

研究报告

耻垢分枝杆菌 MSMEG_6281 过表达对菌株生长和形态的影响

姜涛^{1*} 任丽萍² 臧师竹¹ 张翠丽¹ 辛毅^{1*}

(1. 大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044)

(2. 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室 辽宁 大连 116044)

摘要:【目的】耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* mc²155, mc²155) MSMEG_6281 为结核分枝杆菌自溶素 Rv3717 的同源蛋白, 通过建立过表达 MSMEG_6281 的耻垢分枝杆菌菌株, 推测该蛋白对耻垢分枝杆菌肽聚糖代谢的影响。【方法】利用 RT-PCR 方法检测乙胺丁醇 (Ethambutol, EMB) 作用后 MSMEG_6281 基因的表达变化; 以耻垢分枝杆菌基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 技术克隆 MSMEG_6281 基因, 构建分枝杆菌表达质粒 pVV16-MSMEG_6281, 进一步建立 MSMEG_6281 过表达的耻垢分枝杆菌菌株; 利用生长曲线检测 MSMEG_6281 过表达对耻垢分枝杆菌生长的影响; 利用扫描电子显微镜分析 MSMEG_6281 过表达引起的耻垢分枝杆菌形态变化。【结果】 EMB 处理引起 MSMEG_6281 基因表达上调; 构建了过表达 MSMEG_6281 的耻垢分枝杆菌菌株(mc²155/pVV16-MSMEG_6281); 过表达 MSMEG_6281 的耻垢分枝杆菌生长缓慢, 菌体形态由短杆状转变为长杆状。【结论】MSMEG_6281 的过表达可改变耻垢分枝杆菌形态。MSMEG_6281 的功能与细胞壁肽聚糖水解相关, 在 mc²155 细胞壁形态维持方面发挥重要作用。

关键词: MSMEG_6281, 耻垢分枝杆菌, 细胞形态, 肽聚糖水解酶

Effect of overexpression of MSMEG_6281 on morphology of *Mycobacterium smegmatis*

JIANG Tao^{1*} REN Li-Ping² ZANG Shi-Zhu¹ ZHANG Cui-Li¹ XIN Yi^{1*}

(1. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China)

(2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China)

Abstract: [Objective] In order to predict the function of MSMEG_6281 in *Mycobacterium smegmatis* mc²155, we analyzed the effect of overexpression of MSMEG_6281 on cellular growth and morphological characteristics. [Methods] Ethambutol, one of the first anti-tuberculosis drugs, can

Foundation item: Research Found for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20122105120014, 20122105120009); Joint Fund of National Science Foundation of Liaoning Province (No. 2013023006); National Natural Science Foundation of China (No. 31300672)

*Corresponding author: JIANG Tao: Tel: 86-411-86110350; E-mail: jiangtaodl@163.com
XIN Yi: Tel: 86-411-86110295; E-mail: jimxindl@163.com

Received: July 21, 2015; **Accepted:** October 20, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20122105120014, 20122105120009); 辽宁省自然科学基金联合基金项目(No. 2013023006); 国家自然科学基金项目(No. 31300672)

*通讯作者: 姜涛: Tel: 86-411-86110350; E-mail: jiangtaodl@163.com

辛毅: Tel: 86-411-86110295; E-mail: jimxindl@163.com

收稿日期: 2015-07-21; **接受日期:** 2015-10-20; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-06

destroy structure of cell wall of mc²155 and cause the changes of cellular morphology. The expression change of MSMEG_6281 is determined after ethambutol treatment by RT-PCR. The intact MSMEG_6281 gene was amplified from *M. smegmatis* mc²155 genomic DNA. After analyzing by enzymatic digestion and DNA sequencing, the MSMEG_6281 gene was cloned into vector pVV16 to constitute the recombinant plasmid of pVV16-MSMEG_6281. The expression of MSMEG_6281 for the recombinant mc²155 strain was confirmed by SDS-PAGE and western blotting. **[Results]** RT-PCR results show that gene expression of MSMEG_6281 was up-regulated under the condition of ethambutol treatment for 6 h and 12 h. The recombinant mc²155 strain over-expressing MSMEG_6281 demonstrated a lag growth, and the cellular morphological turns longer than wild type mc²155. **[Conclusion]** MSMEG_6281 must be related with peptidoglycan metabolism of the cell wall.

Keywords: MSMEG_6281, *Mycobacterium smegmatis* mc²155, Cellular morphology, Peptidoglycan hydrolases

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)是引起结核病的主要致病菌。随着艾滋病的流行和耐药菌株的不断增多,结核病又有卷土重来的趋势,研究和开发新一代抗结核药物已迫在眉睫。结核分枝杆菌细胞壁具有独特的高疏水性结构,其核心结构由外至内分别是:分枝菌酸、聚阿拉伯糖半乳糖和肽聚糖(Peptidoglycan)。这3种生物大分子共价相连组成庞大的复合物,即肽聚糖-聚阿拉伯糖半乳糖-分枝菌酸复合物(Mycolyl-arabino-galactan-peptidoglycan complex, mAGP)。肽聚糖是mAGP中的重要组成成分,位于细胞膜的外侧,具有高度复杂的三维网状结构,在维持细菌形态方面具有重要作用,也是抗结核药物开发的有效作用部位之一^[1-3]。

一线抗结核药物乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)处理结核分枝杆菌后,细胞壁聚阿拉伯糖在短时间内大量流失,阿拉伯糖基转移酶 EmbCAB 被认为是 EMB 的主要作用靶点,但各项研究表明 EMB 作用可能是个多靶点的过程^[4-5]。进一步利用 EMB 处理后基因转录谱变化的基因芯片结果(GSE1642)进行统计学处理和聚类分析^[6],在众多表达变化的基因中,筛选到与细胞壁肽聚糖代谢相关的基因,即 Rv3717。EMB 处理后, Rv3717 基因表达明显上调。最近报道表明: Rv3717 具有酰胺酶活性的自溶素,可以分解细胞壁肽聚糖^[7-8],推测影响细菌形态和细胞壁的完整性。耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* mc²155, mc²155)是结核分枝杆菌的模式

菌,与结核分枝杆菌具有相似的细胞壁结构,但其生长迅速且对人无致病性。耻垢分枝杆菌 MSMEG_6281 是 Rv3717 同源蛋白,具有 76%的同源性。因此,本研究首先检测了 EMB 作用于耻垢分枝杆菌后 MSMEG_6281 基因的表达变化;再建立 MSMEG_6281 过表达的耻垢分枝杆菌菌株,分析 MSMEG_6281 过表达对耻垢分枝杆菌形态的影响,从而推测 MSMEG_6281 与细胞壁肽聚糖水解之间的关系,为 Rv3717 与细胞壁肽聚糖代谢的相关性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis* mc²155)以及 pVV16 质粒由本实验室保存。RT-PCR 试剂盒、pMDTM18-T 载体克隆试剂盒、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、250 bp DNA ladder,购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);抗 His 抗体购自 Sigma-ALdrich 有限公司;辣根过氧化物酶 HRP 标记的马抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

PCR 基因扩增仪, Thermo Fisher Scientific 有限公司; JY92 超声波细胞粉碎机, 宁波科生仪器厂; CT18RT 台式高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备工程有限公司; 2510 电转仪, Eppendorf 有限公司; JSM-6360LV 扫描电子显微镜, 日本电子(JEOL)公司。

1.2 方法

1.2.1 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR): 当耻垢分枝杆菌菌体 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入终浓度为 10 mg/L 的一线抗结核药物乙胺丁醇(Ethambutol, EMB), 继续培养 6 h 和 12 h, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 洗涤细菌, 4 °C、5 000×g 离心 10 min 收获细菌。将收获的菌体于液氮中冷冻 2 min, 在室温中放置 2 min, 反复冻融 2 次, 加入 1 mL Trizol/10⁹ 细胞, 涡旋混匀后提取细菌总 RNA。根据 JCVI CMR 数据库中 MSMEG_6281 的序列, 设计 MSMEG_6281 的上下游引物(5'-GTCGTTGCCCCGTTGTG-3', 5'-CGCGTGTGTTGCTCTCGACTTG-3')进行 RT-PCR 扩增。反转录反应体系为: RNA 2 µg, 50 µmol/L 随机引物 1 µL, DEPC 处理水 10.5 µL-RNA 体积; 混匀后, 70 °C 水浴变性 5 min, 4 °C 静置 5 min; 再加入如下反应物: 10×AMV Buffer 2 µL, 10 mmol/L dNTP 2 µL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 µL, 40 U/µL RNase Inhibitor 0.5 µL, 5 U/µL AMV 反转录酶 1 µL; 混匀后 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min 合成 cDNA 分子。25 µL PCR 反应体系为: 10×PCR buffer 2.5 µL, cDNA 模板 1 µL, 10 µmol/L 上下游引物各 0.5 µL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 µL, rTaq DNA 聚合酶 0.5 µL, ddH₂O 19.5 µL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 28 个循环; 72 °C 10 min。以 *gap* 基因为内参, 检测 MSMEG_6281 的基因表达变化。

1.2.2 MSMEG_6281 基因在 *M. smegmatis* mc²155 中的表达: 以耻垢分枝杆菌基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 方法, 设计上下游引物(5'-GGCATATGCCGTGTTCGTGTCTCGG-3', 5'-TAAGCTTACGCACGGGGCTGACGGC-3')扩增 MSMEG_6281 基因全长序列, PCR 反应体系同 MSMEG_6281 的 RT-PCR 反应。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。设计所含限制性内切酶位点分别是: *Nde* I 和 *Hind* III。酶切鉴定正确的 MSMEG_6281 基因与线性 pVV16 进行连接反应构

建 pVV16-MSMEG_6281 重组质粒。利用电转仪在 2.5 kV 和 1 000 Ω 条件下将 pVV16-MSMEG_6281 质粒电转化到 mc²155 细胞中^[9], 获得过表达 MSMEG_6281 蛋白的 mc²155 菌株。提取野生型 mc²155 和过表达 MSMEG_6281 的细菌总蛋白, 利用考马斯亮法测定细胞总蛋白质浓度。用 pVV16 作为表达载体表达目的蛋白 N 末端有 His-Tag, 可以用 Western blotting 方法检测其表达。

1.2.3 过表达 MSMEG_6281 对 mc²155 细菌生长的影响: 分别挑取野生型 *M. smegmatis* mc²155 菌株和过表达 MSMEG_6281 的菌株接种于 3 mL LB 培养基^[10], 37 °C、200 r/min 培养 48 h。用分光光度计测 OD_{600} , 将 2 个菌株浓度调至一致, 按 1:10 000 接种于 3 组 100 mL LB 培养基中。每 12 h 测一次 OD_{600} , 绘制生长曲线。

1.2.4 扫描电子显微镜观察 mc²155 细胞的形态: 接种 *M. smegmatis* mc²155 和过表达 MSMEG_6281 的 mc²155 菌液, 当 OD_{600} 达到 1.0 时收获菌体。将细胞重悬在 1 mL 的 2.5%的戊二醛中, 4 °C 放置 24–48 h。再用 10 mL 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞沉淀 3 次, 将细胞重悬于 1%的四氧化锇中再固定, 再用 PBS 洗涤。用 10 mL 浓度逐渐递增的乙醇洗涤细胞沉淀后, 将细胞重悬在约 0.1 mL 的 100%乙醇中。取其中 0.5 µL 点样到硅片上, 在 JSM-6360LV 扫描电子显微镜下观察细胞形态变化, 测量细胞长度, 并计算同一视野下细胞长度变化的比例。

2 结果与分析

2.1 EMB 处理后 mc²155 细胞中 MSMEG_6281 基因的表达变化

以 *gap* 为内参照基因, 利用 RT-PCR 技术检测对照组和 EMB 处理组 MSMEG_6281 基因的表达情况, 检测结果如图 1 所示。用 Quantity one 凝胶分析软件半定量分析表明: 与对照组相比, MSMEG_6281 基因在 EMB 处理 6 h 和 12 h 均呈现较高的表达。经过 SPSS 对平行样品统计学分析, 3 组样品 $P < 0.05$, 有显著性差异。

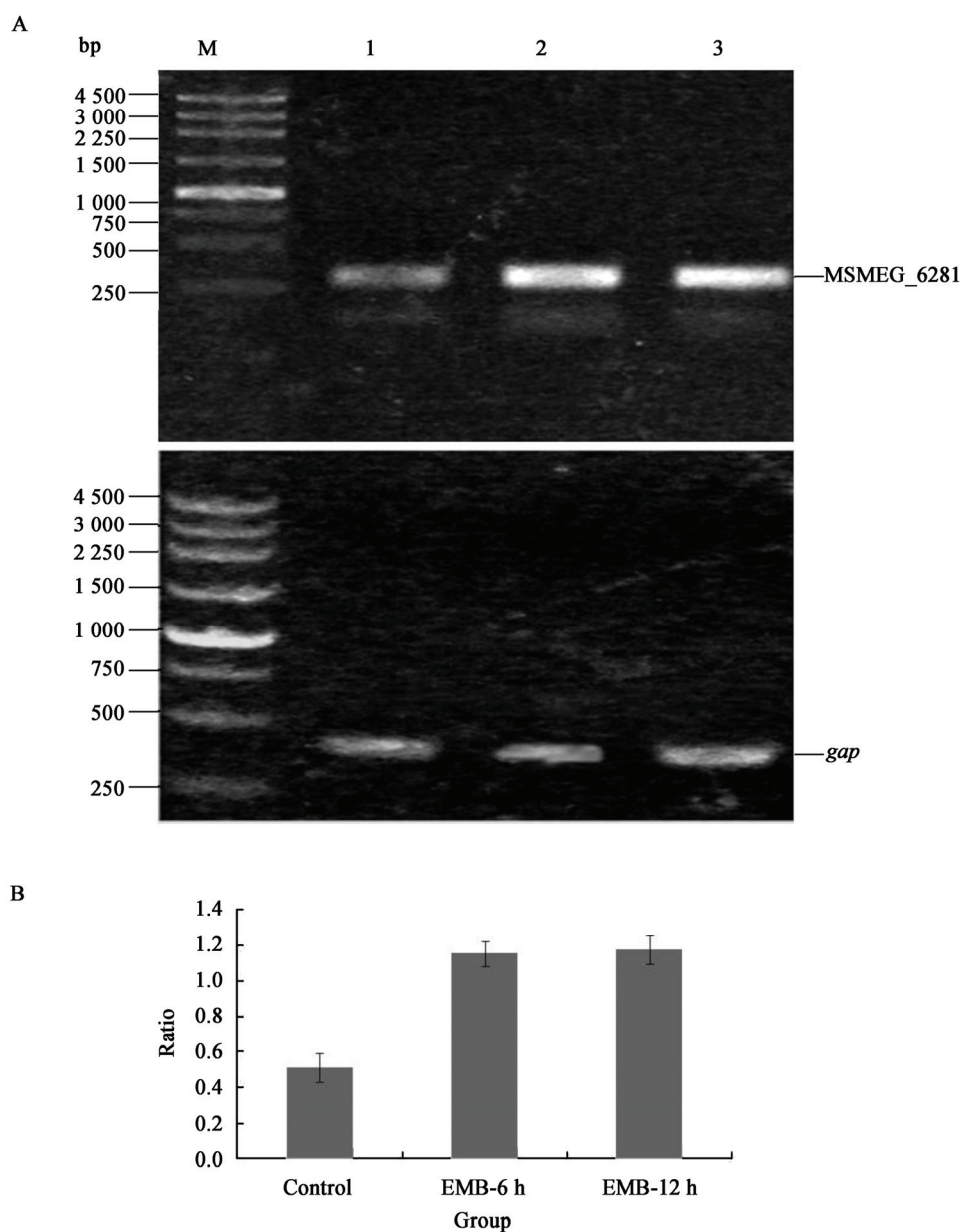


图1 RT-PCR 分析 MSMEG_6281 基因的表达变化

Figure 1 Analysis of mRNA expression of MSMEG_6281

注: A: 琼脂糖凝胶电泳分析; B: EMB 处理后 MSMEG_6281 基因的表达情况. M: 250 bp DNA ladder; 1: 对照组 MSMEG_6281 基因的扩增产物; 2: 10 mg/L EMB 处理 mc^2155 菌体 6 h 后 MSMEG_6281 基因的扩增产物; 3: 10 mg/L EMB 处理 mc^2155 菌体 12 h 后 MSMEG_6281 的基因扩增产物.

Note: A: Agarose gel electrophoresis of PCR product; B: The gene expression change analysis of MSMEG_6281. M: 250 bp DNA ladder; 1: MSMEG_6281 gene expression of control group; 2: MSMEG_6281 gene expression of mc^2155 treated by 10 mg/L EMB for 6 h; 3: MSMEG_6281 gene expression of mc^2155 treated by 10 mg/L EMB for 12 h.

2.2 建立 MSMEG_6281 基因过表达的 mc²155 菌株

以耻垢分枝杆菌 mc²155 菌株的基因组 DNA 为模板，利用高保真的 LA *Taq* DNA 聚合酶扩增出的 PCR 产物与预期片段(918 bp)大小一致。将测序得到的 MSMEG_6281 的 DNA 序列与 *M. smegmatis* mc²155 基因组数据库进行 BLAST 分析，结果表明所克隆的 MSMEG_6281 基因与基因组数据库的 MSMEG_6281 基因序列一致。进一步成功构建 pVV16-MSMEG_6281 表达载体，利用限制性内切

酶图谱鉴定与预期片段大小一致(图 2)。SDS-PAGE 电泳结果显示，在 MSMEG_6281 过表达的 mc²155 菌株的裂解液上清中出现分子量约为 31 kD 的过表达条带。利用过表达 MSMEG_6281 的抗组氨酸标签通过 Western blotting 方法得到确认(图 3)。

2.3 过表达 MSMEG_6281 对 mc²155 菌株生长的影响

在菌株接种量一致的情况下，过表达 MSMEG_6281 的 mc²155 细胞的生长速度比野生型 mc²155 慢，达到对数生长期所用的时间更长(图 4)。

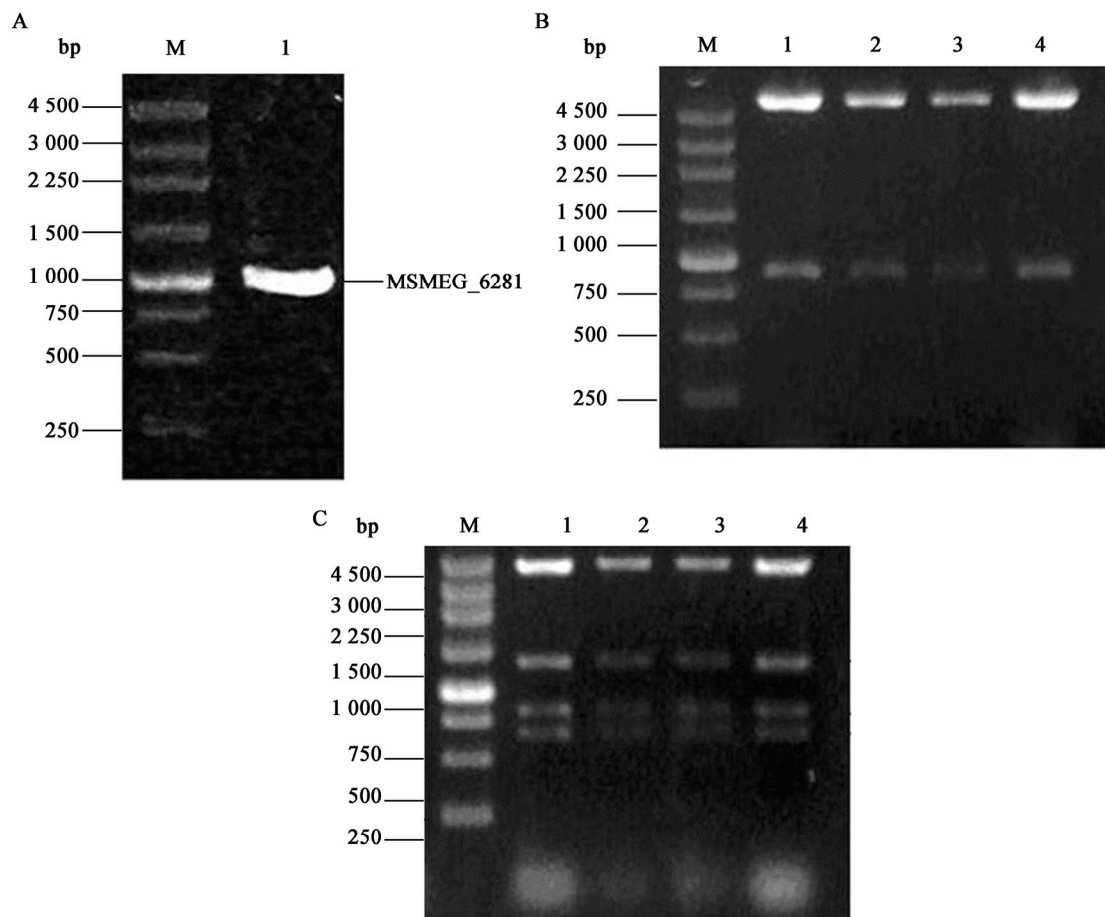


图 2 pVV16-MSMEG_6281 表达质粒的鉴定

Figure 2 Identification of pVV16-MSMEG_6281 expression plasmid

注：A：MSMEG_6281 基因全长的 PCR 扩增结果；B：Nde I 和 Hind III 酶切 pVV16-MSMEG_6281 质粒；C：Nru I 酶切 pVV16-MSMEG_6281 质粒；M：250 bp DNA ladder；1-4：不同的 pVV16-MSMEG_6281 质粒转化菌。

Note: A: PCR amplification of MSMEG_6281 gene; B: pVV16-MSMEG_6281 expression plasmid digested by *Nde* I and *Hind* III; C: pVV16-MSMEG_6281 expression plasmid digested by *Nru* I; M: 250 bp DNA ladder; 1-4: Different transformant with pVV16-MSMEG_6281.

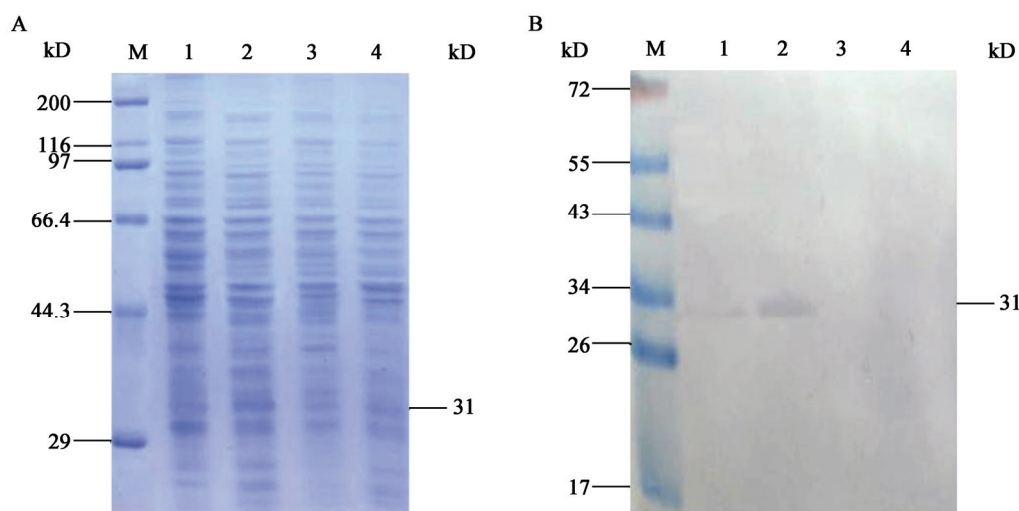


图3 pVV16-MSMEG_6281/mc²155 细胞总蛋白分析

Figure 3 Analysis of the total protein from pVV16-MSMEG_6281/mc²155

注: A: SDS-PAGE 分析; B: Western blotting 分析. M: 蛋白分子量标准; 1: pVV16-MSMEG_6281/mc²155 细胞裂解总蛋白的水溶性上清; 2: pVV16-MSMEG_6281/mc²155 细胞裂解总蛋白的水难溶性沉淀; 3: mc²155 细胞裂解总蛋白的水溶性上清; 4: mc²155 细胞裂解总蛋白的水难溶性沉淀.

Note: A: SDS-PAGE analysis; B: Western blotting analysis. M: Protein marker; 1: Supernatant of pVV16-MSMEG_6281/mc²155; 2: Pellet of pVV16-MSMEG_6281/mc²155; 3: Supernatant of mc²155; 4: Pellet of mc²155.

结果表明, MSMEG_6281 的过表达, 对菌体的生长有抑制作用。

2.4 过表达 MSMEG_6281 对 mc²155 菌株形态的影响

野生型 mc²155 细胞形态呈短棒状, 而过表达 MSMEG_6281 后, mc²155 细胞相对变得更长, 在一个视野范围内, 菌体平均长度是野生型的

1.5–2.0 倍, 表明 MSMEG_6281 的过表达影响了细胞的形态(图 5)。

3 讨论

肽聚糖是维持细菌形态的关键结构。肽聚糖水解相关基因过表达后, 对细胞壁肽聚糖的水解有促进作用, 破坏细胞壁的组成, 使细胞的形态发生变化。过表达 MSMEG_6281 的细胞在形态上确实与正常细胞有差异, 在对数生长的旺盛期, 细胞的平均长度比野生型细胞要长。所以, 本研究提示 MSMEG_6281 与细胞壁肽聚糖代谢密切相关, 参与细菌自溶以及细胞分裂等过程。结核分枝杆菌 Rv3717 是 MSMEG_6281 的同源基因, 最近有文献报道了 Rv3717 的蛋白构象, 并确定了 Rv3717 是具有酰胺酶活性的结核分枝杆菌自溶素^[7-8]。本研究通过细菌形态的变化进一步佐证了 MSMEG_6281 与细胞壁肽聚糖代谢密切相关。

结核分枝杆菌具有酰胺酶活性的自溶素, 研究对揭示复杂的结核分枝杆菌免疫逃逸机制具有重

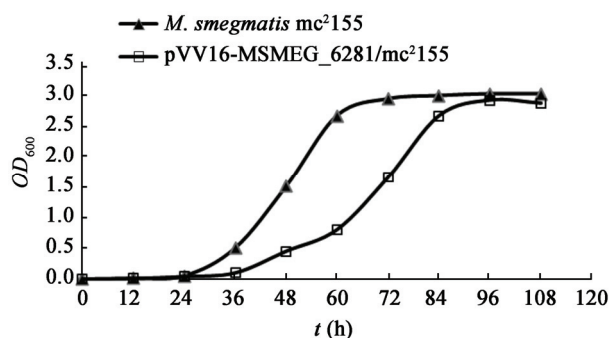


图4 pVV16-MSMEG_6281/mc²155 与野生型 mc²155 的生长曲线

Figure 4 Growth curves of pVV16-MSMEG_6281/mc²155 and wild type mc²155

要意义。肽聚糖水解酶，又称自溶素(Autolysin)，是由细菌自身产生并可以降解细胞壁肽聚糖的一类水解酶，广泛参与细胞壁肽聚糖代谢。根据作用于细胞壁肽聚糖的化学键不同，自溶素分为4类，分别为N-乙酰葡萄糖苷酶、胞壁酸酶(溶菌酶)、酰胺酶和内肽酶^[11](图6)。在这些自溶素的协同作用下，细胞壁肽聚糖方能有效降解。细胞壁肽聚糖降解的最小产物为胞壁酰二肽(Muramyl dipeptide, MDP)，而MDP又是分枝杆菌细胞骨架中具有免疫佐剂活性的最小结构单位^[12]。最近研究表明，MDP在抗结核免疫过程中发挥重要作用，它能识别单核

巨噬细胞内NOD2模式识别受体，激活NF- κ B信号途径，诱导产生一系列如TNF- α 和IF- 1β 等细胞因子，参与宿主对结核分枝杆菌的天然免疫防御，促进机体对外源性抗原的特异性免疫反应^[13-14]。具有酰胺酶活性的自溶素很可能通过破坏MDP的产生抑制NOD2受体介导的信号转导通路，从而抑制宿主免疫反应而致病^[14]。酰胺酶自溶素与细菌致病性密切相关，在很多细菌自溶素研究中已经得到证实。例如在淋球菌中，具有酰胺酶活性的自溶素功能缺失后，引起细胞分裂抑制、细菌生长缓慢、菌体变形以及MDP释放减少等改变^[15-16]；单核细胞

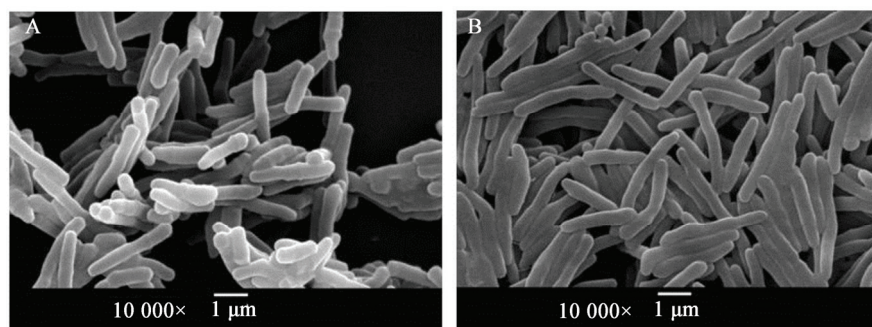


图5 利用扫描电子显微镜分析MSMEG_6281过表达对细菌形态的影响

Figure 5 Scanning electron micrographs of *M. smegmatis* mc²155 of overexpressed MSMEG_6281

注：A：野生型mc²155菌体形态；B：过表达MSMEG_6281的pVV16-MSMEG_6281/mc²155的菌体形态。

Note: A: Wild type mc²155; B: pVV16-MSMEG_6281/mc²155.

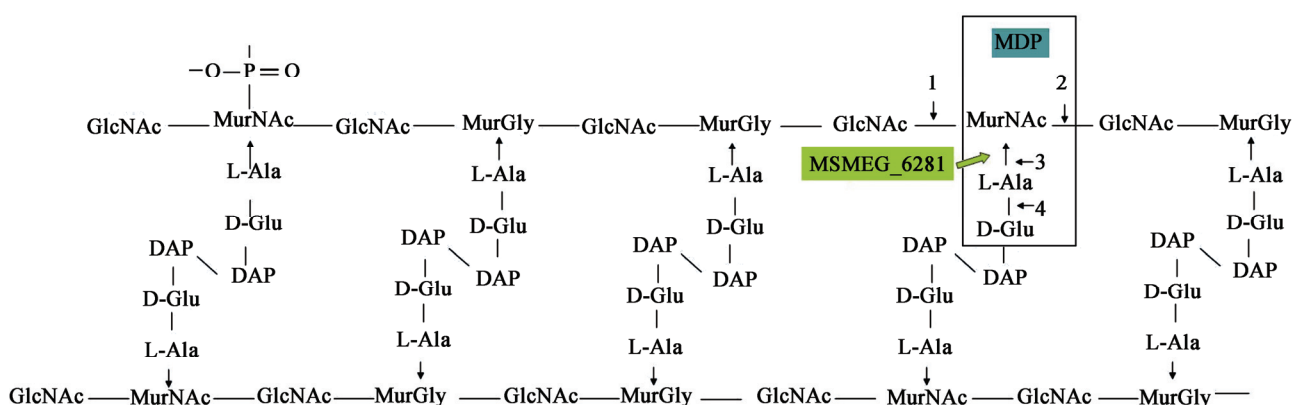


图6 结核分枝杆菌细胞壁肽聚糖的结构

Figure 6 Structure of peptidoglycan for *M. tuberculosis*

注：GlcNAc：N-乙酰葡萄糖胺；MurNAc：N-乙酰胞壁酸；MDP：胞壁酰二肽。

Note: GlcNAc: N-Acetylglucosamine; MurNAc: N-Acetylmuramic acid; MDP: Muramyl dipeptide.

增多性李斯特菌的自溶素基因敲除后,细菌致病力明显弱化,引起感染小鼠死亡率下降等免疫系统相关反应^[17-18]。因此,在自溶素作用下的MDP被水解很可能是结核分枝杆菌复杂的免疫逃逸机制之一。但目前对肽聚糖分解代谢关键酶缺少了解,只是在肽聚糖合成代谢关键酶方面有较深入研究,并寻找到几个有价值的药物筛选靶点^[19-20],所以,对Rv3717和MSMEG_6281的进一步深入研究具有重要意义。

参考文献

- [1] Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(1): 126-156
- [2] Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B. Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the Drosophila innate immune system[J]. Journal of Endotoxin Research, 2005, 11(2): 105-111
- [3] Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149-167
- [4] Belanger AE, Besra GS, Ford ME, et al. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(21): 11919-11924
- [5] Jiang T, He LQ, Zhan YY, et al. The effect of MSMEG_6402 gene disruption on the cell wall structure of *Mycobacterium smegmatis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 51(3): 156-160
- [6] Boshoff HIM, Myers TG, Copp BR, et al. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(38): 40174-40184
- [7] Kumar A, Kumar S, Kumar D, et al. The structure of Rv3717 reveals a novel amidase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography, 2013, 69(12): 2543-2554
- [8] Prigozhin DM, Mavrici D, Huizar JP, et al. Structural and biochemical analyses of *Mycobacterium tuberculosis* N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Rv3717 point to a role in peptidoglycan fragment recycling[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(44): 31549-31555
- [9] Zhang WL, Ma L, Xin Y, et al. EmbB and EmbC functional domains exert anchoring and catalyzation in biosynthesis of mycobacterial Arabinan[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(11): 1051-1060 (in Chinese) 张文利, 马莉, 辛毅, 等. EmbB 及 EmbC 功能结构域对分枝杆菌聚阿拉伯糖合成的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(11): 1051-1060
- [10] Zhang ZB, Deng YM, Xiong YY, et al. Isolation of endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) and analysis of secondary metabolite of active strain S123[J]. Microbiology China, 2015, 42(9): 1662-1670 (in Chinese) 张志斌, 邓映明, 熊瑶瑶, 等. 东乡野生稻内生放线菌分离及菌株 S123 次级代谢产物分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1662-1670
- [11] Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions[J]. Microbiology, 2000, 146(2): 249-262
- [12] Humann J, Lenz LL. Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host mucopeptide detection[J]. Journal of Innate Immunity, 2009, 1(2): 88-97
- [13] Brooks MN, Rajaram MVS, Azad AK, et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(3): 402-418
- [14] Yang Y, Yin C, Pandey A, et al. NOD2 pathway activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* infection involves the stable polyubiquitination of Rip2[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(50): 36223-36229
- [15] Garcia DL, Dillard JP. AmiC functions as an N-Acetylmuramyl-L-Alanine amidase necessary for cell separation and can promote autolysis in *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(20): 7211-7221
- [16] Garcia DL, Dillard JP. Mutations in *ampG* or *ampD* affect peptidoglycan fragment release from *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(11): 3799-3807
- [17] Asano K, Sashinami H, Osanai A, et al. Autolysin amidase of *Listeria monocytogenes* promotes efficient colonization of mouse hepatocytes and enhances host immune response[J]. Internal Journal Medical Microbiology, 2011, 301(6): 480-487
- [18] Humann J, Bjordahl R, Andreasen K, et al. Expression of the p60 autolysin enhances NK cell activation and is required for listeria monocytogenes expansion in IFN-gamma-responsive mice[J]. The Journal of Immunology, 2007, 178(4): 2407-2414
- [19] El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors[J]. Molecular Microbiology, 2003, 47(1): 1-12
- [20] Zhou Y, Xin Y, Sha SS, et al. Kinetic properties of *Mycobacterium tuberculosis* bifunctional GlmU[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(10): 751-757