcrR 类结构域。在大肠杆菌和其他细菌的多药外排泵 AcrAB-TolC 系统中, AcrR 是位于 AcrAB 操纵子上游的阻遏蛋白, 研究报道 AcrR 抑制子对 AcrAB 转录起一定程度的抑制作用^[20]。因此, 我们推测 Ms3469 为 TetR/AcrR 家族的转录因子。

本研究发现超表达 Ms3469 能够使耻垢分枝杆菌产生 INH 抗性, 即 Ms3469 是一个与 INH 抗性相关的转录因子, 但是其中的具体机制有待进一步阐明。据报道耻垢分枝杆菌 TetR 家族的转录因子 LtmA 通过调控脂质运输与代谢相关基因的表达, 导致细胞壁的通透性降低, 减少药物进入胞内, 从而增加细菌的抗药性^[21]。GntR 家族的转录因子 Ms0535 通过调控转运蛋白 Ms0534 的表达从而增强分枝杆菌对 INH 的耐受性, 研究发现 Ms0534 能够作为药物外排泵将 INH 排出细胞外^[22]。有意思的是, 本研究分析 Ms3469 在基因组中的位置, 发现

Ms3469 与处于同一操纵子的 Ms3467 以及与反向的 Ms3470 共一段启动子序列; 并通过细菌单杂交和 EMSA 证实 Ms3469 能够与这段启动子特异性结合。因此, 推测转录因子 Ms3469 可能是通过调控上述 2 个基因的表达, 产生了与 INH 抗性相关的表型。Ms3467 是一个假想蛋白, 目前没有文献报道; Ms3470 是一个 NAD 依赖的差向异构酶/脱水酶, 具体功能未知。因此, Ms3469 与其附近的 Ms3467 和 Ms3470 在 INH 抗性表型中的功能值得进一步研究。

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] 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.
- [3] BOWMAN J, GHOSH P. A complex regulatory network controlling intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Molecular microbiology, 2014, 91:121-134.
- [4] SAUDHU G K. Tuberculosis: current situation, challenges and overview of its control programs in India[J]. Journal of global infectious diseases, 2011, 3(2): 143-150.
- [5] HILLEN W, BERENS C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance[J]. Annual review of microbiology, 1994, 48: 345-369.
- [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] 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.
- [8] CUTHBERTSON L, NODWELL J R. The TetR family of regulators[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2013, 77: 440-475.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] YANG M, GAO C, CUI T, et al. A TetR-like regulator

- broadly affects the expressions of diverse genes in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Nucleic acids research, 2011, 40: 1009-1020.
- [12] BALHANA R J C, SWANSTON S N, COADE S, et al. bkaR is a TetR-type repressor that controls an operon associated with branched-chain keto-acid metabolism in mycobacteria[J]. FEMS microbiology letters, 2013, 345: 132-140.
- [13] LIU J, TAKIFF H E, NIKAIIDO H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump[J]. Journal of bacteriology, 1996, 178: 3791-3795.
- [14] 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 and chemotherapy, 2006, 50: 4044-4052.
- [15] LIU H, YANG M, HE Z H. Novel TetR family transcriptional factor regulates expression of multiple transport-related genes and affects rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Scientific reports, 2016, 6: 27489-27495.
- [16] ZHANG L, LI W, HE Z G. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of biological chemistry, 2013, 288: 3085-3096.
- [17] GUO M, FENG H, ZHANG J, et al. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system[J]. Genome research, 2009, 19: 1301-1308.
- [18] STOVER C, DE LA CRUZ V, FUERST T, et al. New use of BCG for recombinant vaccines[J]. Nature, 1991, 351: 456-460.
- [19] 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.
- [20] MA D, ALBERTI M, LYNCH C, et al. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals[J]. Molecular microbiology, 1996, 19: 101-112.
- [21] 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.
- [22] 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 microbiology, 2015, 15: 214-222.

Regulation of a TetR/AcrR family transcription factor Ms3469 on isoniazid resistance in *Mycobacterium smegmatis*

LI Lingyan HU Lihua

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

Abstract *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis (TB), one of the deadliest diseases worldwide. The emergence of multidrug-resistant (MDR) TB and extensive drug-resistant (XDR) TB is a large challenge to TB treatment. In this study, a transcriptional factor library of *Mycobacterium smegmatis* as a model strain for pathogenic *M. tuberculosis* was screened on plates containing 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Isoniazid (INH). A novel transcriptional factor encoded by MSMEG_3469 (Ms3469) directly affecting *M. smegmatis* INH sensitivity was characterized. Over-expression of Ms3469 caused a significant increase in INH resistance of *M. smegmatis*. Results of bioinformatics analyses showed that Ms3469 is a member of the TetR/AcrR family of transcription regulators and forms a homodimer similar to SO_TetR. The electrophoretic mobility shift assays demonstrated that Ms3469 could bind to its own promoter. The direct and specific interaction was further confirmed by bacterial one-hybrid assays. It will provide a clue for studying the regulatory mechanism of bacterial drug resistance in *M. smegmatis*.

Keywords *Mycobacterium smegmatis*; TetR transcriptional regulator; Ms3469; drug resistance; INH

(责任编辑: 张志钰)