

# 变异链球菌 *clpP* 基因启动子的克隆及活性测定

张加勤<sup>1·2</sup>,侯香华<sup>3</sup>,张世阳<sup>2</sup>,郑港森<sup>1</sup>,马晓波<sup>1</sup>,赵元勋<sup>1</sup>,黄朝阳<sup>1</sup>,洪国彝<sup>1</sup>

**摘要:**目的 克隆变异链球菌 *clpP* 基因启动子,并进行初步验证。方法 PCR 分别扩增变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS,插入 β-半乳糖苷酶 ( $\beta$ -glucuronidase, *gusA*) 报道基因表达载体 pIB107 *Bam*HI/*Xho*I 酶切位点之间,构建 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达载体 pFclpP 和 pFclpP-ΔRS,PCR、酶切及测序鉴定;经 *Bgl* II 线性化后转化变异链球菌 UA159,卡那霉素筛选阳性克隆,得到 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达株 SClpP 和 SClpP-ΔRS,经 PCR 及测序鉴定后,测定 SClpP、SClpP-ΔRS、阳性对照 SAmi 和阴性对照 SIB107 的 GusA 活力。结果 成功扩增出变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体;变异链球菌 *clpP* 基因 *gusA* 报道基因表达载体经 PCR、酶切及测序鉴定正确无误;PCR 及测序结果表明成功构建 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体变异链球菌 *gusA* 报道基因表达株 SClpP 和 SClpP-ΔRS;GusA 活性测定证实变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达株 SClpP 和 SClpP-ΔRS 的 GusA 活性分别是阴性对照 pIB107 的 34.6 和 8.7 倍,是阳性对照松鼠葡萄球菌 *ami* 基因启动子片段 *gusA* 报道基因表达株活性的 5.2 和 1.3 倍,提示插入片段 FclpP 和 FclpP-ΔRS 具有较强的启动子活性。**结论** 成功定位并克隆变异链球菌 *clpP* 基因启动子,为今后研究 *clpP* 基因上游调控序列提供试验和理论依据。

**关键词:**变异链球菌;*clpP*;启动子

中图分类号:R378.7

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)12-1126-05

## Cloning of *Streptococcus mutans* *clpP* promoter and evaluation of its activity

ZHANG Jia-qin<sup>1·2</sup>, HOU Xiang-hua<sup>3</sup>, ZHANG Shi-yang<sup>2</sup>, ZHENG Gang-Sen<sup>1</sup>, MA Xiao-bo<sup>1</sup>, ZHAO Yuan-xun<sup>1</sup>, HUANG Chao-yang<sup>1</sup>, HONG Guo-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

2. Nosocomial Infection Control Center of Xiamen, Xiamen 361003, China;

3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

**Abstract:** We cloned the promoter of *Streptococcus mutans* *clpP* gene and evaluate its promoting activity. The 5'-terminal flanking sequence of *Streptococcus mutans* *clpP* gene and its shortened mutant were amplified from *Streptococcus mutans* UA159 chromosome DNA by PCR, and inserted into pIB107 via *Bam*HI/*Xho*I to construct  $\beta$ -glucuronidase report plasmids. Then, the plasmids were transformed into *S. mutans* UA159 after being linearized by *Bgl*II, and screened with THY agar contain 300 g/mL kanamycin to construct the  $\beta$ -glucuronidase report strains. The homologous recombination strains were verified by PCR and sequencing, and used for GusA assay. Results showed that the 5'-flanking sequence of *Streptococcus mutans* *clpP* gene and its shortened mutant were proved to be correct by sequencing. The  $\beta$ -glucuronidase report plasmids and strains of flanking sequence of *clpP* gene and its shortened mutant were verified by PCR and sequencing. The results of GusA assays showed that the activities of 5'-flanking sequence of *Streptococcus mutans* *clpP* gene and its shortened mutant were 34.6 and 8.7 times of that of the negative control pIB107, 5.2 and 1.3 times of that of the positive control, the promoter fragment of the *Staphylococcus sciuri ami* gene. The promoter region of *Streptococcus mutans* *clpP* gene was located and cloned successfully. Our results provide evidence to investigate the regulation mechanism of *clpP* gene.

福建省自然科学基金(No. 2015J01553)和福建省卫生计生委青年骨干人才培养项目(No. 2017-ZQN-84)联合资助

通讯作者:洪国彝,Email: 18860089899@139.com;

作者单位:1.厦门大学附属第一医院检验科,厦门 361003;

2.厦门市医院感染管理中心,厦门 361003;

3.厦门大学附属第一医院肾内科,厦门 361003

**Keywords:** *Streptococcus mutans*; *clpP*; promoter

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2015J01553) and the Excellent Youths Training Program of Fujian Provincial Health and Family Planning

Commission (No. 2017-ZQN-84)

Corresponding author: Hong Guo-lin, Email: 18860089899@139.com

变异链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 是草绿色链球菌的一种,革兰氏阳性球菌,兼性厌氧,是人类龋病的主要致病菌,可引起牙髓病、牙周病、颌骨炎,感染性心内膜炎等一系列并发症,严重影响患者的身心健康和生活质量<sup>[1-3]</sup>。变异链球菌在人类口腔中生存的酸碱度、温度、氧分压、渗透压等环境极易受到人类日常活动的影响,可在口腔中长期存活并不断繁殖,变异链球菌通过改变其蛋白质的表达状态(包括蛋白质的种类和表达的量),以消除外界变化对菌体造成的影响<sup>[3]</sup>。然而,正是这种对环境改变的应对机制使得菌体内一些小分子蛋白质迅速聚集,多为瞬时表达和受应激因素刺激而发生损伤的蛋白质分子,这些蛋白质大多不但不能行驶应有的生物学功能,如不及时清除还会对细菌造成致命的损伤<sup>[4-6]</sup>。因此,及时清除迅速聚集的小分子蛋白质和维持细菌内环境的稳态(homeostasis)成为变异链球菌生存并成为龋损部位的优势菌以及致病的关键环节。我们前期研究证实变异链球菌 ClpP 蛋白酶在清除应激相关蛋白质和损伤的蛋白质、维持内环境稳态中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。然而变异链球菌 *clpP* 基因在对外应激耐受中以何种方式被诱导及其表达调控机制的报道尚不多见,为此本文通过构建变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -glucuronidase, *gusA*) 报道基因表达载体及其表达株,以研究变异链球菌 *clpP* 基因启动子生物活性及其结构,为阐明变异链球菌 *clpP* 基因表达调控的机制奠定理论和实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒 大肠杆菌 Top 10、变异链球菌

UA159 为本室保存。pIB107 质粒由堪萨斯大学医学中心的 Indrainl Biswas 教授惠赠,含有松鼠葡萄球菌 *ami* 基因启动子的 *gusA* 报道基因表达载体 pFami132 由本室构建保存。

**1.1.2 试剂** 细菌基因组提取试剂盒及小量质粒提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品,DNA marker、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶均为 TaKaRa (大连)公司产品;QIAquick PCR Purification Kit 为 Qiagen 公司产品;p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (PNPG) 为 Sigma 公司产品;余为国产或进口分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 变异链球菌 UA159 基因组 DNA 的提取** 离心收集处于对数生长期的变异链球菌 UA159,灭菌 0.1 mol/L PBS(pH7.4)洗涤 3 次,按照细菌基因提取试剂盒说明书提取变异链球菌 UA159 的基因组 DNA。

**1.2.2 序列片段扩增** 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP- $\Delta$ RS 的扩增 在 0.2 mL PCR 反应管中建立如下反应体系:10 × PCR Buffer 5  $\mu$ L,dNTPs(10 mmol/L)1  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)4  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 变异链球菌 UA159 基因组 DNA 50 ng,上、下游引物各 10 nmol,加灭菌水至 50  $\mu$ L;反应条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 45 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列片段(FclpP)及其突变体片段(FclpP- $\Delta$ RS)扩增、后续 PCR 鉴定和测序所用的引物见表 1。

表 1 实验采用的引物序列及用途  
Tab.1 Primers used in this study and purposes

Primer	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Purpose <sup>b</sup>
Bam HI- <i>clpP</i> -F1	<u>GCGGATCC</u> ATCGCTTGGCACAA	FclpP amplification
Bam HI- <i>clpP</i> -F2	<u>GCGGATCC</u> ACGAGGTTAACGTCTGATAAATT	FclpP- $\Delta$ RS amplification
Xho I- <i>clpP</i> -R1	GT <u>GCTCGA</u> GTTCAATAACTACAGGAATCAT	FclpP and FclpP- $\Delta$ RS amplification
Smul405-F	GTATGATA <u>GTATCCTTTATCAGGG</u>	Strain identification
Gus-R2	CGATCC <u>AGACTGAATGCC</u>	Plasmids identification

<sup>a</sup> Restriction sites used to facilitate ligation are underlined and italic.

<sup>b</sup> RS, repeat sequence.

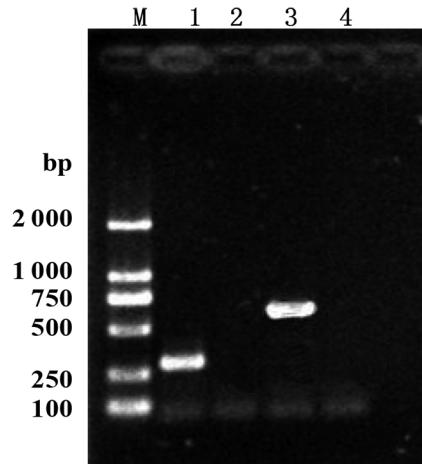
**1.2.3 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达载体的构建与鉴定** 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 PCR 扩增产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后, 限制性内切酶 *Bam* HI/*Xho* I 酶切, 与经 *Bam* HI/*Xho* I 酶切的 *gusA* 报道基因表达载体 pIB107 连接, 转化 *E. coli* Top 10, 氨苄西林 (100 g/mL) 和卡那霉素 (50 g/mL) 筛选, PCR 及酶切鉴定阳性克隆, 构建 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 *gusA* 报道基因表达载体, 分别命名为 pFclpP 和 pFclpP-ΔRS, 并交由上海立菲生物工程有限公司测序。PCR 及测序所用引物为 Smu1405-F\Gus-R2, 详见表 1。

**1.2.4 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达株的构建及 GusA 活性测定** 将含有 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 *gusA* 报道基因表达载体 pFclpP 和 pFclpP-ΔRS、含有松鼠葡萄球菌 *ami* 基因启动子的阳性对照质粒 pFami132 及不含启动子的 *gusA* 报道基因表达载体 pIB107 经 *Bgl* II 线性化后, 分别转化变异链球菌 UA159, 卡那霉素 (300 g/mL) 筛选, 构建各待测片段 *gusA* 报道基因表达株, 分别命名为 SClpP、SClpP-ΔRS、SAmi (阳性对照) 和 SIB107 (阴性对照), 经 PCR 及测序验证后, 参照文献[6] 测定各待测片段 *gusA* 报道基因表达株的 GusA 活性, 鉴定变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 启动子活性。PCR 及测序所用引物分别为 *Bam* HI-*clpP*-F1\Gus-R2 和 *Bam* HI-*clpP*-F2\Gus-R2, 序列见表 1。

## 2 结 果

**2.1 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其截短突变体 FclpP-ΔRS 的体外扩增** 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示: 分别在 621 bp 及 271 bp 处有特异性明亮扩增带, 相对分子量大小与预期结果一致, 且未见非特异扩增带, 详见图 1。

**2.2 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达载体的构建与鉴定** 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 经 *Bam* HI/*Xho* I 酶切, 插入到的 pIB107 载体, 得到 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 *gusA* 报告基因表达载体 pFclpP 和 pFclpP-ΔRS。提取质粒, 行 PCR 及酶切



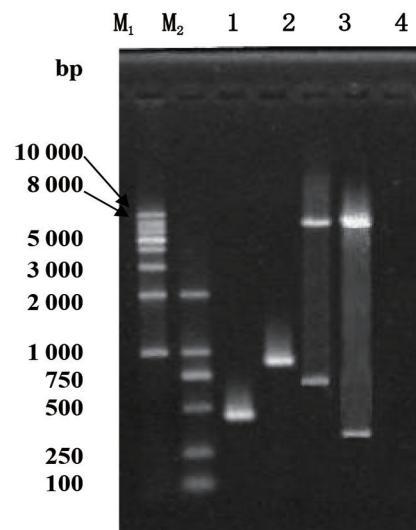
M: DNA Marker 2000

1: 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列截短突变体 (FclpP-ΔRS) PCR 扩增结果; 2: 阴性对照; 3: 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 (FclpP) PCR 扩增结果; 4: 阴性对照

图 1 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其截短突变体的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis of 5'-flanking sequence and its shortened mutants of *S. mutans* *clpP* gene amplified by PCR

鉴定, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示插入片段和载体片段相对分子量大小正确。测序结果进一步证明成功构建了变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP-ΔRS 的 *gusA* 报道基因表达载体, 详见图 2。



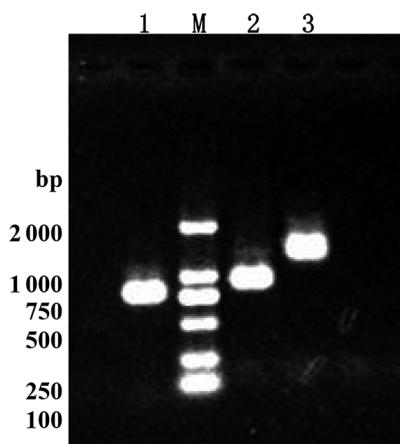
M1: DNA Marker 1kb Ladder; M2: DNA Marker 2000

1: pFclpP-ΔRS 质粒 PCR 鉴定; 2: pFclpP 质粒 PCR 鉴定; 3: pFclpP 质粒 *Bam* HI / *Xho* I 双酶切鉴定; 4: pFclpP 质粒 *Bam* HI / *Xho* I 双酶切鉴定

图 2 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其截短突变体 *gusA* 报道基因表达载体的鉴定

Fig. 2 Identification of the *gusA* report plasmids of 5'-flanking sequence and its shortened mutants of *S. mutans* *clpP* gene

2.3 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其突变体 *gusA* 报道基因表达株的鉴定 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP- $\Delta$ RS 的 *gusA* 报道基因表达载体 pFclpP 和 pFclpP- $\Delta$ RS, 连同阴性对照空载体 pIB107 及含有松鼠葡萄球菌 *ami* 基因启动序列的阳性对照 pFam132 质粒经线性化后转化变异链球菌 UA159, 经卡那霉素筛选, 挑选阳性转化子行菌落 PCR 鉴定, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在 1 341 bp 和 991 bp 处有特异性明亮扩增带, 与预期结果相符, 详见图 3。测序证实变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 FclpP 或其突变体 FclpP- $\Delta$ RS 及 *gusA* 报道基因-*kan*<sup>R</sup> 抗性基因盒以单拷贝插入变异链球菌转座酶基因(SMU.1405)中。



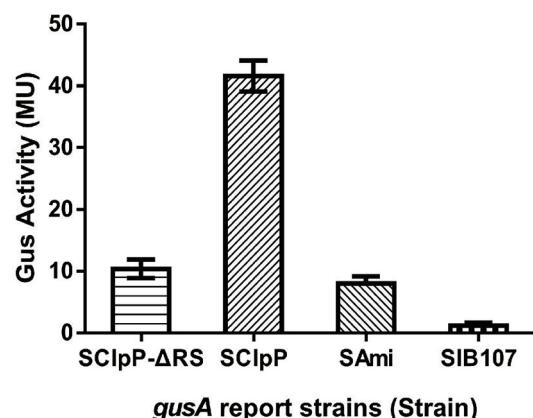
1: 转化线性化 pIB107 质粒的 *gusA* 报道基因表达株的 PCR 扩增结果;2: 转化线性化 pFclpP 质粒的 *gusA* 报道基因表达株的 PCR 扩增结果;3: 转化线性化 pFclpP- $\Delta$ RS 的质粒 *gusA* 报道基因表达株 PCR 扩增结果 M: DNA Marker 2000

图 3 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其截短突变体 *gusA* 报道基因表达株的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR products of the *gusA* report strains of 5'-flanking sequence and its shortened mutants of *S. mutans* *clpP* gene

2.4 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其截短突变体启动子活性 GusA 活性测定结果表明变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 *gusA* 报道基因表达株 SClpP 的 GusA 活性是阴性对照不含启动子的 *gusA* 报道基因表达株 SIB107 的 34.6 倍之多, 是阳性对照松鼠葡萄球菌 *ami* 基因启动子片段 *gusA* 报道基因表达株 SAmi 的 8.7 倍左右; *clpP* 基因 5'-侧翼序列突变体 *gusA* 报道基因表达株 SClpP- $\Delta$ RS 的启动子活性是阴性对照的 5.2 倍, 是阳性对照的 1.3 倍, 说明插入片段变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧

翼序列 FclpP 及其突变体 FclpP- $\Delta$ RS 具有较强的启动子活性。详见图 4 所示。



SClpP: 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 *gusA* 报道基因表达株; SClpP- $\Delta$ RS: 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列截短突变体 *gusA* 报道基因表达株; SAmi: 阳性对照 SIB107: 阴性对照

图 4 变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列及其截短突变体 GusA 活性测定

Fig.4 GusA activity analysis of the *gusA* report strains of *S. mutans* *clpP* gene 5'-flanking sequence and its shortened mutants

### 3 讨论

课题组前期对变异链球菌基因组结构研究表明, 变异链球菌 *clpP* 基因上游为 *upp* 基因, 编码尿嘧啶磷酸核糖基转移酶, 其转录方向与 *clpP* 基因相同, 两者之间存在一非编码区; 而对 *clpP* 基因转录产物的研究发现变异链球菌 UA159 株 *clpP* 基因存在 1.9 kb 和 0.67 kb 两种转录产物, 两者在菌体存在的时间均小于 1 min; 其中 0.67 kb 转录产物的含量占总表达产物的 80%, 为 *clpP* 基因转录产物, 而 1.9 kb 转录产物占 20%, 为 *clpP* 基因及其上游 *upp* 基因共转录产物<sup>[6]</sup>。因此, 我们推断在变异链球菌 *clpP* 基因与其上游 *upp* 基因之间的非编码区存在着 *clpP* 基因的启动子。为检测变异链球菌 *clpP* 基因与 *upp* 基因之间的非编码区是否具有启动子活性, 我们将 *clpP* 基因与 *upp* 基因之间的非编码区及 *upp* 基因 3'-端部分 DNA 片段插入到 *gusA* 报道基因表达载体 pIB107 的 *gusA* 报道基因的上游, 构建变异链球菌 *clpP* 基因 5'-侧翼序列 *gusA* 报道基因表达载体。

pIB107 载体由堪萨斯大学医学中心的 Indrani Biswas 教授为研究变异链球菌启动子活性而特地构建的, 其 *Bam* HI/ *Xba* I 酶切位点上游无启动子序列和表达调控元件, 下游即为 *gusA* 报道基因, 编

码  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -glucuronidase, GusA), 能够水解 PNPG 生成淡黄色的对硝基苯胺, 在 420~450 nm 处具有高的消光系数, 可由分光光度计测定<sup>[7]</sup>。因此可通过检测 GusA 活性间接反映上游插入片段的启动子活性。GusA 活性测定较 lacZ ( $\beta$ -半乳糖苷酶基因)、cat (氯霉素乙酰转移酶基因)、lux (荧光素酶基因) 等目前常用的测定启动子活性的方法具有背景低、灵敏度高, 线性范围广、设备要求低、操作简单、快速等优点。pIB107 载体的 gusA 报道基因的下游为 kan<sup>R</sup> 抗性基因盒, 而变异链球菌转座酶基因(SMU.1405)5'-端及 3'-端约 700~900 bp 的基因片段分别位于 gusA 报道基因的上游和 kan<sup>R</sup> 抗性基因盒的下游。因此线性化的载体可以借此两同源臂与变异链球菌 SMU.1405 基因发生同源重组, 使插入两同源臂中的插入序列以单拷贝的形式插入变异链球菌 SMU.1405 中, 这不仅消除了载体拷贝数不同对 GusA 活性测定造成的影响, 同时不会影响宿主菌其他基因和生物学功能, 还便于重组子的筛选<sup>[8]</sup>。这种序列特异性同源重组多用于序列的定向插入或缺失, 具有 DNA 序列不丢失、不合成等优点, 是生命科学中常用的分子生物学方法和手段。

Jiaxin Zhang 等<sup>[6]</sup> 对变异链球菌 clpP 基因及其周围 DNA 进行序列和结构分析, 分析结果显示, 在 clpP 基因翻译起始位点上游 292 bp 处, 有 7 个随机串联重复序列, 其重复基序由 49~50 bp 的碱基组成 GCGAGGCTANAGTCCAGTGGACTGT TATTTCGGAGCTNTAAAATNGATN。其中每个基序由一个及其保守 29 bp 碱基组成的核心区域, 核心区域的 3' 及 5'-侧翼序列仅有个别碱基不同。诸多研究已证实细菌的重复序列多为非编码序列, 通常具有顺式作用元件的作用, 对基因表达、转录调控、乃至染色体的构建以及生理代谢都起着不可或缺的作用, 为初步探讨此串联重复序列的功能, 我们构建了变异链球菌 clpP 基因 5'-侧翼序列突变体 gusA 报道基因表达株 SClpP-ΔRS, 在该突变体中我们将串联重复序列进行了缺失突变。GusA 活性测定表明变异链球菌 clpP 基因 5'-侧翼序列 FclpP 具有较强的启动子活性, 是阳性对照松鼠葡萄球菌 ami 基因启动子片段活性的 8.7 倍, 说明插入片段具有较强的启动子活性, 而 clpP 基因 5'-侧

翼序列突变体 FclpP-ΔRS 的启动子活性是阳性对照松鼠葡萄球菌 ami 基因启动子片段的 1.3 倍, 因此我们推断 clpP 基因上游的串联重复序列具有增强 clpP 基因表达的功能, 其作用机制尚待实验进一步证实。

综述之, 本实验成功克隆了变异链球菌 clpP 基因启动子, GusA 活性测定证实具有较强的启动子活性, 同时对变异链球菌 clpP 基因串联重复序列进行了初步的功能验证, 为后续 clpP 基因启动子的结构及其表达调控机制的研究提供实验依据和方法上的借鉴。

### 参 考 文 献 :

- [1] Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(4): 499~515. DOI: 10.1007/s10096-013-1993-7
- [2] Hou X, Zhang J, Song X, et al. Contribution of ClpP to stress tolerance and virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. J Basic Microbiol, 2014, 54(11): 1222~1232. DOI: 10.1002/jobm.201300747
- [3] Zhang J, Hou X, Song X, et al. ClpP affects biofilm formation of *Streptococcus mutans* differently in the presence of cariogenic carbohydrates through regulating gtfBC and ftf[J]. Curr Microbiol, 2015, 70(5): 716~723. DOI: 10.1007/s00284-015-0779-9
- [4] Frees D, Savijoki K, Varmanen P, et al. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria[J]. Mol Microbiol, 2007, 63(5): 1285~1295. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x
- [5] Stahlhut SG, Alqarzaee AA, Jensen C, et al. The ClpXP protease is dispensable for degradation of unfolded proteins in *Staphylococcus aureus* [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11739. DOI: 10.1038/s41598-017-12122-y
- [6] Zhang JQ, Banerjee A, Biswas I, et al. Transcription of clpP is enhanced by a unique tandem repeat sequence in *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(3): 1056~1065. DOI: 10.1128/JB.01436-08
- [7] Chatteraj P, Banerjee A, Biswas S, et al. ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance[J]. J Bacteriol, 2010, 192(5): 1312~1323. DOI: 10.1128/JB.01350-09
- [8] Tao L, Biswas I. Degradation of SsrA-tagged proteins in streptococci[J]. Microbiol, 2015, 161(Pt 4): 884~894. DOI: 10.1099/mic.0.000048

收稿日期:2018-09-26 编辑:张智芳