

## *ycjX* 和 *ycjF* 基因在布鲁氏菌热应激中的作用

陈家露<sup>1,2</sup>, 支飞杰<sup>1,2</sup>, 李胜男<sup>1,2</sup>, 王萍萍<sup>1,2</sup>, 李彬<sup>1,2</sup>, 刁梓洋<sup>1,2</sup>, 靳亚平<sup>1,2</sup>, 王爱华<sup>\*1,2</sup>

1 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100

2 农业农村部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

陈家露, 支飞杰, 李胜男, 王萍萍, 李彬, 刁梓洋, 靳亚平, 王爱华. *ycjX* 和 *ycjF* 基因在布鲁氏菌热应激中的作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5159-5170

Chen Jialu, Zhi Feijie, Li Shengnan, Wang Pingping, Li Bin, Diao Ziyang, Jin Yaping, Wang Aihua. Roles of *ycjX* and *ycjF* in the response of *Brucella* to heat stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5159-5170

**摘要:** 【背景】细菌应对环境压力的能力对其存活和增殖及引起感染具有重要意义。充分揭示布鲁氏菌应激机制, 可为防控布鲁氏菌病提供理论依据。研究发现, *ycjX* 基因在细菌热应激时高表达且可能受  $\sigma^{32}$  调节, *ycjF* 基因在细菌败血症期间表达显著上升, 二者在革兰阴性菌中可能构成操纵子。【目的】研究 *ycjX* 和 *ycjF* 基因在布鲁氏菌热应激中的作用。【方法】对布鲁氏菌(*Brucella*) 及其 *ycjX* 和 *ycjF* 双基因缺失株( $\Delta ycjXF$ )和回补株( $C\Delta ycjXF$ )进行热应激试验, 计算3株菌的存活率。利用 RT-PCR 和  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测试验鉴定 *ycjX* 和 *ycjF* 的操纵子模式和启动子区域活性。利用 ChIP 试验分析  $\sigma^{32}$  与 *ycjX* 和 *ycjF* 的靶向调节关系。表达并纯化 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  重组蛋白, 凝胶电泳迁移试验分析  $\sigma^{32}$  与 *ycjX* 和 *ycjF* 之间的结合关系。【结果】热刺激后  $\Delta ycjXF$  存活显著低于 *Brucella suis* S2 和  $C\Delta ycjXF$ 。明确布鲁氏菌 *ycjX* 和 *ycjF* 为同一转录本, 确定其启动子区域具有活性。ChIP 试验表明,  $\sigma^{32}$  可靶向富集在 *ycjXF* 启动子区, 凝胶电泳迁移试验确定  $\sigma^{32}$  可与 *ycjXF* 体外直接结合。【结论】在  $\sigma^{32}$  的调节下, *ycjX* 和 *ycjF* 在布鲁氏菌热应激中发挥正向作用。

**关键词:** 布鲁氏菌; *ycjX*; *ycjF*; 双基因缺失株;  $\sigma^{32}$  因子; 热应激

基金项目: 国家自然科学基金(31672584)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31672584)

\*Corresponding author: E-mail: aihuawang1966@163.com

Received: 2022-08-10; Accepted: 2022-09-15; Published online: 2022-10-12

## Roles of *ycjX* and *ycjF* in the response of *Brucella* to heat stress

CHEN Jialu<sup>1,2</sup>, ZHI Feijie<sup>1,2</sup>, LI Shengnan<sup>1,2</sup>, WANG Pingping<sup>1,2</sup>, LI Bin<sup>1,2</sup>, DIAO Ziyang<sup>1,2</sup>, JIN Yaping<sup>1,2</sup>, WANG Aihua<sup>\*1,2</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Key Laboratory of Animal Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** [Background] The response to environmental stimuli is important for the survival, proliferation, and infection of bacteria. Fully revealing the molecular mechanism of *Brucella* in coping with environmental stimuli can provide a theoretical basis for the prevention and control of brucellosis. The available studies have demonstrated that *ycjX* is highly expressed in the bacteria under heat stress and may be regulated by  $\sigma^{32}$  and the expression of *ycjF* rises significantly during bacterial sepsis. The two genes may constitute an operon in Gram-negative bacteria. [Objective] To explore the roles of *ycjX* and *ycjF* in the response of *Brucella* to heat stress. [Methods] Heat stress test was performed on *Brucella suis* S2,  $\Delta ycjXF$ , and  $C\Delta ycjXF$  and the survival rates of the three strains were calculated. The operon modes of *ycjX* and *ycjF* were identified via RT-PCR method. The activity of  $\beta$ -galactosidase was determined to measure the promoter region activity. The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was employed to explore the endogenous regulation of *ycjX* and *ycjF* by  $\sigma^{32}$ . The pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  recombinant protein was expressed and purified. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was employed to analyze the binding relationship of  $\sigma^{32}$  with *ycjX* and *ycjF*. [Results] The growth rate of  $\Delta ycjXF$  slowed down compared with *B. suis* S2 and  $C\Delta ycjXF$  under heat stress. The co-transcriptional analysis showed that *ycjX* and *ycjF* were in the one transcript of *Brucella*. The promoter region of the two genes was active. The ChIP assay showed that  $\sigma^{32}$  can be enriched in the promoter region of *ycjXF*, and the EMSA determined that  $\sigma^{32}$  can directly bind to *ycjXF* *in vitro*. [Conclusion] Under the regulation of  $\sigma^{32}$ , *ycjX* and *ycjF* play a role in the response of *Brucella* to heat stress.

**Keywords:** *Brucella*; *ycjF*; *ycjX*; strain with double gene deletion;  $\sigma^{32}$  factor; heat stress

细菌遇到一定的环境压力(营养缺乏、高/低渗透压、高/低温、酸/碱性和强氧化等)时,能够进化出复杂的应激机制。细菌可通过调控转录反应促进应激蛋白的表达,维持内部蛋白酶稳定,有利于其适应环境压力并生存<sup>[1-2]</sup>。研究细菌应激机制,有助于揭示细菌的抗逆性,为疫病防控提供理论依据。已知细菌受到热刺激后会加速产生未折叠蛋白,而未折叠蛋白积聚过多会导致细胞毒性<sup>[3]</sup>。此时,细菌的热体

克反应机制发挥功能,可通过  $\sigma^{32}$  与 RNA 聚合酶作用,转录激活热休克基因,也可通过热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)、DnaK 和 FstH 等分子伴侣结合并降解未折叠蛋白<sup>[4]</sup>。

研究显示,大肠杆菌应对热刺激与氮饥饿时,*ycjX* 基因表达高度上调,其诱导热休克反应的水平甚至高于主要的应激诱导伴侣 GroEL、ClpB 和 HtpG<sup>[5-6]</sup>,有研究推测 *ycjX* 可能作为热休克基因并受到  $\sigma^{32}$  的调控<sup>[7-8]</sup>。在研究大肠杆

菌中负责应对环境刺激并修复内膜维持质子动力的 PSP 操纵子时,发现 *ycjX* 基因与 *ycjF* 基因成对出现于 PSP 操纵子附近<sup>[9]</sup>,而且 *ycjX* 基因总是位于 *ycjF* 基因的上游<sup>[10]</sup>。*ycjF* 编码一种内膜蛋白,可在细菌败血症期间高表达<sup>[11]</sup>。推测 *ycjX* 与 *ycjF* 基因可能共同参与细菌应激反应的相关功能。

为了探究 *ycjX* 和 *ycjF* 在布鲁氏菌应激反应中的作用,本研究对布鲁氏菌(*Brucella suis*) S2 及其 *ycjX* 和 *ycjF* 双缺失株( $\Delta$ *ycjXF*)及回补株(*C* $\Delta$ *ycjXF*)进行热应激试验,并对 *ycjX* 和 *ycjF* 是否构成操纵子,其启动子区域是否具有活性进行鉴定;同时,利用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)与凝胶电泳迁移试验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)对上游调控因子  $\sigma^{32}$  与 *ycjXF* 的关系进行探索,以期解析 *ycjXF* 参与布鲁氏菌抵御环境应激的分子机制,为防控布鲁氏菌病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和引物

猪种布鲁氏菌 S2 株(*B. suis* S2)由本实验室保存,*B. suis* S2 的 *ycjX* 和 *ycjF* 双缺失株( $\Delta$ *ycjXF*)与回补株(*C* $\Delta$ *ycjXF*)由本实验室构建、鉴定与保存。大肠杆菌 BL21 和 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技公司。引物由北京擎科生物科技有限公司(西安)合成,具体序列见表 1。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰酪大豆胨培养基(TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、营养肉汤培养基(LB)、营养琼脂(LA),北京奥博星生物技术公司。细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒, Thermo 公司;邻硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside,

ONPG),源叶生物;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、TRIzol、*Bam*H I 限制性核酸内切酶, TaKaRa 公司;Flag 标签抗体、Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate, 全式金生物技术有限公司;DNA 纯化试剂盒, Qiagen 公司;Protein A+G 磁珠、小鼠 IgG、GST 蛋白纯化试剂盒、EMSA/Gel-Shift 试剂盒,碧云天生物生物技术公司;ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit, 诺唯赞生物(南京)科技股份有限公司。PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪,凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *ycjXF* 双基因缺失菌株及回补株的构建与鉴定

根据 NCBI 上 GenBank 所公布的基因序列 *ycjX* (GenBank 登录号为 NZ\_CP006961)和 *ycjF* (GenBank 登录号为 NZ\_CP006961),利用同源重组法构建 *ycjX* 与 *ycjF* 的双基因缺失菌株。使用细菌基因组提取试剂盒提取 *B. suis* S2 基因组为模板,分别采用引物对 Up-F/R 和 Down-F/R,进行 PCR;同时以 pET-28a 质粒为模板,采用引物对 Kna-F/R 进行 PCR。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应条件:98  $^{\circ}$ C 5 min;98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。分别获得 *ycjX* 上游同源臂、*ycjF* 下游同源臂和卡那霉素抗性基因片段;将融合片段与 pMD19-T 载体连接,获得重组载体 19T-*ycjXF*。测序正确的重组载体电击转化转入 *B. suis* S2 感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C 培养 72 h。挑取单菌落,将通过 PCR 筛选并鉴定成功的缺失菌株命名为  $\Delta$ *ycjXF*。

以 *B. suis* S2 基因组与 pET-32a 质粒为模板,采用引物 *ycjXF*-F/R、pBB-XF-F/R、pBB-Amp-F/R 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50  $\mu$ L):

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
Up-F	CTCTGTTCGCACACGCGAAA
Up-R	AGAACTCTGTAGCACCGCTATGCCCTCGCCGAAATTGC
Down-F	TCCCCGAAAAGTGCCACCTGGCGCCCGCTCCGCTGAA
Down-R	GGCGATACTGCCGACAGCGA
Kna-F	AATTCGCGGAGGGCATAGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
Kna-R	ATTCAGCGGAGGCGGGCGCCAGGTGGCACTTTTCGGG
ycjXF-F	GACCTGCATTGTCACAGGA
ycjXF-R	CTCATCGTCCGTCAGATCGA
pBB-XF-F	AAACAAATAGGGGTTCCGCGATCGATGAAAGAAACCGGG
pBB-XF-R	CTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTTTCGGGCGTTTCT
pBB-Amp-F	AGGATGACGACGATAAGTAGTTCGCAAAGTCGTGACCGCC
pBB-Amp-R	GCCCGGTTTCTTTCATCGATCGCGGAACCCCTATTTGTTT
RT-F	TTCTATCCTGTTTCCGTCCC
RT-R	CCGTCTATGATGTCATCCGT
ycjX-P-F	TATGCCCTCGCCGAAATTGC
ycjX-P-R	AGACGTCGGCAATCTTATGCTC
ycjF-P-F	TTCTATCCTGTTTCCGTCCC
ycjF-P-R	CCGTCTATGATGTCATCCGT
qRT-PCR-F	TGCTCACGGGACATAATCCG
qRT-PCR-R	ACTCTCCAGAAAACCACGCC
$\sigma^{32}$ -F	GATCTGGTTCGCGTGGATCCATGGCCCAGATGAAACTCCC
$\sigma^{32}$ -R	ACCCGGGAATTCCGGGGATCCGACGTGCGCTTCCTCGATAT
EMSA-F	AGACGTCGGCAATCTTATGCTC
EMSA-R	TATGCCCTCGCCGAAATTGC
EMSA-R-FAM	TATGCCCTCGCCGAAATTGC

注：下划线表示限制性内切酶位点

Note: The underline indicates the restriction endonuclease site.

PrimeSTAR Max Premix (2×) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 5 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。包含 *ycjX* 与 *ycjF* 基因的启动子、目的基因和 Flag 标签的片段; 并利用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 将目的片段进行连接, 经测序构建成功的回补质粒电击转化转入  $\Delta$ *ycjXF*, 37  $^{\circ}$ C 培养 72 h。挑取单菌落, 参照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, 之后参照逆转录试剂盒说

明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 参照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行反应。将通过荧光定量 PCR 与 Western blotting 筛选并鉴定成功的回补菌株命名为 *C $\Delta$ ycjXF*。

### 1.2.2 *ycjXF* 对布鲁氏菌体外应激的影响

将 *B. suis* S2、 $\Delta$ *ycjXF*、*C $\Delta$ ycjXF* 分别接种于 TSB 培养基, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温摇床培养至对数生长期( $OD_{600} \approx 0.6$ ), 用 TSB 调整为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌液样品。分别置于 37、45、50、55  $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 1 h。然后分别进行 10 倍

倍比稀释,涂布于 TSA 平板上,37 °C 恒温培养 72 h,进行菌落计数并计算存活率。

### 1.2.3 操纵子模式的确定

利用共转录原理设计跨越 *ycjX* 和 *ycjF* 基因的引物 RT-F 与 RT-R (表 1)。取对数生长期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ ) 的 *B. suis* S2 菌液,参照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA。利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,PCR 检测在 *B. suis* S2 的 cDNA 与 DNA 中的共转录情况。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 模板 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。

### 1.2.4 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的检测

采用引物对 *ycjX*-P-F/R 和 *ycjF*-P-F/R 扩增出 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域,利用同源重组的方法构建表达活性质粒。将其电转化转入 *B. suis* S2 感受态细胞中,37 °C 培养 24 h;划线培养,挑取单菌落置于 20 mL TSB 培养基中培养至对数生长期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )。在 2 mL EP 管中加入 100  $\mu$ L 菌液,600  $\mu$ L 预冷 Z-buffer (100 mmol/L Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>、40 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mmol/L KCl、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、5.4  $\mu$ L/mL  $\beta$ -巯基乙醇)重悬菌体并混匀后取 200  $\mu$ L 测定其  $OD_{600}$  值。加入 100  $\mu$ L 氯仿及 50  $\mu$ L 0.1% SDS 到剩余菌液中,颠倒混匀后室温孵育 5 min,然后加入 200  $\mu$ L 4 mg/mL ONPG 溶液混匀后室温孵育并记录溶液变黄时间( $T$ );加入 500  $\mu$ L 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液至体系中,终止反应;将 2 mL EP 管,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,取 200  $\mu$ L 上清测定  $OD_{420}$  与  $OD_{500}$  值。计算酶活的公式: millor unit =  $1\ 000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{500}) / (OD_{600} \times V \times T)$ 。将对数生长期菌液 ( $OD_{600} \approx 0.6$ ) 进行 10 倍倍比稀

释后点斑于含有 2 mg/mL X-gal 的 TSA 平板上,置于 37 °C 恒温培养箱中培养并观察菌落颜色变化。

### 1.2.5 染色质免疫共沉淀试验

染色质免疫共沉淀(ChIP)试验参考文献[12]中的方法。参照回补菌株质粒构建方法<sup>[13]</sup>,构建 pBBori-Amp- $\sigma^{32}$  质粒并电转化转入 *B. suis* S2,得到过表达  $\sigma^{32}$  菌株,37 °C、180 r/min 恒温摇床培养至对数生长期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )。Protein-DNA 交联:先加入 2.2 mg/mL 溶菌酶室温处理菌液 10 min,在培养基中加入终浓度为 1% 的甲醛交联 15 min,并缓慢摇晃,再用终浓度 125 mmol/L 的甘氨酸终止交联。4 °C、8 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。在冷 PBS 中洗涤 2 次,用 2 mL IP Buffer 重悬。以 20% 振幅超声裂解,工作 1 s 间隔 2 s,反复检测裂解情况,将 DNA 片段破碎在 200–500 bp 左右。超声裂解后的样品在 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min。取上清的 1/3 作为 Input 组,2/3 分别加入已预处理的 beads 中,其中一组为 Flag 标签抗体组、另一组为小鼠 IgG 组。4 °C 孵育过夜后进行 beads 洗涤,洗涤后取 20  $\mu$ L 样品进行 Western blotting 检测。解交联后的样品加入 10 mg/mL RNase A,37 °C 水浴 1 h,0.2 mg/mL Proteinase K 55 °C 水浴 30 min。使用 DNA 纯化试剂盒提取 DNA。

### 1.2.6 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证 ChIP 结果

利用 NCBI 中的 Blast-Primer 工具设计 *ycjX* 和 *ycjF* 启动子区域引物 *ycjX*-P-F/R 和 *ycjF*-P-F/R,以纯化后的 DNA 片段作为模板进行 qRT-PCR。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环;65 °C 5 s;55 °C 5 s。其中试验组为 IP 组,对照组为 IgG 组,每组样品均为 3 个重复。进行 qPCR 扩增,并使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

法进行计算。

### 1.2.7 原核表达载体 pGEX4T-1- $\sigma^{32}$ 的构建与蛋白纯化

根据 GenBank 上所公布 *B. suis* S2  $\sigma^{32}$  基因序列(登录号为 NZ\_CP006961.1), 设计引物  $\sigma^{32}$ -F/R 并引入 *Bam*H I 酶切位点。以 *B. suis* S2 菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增  $\sigma^{32}$  片段, PCR 反应体系(50  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 5 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。与酶切后的 pGEX-4T-1 质粒连接。测序鉴定成功的重组质粒命名为 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$ 。

构建成功的重组质粒进一步转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 转化后产物涂布于含有 100 mg/L 氨苄抗性的 LA 培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。挑取生长良好的单个菌落, 接种至含有 100 mg/L 氨苄抗性的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温培养至对数生长期 ( $OD_{600}\approx 0.6$ ), 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温摇床进行诱导表达。培养 12 h 后, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体重悬于裂解液, 在冰上进行超声裂解, 裂解功率 350 W, 每次工作 3 s、间歇 3 s, 直至菌液澄清; 利用 GST 蛋白纯化试剂盒对超裂后上清进行纯化, 纯化后蛋白命名为  $\sigma^{32}$ , 保存于 -80  $^{\circ}$ C 备用。蛋白浓度用 NanoDrop 分光光度仪测定, 保存备用。

### 1.2.8 凝胶电泳迁移试验

凝胶电泳迁移试验参考文献[14]中所使用的方法, 根据 *ycjX* 和 *ycjF* 启动子区域设计引物 EMSA-F/R-FAM、EMSA-F/R, PCR 扩增出携带 FAM 标记的探针与未标记探针, PCR 反应体系(50  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L,

上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 5 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。 $\sigma^{32}$  蛋白与 *ycjX* 和 *ycjF* 启动子区域的结合反应参考 EMSA/Gel-Shift 试剂盒说明书进行, 在凝胶成像仪中拍照并记录结果。

### 1.3 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 通过 *t* 检验或单因素方差分析, \* $P < 0.05$  差异显著, \*\* $P < 0.01$  差异极显著; 利用 GraphPad Prism 8 进行绘图。

## 2 结果与分析

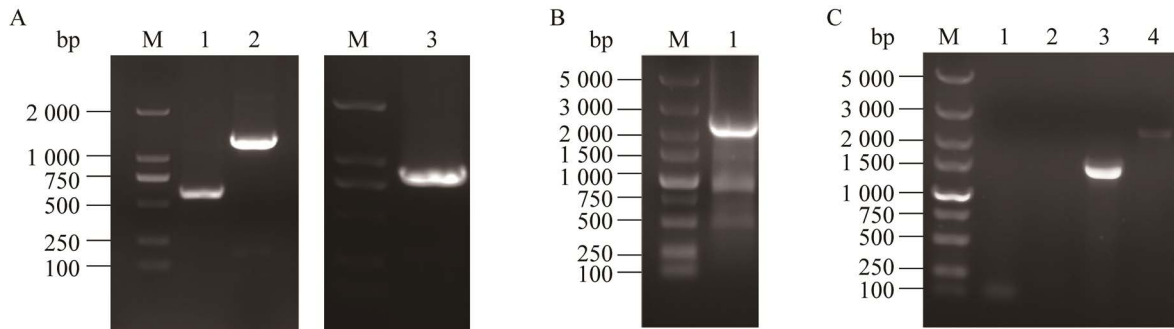
### 2.1 *ycjXF* 基因缺失菌株与回补菌株的构建及鉴定

PCR 扩增并获得目的片段, *ycjX* 上游同源臂为 578 bp, *ycjF* 下游同源臂为 800 bp, 卡那霉素抗性基因片段为 1 229 bp (图 1A); 经融合 PCR 获得融合片段为 2 607 bp (图 1B); 电转化成功后进行 PCR 筛选, 扩增 *ycjXF* 上游同源臂-卡那霉素基因条带为 1 580 bp, 下游同源臂-卡那霉素基因条带 2 343 bp, 使用布鲁氏菌 S2 株基因组模板为阴性对照(图 1C)。

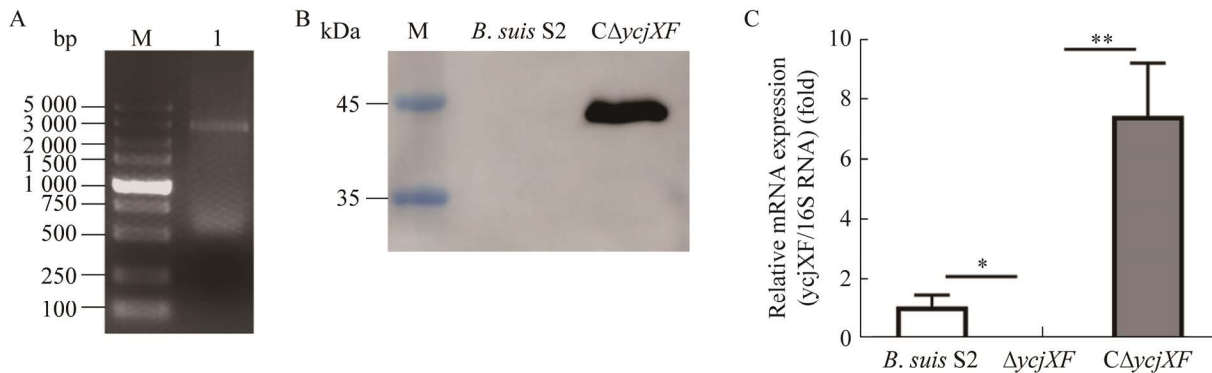
PCR 扩增含 *ycjXF* 启动子、目的基因和 Flag 标签的 3 137 bp 回补片段(图 2A)。回补质粒电转入  $\Delta$ *ycjXF* 后, Western blotting 筛选回补菌株, 在  $C\Delta$ *ycjXF* 检测到 *YcjXF*-flag 条带, 表明回补菌株构建成功(图 2B)。qRT-PCR 再次鉴定,  $\Delta$ *ycjXF* 未检测到 *ycjXF* 的表达, 而  $C\Delta$ *ycjXF* 检测到表达, 表明基因缺失菌株与回补菌株构建成功(图 2C)。

### 2.2 *ycjXF* 基因缺失对布鲁氏菌热应激的影响

热刺激处理后的 *B. suis* S2、 $\Delta$ *ycjXF* 和  $C\Delta$ *ycjXF* 在 37  $^{\circ}$ C 培养 72 h 后进行菌落计数并计



**图 1 缺失菌株构建及鉴定** A: 缺失菌株目的片段 PCR, M: DL2000 DNA Marker; 1: *ycjXF* 上游同源臂; 2: 卡那霉素基因; 3: *ycjXF* 下游同源臂。B: *ycjXF* 上、下游同源臂与卡那霉素基因的融合 PCR, M: DL5000 DNA Marker; 1: *ycjXF* 融合片段。C: 缺失菌株鉴定 PCR, M: DL5000 DNA Marker; 1-2: S2 株阴性对照; 3: *ycjXF* 上游同源臂-卡那霉素基因; 4: *ycjXF* 下游同源臂与卡那霉素基因  
 Figure 1 PCR identification of deletion strains. A: PCR of individual fragments of deletion strain; M: DL2000 DNA Marker; 1: *ycjXF* upstream homologous arm gene; 2: Kanamycin resistance gene; 3: *ycjXF* downstream homologous arm gene. B: PCR of fusion fragment of deletion strain; M: DL5000 DNA Marker, 1: Fusion fragment. C: PCR of deletion strains; M: DL5000 DNA Marker; 1-2: S2 strains as negative control; 3: *ycjXF* upstream homologous arm-kanamycin resistance gene; 4: *ycjXF* downstream homologous arm-kanamycin resistance gene.



**图 2 回补菌株构建** A: 回补片段 PCR, M: DL5000 DNA Marker; 1: *ycjX* 与 *ycjF* 目的片段与启动子区域。B: Western blotting 鉴定回补菌株。C: qRT-PCR 鉴定 *ycjXF* 缺失及回补菌株, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

**Figure 2 Construction and identification of complemented strain.** A: PCR of complemented fragment; M: DL5000 DNA Marker; 1: Region of *ycjX*, *ycjF* and promoter. B: Western blotting of complemented strain. C: qRT-PCR of *ycjXF* deletion strain and complemented strain; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

算其存活率。结果显示, 在热刺激后  $\Delta ycjXF$  与 *B. suis* S2 和  $C\Delta ycjXF$  相比存活率显著降低。表明 *ycjX* 和 *ycjF* 基因缺失降低了布鲁氏菌抵抗热刺激的能力(图 3)。

### 2.3 *ycjX* 和 *ycjF* 操纵子的确定和启动子活性鉴定

设计跨越基因引物 RT-F 与 RT-R, 见图 4A 中黑色竖线。电泳结果显示, cDNA 和 DNA 为

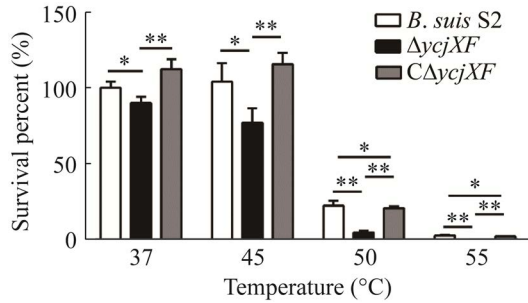


图3 不同热刺激对 *Brucella suis* S2、 $\Delta$ *ycjXF* 和  $C\Delta$ *ycjXF* 菌株在体外生长的影响

Figure 3 Survival of *Brucella suis* S2,  $\Delta$ *ycjXF* and  $C\Delta$ *ycjXF* under heat stress. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

模板时均有条带, RNA 作为阴性对照无条带, 表明 *ycjX* 和 *ycjF* 两个相邻基因共转录, 存在 *ycjXF* 操纵子(图 4B)。

采用 ONPG 比色法检测 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, 结果显示, 与带有无关片段的阴性对照相比, *ycjXF* 的启动子具有活性( $P < 0.01$ ) (图 5A), 而且在含有 X-gal 的平板上显示为蓝色(图 5B)。表明 *ycjX* 和 *ycjF* 共用启动子区域且该区域具有活性。

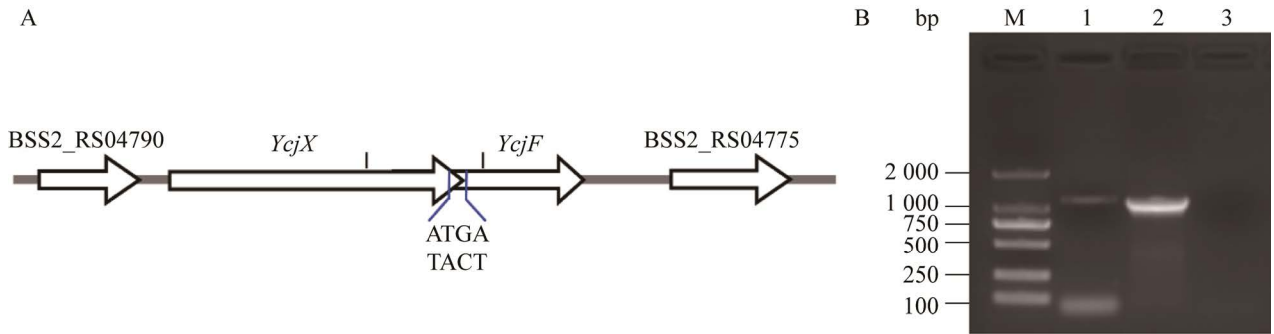


图4 布鲁氏菌 *ycjXF* 基因转录单元的 RT-PCR 分析 A: 基因模式图。B: PCR 检测结果, M: DL2000 DNA Marker; 1: cDNA 为模板扩增结果; 2: DNA 为模板扩增结果; 3: 阴性对照

Figure 4 RT-PCR analysis of *ycjXF* gene transcription unit of *Brucella*. A: *ycjXF* gene model. B: PCR detection of *ycjXF* gene; M: DL2000 DNA Marker; 1: Represent the amplification using cDNA as the templates; 2: Represent the amplification using DNA as the templates; 3: Negative control.

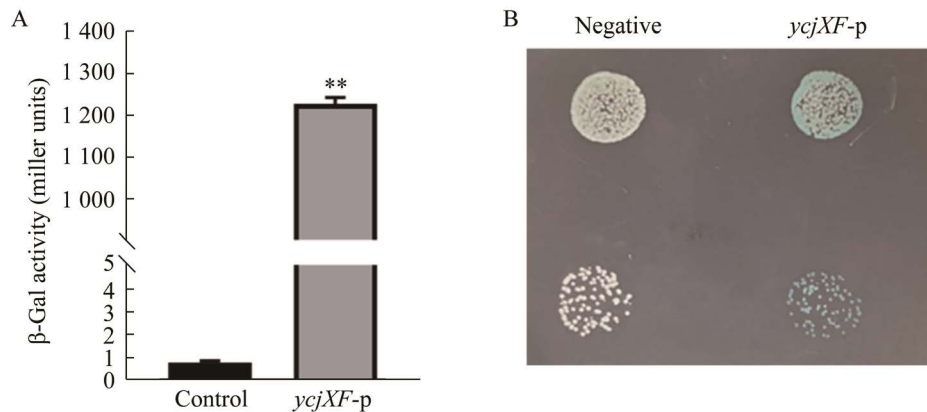


图5 布鲁氏菌 *ycjXF* 启动子活性分析 A: ONPG 比色法检测  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, \*\*:  $P < 0.01$ , 表示差异极显著; B: 蓝白斑鉴定启动子活性

Figure 5 Promoter activity of *Brucella ycjXF*. A:  $\beta$ -galactosidase activity was detected by ONPG colorimetric method; \*\*:  $P < 0.01$ . B: Promoter activity was detected by blue and white spots.



### 2.4 重组 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$ 蛋白表达与纯化

PCR 扩增  $\sigma^{32}$  目的片段为 909 bp, 酶切 pGEX-4T-1 载体后进行连接, 获得 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  重组质粒(图 6A、6B)。对 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  重组蛋白上清进行纯化, 经 SDS-PAGE 电泳, 获得了与预期大小相符的 59.4 kDa 蛋白(图 6C)。

### 2.5 $\sigma^{32}$ 对 *ycjX* 和 *ycjF* 的靶向调节

为了探究  $\sigma^{32}$  与 *ycjX* 和 *ycjF* 之间的调节关系, 超声裂解后样品的主要 DNA 片段大小为 250 bp 左右(图 7A), 符合后续试验要求。Western blotting 结果显示, 在 Input 组和 IP 组出现富集(图 7B)。将富集后的样品通过 qRT-PCR 检测发

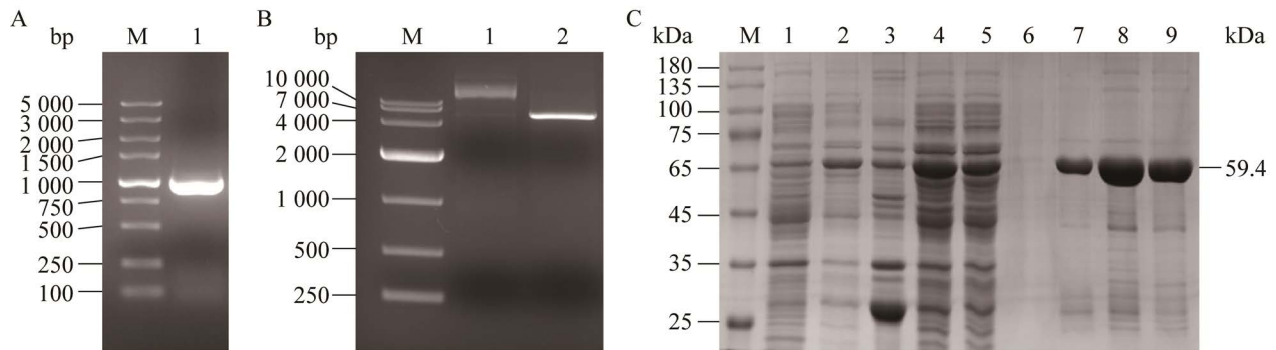


图 6 重组蛋白  $\sigma^{32}$  的构建与纯化 A:  $\sigma^{32}$  目的片段 PCR, M: DL5000 DNA Marker; 1:  $\sigma^{32}$  目的基因。B: pGEX-4T-1 载体酶切, M: DL10000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 酶切。C: SDS-PAGE 检测 pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  重组蛋白, M: Protein Marker; 1: 未诱导; 2: 诱导; 3: 超裂后沉淀; 4-5: 超裂后上清; 6: 穿流液; 7-9: 洗脱液

Figure 6 Construction and purification of recombinant protein  $\sigma^{32}$ . A: PCR of  $\sigma^{32}$  fragment; M: DL5000 DNA Marker; 1:  $\sigma^{32}$  gene. B: Digestion of pGEX-4T-1 vector; M: DL10000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: Digestion of pGEX-4T-1. C: SDS-PAGE detection of pGEX-4T-1- $\sigma^{32}$  recombinant protein; M: Protein Marker; 1: Not induced; 2: Induced; 3: After ultra-splitting precipitate; 4-5: Supernatant; 6: Permeate; 7-9: Eluent.

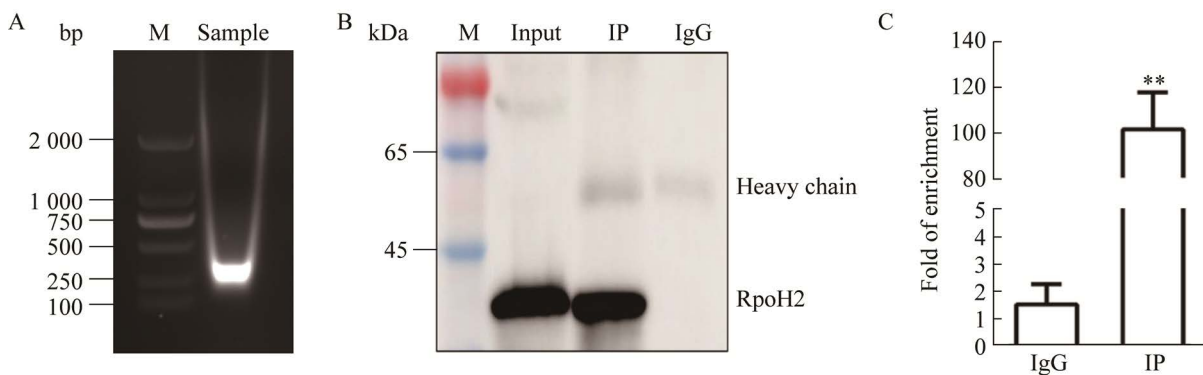


图 7 染色质免疫共沉淀结果 A: 超声破碎染色质, M: DL2000 DNA Marker。B: Western blotting 检测  $\sigma^{32}$  富集情况。C: qRT-PCR 检测  $\sigma^{32}$  对 *ycjXF* 启动子富集倍数, \*\*:  $P < 0.01$ , 表示差异极显著

Figure 7 Chromatin immunoprecipitation analysis of the regulatory relationship between  $\sigma^{32}$  and *ycjXF*. A: Ultrasonic broken chromatin; M: DL2000 DNA Marker. B: Western blotting detection of  $\sigma^{32}$  enrichment. C: qRT-PCR detection of enrichment fold of  $\sigma^{32}$  on *ycjXF* promoter; \*\*:  $P < 0.01$ .

现, IP 组富集到 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域, 对照 IgG 组差异显著(图 7C)。表明  $\sigma^{32}$  对 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域有靶向调节关系。

## 2.6 $\sigma^{32}$ 与 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域直接结合

EMSA 试验判断  $\sigma^{32}$  对 *ycjX* 和 *ycjF* 的调控, 正常结合组随着  $\sigma^{32}$  蛋白量的逐渐增加, DNA-蛋白质复合物逐渐增加(图 8A); 竞争组未标记的探针量逐渐增加, DNA-蛋白质复合物逐渐减少(图 8B)。结果表明  $\sigma^{32}$  可直接结合到 *ycjXF* 的启动子区域。

## 3 讨论与结论

布鲁氏菌病是世界上严重的人畜共患病之一, 引起的慢性感染可导致严重的经济损失和公共卫生负担<sup>[15]</sup>。研究发现当布鲁氏菌面对一般环境压力如营养缺乏、酸性、强氧化性时会调控  $\sigma$  因子 RpoE1、HWE 型传感器 LovhK 激酶和抗  $\sigma$  因子 PhyR 等共同应对环境刺激<sup>[16-17]</sup>。布鲁氏菌可通过未经高温消毒或消毒不彻底的

产品进行扩散<sup>[18]</sup>。研究发现, 极端温度与温度频繁波动都会影响细菌的增殖<sup>[1]</sup>。对于可入侵宿主细胞的细菌, 在感染宿主时的温度变化也是影响毒力的重要信号<sup>[19]</sup>。因此, 细菌对温度变化的适应及在不适温度刺激下如何调节基因表达成为许多研究的重点。

本研究在不同温度的热刺激下发现, 随着环境温度的不断升高,  $\Delta ycjXF$  与 *B. suis* S2 和  $C\Delta ycjXF$  相比存活率显著降低, 表明 *ycjX* 和 *ycjF* 可参与布鲁氏菌热应激, 与 Choi 等<sup>[4]</sup>在大肠杆菌中观测到 *ycjX* 和 *ycjF* 可能参与细菌热应激的结果相似。文献报道中, *ycjX* 与 *ycjF* 基因常成对出现。Yan 等<sup>[20]</sup>学者指出根据操纵子理论可知多顺反子编码的蛋白质通常具有相同功能或参与相关代谢途径。验证 *ycjX* 和 *ycjF* 是否为操纵子模式及启动子区域是否具有活性, 对探究其功能意义重大。本研究通过共转录试验与  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测, 证明布鲁氏菌 *ycjX* 和 *ycjF* 基因共用同一转录本且启动子区域具有活性, 这提示 *ycjX* 和 *ycjF* 可共同参与布鲁氏菌的热应激。

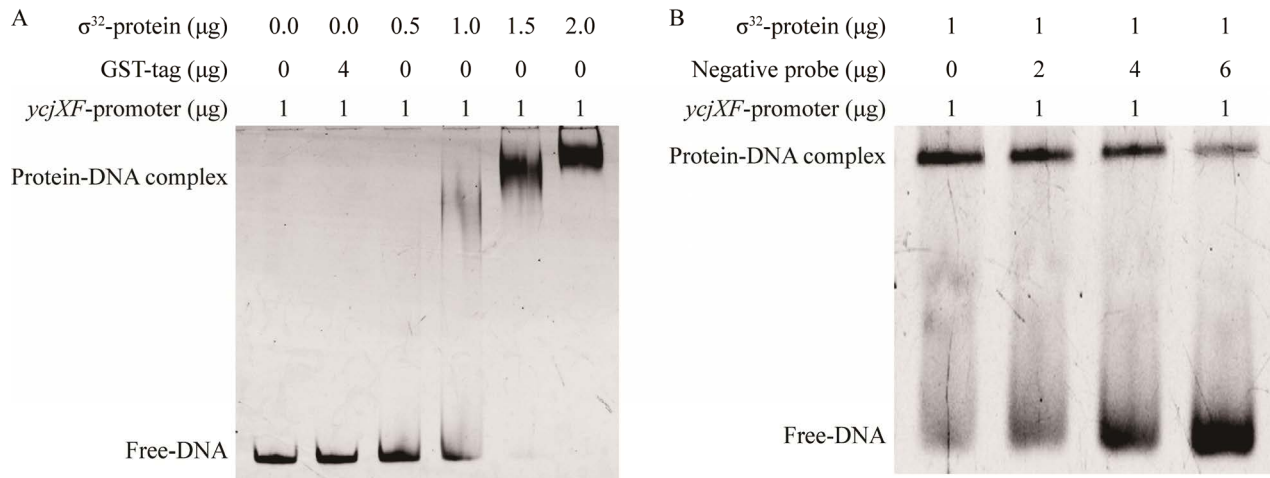


图 8 EMSA 验证  $\sigma^{32}$  与 *ycjXF* 启动子区域结合 A: EMSA 分析  $\sigma^{32}$  与 *ycjXF* 启动子结合; B: 竞争 EMSA 分析  $\sigma^{32}$  与 *ycjXF* 启动子结合

Figure 8 EMSA verified the binding of  $\sigma^{32}$  and *ycjXF* promoter region. A: EMSA assays of  $\sigma^{32}$  binding to the *ycjXF* promoter region; B: Competition assays.

研究表明,当细菌应对热刺激时  $\sigma^{32}$  会高度表达并结合 RNA 聚合酶激活热休克基因的转录<sup>[21]</sup>,同时热休克蛋白可以将细胞内折叠错误的蛋白质进行转运或降解<sup>[22]</sup>。Delory 等<sup>[23]</sup>发现,羊种布鲁氏菌中  $\sigma^{32}$  基因缺失株在 42 °C 下将无法生长。本研究利用 ChIP 试验探究 *ycjX* 和 *ycjF* 参与布鲁氏菌热应激是否受到  $\sigma^{32}$  的靶向调节,从 qRT-PCR 结果显示,  $\sigma^{32}$  富集到 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域,表明布鲁氏菌 *ycjX* 和 *ycjF* 可受  $\sigma^{32}$  调节。纯化  $\sigma^{32}$  重组蛋白,利用 EMSA 试验验证  $\sigma^{32}$  与 *ycjX* 和 *ycjF* 的启动子区域可直接结合,揭示布鲁氏菌的 *ycjX* 和 *ycjF* 参与热应激并受  $\sigma^{32}$  的直接调节。结合在热应激试验中  $\Delta$ *ycjXF* 的存活率显著下降,提示 *ycjX* 和 *ycjF* 基因缺失时无法编码蛋白质参与布鲁氏菌热应激,推测 *ycjX* 和 *ycjF* 基因在布鲁氏菌热应激中作为热休克基因被  $\sigma^{32}$  调节,而且可能作为热休克蛋白参与降解未折叠蛋白,从而维持细菌自身稳态。

本研究揭示了布鲁氏菌热应激中 *ycjX* 和 *ycjF* 基因在  $\sigma^{32}$  的调节下发挥作用,为进一步研究布鲁氏菌抵抗热刺激的分子调控机制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Zhu M, Dai X. Bacterial stress defense: the crucial role of ribosome speed[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(5): 853-858
- [2] Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. *In vivo* aspects of protein folding and quality control[J]. Science, 2016, 353(6294): aac4354
- [3] Nonaka G, Blankschien M, Herman C, Gross CA, Rhodius VA. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress[J]. Genes & Development, 2006, 20(13): 1776-1789
- [4] Choi U, Park YH, Kim YR, Seok YJ, Lee CR. Increased expression of genes involved in uptake and degradation of murein tripeptide under nitrogen starvation in *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(14): fnw136
- [5] Liu KQ, Bittner AN, Wang JD. Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors[J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 24: 72-79
- [6] Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, Brown SD, Chang HY, El-Gebali S, Fraser MI, et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D351-D360
- [7] Huvet M, Toni T, Sheng X, Thorne T, Jovanovic G, Engl C, Buck M, Pinney JW, Stumpf MPH. The evolution of the phage shock protein response system: interplay between protein function, genomic organization, and system function[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(3): 1141-1155
- [8] Jeng W, Lee S, Sung N, Lee J, Tsai FTF. Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states[J]. F1000Research, 2015, 4: F1000 Faculty Rev-F1000 Faculty1448
- [9] Manganelli R, Gennaro ML. Protecting from envelope stress: variations on the phage-shock-protein theme [J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(3):242
- [10] Wright BW, Logel DY, Mirzai M, Pascovici D, Molloy MP, Jaschke PR. Proteomic and transcriptomic analysis of *Microviridae*  $\phi$ X174 infection reveals broad upregulation of host *Escherichia coli* membrane damage and heat shock responses[J]. mSystems, 2021, 6(3): e00046-21
- [11] Khan MA, Isaacson RE. Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(7): 3404-3412
- [12] Francis N, Poncin K, Fioravanti A, Vassen V, Willemart K, Ong TAP, Rappez L, Letesson JJ, Biondi EG, De Bolle X. CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*[J]. Molecular Microbiology, 2017, 103(5): 780-797
- [13] 张广冻. 布鲁氏菌 *brbI* 基因生物学功能及其作用机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2021  
Zhang GD. Study on the role and mechanism of *brbI* in *Brucella*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese)
- [14] Zhi FJ, Zhou D, Chen JL, Fang JY, Zheng WF, Li JM, Hao MY, Shi Y, Jin YP, Wang AH. An ArsR

- transcriptional regulator facilitates *Brucella* sp. survival via regulating self and outer membrane protein[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10860
- [15] Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, Chhabra R, Karthik K, Patel SK, Pathak M, et al. Bovine brucellosis-a comprehensive review[J]. The Veterinary Quarterly, 2021, 41(1): 61-88
- [16] Kim HS, Willett JW, Jain-Gupta N, Fiebig A, Crosson S. The *Brucella abortus* virulence regulator, LovhK, is a sensor kinase in the general stress response signalling pathway[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(4): 913-925
- [17] Fiebig A, Herrou J, Willett J, Crosson S. General stress signaling in the alphaproteobacteria[J]. Annual Review of Genetics, 2015, 49: 603-625
- [18] Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis[J]. Infectious Diseases, 2019, 51(5): 321-333
- [19] Rodrigues JL, Rodrigues LR. Potential applications of the *Escherichia coli* heat shock response in synthetic biology[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(2): 186-198
- [20] Yan B, Boitano M, Clark TA, Ettwiller L. SMRT-Cappable-seq reveals complex operon variants in bacteria[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3676
- [21] Wade JT, Roa DC, Grainger DC, Hurd D, Busby SJW, Struhl K, Nudler E. Extensive functional overlap between  $\sigma$  factors in *Escherichia coli*[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 13(9): 806-814
- [22] Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death[J]. Molecular Cell, 2010, 40(2): 253-266
- [23] Delory M, Hallez R, Letesson JJ, De Bolle X. An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(21): 7707-7710