



溶藻弧菌 ZJ-T 小 RNA *srvg23535* 基因突变株的构建及其功能初探

邓益琴¹ 陈偿² 苏友禄¹ 程长洪¹ 马红玲¹ 刘松林³ 冯娟^{*1}

1 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广东 广州 510300

2 中国科学院南海海洋研究所 西沙、南沙深海海洋环境观测研究站 广东 广州 510301

3 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301

摘要:【背景】小 RNA 被证实对细菌遗传变异、生长繁殖、致病性等具有重要的调控作用,但是在机会致病菌——溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)中研究较少。本实验室前期通过转录组测序和 Northern Blot 鉴定得到溶藻弧菌 ZJ-T 中小 RNA *srvg23535*。【目的】初探小 RNA *srvg23535* 对溶藻弧菌生物学特性的影响。【方法】利用同源重组技术构建小 RNA *srvg23535* 的缺失突变株,并对野生株和 *srvg23535* 突变株的菌落形态、运动性、胞外蛋白酶分泌、H₂O₂ 和 Cu²⁺ 的压力感应、铁吸收利用、抗生素抗性以及生长代谢等生物学特性进行比较研究。【结果】通过对溶藻弧菌小 RNA *srvg23535* 基因缺失突变株的生物学特性分析表明,小 RNA *srvg23535* 缺失后,对溶藻弧菌菌落形态、运动性、胞外蛋白酶分泌、H₂O₂ 和 Cu²⁺ 的压力感应、铁吸收利用、抗生素抗性以及多数测定的碳源、氮源代谢的影响不显著;但突变株对 D-海藻糖(D-trehalose)的代谢减弱,对果胶(Pectin)、丙氨酸-谷氨酰胺(Ala-Gln)的代谢增强,并可利用丙氨酸-天冬氨酸(Ala-Asp)为氮源。【结论】小 RNA *srvg23535* 参与调控溶藻弧菌对 D-海藻糖(D-trehalose)、果胶(Pectin)、丙氨酸-谷氨酰胺(Ala-Gln)和丙氨酸-天冬氨酸(Ala-Asp)的代谢,这将为获取 *srvg23535* 调控靶标基因,进而阐明其与靶标基因的相互作用机制奠定基础。

关键词: 溶藻弧菌, 小 RNA *srvg23535*, 缺失突变株, 生物学特性

Foundation items: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2017YB27, 2017YB01, 2018ZD01); Joint Funding Open Project Fund (2018011004); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD1007)

*Corresponding author: Tel: 86-20-89108320; E-mail: jannyfeng@163.com

Received: 20-03-2018; Accepted: 24-06-2018; Published online: 30-07-2018

基金项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017YB27, 2017YB01, 2018ZD01); 联合资助开放课题基金(2018011004); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2017HY-ZD1007)

*通信作者: Tel: 020-89108320; E-mail: jannyfeng@163.com

收稿日期: 2018-03-20; 接受日期: 2018-06-24; 网络首发日期: 2018-07-30

Construction and characterization of the sRNA *srvg23535* knock-out mutant of *Vibrio alginolyticus* ZJ-T

DENG Yi-Qin¹ CHEN Chang² SU You-Lu¹ CHENG Chang-Hong¹ MA Hong-Ling¹
LIU Song-Lin³ FENG Juan^{*1}

1 Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510300, China

2 Xisha and Nansha Ocean Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China

3 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China

Abstract: [Background] Small non-coding RNAs (sRNAs) play important roles in genetic variation, growth, reproduction, and bacterial pathogenicity, but few studies have been conducted on the opportunistic pathogen of *Vibrio alginolyticus*. We have identified an sRNA, *srvg23535*, of *V. alginolyticus* ZJ-T by RNA-seq and Northern Blot. [Objective] We studied the effect of *srvg23535* on the biological characteristics of *V. alginolyticus*. [Methods] The *srvg23535* knock-out mutant was constructed by homologous recombination. The function of *srvg23535* was studied with comparing the colony morphology, motility, extracellular protease secretion, pressure sensing of H₂O₂ and Cu²⁺, iron utilization, antibiotic resistance, and metabolism between the wild type and the mutant strains. [Results] The biological characteristics analysis of *srvg23535* knock-out mutant showed that the absence of *srvg23535* had no significant effect on the colony morphology, motility, extracellular protease secretion, pressure sensing of H₂O₂ and Cu²⁺, iron utilization, antibiotic resistance and the metabolism of most of the tested carbon and nitrogen sources in *V. alginolyticus*. However, the mutant showed a weaker metabolism of D-trehalose, a stronger metabolism of pectin and alanine-glutamine (Ala-Gln), and accessibility to the utilization of alanine-aspartic acid (Ala-Asp) as the sole nitrogen source. [Conclusion] The sRNA *srvg23535* is involved in the metabolism regulation of D-trehalose, pectin, Ala-Gln and Ala-Asp with laying the foundation for the target genes screening of *srvg23535* and further elucidating the regulation mechanism of *srvg23535* to its target genes.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*, sRNA *srvg23535*, Knock-out mutant, Biological characteristics

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种常见的兼性厌氧的革兰氏阴性嗜盐嗜温短杆菌,同时是一种机会致病菌,对海洋动物和人类造成潜在威胁^[1-3]。在美国,溶藻弧菌引起的疾病发病率在1996-2010年间显著增加,与副溶血性弧菌和创伤弧菌一起被列为最常见的病原体之一^[4]。此外,溶藻弧菌常引起人体严重腹泻、发热并脱水,甚至通过严重感染引起中耳炎及败血症,是人类重要的致病菌^[5-6]。

溶藻弧菌广泛分布在河口与海洋,为了适应不断变化的环境,演化出多种环境适应机制,如菌落相变、生物膜、群感效应等^[7-8]。这些机制都处于

严格且精准的基因表达调控体系中。基因表达调控发生在蛋白表达的各个水平上,转录、转录后、翻译及翻译后修饰等过程都可以作为基因表达的调控节点^[9-10],除了极少数组成型表达的基因外,绝大多数基因的表达都在其中一个或多个节点接收环境信号的控制,从而组成复杂的调控网络以应对不断变化的环境条件。

越来越多的研究表明一类位于基因间区,转录但不翻译的反式编码 sRNAs (Trans-encoded sRNAs, sRNAs)通过调控多个靶标基因,从而形成响应环境的调节活性网络^[11]。此类 sRNA 主要通过与其靶标 mRNA 不完全配对影响 mRNA 的稳

定性, 从而激活或者抑制靶 mRNA 的表达; 还可通过模拟靶蛋白底物, 修饰或抑制靶蛋白的生物学活性, 例如 CsrB sRNA 通过隔离的方式调节蛋白活性^[12]; 此外, 也有少数 sRNAs 与转录因子等蛋白相互作用, 从而抑制相关蛋白活性^[13]。小 RNA 在真核生物基因表达调控中的作用已被广泛研究, 但是直到 2000 年以后, 原核生物小 RNA 及其功能才逐渐被发现, 越来越多的研究表明小 RNA 对细菌遗传变异、生长繁殖、致病性等具有重要的调控作用, 其在细菌环境适应和流行分布方面的重要性已经得到广泛认可^[13-14]。然而, 大多数研究在模式生物体中进行, 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和沙门氏菌 (*Salmonella*)。随着高通量测序技术的发展, 科学家开始探索非模式生物体, 特别是人类病原体, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 或幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 中的调控 RNA^[15-16], 但对于大多数原核生物小 RNA 调控功能和作用机制依然所知有限。

在弧菌科中, 大多数研究集中在霍乱弧菌和哈氏弧菌。溶藻弧菌中关于小 RNA 的研究仅 Huang 等^[17-18]发现了 3 个与粘附、趋化及运动相关的小 RNA, 从小 RNA 角度揭示溶藻弧菌致病性、环

境适应及流行特点的研究仍未见报道。本实验室前期通过转录组预测、Northern Blot 鉴定得到溶藻弧菌 ZJ-T 的小 RNA *srvg23535*, 深入分析发现 *srvg23535* 是一个新的小 RNA, 并且仅存在于弧菌中, 序列相对保守(未发表数据), 但是其功能未知。本研究通过同源重组技术构建小 RNA *srvg23535* 的缺失突变株, 并对突变株环境适应相关的生物学特性进行研究。该研究为深入了解 *srvg23535* 的功能, 并获取其调控靶标基因, 进而阐明其与靶标基因的相互作用机制奠定基础, 研究成果将揭示小 RNA 在溶藻弧菌, 甚至海洋病原弧菌环境适应和疾病暴发中的作用, 也为控制海洋弧菌病害的暴发提供新的思路和防治靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

溶藻弧菌野生株 ZJ-T^[19]保存于本实验室; 自杀质粒 pSW7848^[20]、自杀质粒中间宿主大肠杆菌 Π 3813^[21]以及接合作用供体宿主大肠杆菌 GEB883^[22]来源于 Didier Mazel 和 Annik Jacq 等; 小 RNA 突变重组自杀质粒 pSW7848- Δ *srvg23535* 及小 RNA 突变株 ZJ-T- Δ *srvg23535* 构建于本研究。详细信息见表 1。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strain or plasmid	相关特征 Relevant characteristics	来源 Source
<i>V. alginolyticus</i>		
ZJ-T	Ap ^r (ampicillin resistant), translucent/smooth variant of wild strain ZJ-51 ^[19] ; isolated from diseased <i>Epinephelus coioides</i> off the Southern China coast	[19]
ZJ-T- Δ <i>srvg23535</i>	Ap ^r ; ZJ-T carrying a deletion of <i>srvg23535</i>	This study
<i>E. coli</i>		
Π 3813	lacIQ, <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA462</i> , <i>zei298::Tn10</i> [Tc], Δ <i>thyA::erm-pir116</i> ; suicide vector pSW7848's intermediate host	[21]
GEB883	WT <i>E. coli</i> K12 Δ <i>dapA::erm pir</i> RP4-2 Δ <i>recA gyrA462</i> , <i>zei298::Tn10</i> ; donor strain for conjugation	[22]
Plasmids		
pSW7848	Cm ^r ; suicide vector with an R6K origin, requiring the Pir protein for its replication, and the <i>ccdB</i> toxin gene	[20]
pSW7848- Δ <i>srvg23535</i>	Cm ^r ; pSW7848 containing the mutant allele of Δ <i>srvg23535</i>	This study

注: Cm^r 和 Ap^r 分别表示氯霉素和氨苄青霉素抗性。

Note: Cm^r and Ap^r indicate chloramphenicol and ampicillin resistance, respectively.

1.1.2 主要试剂和仪器

高保真酶 PrimeSTAR® Max DNA polymerase、限制性内切酶 *Dpn* I 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 用于营养缺陷型大肠杆菌 II 3813 生长的 2'-Deoxythymidine (Thy) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 用于营养缺陷型大肠杆菌 GEB883 生长的 2,6-Diaminopimelic acid (DAP) 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 用于等温组装的试剂盒 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。用于 PM (Phenotype MicroArray) 板细菌代谢实验测定 OD_{590} 的 MultiDisk Ascent 读板仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基、TSB (Tryptic soy broth) 培养基购

自 BD 公司。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。TSB 培养基(g/L): 胰酪蛋白胨 17.0, 大豆蛋白胨 3.0, D-葡萄糖 2.5, NaCl 5.0, K_2HPO_4 2.5。固体培养基含琼脂 15.0。在 LB 培养基基础上将 NaCl 浓度提高至 3% 即配制得到 LBS 培养基。

1.2 *srvg23535* 突变株的构建

参考 Deng 等^[23]的方法通过同源重组技术构建 *srvg23535* 缺失突变株, *srvg23535* 的序列信息见图 1, 所用引物见表 2, 但在重组质粒的构建以及反向筛选过程略有修改。将线性化载体与上、下游同源臂片段通过等温组装得到重组自杀质粒 pSW7848- Δ *srvg23535*。接合作用之后, 由于自杀质粒 pSW7848 携带氯霉素抗性, 且不能在溶藻弧菌中复制, 并在受阿拉伯糖诱导后毒性基因 *ccdB*

```
GGCCTCTGAAGAGGCACCTGTGGAGGGA .....1 034 bp.....CTTTCGAT
GATAAAAAACAGACTAAACTCTTACAAACCACTGACATTAGAAGCC
AAGCCTAATACTACTATTTATCCCGAATAGACAACCTTTTGTCTTTC
TGATGATTAATAGATTGGCTCATATTGTTACATTCTGAATAGACT
TCGCGAGTTTCCTCAGGAACTCGCTTTTTTTGCTAAAATTCGG
GTAATTAAG .....1 066 bp.....GGACGTGTAGGTGATGGCGAATGGTA
```

图 1 *srvg23535* 的序列信息

Figure 1 The sequence information of *srvg23535*

注: 加粗、斜体部分为 *srvg23535* 的序列, 下划线部分依次为上、下游同源臂扩增的引物对。

Note: The italic and bold part is the sequence of *srvg23535* and the underlined parts are the primer pairs for the amplification of two flanking fragments.

表 2 缺失突变株构建所用引物

Table 2 Nucleotide sequences of deletion mutants construction primers

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
pSW7848-F	GTCTGATTCGTTACCAATTATGACAAC	3 310
pSW7848-R	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC	
<i>srvg23535</i> -UP-F	AAGCTTGATATCGAATTCGAGGCACCTGTGGAGGGA	1 084
<i>srvg23535</i> -UP-R	GAATTTTAGGTAAGAGTTAAGTCTGTTTTTTATCATCGAAAG	
<i>srvg23535</i> -DOWN_F	TAACTCTTACCTAAAATTCCGCTAATTAAG	1 105
<i>srvg23535</i> -DOWN-R	TTGGTAACGAATCAGACCCATCACCTAACACGTCC	
Del-check-pSW7848-F	TCACTGTCCCTTATTTCGCACC	2 474
Del-check-pSW7848-R	CTGCTTTTGAGCACTACCCG	
Δ <i>srvg23535</i> -check-F	GGCCTCCTATGCCTCAATCAAAG	618 (ZJ-T)/463
Δ <i>srvg23535</i> -check-R	CATGTTGCGTTGATGCGTTCATTAC	(ZJ-T- Δ <i>srvg23535</i>)

表达。因此,通过氯霉素以及阿拉伯糖先后两次筛选后,自杀质粒上的 *srvg23535* 上下游同源臂片段与溶藻弧菌基因组的 *srvg23535* 上下游同源臂片段先后发生两次同源交换,从而获得溶藻弧菌 *srvg23535* 缺失株,命名为 ZJ-T- Δ *srvg23535*。

1.3 LBS 平板上的菌落表型测试

参考邓益琴等^[24]的方法进行菌落表型测试:将单个克隆的溶藻弧菌野生株 ZJ-T 及小 RNA 突变株 ZJ-T- Δ *srvg23535* 分别接种至 LBS 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养过夜(下同);调整培养液浓度至相同吸光度($OD_{600}=1.0$),取 5 μ L 平行 3 次点样到 LBS 固体平板上,30 °C 静置培养 24 h,观察菌落形态。实验至少重复 3 次。

1.4 0.3%琼脂 LB 平板上 Swimming 运动性测试

参考邓益琴等^[24]的方法进行运动性测试:同 1.3 培养过夜菌液,调整培养液浓度至相同吸光度($OD_{600}=1.0$),取 5 μ L 平行 3 次点样到 0.3%琼脂半固体 LB 平板上,30 °C 静置培养 16 h,测量菌斑直径。实验至少重复 3 次。

1.5 1%脱脂奶粉 LBS 平板上的胞外蛋白酶分泌测试

参考邓益琴等^[24]的方法进行胞外蛋白酶分泌测试:同 1.3 培养过夜菌液,调整培养液浓度至相同吸光度($OD_{600}=5.0$),取 5 μ L 平行 3 次点样到 LBS 添加 1%脱脂奶粉平板上,30 °C 静置培养 24 h,测量蛋白分解圈直径以及克隆直径。实验至少重复 3 次。

1.6 TSB 平板上对 H_2O_2 、 Cu^{2+} 抗性以及对铁离子的吸收测试

参考邓益琴等^[24-25]的方法进行对 H_2O_2 、 Cu^{2+} 抗性以及对铁离子的吸收测试:同 1.3 培养过夜菌液,调整培养液浓度至相同吸光度($OD_{600}=5.0$),同时 10 倍比稀释各菌株菌液至最高稀释倍数为 10^6 ,然后将倍比稀释菌液依次取 5 μ L 平行 3 次点样到 TSB 平板,以及 TSB 添加 0.001 5% H_2O_2 或 5 mmol/L $CuSO_4$ 或 120 μ mol/L DIP 平板上,30 °C 静置培养 24 h,观察细菌生长情况。实验至少重复 3 次。

1.7 LBS 平板上对不同抗生素的敏感性测试

参考 Deng 等^[23]的方法进行对不同抗生素的敏感性测试:同 1.3 培养过夜菌液,将 200 μ L 过夜菌液与 10 mL 新鲜 TSB 液体培养基混匀后倒入 TSB 平板(12 cm,正方形),待平板被稀释菌液浸湿后将剩余菌液倒掉,平板晾干后将各抗生素纸片置于平板上,30 °C 静置培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径。重复测试 3 次,使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 作为统计学显著性的阈值。

1.8 不同培养条件下的菌株生长情况测试

参考 Deng 等^[23]的方法进行不同培养条件下的菌株生长情况测试:同 1.3 培养过夜菌液。(1) 为测试细菌在富营养培养基中的生长:菌株用新鲜 LBS 培养液稀释至 OD_{600} 为 1.0 后再分别稀释 1 000 倍培养。(2) 为测试细菌在寡营养培养基中生长,12 000 \times g 离心 10 min 收集过夜细菌,并用不含 D-葡萄糖和 $(NH_4)_2SO_4$ 的 M63 培养基(M63-C-N)洗涤 2 次,然后重悬并稀释至 OD_{600} 为 0.1 于以下修饰的 M63:测试细菌对不同碳源的利用,则 M63 寡营养培养基中 D-葡萄糖被替换成其他碳水化合物(D-葡萄糖, D-蔗糖, D-麦芽糖, D-葡萄糖, D-果糖, D-海藻糖)作为单一碳源;测试细菌以葡萄糖作为单一碳源,以不同氨基酸作为单一氮源的生长情况,则 $(NH_4)_2SO_4$ 被不同氨基酸代替(150 mmol/L L-丙氨酸, 50 mmol/L L-苏氨酸, 10 mmol/L L-天冬氨酸, 10 mmol/L L-谷氨酸, 50 mmol/L L-丝氨酸, 50 mmol/L L-精氨酸, 50 mmol/L L-组氨酸盐酸, 10 mmol/L L-谷氨酰胺盐, 20 mmol/L L-亮氨酸, 20 mmol/L L-缬氨酸, 20 mmol/L L-异亮氨酸以及 3 种支链氨基酸混合物各 20 mmol/L)。然后将稀释好的菌液 100 μ L/孔吸取至 96 孔板中,30 °C、200 r/min 连续振荡温育。使用 MultiDisk Ascent 读板仪相同时间间隔测定 OD_{600} ,指示细菌的代谢活性。重复实验 3 次,使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素协方差分析(ANCOVA) (以野生株和突变株为固定因子,以时间为协变量,以 OD_{600}

值为因变量), 并对显著差异的因子各时间点进行 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 作为统计学显著性的阈值。

1.9 PM 板测试细菌代谢

参考 Bochner 等^[26]的方法, 利用 PM02 和 PM08 板分别测试细菌对 95 种不同碳源以及 95 种不同多肽氮源的利用。细菌在 LBS 固体平板上划线复活, 30 °C 静置培养过夜。首先, 510 μ L 的染料 A 与 7 990 μ L 含 14% NaCl 的水溶液一起加入 1.2 \times IF-0 得到 51 mL 的 1.0 \times IF-0; 其次, 对于每个菌株, 用灭菌棉签刮取固体平板上的克隆, 重悬在 25 mL 的 1.0 \times IF-0 中, 得到浊度为 85% 的孵育液; 然后, 对于 PM02 板, 每孔吸取浊度为 85% 的孵育液 100 μ L, 对于 PM08 板, 向浊度为 85% 的孵育液中加入适当体积的 2 mol/L 的琥珀酸钠, 使得最终浓度为 20 mmol/L, 并每孔吸取 100 μ L 孵育液; 最后, 将准备好的孵育板于 30 °C 静置培养 5 d, 并在不同的时间点测定 OD_{590} , 指示细菌

的代谢活性。重复实验 3 次, 使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素协方差分析(ANCOVA)(以野生株和突变株为固定因子, 以时间为协变量, 以 OD_{590} 值为因变量), 并对显著差异的因子各时间点进行 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 作为统计学显著性的阈值。

2 结果与分析

2.1 突变株的构建

扩增得到的质粒线性化片段以及上游同源臂片段, 电泳结果与预期大小相符(图 2A、B); 等温组装后, 重组自杀质粒 PCR 扩增检测电泳结果与预期大小相符(图 2C), 证实重组自杀质粒 pSW7848- Δ *srvg23535* 构建成功。接合作用后经过两次同源交换, 可能使溶藻弧菌染色体上的 *srvg23535* 缺失, 经 PCR 检测, 溶藻弧菌野生株可扩增出大小为 618 bp 的片段, 而 *srvg23535* 缺失株则扩增出大小为 463 bp 的片段(图 2D), 从而获得

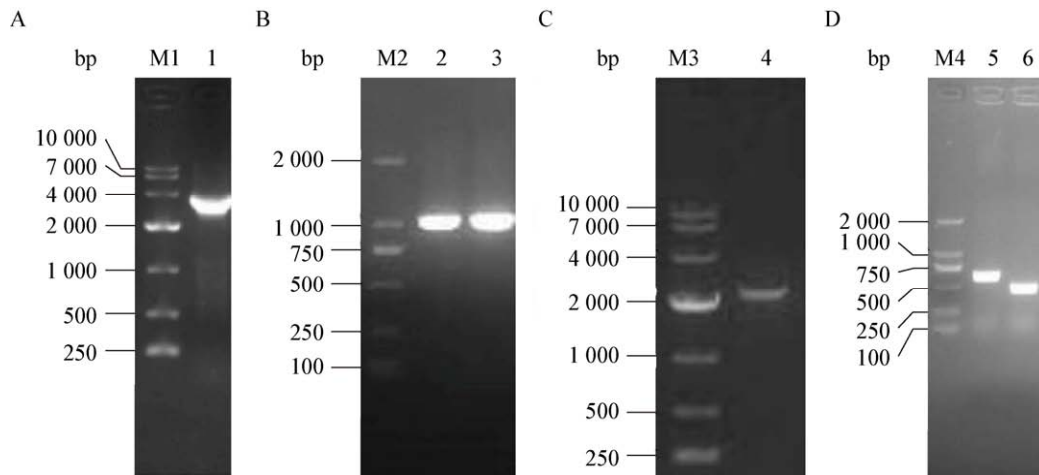


图 2 pSW7848 PCR 线性化片段(A)、*srvg23535* 上下游同源臂片段(B)、重组自杀质粒的 PCR 鉴定扩增片段(C)以及 *srvg23535* 缺失株的 PCR 鉴定(D)

Figure 2 Linearized segment of pSW7848 (A), upstream and downstream homologous segments of *srvg23535* (B), the segment of identification of the recombinant suicide vector by PCR (C) and identification of *srvg23535* deletion mutant by PCR (D)

注: M1、M3: DL10000 DNA marker; M2、M4: DL2000 DNA marker; 1: pSW7848 线性化片段; 2/3: *srvg23535* 上/下游片段; 4: 重组子 pSW7848-*srvg23535* 检测片段; 5: 野生株 ZJ-T; 6: *srvg23535* 候选突变株。

Note: M1, M3: DL10000 DNA marker; M2, M4: DL2000 DNA marker; 1: Linearized segment of pSW7848; 2/3: UP/DOWN segments of *srvg23535*; 4: The segment of identification of the recombinant suicide vector by PCR; 5: Wild type ZJ-T; 6: The deletion candidate of *srvg23535*.

溶藻弧菌 *srvg23535* 缺失株。图 2 所有扩增结果与预期大小相符, 测序结果也与预期序列一致, 说明构建得到 *srvg23535* 缺失株。

2.2 菌落形态测试

srvg23535 缺失后, 在 LBS 平板上菌落表型相对野生株均无变化, 菌落表现为透明光滑, 并且存在涌动性(Swarming), 这说明 *srvg23535* 不参与调控溶藻弧菌的菌落形态(图 3)。

2.3 运动性(Swimming)检测

srvg23535 缺失后, 在 0.3%琼脂 LB 平板上的运动性相对野生株无显著变化, 这说明 *srvg23535* 不参与调控溶藻弧菌的运动性(图 4)。

2.4 胞外蛋白酶分泌检测

srvg23535 缺失后, 在 1%脱脂奶粉 LBS 平板

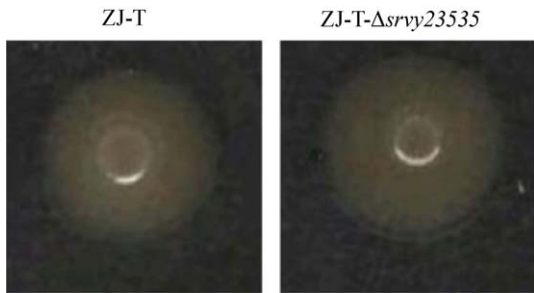


图 3 野生株和 *srvg23535* 突变株在 LBS 平板上的菌落形态

Figure 3 Colony morphology of the wild type and the *srvg23535* mutant on LBS plates

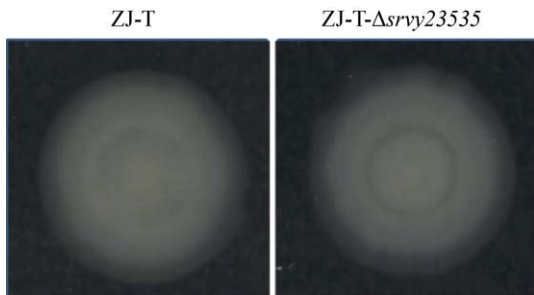


图 4 野生株和 *srvg23535* 突变株在 0.3%琼脂 LB 平板上的运动性

Figure 4 Swimming of the wild type and the *srvg23535* mutant on 0.3% LB agar plates

上, 菌株胞外蛋白酶的分泌相对野生株没有显著差异, 该结果表明 *srvg23535* 不参与调控溶藻弧菌胞外蛋白酶的分泌(图 5)。

2.5 对 H₂O₂、Cu²⁺抗性以及对铁离子的吸收测试

过量的铜离子催化大量羟基自由基的形成, 如同过氧化氢产生强的氧化压力, 从而对细胞产生毒性; 此外, 摄铁系统是溶藻弧菌重要致病因子之一^[24-26]。*srvg23535* 缺失后, 突变株相对野生株对 H₂O₂、Cu₂SO₄ 抗性以及对铁离子的获取无显著差异, 这说明 *srvg23535* 不参与调控溶藻弧菌对 H₂O₂、Cu²⁺的抗性以及对铁离子的吸收(图 6)。

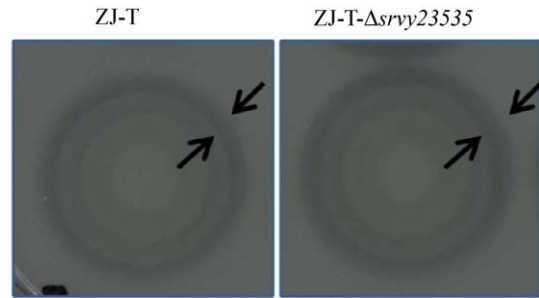


图 5 野生株和 *srvg23535* 突变株在 1%脱脂奶粉 LBS 平板上的胞外蛋白酶分泌圈

Figure 5 Extracellular protease secretion loop of the wild type and the *srvg23535* mutant on 1% skimmed milk LBS plates

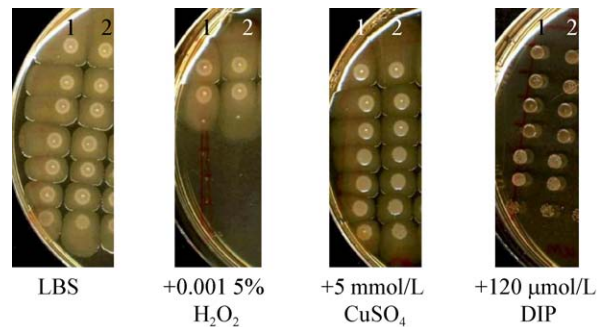


图 6 野生株和 *srvg23535* 突变株对 H₂O₂、CuSO₄ 以及铁离子螯合剂 DIP 的敏感性

Figure 6 Sensitivity to H₂O₂, CuSO₄ and DIP of the wild type and the *srvg23535* mutant on LBS plate

注: 1: ZJ-T; 2: ZJ-T-Δ*srvg23535*.

Note: 1: ZJ-T; 2: ZJ-T-Δ*srvg23535*.

2.6 抗生素敏感性测试

srvg23535 缺失后, 突变株相对野生株对所测试的 30 种抗生素敏感性无显著差异; 野生株和 *srvg23535* 突变株对包括林可霉素、万古霉素、克林霉素在内的 12 种抗生素具有抗性, 对其他 18 种抗生素表现出不同程度的敏感, 但是野生株和突变株之间无明显的差异 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.7 *srvg23535* 缺失对溶藻弧菌代谢的影响

(1) 在富营养培养基中, 突变株的生长与野生型相同 ($P > 0.05$); 在不同单一碳源和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源的培养基中, 仅当以 D-海藻糖为单一碳源时, *srvg23535* 缺失株稳定期相比野生株生长量更小 (One-way ANCOVA, $F=81.194$, $P < 0.001$; Student's *t* 检验, 6.0–24.0 h 之间, 各时间点 $P < 0.05$) (图 7F), 说明 *srvg23535* 正调控溶藻弧菌对 D-海藻糖的利用。

(2) M63 中以葡萄糖作为单一碳源, 以不同氨基酸作为单一氮源时, ZJ-T- Δ *srvg23535* 与野生株生长无明显差异 ($P > 0.05$) (图 8)。

(3) PM02 测试了细菌对 95 种不同碳源的利用, 发现 *srvg23535* 缺失后, 细菌以果胶为碳源时, 在稳定期相对野生株生长量更大 (One-way ANCOVA, $F=23.024$, $P < 0.001$; Student's *t* 检验, 19.5 h 之后, 各时间点 $P < 0.05$) (图 9A), 说明 *srvg23535* 负调控溶藻弧菌对果胶的代谢。

(4) PM08 测试了细菌对 95 种不同多肽的利用, 发现 *srvg23535* 缺失后, 可利用丙氨酸-天冬氨酸为氮源, 而野生株不能利用其为氮源 (One-way ANCOVA, $F=212.914$, $P < 0.001$; Student's *t* 检验, 0.0 h 之后, 各时间点 $P < 0.05$) (图 9B), 此外, 当以丙氨酸-谷氨酰胺为氮源时, 突变株在潜伏期生长更快, 并且稳定期相对野生株生长量更大 (One-way ANCOVA, $F=22.089$, $P < 0.001$; Student's *t* 检验, 4.0 h 之后, 各时间点 $P < 0.05$) (图 9C), 说明 *srvg23535* 负调控溶藻弧菌对丙氨酸-天冬氨酸和丙氨酸-谷氨酰胺的代谢。

表 3 野生株和 *srvg23535* 突变株对各抗生素的抗性

Table 3 The antibiotics resistance of the wild type and the *srvg23535* mutant

抗生素 Antibiotics	浓度 Concentration (μg per disk)	抑菌圈直径 Size of inhibition zone (mm)	
		ZJ-T	ZJ-T- Δ <i>srvg23535</i>
Lincomycin	2	–	–
Vancomycin	30	–	–
Clindamycin	2	–	–
Chloramphenicol	300	21.00 \pm 1.41	22.00 \pm 2.83
Ampicillin	10	–	–
Oxacillin	1	–	–
Piperacillin	100	–	–
Kanamycin	30	–	–
Penicillin-G	10	–	–
Cefazolin	30	11.00 \pm 1.41	11.00 \pm 1.41
Tobramycin	10	12.50 \pm 0.71	11.00 \pm 0.00
Neomycin	30	13.67 \pm 2.52	15.67 \pm 2.08
Novobiocin	30	21.00 \pm 5.66	20.00 \pm 4.24
Tetracycline	30	15.67 \pm 6.03	19.00 \pm 4.24
Erythromycin	15	12.00 \pm 2.65	14.67 \pm 0.58
Medemycin	30	11.50 \pm 0.71	13.00 \pm 1.41
Polymyxin B	300	12.33 \pm 2.31	13.50 \pm 2.12
Doxycycline	30	19.50 \pm 3.54	20.50 \pm 3.54
Acetylspiramycin	30	–	–
Spectinomycin	100	10.33 \pm 1.53	10.50 \pm 2.12
Minocycline	30	24.00 \pm 5.66	25.50 \pm 6.36
Cefixime	5	10.67 \pm 1.53	11.00 \pm 1.41
Amoxicillin	10	–	–
Azithromycin	15	–	–
Clarithromycin	15	12.33 \pm 0.58	13.50 \pm 0.71
Roxithromycin	15	11.00 \pm 1.41	11.50 \pm 2.12
Teicoplanin	30	–	–
Fosfomycin	200	17.33 \pm 2.31	19.00 \pm 2.83
Streptomycin	300	11.33 \pm 1.53	10.33 \pm 0.58
Gentamicin	120	18.00 \pm 4.36	18.67 \pm 3.21

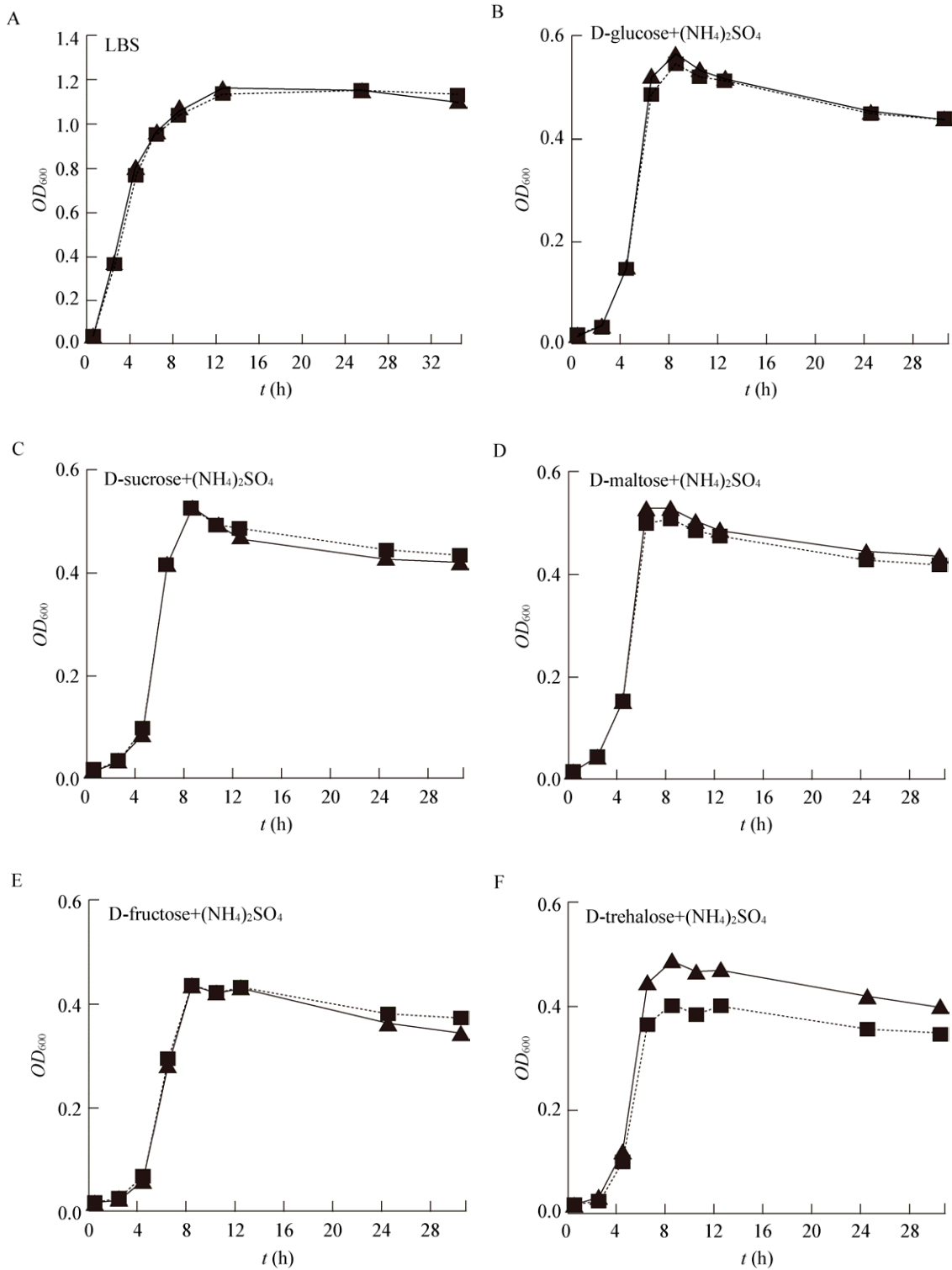


图 7 *srvg23535* 缺失对富培养基中生长和各种碳源利用的影响

Figure 7 Effect of *srvg23535* deletion on the growth in rich medium and the utilization of various carbon sources

注: ▲—: ZJ-T; ■---: ZJ-T- Δ *srvg23535*; 误差线对应于标准偏差.

Note: ▲—: ZJ-T; ■---: ZJ-T- Δ *srvg23535*; Error bars correspond to standard deviations.

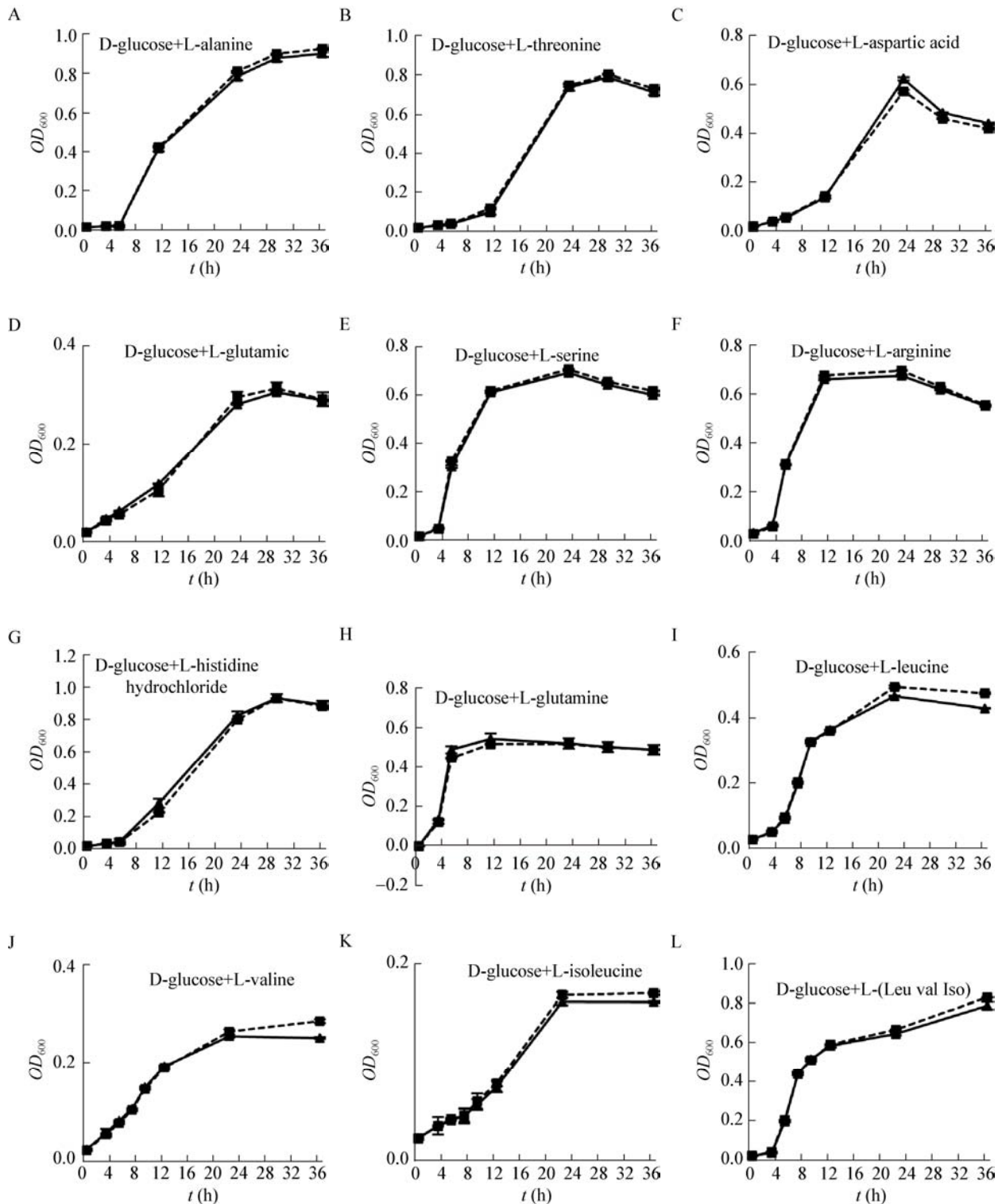


图 8 *srvg23535* 缺失对各种氨基酸作为单一氮源利用的影响

Figure 8 Effect of *srvg23535* deletion on the utilization of various amino acids as sole nitrogen source

注: —▲— : ZJ-T; -■- : ZJ-T- Δ *srvg23535*; 误差线对应于标准偏差。

Note: —▲— : ZJ-T; -■- : ZJ-T- Δ *srvg23535*; Error bars correspond to standard deviations.

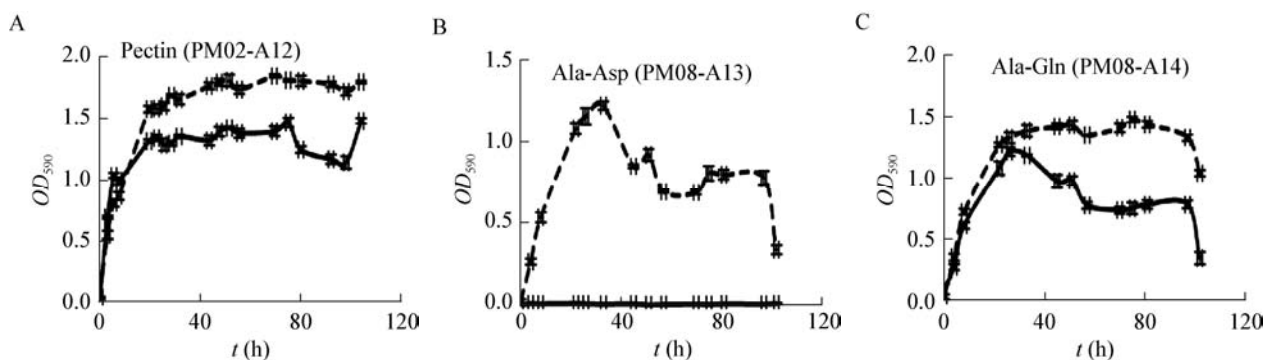


图9 *srvg23535* 缺失对果胶为单一碳源、丙氨酸-天冬氨酸和丙氨酸-谷氨酰胺为单一氮源利用的影响

Figure 9 Effect of *srvg23535* deletion on the utilization of pectin as sole carbon source, and the utilization of Ala-Asp or Ala-Gln as sole nitrogen source

注: ——: ZJ-T, - - - - : ZJ-T- Δ *srvg23535*; 误差线对应于标准偏差。

Note: ——: ZJ-T, - - - - : ZJ-T- Δ *srvg23535*; Error bars correspond to standard deviations.

3 讨论与结论

菌落形态、运动性、胞外蛋白酶分泌、对 H_2O_2 和 Cu^{2+} 的压力感应、铁离子摄取、抗生素抗性以及对不同营养物质利用程度等均被报道与细菌环境适应相关^[23,27]。近年来,原核小 RNA 的基因调控作用越来越受到重视^[28-29]。小 RNA 通过与 mRNA 碱基配对,调控 mRNA 的稳定性,从而达到转录后调控蛋白表达的目的^[29]。小 RNA 已被报道参与调控多种生物过程,如 Spot42 和 SgrS 调控糖代谢^[29], GcvB 和 SR1 调控氨基酸代谢^[30-32], Qrrs 和 CsrBs 调控群感效应^[12,33], RybB 和 MicA 调控外膜蛋白合成^[34], 以及 Fur 调控铁平衡^[35]。很多小 RNA 还可同时参与调控多种生物过程,如 CsrB 既调控群感效应,又调控碳代谢^[36]。本研究中,我们以 pSW7848 自杀质粒为载体,通过等温组装和同源重组筛选技术,成功构建溶藻弧菌小 RNA *srvg23535* 缺失突变株,并对野生株和突变株的生物学特性进行了比较研究。

通过生物学特性比较,发现 *srvg23535* 缺失后并不影响溶藻弧菌的菌落形态、运动性、胞外蛋白酶分泌、对 H_2O_2 和 Cu_2SO_4 的压力感应、对铁的吸收利用、对所测试的 30 种抗生素抗性以及对所测试的大多数单一碳源、单一氮源的利用。但 *srvg23535* 缺失后,对 D-海藻糖的代谢减弱,表现为稳定期生长量更小;对果胶的代谢增强,表现为

稳定期生长量更大;对丙氨酸-谷氨酰胺的代谢增强,表现为潜伏期生长更快,并且稳定期生长量更大;并变得可利用丙氨酸-天冬氨酸作为氮源。截至目前仅发现 SR1 一个既参与氨基酸代谢又参与碳代谢的小 RNA,并在细菌中高度保守^[31-32]。SR1 是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中发现的第一个双功能小 RNA,既能以 RNA 调控子形式调控精氨酸代谢,同时也能编码多肽调控 *gapA* 操纵子,从而参与调控糖分解^[31-32]。因此, *srvg23535* 很可能是第二个被发现的既参与碳代谢又参与氮代谢的小 RNA,但是否都以小 RNA 形式在 RNA 水平进行调控,还是类似 SR1 既能以小 RNA 形式在 RNA 水平进行调控,又能编码成小肽进行蛋白水平的调控,仍需进一步研究揭示。

海藻糖作为一种碳源被储存在生物体内,必要的时候被分解代谢提供能量^[37];同时,海藻糖作为许多生物的应急代谢物,对生物在逆境中的生存起着重要作用,如酿酒酵母在干燥脱水、热休克和高氧化等环境中其胞内海藻糖含量会显著升高^[38-39],低温环境下大肠杆菌体内海藻糖含量会显著增加^[40]。本研究发现 *srvg23535* 缺失后,以 D-海藻糖为单一碳源生长时,稳定期的生长量降低,但是前期的生长速度与野生株无显著差异。我们推测,稳定期细菌处于营养饥饿以及缺氧等胁迫条件下, *srvg23535* 缺失后,一方面影响稳定期 D-

海藻糖从体外转运到体内储存,另一方面影响 D-海藻糖的分解代谢,从而导致其稳定期生长量降低。对野生株基因组^[41]序列信息分析发现,其基因组上存在一个海藻糖转运代谢的操纵子 *treRBC*,因此, *srvg23535* 可能通过调控 *treRBC* 的表达而调控海藻糖的转运和代谢,具体调控机制需要进一步研究。果胶是一类杂多糖,由以 D-半乳糖醛酸为主,少量 D-半乳糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、L-岩藻糖等多达 12 种单糖组成^[42-43],因此对果胶的代谢也涉及多种酶的共同作用。本研究发现 *srvg23535* 缺失后,以果胶为碳源生长时,稳定期的生长量增加,因此 *srvg23535* 可能调控了其中一种或者多种单糖的代谢,但是具体调控作用需要进一步以各单糖作为单一碳源进行代谢测试鉴定。

氨基酸作为蛋白质的基本骨架,酶的主要成分参与能量供给、酶催化、碳氮代谢等几乎所有生命活动,其精细调控对细菌生命活动具有重要意义。能量供给过程,氨基酸主要通过脱氨或者转氨作用,进而进入三羧酸循环,氧化供能。本研究发现, *srvg23535* 缺失后,缺失株对丙氨酸-谷氨酰胺的代谢增强,并可利用丙氨酸-天冬氨酸为氮源;但当以 L-丙氨酸、L-谷氨酰胺盐和 L-天冬氨酸单独作为氮源时, *srvg23535* 缺失前后生长并无差异,因此 *srvg23535* 很有可能通过调控丙氨酸-谷氨酰胺和丙氨酸-天冬氨酸的转运以及分解成单一氨基酸过程,从而影响细菌生长,但不直接调控二肽的降解代谢。基因组^[41]序列信息分析发现,溶藻弧菌 ZJ-T 基因组上存在多个寡肽转运蛋白,如 BAU10_09580、BAU10_15980 和 BAU10_15990,因此 *srvg23535* 可能通过调控这些基因的表达从而调控溶藻弧菌碳氮代谢,具体调控机制需要进一步深入研究。

本研究中,我们对溶藻弧菌小 RNA *srvg23535* 的环境适应调控功能进行了初探,发现 *srvg23535* 与溶藻弧菌的 D-海藻糖、果胶、丙氨酸-谷氨酰胺和丙氨酸-天冬氨酸代谢相关。小 RNA 的调控方式主要是与 mRNA 配对,影响其稳定性,从而达到调控基因表达的目的。因此,下一步将对野生株和

突变株的基因表达谱进行分析,通过比较野生株和突变株基因表达的差异,并结合本研究发现的调控表型,找出 *srvg23535* 调控的可能靶标基因,并通过凝胶迁移结合(EMSA)实验、双质粒荧光报告基因相互作用检测系统^[44]等鉴定 *srvg23535* 与靶标基因的相互作用机制,从而阐明 *srvg23535* 对溶藻弧菌碳氮代谢的基因调控机制。

REFERENCES

- [1] Siddiqui R, Alam MM, Naser MN, et al. Prevalence of *Vibrio alginolyticus* in sediment samples of river and coastal areas of Bangladesh[J]. Bangladesh Journal of Microbiology, 2016, 29(1): 1-6
- [2] Citil BE, Derin S, Sankur F, et al. *Vibrio alginolyticus* associated chronic myringitis acquired in Mediterranean waters of Turkey[J]. Case Reports in Infectious Diseases, 2015, 2015(42): 187212-187214
- [3] Zheng TL, Wang GL, Jin S, et al. Studies on pathogen of ulcer disease of cultured large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* and its control medicines[J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(1): 5-10 (in Chinese)
郑天伦, 王国良, 金珊, 等. 养殖大黄鱼溃疡病的病原菌及其防治药物研究[J]. 南方水产科学, 2006, 2(1): 5-10
- [4] Newton A, Mahon BE. Increasing rates of *Vibriosis* in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems[J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54 (s5): S391-395
- [5] Baran I, Acar A, Genç Y, et al. Case report: A case of otitis externa due to *Vibrio alginolyticus*[J]. Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology, 2016, 73(1): 49-54
- [6] Gaüzère BA, Chanareille P, Vandroux D. Post nearly drowning *Vibrio alginolyticus* septicemia acquired in reunion (Indian ocean)[J]. Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique, 2016, 109(3): 151-154
- [7] Chen C, Xie J, Hu C. Phenotypic and genetic differences between opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus*[J]. Biofouling, 2009, 25(6): 525-531
- [8] Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18(4): 96-104
- [9] Alonso CR. Post-transcriptional gene regulation via RNA control[M]. Humana Press, 2008
- [10] Wang Z, Sun X, Zhao Y, et al. Evolution of gene regulation during transcription and translation[J]. Genome Biology & Evolution, 2015, 7(4): 1155-1167
- [11] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J]. Molecular Cell, 2011, 43(6): 880-891
- [12] Lenz DH, Miller M B, Zhu J, et al. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(4): 1186-1202
- [13] Liu JM, Camilli A. A broadening world of bacterial small RNAs[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(1): 18-23

- [14] Toledo-Arana A, Repoila F, Cossart P. Small noncoding RNAs controlling pathogenesis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(2): 182-188
- [15] Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, et al. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(19): 6620-6636
- [16] Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, et al. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Nature*, 2010, 464(7286): 250-255
- [17] Huang L, Hu J, Su Y, et al. Identification and characterization of three *Vibrio alginolyticus* non-coding RNAs involved in adhesion, chemotaxis, and motility processes[J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2015, 5 : 56-68
- [18] Huang L, Hu J, Su Y, et al. Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs related to the adhesion process in *Vibrio alginolyticus* using high-throughput sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7 : 619-628
- [19] Huang X, Chen C, Ren C, et al. Identification and characterization of a locus putatively involved in colanic acid biosynthesis in *Vibrio alginolyticus* ZJ-51[J]. *Biofouling*, 2017, 34(1): 1-14
- [20] Val ME, Skovgaard O, Ducos-galand M, et al. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(1): e1002472
- [21] Le RF, Binesse J, Saulnier D, et al. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 777-784
- [22] Nguyen AN, Disconzi E, Charrière GM, et al. *csrB* gene duplication drives the evolution of redundant regulatory pathways controlling expression of the major toxic secreted metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32[J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00582-18
- [23] Deng YQ, Chen C, Zhao Z, et al. The RNA chaperone Hfq is involved in colony morphology, nutrient utilization and oxidative and envelope stress response in *Vibrio alginolyticus*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163689
- [24] Deng YQ, Zhao Z, Liu SL, et al. Preliminary research of effect of different carbon sources on adhesion-related phenotypes in *Vibrio alginolyticus*[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(11): 99-107 (in Chinese)
邓益琴, 赵哲, 刘松林, 等. 不同碳源对溶藻弧菌黏附相关表型的影响初探及 Hfq 对其的调控[J]. *海洋科学*, 2016, 40(11): 99-107
- [25] Deng YQ, Zhao JJ, Liu SL, et al. Role of *hfq* in virulence regulation of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 604-611 (in Chinese)
邓益琴, 赵晶晶, 刘松林, 等. Hfq 对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)毒力的调控分析[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(3): 604-611
- [26] Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function[J]. *Genome Research*, 2001, 11(7): 1246-1255
- [27] Ahmad S, Ahmad M, Khan S, et al. An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation[J]. *Jpma the Journal of the Pakistan Medical Association*, 2017, 67(2): 285-291
- [28] Vogel J. A rough guide to the non - coding RNA world of *Salmonella*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(1): 1-11
- [29] Wagner EGH, Romby P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it[J]. *Advances in Genetics*, 2015, 90: 133-208
- [30] Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(4): 856-868
- [31] Heidrich N, Moll I, Brantl S. In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(13): 4331-4346
- [32] Gimpel M, Heidrich N, Mäder U, et al. A dual-function sRNA from *Bacillus subtilis*: SR1 acts as a peptide encoding mRNA on the *gapA* operon[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(4): 990-1009
- [33] Nguyen AN, Jacq A. Small RNAs in the *Vibrionaceae*: an ocean still to be explored[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Rna*, 2014, 5(3): 381-392
- [34] Kai P, Pfeiffer V, Mika F, et al. σE - dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global *omp* mRNA decay[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(6): 1674-1688
- [35] Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(7): 4620-4625
- [36] Revelles O, Millard P, Nougayrède JP, et al. The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66386
- [37] Becker A, Schlöder P, Steele JE, et al. The regulation of trehalose metabolism in insects[J]. *Experientia*, 1996, 52(5): 433-439
- [38] Attfield PV. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response[J]. *FEBS Letters*, 1987, 225(1-2): 259-263
- [39] Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(26): 24261-24267
- [40] Kandror O, Deleon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(15): 9727-9732
- [41] Deng Y, Chen C, Zhao Z, et al. Complete Genome Sequence of *Vibrio alginolyticus* ZJ-T[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(5): e00912-16
- [42] Pérez S, Mazeau K, Penhoat CHD. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2000, 38(1-2): 37-55
- [43] Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 266-277
- [44] Urban JH, Vogel J. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(3): 1018-1037