

鼠伤寒沙门菌 7 个未知功能岛在致病性中的作用

蒋玲艳^{1,2*} 江小涵² 王培胜² 杨斌²

(1. 南开大学环境科学与工程学院 天津 300350)

(2. 南开大学泰达生物技术研究院 天津 300457)

摘要:【目的】探索沙门菌在进化过程中通过水平转移获得的未知功能岛在其致病过程中的作用,发现新的与致病性相关的岛。【方法】以鼠伤寒沙门菌 ATCC 14028 为亲本株,利用 λ Red 重组酶系统分别构建了 7 个未知功能岛 (STM14_0667–0673、2682–2687、2885–2891、3721–3728、4247–4253、4823–4828、5331–5341) 的突变株,通过细胞侵袭实验、巨噬细胞内复制力检测及小鼠实验比较了野生型和突变株的毒力差异。【结果】 Δ 2682–2687 和 Δ 5331–5341 对上皮细胞的侵袭力显著低于野生型 ($P < 0.01$); Δ 2682–2687、 Δ 2885–2891 和 Δ 5331–5341 在巨噬细胞内的复制力、对小鼠的致死率以及在小鼠肠道和肝、脾的定殖能力均显著低于野生型 ($P < 0.05$); 其余 4 个突变株 (Δ 0667–0673、 Δ 3721–3728、 Δ 4247–4253、 Δ 4823–4828) 的侵袭力、胞内复制力以及对小鼠的致病力与野生型相比无显著差异。【结论】发现 3 个未知功能岛显著影响鼠伤寒沙门菌的致病力,为深入研究这些岛的功能及调控机制奠定了基础。

关键词: 鼠伤寒沙门菌, 未知功能岛, 致病性

Contribution of seven genomic islands of unknown functions to *Salmonella* Typhimurium pathogenicityJIANG Ling-Yan^{1,2*} JIANG Xiao-Han² WANG Pei-Sheng² YANG Bin²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China)

(2. TEDA Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] To investigate the role of *Salmonella* genomic islands of unknown functions for pathogenicity and also to identify new islands associated with *Salmonella* virulence. [Methods] Using *Salmonella enteric* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ATCC 14028 as wild-type strain, we constructed mutants for seven islands of unknown functions (STM14_0667–0673, 2682–2687, 2885–2891, 3721–3728, 4247–4253, 4823–4828, 5331–5341) by employing the λ Red recombinase

Foundation item: China Postdoctoral Science Foundation (No. 2016M591381); International Science & Technology Cooperation Program of China (No. 2012DFG31680); National Natural Science Foundation of China (No. 31470194)

*Corresponding author: E-mail: jianglingyan@nankai.edu.cn

Received: November 08, 2016; **Accepted:** March 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): April 05, 2017

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (No. 2016M591381); 国家国际科技合作专项项目 (No. 2012DFG31680); 国家自然科学基金项目 (No. 31470194)

*通讯作者: E-mail: jianglingyan@nankai.edu.cn

收稿日期: 2016-11-08; **接受日期:** 2017-03-07; **优先数字出版日期** (www.cnki.net): 2017-04-05

method. Through invasion assays, macrophage replication assays, and mice experiment, we compared the virulence of the mutant strains to that of the wild-type 14028. **[Results]** Compared with wild-type strain, $\Delta 2682-2687$ and $\Delta 5331-5341$ significantly decreased their invasion ability to epithelial cells ($P < 0.01$); $\Delta 2682-2687$, $\Delta 2885-2891$ and $\Delta 5331-5341$ significantly decreased their replication ability in macrophages, and also showed decreased virulence to mice, with the bacterial counts of mutants in intestine, liver and spleen were less abundant than that of the wild-type strain ($P < 0.05$). No significant differences in invasion ability, replication ability, and virulent to mice were observed between wild-type strain and the other four mutant strains ($\Delta 0667-0673$, $\Delta 3721-3728$, $\Delta 4247-4253$ and $\Delta 4823-4828$). **[Conclusions]** This study found three islands of unknown functions contributing to *S. Typhimurium* pathogenicity, and provided powerful tools for the further research on the regulatory systems and functions of these islands.

Keywords: *Salmonella Typhimurium*, Islands of unknown functions, Pathogenicity

沙门菌(*Salmonella*)是一种重要的人畜共患肠道致病菌,目前已经发现了 2 500 多种血清型,广泛分布于自然界,能感染人和多种哺乳动物^[1-2]。沙门菌经污染的水源和食物传播,能引起食物中毒、肠胃炎以及系统性的伤寒。全球每年由沙门菌感染引起的病例超过 9 300 万,造成约 15 万人死亡^[3]。对沙门菌的致病机理及致病因子进行研究具有非常重要的公共卫生意义。

沙门菌由非致病性大肠杆菌经历漫长的进化而来^[4-5]。通过水平转移获得毒力基因是沙门菌致病性进化的关键方式之一。与大肠杆菌 K12 相比,沙门菌基因组中有 1 000 多个特异基因,占整个基因组的 25%左右,特异基因呈簇分布构成了沙门菌特有的基因岛^[6]。目前已被命名且与致病性相关的岛有 20 多个,其中包括致病性必需的致病岛 1 和致病岛 2^[7-9]。但是除了已经命名的致病岛外,其他大部分基因岛都是功能未知的。基于水平获得的基因在沙门菌致病性中的重要作用,一些未知功能岛也有可能沙门菌的致病过程中发挥作用。为了进一步探索未知功能岛的作用,发现新的与致病性相关的岛,本研究以沙门菌的典型致病血清型——鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enteric* serovar Typhimurium, 简称 *S. Typhimurium*)菌株 ATCC (American Type Culture Collection) 14028 为材料,根据 McClelland 等定义的基因岛区域^[6],随机挑选了 7 个未命名且功能未知的岛(图 1A),构建了它们的突变株,通过细胞实验和小鼠实验初步研究了各

岛突变对鼠伤寒沙门菌致病性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞系和培养条件:鼠伤寒沙门菌 ATCC 14028 (野生型)以及质粒 pKD46 (温度敏感型质粒,含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因)和 pKD3 (含有氯霉素抗性基因)由本实验室保存。7 个岛的突变株皆通过含有 pKD46 质粒的 14028 菌株(本实验室前期构建并保存)构建,分别命名为 $\Delta 0667-0673$ 、 $\Delta 2682-2687$ 、 $\Delta 2885-2891$ 、 $\Delta 3721-3728$ 、 $\Delta 4247-4253$ 、 $\Delta 4823-4828$ 和 $\Delta 5331-5341$ 。菌株培养用常规 Luria-Bertani (LB)培养基(胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L),实验中所用抗生素浓度:氨苄青霉素(Ap) 100 mg/L,氯霉素(Cm) 10 mg/L,庆大霉素(Gm) 10 或 100 mg/L。

HeLa 细胞系、Caco-2 细胞系和小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自上海中国科学院细胞库。细胞培养用 RPMI-1640 细胞培养基,补充 10%的胎牛血清,于 75 cm² 细胞培养瓶、5% CO₂ 恒温培养箱中传代培养。细胞用胰酶消化后接种于 24 孔细胞培养板中,继续孵育约 24–48 h,待细胞铺满后用于实验。

1.1.2 主要试剂和仪器:RPMI-1640 培养基,胰酶和胎牛血清购自 Gibco 公司;24 孔细胞培养板购自 Corning 公司;DNA marker、阿拉伯糖、各类抗生素及 DNA 切胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Taq 酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公司。

恒温 CO₂ 细胞培养箱和 NanoDrop 2000 分光光度计购自 Thermo 公司; PCR 仪购自 Biometra 公司; 恒温摇床购自上海世平实验设备有限公司; 高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; 凝胶成像系统购自 Tanon 公司; 电转化仪、电泳仪和电泳槽购自 Bio-Rad 公司; 高级倒置显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 突变株的构建: 通过 λ Red 重组酶系统构建突变株, 参照文献[10]的方法。根据 ATCC 14028 的基因组序列, 设计含有被突变基因簇左右基因

38–40 bp 同源序列的正反向引物, 引物序列见表 1。以 pKD3 质粒为模板, 扩增得到中间带有氯霉素抗性基因且两端含有与打靶基因簇同源序列的片段, 片段经切胶纯化后电转化至 14028 pKD46 感受态细胞中, 通过氯霉素抗性平板筛选阳性克隆。突变菌株的鉴定引物设计在被缺失基因簇的两侧, 由于所选基因簇长度都大于 5 000 bp (图 1A), 如基因簇被氯霉素成功替换后长度为 1 500 bp 左右, 通过扩增条带的长度确定突变株的正确性。另外, 菌落 PCR 产物经切胶回收后测序, 通过序列比对确定氯霉素基因的插入。

表 1 本研究中应用的引物序列
Table 1 Primers used in this study

目的基因 Target gene	突变体构建用引物* Primers for construction of the mutants (5'→3')*	鉴定引物 Primers for identification of the mutants (5'→3')
0667–0673	F <u>ATGAATAAAGAGTCCATATTTTCGTCAGTTGGAGCTACGGTGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTCG	TGTGGGTGAAGCCTGTG
	R <u>GATTGCCGCACTGGGCATTCTTGACGGGCGTTTACTCGGCATATGA</u> ATATCCTCCTTAG	TGCCGCTTGAAACCACA
2682–2687	F <u>TCAACGCGGCTCAAGACAGTTATCTTCTTCCAGCCGTGTGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTCG	TAATCATTCACTTCGGTCAG
	R <u>CTAAACCTGGGCTAAAAAATACAAAAAGCGACTCAGGGCCATATG</u> AATATCCTCCTTAG	AGCCCTTGATGAGATGGAT
2885–2891	F <u>TTAAAGCAGTGATTTCGCGGCTTCTACAATCGCTTCGGGTGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTCG	AGTTTGGCGATGGCTTC
	R <u>TTAGCAGCTTTCCCGCATACATAAACTGGAGGCGATGGACATATGA</u> ATATCCTCCTTAG	TACGCCAGATTCGCTCA
3721–3728	F <u>TTAAGAGGCCTTAGGGATTGCGCGCTGTAAAACTCAAGTGTAGG</u> CTGGAGCTGCTTCG	GACAGACCGCATTATTGAA
	R <u>ATGAGCAAATTTAAATTTAATGCCGTCATTGTTGGCTTGCATATGAA</u> TATCCTCCTTAG	CTCGGCTTCTTATGGTC
4247–4253	F <u>TCACTCGCCGGGTTTGTACAGCCGGGCATATGATTAGGTGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTCG	GCGGCGTATGTTGAGAA
	R <u>ATGAAAAAGATTACGACATCTATTCGGCTCTCGATAAACATATGA</u> ATATCCTCCTTAG	GTTAGCGGCACTTGGTCT
4823–4828	F <u>TTATTCACGTTGAGAAAGGGATAAGGTTGCCAAAAAATGTGTAGG</u> CTGGAGCTGCTTCG	ACCGTGGTCAGAAAGAAGA
	R <u>ATGAATAAGCGATTAAATATTGATTGGGACAATGAATTACATATGAA</u> TATCCTCCTTAG	AGCGGGTAGTTGTTCTGC
5331–5341	F <u>GTGAGACGCGTGGATAACGGAGCAGTAAACACGATGCGTGTAG</u> GCTGGAGCTGCTTCG	TATTCGGTTCGGCTGTTT
	R <u>CTAAAGCCGTTTGTGTCATCGTGATAGACGGCTGAATGCATATGA</u> ATATCCTCCTTAG	TCAACGCCGCACAGAT

注: *: 引物包含所缺失基因簇左右两端基因 38–40 bp 同源序列, 以下划线标示。

Note: *: Primers were designed carry extensions homologous to 38–40 bp (underlined) of the target gene cluster.

1.2.2 生长曲线测定: 从 LB 平板上挑取野生菌和各突变株的单菌落, 分别接种于 20 mL 相应抗性的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养过夜, 以 1:100 转接于 200 mL 含相应抗性的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 同步培养, 每隔 0.5–1.0 h 取样测定 OD_{600} 值。

1.2.3 侵袭力检测: 参照文献[11]的方法检测细菌对上皮细胞的侵袭力。培养至对数中期(OD_{600} 为 0.6–0.8)的细菌用 RPMI-1640 培养基重悬, 并通过 LB 平板计数初始菌量。按照感染复数(Multiplicity of infection, MOI)为 10 将重悬的细菌加入至 24 孔细胞培养板, 1 000×g 离心 5 min, 然后在 37 °C、5% CO_2 培养箱中共孵育 1 h。吸去菌液, 用 PBS 溶液洗 3 次, 然后向孔板中加入终浓度为 100 mg/L 庆大霉素的 1640 培养基, 继续培养 1 h, 以杀死未进入细胞的细菌。然后再向每孔中加入 0.5 mL 0.1% SDS 裂解细胞。为避免 SDS 对细菌的杀伤, 待细胞裂解后, 迅速进行逐级稀释并涂平板, 从而计算细胞内的细菌数。细菌侵袭率(%)=细胞内细菌数/初始菌数×100。将野生菌的侵袭力定义为 1, 各突变株的侵袭力均相对于野生型的侵袭率计算百分比。

1.2.4 复制能力检测: 参照文献[12]的方法检测细菌在巨噬细胞内的复制力。培养至对数中期的细菌用 1 640 培养基重悬, 按照 MOI=10 加入至细胞培养板, 1 000×g 离心 5 min, 然后在 37 °C、5% CO_2 培养箱中共孵育 30 min。PBS 溶液洗 3 次, 将此时的时间点定义为 0 h。向孔板中加入终浓度为 100 mg/L 庆大霉素的 1640 培养基, 继续孵育 2 h 后用 0.1% SDS 裂解部分孔内的细胞, 细胞裂解后迅速进行逐级稀释, 然后涂平板, 此时, 即 2 h 的细菌数目为初始胞内菌量。将培养基换成新的终浓度为 10 mg/L 庆大霉素的 1 640 培养基, 继续孵育 14 h 后用 0.1% SDS 裂解剩余孔内的细胞涂板, 计算细胞内 16 h 时的胞内菌量。细菌复制力=16 h 胞内菌量/2 h 胞内菌量。将野生菌的复制能力定义为 1, 各突变株的复制力均相对于野生型的复制力计算百分比。

1.2.5 小鼠实验: 参照文献[13–14]的方法进行小鼠

实验。选用健康的 6–8 周的 BALB/c 雌性小鼠作为实验动物。检测小鼠存活率时, 将被感染的 80 只小鼠随机分为 8 组, 每组小鼠感染一种菌株。每只小鼠经口(灌胃)感染约 5×10^7 CFU 的野生型菌株或者突变菌株, 每天观察 8 组小鼠的死亡情况, 共观察 20 d。为了统计肠道及肝、脾中的细菌数量, 将被感染的 43 只小鼠随机分为 8 组, 每组小鼠感染一种菌株。每只小鼠经口感染约 5×10^6 CFU 的野生型菌株或者突变菌株, 5 d 后处死被感染的小鼠。分离回肠、结肠、肝和脾打碎匀浆, 稀释后涂板分别统计各脏器中细菌数目。

1.2.6 数据分析: 采用 SPSS 15.0 软件对数据进行统计分析。每种实验都重复 3 次, 计算平均值和标准差。采用定量资料方差分析法和两两比较的 t 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 7 个岛的分布

7 个未知功能岛所包含的基因及长度见图 1A。为了了解这 7 个岛在沙门菌属内的分布情况, 通过 NCBI BLAST 分析了各岛在已测序的沙门菌典型血清型中是否存在。由表 2 可见, 岛 2682–2687、2885–2891 和 5331–5341 在所分析的所有血清型中存在; 岛 0667–0673 在邦戈沙门菌(*Salmonella bongori*)和鼠伤寒沙门菌(*S. Typhimurium*)中存在, 在人伤寒沙门菌(*S. Typhi*)和 A 型副伤寒沙门菌(*S. Paratyphi A*)中不存在; 岛 3721–3728、4247–4253 和 4823–4828 只在鼠伤寒沙门菌(*S. Typhimurium*)中存在。

2.2 突变菌株的构建结果及生长情况

7 种突变株的阳性菌落经两侧鉴定引物 PCR 扩增后, 均得到长度为 1 500 bp 左右的片段(图 1B)。测序结果显示片段是由氯霉素抗性基因和所缺失基因簇的上下游序列组成, 这表明氯霉素基因替换了所选择的未知功能岛基因簇, 说明突变菌株构建成功。

各突变株在 LB 固体平板上均生长良好, 大小形态与野生型相比无明显差异, 在 LB 液体培养基中的生长曲线与野生菌基本一致(图 1C), 表明各岛的突变不影响细菌的体外生长。

表 2 7 个岛的分布					
Table 2 Distribution of the 7 islands					
Genomic island	<i>S. Typhimuium</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>Salmonella bongori</i>	<i>Escherichia coli</i>
0667-0673	+	-	-	+	-
2682-2687	+	+	+	+	-
2885-2891	+	-	+	+	-
3721-3728	+	-	-	-	-
4247-4253	+	-	-	-	-
4823-4828	+	-	-	-	-
5331-5341	+	+	+	+	-

注：+：存在；-：不存在。
Note：+：Present；-：Absent.

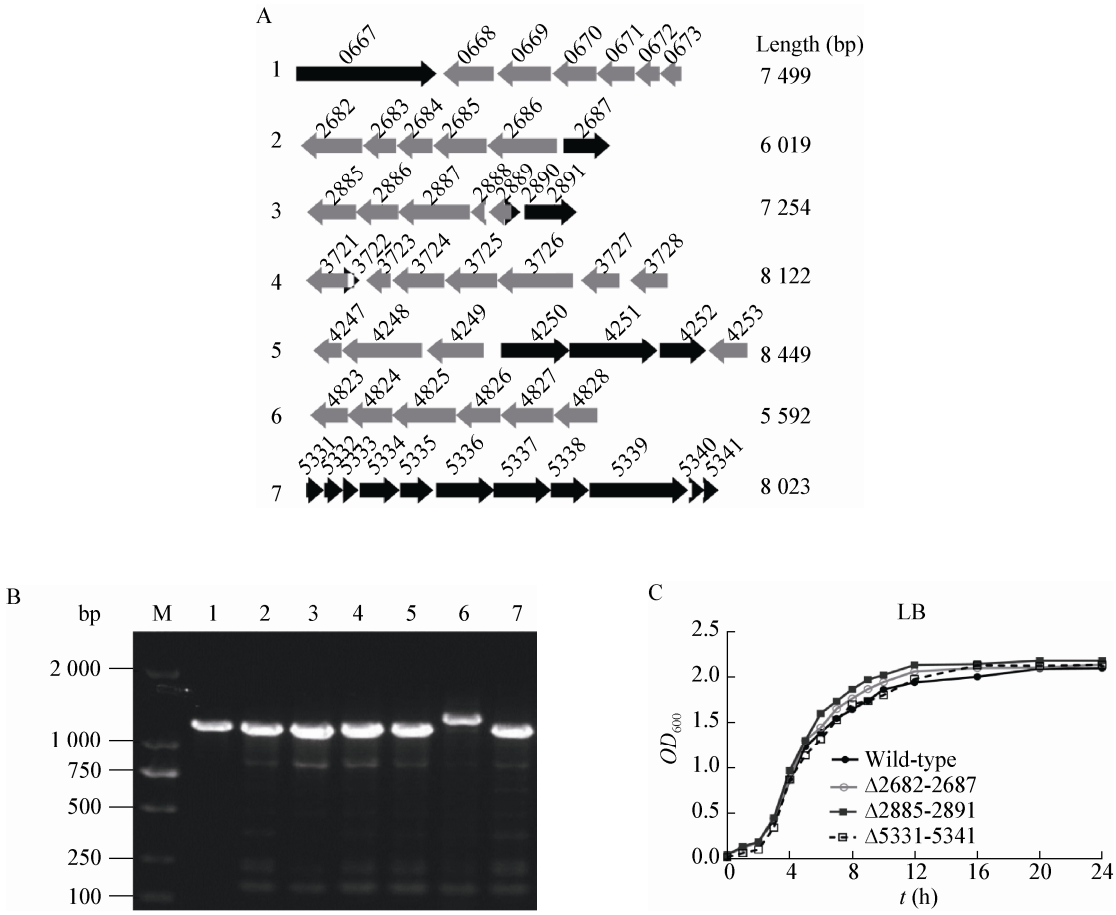


图 1 7 个岛的缺失鉴定及突变株生长曲线

Figure 1 Construction and identification of the mutants of 7 islands and the *in vitro* growth curve of the mutants

注：A：各岛长度及包含的基因。B：突变株 PCR 鉴定结果：M：DL2000 marker；1：Δ0667-0673；2：Δ2682-2687；3：Δ2885-2891；4：Δ3721-3728；5：Δ4247-4253；6：Δ4823-4828；7：Δ5331-5341。C：3 个典型突变株及野生菌的生长曲线。

Note：A：Length and gene profile of each island. B：PCR identification of mutant strains：M：DL2000 marker；1：Δ0667-0673；2：Δ2682-2687；3：Δ2885-2891；4：Δ3721-3728；5：Δ4247-4253；6：Δ4823-4828；7：Δ5331-5341. C：Growth curve of three representative mutants and wild-type.

2.3 比较野生菌和突变株对上皮细胞的侵袭力

侵袭肠道上皮细胞是沙门菌致病过程中的首要关键步骤,是影响沙门菌致病性的因素之一^[1-2],沙门菌对 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞的侵袭力能反映该细菌在体内对肠道上皮细胞的侵袭能力,已被广泛用于沙门菌的侵袭力检测实验^[15-16],因此以 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞为细胞模型检测野生菌和突变株的侵袭力。如图 2 所示, $\Delta 2682-2687$ 和 $\Delta 5331-5341$ 对 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞的侵袭力均显著低于野生型($P<0.01$),其它 5 个岛的突变株对 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞的侵袭力与野生型类似。该结果表明 2682-2687 和 5331-5341 这两个岛的获得能促进鼠伤寒沙门菌对肠道上皮细胞的侵袭力。

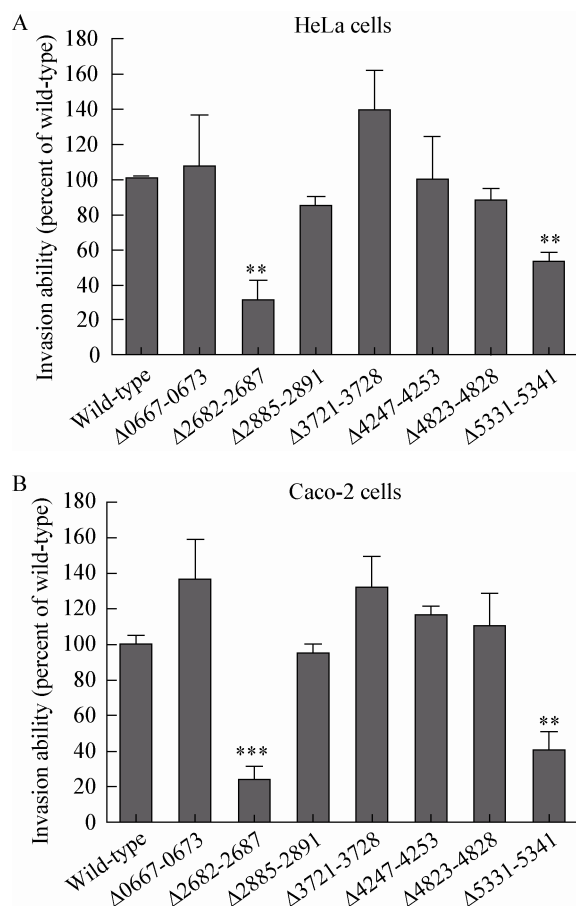


图2 野生型和突变株对 HeLa 细胞(A)和 Caco-2 细胞(B)的侵袭力

Figure 2 Invasion ability of wild-type strain and mutant strains to HeLa cells (A) and Caco-2 cells (B)

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. The same below.

2.4 比较野生菌和突变株在巨噬细胞内的复制能力

沙门菌能在宿主的巨噬细胞内进行生存复制是其致病过程中的另一关键因素,是导致系统性疾病的必要条件^[17-18]。比较野生型菌株和突变株在鼠巨噬细胞系 RAW264.7 内的复制能力,图 3 结果显示 $\Delta 2682-2687$ 、 $\Delta 2885-2891$ 和 $\Delta 5331-5341$ 在 RAW264.7 内的复制能力显著低于野生型($P<0.05$),其它 4 个岛的突变株在 RAW264.7 内的复制能力与野生型类似。该结果表明 2682-2687、2885-2891 和 5331-5341 这 3 个岛的获得有利于鼠伤寒沙门菌在鼠巨噬细胞内的生存复制。

2.5 比较野生菌和突变株对小鼠的致病能力

如图 4A 所示, $\Delta 2682-2687$ 、 $\Delta 2885-2891$ 和 $\Delta 5331-5341$ 对小鼠的致死力显著降低($P<0.01$):感染野生型菌株的小鼠在感染后 3 d 开始死亡,8 d 内 10 只小鼠全部死亡;感染 $\Delta 2682-2687$ 、 $\Delta 2885-2891$ 和 $\Delta 5331-5341$ 的小鼠在感染 20 d 后仍分别有 6、7、8 只存活。感染其它 4 种突变株的小鼠死亡率与野生型类似,10 只小鼠在 10 d 内全部死亡。

比较野生型和突变株在肠道(回肠、结肠)和系统性位点(肝、脾)的定殖量,结果如图 4B 所示, $\Delta 2682-2687$ 、 $\Delta 2885-2891$ 和 $\Delta 5331-5341$ 在各位点

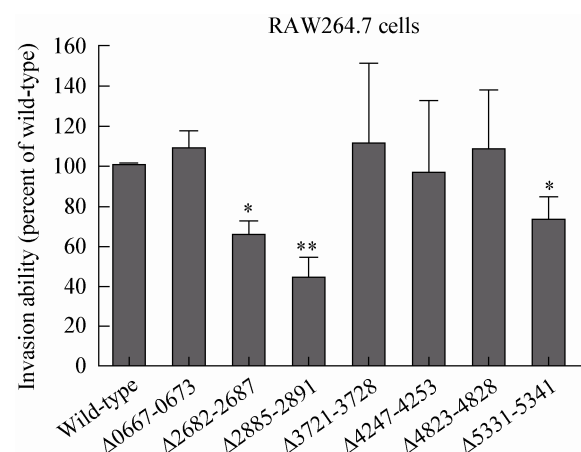


图3 野生型和突变株在小鼠 RAW264.7 巨噬细胞内的复制力

Figure 3 Replication ability of wild-type strain and mutant strains in murine RAW264.7 macrophages

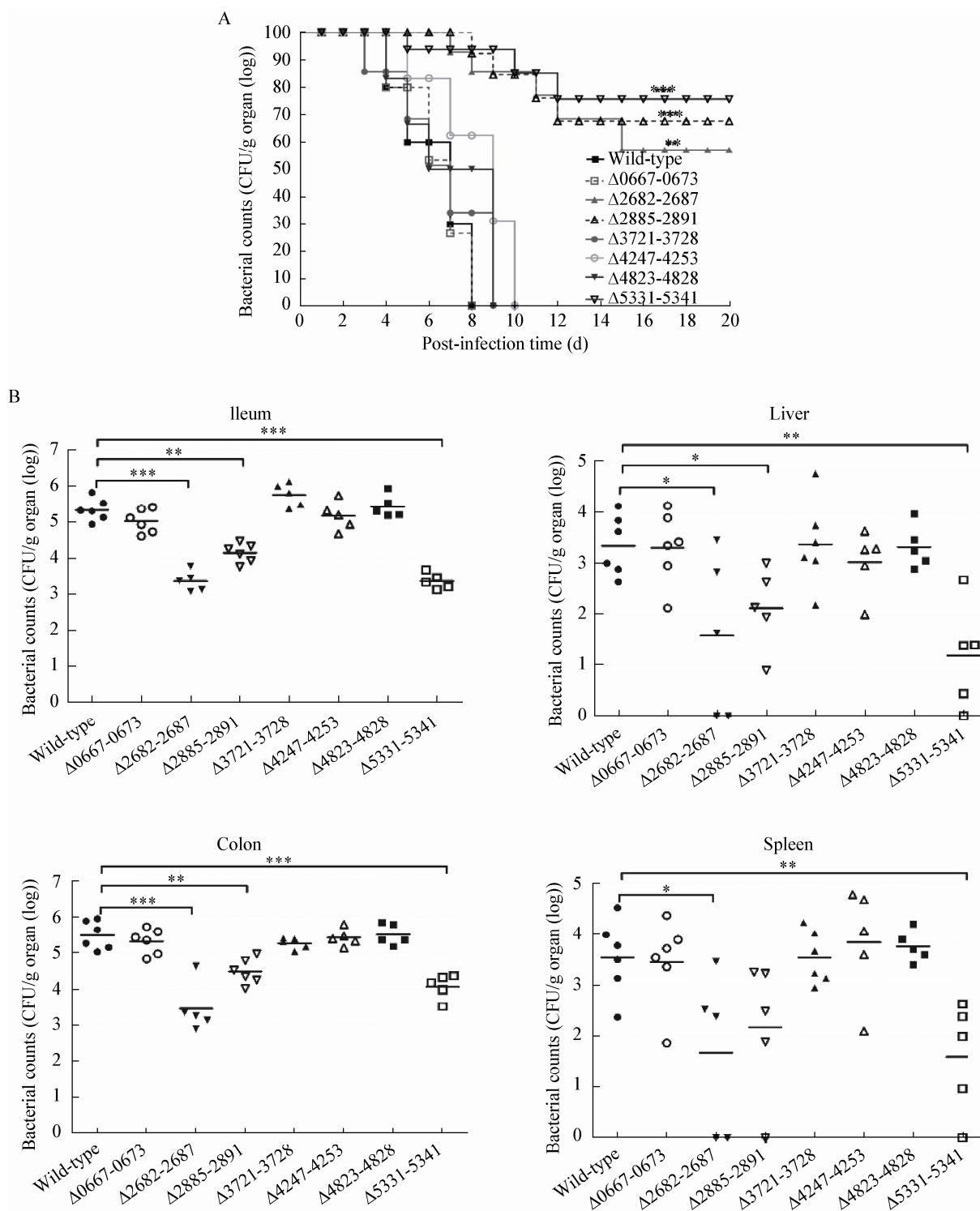


图4 野生型和突变株对小鼠的致病力

Figure 4 Virulence to mice of wild-type strain and mutant strains

注: A: 小鼠存活曲线; B: 回肠、结肠、肝和脾中的细菌数量。

Note: A: Survival plots of mice infected with wild-type strain or mutant strains; B: Bacterial counts recovered from ileum, colon, liver and spleen after infection of wild-type strain or mutant strains.

的定殖菌量均低于野生型, 其余 4 个岛的突变株在各位点的定殖能力与野生型类似。细菌的定殖能力与其对小鼠的致死力结果相吻合。

以上结果表明, 2682-2687、2885-2891 和 5331-5341 这 3 个岛的获得增强了鼠伤寒沙门菌对小鼠的致病力。

3 讨论

沙门菌是威胁人类健康和公共卫生的主要致病菌之一, 近年来对沙门菌致病机制及致病因子的研究备受关注。在沙门菌的致病性进化过程中, 通过水平转移获得大量的特异基因和/或基因岛发挥了关键作用^[4-5]。迄今为止, 对致病岛 1 和致病岛 2 的功能研究已相对清晰, 但是其它多数致病岛在致病性中的作用并不清楚, 除致病岛外的基因岛的研究仍处于空白阶段。本研究为探索未知功能岛对鼠伤寒沙门菌致病性的影响, 发现新的与致病性相关的岛, 构建了 7 个未知功能岛的突变株, 分析了各个岛突变后对细菌致病过程的影响。结果发现 3 个岛显著影响致病性, 表明未知功能岛在鼠伤寒沙门菌的致病过程中也发挥重要作用。

对于引起系统性的伤寒病来说, 侵袭肠道上皮细胞和在巨噬细胞内生存复制这两个致病阶段缺一不可^[1-2,19]。因此, 不同基因岛可能通过作用于不同的致病阶段影响沙门菌的毒力。本研究发现虽然 2682-2687、2885-2891 和 5331-5341 三个岛突变都降低细菌毒力, 但是岛 2682-2687 和岛 5331-5341 同时影响细胞侵袭和胞内复制; 岛 2885-2891 只影响胞内复制能力, 不影响侵袭力。然而, 细菌侵袭力和胞内复制能力的降低最终都能导致细菌对小鼠致病能力的降低。

值得注意的是, 与不影响致病力的 4 个岛(0667-0673、3721-3728、4247-4253 和 4823-4828)相比, 3 个影响致病力的岛(2682-2687、2885-2891 和 5331-5341)在沙门菌的几种典型血清型中都存在(表 2)。在我们所选择的几种血清型中, 邦戈沙门菌是沙门菌属中比较古老的种, 进化地位处于肠炎沙门菌和大肠杆菌之间^[20-21]; 鼠伤寒沙门菌是广宿

主血清型, 进化地位适中; 人伤寒沙门菌和 A 型副伤寒沙门菌起源进化时间相对较晚, 只对人致病^[2]。岛 2682-2687、2885-2891 和 5331-5341 在邦戈沙门氏菌中存在, 说明它们是沙门菌与大肠杆菌分化之初获得的岛, 揭示沙门菌早期的基因获得对于该菌的毒力进化具有非常重要的作用。由于沙门菌的不同血清型致病过程基本类似, 对肠道上皮细胞侵袭和巨噬细胞内复制这两个关键过程影响较大的岛可能存在于所有的能引起系统性疾病的沙门菌血清型中, 而一些与致病性无关或影响较小的岛可能在不同血清型中特异性存在。例如, 岛 0667-0673 虽然也存在于邦戈沙门氏菌中, 属于早期获得的基因岛, 但它在对人致病性的血清型中都已丢失, 所以对于系统性致病性来说, 该岛是非必需的岛。

根据已注释的基因功能进一步推测 3 个岛促进侵袭力和/或胞内复制力的可能机制。岛 2682-2687 中的 *STM14_2683* 基因编码假定的谷胱甘肽 S-转移酶, 有可能在致病过程中结合细胞分泌的某些抗菌物质, 起到解毒作用; *STM14_2686* 基因编码假定的糖运输蛋白, 在营养物质贫瘠的肠道及巨噬细胞内有利于糖类物质的吸收; 对抗菌物质的解毒作用及增加对糖类物质的运输能力均有利于细菌在宿主细胞内和肠道环境中进行复制, 从而增强细菌对宿主的毒力^[22-23]。岛 2885-2891 和岛 5331-5341 中的多数基因编码假定蛋白, 但是岛 2885-2891 中的 *STM14_2889* 基因和岛 5331-5341 中的 *STM14_5339* 基因都编码假定的抗坏血酸运输蛋白, 能促进抗坏血酸的运输^[24]。抗坏血酸的吸收可能有利于细菌抵御肠道及巨噬细胞内活性氧和活性氮等物质的伤害, 从而促进细菌复制^[25]。此外, 我们注意到岛 2682-2687 中的 *STM14_2687* 基因和岛 2885-2891 中的 *STM14_2891* 基因都编码假定的调控蛋白, 有可能直接参与致病过程中毒力基因(如 SPI-1 和 SPI-2)的调控, 从而影响细菌毒力。

综上所述, 本研究发现 3 个未知功能岛的获得显著促进了鼠伤寒沙门菌的致病性, 说明未知功能岛在沙门菌致病性进化过程中发挥重要作用。但是

这些岛具体的调控机制及岛内关键基因目前并不清楚,值得进一步深入研究,本文为深入研究这些岛的调控及影响致病性的机制奠定了基础。

参考文献

- [1] LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(4): 191-205
- [2] Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2007, 85(2): 112-118
- [3] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 50(6): 882-889
- [4] Doolittle RF, Feng DF, Tsang S, et al. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock[J]. *Science*, 1996, 271(5248): 470-477
- [5] Ochman H, Wilson AC. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1987, 26(1/2): 74-86
- [6] McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2[J]. *Nature*, 2001, 413(6858): 852-856
- [7] Nieto PA, Pardo-Roa C, Salazar-Echegarai FJ, et al. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence[J]. *Microbes and Infection*, 2016, 18(5): 302-309
- [8] Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems[J]. *Microbes and Infection*, 2001, 3(7): 549-559
- [9] Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294(2/3): 95-102
- [10] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [11] Gong H, Vu GP, Bai Y, et al. A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002120
- [12] Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, et al. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(1): 193-217
- [13] Anderson CJ, Clark DE, Adli M, et al. Ethanolamine signaling promotes *Salmonella* niche recognition and adaptation during infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(11): e1005278
- [14] Arpaia N, Godec J, Lau L, et al. TLR signaling is required for *Salmonella typhimurium* virulence[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 675-688
- [15] Giannella RA, Washington O, Gemski P, et al. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1973, 128(1): 69-75
- [16] Elhadad D, Desai P, Grassl GA, et al. Differences in host cell invasion and *Salmonella* pathogenicity island 1 expression between *Salmonella enterica* serovar paratyphi A and nontyphoidal *S. typhimurium*[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(4): 1150-1165
- [17] Hölzer SU, Hensel M. Divergent roles of *Salmonella* pathogenicity island 2 and metabolic traits during interaction of *S. enterica* serovar typhimurium with host cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33220
- [18] Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(5): 1015-1023
- [19] Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 308-341
- [20] Briones V, Téllez S, Goyache J, et al. *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(8): 868-871
- [21] Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC, et al. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002191
- [22] Eaton DL, Bammeler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology[J]. *Toxicological Sciences*, 1999, 49(2): 156-164
- [23] Eisenreich W, Dandekar T, Heesemann J, et al. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(6): 401-412
- [24] Zhang ZG, Aboulwafa M, Smith MH, et al. The ascorbate transporter of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(7): 2243-2250
- [25] Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(2): 227-236