

# sRNA (*istR*) 在肠炎沙门氏菌抗活性氮氧中的作用分析

曹学松 蒋惠源 曹鸣辉 顾宏伟\* 曾科\*

(南京大学 生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210093)

**摘要:** sRNA (Small non-coding RNA, sRNA) 为新近发现的基因表达调控分子, 转录后水平调控靶基因表达, 在细菌毒力、应激及对外界环境感应方面起调控作用。沙门氏菌是一种重要的人畜共患病病原菌, 可引起人类食物中毒、败血症及伤寒等。以肠炎型沙门氏菌为模型, 研究 sRNA (*istR*) 在肠炎沙门氏菌抗活性氮氧中的作用, 为沙门氏菌的防治提供新方向。参考已报道的沙门氏菌全基因组及 *istR* 序列, 设计引物, PCR 扩增 *istR* 突变用基因片段, 运用 Red 同源重组系统对肠炎沙门氏菌(SE2472)的 *istR* 基因进行定点敲除, 构建敲除菌株(SE2472 $\Delta$ *istR*), 比较野生株和敲除株对活性氮氧的敏感性; 构建回复表达质粒 pHDB3-*istR*, 将其转入 *istR* 敲除株构建回复株 SE2472 $\Delta$ *istR*-comp, 以回复表达 *istR*, 分析 *istR* 表达对沙门氏菌 *istR* 敲除株抵抗活性氮氧的回复作用。活性氮抑菌结果表明, SE2472 在 pH 5.0、NaNO<sub>2</sub> 浓度为 20 mmol/L 的 LB 液体培养基中培养 3 h, 存活率为 20.40%; 培养 6 h, 存活率降至 0.05%。同等培养条件下, SE2472 $\Delta$ *istR* 的存活率分别为 0.70% 和 0, SE2472 $\Delta$ *istR*-comp 生长情况与 SE2472 类似, 存活率分别为 21.40% 和 0.08%。同时用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分析 *istR* 在沙门氏菌抗活性氧中的作用, 活性氧抑菌结果表明, SE2472 和 SE2472 $\Delta$ *istR* 两者对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抑菌作用无明显差异。综合上述结果, 推测 *istR* 在沙门氏菌抗活性氮中起着调控作用, 在抗活性氧作用中没有调控作用。

**关键词:** 沙门氏菌, sRNA, 基因敲除, 活性氧, 活性氮

## Analysis of regulation role of sRNA (*istR*) in *Salmonella* resistant to reactive nitrogen and oxygen intermediates

CAO Xue-Song JIANG Hui-Yuan CAO Ming-Hui GU Hong-Wei\* ZENG Ke\*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(No. 30988003); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20100091120026)

\* 通讯作者: 顾宏伟: Tel: 86-25-84530997; ✉: hongweigu999@yahoo.com.cn

曾科: Tel: 86-25-84530247; ✉: kzen@nju.edu.cn

收稿日期: 2010-12-03; 接受日期: 2011-02-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Abstract:** *Salmonella* is a facultative intracellular pathogen that is associated with gastroenteritis, septicemia, and typhoid fever. It survives and replicates in macrophages during the course of infection and can be exposed to a number of stressful environments during its life cycle. Among the major antimicrobial products of macrophages are reactive intermediates of the oxidation of nitrogen (RNI) and the reduction of oxygen (ROI) which belong to oxygen-dependent antimicrobial systems of phagocytic cells. Resistance to ROI and RNI is a key feature of *Salmonella* virulence *in vivo*. Bacterial small non-coding RNA (sRNA) plays diverse physiological roles in stress responses, regulation of metabolism, control of bacterial envelope composition and bacterial virulence. In this study, we studied regulatory function of *salmonella* sRNA *istR* associated with resistance of *S. enterica* serovar Enteritidis to RNI and ROI. We constructed an *istR*-deletion mutant of SE2472 (*SE2472* $\Delta$ *istR*) using the red recombination system. The  $\Delta$ *istR* mutant of SE2472 was complemented by cloned the wild-type allele of *istR* into plasmid pHDB3. To study the contribution of *istR* to the resistance of *Salmonella enteritidis* to RNI and ROI, we studied the differences of the survival rate of wild type SE2472, *SE2472* $\Delta$ *istR* mutant and complement strain to NaNO<sub>2</sub> (pH 5.0, 20 mmol/L) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The *SE2472* $\Delta$ *istR* was more sensitive to the bactericidal activity of NaNO<sub>2</sub> (pH 5.0, 20 mmol/L) than wild type SE2472, but there is no difference in survival rate in the present of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To confirm the results, we constructed the complement plasmid and transferred it into *SE2472* $\Delta$ *istR* to rescue the survival defect. Results showed that the survival defect of *SE2472* $\Delta$ *istR* was rescued well when complement strain grown with NaNO<sub>2</sub>. The study of survival rate of the wild type SE2472 and *istR* deletion mutant in the presence of NaNO<sub>2</sub> (pH 5.0, 20 mmol/L) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrated that sRNA *istR* acts as an important regulator of the resistance of SE oxygen-dependent antimicrobial systems.

**Keywords:** *S. enterica* serovar Enteritidis, sRNA, Red recombination system, ROI, RNI

沙门氏菌(*Salmonella*)属肠杆菌科沙门氏菌属,革兰氏阴性,兼性厌氧,胞内寄生,是一种重要的人畜共患病病原菌,可引起肠胃炎、伤寒、败血症等多种沙门氏菌病<sup>[1]</sup>。在美国,预计每年都有约1%的人被沙门氏菌感染,其中大部分是儿童、老人和免疫缺陷个体<sup>[2-3]</sup>。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *S. Enteritidis*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. Typhimurium*)感染占人类沙门氏菌感染病例的75%以上<sup>[4]</sup>。我国每年约有3亿人因沙门氏菌感染而患病,占病原菌食源性疾病总数的70%–80%<sup>[5]</sup>。沙门氏菌感染是危害动物和人类健康的全球性顽疾之一,已成为世界各国政府和医疗界广泛关注的热点和棘手问题之一。

沙门氏菌主要通过食物传播,经口进入人体,侵入小肠壁上皮细胞,并穿过上皮细胞层侵入固有层。巨噬细胞是清除病原微生物的重要免疫细胞之

一,研究表明巨噬细胞存在多种抗菌机制,主要分为非氧依赖型杀菌系统(Oxygen-independent antimicrobial systems)和氧依赖型杀菌系统(Oxygen-dependent antimicrobial systems)。非氧依赖型杀菌系统包括低pH、溶菌酶、防御素(Defensin)和阳离子肽等;氧依赖型杀菌系统包括活性氧(Reactive oxygen intermediates, ROI)和活性氮(Reactive nitrogen intermediates, RNI)。活性氧主要包括超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、游离羟基(OH<sup>-</sup>)、单态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等,这些活性氧化物直接作用于病原菌而发挥抗菌作用;活性氮(RNI)主要包括一氧化氮(Nitric oxide, NO)和过氧化亚硝酸盐(ONOO<sup>-</sup>)等,其中NO是一种简单而不稳定的自由基,在体内由一氧化氮合酶催化生成,其与巨噬细胞的活性有着密切关系<sup>[6]</sup>。氧依赖型杀菌系统是先天性免疫系统的重要组成部分,细菌对抗该系统的能力与其致病性密切相关。

sRNA (Small non-coding RNA)是近年发现的一类非编码小 RNA, 具有基因表达调控功能, 在转录后水平调控基因表达, 调控细菌的适应性、毒力、致病性等各种功能, 在细菌生存、传播、进化过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。sRNA 大小约 50–250 nt, 处于细菌基因组的非编码区域, 无开放性阅读框(ORFs)。sRNAs 调控基因表达主要有两种方式: 一是 sRNA 通过碱基配对的方式结合到靶 mRNA 上, 调节靶 mRNA 的翻译及稳定性<sup>[8]</sup>; 另一种是分子模拟, 这类 sRNA 带有与 RNA 结合蛋白(如 CsrA/RsmA 家族)相结合的位点, 从而调节靶蛋白的活性<sup>[9]</sup>。目前, 已在大肠杆菌的基因组中发现 70 多条 sRNA, 沙门氏菌中也存在大量 sRNA, 且大部分与大肠杆菌的同源, 但沙门氏菌也存在自身特异性 sRNA<sup>[8]</sup>。随着对沙门氏菌 sRNA 研究的深入, 近些年来, 发现 sRNA 在调节沙门氏菌对抗不利环境中起着重要作用。Johansen 等发现, MicA 和 RybB 受转录因子  $\delta^E$  调控, 调节多种细菌外膜蛋白(如 *ompA/C/D*)的表达, 在细菌对抗渗透压方面发挥关键作用<sup>[10]</sup>。Altuvia 等发现 *oxyS* 在过氧条件下表达, 可作为一种全面调控因子(Global regulator)调控 40 多个靶基因, 其中转录激活因子 *fhIA* 直接受 *oxyS* 调节<sup>[11]</sup>。sRNA 调节细菌对抗不利的生存环境提示, sRNA 可能在沙门氏菌对抗巨噬细胞氧依赖型杀菌系统中发挥重要

作用。

氧依赖型杀菌系统主要包括活性氧和活性氮, 结合本课题组前期的研究结果, 本实验以 sRNA (*istR*)为对象, 探索 *istR* 在沙门氏菌抗活性氧和活性氮中所起的可能的作用。运用 Red 重组系统 (Red recombination system) 对肠炎沙门氏菌野生株 (SE2472) 的 *istR* 基因进行定点敲除, 构建出 *istR* 敲除株 (SE2472 $\Delta$ *istR*), 另外构建可回复表达 *istR* 的回复株 SE2472 $\Delta$ *istR*-comp。分别以野生株、敲除株及回复株为对象, 研究 *istR* 在肠炎沙门氏菌抵抗活性氧(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及活性氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)作用中可能的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Taq* 酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、DNA marker、PCR 回收试剂盒、凝胶回收试剂盒及限制性内切酶 (*EcoR* I、*Hind* III)均购自大连宝生物工程公司; L-Arabinose 购自 Sigma 公司; 质粒回收试剂盒购自 Axxygen 公司; 引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.2 菌株、质粒及引物

肠炎型沙门氏菌 SE2472 为野生型菌株(由美国加州大学伯克利分校刘奋勇教授馈赠), 大肠杆菌 Top10 和 DH5 $\alpha$  为质粒宿主。本实验涉及的菌株及质粒见表 1。

表 1 菌株及质粒

Table 1 A list of the strains and plasmid constructed in the study

菌株及质粒 Strain and plasmid	性状描述 Description
SE2472	野生型肠炎沙门氏菌
SE2472 $\Delta$ <i>istR</i>	SE2472 <i>istR::kan</i>
SE2472 $\Delta$ <i>istR</i> -comp	SE2472 <i>istR::kan</i> 转入 pHDB3- <i>istR</i> 质粒
SE2472 $\Delta$ <i>istR</i> -control	SE2472 <i>istR::kan</i> 转入 pHDB3 质粒
DH5 $\alpha$	宿主菌
TOP10	宿主菌
pKD4	带有卡那霉素抗性基因, 该抗性基因的两端含有可被 FLP 重组蛋白识别的 FRT 位点 (FLP recognition target)
pKD46	含有受阿拉伯糖启动子调控的 3 个 Red 重组酶基因, 30 °C 时, 可被阿拉伯糖诱导表达, Amp 抗性
pCP20	编码能够识别 FRT 位点的 FLP 重组酶, 30 °C 时有 Amp 抗性, 42 °C 时能热诱导 FLP 重组酶表达
pHDB3	低拷贝质粒, 可在培养基中自然表达, Amp 抗性
pHDB3- <i>istR</i>	由 pHDB3 质粒改造, 含有 <i>istR</i> 基因片段

表 2 引物序列  
Table 2 Sequence of primer

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')
<i>istR</i> -1	TTAAGGCGCTGACGGCACCACCCGTTTCAGCCAGGACTTCGTTGCGCCGGTTTACGATGCGGCCCCGCATAACA CATTGTGTCAAAGACATTATAGTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>istR</i> -2	TATAGGCGTGATAAGCGTAGCGCCCTCCGGTAATCGCCGGGATTGATGATCACGCATTTACAATGCCGAAAAAC AAAAAACCTCGCCGAAGCGAGGTTCTGGTCCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>istR</i> -3	GTTTTTCTCGAGCGAGATGGCGCAGTT
<i>istR</i> -4	GTTTTTCTAGACGTCGTTGAGGGTGTGCATA
<i>istR</i> -5	ACCAAGCTTGAGTATAGGCGTGATAAGCG
<i>istR</i> -6	ACGGAATTCCTCAGCCAGGACTTCGTT

参考已报道的 *S. typhimurium* LT2 全基因组序列, 设计同源重组、检测及回复质粒构建等引物, 序列见表 2。引物 *istR*-1、*istR*-2 用于 Red 重组, 3'端加下划线的部分与质粒 pKD4 上卡那霉素抗性基因两侧序列互补, 未加下划线部分与 *istR* 基因两翼序列互补。引物 *istR*-3、*istR*-4 根据 *istR* 基因同源重组区域的外侧序列设计, 用于鉴定 *istR* 基因敲除菌株。引物 *istR*-5、*istR*-6 用于构建及检测回复质粒。

### 1.3 *istR* 敲除株的构建

**1.3.1 扩增突变片段:** 以质粒 pKD4 为模板, 用突变引物 *istR*-1/2 为引物进行 PCR 扩增, 扩增出带有 *istR* 基因侧翼序列、FRT 位点及卡那霉素(Kan)抗性基因的片段。将获得的 DNA 片段与 T 载体连接, 送公司测序, 序列鉴定正确后, 用凝胶回收试剂盒回收目的片段, -20 °C 冻存备用。

**1.3.2 构建突变株:** 参考 Datsenko 等发明的 PCR 产物一步敲除方法<sup>[12]</sup>, 敲除 *istR* 基因。将质粒 pKD46 导入肠炎沙门氏菌 SE2472 中, 得到带有 FLP 重组酶基因的宿主菌, 以此菌制备电转化感受态细胞。将步骤 1.3.1 中纯化的 PCR 产物电击转化肠炎沙门氏菌 SE2472 感受态细胞, 涂布 LB 平板(Kan), 筛选阳性重组子。

**1.3.3 鉴定突变株:** 挑单克隆接种 LB 肉汤培养基, 37 °C 振荡培养, 用引物 *istR*-3/4 进行菌落 PCR, 电泳比较突变重组子与野生株的扩增片段的大小, 以确定基因敲除与否。

### 1.4 卡那霉素抗性基因的消除

为消除极性效应, 将质粒 pCP20 电击转入经鉴定正确的阳性重组子中, 进行 Amp 和 Kan 双抗性

筛选, 挑单克隆先 30 °C 培养, 后 42 °C 培养过夜, 诱导 FLP 重组酶表达, 去除 Kan 抗性基因。以鉴定引物 *istR*-5/6 进行 PCR 扩增, 鉴定 Kan 抗性基因消除与否, 筛选获得无 Kan 抗性的 *istR* 敲除株 (SE2472Δ*istR*)。

### 1.5 构建回复株

**1.5.1 扩增 *istR* 基因:** 以肠炎沙门氏菌 SE2472 的基因组为模板, 用引物 *istR*-5/6 进行 PCR, 扩增出完整 *istR* 片段, 用凝胶回收试剂盒回收目的片段, 待用。

**1.5.2 构建回复质粒:** 参考 Wadler 等报道, 构建 *istR* 回复表达质粒<sup>[13]</sup>, 简要步骤如下: 将 1.5.1 所得 *istR* 基因片段和质粒 pHDB3 分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 然后用 T4 连接酶进行连接, 将连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, Amp 抗性筛选阳性克隆。

**1.5.3 鉴定回复质粒:** 挑单克隆接种 LB 肉汤培养基, 37 °C 振荡培养, 采用菌落 PCR 方法, 以检测引物 *istR*-5/6 分别进行 PCR 扩增, 电泳鉴定, 以获得重组质粒 pHDB3-*istR*。

**1.5.4 构建回复株、对照株:** 将 pHDB3-*istR* 电击导入 SE2472Δ*istR*, 经抗性筛选获得回复株 SE2472Δ*istR*-comp; 同时将空白 pHDB3 电击导入 SE2472Δ*istR*, 得到对照株 SE2472Δ*istR*-control。Amp 抗性平板筛选单克隆, 重新提取质粒, 并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

### 1.6 活性氮抑制

待检测菌株 (SE247、SE2472Δ*istR*、SE2472Δ*istR*-control 和 SE2472Δ*istR*-comp) 接种新鲜 LB 培

培养基, 37 °C 振荡培养过夜待用。配制 pH 5.0 LB 液体培养基, 并加入  $\text{NaNO}_2$  将浓度调至 20 mmol/L, 即 RNI-LB 培养基。以 1% 比例接种上述各待检菌种至 2 mL RNI-LB 培养基中, 37 °C 孵育, 在 3 h、6 h 取样点平板测活菌数, 与 0 h 菌数对比得存活率。

### 1.7 活性氧抑制

待检测菌株(SE247、SE2472 $\Delta istR$ 、SE2472 $\Delta istR$ -control 和 SE2472 $\Delta istR$ -comp)接种新鲜培养基, 37 °C 振荡培养过夜, 测定各菌液浓度, 并用 PBS 稀释至终浓度  $10^7$  CFU/mL。取稀释后的菌液 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 M9 平板上。将 30  $\mu\text{L}$  浓度 3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  滴于直径 6 mm 的无菌滤纸上, 制备药敏纸片, 并置于平板中心。37 °C 培养 16 h, 测量各平板抑菌圈的直径。

## 2 结果

### 2.1 *istR* 基因的敲除

本试验通过构建 *istR* 敲除的肠炎沙门氏菌 SE2472, 以研究 *istR* 在肠炎沙门氏菌抵抗活性氮作用中的调控功能。采用 Red 同源重组系统(Red recombination system)对肠炎沙门氏菌 *istR* 进行定点敲除。按照 1.3 的方法构建 *istR* 敲除株(用 Kan 抗性基因置换 *istR*), 以 *istR* 基因侧翼引物 *istR*-3/4 进行 PCR 检验, 筛选阳性重组子。野生型 PCR 产物大小为 883 bp, *istR* 基因被 Kan 抗性基因替代后的 PCR 产物大小为 2 324 bp, 电泳图与预期一致(图 1)。

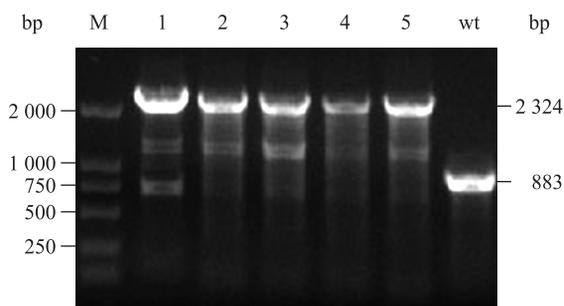


图 1 SE2472 $\Delta istR$ ::*kan* 重组子的 PCR 鉴定图谱  
Fig. 1 Characterization of SE2472 $\Delta istR$ ::*kan* recombinant by PCR amplification  
Note: 1-5: SE2472 $\Delta istR$ ::*kan*; wt: SE2472; M: DNA marker.

### 2.2 卡那霉素抗性基因的消除

为避免卡那霉素基因的极性效应对下游基因表达的影响, 向带 Kan 抗性的 *istR* 敲除株中导入质粒 pCP20, pCP20 可温度诱导表达 FLP 重组酶, 重组删除 FRT 位点之间的序列, 以消除 Kan 抗性基因片段。按照 1.4 的方法去除重组子携带的 Kan 抗性基因, 以 *istR* 基因侧翼引物 *istR*-3/4 进行 PCR 检验。野生型 PCR 产物大小为 883 bp, 抗性基因消除后的 *istR* 敲除株(SE2472 $\Delta istR$ )扩增片段为 802 bp, 电泳图与预期一致(图 2)。

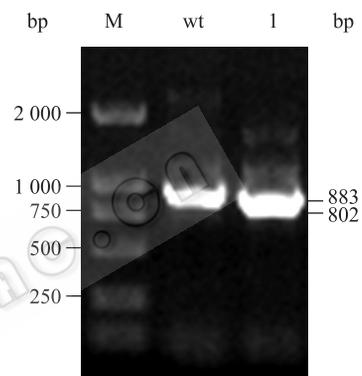


图 2 去除抗性基因突变株 SE2472 $\Delta istR$  的 PCR 鉴定图谱

Fig. 2 Characterization of gene *istR* deletion mutant SE2472 $\Delta istR$  by PCR amplification

Note: 1: SE2472 $\Delta istR$ ; wt: SE2472; M: DNA marker.

### 2.3 回复株的构建

本实验用可在宿主菌中自主表达的质粒 pHDB3 为载体回复表达 *istR* 以研究 *istR* 的功能。以引物 *istR*-5/6 扩增出完整的 *istR* 片段, 以 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别双酶切 *istR* 扩增片段和 pHDB3, 回收各自酶切片段进行连接, 得到 pHDB3-*istR* 回复质粒, 并导入 SE2472 $\Delta istR$ , 构建 *istR* 回复株。提取回复质粒 pHDB3-*istR*, 并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。酶切产物包括 345 bp 的 *istR* 片段和 2 500 bp 的 pHDB3, 电泳图与预期一致(图 3)。

### 2.4 活性氮抑制下的存活率

$\text{NaNO}_2$  在酸性条件下可以生成  $\text{HNO}_2$  和 NO 等物质。按照 1.6 所示方法测各菌株对活性氮(RNI)的耐受性结果如图 4 所示: 培养至 3 h, SE2472 的存活

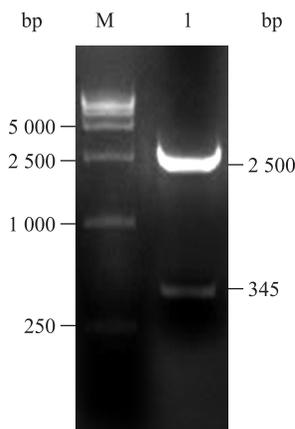


图3 质粒 pHDB3-*istR* 的双酶切鉴定

Fig. 3 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pHDB3-*istR*

Note: 1: pHDB3-*istR*; M: DNA marker.

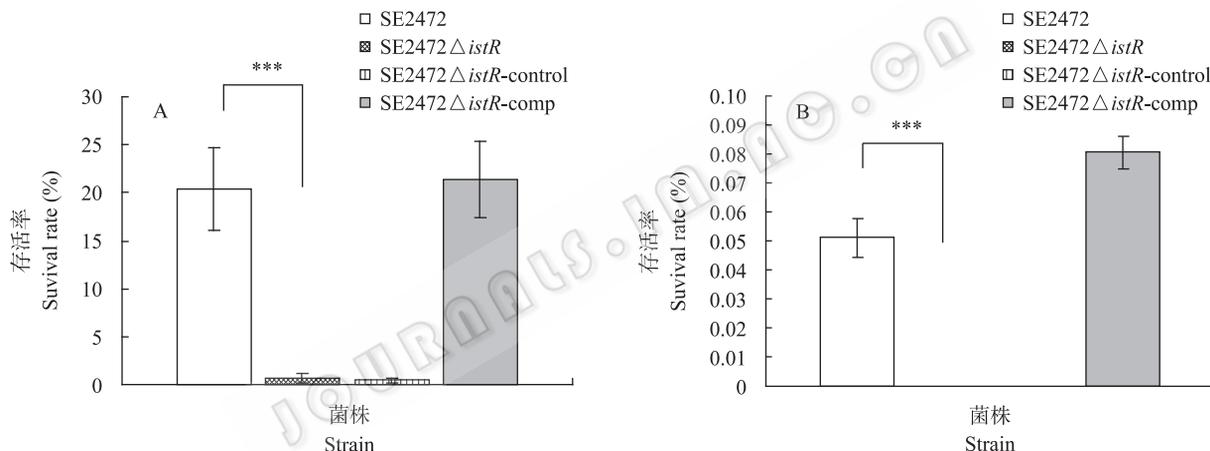


图4 活性氮抑制的测定

Fig. 4 Measurement of reactive nitrogen intermediates inhibition

注: 37 °C 振荡培养条件下, SE2472、SE2472Δ*istR*、SE2472Δ*istR*-control 和 SE2472Δ*istR*-comp 对 LB 培养基中酸性 NaNO<sub>2</sub> 抑制的存活率测定。A 为 3 h 各菌株的存活率, B 为 6 h 各菌株的存活率。误差线为标准差。\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

Note: Resistances of SE2472, SE2472Δ*istR*, SE2472Δ*istR*-control and SE2472Δ*istR*-comp to acidified sodium nitrite (ASN). Resistance was measured by the survival rate in LB broth with 20 mmol/L NaNO<sub>2</sub> adjusted to pH 5.0, which equals (CFU of bacteria after incubation in ASN/CFU of bacteria before incubation). Error bars indicate standard deviations. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 3 讨论

沙门氏菌为一种重要的食源性传染病病原,可引起人类多种沙门氏菌病。该菌可在被感染的宿主细胞内存活,成为机体健康的隐患。Witthöft 等研究发现,活性氮和活性氧是巨噬细胞氧依赖型杀菌系统对抗胞内细菌的主要方式<sup>[14]</sup>。活性氮(RNI)通过结合到靶蛋白巯基或金属活性中心,阻止病原微

率降至 20.40%, SE2472Δ*istR* 的存活率降至 0.70%, SE2472Δ*istR*-comp 的存活率降至 21.40%,与 SE2472 相近(图 4A); 培养至 6 h, SE2472 的存活率降至 0.05%, SE2472Δ*istR* 存活率降至 0, SE2472Δ*istR*-comp 存活率降至 0.08%; SE2472Δ*istR*-control 生长情况与敲除株相似(图 4B)。

#### 2.5 活性氧抑制下的耐受性

按照 1.7 所示方法测各菌株对活性氧(ROI)的耐受性,结果如图 5 所示: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制 16 h 后, SE2472 的抑菌圈直径为 4.60 cm±0.10 cm; SE2472Δ*istR* 为 4.57 cm±0.06 cm; SE2472Δ*istR*-control 为 4.60 cm±0.10 cm; SE2472Δ*istR*-comp 为 4.47 cm±0.06 cm,各菌株抑菌圈直径差异不明显。

生物代谢过程,包括呼吸作用、DNA 复制等<sup>[15]</sup>。活性氧(ROI)在吞噬细胞被激活后通过呼吸爆发(Respiratory burst)产生,由 NADPH 氧化酶合成,吞噬细胞利用这些活性氧杀死细菌。可见,氧依赖型杀菌系统是机体抗细菌感染重要的天然免疫屏障,但病原菌在长期的进化过程中也产生了相关的耐受机制。据 Bang 等报道,肠炎沙门氏菌黄素血红蛋白 Hmp 在其有氧代谢一氧化氮中起着一定的作用,

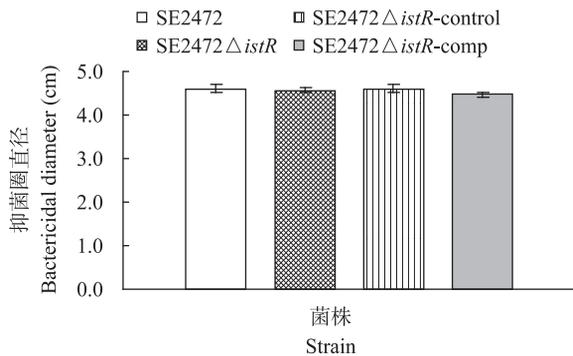


图5 活性氧抑制的测定

Fig. 5 Measurement of reactive oxygen intermediates inhibition

注: 37 °C 条件, 测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 药敏纸片对 SE2472、SE2472 $\Delta$ *istR*、SE2472 $\Delta$ *istR*-control 和 SE2472 $\Delta$ *istR*-comp 的抑菌圈直径, 误差线为标准差。

Note: Resistance of SE2472, SE2472 $\Delta$ *istR*, SE2472 $\Delta$ *istR*-control and SE2472 $\Delta$ *istR*-comp mutant to hydrogen peroxide. Resistance was assayed by the ability to grow in the presence of hydrogen peroxide. Bars indicate the diameters of inhibitory zones of strains on plates when a source of hydrogen peroxide was placed in the center. Error bars indicate standard deviations.

可提高其在巨噬细胞中的生存能力<sup>[16]</sup>。沙门氏菌对抗活性氧方式主要有还原酶降解活性氧和 DNA 损伤修复等<sup>[17-18]</sup>。沙门氏菌对氧依赖型杀菌系统产生耐受涉及到多方面的因素, 相关蛋白的表达与否固然重要, 但沙门氏菌如何感应氧依赖型杀菌系统及做出相应的调控可能对了解沙门氏菌的致病机理有参考意义。

sRNAs 是近年新发现的基因调控因子, 在细菌应对环境刺激(如活性氧、温度和酸碱性等)条件下调控靶基因的表达。蒋惠源等研究表明, *sraB* 在肠炎沙门氏菌抵抗蛋清抑菌作用中起着重要调控功能<sup>[19]</sup>。sRNA 是否也在沙门氏菌对抗氧依赖型杀菌系统中起调控作用, 目前尚未见报道。本试验在课题组前期研究的基础上初探了 sRNA 在沙门氏菌抗活性氧氮中的调控作用。

本实验以 sRNA (*istR*)为研究对象, 探索其在肠炎沙门氏菌抵抗氧依赖型杀菌系统的调控作用, 针对氧依赖型杀菌系统中两种主要抑菌方式(活性氮和活性氧)展开研究。因 sRNA 不编码任何蛋白, 本实验首先对沙门氏菌野生株 SE2472 进行定点敲除 *istR*, 构建出相应的敲除株 SE2472 $\Delta$ *istR*, 通过比较

SE2472 $\Delta$ *istR* 和野生型 SE2472 对抗 NaNO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抑菌作用。活性氮条件下, 敲除株 SE2472 $\Delta$ *istR* 与野生株 SE2472 相比, 其对 NO 的耐受力下降显著, 3 h 和 6 h 时的存活率远低于 SE2472, 表明 *istR* 在沙门氏菌抵抗活性氮中有作用; 至于是否与 *istR* 有直接的关系, 本实验在敲除株 SE2472 $\Delta$ *istR* 的基础上, 运用回复表达质粒来表达 *istR*, 再次研究它们对活性氮的耐受性, 结果显示, 在 3 h 和 6 h 时 *istR* 回复株的存活率接近于野生菌株 SE2472, 这提示 sRNA (*istR*) 在沙门氏菌抗活性氮中起着重要的调控作用, 但其如何调控及调控哪些靶基因有待于进一步研究。在活性氧实验中, 各菌株之间差异不大, 推测沙门氏菌抗活性氧可能与其他 sRNA 或基因相关。

本实验为寻找与抗氧化依赖型抑菌系统有关的 sRNA 分子, 进一步揭示细菌在巨噬细胞中生存的机制提供了线索, 为深入研究沙门氏菌的致病机理和防治沙门氏菌病提供了新的思路。但对于 sRNA 的研究还刚刚起步, 很多机制还不明确, 今后还需要对 *istR* 的调控机理做进一步深入的研究, 以期进一步弄清肠炎沙门氏菌传播及致病的机理。

致谢: 本实验用到的野生型肠炎沙门氏菌 SE2472 菌株由美国加州大学伯克利分校刘奋勇教授馈赠, 在此表示衷心的感谢。

## 参 考 文 献

- [1] Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS, et al. Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1993-1997[J]. Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention Surveillance Summaries, 2000, 49(1): 1-62.
- [2] Chalker RB, Blaser MJ. A review of human salmonellosis: III. magnitude of salmonella infection in the United States[J]. Clin Infect Dis, 1988, 10(1): 111-124.
- [3] Teka T, Faruque ASG, Fuchs GJ. Risk factors for deaths in under-age-five children attending a diarrhoea treatment centre[J]. Acta Paediatrica, 1996, 85(9): 1070-1075.
- [4] Hardy A. Salmonella: a continuing problem[J]. Postgrad Med J, 2004, 80(947): 541-545.
- [5] 杨保伟, 曲东, 申进玲, 等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 788-796.
- [6] Akaki T, Sato K, Shimizu T, et al. Effector molecules in expression of the antimicrobial activity of macrophages

- against *Mycobacterium avium* complex: roles of reactive nitrogen intermediates, reactive oxygen intermediates, and free fatty acids[J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 62(6): 795–804.
- [7] Vogel J, Papenfort K. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(6): 605–611.
- [8] Vogel J, Sharma CM. How to find small non-coding RNAs in bacteria[J]. *Biol Chem*, 2005, 386(12): 1219–1238.
- [9] Liu MY, Gui GJ, Wei BD, et al. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17502–17510.
- [10] Johansen J, Rasmussen AA, Overgaard M, et al. Conserved small non-coding RNAs that belong to the  $\sigma^E$  regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins[J]. *J Mol Biol*, 2006, 364(1): 1–8.
- [11] Altuvia S, Zhang A, Argaman L, et al. The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding[J]. *EMBO J*, 1998, 17(20): 6069–6075.
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [13] Wadler CS, Vanderpool CK. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(51): 20454–20459.
- [14] Witthöft T, Eckmann L, Kim JM, et al. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(3Pt 1): 564–571.
- [15] Vazquez-Torres A, Stevanin T, Jones-Carson J, et al. Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 437: 521–538.
- [16] Bang IS, Liu LM, Vazquez-Torres A, et al. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin hmp[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(38): 28039–28047.
- [17] Hébrard M, Viala JPM, Méresse S, et al. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance[J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(14): 4605–4614.
- [18] Almirón M, Link AJ, Furlong D, et al. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*[J]. *Genes Dev*, 1992, 6(12B): 2646–2654.
- [19] 蒋惠源, 曹鸣辉, 曹学松, 等. 非编码小 RNA (*sraB*) 调控肠炎型沙门菌的抗血清抑菌作用[J]. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1537–1544.

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。