



鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统相关基因敲除及其功能特性

王志林¹, 董震^{1,2,3}, 武珊珊¹, 敬文宪¹, 陈启伟¹, 尚佑军¹, 王琬凝¹,
刘永生^{1*}, 兰喜^{1*}

¹中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

²华南农业大学动物医学院, 广东省重大临床动物疾病预防控制重点实验室, 广东 广州 510642

³甘肃省定西市安定区畜牧兽医局, 甘肃 定西 743000

摘要: VI型分泌系统(T6SS)是大多数革兰氏阴性细菌中都存在的一种重要的分泌系统, 能介导细菌与细菌之间以及细菌和宿主细胞之间的相互作用, 溶血素共调节蛋白(Hcp)和缬氨酸甘氨酸重复蛋白G(VgrG)是组成T6SS穿刺装置的重要组分。但鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统的Hcp与VgrG在该菌入侵宿主细胞及抗吞噬过程中发挥的作用尚不清楚。【目的】本研究旨在利用基因敲除技术构建的鼠伤寒沙门氏菌*hcp*及*vgrg*基因缺失株体外接种真核上皮细胞和巨噬细胞, 并以其亲本株作为对照, 以研究Hcp及VgrG在该菌粘附、侵入上皮细胞及抗吞噬过程中所发挥的作用。【方法】通过优化Red同源重组系统操作过程中各个条件, 建立一套快速敲除鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统相关基因的操作系统, 成功构建鼠伤寒沙门氏菌CVCC541的*hcp*及*vgrg*单基因缺失株、双基因缺失株及三基因缺失株, 并用Hela细胞接种试验和菌落计数试验, 评估不同菌株的粘附和侵袭能力; 用小鼠巨噬细胞RAW 264.7接种试验, 评估不同菌株的抗吞噬能力。【结果】与亲本株CVCC541粘附侵袭Hela细胞相比, 基因缺失株CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg*和CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3*的粘附率分别为17.17% \pm 2.1%、14.73% \pm 2.5%和82% \pm 3.7%; CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg*和CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3*的侵袭率分别为7.05% \pm 1.05%、6.21% \pm 1.35%和87% \pm 3.25%; 与亲本株CVCC541在小鼠巨噬细胞RAW 264.7中的存活相比, 基因缺失株CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg*和CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3*的存活率分别为15.67% \pm 2.9%、14.47% \pm 1.87%和56.12% \pm 3.48%。【结论】鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统VgrG和Hcp对该菌入侵细胞和抗吞噬方面具有重要作用, 该研究为鼠伤寒沙门氏菌通过六型分泌系统与宿主细胞相互作用的机制研究奠定了基础。

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500703, 2018YFD0502006)

*通信作者。兰喜, Tel: +86-9318342685, E-mail: lanxi@caas.cn; 刘永生, Tel: +86-9318343721, E-mail: liuyongsheng@caas.cn

收稿日期: 2019-11-07; 修回日期: 2020-01-16; 网络出版日期: 2020-03-09

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌, VI型分泌系统(T6SS), 溶血素共调节蛋白(Hcp), 缬氨酸甘氨酸重复蛋白G(VgrG), Red同源重组系统

鼠伤寒沙门氏菌是肠杆菌科、沙门氏菌属的一种重要肠道致病菌,其宿主广泛,能通过污染的水和食物等传播媒介感染包括人在内的多种动物,从而引起包括腹泻、伤寒等一系列的临床症状^[1]。革兰氏阴性细菌中存在几种不同类型的蛋白质分泌系统,包括 T1SS、T2SS、T3SS、T4SS、T5SS、T6SS^[2-3],其功能是将蛋白质转移到其胞外环境,或转移到相邻的原核或真核细胞中^[4]。生物信息学研究表明高保守性细菌VI型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)在大约 25%已测序的革兰氏阴性菌中广泛分布^[5],是一种结构和机制类似于细胞内膜附着、收缩的噬菌体尾部的细胞器装置^[6],并通过该装置促进细菌之间以及细菌和宿主细胞之间的相互作用,发挥多种生物学效应^[4-5,7-8]。类似于 T4 噬菌体尾管蛋白 gp19/gp5 的溶血素共调节蛋白(Hcp),可形成堆叠环状的六聚体结构蛋白,效应蛋白可以通过该管环状结构转运出去^[9-10];缬氨酸甘氨酸重复蛋白 G (VgrG)蛋白的 N 端结构域与噬菌体 T4 尾部刺突蛋白 gp5/gp27 高度同源^[4,11],可以聚集成一个三聚体位于 Hcp 管道末端并与其相连, Hcp-VgrG 组成噬菌体“注射器”样基本结构^[9,12]。此外,圆锥形的针头蛋白脯氨酸-丙氨酸-丙氨酸-精氨酸重复蛋白(PAAR)位于 Hcp-VgrG 结构的末端,发挥稳定“注射器”结构装置的功能,更利于效应蛋白从细菌表面延伸到真核宿主细胞膜表面,并从“注射器”管道直接释放到宿主细胞质内,从而入侵宿主细胞内并逃避免疫监视^[13]。研究发现鼠伤寒沙门氏菌具有存在于毒力岛 6 (SPI-6)上

的 T6SS,由至少 13 个保守核心蛋白组成,鼠伤寒沙门氏菌存在有 3 种 Hcp 样蛋白和一个 VgrG 样蛋白^[14-16],分别由位于毒力岛 6 (*Salmonella* pathogenicity island, SPI-6)上的 STM14_0324 (Hcp1)、STM14_0327 (Hcp2)和 STM14_0338 的 VgrG (VgrS)以及位于毒力岛 6 之外的 STM14_3785 (Hcp3)编码,这些蛋白既是分泌蛋白也是结构蛋白^[14,17-18]。

Red 同源重组系统^[19]是利用 λ 噬菌体的 3 个重组相关的基因 *exo*、*bet* 和 *gam*,分别编码 Exo (λ 核酸外切酶)、Beta 和 Gam 蛋白的一种外源性 DNA 片段和细菌染色体或质粒基因同源重组的基因改造技术^[20]。由于不同菌株生理特征差异较大,该技术在不同的革兰氏阴性菌的基因敲除应用中存在差别。在此项研究中,我们成功优化 red 同源重组系统操作过程中各个条件,成功构建了鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 VI型分泌系统的 *hcp* 及 *vgrg* 基因的多个组合缺失株,并进行了 CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp1 Δ *hcp2 Δ *hcp3* 菌株体外粘附侵袭 Hela 细胞能力和抗小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬能力的实验研究。***

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及器材: Fetal bovine serum (FBS)、培养液 DMEM、0.25% Trypsin-EDTA (胰酶)购于美国 Gibco 公司;胶回收试剂盒、PCR

产物纯化试剂盒、高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 和 DL 5000 DNA Marker 购于大连 TaKaRa 公司; L-(+)-阿拉伯糖购于上海生工公司; Dpn1 酶购于美国 Promega 公司; counting kit-8 cck-8 细胞增殖试剂盒、青霉素-链霉素混合液(双抗)、氨苄西林(Ampicillin, Amp)、庆大霉素(Gentamicin, Gent)、卡那霉素(Kanamycin, Kna) 购自北京索莱宝科技有限公司; Corning 24 孔细胞培养板、Corning 96 细胞培养孔板购自 Corning 公司; PBS, LB 液体和固体培养基均为实验室配制; 台式高速离心机购于 Beckman 公司; 凝胶电泳仪、PCR 仪、凝胶成像仪、酶标仪、MicroPulser 电击仪及电击杯均购于美国 Bio-Rad 公司; 电热恒温水浴槽购于上海一恒科技有限公司; 二氧化碳温箱购于美国 Thermo Scientific 公司; 紫外分光光度计购于美国 Beckman 公司; Countstar 自动细胞计数仪购于美国 Countstar 公司。

1.1.2 菌株、质粒及细胞: 菌株鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 购于中国兽药监察所(北京)。实验中 Red 同源重组系统质粒 pKD46、pKD4 和 pCP20, 以及 HeLa 细胞和小鼠巨噬细胞 RAW

264.7 均为本实验室保存, 本研究构建的单基因缺失菌株为 CVCC541 Δ hcp1、CVCC541 Δ hcp2、CVCC541 Δ hcp3、CVCC541 Δ vgrg; 双基因缺失株 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2、CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp3、CVCC541 Δ hcp2 Δ hcp3、CVCC541 Δ hcp1 Δ vgrg、CVCC541 Δ hcp2 Δ vgrg、CVCC541 Δ hcp3 Δ vgrg 以及三基因缺失株 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2 Δ hcp3。

1.1.3 引物设计: 本研究以 NCBI 公布的鼠伤寒沙门氏菌 14028s 的全基因组序列(GenBank 序列号: CP001363.1)为参考序列, 设计了目的基因打靶片段引物和鉴定引物。选取 hcp2 基因序列前后各 56 bp 和 vgrg 基因序列前后各 45 bp 分别作为同源打靶片段, 并分别在同源打靶片段的 3'端加上了从 pKD4 质粒上扩增卡那霉素抗性基因的上下游引物序列作为打靶片段引物, 本研究参考了文献[18]中 Hcp1 和 Hcp3 的引物序列, 另外, 还设计了 GC 含量适宜的碱基序列作为目的基因的鉴定引物, 所有引物序列如表 1 所示(qc 为目的基因敲除引物, jd 为目的基因的鉴定引物)。所有引物送到西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成。

表 1. 本研究中设计的引物
Table 1. Primers designed in this study

Primers	Sequences (5'→3')
Hcp2-qcF	ACCTAATAAAGCAGATAAATCAGGGCTTAATTTAGGTAGTTAAAAGGATAGTAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Hcp2-qcR	TTTAAAATCAAATAATAAATCCGGCCAGATATAAATCTGGCCGAAAAACAGCCGCATATGAATATCCTCCTTAG
Vgrg-qcF	CGGTGAGTCTATTTATTTAATCCGGTATTAAGGAGTCACTACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Vgrg-qcR	ACCTTTACCAATCAGTTGCATGACATCGCTGGTATGTAACATCAGCATATGAATATCCTCCTTAG
Hcp2-jdF	AGGCGTGTGCGAGAAGTAAA
Hcp2-jdR	TGTGATTCGAGGTCAGGTAA
Vgrg-jdF	AACCGGATGAAATTATCGTGTCT
Vgrg-jdR	TTTATCATCAAAAGGACGGGGACT
Kan-F	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
Kan-R	CGGCCACAGTCGATGAATCC
pKD46-F	TAGTCCTTTTCCTTTGAGTTGTGG
pKD46-R	GGTGCCTGATGGTCGGAGA

1.2 鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统 *hcp* 及 *vgrg* 基因缺失株构建

1.2.1 Red 同源重组系统操作步骤: (1) 质粒 pKD46 经电转进入鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541; (2) 各个线性打靶片段的构建(以 pKD4 为模板, 扩增的 PCR 产物为携带 FRT 位点的卡那霉素抗性基因序列及目的基因 3'端或 5'端外 56 bp 或 45 bp 的同源片段); (3) 将线性打靶片段经电转转入能表达 Red 重组酶的鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 菌中; (4) 筛选卡那霉素抗性的阳性体(一般单基因敲除阳性率极高, 达到百分之八十以上, 双基因缺失与三基因缺失阳性率较低, 本实验采取 Kan-F 和 Kan-R 与敲除目的基因的鉴定引物交叉组合鉴定及测序鉴定); (5) 携带能表达 FLP 重组酶的 PCP20 质粒消除卡那霉素抗性基因; (6) 鉴定引物筛选敲除目的基因的阳性重组体。

1.2.2 线性打靶片段构建:以质粒 pKD4 为模板, 用相应打靶片段引物和高保真酶进行 PCR 扩增。利用 PCR 产物纯化试剂盒对各 PCR 产物进行分别纯化回收, 回收产物经 Dpn1 酶 37 °C 单酶切 6–8 h, 酶切产物经胶回收试剂盒回收用于电转化。

1.2.3 CVCC541 感受态的制备以及质粒 pKD46 的电转化:(1) 37 °C 过夜培养需要敲除的靶细菌, 次日取该菌液 1 mL 加入含有 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中, 置摇床 37 °C、200 r/min 培养 4–6 h, 使菌液 OD_{600} 达到 0.6–0.8。(2) 将菌液立刻置冰水浴中冷却 30 min, 然后将 100 mL 的菌液平分为两管, 4 °C、5500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再用预冷的 10%甘油洗涤 3 次后, 加入 300 μ L 预冷的 10%甘油重悬细菌, 将重悬细菌分装于预冷的 1.5 mL EP 管中, 每管 50 μ L, 立即置–80 °C 保存待用。(3) 将 2 μ L pKD46 质粒

(80–200 ng/ μ L)加入制备好的 CVCC541 感受态细胞悬液内, 混匀, 转移至预冷的 0.2 cm 电击杯中, 用 Bio-Rad 电击仪进行电击, 电击条件为 200 Ω , 25 μ F, 电压为 2.3 kV, 电击时间为 2.5 ms, 电击后迅速加入 1 mL LB 液体培养液并混匀, 将该菌液置于 30 °C 温箱静置培养至少 1 h, 然后均匀涂布在含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平皿上, 于 30 °C 温箱培养过夜后, 挑取单个菌落于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养, 并用引物 pKD46-F/R 进行菌液 PCR 鉴定。将鉴定为阳性的 CVCC541/pKD46 菌液于 60%的甘油中保存备用。

1.2.4 CVCC541/pKD46 感受态细菌的制备以及抗性片段的电转化: (1) CVCC541/pKD46 菌液按 1:100 转接到 10 mL 的 LB 中, 并以 1:1000 加入 50 mg/mL 氨苄青霉素, 置摇床 30 °C、200 r/min 培养过夜。次日, 将菌液按 1:100 转接到 100 mL 的 LB 液体培养液中, 同时按 1:1000 加入 50 mg/mL 氨苄青霉素, 30 °C、200 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600} ≈0.2 时, 按 1:100 加入 3 mol/L 的 L-阿拉伯糖诱导至菌液 OD_{600} ≈0.6–0.8 (诱导过程至少 1 h), 然后按 1.2.3 所述步骤(2)制备 CVCC541/pKD46 感受态细胞。(2) 取 2 μ L 构建的线性打靶片段加入至 CVCC541/pKD46 感受态细胞并混匀, 然后置于预冷的电击杯内, 在电转仪电转, 电击后加入 1 mL LB 液体培养液重悬。将菌液置于 37 °C 温箱静置培养至少 1 h 后, 在含有 50 μ g/mL 卡那霉素抗性的 LB 平皿上均匀涂板, 37 °C 过夜培养, 选取长出的单菌落于 LB 液体培养基后, 用交叉鉴定引物(kan-F/目的鉴定引物 R, kan-R/目的鉴定引物 F)进行菌液 PCR 扩增鉴定, 阳性的 PCR 产物送往西安擎科泽西生物科

技有限责任公司测序, 测序结果含有卡那抗性基因片段而不含有目的基因的菌株为具有卡那抗性的基因缺失菌株。

1.2.5 质粒 pKD46 消除: 将 1.2.4 获得的基因缺失菌株在 42 °C、200 r/min 条件下培养过夜后, 涂于含有 50 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平皿上 37 °C 培养过夜, 将挑取的单菌落接种于 LB 液体培养基中, 然后分别涂布含有 50 µg/mL 卡那霉素和 50 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 在 37 °C 温箱培养, 能在卡那霉素平皿上生长而不能在氨苄青霉素平皿上生长的菌株为消除了 pKD46 质粒且具有卡那抗性的基因缺失菌株。

1.2.6 卡那霉素抗性基因及质粒 PCP20 的消除:

(1) 将消除了 pKD46 质粒且具有卡那抗性的基因缺失菌株按照 1.2.3 所述方法(1)和(2)制备成感受态细胞。(2)取 1 µL 质粒 PCP20 分别与感受态细胞混匀置于冷的电击杯内, 在电转仪电转, 电击后加入 1 mL LB 液体培养液重悬。将菌液置于 30 °C 温箱静置培养至少 1 h, 均匀涂布含有 50 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平皿, 30 °C 培养 16 h 以上后, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 在 42 °C、200 r/min 过夜培养或 37 °C、200 r/min 培养 12 h 以上, 用目的基因鉴定引物进行菌液 PCR 扩增鉴定。将鉴定为阳性的菌液分别涂于含有 50 µg/mL 卡那霉素 LB 平皿、50 µg/mL 氨苄青霉素 LB 平皿或无抗性 LB 平皿上进行鉴定筛选, 同时设置阴性与阳性对照, 挑选只能在无抗性 LB 平皿上生长且在卡那霉素 LB 平皿和氨苄青霉素 LB 平皿上均不能生长的菌株进行 PCR 扩增, 并将 PCR 产物送往西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序。测序正确后保存。

1.2.7 CVCC541 双基因缺失株与三基因缺失株敲除: 利用 Red 同源重组系统在 CVCC541 单缺失基础上进行逐个基因缺失得到各个双基因缺失株或三缺失株。

1.3 鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 亲本株及其基因缺失株感染细胞实验

1.3.1 CVCC541、CVCC541Δvrg、CVCC541Δhcp2Δvrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株的生长曲线测定实验: 分别挑取 4 个菌株的单菌落于 10 mL 的 LB 液体培养基, 在 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养培养至 $OD_{600} \approx 0.8$ 时, 分别取 1 mL 加入相应的盛有 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中振荡培养, 并每间隔 1 h 取 100 µL 液体测定 OD_{600} 值, 每个菌株做 3 个平行试验, 试验重复 3 次。另外, 在 $OD_{600} \approx 0.7$ 时, 取各菌株菌液 100 µL 分别加入 900 µL 的 PBS 中, 按照 10 倍梯度依次稀释, 取稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的菌液涂于 LB 固体培养板, 12 h 后进行菌落计数。每个梯度做 3 个平行实验, 实验重复 3 次。

1.3.2 HeLa 细胞和小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 的活力试验: 为了验证细菌感染 HeLa 细胞和小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 后细胞的活力不受影响, 将 HeLa 细胞或小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 培养于 96 孔细胞板中, 培养 CVCC541、CVCC541Δvrg、CVCC541Δhcp2Δvrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株至 $OD_{600} \approx 0.7$ 时, 分别以感染复数 MOI 为 1、10、100 接种长成单层的 HeLa 细胞或小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 的 96 孔细胞板, 并于接种 90 min、120 min、150 min、180 min 和 210 min 后, 用 counting kit-8 cck-8 细胞增殖试剂盒检测细胞的活性, 与不加细菌的对照进行相比, 每个组合做 3 个重复, 重

复试验 3 次, 以此确定最佳感染时间和最佳感染复数。

1.3.3 CVCC541、CVCC541 Δ vrg、CVCC541 Δ hcp2 Δ vrg 和 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2 Δ hcp3 菌株对 HeLa 细胞的黏附试验: 将 HeLa 细胞培养于 24 孔板(细胞计数板计数, 每孔含有大约 6×10^5 个细胞), 长成单层后, 用 PBS 轻洗 3 遍, 每孔加入 1 mL 含有细菌($OD_{600} \approx 0.7$ 和感染复数 MOI=10)的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 温箱培养 180 min, 吸去孔中液体, 用 PBS 轻洗 5 次, 为确定细胞培养孔中游离的细菌是否被清洗干净, 取最后一次洗涤液涂于无抗性的 LB 平皿并进行计数。每孔加入 500 μ L 的胰酶消化 5 min, 再加入 500 μ L 1% 的 Triton X-100 溶解混匀, 收集 100 μ L 液体倍比稀释一定梯度涂于无抗性 LB 平皿上。黏附率表示为鼠伤寒沙门氏菌感染 HeLa 细胞后, 每个 HeLa 细胞表面的平均细菌, 即每孔溶解的细菌数/每孔的细胞数。试验时每个处理设 3 个重复, 整个试验重复 3 次。为了探究 500 μ L 胰酶和 500 μ L 1% 的 Triton X-100 在消化和破碎细胞过程中是否对细菌有影响, 本实验设置 500 μ L 胰酶和 500 μ L 1% 的 Triton X-100 处理各菌株作为对照组进行菌落计数试验。

1.3.4 CVCC541、CVCC541 Δ vrg、CVCC541 Δ hcp2 Δ vrg 和 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2 Δ hcp3 菌株对 HeLa 细胞的侵袭试验: 将长成单层的 HeLa 细胞用 PBS 轻洗 3 遍, 每孔加入 1 mL 含有细菌($OD_{600} \approx 0.7$ 和感染复数 MOI=10)的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养 180 min, 吸去孔中液体, 用 PBS 洗 5 次, 为确保细胞培养孔中的细菌被洗掉, 取最后一次洗涤液涂于无抗性的 LB 平皿并计数; 根据庆大霉素保护实验^[21]以及前期的探索

试验, 选择每孔中加入 1 mL 终浓度为 300 μ g/mL 的庆大霉素 DMEM 培养基, 在 5% CO₂ 温箱培养 1 h, PBS 洗涤 5 次, 为了确保在使用抗生素后能 100% 杀死细胞外的细菌, 取最后一次洗涤液再次涂于无抗性的 LB 平皿并计数。每孔加入 500 μ L 的胰酶消化 5 min, 再加入 500 μ L 1% 的 Triton X-100 溶解混匀, 取 100 μ L 倍比稀释的菌液涂于无抗性 LB 平皿上, 计算每孔裂解液中的细菌数量。侵袭率表示为在使用庆大霉素后每个 HeLa 细胞内的平均细菌数, 即每孔裂解的细菌数/每孔接种的细胞数。试验时每个处理组设 3 个重复, 整个试验重复 3 次。

1.3.5 CVCC541、CVCC541 Δ vrg、CVCC541 Δ hcp2 Δ vrg 和 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2 Δ hcp3 菌株对小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 抗吞噬能力影响实验: 实验操作过程与 1.3.4 基本相同, 24 孔细胞板中每孔含有大约 4.6×10^5 个 RAW 264.7 细胞(细胞计数板计数)。

1.4 数据的处理

除凝胶电泳图片和碱基序列图片, 其他所有图片用 GraphPad Prism 5.0 制作完成, 所有数据用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, 结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 差异显著性分析用 Duncans 多重比较分析方法, *表示 $P < 0.05$, 差异显著, **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

2 结果和分析

2.1 CVCC541 单缺失株构建

分别用目的基因 *hcp1*、*hcp2*、*hcp3* 和 *vrg* 两侧的鉴定引物进行菌液 PCR 扩增 CVCC541 菌液, 大小分别是 845、824、645 和 2269 bp。用

目的基因 *hcp1*、*hcp2*、*hcp3* 和 *vgrg* 两侧的鉴定引物分别进行 PCR 扩增各自基因缺失株 CVCC541 Δ *hcp1*、CVCC541 Δ *hcp2*、CVCC541 Δ *hcp3* 和 CVCC541 Δ *vgrg* 菌液, 大小分别为 465、430、241 和 365 bp (图 1)。敲除后的测序结果显示在消除卡那抗性基因的过程中在基因位置残留 84 bp“疤痕序列”, 测序结果也显示该基因被敲除。以 *hcp1* 基因敲除后为例(图 2),

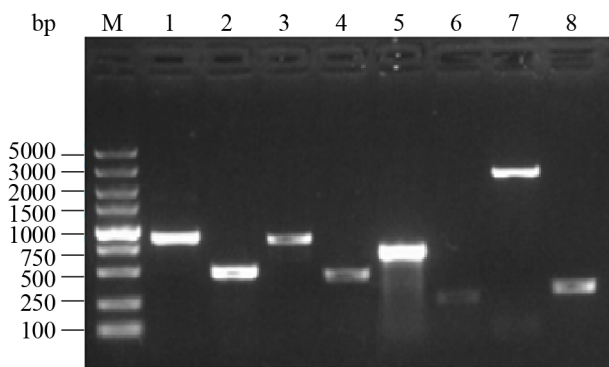


图 1. CVCC54 各单基因缺失前后的 PCR 扩增结果
 Figure 1. PCR amplification result of CVCC541 and CVCC541 single deletion strains. M: TaKaRa DL 5000 marker; lane 1, 3, 5, 7: PCR amplification results of genes *hcp1*, *hcp2*, *hcp3*, and *vgrg* in the bacteria CVCC541; lane 2: PCR amplification result of *hcp1* gene in the CVCC541 Δ *hcp1*; lane 4: PCR amplification result of *hcp2* gene in the CVCC541 Δ *hcp2*; lane 6: PCR amplification result of *hcp3* gene in the CVCC541 Δ *hcp3*; lane 8: PCR amplification result of *vgrg* gene in the CVCC541 Δ *vgrg*.

ACCTAATAAAGCAGATAAATCAGGGCTTAATTTAGGTAGTAAAAGGATAGTAGATG
 TGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAAT
 AGGAACTAAGGAGGATATTCATATGCGGCTGTTTTCCGGCCAGATTTATATCTGGCC
 GGATTATTATTTGATTTTAAA

图 2. 基因敲除后残留的碱基序列

Figure 2. Remaining base sequence after gene knockout. The red represents the 56 bp homologous sequence of the genes upstream and downstream, and the blue underlined portion indicates the remaining scar sequence after gene knockout.

序列中红色部分表示 *hcp1* 基因上下游 56 bp 同源序列, 蓝色划线部分表示 *hcp1* 基因敲除后该位置残留 84 bp 碱基的“疤痕序列”。

2.2 CVCC541 双基因缺失株构建

分别用 *hcp1*、*hcp2*、*hcp3* 和 *vgrg* 基因两侧的鉴定引物对敲除了两个基因的缺失菌株进行扩增的结果显示, 扩增得到的片段明显变小, 目的基因被敲除(图 3)。敲除后的测序结果显示在消除卡那抗性基因的过程中在每个基因位置同样残留 84 bp “疤痕序列”, 测序结果也显示该双基因同时被敲除。

2.3 CVCC541 三缺失株构建

分别用 *hcp1*、*hcp2*、*hcp3* 基因两侧的鉴定引物扩增敲除了三基因缺失的 CVCC541 菌液, 结果显示扩增得到的片段明显变小, 目的基因被敲除(图 4)。敲除后的测序结果显示在消除卡那抗性基因的过程中在每个基因缺失位置同样残留 84 bp “疤痕序列”, 测序结果也显示 *hcp1*、*hcp2* 和 *hcp3* 三个基因同时被敲除。

2.4 CVCC541、CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg* 和 CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 菌株的生长曲线测定结果

生长曲线结果显示 4 个菌株的对数生长期均为 $OD_{600}=0.3-0.9$, 与对照组 CVCC54 相比,

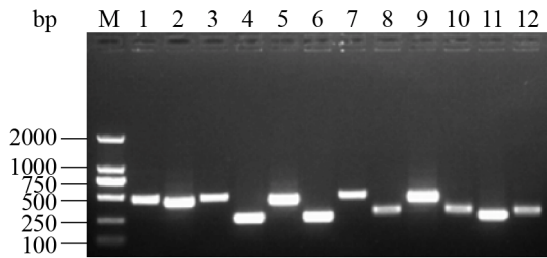


图 3. CVCC54 双基因缺失株的 PCR 扩增结果

Figure 3. PCR amplification result of CVCC541 double gene deletion strains. M: TaKaRa DL 2000 marker; lane 1–2: PCR amplification results of genes *hcp1* and *hcp2* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2*, respectively; lane 3–4: PCR amplification results of genes *hcp1* and *hcp3* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp3*, respectively; lane 5–6: PCR amplification results of genes *hcp2* and *hcp3* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp2* Δ *hcp3*, respectively; lane 7–8: PCR amplification results of genes *hcp1* and *vgrg* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp1* Δ *vgrg*, respectively; lane 9–10: PCR amplification results of genes *hcp2* and *vgrg* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg*, respectively; lane 11–12: PCR amplification results of genes *hcp3* and *vgrg* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp3* Δ *vgrg*, respectively.

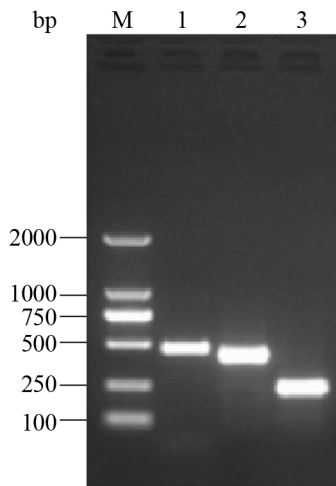


图 4. CVCC54 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 缺失株的菌液 PCR 的扩增结果

Figure 4. PCR amplification result of CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3*. M: TaKaRa DL 5000 marker; lane 1–3: PCR amplification results of genes *hcp*, *hcp2*, and *hcp3* in the bacteria CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3*, respectively.

各菌株的生长速度并无显著差异(图略)。CFU 计数实验证明,鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 在对数生长期且 $OD_{600} \approx 0.7$ 时,菌液含有 3×10^8 CFU/mL,并且 CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg* 和 CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 在对数生长期且 $OD_{600} \approx 0.7$ 时,菌落含量与 CVCC541 均在一个数量级(即 10^8 CFU/mL)。

2.5 CVCC541、CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg* 和 CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 菌株对 HeLa 细胞活力影响及感染复数 MOI 的确定

在 4 个菌株分别生长到对数生长期时($OD_{600} \approx 0.7$),以不同感染复数接种 HeLa 细胞或小鼠的巨噬细胞 RAW264.7 后,不同时间段感染后,用 counting kit-8 cck-8 试剂盒检测细胞的活性,发现 HeLa 细胞和小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 在 4 个菌株(MOI=10)感染 180 min 后,其活性均可以维持在 90%以上,为了使细菌粘附侵袭细胞最大化,而且细胞活性维持在一个较高状态,故实验选择 180 min、MOI=10 为最佳感染时间和感染复数。

2.6 CVCC541、CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg* 和 CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 菌株对 HeLa 黏附结果

与 CVCC541 粘附 HeLa 细胞(100%)相比,CVCC541 Δ *vgrg*、CVCC541 Δ *hcp2* Δ *vgrg* 和 CVCC541 Δ *hcp1* Δ *hcp2* Δ *hcp3* 的粘附率分别约为 $17.17\% \pm 2.1\%$ 、 $14.73\% \pm 2.5\%$ 和 $82\% \pm 3.7\%$ (图 5)。实验表明缺失 *hcp* 与 *vgrg* 的菌株粘附 HeLa 细胞能力均下降,但缺失 *vgrg* 基因的菌株粘附力显著下降。试验中我们发现 500 μ L 胰酶和 500 μ L 1% 的 Triton X-100 消化和破碎细胞过程中无损伤杀灭细菌作用。

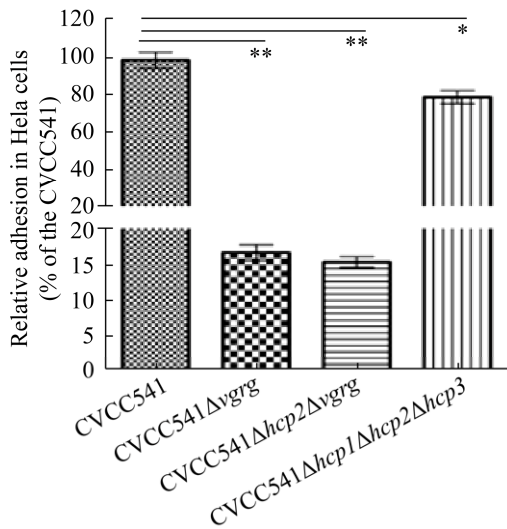


图 5. CVCC541、CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株粘附 HeLa 细胞的 CFU 比较

Figure 5. Comparison of adhesion rates of CVCC541, CVCC541Δvgrg, CVCC541Δhcp2Δvgrg, and CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 to HeLa cells. ** indicates $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

2.7 CVCC541、CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株对 HeLa 细胞的侵入结果

与 CVCC541 侵入 HeLa 细胞(100%)相比, CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 的侵入率分别约为 7.05%±1.05%、6.21%±1.35% 和 87%±3.25% (图 6)。实验数据表明缺失 hcp 与 vgrg 的菌株侵袭力均下降, 但缺失 VgrG 的菌株侵袭力显著下降。说明 VgrG 在细菌侵入上皮细胞中发挥更加显著作用, 也有可能是 Hcp 与 vgrG 相互关联发挥影响细菌进入上皮细胞的能力。

2.8 CVCC541、CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株对小鼠的巨噬细胞 RAW 264.7 抗吞噬作用影响的实验结果

与 CVCC541 在小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的

存活数量相比, CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 的存活率分别为 15.67%±2.9%、14.47%±1.87% 和 56.12%±3.48% (图 7)。实验数据表明, 与 CVCC541

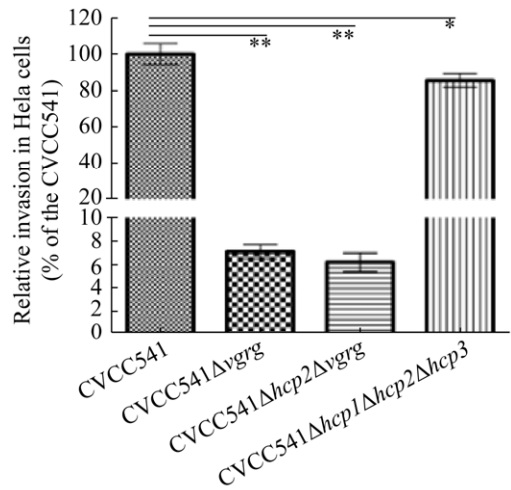


图 6. CVCC541、CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 菌株对 HeLa 细胞的侵袭率的比较

Figure 6. Comparison of invasion rates of CVCC541, CVCC541Δvgrg, CVCC541Δhcp2Δvgrg, and CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 to HeLa cells. ** indicates $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

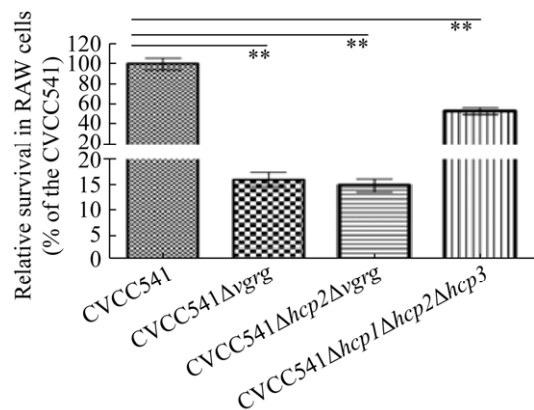


图 7. CVCC541、CVCC541Δvgrg、CVCC541Δhcp2Δvgrg 和 CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 在小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 存活的 CFU 的比较

Figure 7. The CFU comparison of CVCC541, CVCC541Δvgrg, CVCC541Δhcp2Δvgrg, and CVCC541Δhcp1Δhcp2Δhcp3 in mouse macrophage RAW 264.7. ** indicates $P < 0.01$.

菌株相比, 缺失了 *hcp* 与 *vgrg* 基因的菌株抗小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬的能力均下降, 但缺失了 *vgrg* 基因的菌株抗小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬的能力显著下降, 说明其可能在鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 逃逸巨噬细胞吞噬进而逃逸免疫监视过程中发挥巨大作用, 也有可能是 Hcp 与 VgrG 相互关联发挥这种逃逸吞噬的能力。

3 讨论

沙门氏菌可以采用多种方式逃避宿主的免疫系统监视, 从而在宿主体内较长时间存活并造成持续感染。VI型分泌系统是一种能够直接将自身蛋白分子或分泌物通过该系统递呈到其他细菌和真核细胞中的接触依赖性分泌装置, 其结构类似于 T4 噬菌体。VI型分泌系统普遍存在于动植物革兰氏阴性细菌中, 细菌可以通过该分泌系统吸取有利的营养物质或营造利己的环境。大量实验研究表明, VI型分泌系统不仅与细菌毒力、生物膜形成、应激反应、耐药基因的水平转移、金属离子的摄入和肠道菌群竞争等生理现象密切相关, 而且还参与细菌对宿主细胞的粘附侵袭、巨噬细胞的抗吞噬以及宿主免疫监视的抵抗等作用^[22-25]。VI型分泌系统至少由 13 种蛋白组成, 其中, 溶血素共调节蛋白(Hcp)和缬氨酸甘氨酸重复蛋白 G (VgrG)是标志性蛋白^[4]。与其他革兰氏阴性菌一样, 沙门氏菌同样具有VI型分泌系统。沙门氏菌的 SCI 包括编码 Hcp 样蛋白的 *sci K* 基因和编码 VgrG 样蛋白的 *vgrS* 基因, 如果缺失伤寒沙门氏菌的整个 SCI 基因岛, 其入侵真核细胞的能力将会下降^[26], 而敲除 Hcp2 基因后, 可以检测到 Hcp1 基因的表达量上升, 推测细菌为了避免过度繁殖造成自身损害, 多拷贝的 Hcp 可

以发挥一种调控同源基因并平衡同源基因的功能^[27-28]。沙门氏菌VI型分泌系统在哺乳动物肠道内细菌间的竞争中也发挥着重要的依赖性抗菌作用, 其不仅可以塑造微生物群落组成, 而且可以控制微生物群落与入侵病原体之间的相互作用, 从而促进病原菌定植。研究发现, 沙门氏菌VI型分泌系统可利用其 Hcp1 蛋白介导分泌型效应因子 Tae4 与 Hcp1 相互作用来杀死产酸克雷伯氏菌, 而其 Hcp2 则不能通过与 Tae4 相互作用来发挥杀菌功能^[30], 但猪源肠道致病性大肠杆菌的 Hcp2 则能在细菌竞争中发挥巨大作用^[23]。另一项研究发现, 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的 Hcp1 与细菌的运动能力有关, Hcp2 则介导杀伤其他细菌^[31]。另外, 研究表明, 细菌的VI型分泌系统与抗吞噬作用也有紧密联系。周宏^[32]等发现敲除产志贺毒素大肠埃希菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 分离株 F18ab⁺ 的 Hcp 基因后, 该菌的运动能力和黏附上皮细胞及抗巨噬细胞吞噬的能力均下降; 嗜水气单胞菌 Hcp 不仅具有抑制促炎细胞因子产生的作用, 同时还有诱导细胞产生免疫抑制因子的作用, 从而逃避宿主天然免疫^[33]。研究也发现, 被变形细胞阿米巴吞噬后, Hcp 基因缺陷型鼠伤寒沙门氏菌在该细胞内的定植能力下降^[29]。霍乱弧菌被巨噬细胞吞噬时, 其VI型分泌系统可利用 VgrG 与巨噬细胞肌动蛋白发生共价交联, 进而破坏巨噬细胞骨架, 使巨噬细胞失去吞噬作用^[34]。在少数沙门氏菌中还发现了一些 C-末端延伸 VgrG 蛋白, 可介导宿主细胞肌动蛋白交联, 造成细胞肽聚糖层的退化和蛋白的 ADP-核糖基化等, 从而发挥致病作用^[35]。但鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统的 VgrG 在该菌入侵上皮细胞和抗吞噬方面

是否发挥作用尚未见报道。

在本研究中, 我们成功构建了多个基因缺失株, 并对 CVCC541 Δ vgrg、CVCC541 Δ hcp2 Δ vgrg 和 CVCC541 Δ hcp1 Δ hcp2 Δ hcp31 粘附侵袭 HeLa 细胞以及抵抗小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬的能力进行了实验探索, 研究发现, 缺失 Hcp 与 VgrG 的鼠伤寒沙门氏菌菌株对 HeLa 细胞的粘附能力、侵袭力以及对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的抗吞噬能力都显著下降, 但缺失 VgrG 的菌株的粘附能力、侵袭力及抗吞噬能力下降极显著。在一定程度上说明, 鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 VI 型分泌系统的 VgrG 可能在入侵与定植上皮细胞、抗巨噬细胞吞噬及逃逸宿主免疫监视中发挥一定作用。也有可能如铜绿假单胞菌利用 Hcp-VgrG2b 结构进入 HeLa 细胞^[24]一样, 鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 VI 型分泌系统也有可能存在 Hcp-VgrG 结构共同发挥作用机制。由于 hcp 及 vgrg 基因的启动子区域及终止子区域并未见报道, 而回复株的构建需要非诱导性的启动子, 最常用的是基因本身启动子, 需要下一步的实验进行具体研究以确定其完整的调控序列。本研究构建的多个缺失株为下一步研究鼠伤寒沙门氏菌利用 VI 型分泌系统相关分子入侵上皮细胞、抗吞噬、逃逸免疫监视、介导细菌耐药、维持细菌毒力与生物被膜形成以及参与微生物菌群竞争等研究作了前期铺垫工作。

参考文献

[1] Scallan E, Mahon BE. Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) in 2012: a foundation for food safety in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54(S5): S381–S384.

[2] Schadich E, Dzubak P, Hajdich M. Role of *Salmonella* Typhi Vi antigen and secretory systems on immune response.

Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(41): 6251–6260.

[3] Young AM, Palmer AE. Methods to illuminate the role of *Salmonella* effector proteins during infection: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 363.

[4] Schwarz S, Hood RD, Mougous JD. What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends in Microbiology*, 2010, 18(12): 531–537.

[5] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528–1533.

[6] Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 2012, 483(7388): 182–186.

[7] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, 312(5779): 1526–1530.

[8] Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Reports*, 2008, 9(8): 735–741.

[9] Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 453–472.

[10] Brunet YR, Héning J, Celia H, Cascales E. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Reports*, 2014, 15(3): 315–321.

[11] Durand E, Derrez E, Audoly G, Spinelli S, Ortiz-Lombardia M, Raoult D, Cascales E, Cambillau C. Crystal structure of the VgrG1 actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* type VI secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(45): 38190–38199.

[12] Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(1): 9–21.

[13] Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 2013, 500(7462): 350–353.

[14] Folkesson A, Löfdahl S, Normark S. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in Microbiology*, 2002, 153(8): 537–545.

- [15] Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 2009, 10: 104.
- [16] Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(1): 11–17.
- [17] Blondel CJ, Jiménez JC, Contreras I, Santiviago CA. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics*, 2009, 10: 354.
- [18] Wang P, Dong JF, Zou QH. Knockout of *hcp* genes in *Salmonella typhimurium* by Red recombination system. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2529–2536. (in Chinese)
王萍, 董俊芳, 邹清华. 利用Red重组系统敲除鼠伤寒沙门氏菌VI型分泌系统相关基因. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2529–2536.
- [19] 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.
- [20] Murphy KC. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2036–2071.
- [21] Othman S, Parton R, Coote J. Interaction between mammalian cells and *Pasteurella multocida* B:2. Adherence, invasion and intracellular survival. *Microbial Pathogenesis*, 2012, 52(6): 353–358
- [22] Borgeaud S, Metzger LC, Scrinari T, Blokesch M. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*, 2015, 347(6217): 63–67.
- [23] Peng Y, Wang XR, Shou J, Zong BB, Zhang YY, Tan J, Chen J, Hu LL, Zhu YW, Chen HC, Tan C. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26816.
- [24] Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A, Jones C, Bennett KL, Filloux A, Superti-Furga G, Voulhoux R, Bleves S. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. *mBio*, 2015, 6(3): e00712-15.
- [25] Chen WJ, Kuo TY, Hsieh FC, Chen PY, Wang CS, Shih YL, Lai YM, Liu JR, Yang YL, Shih MC. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32950.
- [26] Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 2008, 154(6): 1570–1583.
- [27] 赵潘. 鼠伤寒沙门菌VI型分泌系统中溶血素共调节蛋白的功能探讨. 北京大学学位论文, 2015.
- [28] Wang P, Zou QH. Advances in hemolysin co-regulated protein of bacterial type VI secretion system. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2018, 46(3): 67–71. (in Chinese)
王萍, 邹清华. 细菌VI型分泌系统溶血素共调节蛋白研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2018, 46(3): 67–71.
- [29] Riquelme S, Varas M, Valenzuela C, Velozo P, Chahin N, Aguilera P, Sabag A, Labra B, Álvarez SA, Chávez FP, Santiviago CA. Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella typhimurium* to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1305.
- [30] Sana TG, Flaugnatti N, Lugo KA, Lam LH, Jacobson A, Baylot V, Durand E, Journet L, Cascales E, Monack DM. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(34): E5044–E5051.
- [31] Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170770.
- [32] 周虹. F18ab⁺大肠杆菌 *hcp* 基因缺失株的构建及其对重要毒力因子分泌功能的影响. 扬州大学硕士学位论文, 2012.
- [33] Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, Chopra AK. Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology*, 2010, 156(12): 3678–3688.
- [34] Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39): 15508–15513.
- [35] Blondel CJ, Jiménez JC, Contreras I, Santiviago CA. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics*, 2009, 10: 354.

Knockout and functional characteristics of CVCC541 VI secretion system related genes in *Salmonella typhimurium*

Zhilin Wang¹, Zhen Dong^{1,2,3}, Shanshan Wu¹, Wenxian Jing¹, Qiwei Chen¹, Youjun Shang¹, Wanning Wang¹, Yongsheng Liu^{1*}, Xi Lan^{1*}

¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

² College of Veterinary Medicine, Guangdong Provincial Key Laboratory of Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

³ Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Dingxi 743000, Gansu Province, China

Abstract: The type VI secretion system (T6SS) was an important secretory system found in most Gram-negative bacteria. It mediates the interaction between bacteria and bacteria and between bacteria and host cells. Haemolysin co-regulatory protein (Hcp) and valine glycine repeat protein G (VgrG) were important components of the T6SS puncturing device. However, the role of Hcp and VgrG of the *Salmonella typhimurium* type VI secretion system in the process of invading host cells and anti-phagocytosis is not completely clear. **[Objective]** The aim of this study was to inoculate eukaryotic epithelial cells and macrophages *in vitro* using the *hcp* and *vgrg* gene deletion strains constructed by gene knockout technology, and to use their parental strains as a control group, to study the role of Hcp and VgrG genes in the process of adhesion and invading epithelial cell and anti-phagocytosis. **[Methods]** We optimized the conditions in the operation of Red homologous recombination system, and established an operating system that rapidly knockout genes related to the type VI secretion system of *Salmonella typhimurium*, and successfully constructed CVCC541 single deletion strain, double deletion strain, and triple deletion strain, and HeLa cell inoculation test and colony count test were used to evaluate the adhesion and invasion ability of different strains; the macrophage RAW 264.7 inoculation test was used to evaluate the anti-phagocytic ability of different strains. **[Results]** Compared with the CVCC541 strain, the adhesion rates of CVCC541 Δ *vgrg*, CVCC541 Δ *hcp2 Δ *vgrg*, and CVCC541 Δ *hcp1 Δ *hcp2 Δ *hcg3* were 16.17% \pm 2.1%, 14.73% \pm 2.5% and 82% \pm 3.7%, respectively; the invasive rates of CVCC541 Δ *vgrg*, CVCC541 Δ *hcp2 Δ *vgrg*, and CVCC541 Δ *hcp1 Δ *hcp2 Δ *hcg3* were 7.05% \pm 1.05%, 6.21% \pm 1.35% and 87% \pm 3.25%, respectively. The survival rates of CVCC541 Δ *vgrg*, CVCC541 Δ *hcp2 Δ *vgrg* and CVCC541 Δ *hcp1 Δ *hcp2 Δ *hcg3* were 15.67% \pm 2.9%, 14.47% \pm 1.87% and 56.12% \pm 3.48%, respectively. **[Conclusion]** *Salmonella typhimurium* type VI secretion system VgrG and Hcp played an important role in the process invading host cells and anti-phagocytosis. This work created the conditions for the research mechanism of interaction between *Salmonella typhimurium* and host cells through type VI secretion system secretory system.*********

Keywords: *Salmonella typhimurium*, type VI secretion system, hemolysin co-regulatory protein (Hcp), valine glycine repeat protein G(VgrG), Red homologous recombination system

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program (2016YFD0500703, 2018YFD0502006)

*Corresponding authors. Xi Lan, Tel: +86-931-8342685, E-mail: lanxi@caas.cn; Yongsheng Liu, Tel: +86-931-8343721, E-mail: liuyongsheng@caas.cn

Received: 7 November 2019; Revised: 16 January 2020; Published online: 9 March 2020