

基于 GFP 观察鼠伤寒沙门氏菌 HilD 介导 *ssrAB* 表达的初探

韩敏敏, 张丽, 周妮妮, 陈传荣, 曹堃, 李郁

摘要: 目的 以绿色荧光蛋白(GFP)标记的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S.Typhi*)为研究对象, 秀丽隐杆线虫为模式生物, 初步探究体内环境下 HilD 对 *ssrAB* 表达的调控作用。 **方法** 通过基因工程技术分别构建携带 *gfp* 基因的亲本株 *S.Typhi(ssrAB-gfp+pcDNA3.1)*、*hilD* 基因缺失株 *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* 和 *hilD* 基因回补株 *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* 标记菌。利用荧光显微技术, 观察 3 株标记菌在饲喂感染秀丽隐杆线虫体内外的 GFP 表达状况及其定殖分布, 并通过 ImageJ 软件进行荧光强度的比较。 **结果** 成功构建的 3 株标记菌在秀丽隐杆线虫体内外均呈现绿色荧光, 荧光强度为 *S.Typhi(ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* 高于 *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* 和 *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)*, *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* 高于 *S.Typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)*; 3 株标记菌在线虫体内主要定殖分布于口咽部和肠道中, 荧光强度为口咽部较肠道高。 **结论** GFP 在鼠伤寒沙门氏菌中得到稳定表达, 感染秀丽隐杆线虫后同样获得 GFP 的稳定表达, 且在线虫的口咽部和肠道具有良好的定殖分布, 首次初步证明体内环境下 HilD 介导 *ssrAB* 表达, 但并非为单一的调控作用。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌; HilD; *ssrAB*; GFP; 秀丽隐杆线虫

中图分类号: R378.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2018)12-1112-07

HilD mediated expression of *ssrAB* based on GFP in *Salmonella typhimurium*

HAN Min-min, ZHANG Li, ZHOU Ni-ni, CHEN Chuan-rong, CAO Kun, LI Yu

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: *Salmonella typhimurium* (*S.typhi*) labeled with GFP was used as the research object and *Caenorhabditis elegans* as a model organism, initially the role of HilD in the regulation of the expression of *ssrAB* was explored *in vivo*. Genetic engineering technology was used to construct *S.typhi(ssrAB-gfp+pcDNA3.1)*, *hilD* gene deletion strain *S.typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* and *hilD* gene reversion strain *S.typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* carrying GFP gene respectively. Fluorescence microscopy was used to observe the expression and distribution of GFP in 3 labelled strains in *Caenorhabditis elegans* *in vitro* and *in vivo*, and the fluorescence intensity was compared by ImageJ. Three labelled strains were successfully constructed and showed green fluorescence in *Caenorhabditis elegans* *in vitro* and *in vivo*. The fluorescence intensity of *S.typhi(ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* was higher than that of *(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* ($P < 0.05$) and *S.typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* ($P < 0.01$), the fluorescence intensity of *S.typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1-hilD)* was higher than that of *S.typhi(ΔhilD+ssrAB-gfp+pcDNA3.1)* ($P < 0.05$). Colonization of 3 labelled strains in *Caenorhabditis elegans* *in vitro* was mainly distributed in oropharyngeal and intestinal tract, the fluorescence intensity of oropharynx was high that of intestinal ($P < 0.05$). The expression of GFP was stable in *Salmonella typhimurium*, expressing the same in *Caenorhabditis elegans*. Three labelled strains colonized in oropharyngeal and intestinal very well in *Caenorhabditis elegans*. The study proved that HilD mediated the expression of *ssrAB* at the first time *in vitro*, not only a regulation role.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; HilD; *ssrAB*; GFP; *Caenorhabditis elegans*

国家级大学生创新训练项目(No.201410364003); 安徽省自然科学基金项目(No.1508085MC44)和安徽省高等学校省级自然科学研究项目(No.KJ2008B056)联合资助

通讯作者: 李郁, Email: liyouer@163.com

作者单位: 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

Supported by the National College Students' Innovation Training Project (No. 201410364003), the Anhui Natural Science Foundation Project (No. 1508085MC44), and the Provincial Natural Science Research Projects of Anhui Higher Education Institutions (No. KJ2008B056)

Corresponding author: Li Yu, Email: liyouer@163.com

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种重要的人兽共患病原菌,在医学、兽医学和公共卫生方面均具有重要意义。该菌为兼性胞内寄生菌,其致病性主要与基因组上成簇分布的编码致病相关基因的特定区域—毒力岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)有关。目前在沙门氏菌基因组上发现了约 39 个 SPI,分别以 SPI-1~SPI-39 表示,其中 SPI-1 和 SPI-2 与致病性密切相关^[1-2]。有研究报道,位于 SPI-1 上 *hilD* 基因编码的 HilD 在体外环境下,能对 SPI-1 的基因表达起调控作用,并且可以与位于 SPI-2 上的 *ssrAB* 启动子区域结合,诱导 SPI-2 上基因的表达,实现调控沙门氏菌 SPI-1 和 SPI-2 的作用^[3-4]。然而,有关在体内环境中 HilD 对 *ssrAB* 表达调控的研究尚未见报道。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)因具有无细胞毒性、荧光性质稳定、分子量小、操作简单等特点,作为分子标记被广泛用于研究特定的环境下生物体的基因表达和蛋白定位监控等^[5-6]。本试验以鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)为研究对象,秀丽隐杆线虫为模式生物,通过同源重组技术将编码绿色荧光蛋白的基因(*gfp*)插入 pMD19-*ssrAB* 质粒中构建 pMD19-*ssrAB-gfp* 重组质粒,再转入 pWM91 自杀质粒中构建 pWM91-*ssrAB-gfp* 重组自杀质粒,最终分别转入鼠伤寒沙门氏菌亲本株空质粒菌 *S. Typhi*(*pcDNA3.1*)、*hilD* 基因回补株 *S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1-hilD*)和 *hilD* 基因缺失株空质粒菌 *S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1*)中,经含有 100 g/mL 链霉素-氨苄青霉素的双抗 LB 琼脂培养基上筛选鉴定后,获得能够稳定表达 GFP 的标记菌株。将构建的带有 GFP 分子的标记菌株饲喂秀丽隐杆线虫,利用荧光显微镜观察在线虫体内标记菌株 GFP 表达和绿色荧光强度及其在线虫体内定殖和分布情况,初步探究体内环境下 HilD 与 *ssrAB* 表达之间的相互关系,为深入探究沙门氏菌 HilD 介导 *ssrAB* 表达调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和模式生物

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S. Typhi*)标准株 CM-CC50115 购自广东省微生物研究所菌种保藏中心;亲本株空质粒菌 *S. Typhi*(*pcDNA3.1*)、*hilD* 基因回补株 *S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1-hilD*)及 *hilD* 基因缺失株空质粒菌 *S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1*)、pMD19-*ssrAB* 重组质粒均由安徽农

业大学动物传染病实验室构建和保存;pEGFP 质粒及 pWM91 自杀质粒购自 TAKARA 公司;大肠杆菌 OP50(*E.coli* OP50)及秀丽隐杆线虫由安徽农业大学李琳博士馈赠。

1.2 主要试剂和仪器

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN 公司),M9 培养基(上海羽朵生物科技有限公司),S. Medium 培养基(北京普博斯生物科技有限公司),NGM 琼脂平板(英国 OXIOD 公司),聚乙二醇辛基苯基醚 Triton-X100(上海生工生物工程股份有限公司),*Bam*H I、*Hpa*I、*Not*I、*Xho*I、T4 DNA 连接酶均购自于 TAKARA 生物科技有限公司。荧光显微镜(日本 TOKYO 公司),Eon 全自动酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

1.3 GFP 标记菌株的构建与表达

1.3.1 GFP 标记菌株的构建与鉴定

根据 *gfp* 基因序列(Gene ID:DQ399411.1)设计 1 对引物,酶切位点分别是 *Bam*H I 和 *Hpa*I(下划线标出),上游引物:5'-ATAGGGATCCCATGGTGAGCAAGGGCGA-GGA-3';下游引物:5'-GCGGTTAACTTACTTG-TACAGCTCGTCCA-3',由南京金斯瑞生物公司合成。以 pEGFP 为模板,PCR 扩增得到约 700 bp *gfp* 片段。参考文献[7-9],用 *Bam*H I 和 *Hpa*I 分别双酶切 *gfp* 片段和 pMD19-*ssrAB* 载体质粒,按 1:4 摩尔比混合,T4 DNA 连接酶 16 ℃连接 12 h。连接产物 pMD19-*ssrAB-gfp* 和自杀质粒 pWM91 分别用 *Not*I 和 *Xho*I 双酶切,将 *ssrAB-gfp* 片段插入 pWM91 自杀质粒中,提取质粒 DNA,PCR 鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pWM91-*ssrAB-gfp*。采用固相滤膜杂交法,分别将宿主菌 *S. Typhi*(*pcDNA3.1*)、*S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1-hilD*)和 *S. Typhi*(Δ *hilD*+*pcDNA3.1*)与 pWM91-*ssrAB-gfp* 进行固相结合,涂布于 100 g/mL 链霉素-氨苄青霉素双抗 LB 平板,挑取单克隆,经菌液 PCR 和双酶切初步鉴定后,送南京金斯瑞生物公司测序验证。

1.3.2 GFP 标记菌株的表达

将 *S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)、*S. Typhi*(Δ *hilD*+*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)、*S. Typhi*(Δ *hilD*+*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)3 株标记菌分别接种 5 mL 含 0.04% 组氨酸的 M9 培养基,培养至菌液浑浊,置 4 ℃冰箱 3 d。分别将诱导表达的标记菌离心后取沉淀,PBS 洗涤 3 次,取 10 μL 涂于载玻片,石蜡封片,经荧光显微镜观察,同时以未转入 pWM91-*ssrAB-gfp* 质粒的 *S. Typhi*(*pcDNA3.1*)为对照,确认 GFP 表达与否。

1.4 标记菌株在秀丽隐杆线虫体内的定殖观察

1.4.1 线虫同期化培养 参考文献[10-11], 将含秀丽隐杆线虫虫卵的 S. Medium 培养基置 20 ℃ 培养 10 h, 1 500 r/min 离心 3 min, 收集幼虫, 转至含 *E. coli* OP50 的 NGM 平板, 继续培养 48~60 h 获 L4 期幼虫。PBS 洗下平板上线虫, 洗涤 3 次收集幼虫, 分装于含 2 mL S. Medium 培养基的 12 孔板里(每孔大约 15~20 只虫体), 静止培养过夜。

1.4.2 标记菌株前处理 将 3 株标记菌分别接种 5 mL LB 液体培养基, 培养过夜, 以 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*) 为对照组。分别取培养的标记菌离心后收集沉淀, 用 S. Medium 培养基洗涤 2 次并重悬菌体, 测定标记菌株 OD₆₀₀, 调至所需浓度, 备用。

1.4.3 标记菌株饲喂线虫 将同期化线虫分别涂于含 3 株标记菌的 NGM 平板, 以 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*) 为对照组, 20 ℃ 孵育 10 h。

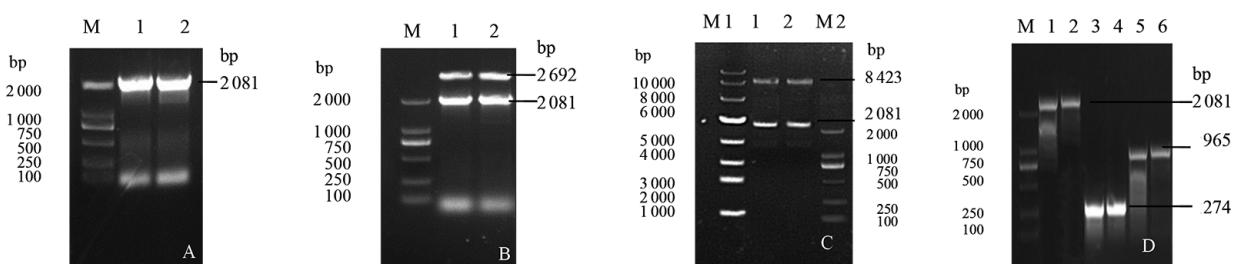
1.4.4 线虫体内 GFP 的显微观察 用 PBS 洗下 NGM 平板上线虫, 清洗 3 次, 分别放入含有 1% Triton-X100 的 M9 培养基, 15 ℃ 培养 2 h。PBS 洗涤 3 次收集菌体, 取 5% 琼脂溶解后滴加于载玻片, 立刻轻轻用盖玻片压平, 形成约 0.4 mm 厚的琼脂圈, 待琼脂冷却后, 移去盖玻片, 滴加 20 μL 10 mmol/L 的 NaN₃ 于凝固的琼脂圈上, 取线虫置琼脂圈的表面, 待线虫定型后盖上玻片, 荧光显微镜下观察标记菌在线虫口咽部和肠道内的分布情况。

1.4.5 统计学分析 利用 ImageJ 软件对拍摄的荧

光图片半定量分析, 并采用 Prism 软件作图。本研究统计分析均采用 SPSS 19.0 软件分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 GFP 标记菌株的构建 将 *gfp* 基因克隆于 pMD19-ssrAB 重组质粒载体上, PCR 鉴定, 由图 1-A 可知, 扩增片段大小为 2 081 bp(*ssrAB-gfp*), 与预期结果一致; 提取阳性重组质粒 pMD19-ssrAB-*gfp* 双酶切鉴定, 由图 1-B 及测序结果可知, 双酶切片段大小分别为 2 081 bp(*ssrAB-gfp*)、2 692 bp(pMD19), 与预期结果一致; 将 *ssrAB-gfp* 基因克隆于 pWM91 自杀质粒载体上, 提取阳性重组质粒 pWM91-ssrAB-*gfp* 双酶切鉴定, 由图 1-C 及测序结果可知, 双酶切片段大小分别为 2 081 bp(*ssrAB-gfp*)、8 423 bp(pWM91), 与预期结果一致; 通过固相结合方法, 将 *ssrAB-gfp* 分别转化到 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*)、*S. Typhi* (*ΔhilD + pcDNA3.1-hilD*) 和 *S. Typhi* (*ΔhilD + pcDNA3.1*) 中, 由图 1-D 及测序结果可知, 扩增片段大小 2 081 bp(*ssrAB-gfp*)、274 bp(*pcDNA3.1*)、965 bp(*pcDNA3.1-hilD*), 与预期结果一致。成功构建了 3 株标记菌 *S. Typhi* (*ssrAB-gfp + pcDNA3.1*)、*S. Typhi* (*ΔhilD + ssrAB-gfp + pcDNA3.1-hilD*)、*S. Typhi* (*ΔhilD + ssrAB-gfp + pcDNA3.1*)。



A: M: DNA Marker DL2000; 1-2: *ssrAB-gfp* 基因 PCR 扩增产物; B: M: DNA Marker DL2000; 1-2: pMD19-*ssrAB-gfp* 双酶切鉴定; C: M1: DNA Marker DL10000; M2: DNA Marker DL2000; 1-2: pWM91-*ssrAB-gfp* 双酶切鉴定; D: M: DNA Marker DL2000; 1-2: *ssrAB-gfp* 基因 PCR 扩增产物; 3-4: *pcDNA3.1* PCR 扩增产物; 5-6: *pcDNA3.1-hilD* PCR 扩增产物;

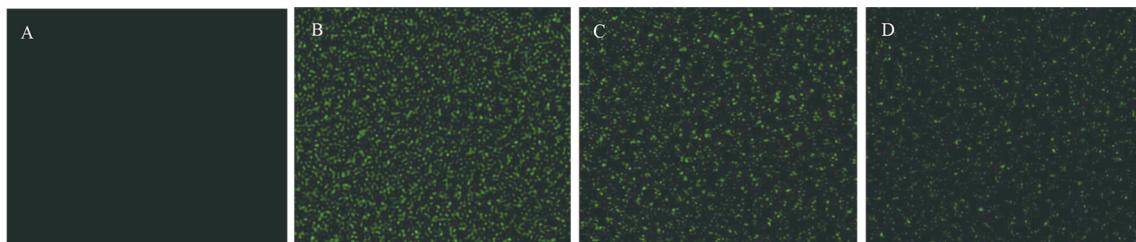
图 1 PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定

Fig.1 Amplification of PCR and the enzymes digestion of the recombinant plasmids

2.2 标记菌株 GFP 的荧光观察 以未插入 *gfp* 基因的 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*) 为对照, 利用荧光显微镜观察 3 株标记菌中 GFP 的表达情况。对照组 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*) 未见绿色荧光(图 2-A), 而 3 株标记菌均可见绿色荧光(图 2-B、图 2-C、图 2-D), 显示标记菌已成功表达了外源 GFP, 且荧光强度存

在明显差异。由图 2-E 可知, *S. Typhi* (*ssrAB-gfp + pcDNA3.1*) 的荧光强度显著高于 *S. Typhi* (*ΔhilD + ssrAB-gfp + pcDNA3.1-hilD*) ($t = 3.513, P < 0.05$) 和 *S. Typhi* (*ΔhilD + ssrAB-gfp + pcDNA3.1*) ($t = 6.722, P < 0.05$), 且 *S. Typhi* (*ΔhilD + ssrAB-gfp + pcDNA3.1-hilD*) 荧光强度

高于 *S. Typhi* ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) ($t = 3.980, P < 0.05$)。



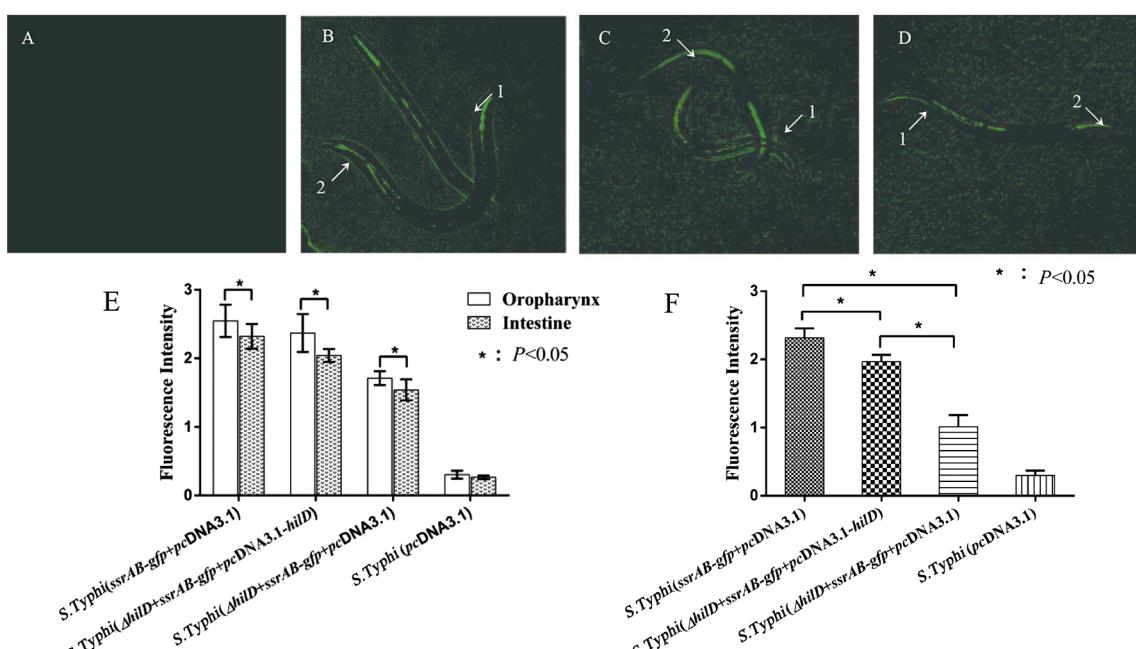
A: 荧光显微镜下 *S. typhi* (*pcDNA3.1*) 的表达;B: 荧光显微镜下 *S. typhi* (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 的表达;C: 荧光显微镜下 *S. typhi* ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) 的表达;D: 荧光显微镜下 *S. typhi* ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 的表达

图 2 GFP 在标记菌株中的表达差异

Fig.2 Differences of expression of GFP in tagged strains

2.3 标记菌株在秀丽隐杆线虫体内的定殖显微观察 将 3 株标记菌和对照菌 *S. Typhi* (*pcDNA3.1*) 饲喂感染线虫,利用荧光显微镜观察 GFP 在线虫体内的表达及分布情况。由图 3-A 可知,对照组未见绿色荧光,但 3 株标记菌在线虫体内可见分布不均的绿色荧光,主要分布在口咽部和肠道内(图 3-B、图 3-C、图 3-D),且荧光强度均为口咽部较肠道的高($t_A = 2.796; t_B = 2.785; t_C = 0.099, P < 0.05$,)(图 3-E),显示标记菌可在线虫体内定殖并成功表达 GFP。通过 ImageJ 软件比较绿色荧光强度,由图 3-F 可以看出,3 株标记菌的荧光强度由强到弱依次

为 $S. Typhi$ (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) $>$ $S. Typhi$ ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) $>$ $S. Typhi$ ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*)。其中, $S. Typhi$ ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 荧光强度显著低于 $S. Typhi$ (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) ($t = 10.370, P < 0.05$) 和 $S. Typhi$ ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) ($t = 8.477, P < 0.05$),且 $S. Typhi$ (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 与 $S. Typhi$ ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) 之间荧光强度差异有统计学意义 ($t = 3.554, P < 0.05$)。



1: 口咽部;2: 肠道

A: 线虫体内 *S. typhi* (*pcDNA3.1*) 的表达;B: 线虫体内 *S. typhi* (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 的表达;C: 线虫体内 *S. typhi* ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) 的表达;D: 线虫体内 *S. typhi* ($\Delta hild$ + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 的表达;E: 标记菌在线虫体内分布情况;F: 标记菌在线虫体内荧光强度对比

图 3 标记菌株在线虫体内定殖情况

Fig.3 Colonization of tagged strains *in vivo* of *Caenorhabditis elegans*

2.4 标记菌株在线虫体内外环境下荧光强度比较
通过ImageJ软件比较3株标记菌和对照菌的绿色荧光强度,由图4可知,在线虫体内和体外环境下,*S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)与*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)之间荧光强度无明显差异($t_A=0.595$; $t_B=0.719$; $P>0.05$),而*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)在体内的荧光强度明显弱于体外($t=7.091$, $P<0.05$)。

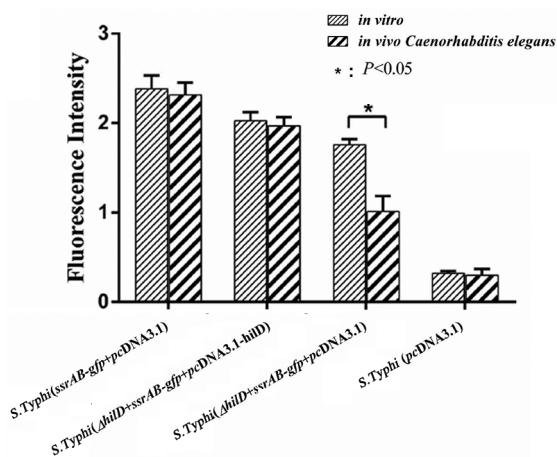


图4 3株标记菌在线虫体内与体外的荧光强度比较

Fig.4 Comparison of the fluorescence intensity of three tagged strains *in vivo* and *in vitro* of *Caenorhabditis elegans*

3 讨 论

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)属于沙门氏菌属B群,是一群宿主非特异性肠道致病菌,具有广泛的宿主谱和致病性,能致各种动物及人的副伤寒,常引起人类食物中毒和其他疾病。近年来,该菌是世界各国分离率最高的沙门氏菌菌型之一^[12-13],在医学、兽医学和公共卫生方面的重要性均十分显著。

目前,关于沙门氏菌毒力岛调控的研究已经成为探究该菌致病机理的重要方面。SPI-1和SPI-2是感染、侵袭、定殖于宿主的关键因子^[14-17]。位于SPI-1上的调节子HilD不仅能调控SPI-1上基因表达,而且HilD可通过结合于SPI-2上ssrAB二元调控系统调节SPI-2上基因的表达。Martínez和Bustamante等研究发现体外环境下HilD调控SPI-2的机制与SPI-2上ssrAB基因启动子有关,HilD可结合到ssrAB的启动子上,招募OmpR蛋白,通过蛋白相互作用,将阻遏蛋白HS-N从ssrAB基因启动子上替换下来,使SPI-2上其他毒力基因得到表达。体外环境下HilD能够介导ssrAB的表

达^[4,18],但迄今尚未有文献报道体内环境中HilD对ssrAB表达的调控作用。

秀丽隐杆线虫因体小、通体透明、生长周期短、基因组信息明确、实验室条件下易于培养及观察等优势,而作为经典的模式生物^[19]。1994年Chalfie等首次报道以秀丽隐杆线虫为模型,通过观察原核细胞或真核细胞中GFP的发光强弱,研究单个细胞基因表达和蛋白定位^[20]。现已报道感染线虫的致病菌有沙门氏菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌等,其中鼠伤寒沙门氏菌是细菌中已发现的唯一感染秀丽隐杆线虫的胞内菌^[21-22]。

本试验首先成功构建携带gfp基因的3株标记菌*S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)、*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)和*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*),以未携带gfp基因的*S. Typhi*(*pcDNA3.1*)菌株为对照,通过荧光显微镜观察到3株标记菌均呈现绿色荧光,对照菌则无荧光,表明外源GFP在标记菌中得到表达。继而重要的是将上述3株标记菌和对照菌饲喂感染秀丽隐杆线虫后,以荧光显微镜仍可直接观察到3株标记菌的绿色荧光,而对照菌无荧光,表明携带gfp基因的标记菌在线虫体内也获得了GFP的表达。ImageJ软件半定量测定的结果显示,标记菌的绿色荧光强度存在差异。在体外环境下,虽然*S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)的荧光显著强于*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)($P<0.05$),这可能由于*hilD*基因缺失株回复时转入了*hilD*基因过表达质粒,使HilD表达量下降,进而引起ssrAB表达水平低^[23-24];但*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)与*S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)和*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)之间的差异有统计学意义。在秀丽隐杆线虫体内呈现了同样情况,*S. Typhi*(*ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)的荧光显著强于*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)($P<0.05$)及*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)($P<0.05$),且*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1*)与*S. Typhi*(*ΔhilD+ssrAB-gfp*+*pcDNA3.1-hilD*)之间的差异有统计学意义。不仅证实了体外环境下鼠伤寒沙门氏菌HilD正调控ssrAB,也表明了体内环境中HilD对ssrAB的调控具有相同作用。然而HilD并非单一介导ssrAB的表达调控,尚存在其他调控因子的参与。有研究表明,体外环境下ssrAB的表达既受HilD的调控,又能够通过EnvZ/OmpR、PhoP/Q双

组份系统以及转录调控因子 SlyA 等参与调控^[25-28]。由此推断在体内环境中, Hild 介导 *ssrAB* 表达的调控机制可能与体外环境下的相似。

比较标记菌株在秀丽隐杆线虫体内外的绿色荧光强度, *S. Typhi* (*ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 与 *S. Typhi* (*Δhild* + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1-hild*) 之间无明显差异, 但 *S. Typhi* (*Δhild* + *ssrAB-gfp* + *pcDNA3.1*) 在线虫体内的荧光强度明显弱于体外, 其原因可能是: ①标记菌株 *gfp-ssrAB* 在线虫体内的表达量较低; ②在不同生长条件下, 沙门氏菌的 Hild 表达水平存在显著差异, 从而导致 *ssrAB* 表达量的变化^[29-30]; ③Hild 与宿主间的相互作用也可能影响其对 *ssrAB* 表达的调控, López-Garrido 证实 *hild* 基因的 mRNA 的 3' 端未翻译区存在一些符合真核生物的特征序列, 预测宿主体内的某些基因可能影响了 *hild* 对 *ssrAB* 表达的调控^[31]。此外, 本试验结果显示, 3 株标记菌在线虫体内分布不均, 主要定殖在口咽部和肠道中, 且其荧光强度为口咽部较肠道高, 这可能与线虫口咽部和肠道的结构及其分泌的效应因子有关。Sulston^[32] 发现线虫的口咽部是由 20 个肌肉细胞、20 个神经细胞和 18 个上皮细胞形成的 3 条辐射状结构, 肠道则是由 20 个上皮细胞组成的简单线性结构, 口咽部黏膜面积大于肠道黏膜面积, 有利于标记菌在该处定殖。Bereman^[33] 研究表明线虫表达的抗菌肽 ABF 在口咽部和肠道中均能发挥抑菌活性, 同时肠道分泌的 3 种溶菌酶 lys-1、lys-7、lys-8 也具有杀菌作用, 能够有效抑制标记菌在其内定殖。由此也可初步推断出鼠伤寒沙门氏菌对秀丽隐杆线虫的侵染路线。

本试验成功在鼠伤寒沙门氏菌中稳定表达了 *gfp* 基因, 利用秀丽隐杆线虫作为模式生物, 使 GFP 在其口咽部和肠道的黏膜表面得到表达, 首次进行了体内环境中 Hild 介导 *ssrAB* 表达的初探, 为进一步开展 Hild 与 *ssrAB* 基因结合位点的确立, 深入探究沙门氏菌 Hild 介导 *ssrAB* 表达调控奠定基础。

参考文献:

- [1] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0033220
- [2] Espinoza RA, Silva-Valenzuela CA, Amaya FA, et al. Differential roles for *Pathogenicity Islands* SPI-13 and SPI-8 in the interaction of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi* with murine and human macrophages[J]. Biol Res, 2017, 50(1): 5.
- [3] Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through *hild*[J]. Mol Microbiol, 2011, 80(6): 1637-1656. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x
- [4] Martínez LC, Banda MM, Fernández-Mora M, et al. Hild induces expression of *Salmonella Pathogenicity Island 2* genes by Displacing the Global Negative Regulator H-NS from *ssrAB*[J]. J Bacteriol, 2014, 196(21): 3746-3755. DOI: 10.1128/JB.01799-14
- [5] Neveu B, Labbé C, Bélanger RR. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(2): 275-281. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.08.012
- [6] Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, et al. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions[J]. Gene, 1996, 173(1): 47-52. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00706-7
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M].3 版.北京: 科学技术出版社, 2002: 32-35.
- [8] Ottemann KM, DiRita VJ, Mekalanos JJ. ToxR proteins with substitutions in residues conserved with OmpR fail to activate transcription from the cholera toxin promoter[J]. J Bacteriol, 1992, 174(21): 6807-6814. DOI: 10.1128/jb.174.21.6807-6814.1992
- [9] Yang M, Giel JL, Cai T, et al. The LuxR family quorum-sensing activator MrtR requires its cognate autoinducer for dimerization and activation but not for protein folding[J]. J Bacteriol, 2009, 191(1): 434-438. DOI: 10.1128/JB.01247-08
- [10] Wang C, Wang J, Gong J, et al. Use of *Caenorhabditis elegans* for preselecting *Lactobacillus* isolates to control *Salmonella typhimurium*[J]. J Food Prot, 2011, 74(1): 86-93. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-155
- [11] Voisine C, Varma H, Walker N, et al. Identification of potential therapeutic drugs for Huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e504. DOI: 10.1371/journal.pone.0000504
- [12] Barco L, Longo A, Lettini AA, et al. Molecular characterization of "inconsistent" variants of *Salmonella typhimurium* isolated in Italy[J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(6): 497-499. DOI: 10.1089/fpd.2013.1714
- [13] 耿士忠, 潘志明, 方强, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 X4550 FlhD 基因缺失株的构建[J]. 中国兽医学报, 2010, 40(1): 1-6. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2010.01.007
- [14] Fabrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 308-341. DOI: 10.1128/CMR.00066-12
- [15] Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella Pathogenicity Islands* encoding type III secretion systems[J]. Microbes Infect, 2001, 3(37): 549-559.

DOI: 10.1186/s40659-017-0109-8

- [16] Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1):53-66. DOI: 10.1038/nrmicro1788
- [17] Moest TP, Meresse S. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secretion agents[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(1): 38-44. DOI: 10.1016/j.mib.2012.11.006
- [18] Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, et al. Hld-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(38): 14591-14596. DOI: 10.1073/pnas.0801205105
- [19] Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM enhances gram-positive immune responses[J]. Infect Immun, 2012, 80(7): 2500-2508. DOI: 10.1128/IAI.06350-11
- [20] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263(5148): 802-805. DOI: 10.1016/S1286-4579(01)01411-3
- [21] Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, et al. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*[J]. Current Biology, 2000, 10(23): 1543-1545. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00833-2
- [22] Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(19): 10892-10897. DOI: 10.1073/pnas.191378698
- [23] 黄维, 钟辉, 曹诚. 染色体-质粒平衡致死系统的构建及应用[J]. 生物技术通讯, 2002, 5(13): 378-382. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2002.05.018
- [24] 孙建和, 严亚贤, 陆承平. 大肠杆菌 *vpr* 基因突变株的蛋白表达及功能研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 176-180. DOI: 10.3321/j.issn:0578-1752.2006.01.025
- [25] Fass E, Groisman EA. Control of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 gene expression [J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(2): 199-204. DOI: 10.1016/j.mib.2009.01.004
- [26] Bijlsma JJ, Groisman EA. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(1): 85-96. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04668.x
- [27] Xu X, Michael H. Systematic analysis of the SsrAB virulon of *Salmonella enterica* [J]. Infect Immun, 2010, 78(1): 49-58. DOI: 10.1128/IAI.00931-09
- [28] Okada N, Oi Y, Takeda-Shitaka M, et al. Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation[J]. Microbiology, 2007, 153(2): 548-560. DOI: 10.1099/mic.0.29259-0
- [29] Kroger C, Colgan A, Srikumar S, et al. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(6): 683-695. DOI: 10.1016/j.chom.2013.11.010
- [30] 刘子健, 陈韵, 李扬, 等. 肠炎沙门菌调控基因 *hild* 与 *hilA* 的体外表达规律研究[J]. 扬州大学学报, 2016, 37(4): 5-8. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2016.04.002
- [31] López-Garrido J, Puerta-Fenández E, Casadesús J. A eukaryotic-like 3' untranslated region in *Salmonella enterica* *hild* mRNA[J]. Nucleic Acid Res, 2014, 42(9): 5894-5906. DOI: 10.1093/nar/gku222
- [32] Sulston J, Hodgkin J. Methods in the nematode *Caenorhabditis elegans*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988: 587-606.
- [33] Berman JR, Kenyon C. Germ-cell loss extends *C.elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri21 and lipophilic-hormone signaling[J]. Cell, 2006, 124(5): 1055-1068. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.039

收稿日期:2018-01-10 编辑:张智芳

(上接第 1101 页)

- [16] Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(3): 349-358. DOI: 10.1099/jmm.0.025056-0
- [17] Han Y, Wang L, Cui J, et al. SIRT1 inhibits EV71 genome replication and RNA translation by interfering viral polymerase and 5' UTR RNA[J]. J Cell Sci, 2016, 129(24): 4534-4547. DOI: 10.1242/jcs.193698
- [18] Li W, Yi L, Su J, et al. Seroepidemiology of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 among children in Guangdong province, China[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1): 322-329. DOI: 10.1186/1471-2334-13-322
- [19] Lin K, Hwang K, Ke G, et al. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: An emerging of subgenogroup C4 of EV71[J]. J Med Virol, 2006, 78(2): 254-262. DOI: 10.1002/jmv.20534
- [20] Chan YF, Sam IC, Abubakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences[J]. Infect Gen Evol, 2010, 10(3): 404-412. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.010
- [21] Wang X, Zhu C, Bao W, et al. Characterization of full-length enterovirus 71 strains from severe and mild disease patients in northeastern China[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32405-e32413. DOI: 10.1371/journal.pone.0032405
- [22] Yi E J, Shin Y J, Kim J H, et al. Enterovirus 71 infection and vaccines[J]. Clin Exp Vaccine Res, 2017, 6(1): 4-14. DOI: 10.7774/cevr.2017.6.1.4
- [23] Yee PT, Poh CL. Development of novel vaccines against enterovirus-71[J]. Viruses, 2015, 8(1): 1-13. DOI: 10.3390/v8010001

收稿日期:2017-12-08 编辑:李友松