

研究报告

鼠伤寒沙门氏菌 *ybiH* 基因缺失株的构建及其生物学特性裴芳樱^{1,2} 赵威² 王涛^{1,2} 王文魁^{*1} 齐永华^{*2}

1 山西农业大学动物科技学院 山西 太谷 030801

2 新乡学院医学院 河南 新乡 453003

摘要:【背景】鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是一种重要的人兽共患病原菌,能够引起多种食源性疾病。*ybiH* 基因在鼠伤寒沙门氏菌中的生物学功能尚未确定。【目的】构建鼠伤寒沙门氏菌 *ybiH* 基因的缺失株和回补株,研究 *ybiH* 基因在鼠伤寒沙门氏菌中的生物学功能。【方法】采用 λ -Red 同源重组系统构建鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 *ybiH* 基因缺失株 ST Δ *ybiH*, 同时构建该基因缺失株的回补株 ST Δ *ybiH*/py*ybiH*, 并对缺失株 ST Δ *ybiH* 的生长特性、运动性、生化特性和毒力情况等生物学特性进行比较分析。【结果】与标准株和回补株相比,缺失株 ST Δ *ybiH* 生长速率略快,而其运动性、生化特性、耐药性均无明显差别。但是, *ybiH* 基因的缺失明显提高了鼠伤寒沙门氏菌对 IEC-6 细胞和 RAW 264.7 细胞的黏附力和侵袭力, qRT-PCR 实验结果显示,缺失株中 *InvH* 基因的表达量明显提高,表明 *ybiH* 基因的缺失使鼠伤寒沙门氏菌的侵袭力也有所提高。此外,在胞内存活实验中,标准株与缺失株在胞内的增长率变化不明显,表明 *ybiH* 基因的缺失对沙门氏菌在 RAW 264.7 细胞中存活的影响不大。【结论】*ybiH* 基因介导鼠伤寒沙门氏菌的黏附侵袭力,本文为进一步阐明 *ybiH* 基因的功能提供基础。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌, 突变株, *ybiH* 基因, 生物学特性Construction of a *Salmonella typhimurium* ST Δ *ybiH* strain and its biological characteristicsPEI Fang-Ying^{1,2} ZHAO Wei² WANG Tao^{1,2} WANG Wen-Kui^{*1} QI Yong-Hua^{*2}

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

2 College of Medicine, Xinxiang University, Xinxiang, Henan 453003, China

Abstract: [Background] *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) is an important zoonotic pathogen that causes a variety of food-borne diseases. The biological function of *ybiH* gene in *S. typhimurium* has not been determined. [Objective] In order to define the pathogenicity of *ybiH* gene to *S. typhimurium*, the *ybiH* gene mutant and complementary strain of *S. typhimurium* were constructed and

Foundation items: Natural Science Foundation of Henan Province (162300410109); Key Research Project of Henan Provincial Department of Education (19A230008); Postdoctoral Research Foundation of Shanxi Province (K271899011); 181 National Fund Cultivation (J341802003)

***Corresponding authors:** WANG Wen-Kui: Tel: 86-354-6288335; E-mail: wenkui2009@yeah.net
QI Yong-Hua: Tel: 86-373-3682937; E-mail: qyh@xxu.edu.cn

Received: 24-09-2019; **Accepted:** 27-12-2019; **Published online:** 04-01-2020

基金项目: 河南省自然科学基金(162300410109); 河南省高等学校重点科研项目(19A230008); 山西省博士后基金(K271899011); 181 国家基金培育项目(J341802003)

***通信作者:** 王文魁: Tel: 0354-6288335; E-mail: wenkui2009@yeah.net

齐永华: Tel: 0373-3682937; E-mail: qyh@xxu.edu.cn

收稿日期: 2019-09-24; **接受日期:** 2019-12-27; **网络首发日期:** 2020-01-04

characterized. **[Methods]** In this paper, the mutant ST $\Delta ybiH$ of *S. typhimurium* CVCC541 standard strain was successful constructed by λ -Red homologous recombination system. At the same time, its complementary strain ST $\Delta ybiH$ /py*ybiH* was successfully constructed. Then we analyzed the biological characteristics of growth characteristics, motility, biochemical properties and virulence. **[Results]** The results showed that the growth rate of ST $\Delta ybiH$ was slightly faster than that of the standard strain and the complementary strain, but there was no significant difference in motility and biochemical characteristics. However, the deletion of *ybiH* gene significantly increased the adhesion and invasion of *S. typhimurium* to IEC-6 cells and RAW 264.7 cells. The results of qRT-PCR showed that the expression of *InvH* gene was significantly increased in the deletion strain. The results showed that the deletion of *ybiH* gene increased the invasiveness of *S. typhimurium*. In addition, the intracellular growth rate of the standard strain and the deletion strain did not change significantly in the intracellular survival experiment, indicating that the deletion of the *ybiH* gene had little effect on the survival of *Salmonella* in RAW 264.7 cells. **[Conclusion]** The *ybiH* gene mediates the adhesion and invasiveness of *S. typhimurium*, which provides a theoretical basis for further elucidating the function of *ybiH* gene.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Mutant strain, *ybiH* gene, Biological characteristics

鼠伤寒沙门氏菌是一种重要的人兽共患病病原菌, 具有广泛的宿主谱, 发病感染率位于沙门氏菌属的首位, 可在多种家禽、家畜及人的肠道中存活, 具有重要的公共卫生意义^[1-2]。在沙门氏菌感染致病过程中, 毒力因子在鞭毛、囊膜、质粒、黏附系统、由沙门氏菌毒力岛 SPI-1 和 SPI-2 及其他毒力岛编码的III型分泌系统(T3SS)的调节等诸多方面发挥着重要作用^[3-4]。

ybiH 是一种在鼠伤寒沙门氏菌中尚未表征的独特调节因子, Yamanaka 等研究表明^[5], 在大肠杆菌中, *ybiH* 基因调节双向转录单元 *ybiH*-abhGFSR 操纵子和 *rhIE* 基因的转录, 它们共同参与控制对头孢哌酮和氯霉素的敏感性^[5]。目前, 关于 *ybiH* 基因在鼠伤寒沙门氏菌中的作用研究尚未见报道。因此, 本研究通过利用 λ -Red 同源重组系统敲除鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 的 *ybiH* 基因并构建相应回补株, 旨在为进一步研究 *ybiH* 基因在鼠伤寒沙门氏菌中的生物学作用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株、质粒及培养条件

鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 CVCC541(ST)、CVCC541-pKD46, RAW 264.7 巨噬细胞, 质粒 pKD4、pKD46、pCP20 和表达质粒 pGEX-6P-1 等, 均由本实验室保存。大鼠肠隐窝上皮细胞 IEC-6 细

胞由中国农业大学朱奎教授惠赠。细菌培养时, 挑取单菌落接种于 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 条件下培养。DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, 细胞培养时, 使用 DMEM 培养基(含 15%胎牛血清)在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 纯化试剂盒购自 GeneMark 公司; 质粒小提试剂盒和琼脂凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; 培养基和生化鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司; 其余常规试剂均为国产或进口分析纯产品。电热恒温培养箱和全温培养振荡器购自上海精宏实验设备有限公司; 小型台式高速离心机、梯度 PCR 仪和实时定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中公布的鼠伤寒沙门氏菌株的基因组序列(NC_003197.2), 利用软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物(表 1)。P1、P2 分别由前后两部分组成, 5'端为 39 bp 的 *ybiH* 目的基因两侧的同源臂, 3'端是与质粒 pKD4 卡那霉素抗性基因的序列互补。P3、P4 引物位于 *ybiH* 基因开放阅读框的外侧, 用于缺失株的鉴定。P5、P6 引物用于扩增 *ybiH* 基因完整开放阅读框, 构建回补质粒。所有引物均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

表 1 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers used for PCR in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	扩增片段长度 Amplicon size (bp)
P1	CACCAAGGGCGAGCAGGCGAAAAGTCAGCTCATTGCCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1 555
P2	ACCGTCTGGTAAATCAGCTCCGCTTTTCTTCATCAAACCATATGAATATCCTCCTTAG	
P3	ACAAGTGCCATTATGAGTCA	766/250
P4	ATTGCCAGTCCGATAACG	
P5	CGCGGATCCATGAATATTTCCACCACGAC	675
P6	CCGCTCGAGTCAGTCCAGACTCCTTTGC	

1.4 *ybiH* 基因缺失株的构建

利用 λ -Red 同源重组方法, 以质粒 pKD4 为模板, 利用引物 P1、P2 扩增两侧带有 *ybiH* 基因上、下游同源臂的 1 555 bp 目的片段。PCR 反应体系: 2×Prime STAR Max Premix 25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, pKD4 质粒 1 μ L, ddH₂O 23 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 10 s, 58 °C 5 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。在含有 1% L-阿拉伯糖的 LB 培养基中, 30 °C、180 r/min 诱导培养 CVCC541-pKD46, OD_{600} 值达到 0.4–0.6 时, 将其菌液制备成电转化感受态细胞。将打靶片段电转化至 CVCC541-pKD46 感受态细胞中, 转化产物于 LB 平板 (含 50 μ g/mL 的卡那霉素) 上 37 °C 培养过夜。经 PCR 筛选出 *ybiH* 基因替换缺失株 ST Δ *ybiH*::Kan。将 pCP20 质粒转入 ST Δ *ybiH*::Kan 缺失株中, 42 °C 培养消除卡那霉素基因和 pCP20 质粒, 最终获得的菌株为 *ybiH* 基因缺失株 ST Δ *ybiH*。

1.5 *ybiH* 基因回补株的构建

将提取的鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 基因组 DNA 作为模板, 以 P5、P6 为引物扩增 *ybiH* 基因片段。PCR 反应体系: 2×Prime STAR Max Premix 25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA 片段 1 μ L, ddH₂O 23 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 10 s, 58 °C 5 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。经过双酶切后, 将其连接至 pGEX-6P-1 表达质粒上, 构建回补质粒 pGEX-6P-1-*ybiH*。将获得的回补质粒转化至 ST Δ *ybiH* 突变株中, 构建回补菌株 ST Δ *ybiH*/py*ybiH*。

1.6 ST Δ *ybiH* 生长特性的鉴定

标准菌株 ST、缺失菌株 ST Δ *ybiH*、回补株

ST Δ *ybiH*/py*ybiH* 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日分别复接到新的 LB 液体培养基中, 将细菌浓度调整至 OD_{600} 为 0.05, 继续振荡培养, 每隔 2 h 取样, 检测其 OD_{600} 值, 连续测定 12 h。绘制细菌的生长曲线, 比较标准菌株、缺失株与回补株的生长速度差异性。

1.7 ST Δ *ybiH* 运动性的测定

将 ST、ST Δ *ybiH*、ST Δ *ybiH*/py*ybiH* 菌液培养至生长对数期, 将 OD_{600} 值调为 1.0 左右, 吸取 10 μ L 的菌液, 垂直滴加在含 0.5% 琼脂的 LB 半固体平板 (回补株含氨苄抗性) 上, 置于 37 °C 培养箱中培养 18 h, 测量细菌生长圈的直径。

1.8 ST Δ *ybiH* 生化特性的鉴定

分别挑取标准菌株 ST、缺失菌株 ST Δ *ybiH*、回补株 ST Δ *ybiH*/py*ybiH* 单菌落, 接种至赖氨酸脱羧酶培养基、靛基质 (色氨酸肉汤)、尿素酶、氰化钾、山梨醇、甘露醇、水杨苷、丙二酸盐、枸橼酸盐、卫矛醇半固体和 ONPG 生化鉴定管, 37 °C 培养 24 h, 观察生化鉴定结果。

1.9 ST Δ *ybiH* 黏附能力与侵袭能力的研究

取新鲜培养的标准菌株 ST、缺失株 ST Δ *ybiH*、回补株 ST Δ *ybiH*/py*ybiH*, 用 PBS 洗涤 3 次, 去除培养基, 调整细菌浓度为 10^7 CFU/mL, 备用。取各菌液 1 mL 加入到 9 mL DMEM 完全培养基 (无抗性) 中, 37 °C 预热 30 min。用 PBS 将 IEC-6 或 RAW 264.7 细胞洗涤 3 次后, 将含有菌液的培养基加入细胞板中, 37 °C 培养箱中孵育 1 h。用 PBS 洗涤 3 次后, 再用 0.5% Triton X-100 在 37 °C 培养箱中裂解细胞 10 min, 将培养板中的细胞裂解液倍比稀释, 均匀涂布于 LB 培养基平板上, 37 °C 培养过夜,

观察计数。

侵袭实验在菌液孵育 1 h 后,用 PBS 洗涤 3 次,加入添加高浓度抗生素(100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素)的培养基继续培养 1 h 后,用 0.5% Triton X-100 裂解,PBS 稀释,涂布于 LB 培养基平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,观察计数。其中回补株始终使用含有相应抗性的培养基。3 组平行实验。

1.10 qRT-PCR 检测 $\text{ST}\Delta ybiH$ 毒力基因的表达

取上述 3 种菌株的过夜培养物,使用总 RNA 纯化试剂盒提取 RNA,反转录得到 cDNA。qRT-PCR 检测毒力因子 *InvA*、*InvH* 和 *SpaP*。反应体系为 TB Green Premix *ExTaq* II 10 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 6 μL 。qRT-PCR 的反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.11 细胞内 $\text{ST}\Delta ybiH$ 突变株的存活实验研究

将 24 孔板内生长状态良好的 RAW 264.7 巨噬细胞用无菌 PBS 洗涤 3 次。取新鲜培养的标准菌株 ST、缺失株 $\text{ST}\Delta ybiH$ 、回补株 $\text{ST}\Delta ybiH/\text{pybiH}$, PBS 洗涤 3 次,去除培养基,调整细菌浓度为 10^7 CFU/mL,备用。细菌数量按照 100:1 的比例感染细胞,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h。使用预热的 DMEM 洗 3 次,将游离菌体洗去。加入含庆大霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的 DMEM 杀死黏附的细菌,此时计为 0 h。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱继续培养 2 h,杀死胞外菌。用 DMEM 洗 3 次后,然后用含庆大霉素(20 $\mu\text{g/mL}$)的 DMEM 继续培养细胞,分别于 0、2、4、8、12 h 后收集细胞。收集细胞时,将细胞以无菌 PBS 洗涤,然后加入 0.5% Triton X-100 裂解细胞,倍比稀释后涂于 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养后菌落计数。以 0 h 细胞内的菌数作为基数 1,计算各菌的胞内存活率,分析 3 种鼠伤寒沙门氏菌在 RAW 264.7 巨噬细胞中的胞内存活情况。其中回补株始终使用含有相应抗性的培养基。

1.12 *ybiH* 基因的遗传稳定性

挑取 $\text{ST}\Delta ybiH$ 缺失株的单菌落接种于 LB 液体

培养基中,连续传代培养。选择第 5、10、15、20、25、30 代菌液进行 PCR 鉴定,研究 *ybiH* 缺失基因在 $\text{ST}\Delta ybiH$ 缺失株中的遗传稳定性。

1.13 $\text{ST}\Delta ybiH$ 缺失株的耐药性检测

根据微量肉汤稀释法,以大肠杆菌 ATCC25922 为质控菌,对标准菌株 ST、缺失株 $\text{ST}\Delta ybiH$ 的耐药情况进行分析。采用的抗生素为氯霉素、头孢噻肟钠、氟苯尼考、多西环素、阿莫西林、四环素。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 h,观察各孔,以肉眼观察无菌生长的最低浓度孔为最小抑菌浓度(MIC, $\mu\text{g/mL}$)。

2 结果与分析

2.1 缺失株 $\text{ST}\Delta ybiH$ 的构建

利用 P1、P2 为引物,扩增含有 *ybiH* 基因同源序列的目的片段,长度约为 1 555 bp,扩增结果与预期结果一致。纯化后将其导入到含有 pKD46 质粒的鼠伤寒沙门氏菌 ST 感受态细胞中,使卡那霉素的基因替换目的基因 *ybiH*。经抗性与 PCR 检测筛选,得到阳性重组子 $\Delta ybiH::\text{Kan}$,进一步将 pCP20 质粒转化到 $\Delta ybiH::\text{Kan}$ 菌株中,42 $^{\circ}\text{C}$ 消除卡那霉素基因和 pCP20 质粒。利用 P3、P4 引物对所得菌株进行了 PCR 鉴定(图 1),经测序鉴定确定成功构建了缺失株 $\text{ST}\Delta ybiH$ 。

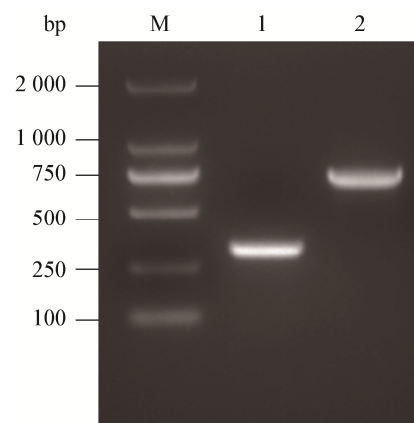


图 1 $\text{ST}\Delta ybiH$ 缺失株的 PCR 鉴定

Figure 1 PCR identification of $\text{ST}\Delta ybiH$ with P3 and P4

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 缺失株 $\text{ST}\Delta ybiH$ 的 PCR 产物; 2: 标准株 ST 的 PCR 产物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Product for *ybiH* from $\Delta ybiH$; ST amplified by PCR; 2: Product for *ybiH* from standard strain ST amplified by PCR.

2.2 回补株 STΔ*ybiH*/py*ybiH* 的构建

如图 2 所示,以提取的鼠伤寒沙门氏菌 ST 基因组 DNA 为模板,利用 P5、P6 引物扩增 *ybiH* 基因片段,并将其连接至表达质粒 pGEX-6P-1 上,将构建的回补质粒 pGEX-6P-1-*ybiH* 转化至 STΔ*ybiH* 突变株中,PCR 鉴定结果显示成功构建出回补菌株 STΔ*ybiH*/py*ybiH*。

2.3 *ybiH* 基因缺失对鼠伤寒沙门氏菌生长特性的影响

通过测定标准菌株 ST、缺失菌株 STΔ*ybiH*、回补株 STΔ*ybiH*/py*ybiH* 在 LB 液体培养基中的生长情况,由图 3 可知,*ybiH* 缺失株的生长速度略微较快,

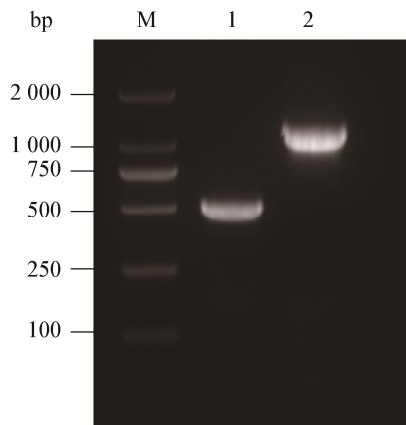


图 2 回补株 STΔ*ybiH*/py*ybiH* 的 PCR 鉴定
Figure 2 PCR identification of STΔ*ybiH*/py*ybiH* with P5 and P6

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 表达质粒 pGEX-6P-1 的 PCR 扩增产物; 2: 回补株 STΔ*ybiH*/py*ybiH* 的 PCR 扩增产物。
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Product from pGEX-6P-1 amplified by PCR; 2: Product from STΔ*ybiH*/py*ybiH* amplified by PCR.

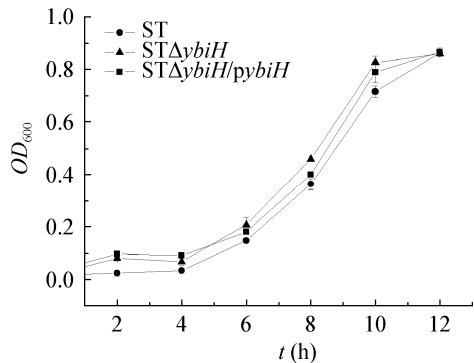


图 3 生长曲线测定
Figure 3 Growth curve determination

但差别并不明显,说明 *ybiH* 基因的缺失对鼠伤寒沙门氏菌的生长速度稍微有所影响。

2.4 *ybiH* 基因缺失对鼠伤寒沙门氏菌运动性的影响

在 LB 半固体平板上,标准菌株 ST、缺失菌株 STΔ*ybiH*、回补株 STΔ*ybiH*/py*ybiH* 的运动性差别不大(图 4),由此可知,*ybiH* 基因的缺失不会影响鼠伤寒沙门氏菌的运动性。

2.5 *ybiH* 基因缺失对鼠伤寒沙门氏菌生化特性的影响

表 2 结果显示,标准菌株 ST、缺失菌株 STΔ*ybiH*、

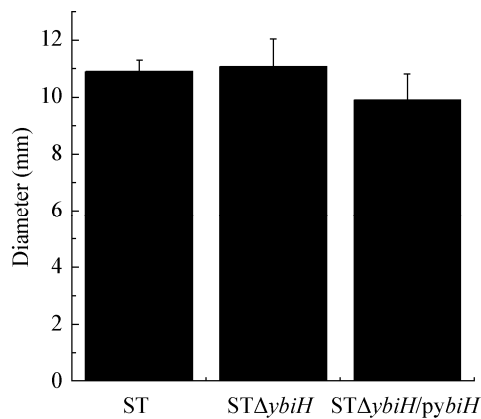


图 4 运动性的测定
Figure 4 Determination of athletic ability

表 2 生化特性比较

生化特性	ST	STΔ <i>ybiH</i>	STΔ <i>ybiH</i> /py <i>ybiH</i>
Biochemical characterization			
色氨酸肉汤 Tryptophan broth	—	—	—
赖氨酸脱羧酶	+	+	+
Lysine decarboxylase	—	—	—
尿素酶 Urase	—	—	—
氰化钾 Potassium cyanide	—	—	—
山梨醇 Sorbic alcohol	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+
水杨苷 Salicin	—	—	—
卫矛醇半固体	+	+	+
Spear alcohol semisolid	—	—	—
ONPG	—	—	—
丙二酸盐 Malonate	—	—	—
枸橼酸盐 Citrate	+	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

回补株 ST Δ *ybiH*/py*ybiH* 的多个生化反应的结果均相同, 表明 *ybiH* 基因与鼠伤寒沙门氏菌的代谢过程无关。

2.6 ST Δ *ybiH* 缺失株的黏附与侵袭能力的分析

为了分析 *ybiH* 基因对沙门氏菌标准菌黏附与侵袭能力的影响, 利用 IEC-6 细胞和 RAW 264.7 细胞进行黏附与侵袭试验。由图 5 可知, 缺失株对 IEC-6 和 RAW 264.7 细胞的黏附和侵袭能力明显高于野生株 ($P<0.01$), 互补株的黏附与侵袭能力仅部分恢复。

2.7 qRT-PCR 检测 ST Δ *ybiH* 毒力基因的表达情况

采用 qRT-PCR 技术对 *InvA*、*InvH*、*SpaP* 三个毒力基因的表达情况进行分析。如图 6 所示, 在 ST Δ *ybiH* 缺失株中, 3 个毒力基因的表达均有所上调, 其中 *InvH* 基因的相对表达量变化得最为明显

($P<0.01$)。

2.8 在细胞内的存活情况

胞内存活实验表明, 在感染 RAW 264.7 细胞 12 h 后, 标准株 ST 与缺失株 ST Δ *ybiH* 的相对存活率差异不显著(图 7), *ybiH* 基因对鼠伤寒沙门氏菌在巨噬细胞中的存活影响不大。

2.9 *ybiH* 基因缺失株的稳定性表达

缺失株 ST Δ *ybiH* 的第 5、10、15、20、25、30 代菌液, 利用引物进行 PCR 扩增鉴定, 结果如图 8 所示, 表明 *ybiH* 基因的缺失在遗传过程中能够稳定遗传。

2.10 ST Δ *ybiH* 缺失株的耐药性检测

标准株 ST 和缺失株 ST Δ *ybiH* 对抗生素的抑菌效果如表 3 所示, 缺失株和标准株的最小抑菌浓度并无明显差别。

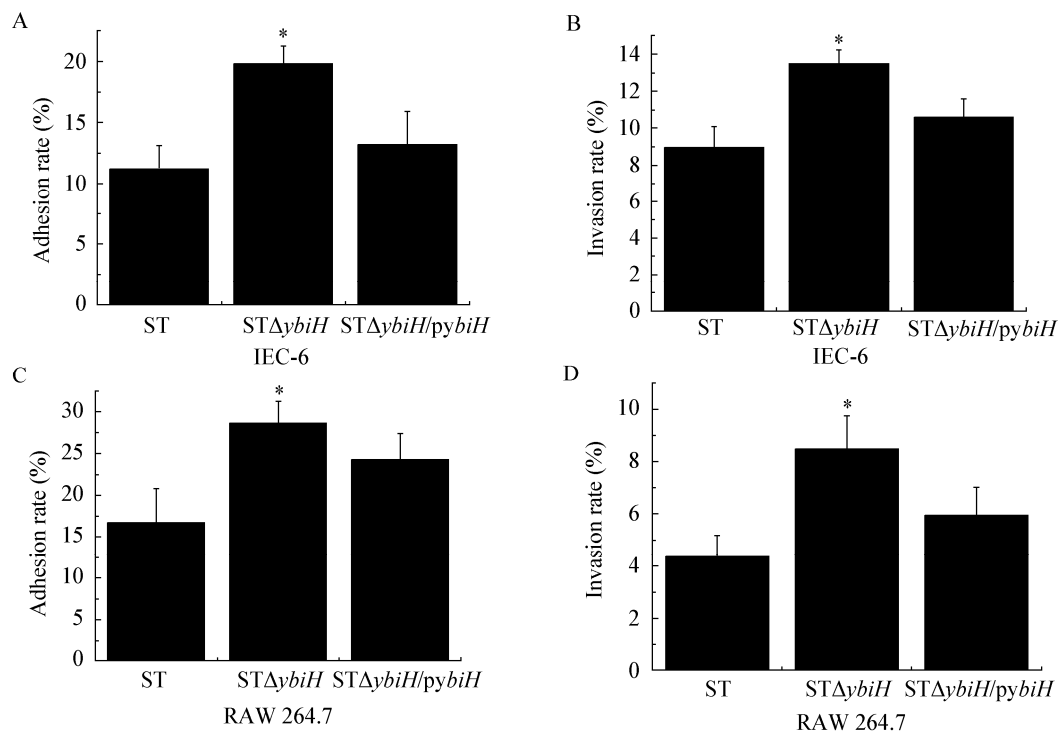


图 5 ST Δ *ybiH* 对 IEC-6 和 RAW264.7 细胞黏附及侵袭的试验结果

Figure 5 Results of adhesion and invasion of ST Δ *ybiH* to IEC-6 and RAW 264.7 cells

注: A: 对 IEC-6 细胞的黏附; B: 对 IEC-6 细胞的侵袭; C: 对 RAW 264.7 细胞的黏附; D: 对 RAW 264.7 细胞的侵袭。

Note: A: Adhesion to IEC-6 cells; B: Invasion to IEC-6 cells; C: Adhesion to RAW 264.7 cells; D: Invasion to RAW 264.7 cells.

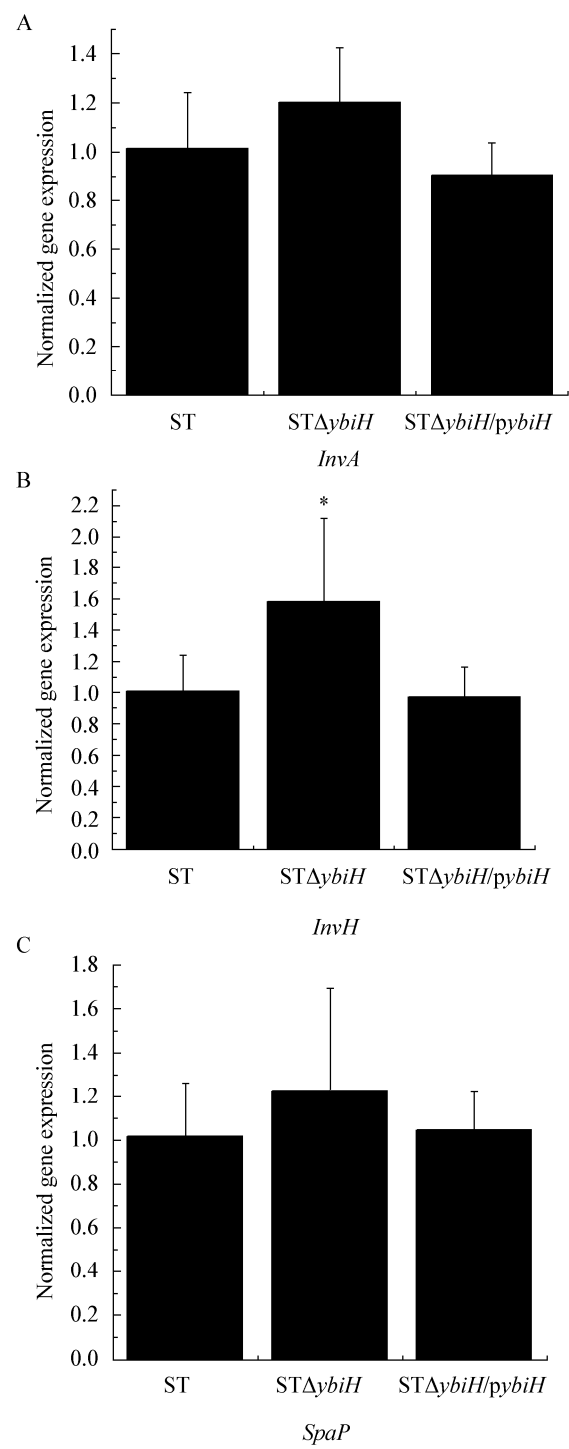


图6 毒力因子的基因表达情况

Figure 6 Gene expression of virulence factors

注: A: *InvA* 基因的相对表达量; B: *InvH* 基因的相对表达量; C: *SpaP* 基因的相对表达量. *: $P<0.05$.

Note: A: Relative expression of *InvA* gene; B: Relative expression of *InvH* gene; C: Relative expression of *SpaP* gene. *: $P<0.05$.

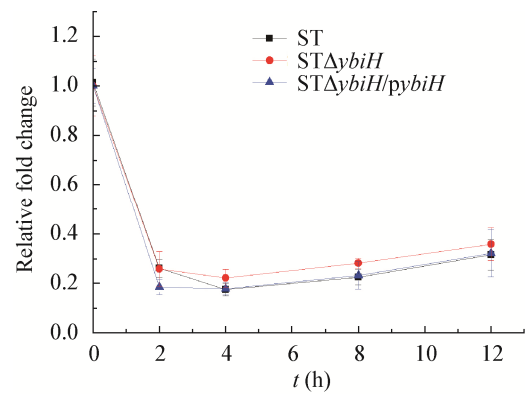


图7 鼠伤寒沙门氏菌在 RAW 264.7 巨噬细胞中的相对存活率

Figure 7 Intracellular survival rate of *S. typhimurium* in macrophage RAW 264.7 cells

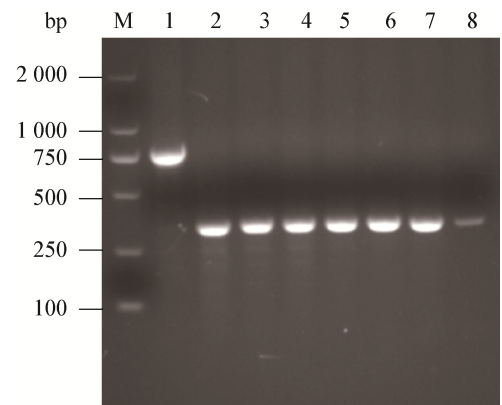


图8 缺失株 *STΔybiH* 的 PCR 鉴定

Figure 8 PCR identification of *STΔybiH* with P3 and P4

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 标准株 CVCC541 的 PCR 扩增产物; 2-8: 缺失株 *STΔybiH* 的第 1、5、10、15、20、25、30 代的扩增产物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Product from CVCC541 amplified by PCR; 2-8: Product from *STΔybiH* amplified by PCR.

表3 最小抑菌浓度的比较

Table 3 Comparison of minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$)

抗生素 Antibiotic	ST	<i>STΔybiH</i>
氯霉素 Chloramphenicol	1.00	1.00
头孢噻肟钠 Cefotaxime Sodium	>0.03	>0.03
氟苯尼考 Florfenicol	>0.50	>0.50
多西环素 Doxycycline	>2.00	>2.00
阿莫西林 Amoxicillin	>0.25	>0.25
四环素 Tetracycline	1.00	1.00

3 讨论与结论

沙门氏菌属代表了最常见的食源性病原体, 经常从食源性动物中分离出来, 这是人类和动物物种(包括鸟类)人畜共患沙门氏菌病的主要原因。鼠伤寒沙门氏菌作为一种宿主泛嗜性菌, 是各国分离率最高的菌种之一, 其可以使各种动物发生副伤寒, 也可以引起人类食物中毒^[6]。鼠伤寒沙门氏菌的致病机理主要与其毒力因子有关, 目前研究最多的是沙门氏菌致病性岛-1 (SPI-1)编码的第三类分泌系统(T3SS-1)^[7], 主要成分包括其调节子及分泌性效应蛋白, 这些效应蛋白主要参与细胞支架肌动蛋白的重排, 帮助细菌入侵上皮细胞^[8]。

鼠伤寒沙门氏菌的基因 *ybiH* 是一种转录调节子, 但其具体功能尚不十分清楚, 因此本研究通过 λ -Red同源重组技术构建了*ybiH*基因缺失株及回补株, 并对其生物学特性进行了初步探讨。研究结果表明, *ybiH*基因的缺失不会改变鼠伤寒沙门氏菌的生长速度、运动性以及正常的代谢活动, 而且*ybiH*基因的缺失在遗传过程中能够稳定遗传。在 RAW 264.7 巨噬细胞胞内存活试验的结果显示, 标准株在 RAW 264.7 细胞中的相对存活率与*ybiH*基因缺失株的差异不显著, 说明*ybiH*基因的存在对鼠伤寒沙门氏菌在 RAW 264.7 巨噬细胞中的存活和增殖影响不大。标准株和缺失株对于氯霉素、头孢噻肟钠、氟苯尼考、多西环素、阿莫西林、四环素的耐药性差别也并不明显。

在沙门氏菌对 RAW 264.7 细胞的侵袭和黏附试验中, ST Δ *ybiH*缺失株的黏附率为 19.9%, ST 标准株的黏附率为 11.3%, 缺失株的黏附率大于标准株。ST Δ *ybiH*缺失株的侵袭率为 13.5%, ST 标准株的侵袭率为 5.3%, 缺失株的侵袭率也明显大于标准株。利用 qRT-PCR 技术对 *InvA*、*InvH*、*SpaP* 毒力因子进行检测, ST Δ *ybiH*缺失株中 3 种毒力因子的基因表达量都有所上升, 尤其是 *InvH* 基因的增加更为明显。*InvH* 基因是影响与细胞黏附的主要基因^[9], 直接反映沙门氏菌的黏附侵袭情况。Aiastui 等^[10]

发现, *InvH* 缺陷型沙门氏菌的入侵能力急剧下降, 黏附在细胞表面的细菌数量也急剧减少, 表明该基因作为一个重要的毒力因子, 其缺失会造成侵袭力的骤降。*ybiH* 基因与鼠伤寒沙门氏菌的黏附侵袭力有关, *ybiH* 基因的缺失会引起 *InvH* 基因数量的增加, 致使 ST Δ *ybiH* 缺失株的黏附侵袭力增加。有数据表明, 即使在没有 T3SS-1 的情况下, 沙门氏菌仍然能够侵入上皮细胞和成纤维细胞^[11-12], 表明存在其他未知的侵袭因子, 而 *ybiH* 基因是通过参与 T3SS-1 分泌系统还是调节其他未知的侵袭因子而最终影响细菌侵袭力, 仍有待鉴定。

本文通过对 ST 标准株、ST Δ *ybiH* 缺失株和 ST Δ *ybiH*/*pybiH* 回补株的生物学特性进行比较分析发现, *ybiH* 基因显著影响鼠伤寒沙门氏菌的黏附和侵袭能力及部分毒力基因的表达情况, 而该基因的缺失会不会影响鼠伤寒沙门氏菌的致病性, 还有待进一步进行分析研究。

REFERENCES

- [1] Alzwghaibi AB, Yahyaraeyat R, Fasaei BN, et al. Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay[J]. Archives of Microbiology, 2018, 200(7): 1009-1016
- [2] Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance[J]. Veterinary World, 2019, 12(4): 504-521
- [3] Daigle F. Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2008, 2(6): 431-437
- [4] Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, et al. So similar, yet so different: Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 305(1): 1-13
- [5] Yamanaka Y, Shimada T, Yamamoto K, et al. Transcription factor CecR (YbiH) regulates a set of genes affecting the sensitivity of *Escherichia coli* against cefoperazone and chloramphenicol[J]. Microbiology, 2016, 162(7): 1253-1264
- [6] Lu CP. Veterinary Microbiology[M]. 4th ed. Beijing: China Agricultural Press, 2007: 43 (in Chinese)
- 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 43

- [7] Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells[J]. Science, 1999, 284(5418): 1322-1328
- [8] Zhao ZH, Li Q, He XL, et al. Advances in research on pathogenic mechanism of *Salmonella typhimurium*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(3): 71-75 (in Chinese)
赵泽慧, 李强, 何小丽, 等. 鼠伤寒沙门氏菌致病机理的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(3): 71-75
- [9] Crago AM, Koronakis V. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(1): 47-56
- [10] Aiastui A, Pucciarelli MG, García-del Portillo F. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(6): 2700-2713
- [11] Radtke AL, Wilson JW, Sarker S, et al. Analysis of interactions of *Salmonella* type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15750
- [12] Rosselin M, Abed N, Virlogeux-Payant I, et al. Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella Enteritidis* to invade different cell types[J]. Microbiology, 2011, 157(3): 839-847

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选 300 种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿;(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.994)