

论著·基础研究

## 鼠伤寒沙门菌中假定转录调控因子的筛选

刘舒婷, 姚玉峰, 倪进婧

上海交通大学基础医学院病原生物学教研室, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·基因组信息学分析结合分子生物学实验对鼠伤寒沙门菌中假定转录调控因子进行筛选, 以期发现新的转录调控因子和调控机制。**方法**·通过沙门菌基因组信息分析筛选得到 30 个假定转录调控因子, 利用  $\lambda$ -Red 同源重组系统敲除各目的基因。酸耐受实验检测各敲除株在对数期酸耐受应答中的差异; 细胞感染模型检测各敲除株上皮细胞入侵能力和巨噬细胞内复制能力; 利用 realtime-PCR 检测突变株中 *phoP* 及其下游基因的转录水平。**结果**·成功构建 30 个敲除株。 $\Delta$ STM14\_0739、 $\Delta$ STM14\_2717 和  $\Delta$ STM14\_1646 对数期酸耐受能力较 WT 增强,  $\Delta$ STM14\_1878、 $\Delta$ STM14\_4338 和  $\Delta$ STM14\_1965 则较 WT 减弱。 $\Delta$ STM14\_0739 和  $\Delta$ STM14\_2717 对 HeLa 细胞的入侵率降低,  $\Delta$ STM14\_1878 和  $\Delta$ STM14\_2717 在 RAW264.7 细胞内的 24 h 复制率提高。Realtime-PCR 结果显示 STM14\_2717 敲除并不影响 *phoP* 转录。**结论**·研究发现了新的转录调控因子, 为深入研究沙门菌致病机制提供新的方向。

**[关键词]** 鼠伤寒沙门菌; 转录调控因子; 酸耐受; 细胞入侵及胞内复制

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.007 **[中图分类号]** R37 **[文献标志码]** A

### Screening of putative transcriptional regulators in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

LIU Shu-ting, YAO Yu-feng, NI Jin-jing

Department of Pathogen Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To uncover new transcriptional regulators by screening putative transcriptional regulators in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) through genome informatics and molecular biology analyses. **Methods**·*S. Typhimurium* genome informatics was analyzed and 30 putative transcriptional regulators were screened out. All candidate genes were deleted by  $\lambda$ -Red system. The log-phase acid tolerance response (ATR) ability was compared between knock-out (KO) strains and wild type (WT) strain. Cell model was used to detect the invasion ability and intracellular ability of KO strains that showed differences in acid stress compared to WT strain. The transcription level of *phoP* was detected by realtime-PCR in the mutants involved in both ATR and cell infection. **Results**·All 30 deletion mutants were successfully constructed.  $\Delta$ STM14\_0739,  $\Delta$ STM14\_2717 and  $\Delta$ STM14\_1646 showed increased log-phase ATR ability, while ATR abilities of  $\Delta$ STM14\_4338,  $\Delta$ STM14\_1965 and  $\Delta$ STM14\_1878 decreased, compared with WT.  $\Delta$ STM14\_0739 and  $\Delta$ STM14\_2717 mutants showed weaker invasion ability in HeLa cells than WT, and  $\Delta$ STM14\_1878 and  $\Delta$ STM14\_2717 mutants showed stronger replication ability in RAW264.7 cells than WT. Realtime-PCR suggested STM14\_2717 deletion had no effect on *phoP* transcription. **Conclusion**·This work discovers unknown transcriptional regulators, and provides clues for future research in *S. Typhimurium* pathogenesis.

**[Key words]** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; transcriptional regulators; acid tolerance response; invasion and replication

鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. Typhimurium*) 作为食源性肠道细菌, 可经多种途径传播, 是引起人类胃肠道疾病的主要致病菌之一, 可引起感染者腹痛、腹泻、恶心、呕吐等症状。全球每年有相当数量的 *S. Typhimurium* 感染引起的新发病例, 给人类健康和社会经济带来重大危害<sup>[1]</sup>。

*S. Typhimurium* 通过被污染的食物或水被宿主摄入,

到达肠道上皮细胞并引发肠道疾病, 此过程首先须克服宿主胃的酸性环境。*S. Typhimurium* 在进化中形成多种酸环境应答机制<sup>[2]</sup>, 其中研究最多的是酸耐受 (acid tolerance response, ATR) 机制。ATR 机制是指, *S. Typhimurium* 经过弱酸环境的适应, 产生的酸激蛋白 (acid shock proteins, ASPs) 能够修复酸性环境下受损的大分子物质, 帮助其更好地适应强酸环境, 并增强其对细胞的入侵能力

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (31700121) (National Natural Science Foundation of China, 31700121)。

**[作者简介]** 刘舒婷 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: shooting\_lst@126.com。

**[通信作者]** 倪进婧, 电子信箱: nijinjing45@163.com。



及毒力<sup>[3]</sup>。

另外, *S. Typhimurium* 对宿主细胞的感染过程包括其对肠道上皮细胞的入侵<sup>[4]</sup>及在巨噬细胞内的复制<sup>[5]</sup>。*S. Typhimurium* 进化出一系列毒力因子, 其中主要的毒力因子位于沙门菌毒力岛 (*Salmonella* pathogenicity islands, SPIs) 上。沙门菌黏附上皮细胞, 引起宿主细胞骨架的重排以及膜褶皱的形成, 诱导宿主将黏附的沙门菌通过胞饮吞入胞内, 此过程主要依赖于 SPI-1 发挥作用。沙门菌成功入侵细胞后在包含沙门菌的液泡 (*Salmonella*-containing vacuoles, SCVs) 中, 能够生存并复制, 此过程主要依赖于 SPI-2 发挥作用<sup>[6]</sup>。

*S. Typhimurium* 在感染宿主过程中, 针对宿主内多种环境压力<sup>[7]</sup>, 需要快速做出应答以维持蛋白的稳定性和活性, 增强自身在宿主内的生存能力<sup>[8]</sup>。这种应答通常需要多种调控机制来实现<sup>[9]</sup>, 包括基因转录水平的调控、mRNA 翻译过程中的调控以及翻译后的调控。基因在转录水平的调控离不开转录调控因子的参与。转录调控因子通过结合于靶基因 DNA 序列而发挥转录调控作用<sup>[10]</sup>, 全局性的转录调控因子能够产生系统性的影响。此外, 自调控、共调控以及交叉调控<sup>[11]</sup>等共同丰富了原核生物的调控网络。通过这一复杂而高效的转录调控系统, 原核生物能够快速地对环境信号的瞬时变化。如双组分调控系统 PhoP/PhoQ 中的调控蛋白 PhoP, 能够在激活状态时结合于下游基因的启动子序列, 激活或抑制相关基因的转录, 由此参与沙门菌对低 pH<sup>[12]</sup>、低 Mg<sup>2+</sup><sup>[13]</sup> 的适应, 以及入侵上皮细胞<sup>[14]</sup>和在巨噬细胞内复制<sup>[15]</sup>等多种生命活动。此外, HilD<sup>[16]</sup>、Lrp<sup>[17]</sup>等转录调控蛋白也分别以不同方式参与对 *S. Typhimurium* 生命活动的调控。HilD 由 SPI-1 编码, 并介导许多基因对 SPI-1 的调控<sup>[18]</sup>。例如, HilD 介导 OmpR 对 SPI-1 的调控<sup>[19]</sup>, 进而影响了多种毒力相关基因的表达。

但是, 目前 *S. Typhimurium* 中依然存在众多结构功能未知的转录调控因子。基于此我们根据基因组信息学分析的结果, 筛选到 30 个可能的转录调控因子, 并构建了这些基因的敲除突变株, 依次通过 ATR 和细胞感染模型 2 种手段进行了检测, 旨在发现 *S. Typhimurium* 中更多的重要转录调控因子, 为沙门菌转录调控及致病性等研究提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞 出发菌株为 *S. Typhimurium*

14028s 菌株。pKD46、pKD3、pKD4 质粒, 均为本实验室自存。RAW264.7 细胞购于上海中国科学院细胞资源中心, HeLa 细胞获赠于上海市免疫学研究所苏冰课题组, 两者均为贴壁细胞。

1.1.2 试剂 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。Taq 聚合酶购自北京天根生物科技有限公司。pfu DNA 聚合酶购自 Fermentas。DNA 回收纯化试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。反转录试剂盒购自 Invitrogen。DMEM 培养基购自 Hyclone。胎牛血清购自 Excell Bio。

### 1.2 方法

1.2.1 敲除株的构建 利用 Primer 3, 根据 GenBank 中各候选基因和质粒 pKD3 中氯霉素的抗性 (chloramphenicol resistance, Cm<sup>R</sup>) 基因或 pKD4 卡那霉素抗性 (kanamycin resistance, Kan<sup>R</sup>) 基因序列信息设计引物。引物用来扩增 Cm<sup>R</sup> 基因或 Kan<sup>R</sup> 基因, 以替换候选基因编码区序列。以 pKD3 (或 pKD4) 质粒为模板进行 PCR 扩增, 其上含有两端携带 FLP 重组酶识别位点的 Cm<sup>R</sup> 或 Kan<sup>R</sup>。反应体系如下: 94 ℃、5 min; 94 ℃、30 s, 55 ℃、30 s, 72 ℃、2 min, 30 个循环; 72 ℃、10 min。获得的目的条带通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并通过试剂盒回收、纯化并定量。

通过 λ-Red 同源重组系统, 使用含有 Cm<sup>R</sup> (或 Kan<sup>R</sup>) 的 PCR 扩增片段替换候选的目的基因。pKD46 质粒携带有氨苄霉素抗性 (Amp<sup>R</sup>) 基因及 3 个同源重组酶 Gam、Exo、Bet, 在 L-阿拉伯糖诱导下表达, 使具有同源序列的 DNA 发生同源重组。

制备野生型 14028s (WT) 菌株的电感受态细胞, 电穿孔法转入 pKD46 质粒。感受态制备过程如下: 过夜培养的种子菌 1:100 稀释, 培养于新鲜的 LB 培养基中, 至 *D* (600 nm) 约为 0.2 时加入终浓度为 10 mmol/L 的 L-阿拉伯糖, 以诱导同源重组酶的表达; 继续培养至 *D* (600 nm) 为 0.4 ~ 0.6 时, 收集菌液, ddH<sub>2</sub>O 重悬并清洗 3 次, 4 700 × *g* 离心 8 min, 10% 甘油清洗并重悬菌体沉淀, 分装后保存感受态细胞于 -80 ℃ 备用。将新鲜抽提的 pKD46 质粒通过电击转入上述感受态细胞中, 转化产物涂布于含有 Amp 的平板, 30 ℃ 培养过夜。得到的单克隆重复上述操作, 制得的感受态细胞中电击转入 PCR 产物, 转化产物涂布于含有 Cm (或 Kan) 的平板, 37 ℃ 培养过夜。PCR 验证阳性克隆并进一步通过测序验证目的基因是否敲除成功。

1.2.2 基因组中 pKD46 质粒的消除 pKD46 为温敏型质

粒, 在 30 ℃ 可以稳定复制, 而在 42 ℃ 可被消除。挑取测序鉴定正确的克隆菌株于 42 ℃ 培养, 早晚各稀释转接 1 次, 4 ~ 6 次后分别划线接种于含有 Cm (或 Kan) 和 Amp 的平板上进行验证。

**1.2.3 ATR 检测** 分别挑取各单克隆培养于 pH 7.7 的 EG 培养基中, 37 ℃ 培养过夜 (8 h 以上)。1:100 稀释至新鲜的 pH 7.7 的 EG 培养基, 培养至 *D* (600 nm) 约为 0.4, 离心收菌并重悬至等体积的 pH 4.3 的 EG 培养基, 继续培养 90 min。重新离心收菌并重悬至等体积的 pH 3.0 的 EG 培养基, 每隔 1 h 分别吸取菌液梯度稀释并涂布, 37 ℃ 培养过夜, 计数各平板上的单克隆数。WT 作为对照, 以时间点为横坐标, 各组克隆数与 WT 克隆数百分比值为纵坐标, 0 h 记为 100%, 制作柱状图。

**1.2.4 细胞感染实验** 分别于 24 孔板中接种 RAW264.7 或 HeLa 细胞, 每孔 600 μL 培养基, 含有  $2 \times 10^5$  或  $1 \times 10^5$  个细胞, 放回细胞培养箱中培养。过夜的种子菌以 MOI (multiplicity of infection) =10 (100) 的比例感染 RAW264.7 (HeLa) 细胞。具体操作如下: 过夜种子菌离心收菌后由 PBS 重悬并调至 *D* (600 nm) 约为 1.0 (沙门菌量约为  $8 \times 10^8$ /mL), 由 DMEM 培养基稀释后, 分别加入 24 孔板中, 每孔 600 μL。感染 1 h 后, 重新加入含有 100 μg/mL 庆大霉素的新鲜 DMEM 培养基, 继续培养以杀灭未能成功入侵的胞外菌。再过 2 h, 使用含有 25 μg/mL 庆大霉素的新鲜 DMEM 培养基继续培养。分别在杀菌起 2 h 和 24 h 裂解细胞释放胞内菌, 并通过梯度稀释涂布计数单克隆。WT 作为对照, 以时间点为横坐标, 以各菌株 24 h 克隆数与 2 h 克隆数的比值即复制倍数为纵坐标, 制作柱状图。

**1.2.5 总 RNA 抽提** LB 过夜培养的种子菌, 1:100 转接至新鲜的 LB 培养基, 培养至对数期 [*D* (600 nm) 约为 0.6]。利用 RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion) 抽提细菌的 RNA。Nanodrop 2000 定量样品浓度, 使用 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for qPCR 进行反转录。

**1.2.6 Realtime-PCR 检测** 适当稀释 cDNA 样品, 使用 20 μL 反应体系:  $2 \times$  Fast SYBR Mixture 10 μL, 10 μmol/L 反转录引物各 8 μL, cDNA 2 μL。于 ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System 检测, 设置程序参数如下: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 3 s, 60 ℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。以 16S rRNA 为内参, realtime-PCR 结果按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法分析, 比较敲除株与 WT 中 *phoP* 及其下游基因 *mgtA*、*mgtC*、*pmrA* 和 *pagC* 的转录变化。引物序列见表 1。

表 1 Realtime-PCR 所用引物序列  
Tab 1 Primer sequences used in realtime-PCR

基因	引物序列 (5'→3')
<i>phoP</i>	F: tgcgcgtactgtgttagag
	R: tcattccggcagacctaaac
<i>pmrA</i>	F: cataataaccagggtgaaagtgaac
	R: cgttatccagttgtagatcgtt
<i>mgtA</i>	F: aatcctttcaacatcttactcagca
	R: attttcattaataaccgcagtcag
<i>mgtC</i>	F: agggagaaaaacgttatatcctgaa
	R: attctttatagccctgttctctgag
<i>pagC</i>	F: acatttaagaacattccactcagg
	R: agccggtttattttgtagaggagat
16SrRNA	F: cagccacactggaactgaga
	R: gtgcttctctgcgggtaac

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 软件进行数据处理和统计分析。所有数据经过 3 次或以上重复, 每次实验设 2 个复孔。定量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 方法验证敲除株插入片段

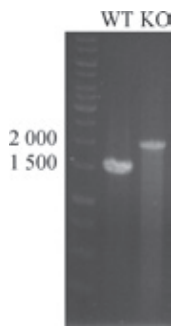
通过 λ-Red 同源重组系统, 使用 Cm (或 Kan) 抗性基因替换目的基因。挑取 Cm (或 Kan) 平板上的阳性克隆, 分别通过相应的重组鉴定引物, 进行菌落 PCR 验证, 并以 WT 作为对照。通过这种同源重组方式, 我们共成功构建了 30 个敲除株。

以基因 STM14\_1878 为例, 菌落 PCR 验证结果 (图 1) 显示, 敲除株 (knock out, KO) 中 Kan<sup>r</sup> 基因片段已经通过同源重组整合至基因组, PCR 产物约为 2 000 bp, 而对照组野生型菌株 (WT) PCR 产物约为 1 500 bp。将此阳性克隆经过测序确认, 序列比对结果显示插入片段序列正确。

2.2 各敲除株与 WT 对数期 ATR 能力的比较

如表 2 所示, ATR 能力较 WT 增强的有 3 个敲除株, ATR 能力较 WT 减弱的有 3 个敲除株, 其余 24 个菌株的 ATR 能力与 WT 菌株相比则无明显差异。

如图 2 所示, ΔSTM14\_0739、ΔSTM14\_2717 和 ΔSTM14\_1646 的 ATR 能力分别在 4 h、2 h 和 2 h 较 WT 增强, 而 ΔSTM14\_4338、ΔSTM14\_1965 和 ΔSTM14\_1878 在 2 h 或 1 h 时 ATR 能力较 WT 减弱。

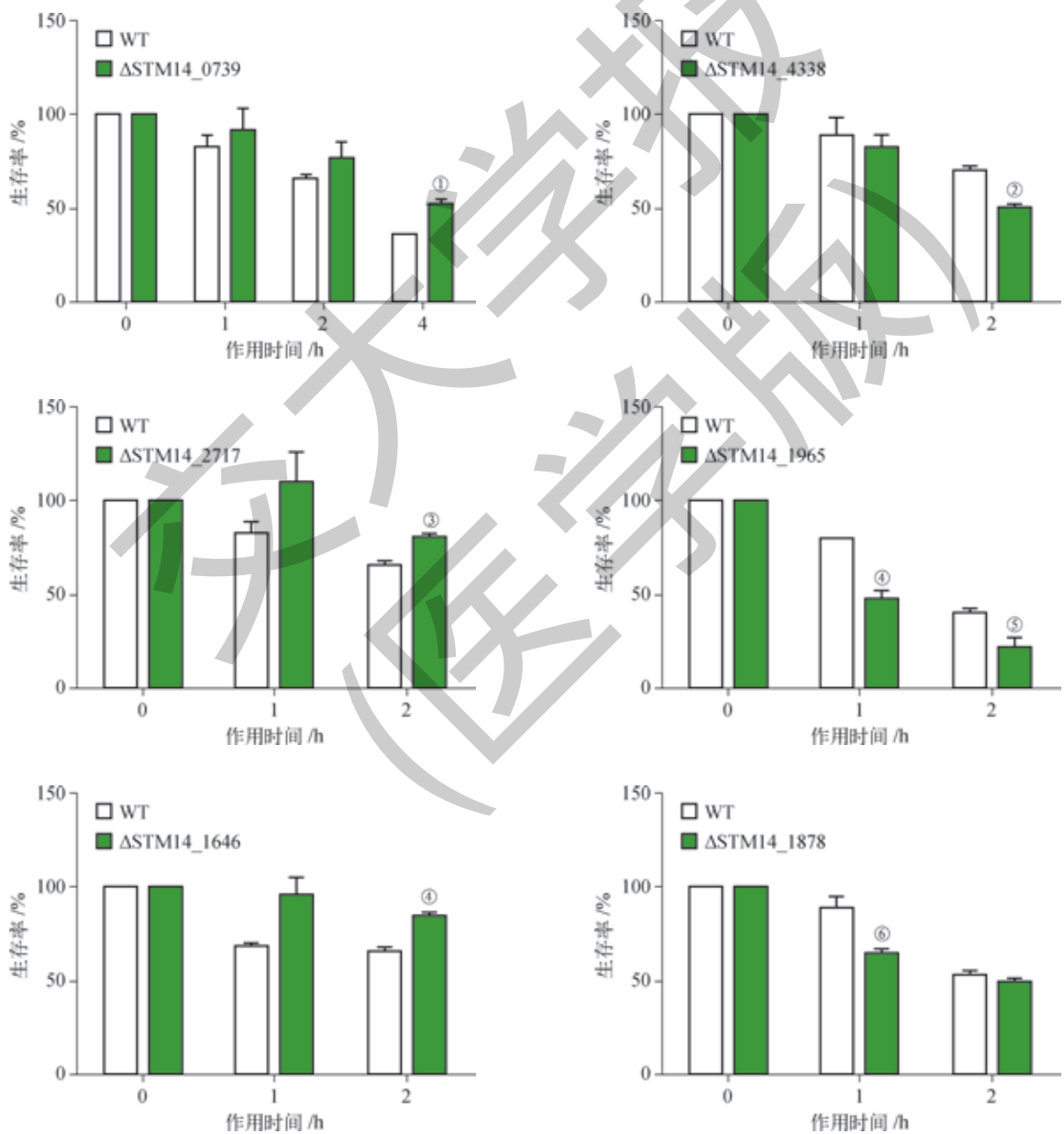


注：挑取 Kan 平板上的阳性克隆，并通过相应的重组鉴定引物，进行菌落 PCR 验证，并以 WT 作为对照。

图 1 PCR 方法验证 STM14\_1878 敲除成功  
Fig 1 Positive KO clone of STM14\_1878 checked by PCR

表 2 各敲除株与 WT 菌株对数期 ATR 能力的比较  
Tab 2 Differences between KO strains and WT strain in log-phase ATR

ATR 能力	菌株
增强	$\Delta$ STM14_0739、 $\Delta$ STM14_2717、 $\Delta$ STM14_1646
减弱	$\Delta$ STM14_4338、 $\Delta$ STM14_1965、 $\Delta$ STM14_1878
无差异	$\Delta$ STM14_3637、 $\Delta$ STM14_4253、 $\Delta$ STM14_1921、 $\Delta$ STM14_1841、 $\Delta$ STM14_0016、 $\Delta$ STM14_5307、 $\Delta$ STM14_2979、 $\Delta$ STM14_2468、 $\Delta$ STM14_4439、 $\Delta$ STM14_4627、 $\Delta$ STM14_2011、 $\Delta$ STM14_0807、 $\Delta$ STM14_0703、 $\Delta$ STM14_3770、 $\Delta$ STM14_3152、 $\Delta$ STM14_2025、 $\Delta$ STM14_1866、 $\Delta$ STM14_1008、 $\Delta$ STM14_0760、 $\Delta$ STM14_4550、 $\Delta$ STM14_3829、 $\Delta$ STM14_2228、 $\Delta$ STM14_3241、 $\Delta$ STM14_950



注：① $P=0.009$ ，② $P=0.001$ ，③ $P=0.005$ ，④ $P=0.010$ ，⑤ $P=0.040$ ，⑥ $P=0.030$ ，与 WT 同时时间点比较。

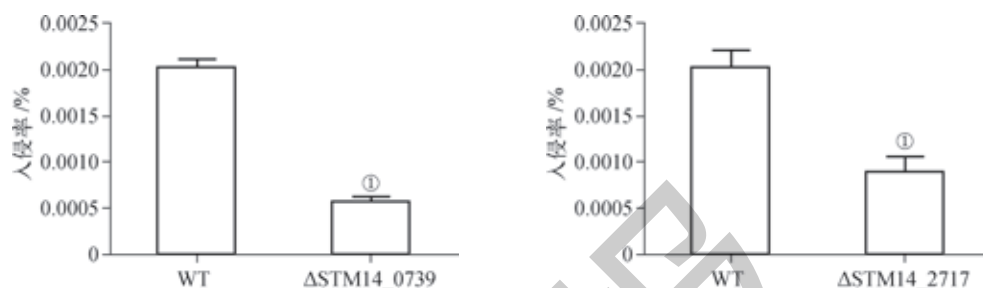
图 2 ATR 能力较 WT 菌株差异明显的敲除株  
Fig 2 Mutants with significant difference from WT in ATR assay



### 2.3 ATR 能力较 WT 差异显著的敲除株入侵上皮细胞及在巨噬细胞内复制能力的检测

HeLa 细胞感染实验的结果 (图 3) 显示,  $\Delta$ STM14\_0739 和  $\Delta$ STM14\_2717 对 HeLa 细胞的入侵率较 WT 减弱,  $\Delta$ STM14\_1878、 $\Delta$ STM14\_1965、 $\Delta$ STM14\_1646、 $\Delta$ STM14\_4338

的入侵率则与 WT 无明显差异。结果提示, STM14\_0739 和 STM14\_2717 可能参与沙门菌对上皮细胞的入侵过程, 缺失导致对 HeLa 细胞入侵能力减弱, 而基因 STM14\_1878、STM14\_1965、STM14\_1646、STM14\_4338 则可能不参与调控沙门菌对上皮细胞的入侵过程, 缺失不会影响入侵能力。



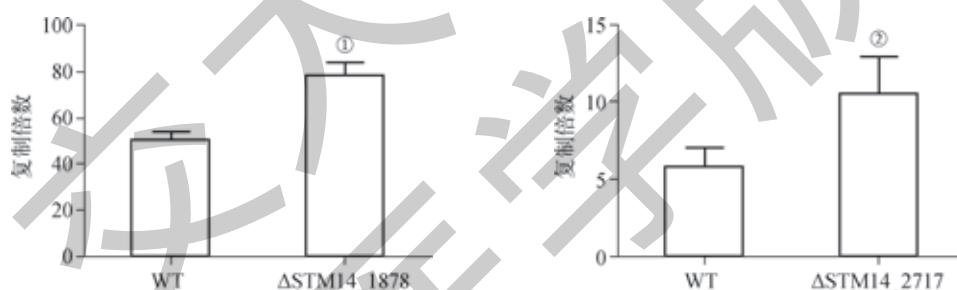
注: <sup>①</sup> $P=0.000$ , 与 WT 比较。

图 3  $\Delta$ STM14\_0739 和  $\Delta$ STM14\_2717 对 HeLa 细胞的入侵

Fig 3 Invasion rate of  $\Delta$ STM14\_0739 and  $\Delta$ STM14\_2717 in HeLa cells

RAW264.7 细胞感染实验的结果 (图 4) 显示,  $\Delta$ STM14\_1878 和  $\Delta$ STM14\_2717 24 h 内的复制倍数较 WT 升高, 而  $\Delta$ STM14\_0739、 $\Delta$ STM14\_1965、 $\Delta$ STM14\_1646 和  $\Delta$ STM14\_4338 则与 WT 无明显差异。结果提示,

STM14\_1878 和 STM14\_2717 可能参与抑制沙门菌在胞内的复制过程, 缺失会表现出更强的胞内复制能力; 而 STM14\_0739、STM14\_1965、STM14\_1646 和 STM14\_4338 则可能不参与胞内复制过程, 缺失不会影响这一过程。



注: <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>②</sup> $P=0.010$ , 与 WT 比较。

图 4  $\Delta$ STM14\_1878 和  $\Delta$ STM14\_2717 在 RAW264.7 细胞内的复制

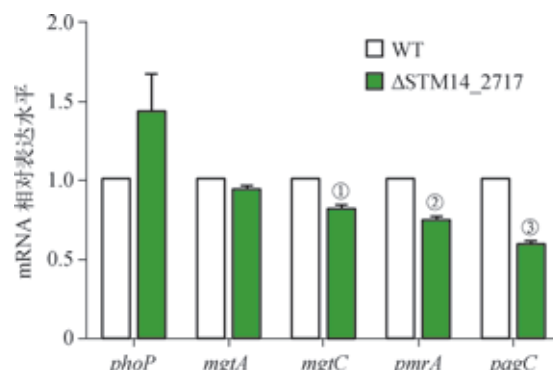
Fig 4 Replication fold of  $\Delta$ STM14\_1878 and  $\Delta$ STM14\_2717 in RAW264.7 cells

### 2.4 STM14\_2717 与 *phoP* 转录水平的关系

PhoP 蛋白是 *S. Typhimurium* 中重要的调控蛋白, 参与 ATR、对上皮细胞的入侵以及胞内复制等多种生命活动。*phoP* 缺失导致沙门菌酸耐受能力减弱, 入侵上皮细胞能力增强, 同时胞内复制能力减弱<sup>[20]</sup>。

我们发现  $\Delta$ STM14\_2717 同时参与了上述 3 种细胞进程, 推断其可能通过全局性转录调控因子 PhoP 发挥功能。为了检测 STM14\_2717 是否调控 *phoP* 的转录, 我们分别抽提了  $\Delta$ STM14\_2717 和 WT 菌株对数期的总 RNA, 并通过 RT-PCR 检测了其中 *phoP* 及其下游基因的转录水平变化。

结果 (图 5) 显示,  $\Delta$ STM14\_2717 菌株中 *phoP* 的转录水平较 WT 并无明显差异, 而 *mgtC*、*pmrA* 和 *pagC* 转



注: <sup>①</sup> $P=0.007$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.000$ , 分别与 WT 比较。

图 5  $\Delta$ STM14\_2717 菌株中 *phoP* 及相关基因的转录

Fig 5 Transcription level of *phoP* and related genes in  $\Delta$ STM14\_2717

录水平降低。这表明该基因可能不参与对 *phoP* 转录的调控, 而是参与其他途径的调控。

### 3 讨论

细菌感知周围环境信号的变化, 调控相关基因的表达以帮助其更好地维持细胞活动和适应环境, 完成这一过程需要转录调控因子的参与。转录调控因子能够结合下游基因的 DNA 序列, 进而激活或抑制靶基因的转录, 参与调控细菌的各种生命活动。

对数期的 *S. Typhimurium* 能在 pH 7.7 的培养基中生长, 而在 pH 3.3 培养基中不能生长; 经过 pH 5.8 或 pH 4.3 弱酸环境后, 可对强酸环境产生适应性<sup>[21]</sup>。目前已知的 *S. Typhimurium* 的 ATR 机制包括 pH 平衡系统、ASP 的合成、膜组成的改变及膜流动性三方面。*S. Typhimurium* 中参与对数期 ATR 调控的有 PhoP/PhoQ、RpoS、Fur 及 OmpR 蛋白<sup>[22]</sup>等, 均能够诱导 ASP 的产生, 因此这些基因的缺失会导致 *S. Typhimurium* 的 ATR 能力显著减弱。例如, 弱酸性环境能够促进 PhoP 下游相关基因的转录水平升高<sup>[23]</sup>, *phoP* 突变株对致死酸环境更加敏感, 且仅诱导产生 4 种 ASPs, 表明了其对 ATR 的重要性<sup>[24]</sup>。

*S. Typhimurium* 对酸环境应答的重要性, 提示我们沙门菌中是否还存在着其他未知的 ATR 调控机制。我们分析了沙门菌基因组信息, 筛选出其中 30 个含有典型 DNA 结合结构域的蛋白, 分别对各基因进行敲除并通过对数期 ATR 的筛选策略, 分别比较各候选基因敲除株与 WT 的存活率, 以检测各目的基因是否参与 ATR 应答过程, 试图发现新的参与 ATR 应答的转录调控因子。结果发现共有 6 个敲除株的 ATR 能力与 WT 相比发生显著变化, 其中 ATR 能力增强和减弱的各有 3 个敲除株, 而剩余 24 个敲除株的 ATR 能力

无明显变化。这提示我们这些基因可能参与了对数期 ATR 以外的其他生命活动, 还有待于进一步探究。

鉴于肠道病原菌的致病能力还与其对肠上皮细胞的入侵及胞内的复制定植能力密切相关, 因此, 针对 ATR 检测有显著变化的 6 个菌株, 我们继续通过细胞感染模型进行了功能探究。HeLa 细胞感染结果显示,  $\Delta$ STM14\_0739 和  $\Delta$ STM14\_2717 的入侵率较 WT 降低。而 RAW264.7 细胞感染结果显示, 仅  $\Delta$ STM14\_1878 和  $\Delta$ STM14\_2717 菌株 24 h 内的复制倍数较 WT 升高。提示这些基因可能参与了沙门菌侵染细胞, 并在胞内复制的不同阶段发挥作用, 而剩余基因则可能参与调控沙门菌入侵和胞内复制以外的其他生命活动。另外我们发现,  $\Delta$ STM14\_2717 同时参与了 ATR、对上皮细胞的入侵和胞内复制 3 个过程, 因此进一步检测了  $\Delta$ STM14\_2717 中 *phoP* 及其下游基因的转录水平, 结果显示 STM14\_2717 敲除不影响 *phoP* 的转录, 提示其可能参与其他的调控通路而影响 *S. Typhimurium* 的细胞进程。

未来的研究将主要围绕 STM14\_2717 展开。我们将首先在基因组上回补 STM14\_2717, 以进一步确认其对于细菌致病性的影响。其次将检测 ASPs 相关基因的转录及蛋白表达, 验证 STM14\_2717 是否通过调控 ASPs 来影响细胞功能。

另外, ATR 实验可以筛选出酸环境应答相关的转录调控因子, 而细胞感染模型则帮我们筛选毒力相关的转录调控因子。但上述 2 种策略也存在不足, 如 ATR 实验为体外实验, 并不足以完全模拟宿主内的复杂环境。因此, 我们还将结合更多筛选模型来确认其他转录调控因子的功能。

转录调控因子对靶基因表达的调控, 能够迅速对环境变化做出应答, 在细菌多种生命活动中发挥重要作用。对潜在的转录调控因子功能的研究, 能够帮助我们更好地了解沙门菌生理活动调节机制, 也能够进一步揭示其在沙门菌致病性中的作用。

### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Young I, Wilhelm BJ, Cahill S, et al. A rapid systematic review and meta-analysis of the efficacy of slaughter and processing interventions to control non-typhoidal *Salmonella* in beef and pork[J]. J Food Prot, 2016, 79(12): 2196-2210.
- [2] Alvarez-Ordóñez A, Fernández A, López M, et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 123(3): 212-219.
- [3] Audia JP, Webb CC, Foster JW. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria[J]. Int J Med Microbiol, 2001, 291(2): 97-106.
- [4] Fink RC, Evans MR, Porwollik S, et al. FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028s)[J]. J Bacteriol, 2007, 189(6): 2262-2273.
- [5] Groisman EA, Chiao E, Lipps CJ, et al. *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(18): 7077-7081.
- [6] Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 308-341.
- [7] Lin Z, Zhang Y, Wang J. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(6): 986-991.
- [8] Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(8): 1017-1039.
- [9] Reynolds N, O'Shaughnessy A, Hendrich B. Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression[J]. Development, 2013, 140(3): 505-512.
- [10] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks[J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34(5): 628-645.

- [11] Martínez-Antonio A, Collado-Vides J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(5): 482-489.
- [12] Prost LR, Daley ME, Le Sage V, et al. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH[J]. Mol Cell, 2007, 26(2): 165-174.
- [13] García Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA.  $Mg^{2+}$  as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence[J]. Cell, 1996, 84(1): 165-174.
- [14] Behlau I, Miller SI. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* typhimurium invasion of epithelial cells[J]. J Bacteriol, 1993, 175(14): 4475-4484.
- [15] Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, et al. Mutants of *Salmonella* typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(14): 5189-5193.
- [16] Sang Y, Ren J, Ni J, et al. Protein acetylation is involved in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence[J]. J Infect Dis, 2016, 213(11): 1836-1845.
- [17] Qin R, Sang Y, Ren J, et al. The bacterial two-hybrid system uncovers the involvement of acetylation in regulating of Lrp activity in *Salmonella* Typhimurium[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1864.
- [18] Golubeva YA, Sadik AY, Ellermeier JR, et al. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system[J]. Genetics, 2012, 190(1): 79-90.
- [19] Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator HilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(3): 691-705.
- [20] Aguirre A, Cabeza ML, Spinelli SV, et al. PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island I[J]. J Bacteriol, 2006, 188(19): 6889-6898.
- [21] Álvarez-Ordóñez A, Prieto M, Bernardo A, et al. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host[J]. Food Res Int, 2012, 45(2): 482-492.
- [22] 任洁, 赵明文, 姚玉峰. 沙门菌对酸压力的应答及其与毒力的关系[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 367-375.
- [23] Foster JW. Bacterial stress responses[M]. Washington: ASM Press, 2000: 99-115.
- [24] Bearson BL, Wilson L, Foster JW. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* typhimurium against inorganic acid stress[J]. J Bacteriol, 1998, 180(9): 2409-2417.

[ 收稿日期 ] 2018-04-16

[ 本文编辑 ] 邵碧云

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院与施普林格·自然出版集团签署全面合作协议

2018年10月23日下午,上海交通大学医学院与施普林格·自然集团(Springer-Nature)谅解备忘录签署仪式于上海交通大学医学院举行。Springer-Nature出版集团生物医学编辑总监Sadie Forrester一行出席签约仪式,上海交通大学医学院副院长江帆及相关部处参加了签约仪式。

双方就共同建立学术不端防范及沟通渠道、联合举办高端国际学术论坛和研讨会、科学家和科研写作培训、合作创办英文学术期刊,以及建立联合编辑部等议题达成了共识,并商讨了将来的工作计划。江帆还提出,希望与Springer-Nature出版集团在基础医学领域加深彼此的了解与合作,共同为基础研究的前沿性成果搭建学术成果交流展示舞台;此外还希望能够在临床研究方面开展合作,促进医学院科研与临床人才的国际化培养,能够有更多高质量的临床研究成果展现,为进一步提升医学院临床医学学科的国际影响力打下坚实基础。

Forrester总监表示,本次的备忘录签署仪式,标志着双方的合作进入了新的阶段;她期待通过双方优势资源的相互融合,切实推进学术研究、人才培养、合作出版等,提升科研的品牌与质量,共同创建新的成果。