

研究报告



鼠伤寒沙门氏菌参与细菌竞争相关基因

王萍 刘存伟 董俊芳 邹清华*

北京大学医学部基础医学院病原生物学系 北京 100191

摘要:【背景】细菌在环境中以复杂的微生物群落形式存在,细菌间的竞争是细菌生存的一种重要方式。鼠伤寒沙门氏菌是一种可引起胃肠道疾病的重要人畜共患病病原体,其在水源、食物或是宿主肠道等环境中均需与其他细菌进行相互作用以获得生存优势。【目的】通过转座子技术构建鼠伤寒沙门氏菌转座子插入突变体库,从中筛选鼠伤寒沙门氏菌与细菌竞争能力相关的基因,探讨该菌参与细菌竞争的相关机制。【方法】利用 EZ-Tn5™<R6K_{ori}/KAN-2>Tnp Transposome™试剂盒获得了含有 1 323 个突变株的鼠伤寒沙门氏菌突变库,并针对其与大肠杆菌 JM109 以及 MG1655 的竞争作用进行筛选,利用反向 PCR 对筛选出的在细菌竞争能力上具有显著差异的突变株进行侧翼序列的鉴定,确定了转座子插入位点,并根据插入位点所表达基因的功能分析了其造成细菌竞争能力差异的可能原因。【结果】筛选出细菌竞争能力差异显著的 13 株突变株,其中 2 株突变株竞争能力显著增强,插入突变的基因为 *polB* 与 *flhd*; 11 株竞争能力显著下降的细菌突变的基因分别为 *fstJ*、*rfbG*、*recC*、*rfaI*、*rfaG*、*rfbC*、*udha*、*plsc*、*mdh*、*res* 及 *ackA*。【结论】毒力因子、细菌膜蛋白的完整、细菌代谢能力的正常及其天然免疫能力和 DNA 的合适修饰等都与细菌参与竞争的能力密切相关,此研究为进一步探讨影响细菌竞争能力的具体机制奠定了基础。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌, 转座子, 突变株, 细菌竞争

Genes of *Salmonella typhimurium* participating in bacterial competition

WANG Ping LIU Cunwei DONG Junfang ZOU Qinghua*

Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Abstract: [Background] Bacteria exist in the form of complex microbial communities in the environment, and the competition among bacteria is an important way for bacteria to survive. *Salmonella typhimurium* is an important zoonotic pathogen that causes gastrointestinal diseases. It needs to interact with other bacteria in water, food or host intestine to gain survival advantage. [Objective] This study intends to construct a transposon insertion mutant library of *Salmonella typhimurium* by transposon technology, and to screen the mutant library according to the bacterial competitiveness, thus to explore the relevant

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81572041)

*Corresponding author: E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

Received: 10-06-2020; Accepted: 17-07-2020; Published online: 17-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81572041)

*通信作者: E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-10; 接受日期: 2020-07-17; 网络首发日期: 2020-09-17

mechanism of bacterial competition. **[Methods]** The EZ-Tn5™<R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ kit was used to obtain a mutant library of *Salmonella typhimurium* containing 1 323 mutants. The competition of the mutants and wild type strain with *Escherichia coli* JM109 and MG1655 were screened. Then the flanking sequences were identified by reverse PCR, the insertion sites were determined. **[Results]** This study screened out 13 mutant strains with significant differences in bacterial competition. Among them, 2 mutant strains showed enhanced competitiveness. The inserted mutation genes were *polB* and *flhD*. Eleven bacterial mutants with decreased competitiveness were inserted in *fstJ*, *rfbG*, *recC*, *rfaI*, *rfaG*, *rfbC*, *udhA*, *plsc*, *mdh*, *res* and *ackA*. **[Conclusion]** Virulence factors, the integrity of bacterial membrane, the normal bacterial metabolic capacity and their natural immunity and the appropriate modification of DNA are all closely related to the ability of bacteria to participate in competition. This study laid the foundation to further explore the specific factors affecting the ability of bacterial competition.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, transposon, mutants, bacterial competition

鼠伤寒沙门氏菌是一种可引起多宿主食源性疾病的革兰氏阴性杆菌, 其能通过粪口途径进入宿主的肠道, 侵袭巨噬细胞或树突状细胞, 引起宿主全身系统性疾病甚至导致宿主慢性感染, 与胆囊癌等疾病密切相关^[1-3]。无论在其生活环境中还是在宿主肠道内, 鼠伤寒沙门氏菌都会遇到多种细菌, 通过与细菌相互作用争夺生态位及资源, 获得生存优势导致感染^[4]。细菌间的竞争分为剥削性的竞争以及干扰性的竞争, 前者会耗尽周围的养分等资源, 后者则主要产生阻碍竞争者的对抗性因素^[5-6]。目前已知的细菌竞争相关机制包括产生酶等特殊代谢物形成细胞外囊泡进行防御, 或是利用接触依赖性抑制系统及 VI 型分泌系统(Type VI Secretion System, T6SS)将毒素等效应蛋白直接递送到竞争对象中^[7]。目前已发现鼠伤寒沙门氏菌可以利用 T6SS 杀伤宿主的共生细菌^[4], 也有研究发现鼠伤寒沙门氏菌可以通过引起宿主的免疫反应抑制微生物群来间接竞争生态位, 帮助其在肠道内定殖^[8]。

转座子插入失活技术可以快速获得大量随机插入的突变株, 从而可以针对细菌的某些特性进行研究, 例如获取减毒株并寻找毒力相关基因^[9]、获取益生菌营养缺陷突变体探究其对人体的有益机制^[10]、研究耐药相关基因^[11]等。EZ Tn5 转座子系统能随机单拷贝地插入细菌基因组, 而且其突变株具有遗传稳定性^[9,11], 为建立

稳定的突变库的较好方法之一。本研究通过该系统建立鼠伤寒沙门氏菌的突变体库, 从中筛选细菌竞争能力变化的突变体, 从而探讨鼠伤寒沙门氏菌与细菌竞争能力相关的基因。

1 材料与方法

1.1 菌株和引物

实验所用菌株为鼠伤寒沙门氏菌 LT2 野生型菌株、大肠杆菌 JM109 菌株和 MG1655 菌株, 大肠杆菌 JM109 及 MG1655 均经化学转化导入 pUC19 质粒以使其具备羧苄青霉素抗性。以上菌株均为实验室保存菌株。实验所用引物如表 1 所示。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

卡那霉素(Kanamycin, Kan)及羧苄青霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司, 其浓度均选取为 50 μg/mL 的终浓度; 构建突变库所使用的 EZ-Tn5™<R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™试剂盒, Epicentre Biotechnologies 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; *Bam*H I、*Pst* I 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, 宝

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物	序列	目的
Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
FP	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	To identify
RP	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	flanking sequences

生物工程(大连)有限公司; 2×*Taq* PCR MasterMix, 天根生化科技(北京)有限公司。电转化法所用的 MicroPulser 电击仪和电击杯, Bio-Rad 公司; THZ-C 恒温振荡器, 苏州培英仪器设备公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司。LB 肉汤和 LB 琼脂培养基, 北京陆桥技术股份有限公司; SOC 培养基, 青岛日水生物科技有限公司。

1.3 鼠伤寒沙门氏菌突变库的构建

将鼠伤寒沙门氏菌 LT2 菌株接种到 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜后挑取单菌落到 3 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜。次日, 按 1:100 的比例接种到预热为 37 °C 的 LB 液体培养基中, 在恒温振荡培养箱中以 37 °C、200 r/min 振荡培养 4 h; 之后立刻置冰水浴中 30 min, 随后在 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用预冷的去离子水洗涤 3 次; 再用 10% 的预冷甘油洗涤 2 次, 最终加入 100 μ L 的 10% 预冷甘油重悬细胞并分装, 每 50 μ L 分装为一支, 分装后于 -80 °C 保存备用。

在制备出的感受态细胞中加入 1 μ L 的 EZ-Tn5™<R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome™, 混匀后转移到电击杯内, 选择 EC2 模式进行电击后, 加入 900 μ L 的 SOC 液体培养基, 转移到 2 mL 离心管内, 在 37 °C、200 r/min 振荡培养 1 h, 将上述产物分别涂到含有 Kan 的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜后挑取单菌落到另一含有 Kan 的 LB 琼脂平板上确认其抗性, 获得突变库。

1.4 初筛

分别挑取突变株及野生株部分菌落接种到含有 LB 液体培养基的 96 孔板中, 37 °C 培养 12 h 后测量其 OD_{570} 值, 将培养物转移到另一 96 孔板内, 加入培养过夜的大肠杆菌 JM109 菌株并使最终沙门氏菌与大肠杆菌的比例为 10:1^[12], 测此时的 OD_{570} 读数(记为 A), 12 h 后再次测 OD_{570} 值(记为 B)。将 B 值与 A 值相减, 代表 12 h 内该菌与

大肠杆菌竞争后的浊度变化, 使用所有菌株 OD_{570} 值的均值 \pm 2 倍标准差(SD)的方式, 筛选出异常值, 记录对应的菌株。初筛实验仅进行一次, 用于粗略筛选出可能与细菌竞争相关的突变株。

1.5 突变株生长曲线测定

随机插入突变获得的突变株生长能力也有可能发生改变, 如果菌株生长能力改变, 则必然会导致竞争能力改变。为了排除这一因素对细菌竞争可能造成的影响, 对初筛获得的所有突变株进行生长能力的检测。将初筛所得的菌株及野生株细菌分别在含有 3 mL LB 液体培养基的试管内 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 测量各菌的浊度, 调整各菌的终浊度均为 3 麦氏单位(McFarland, MCF), 使用 LB 液体培养基进行 20 倍稀释后取 200 μ L 转移到 96 孔板内, 使用酶标仪测量初始 OD_{570} 值, 之后在 37 °C 条件下培养 12 h 且每隔 1 h 使用酶标仪测量其 OD_{570} 值, 在测量前均进行轻微振荡以精确测量浊度。

1.6 细筛

将初筛所得的菌株及野生株细菌分别在含有 3 mL LB 液体培养基的试管内 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 测量各菌的浊度, 调整各菌的终浊度均为 3 MCF, 将沙门氏菌各突变株与大肠杆菌 JM109 以 10:1 的比例转接到新鲜的 LB 液体培养基内, 培养 12 h 后收集培养产物稀释并分别涂到含有 Kan 的 LB 琼脂平板(用于筛选最终的沙门氏菌)及含有羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上(用于筛选大肠杆菌), 将相同比例的大肠杆菌再单独培养作为无沙门菌作用的对照。获得在细菌竞争能力上统计学差异显著的细菌后, 将这些细菌再次用相同的方法与大肠杆菌 MG1655 进行竞争, 涂布含有羧苄青霉素的 LB 琼脂平板检测沙门氏菌对 MG1655 的杀伤能力。

生长曲线测定及细筛实验均重复 2 次以上,

统计及作图选用 Graphpad Prism 5.0 软件, 选用 t 检验进行统计分析各突变株与野生型的差异, 以 $P<0.05$ (*)作为有统计学差异, $P<0.01$ 及 $P<0.001$ 分别用“**”及“***”表示, 作为显著统计学差异。

1.7 突变株插入位点的鉴定

突变株插入位点侧翼序列的鉴定选用反向 PCR 法^[13], 分别将最终获得的细菌竞争能力差异显著的细菌再次接种到新鲜的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜后挑取单菌落到含有 3 mL LB 液体培养基试管内, 在 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取各细菌的总 DNA, 将各突变株的基因组 DNA 分别使用 *Bam*H I 或 *Pst* I 限制性内切酶酶切, 将其酶切产物使用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 次日将连接产物使用乙醇沉淀, 获取的 DNA 产物使用 FP/RP 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 模板 1 μ L, 引物 FP/RP (10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix 10 μ L, 无核酶去离子水 7 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。将获得的部分 PCR 产物电泳确认条带大小后, 送去生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序片段进行 NCBI BLAST, 确定突变株内转座子的插入位点。

2 结果与分析

2.1 突变库的构建及初筛结果

使用转座子随机插入鼠伤寒沙门氏菌 LT2 菌株, 共获得 1 323 个突变株, 转化效率约为 4.38×10^6 CFU/ μ g。将所有突变株以及野生株分别与大肠杆菌进行共同培养, 对培养物的浊度进行测定, 与野生株相比, 其中 80 个突变株与大肠杆菌共培养后, 培养物的浊度出现显著下降或升高。

2.2 细筛结果

由于吸光度法精确度较差, 接着利用菌落计数的方法对 80 个鼠伤寒沙门氏菌突变菌株进行了验证。将突变株以及野生株分别与大肠杆菌 JM109 进行共培养, 对培养物进行稀释培养并计数, 对所得菌落数进行比较。最终结果显示 49 个菌株的细菌竞争能力与野生株存在显著差异(图 1), 其中 32 个突变株的细菌竞争能力显著下降(被捕食的大肠杆菌数量增加), 20 个突变株的竞争能力显著增强, 选取这 49 个突变株中 2 倍以上差异的 13 株突变株, 再次使用大肠杆菌 MG1655 作为被捕食菌株进行细菌竞争实验, 结果显示与 JM109 竞争结果趋势一致, 11 个突变株的细菌竞争能力显著下降, 2 个突变株的细菌竞争能力显著增强(图 2)。

对 80 株细菌进行生长能力的检测, 检测结果如图 3 所示, 显示生长能力有差异的细菌共 9 株, 分别为 F318、F319、F320、M199、M81、M146、S210、S262 和 F372, 其中, S210、M146 及 F372 的细菌竞争能力显著减弱, F196 及 F615 的细菌生长能力虽然没有显著变化, 但在培养时显示细菌菌落相对于野生株及其他突变株有肉眼可见的缩小。

2.3 插入位点的确认

使用反向 PCR 方法对 13 株细菌竞争能力变化 2 倍以上的突变株进行深入研究, 确定各菌株插入位点的侧翼序列, 以确定转座子在各突变株内的插入位点, 结果如表 2 所示。13 个菌株中, 9 个菌株内的转座子为反向插入, 4 个为正向插入。对其进行 KEGG 通路分析(https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html)显示, 导致细菌竞争能力下降的突变株其突变位点所涉及的通路主要为代谢通路, 包括次生代谢产物的生物合成、甲烷代谢、碳代谢、丙酮酸代谢及脂多糖生物合成等。

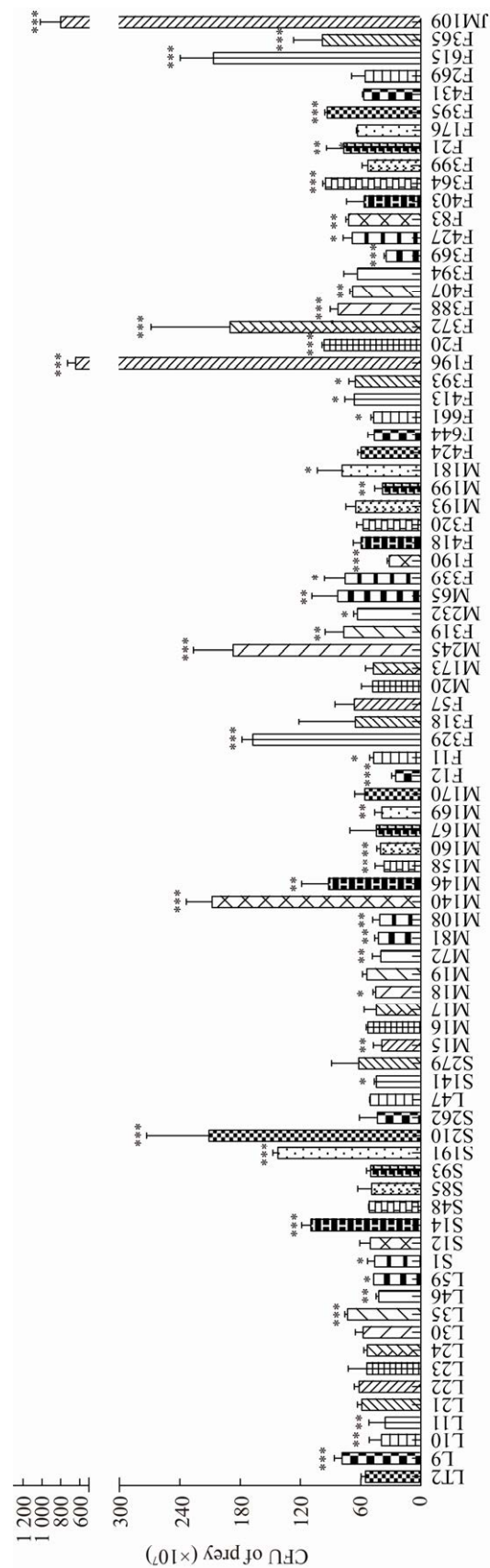


图 1 鼠伤寒沙门氏菌LT2及其突变菌株与JM109细菌竞争12 h后JM109菌落计数结果

Figure 1 CFU of prey when *Salmonella typhimurium* and *E. coli* JM109 competing for 12 h

注：将与野生株比较后的统计学差异用*表示； $P<0.05$ (*)； $P<0.01$ (**)； $P<0.001$ (***)

Note: Significant differences were defined by $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) and $P<0.001$ (***) compared to the wild type strain

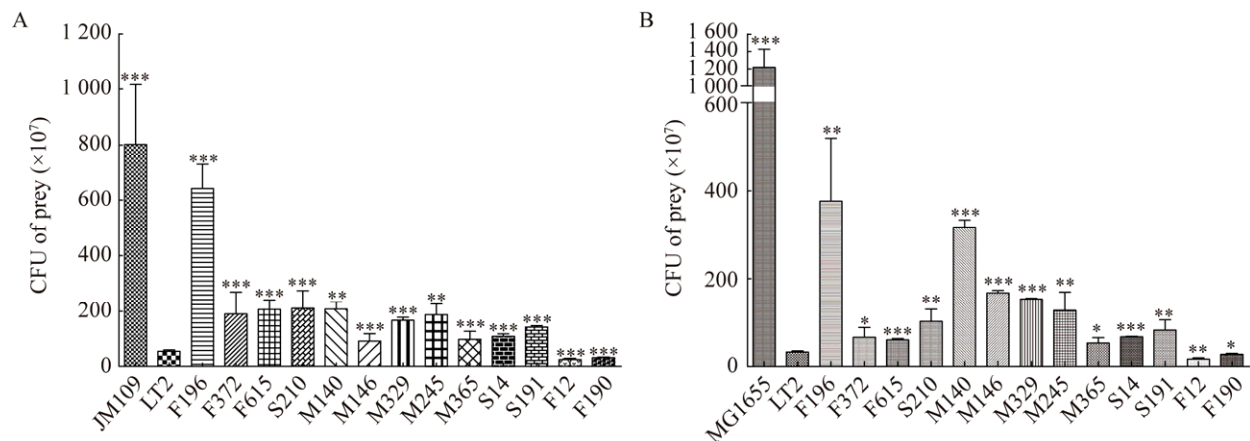


图2 分别以 JM109 (A)及 MG1655 (B)作为竞争对象后被捕食者菌落计数结果

Figure 2 CFU of prey *E. coli* JM109 (A) and MG1655 (B) respectively

注: A: JM109; B: MG1655。将与野生株比较后的统计学差异用*表示: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

Note: A: JM109; B: MG1655. Significant differences were defined by $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) compared to the wild type strain

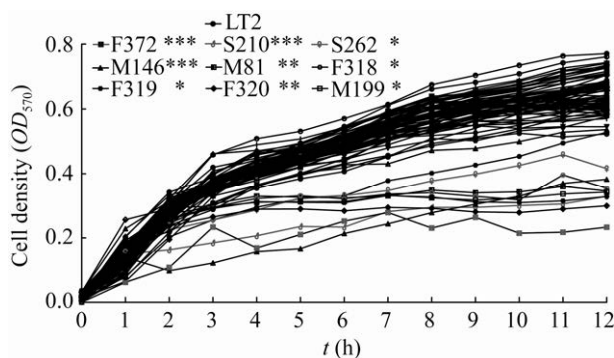


图3 野生株及突变株的生长曲线

Figure 3 The growth curve of the mutant strains compared to the parental wild-type strain

注: 将与野生株比较后的统计学差异用*表示: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)。图例仅列出有统计学差异菌株名称

Note: Significant differences were defined by $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) compared to the wild type strain. The legends of the figure only represent mutants that have significant differences

3 讨论与结论

在建立突变库时, 细菌感受态细胞的状态对转化效率至关重要, 本研究在进行转化前确定了鼠伤寒沙门氏菌电转化的最佳条件是取较多对数生长期的细菌进行感受态的制备, 对制备的感受态用 10% 的甘油进行一定浓缩后使用 EC2 模式 (2.5 kV) 进行电转化。利用这种条件, 本研究

将 EZ-Tn5<R6K γ ori/KAN-2>转座子系统成功导入鼠伤寒沙门氏菌感受态内, 转座酶被激活后, 转座子随机插入到细菌的基因组 DNA 中, 最终获得了包含 1 323 个突变株的鼠伤寒沙门氏菌转座子插入突变库, 筛选出了 13 株与大肠杆菌共同培养时竞争能力显著变化的突变株, 并通过反向 PCR 技术以及测序确定了插入位点。

在 13 株突变株中, 2 株显示出细菌竞争能力增强, 其插入突变的基因为 *polB* 与 *flhD*。 *polB* 基因编码 DNA 聚合酶, 这种聚合酶参与重新启动受损 DNA 的合成, 已有研究证明其缺失会使某些化学药物对鼠伤寒沙门氏菌的致突变率降低^[14], 铜绿假单胞菌缺失 *polB* 后会发生绿脓素产量的改变而使其对细胞的杀伤力更强^[15], 这与本研究的结果一致, 我们认为 *polB* 可以控制细菌的毒力特性, 例如控制毒素的分泌等来帮助细菌与其他细菌暂时地“和平共处”。 *flhD* 为编码 I 型鞭毛蛋白的基因, 对细胞表面鞭毛的形成及功能发生至关重要^[16], 先前的研究^[17]发现 *flhD* 突变体细菌对小鼠肠上皮细胞的侵袭能力降低, 但其对小鼠的毒性稍微增强, 推测增强的毒力与代谢负担的降低相关; 另一项研究^[18]发现, 在鼠伤寒沙门氏菌进入

表 2 突变株信息

Table 2 The characteristics of the mutants

菌株编号 The name of bacteria	插入方向 The direction of inserting	插入位点/基因 Insertion site/Gene	编码产物 Protein name	KEGG 通路编号 KEGG pathways
F196	Reverse	STM3297/ <i>fstJ</i>	23S rRNA (uridine(2552)-2'-O)-methyltransferase	\
F372	Reverse	STM2091/ <i>rfbG</i>	CDP-glucose 4,6-dehydratase	stm01100, stm00520
F615	Reverse	STM2996/ <i>recC</i>	Exodeoxyribonuclease V subunit gamma	stm03440
S210	Reverse	STM3718/ <i>rfaI</i>	Lipopolysaccharide 1,3-galactosyltransferase	stm01100, stm00540
M140	Reverse	STM3722/ <i>rfaG</i>	Glucosyltransferase I RfaG	stm01100, stm00540
M146	Reverse	STM 2094/ <i>rfbC</i>	dTDP-4,deoxyrhamnose 3,5 epimerase	stm01100, stm01110, stm00523, stm00521
F329	Reverse	STM4126/ <i>udha</i>	NAD(P)(+) transhydrogenase	\
F365	Forward	STM3173/ <i>plsc</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	\
M245	Forward	STM3359/ <i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	stm01100, stm01200, stm00620, stm01110, stm00680, stm01120, stm00020, stm00630, stm00270
S14	Reverse	STM0358/ <i>res</i>	DNA restriction (DNA helicase)	\
S191	Forward	STM2337/ <i>ackA</i>	Acetate kinase	stm01100, stm01200, stm00620, stm00680, stm01120, stm00640, stm00430,
F12	Reverse	STM0097/ <i>polB</i>	DNA polymerase II	\
F190	Forward	STM1925/ <i>flhD</i>	Regulator of flagellar biosynthesis	\

Note: \: Unknown pathway; stm01100: Metabolic pathways; stm01110: Biosynthesis of secondary metabolites; stm01120: Microbial metabolism in diverse environments; stm01200: Carbon metabolism; stm00020: Citrate cycle (TCA cycle); stm00520: Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; stm00620: Pyruvate metabolism; stm00630: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; stm00640: Propanoate metabolism; stm00680: Methane metabolism; stm00270: Cysteine and methionine metabolism; stm00430: Taurine and hypotaurine metabolism; stm00540: Lipopolysaccharide biosynthesis; stm00523: Polyketide sugar unit biosynthesis; stm00521: Streptomycin biosynthesis; stm03440: Homologous recombination

宿主细胞后 STM1697 可与 FlhD 结合，抑制 RNA 聚合酶的募集及鞭毛基因的表达，由于鞭毛蛋白被抑制可以使沙门氏菌逃避宿主的免疫攻击，我们推测本研究 *flhD* 基因被插入失活后造成的细菌竞争能力增强很可能是由于其逃避了来自靶细菌的免疫攻击，使其更易杀伤靶细菌，或是由于其合成鞭毛受阻而使其代谢负担降低所致，但其具体机制仍需进一步验证。

11 株竞争能力下降的细菌突变基因分别为 *fstJ*、*rfbG*、*recC*、*rfaI*、*rfaG*、*rfbC*、*udha*、*plsc*、*mdh*、*res* 及 *ackA*，在本研究中将其分为 3 类。第 1 类与细菌的 DNA 修饰等相关：*recC* 编码的基因为核酸内切酶基因^[19]，为基因重组所需，是沙门氏菌对秀丽隐杆线虫的毒力因子之一^[20]。*res* 基因编码 DNA 限制酶，与细菌抵御外界 DNA 的

能力相关^[21]。*fstJ* 编码细菌的 23S rRNA 甲基转移酶，甲基转移酶可以参与细菌的甲基化修饰，而甲基化状态的不同可以使 DNA 与蛋白的结合能力不同而调控某些基因的表达，并与细菌的致病性等相关^[22]，对 *fstJ* 基因的研究目前为缺失状态，本研究发现该基因缺失后，细菌与大肠杆菌竞争的能力显著减弱，可能与其对细菌的毒力相关蛋白基因等的修饰调控相关，值得深入研究探讨。第 2 类基因直接参与 LPS 等毒力因子的表达：编码 CDP-葡萄糖 4,6-脱水酶的 *rfbG* 基因及编码 dTDP-4-脱水海洛糖 3,5-差向异构酶的 *rfbC* 基因均属于 *rfb* 基因簇的成员，编码脂多糖 1,3-半乳糖基转移酶的 *rfaI* 及编码葡萄糖基转移酶的 *rfaG* 均属于 *rfa* 基因簇的成员，这 2 个基因簇对于脂多糖 LPS 的生物合成至关重要^[23-27]。已有研究发现，

在沙门氏菌中 *rfbG* 及 *rfaI* 基因的缺失会导致 LPS 结构改变而使其对小鼠或蜡蛾幼虫的毒力显著降低^[23,28-29]。在本研究中发现这些基因的突变不仅使细菌竞争能力减弱,对细菌的生长能力也有一定的减弱作用。第 3 类基因为调节细菌的代谢或是参与细菌的膜结构等:*udhA* 编码的转氢酶催化氧化还原辅助因子 NADH 与 NADPH 的相互转化,与细菌的代谢密切相关^[30]。*plsc* 编码的 1-酰基-SN-甘油-3-磷酸酰基转移酶催化溶血磷脂酸的酰化作用,并负责从头生产磷脂酸,磷脂酸是合成各种膜甘油磷脂的前体,其可作为不可或缺的膜蛋白发挥生理作用^[31]。*mdh* 编码的苹果酸脱氢酶能催化苹果酸与草酰乙酸的可逆转化,为糖代谢的关键酶之一^[32]。*ackA* 编码的乙酸激酶对乙酸盐代谢至关重要,其缺失使丙酮酸节点处发生代谢障碍,并对糖酵解及三羧酸循环都会产生影响^[33]。

综上所述,本研究发现除了必要的毒力因子外,膜蛋白的完整、细菌代谢能力的正常及其天然免疫能力和 DNA 的合适修饰等都对细菌参与竞争的能力密切相关。另外,细菌在攻击其他细菌时可能会暂时与其和平共处,而这种参与负调控基因的变化对于细菌间的相互作用也至关重要。本研究涉及的毒力因子的干扰以及细菌代谢能力的完整等机制对细菌竞争能力的影响与先前的研究基本一致,但未鉴定出 T6SS 等相关系统的基因,我们认为可能是由于突变库依旧太小,未能覆盖基因组,仍需进一步扩大突变库中菌株的数量以获得其他细菌竞争相关的突变体。有学者认为虽然转座子插入突变会导致基因失活,但该基因依旧存在于细菌基因组内,其小部分甚至大部分仍然可以被转录或翻译从而导致部分活性^[15]。本研究对该菌参与细菌竞争的机制进行的只是初步筛选,仍然需要利用基因敲除等技术完全缺失靶基因观察表型变化,其引起细菌竞争能力变化的具体机制也值得进一步探讨。

REFERENCES

- [1] Nagaraja V, Eslick GD. Systematic review with meta-analysis: the relationship between chronic *Salmonella typhi* carrier status and gall-bladder cancer[J]. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2014, 39(8): 745-750
- [2] Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system[J]. *Immunology Letters*, 2017, 190: 42-50
- [3] Herrero-Fresno A, Olsen JE. *Salmonella typhimurium* metabolism affects virulence in the host: a mini-review[J]. *Food Microbiology*, 2018, 71: 98-110
- [4] Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, Lam LH, Jacobson A, Baylot V, Durand E, Journet L, Cascales E, Monack DM. *Salmonella typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(34): E5044-E5051
- [5] Birch LC. The meanings of competition[J]. *The American Naturalist*, 1957, 91(856): 5-18
- [6] Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(1): 15-25
- [7] Stubbendieck RM, Straight PD. Multifaceted interfaces of bacterial competition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(16): 2145-2155
- [8] Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota[J]. *PLoS Biology*, 2007, 5(10): 2177-2189
- [9] He YX, Xu H, Ye F, Sun HL, Wang HJ, Gong YM, Zhang L, Huang XF, Zhang PJ. Construction of mutation library in *Haemophilus parasuis* by inserting Tn5 transposon and the screening of attenuated strain[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(13): 7820-7823,7831 (in Chinese)
贺云霞, 徐慧, 叶飞, 孙慧玲, 王宏俊, 龚玉梅, 张莉, 黄秀芬, 张培君. 副猪嗜血杆菌 EZ-Tn5 转座子插入突变体库的构建及减毒株的筛选[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(13): 7820-7823,7831
- [10] Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Nomoto K, Tanaka R, Okada N, Danbara H. A practical random mutagenesis system for probiotic *Lactobacillus casei* using Tn5 transposition complexes[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 657-666
- [11] Chen XY, Jiang XF, Wei QH, Li R, Wang YY, Lü Y. Exploration of drug resistance mechanism with EZ-Tn5 transposome insertion in bacterial DNA[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology* 2010, 20(13): 1821-1824 (in Chinese)
陈晓耘, 蒋晓飞, 魏取好, 李茹, 王艳艳, 吕元. 利用 EZ-Tn5 转座子插入突变探索细菌基因组中影响其耐药性变化的因素[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(13): 1821-1824

- [12] Peng Y, Wang XR, Shou J, Zong BB, Zhang YY, Tan J, Chen J, Hu LL, Zhu YW, Chen HC, et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 26816
- [13] Kwon YM, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. Isolation of *Salmonella* typhimurium Tn5 mutants defective for survival on egg shell surface using transposon footprinting[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2003, 38(1): 103-109
- [14] Kokubo K, Yamada M, Kanke Y, Nohmi T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella* typhimurium strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals[J]. DNA Repair, 2005, 4(10): 1160-1171
- [15] Alshalchi SA, Anderson GG. Involvement of stress-related genes *polB* and *PA14_46880* in biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(11): 4746-4757
- [16] Claret L, Hughes C. Functions of the subunits in the FlhD₂C₂ transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 303(4): 467-478
- [17] Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, O'Brien AD. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(9): 5619-5625
- [18] Li BQ, Yue YY, Yuan ZL, Zhang FY, Li P, Song NN, Lin W, Liu Y, Yang YL, Li ZH, et al. *Salmonella* STM1697 coordinates flagella biogenesis and virulence by restricting flagellar master protein FlhD₄C₂ from recruiting RNA polymerase[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(17): 9976-9989
- [19] Mahan MJ, Roth JR. *recB* and *recC* genes of *Salmonella* typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(1): 612-615
- [20] Tenor JL, McCormick BA, Ausubel FM, Aballay A. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions[J]. Current Biology, 2004, 14(11): 1018-1024
- [21] Shen MJ, Qiu JP, Sun DC. Bacterial innate immunity-research progress of DNA restriction modification system[J]. Bulletin of Science and Technology, 2019, 35(6): 7-12, 19 (in Chinese)
沈敏佳, 裘娟萍, 孙东昌. 细菌先天免疫—DNA 限制系统的研究进展[J]. 科技通报, 2019, 35(6): 7-12, 19
- [22] Tong T, Wang LR. Epigenetic regulation role of DNA methylation in bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(11): 1688-1697 (in Chinese)
童童, 王连荣. 甲基化修饰在细菌表观调控中的功能[J]. 微生物学报, 2017, 57(11): 1688-1697
- [23] Jiao Y, Guo RX, Tang PP, Kang XL, Yin JL, Wu KY, Geng SZ, Li QC, Sun J, Xu XL, et al. Signature-tagged mutagenesis screening revealed a novel smooth-to-rough transition determinant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 48
- [24] Macpherson DF, Manning PA, Morona R. Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11(2): 281-292
- [25] Xiang SH, Haase AM, Reeves PR. Variation of the *rfb* gene clusters in *Salmonella enterica*[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(15): 4877-4884
- [26] Klena JD, Pradel E, Schnaitman CA. Comparison of lipopolysaccharide biosynthesis genes *rfaK*, *rfaL*, *rfaY*, and *rfaZ* of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella* typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(14): 4746-4752
- [27] Kuo TT, Stocker BAD. Mapping of *rfa* genes in *Salmonella* typhimurium by ES18 and P22 transduction and by conjugation[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 112(1): 48-57
- [28] Bender JK, Wille T, Blank K, Lange A, Gerlach RG. LPS structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73287
- [29] Kong QK, Yang J, Liu Q, Alamuri P, Roland KL, Curtiss III R. Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(10): 4227-4239
- [30] Van Rijsewijk BRBH, Kochanowski K, Heinemann M, Sauer U. Distinct transcriptional regulation of the two *Escherichia coli* transhydrogenases PntAB and UdhA[J]. Microbiology, 2016, 162(9): 1672-1679
- [31] Ogawa T, Tanaka A, Kawamoto J, Kurihara T. Purification and characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase with a substrate preference for polyunsaturated fatty acyl donors from the eicosapentaenoic acid-producing bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10[J]. The Journal of Biochemistry, 2018, 164(1): 33-39
- [32] Wang XY, Wang B, Hou ST, Zhu GP. Structure and function of malate dehydrogenases[J]. Journal of Biology, 2009, 26(4): 69-72 (in Chinese)
汪新颖, 王波, 侯松涛, 朱国萍. 苹果酸脱氢酶的结构及功能[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 69-72
- [33] Sadykov MR, Thomas VC, Marshall DD, Wenstrom CJ, Moormeier DE, Widhelm TJ, Nuxoll AS, Powers R, Bayles KW. Inactivation of the Pta-AckA pathway causes cell death in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(13): 3035-3044