

非编码小 RNA (*sraB*) 调控肠炎型沙门菌的抗蛋清抑菌作用

蒋惠源, 曹鸣辉, 曹学松, 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, 南京 210093)

摘要:【目的】肠炎型沙门菌是一种食源性人畜共患病病原菌,可在禽蛋中存活并传播。sRNA 为新近发现的基因表达调控分子,本实验以 sRNA(*sraB*)为对象,探索 sRNA 与肠炎型沙门菌在禽蛋中存活的相关性,及研究其在细菌抵抗蛋清抑菌作用中的调控功能。【方法】参考已报道的沙门菌全基因组及 *sraB* 序列,设计并扩增 *sraB* 突变用基因片段,运用 Red 重组系统(red recombination system)对肠炎沙门菌野生株(SE2472) *sraB* 基因进行定点敲除,构建出 *sraB* 敲除株(SE2472 Δ *sraB*)。分析比较 *sraB* 敲除对沙门菌在蛋清中存活的影响;另构建表达 *sraB* 的回复表达质粒 pHDB3-*sraB*,将其转入 *sraB* 敲除株构建回复株 SE2472 Δ *sraB*-comp,以回复表达 *sraB*,分析 *sraB* 表达对沙门菌敲除株的回复作用;并分别以野生株、敲除株及回复株研究 *sraB* 在抵抗蛋清中几种抑菌因子(如溶菌酶和卵转铁蛋白)作用中可能的调控作用。【结果】敲除株在蛋清中存活率为野生型的 61% - 70%,回复株相比野生型的存活率比敲除株提高 10% - 33%;在转铁蛋白抑菌实验中,孵育 8 h 和 24 h,敲除株的存活率分别为野生型存活率的 38% 和 23%,孵育 8 h 回复株相比野生型的存活率比敲除株提高 15%,但孵育 24 h 回复株的存活率未见提高;在溶菌酶抑菌实验中,孵育 8 h 和 24 h 后,敲除株存活率分别为野生型的 41% 和 27%,回复株相比野生型的存活率分别比敲除株提高 35% 和 23%。【结论】通过比较 *sraB* 敲除与否,研究肠炎型沙门菌在禽蛋中的存活及对抑菌因子的抵抗作用,结果表明 *sraB* 在肠炎沙门菌抵抗蛋清抑菌作用中起着重要调控功能。

关键词: 沙门菌; sRNA; 基因调控; 蛋清

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1537-08

沙门菌(*Salmonella*)革兰氏阴性,兼性胞内寄生菌,肠杆菌科沙门菌属,是一种重要的人畜共患病病原菌,可引起肠胃炎,甚至致命性系统感染疾病如伤寒,败血症等^[1]。世界各国各类细菌性的食物中毒中,沙门菌引起的食物中毒位于前列。1985 - 2007 年间,世界范围内,由食物引起的沙门菌感染数量显著增加,其中 62.5% 由肠炎型沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *S. Enteritidis*)感染引起^[2]。对 1993 - 2003 年我国 766 起细菌性食物中毒统计分析显示,中毒人数以沙门菌所占比例最大,占 20.4%^[3]。目前世界各国在食品微生物的检验

指标中,均将沙门菌列为重要的检测对象。

沙门菌菌型繁多,已确认的沙门菌有 2000 个以上的血清型,其中鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. Typhimurium*)和肠炎沙门菌(*S. Enteritidis*)是引起人类沙门菌中毒的最主要血清型。沙门菌通过食源传播,禽蛋及其制品是引起沙门菌病暴发最常见的食物源^[4]。欧洲 2006 年确诊的总 165023 例沙门菌感染中,0.8% 系污染的禽蛋引起,禽蛋污染中大于 90% 为肠炎沙门菌^[2]。鼠伤寒沙门菌(*S. Typhimurium*)可通过破裂的禽蛋感染人类,肠炎沙门菌是唯一可在完整禽蛋中存活

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30988003)

* 通信作者。顾宏伟, Tel: +86-25-84530997, hongweigu999@yahoo.com.cn; 曾科, Tel: +86-25-84530247, kzen@nju.edu.cn

作者简介: 蒋惠源(1987-),女,江苏宿迁人,硕士研究生,微生物与生化药学专业。E-mail: janghuiyuannju@163.com

收稿日期: 2010-04-19; **修回日期:** 2010-06-17

并传播给人的血清型^[5],肠炎沙门菌可从污染禽蛋中检测出,尤其在污染禽蛋的蛋清中检出率最高^[6]。

蛋清中存在多种抗菌因子(Antimicrobial components),如卵转铁蛋白(ovotransferrin)和溶菌酶(lysozyme)等,可引起细胞壁和细胞膜结构损伤,竞争营养元素等,进而抑制或清除蛋清中的细菌^[7]。Lu等研究发现蛋清可能存在核酶活性,但如何进入菌体发挥功能的机制不清^[8]。另外,蛋清中的环境(如pH值、温度及蛋清中活菌数量等)亦可影响细菌在蛋清中的存活^[9]。肠炎沙门菌却能抵抗上述不利因素,并在禽蛋中存活及增殖,这对其传播发挥着重要作用,但肠炎沙门菌在禽蛋中存活并传播的机制目前尚未研究清楚。

sRNAs (small non-coding RNAs) 是一类非编码小RNA,是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^[10]。sRNAs长度约50-250碱基,位于细菌基因组的非编码区,无开放性阅读框(ORFs)。sRNAs调控基因表达主要有两种方式,一种为反式编码的反义sRNA通过碱基结合方式结合到靶mRNA上,影响靶mRNA的翻译或稳定性^[11]。另一种结合方式是分子模拟,sRNAs提供RNA结合蛋白如CsrA/RsmA家族的结合位点,从而调节蛋白的活性^[12]。目前,在大肠杆菌基因组已发现并鉴定的sRNA达70多条,沙门菌中也存在大量sRNA,序列多数与大肠杆菌的同源^[11]。近年来,随着沙门菌毒力因子研究的深入,sRNA调控沙门菌毒力基因表达成为新的研究热点,如Pfeiffer等发现位于沙门菌毒力岛(SPI-1)的sRNA(*invR*)可抑制外膜蛋白(*ompD*)的合成^[13];Altuvia等发现sRNA(*oxyS*)在过氧条件下表达,可调控多个靶基因,其中转录激活因

子*fhla*直接受*oxyS*调节^[14]。sRNA这种调节细菌对抗环境刺激的特性,使sRNA可能在沙门菌对抗蛋清中不利因素得以生存中发挥重要作用。

*sraB*是Argaman等首先在大肠杆菌中发现,并通过Northern blot得到验证,*sraB*在稳定期大量表达,其具体功能目前尚未有研究^[15]。Papenfort等确定了沙门菌*sraB*在基因组中的位置,序列比对分析表明,其与大肠杆菌*sraB*高度同源(同源性:83%)^[16]。

本实验以sRNA(*sraB*)为对象,探索sRNA与肠炎型沙门菌在禽蛋中存活的相关性,及研究其在细菌抵抗蛋清抑菌作用中的调控功能。实验运用Red重组系统(red recombination system)对肠炎沙门菌野生株(SE2472)*sraB*基因进行定点敲除,构建*sraB*敲除株(SE2472 Δ *sraB*),并构建可回复表达*sraB*的回复株SE2472 Δ *sraB*-comp。分别以野生株、敲除株及回复株为对象,研究*sraB*在抵抗蛋清及蛋清中两种主要抑菌因子(溶菌酶和卵转铁蛋白)作用中可能的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:Taq酶、dNTP、T4 DNA连接酶、DNA marker、质粒回收试剂盒、PCR回收试剂盒、凝胶回收试剂盒及限制性内切酶(*EcoRI*、*XbaI*)均购自大连宝生物工程公司;L-arabinose、转铁蛋白购自Sigma公司;Lysozyme购自Fluka公司;引物由Invitrogen公司合成。

1.1.2 菌株、质粒及引物:实验涉及的菌株和质粒见表1。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。

表1 菌株及质粒

Table 1 A list of the strains and plasmid constructs used in the study

Strains and plasmids	Description	Reference/source
SE2472	Wild type and parental strain	[17]
SE2472 Δ <i>sraB</i>	SE2472 <i>sraB</i> : ; <i>kan</i>	This study
SE2472 Δ <i>sraB</i> -comp	SE2472 <i>sraB</i> : ; <i>kan</i> transformed with pHDB3- <i>sraB</i>	This study
SE2472 Δ <i>sraB</i> -pHDB3	SE2472 <i>sraB</i> : ; <i>kan</i> transformed with pHDB3	This study
<i>E. coli</i> DH5a	Plasmid host strain	
<i>E. coli</i> TOP10	Plasmid host strain	
pKD4	containing a kanamycin resistance cassette and sequence which can be recognized by flapase	[18]
pKD46	<i>Amp</i> ^r , containing the Red recombinase of (phage	[18]
pCP20	Containing the expression cassette of flapase which can remove the kanamycin resistance cassette from the mutant strains	[18]
pHDB3	<i>Amp</i> ^r , pBR322 deleted for the <i>Hind</i> III- <i>Ava</i> I fragment; the <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III fragment was replaced by the pUC18 polylinker	[19]
pHDB3- <i>sraB</i>	Derivative of pHDB3 containing <i>sraB</i>	This study

表 2 引物序列

Table 2 The primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Description
<i>sraB</i> -fk-F	TCGTCAGCTTTTCAGCAGCGCGGACGCCAGGGAGAGGTAGACGCAAGGATG AGACGGGGCATATTTTTCCCTCAGATATAGCGTAATGATGAGAGCGGTAGGC TGGAGCTGCTTC	homologous recombination primer
<i>sraB</i> -fk-R	TTGAGCGGTACGAACCGGATCAAGACTCAGGGGTAATTTTACCTTTTGCATAGG GCCGCGATATTAACCTTCGTAACGTCATATAGTCAAAGAAAAAGGCAGCCGGTCC ATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>sraB</i> -c-F	ATGGAATTCCGCTGGCTTTGGCTAA	primers used to construct complement strain
<i>sraB</i> -c-R	GTTTTTCTAGAGGTACGAACCGGATCAA	
<i>sraB</i> -f-F	CGCTGGCTTTGGCTAAGACGA	primer used to detect mutant
<i>sraB</i> -f-R	GGTACGAACCGGATCAA	

1.2 *sraB* 敲除株的构建

1.2.1 突变片段的扩增:以质粒 pKD4 为模板,用突变引物 *sraB*-fk-F/R 进行 PCR 扩增,扩增出含有待敲除基因侧翼序列、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,运用凝胶回收试剂盒回收目的片段, -20℃ 冻存备用。

1.2.2 突变株构建:参照 Datsenko 等发明的 PCR 产物一步敲除方法^[18], 简要步骤如下:将质粒 pKD46 导入肠炎沙门菌 SE2472 中,得到带有重组酶质粒的宿主菌,以此菌制备电转化感受态细胞。将步骤 1.2.1 中纯化的 PCR 产物电击转化肠炎沙门菌 SE2472 感受态细胞,涂布 LB 平板 (*kan*),筛选阳性重组子。

1.2.3 突变株鉴定:挑单克隆接种 LB 肉汤培养基,37℃ 振荡培养,用检测引物 *sraB*-f-F/R 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。

1.3 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,进行双抗性筛选,挑单克隆先 30℃ 培养,后 42℃ 培养过夜,诱导 FLP 重组酶表达,去除 *kan* 基因。以鉴定引物 *sraB*-f-F/R 进行 PCR 扩增,鉴定 *kan* 基因消除与否,筛选获得无 *kan* 抗性的 *sraB* 敲除株 (SE2472Δ*sraB*)。

1.4 回复株构建

1.4.1 *sraB* 基因扩增:以肠炎沙门菌 SE2472 的基因组为模板,用引物 *sraB*-c-F/R (Table 2) PCR 扩增出完整 *sraB* 片段,运用凝胶回收试剂盒回收目的片段待用。

1.4.2 回复质粒构建:参考 Wadler 等报道,构建 *sraB* 回复表达质粒^[20]。简要步骤如下:将 1.4.1 所

得 *sraB* 基因片段和 pHDB3 载体分别用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切,然后用 T4 连接酶连接,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。

1.4.3 回复质粒鉴定:挑单克隆接种 LB 肉汤培养基,37℃ 振荡培养,采用菌液 PCR 方法,以检测引物 *sraB*-c-F/R 分别扩增,电泳鉴定,以获得重组质粒 pHDB3-*sraB*。

1.4.4 构建回复株、对照株:将 pHDB3-*sraB* 电击导入 SE2472Δ*sraB*,经抗性筛选获得回复株 SE2472Δ*sraB*-comp;同时将空白 pHDB3 电击导入 SE2472Δ*sraB*,作为对照株 SE2472Δ*sraB*-pHDB3。

1.5 *sraB* 敲除对沙门菌在 LB 培养基中生长影响的测定

取 SE2472、SE2472Δ*sraB*、SE2472Δ*sraB*-comp 和 SE2472Δ*sraB*-pHDB3 分别划线培养,挑单克隆接种新鲜 LB 培养基,37℃ 振荡培养过夜。次日将菌种以 1:100 比例接种 3 mL 新鲜 LB 培养基,选取不同的时间点,测定培养基中活菌数量。

1.6 *sraB* 敲除对沙门菌抗蛋清抑菌作用的影响

沙门菌在蛋清中存活率测定方法,参考 Lu 等报道^[8], 简要步骤如下:待检测菌株 (SE2472、SE2472Δ*sraB*、SE2472Δ*sraB*-comp 和 SE2472Δ*sraB*-pHDB3) 接种新鲜培养基,37℃ 振荡培养过夜待用。取 4-6 枚产后 9 天内的新鲜鸡蛋以 70% 乙醇消毒,从气室处打开,吸取蛋清,移至灭菌容器中,搅拌均匀。分别取 1.5 mL 蛋清于 2 mL 灭菌离心管中,过夜培养细菌稀释后 (终浓度 2-4 × 10³ CFU/mL),加入蛋清中混匀,37℃ 孵育,于不同时间点取 30 μL 涂布 LB 平板 37℃ 培养并计数,将各孵育时间活菌数与初始活菌数比较 (初始存活率设为 1),计算出 37℃ 孵育条件下各菌株存活率。

1.7 *sraB* 敲除对沙门菌抵抗转铁蛋白作用的测定

分别以 SE2472、SE2472 Δ *sraB*、SE2472 Δ *sraB*-comp 和 SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 作为待检菌株。转铁蛋白溶于 Tris 缓冲液 (10 mmol/L), 配成梯度浓度转铁蛋白溶液 (1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L), 将待检测各菌稀释后加入上述转铁蛋白溶液, 调成终浓度 $2 - 4 \times 10^3$ CFU/mL, 37°C 孵育, 8 h 和 24 h 取样测活菌数, 与 0 h 菌数对比计算存活率。

对照组: 将 SE2472、SE2472 Δ *sraB*、SE2472 Δ *sraB*-comp 和 SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 分别加入 10 mmol/L Tris 缓冲液, 37°C 孵育, 于 8 h 和 24 h 取样测活菌数, 与 0 h 菌数对比计算存活率。

1.8 *sraB* 敲除对沙门菌抵抗溶菌酶作用的测定

分别以 SE2472、SE2472 Δ *sraB*、SE2472 Δ *sraB*-comp 和 SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 作为待检菌株。将溶菌酶加入缓冲液 (10 mmol/L Tris buffer, pH 7.0) 中, 配成梯度浓度 (5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L) 的溶菌酶溶液。将待检测各菌稀释后加入上述溶菌酶溶液, 至终浓度 $2 - 4 \times 10^3$ CFU/mL, 37°C 孵育, 在 8 h、24 h 取样点平板测活菌数, 与 0 h 菌数对比得存活率。

2 结果

2.1 *sraB* 基因的敲除

本试验通过构建 *sraB* 敲除的肠炎沙门菌, 以研究 *sraB* 在肠炎沙门菌抵抗蛋清抑菌作用中的调控功能。采用 Red 重组系统 (red recombination system) 对肠炎沙门菌 *sraB* 进行定点敲除。按照 1.2 的方法构建 *sraB* 敲除株 (用 *kan* 抗性基因置换 *sraB*), 以 *sraB* 基因侧翼引物 *sraB*-f-R/F 进行 PCR 检验, 筛选阳性重组子。PCR 产物大小: 野生型为 540 bp, *sraB* 基因被卡那霉素抗性基因替代后的序列为 1640 bp。

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, 向带卡那霉素抗性的 *sraB* 敲除株中导入 pCP20 质粒, pCP20 可温度诱导表达 FLP 重组酶, 重组删除 FRT 位点之间的序列, 以消除卡那霉素抗性片段。按照 1.3 的方法去除重组子携带的卡那霉素抗性基因, 以 *sraB* 基因侧翼引物对 *sraB*-f-R/F 进行 PCR 检验。PCR 产物大小: 野生型为 540 bp; 抗性基因消除后的 *sraB* 敲除株 (SE2472 Δ *sraB*) 扩增片段

为 515 bp, 电泳图与预期一致。

2.3 回复株构建

本实验运用可在宿主菌中自主表达的质粒 pHDB3 为载体回复表达 *sraB* 以研究 *sraB* 的功能。以引物 *sraB*-c-R/F 扩增出完整的 *sraB* 片段, 以 *EcoRI* 和 *XbaI* 分别双酶切 *sraB* 扩增片段和 pHDB3, 回收各自酶切片段进行连接, 得到 pHDB3-*sraB* 回复质粒, 经 PCR 鉴定插入片段长 530 bp。

2.4 *SraB* 敲除对沙门菌在 LB 培养基中生长影响的测定

为分析 *sraB* 敲除是否影响沙门菌的生长, 本试验分别检测 SE2472、SE2472 Δ *sraB*、SE2472 Δ *sraB*-comp 和 SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 在 LB 培养基中生长状况, 并绘出各自生长曲线, 结果表明, 敲除株与野生株在正常培养条件 (LB) 生长无明显差异 (图 1)。

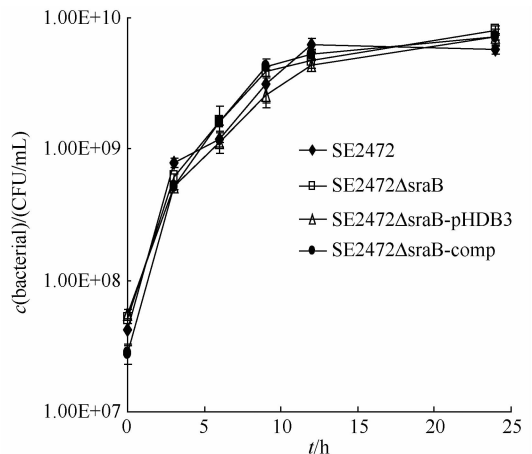


图 1 四株沙门菌在 LB 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain: SE2472, SE2472 Δ *sraB*, SE2472 Δ *sraB*-comp and SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 in LB broth.

2.5 *sraB* 敲除对沙门菌抵抗蛋清抑菌作用的测定

分别将 SE2472、SE2472 Δ *sraB*、SE2472 Δ *sraB*-comp 和 SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 与蛋清混合, 置于 37°C 孵育, 于 4 h、8 h、12 h 及 24 h 测定各菌株存活率。结果显示, SE2472 Δ *sraB* 在蛋清中存活率明显低于 SE2472, 敲除株在蛋清中存活率为野生型的 61% - 70%。*sraB* 回复表达时, 与敲除株 SE2472 Δ *sraB* 相比, 回复株 SE2472 Δ *sraB*-comp 存活率显著提高, 比敲除株提高 10 - 33%, SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 在蛋清中生长情况基本与敲除株一致 (图 2)。

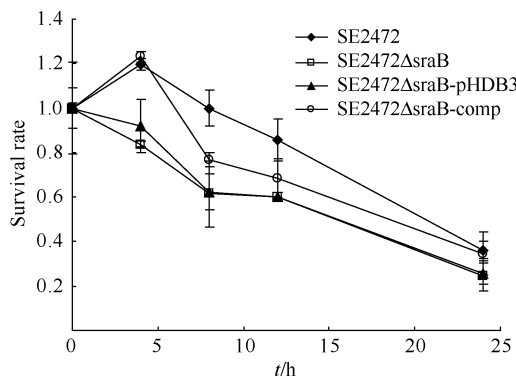


图2 四株沙门菌在蛋清中的存活率

Fig. 2 Survival rate of strains in egg albumen. SE2472 Δ *sraB*, SE2472 Δ *sraB*-comp, SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 and wild-type SE2472 were mixed with egg albumen respectively and incubated at 37 °C, bacterial number was determined against time. The ratio of survival was determined by comparison of the bacterial CFU recovered at different time to that obtained at 0 h. The error bars indicate standard deviations.

2.6 *sraB* 敲除对沙门菌抵抗转铁蛋白作用的测定

分析 *sraB* 是否在肠炎沙门菌抵抗转铁蛋白抑制中起调控作用。测定各菌株在不同浓度转铁蛋白溶液中的存活率,当转铁蛋白浓度在 2 – 10 mg/L 之间时,对本实验所用菌株有较好抑制效果。本试验以 5 mg/L 转铁蛋白测定各菌株存活率, 8 h: SE2472 Δ *sraB* 的存活率为 SE2472 的 38%, 回复株 SE2472 Δ *sraB*-comp 相比野生型的存活率比 SE2472 Δ *sraB* 提高 15%; 24 h: SE2472 Δ *sraB* 的存活率为 SE2472 的 23%, 回复株 SE2472 Δ *sraB*-comp 相比野生型的存活率比 SE2472 Δ *sraB* 略有下降(图 3)。

由于 Na⁺, K⁺ 等盐离子干扰溶菌酶和转铁蛋白的活性^[21], 本试验所用的溶菌酶和转铁蛋白均用 Tris 缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0)配制。用该 Tris 缓冲液按照步骤 1.7 所示方法检测各菌株在其中的生长情况,结果表明缓冲液不影响各菌株生长(数据未在本文显示)。

2.7 *sraB* 敲除对沙门菌抵抗溶菌酶作用的测定

分析 *sraB* 是否在肠炎沙门菌抵抗溶菌酶抑制中起调控作用。测定各菌株在不同浓度溶菌酶中的存活率,当溶菌酶浓度在 20 – 50 mg/L 之间时,对本实验所用菌株有较好抑菌效果。本试验以 50 mg/L 溶菌酶测定各菌株存活率, 8 h: SE2472 Δ *sraB* 的存活率为 SE2472 的 41%, 回复株 SE2472 Δ *sraB*-comp 相比野生型的存活率比 SE2472 Δ *sraB* 提高 35%; 24 h: SE2472 Δ *sraB* 的存活率为 SE2472 的 27%, 回

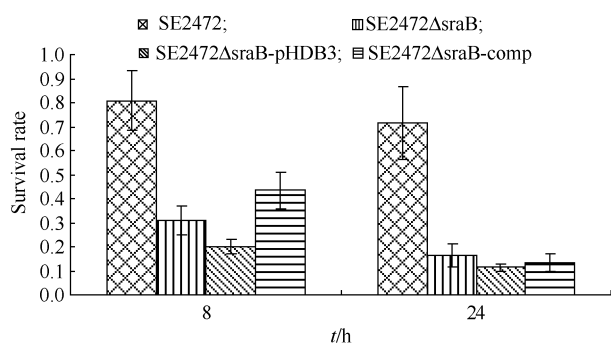


图3 四株沙门菌在转铁蛋白中的存活率

Fig. 3 Survival rate of strains in transferrin. SE2472 Δ *sraB*, SE2472 Δ *sraB*-comp, SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 and wild-type SE2472 were added to 5 μ g transferrin in 10mmol/L Tris buffer adjusted to pH 7.0. Mixtures were incubated at 37°C and at different periods of incubation, survived bacterial was quantified. The ratio of survival was determined by comparison of the bacterial CFU recovered at 8 or 24 h to that obtained at 0 h. The error bars indicate standard deviations.

复株 SE2472 Δ *sraB*-comp 相比野生型的存活率比 SE2472 Δ *sraB* 提高 23%, 呈现较好的回复作用, 对照株存活率无提高(图 4)。

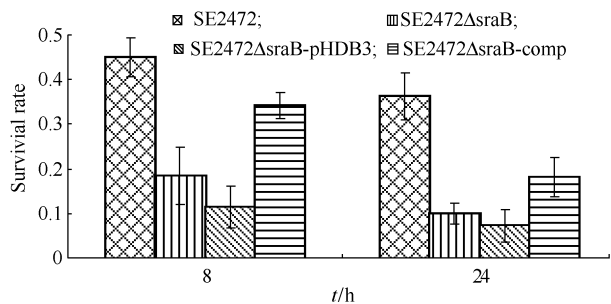


图4 四株沙门菌在溶菌酶中的存活率

Fig. 4 Survival rate of strains in lysozyme. SE2472 Δ *sraB*, SE2472 Δ *sraB*-comp, SE2472 Δ *sraB*-pHDB3 and wild-type SE2472 were added to 50 μ g lysozyme in 10 mmol/L Tris buffer adjusted to pH 7.0. Mixtures were incubated at 37°C and at different periods of incubation, survived bacterial was quantified. The ratio of survival was determined by comparison of the bacterial CFU recovered at 8 or 24 h to that obtained at 0 h. The error bars indicate standard deviations.

3 讨论

沙门菌为一种重要的食源性传染病病原,引起人类多种沙门菌病,其中肠炎沙门菌可在蛋清中生存,是唯一可通过完整禽蛋传播的血清型沙门菌。

蛋清存在多种抑菌成分,其中溶菌酶与卵转铁蛋白是目前研究较为清楚的两种抑菌因子;溶菌酶与转铁蛋白都可破坏细胞壁和细胞膜结构,转铁蛋白还可通过螯合游离铁离子,抑制细菌生长增殖^[22-23]。肠炎沙门菌对抗上述抑菌因子在蛋清中生存的机理,迄今尚未弄清。目前已发现肠炎沙门菌中多个基因与其在蛋清中的生存有关,Clavijo 等筛选出肠炎型沙门菌 (*S. Enteritidis*) 32 个基因与抗蛋清有关^[24]。肠炎型沙门菌能在蛋清中存活不仅与其自身 egg-resistant genes 相关,还与细菌感应蛋清环境及应答性调控相关,但目前对这些基因调控机制未见有报道。

sRNAs 是近年新发现的基因调控小分子,在细菌应对环境刺激(如活性氧,温度,酸碱性等)条件下调控靶基因的表达^[25]。结合本课题组前期研究结果,实验以 *sraB* 为研究对象,探索 *sraB* 在肠炎型沙门菌抵抗蛋清的抑菌中可能的调控作用。本实验分别构建出沙门菌 *sraB* 敲除株,回复株及回复对照株,在不同条件下比较它们与野生株之间的差异。质粒 pHDB3 具有较高拷贝数,可转录插入的 sRNA 片段^[19],且目前已有成功运用该质粒回复 sRNA (sgrS) 敲除的报道^[20],本试验运用该质粒回复表达 *sraB*。LB 培养实验表明,*sraB* 的敲除不影响沙门菌的生长。当比较 SE2472 Δ *sraB* 和野生型 SE2472 对抗蛋清抑菌作用时,发现野生株 SE2472 的 *sraB* 敲除后其在蛋清中存活率明显下降,随后通过 *sraB* 回复表达,*sraB* 敲除株的存活率得到显著提高,这提示 *sraB* 在沙门菌抵抗蛋清抑菌作用过程中发挥作用。鉴于 sRNA 的作用机制是调控基因的表达,推测沙门菌可能通过表达 *sraB*,调控相关靶基因,以提高其抵抗蛋清的抑菌作用。

为深入分析 *sraB* 在抵抗蛋清中哪种抑菌因子中发挥调控功能,本实验对蛋清中两种主要抑菌成分溶菌酶和转铁蛋白展开研究。溶菌酶实验结果表明,*sraB* 表达与沙门菌抵抗溶菌酶抑菌作用密切相关。转铁蛋白抑菌实验,SE2472 Δ *sraB* 存活率比 SE2472 明显下降,回复实验表明,孵育 8 h, *sraB* 的表达能部分提高回复株在转铁蛋白中的存活率,但孵育至 24 h 回复株的存活率未能得到提高,推测 *sraB* 在沙门菌抵抗转铁蛋白抑菌中起部分调控功能,或 *sraB* 的调控还需其它因子参与。

综合本实验结果,推测 *sraB* 可能通过调节沙门菌的相关基因表达来抵抗蛋清抑菌因子——溶菌酶

和转铁蛋白的抑菌作用,维持或增加肠炎型沙门菌在蛋清中的存活几率。sRNA 作为一种基因表达调控因子,在 RNA 水平调节基因,在细菌应激及对外界环境感应方面起重要调控作用,与细菌致病性相关,目前已成为国际上新的研究热点。sRNA 半衰期短、在 RNA 水平调控、一个 sRNA 有多个靶基因或靶位点,这些特点使其能更精确迅速地调控基因表达,具有比蛋白调控更多的优势^[26]。*sraB* 的靶基因为何,及如何对其调控有待后期深入研究,以期为进一步弄清肠炎沙门菌的传播及分子致病机理提供参考。

参考文献

- [1] Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS, Bean NH, Slutsker L. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1993 – 1997. *Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention Surveillance Summaries*, 2000, 49(1): 1-62.
- [2] European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *European Food Safety Authority*, 2007a. 130: 34-117.
- [3] 王世杰, 杨杰, 谌志强, 张伟, 李君文. 1994 – 2003 年我国 766 起细菌性食物中毒分析. *中国预防医学杂志 (China Preventive Medicine)*, 2006, 7(3): 180-184.
- [4] Braden CR. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(4): 512-517.
- [5] Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade RJ. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, 1995, 63(7): 2443-2449
- [6] Gast RK, Holt PS. Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4, 8, 13a, and 14b. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(6): 865-868.
- [7] Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Fems Microbiology Reviews*, 2009, 33(4): 718-738.
- [8] Lu S, Killoran PB, Fang FC, Riley LW. Association of *Salmonella enterica* serovar enteritidis yafD with resistance to chicken egg albumen. *Infection and Immunity*, 2003, 71(12): 6734-6741.

- [9] Kang H, Loui C, Clavijo RI, Riley LW, Lu S. Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiology and Infection*, 2006, 134(5): 967-976.
- [10] Vogel J, Papenfort K. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Current opinion in microbiology*, 2006, 9(6): 605-611.
- [11] Vogel J, Sharma CM. How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biological Chemistry*, 2005, 386(12): 1219-1238.
- [12] Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF, 3rd, Oakford L, Yuksel U, Giedroc DP, Romeo T. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(28): 17502-17510.
- [13] Pfeiffer V, Sittka A, Tomer R, Tedin K, Brinkmann V, Vogel J. A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(5): 1174-1191.
- [14] Altuvia S, Zhang A, Argaman L, Tiwari A, Storz G. The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhfA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO Journal*, 1998, 17(20): 6069-6075.
- [15] Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S: Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current Biology*, 2001, 11(12): 941-950.
- [16] Papenfort K, Pfeiffer V, Lucchini S, Sonawane A, Hinton JC, Vogel J. Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(4): 890-906.
- [17] Lu S, Manges AR, Xu Y, Fang FC, Riley LW. Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella* Enteritidis in vivo and in vitro. *Infection and Immunity*, 1999, 67(11): 5651-5657.
- [18] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [19] Ulbrandt ND, Newitt JA, Bernstein HD. The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell*, 1997, 88: 187-196.
- [20] Wadler CS, Vanderpool CK. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(51): 20454-20459.
- [21] Chassy BM, Giuffrida A. Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(1): 153-158.
- [22] Hughey VL, Johnson EA. Antimicrobial Activity of Lysozyme against Bacteria Involved in Food Spoilage and Foodborne Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(9): 2165-2170.
- [23] Ibrahim HR, Iwamori E, Sugimoto Y, Aoki T. Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1401(3): 289-303.
- [24] Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1055-1064.
- [25] Toledo-Arana A, Repoila F, Cossart P. Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 2007, 10(2): 182-188.
- [26] Johansson J, Cossart P. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(6): 280-285.

sRNA (*sraB*) regulate the resistant ability of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis to egg albumen

Huiyuan Jiang, Minhui Cao, Xuesong Cao, Hongwei Gu^{*}, Ke Zeng^{*}

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

Abstract: [**Objective**] *Salmonella species* are important food-borne pathogens of human and animal. *S. enterica* serovar Enteritidis is the only serovar that routinely causes human infection through intact egg, the molecular basis of its ability to survive in egg is poorly understood. The importance of post-transcriptional regulation by small non-coding RNAs (sRNA) has recently been recognized. The sRNAs play 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 *sraB* associated with survival ability of *S. enterica* serovar Enteritidis in egg albumen. [**Methods**] To study the contribution of *sraB* to the survival ability of *S. Enteritidis* in egg albumen, we constructed *sraB* deletion strain (SE2472 Δ *sraB*) with wild type *S. Enteritidis* SE2472, using red recombination system. For complementation of *sraB*, complete fragment *sraB* was amplified from SE2472 and inserted into plasmid pHDB3 to overexpress *sraB*. We carried out the egg albumen bactericidal experiment with strains of SE2472, SE2472 Δ *sraB* (*sraB* deletion), SE2472 Δ *sraB*-comp (*sraB* complement) and control. To explore the regulatory role of *sraB*, we assayed the bactericidal activity of the two important antimicrobial components of egg albumen: lysozyme and transferrin. [**Results**] In the egg albumen bactericidal experiment, the survival rate of SE2472 Δ *sraB* was only about 61% – 70% of that of SE2472; while SE2472 Δ *sraB*-comp improve the survival rate of SE2472 Δ *sraB* by 10% – 33% . In the transferrin bactericidal experiment, the survival rate of SE2472 Δ *sraB* was 38% of that of SE2472 at 8 h incubation, and 23% at 24 h incubation. SE2472 Δ *sraB*-comp played an important role in improving the survival rate rescued the defect by 14% than SE2472 Δ *sraB* at 8 h of incubation, but failed to rescue the defect at 24 h incubation. In the Lysozyme experiment, the survival rate of SE2472 Δ *sraB* was 41% of that of SE2472 at 8 h incubation, and 27% at 24 h incubation, compared with SE2472 Δ *sraB*, the expression of *sraB* of SE2472 Δ *sraB*-comp has improved the survival rate by 35% after 8 h of incubation and 23% after 24 h of incubation. [**Conclusion**] Based on our results, we conclude that small RNA (*sraB*) plays important role during the survival of *S. Enteritidis* in egg albumen, and may contribute regulatory role in response to antimicrobial components of egg albumen such as lysozyme and transferrin.

Keywords: *S. enterica* serovar Enteritidis; sRNA; gene regulation; egg albumen

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30988003)

^{*} Corresponding authors. Hongwei Gu, Tel: +86-25-84530997, E-mail: hongweigu999@yahoo.com.cn; Ke Zeng, Tel: +86-25-84530247, E-mail: kzen@nju.edu.cn

Received: 19 April 2010/Revised: 17 June 2010