



鼠伤寒沙门菌小 RNA RybB 及伴侣蛋白 Hfq 对孔蛋白 OmpD 的表达调控

陈世雄^{1,2}, 潘永³, 令狐远凤^{1,2}, 张家莉^{1,2}, 杨婉^{1,2}, 武绍碧^{1,2}, 叶景芬^{1,2}, 杨琦^{1,2*}

- 1 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025
- 2 贵州大学 动物疫病研究所, 贵州 贵阳 550025
- 3 贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550025

陈世雄, 潘永, 令狐远凤, 张家莉, 杨婉, 武绍碧, 叶景芬, 杨琦. 鼠伤寒沙门菌小 RNA RybB 及伴侣蛋白 Hfq 对孔蛋白 OmpD 的表达调控[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1263-1273.

CHEN Shixiong, PAN Yong, LINGHU Yuanfeng, ZHANG Jiali, YANG Wan, WU Shaobi, YE Jingfen, YANG Qi. Small RNA RybB and chaperone protein Hfq of *Salmonella* Typhimurium regulate expression of porin OmpD[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1263-1273.

摘要: 【目的】探究小 RNA (small RNA, sRNA) RybB 和伴侣蛋白 Hfq 对沙门氏菌孔蛋白 OmpD 表达的调控作用。【方法】以鼠伤寒沙门菌(*Salmonella* Typhimurium, STM)为研究对象, 将含有编码 β -半乳糖苷酶的 *lacZ* 报告基因的 pCE40 质粒转入 *ompD* 基因单缺失菌株中以获得 *lacZ* 报告菌株; 在此基础上, 利用 P22 噬菌体转导技术分在 *lacZ* 报告菌株中构建 *rybB* 全序列缺失、*hfq* 全序列缺失、*hfq* 点序列敲除和 *hfq* 序列截短以获得双突变实验菌株, 以及 *rybB* 全序列缺失和 *hfq* 全序列缺失的三突变实验菌株。通过 β -半乳糖苷酶活性试验和 RT-qPCR 探究 sRNA RybB 及伴侣蛋白 Hfq 对孔蛋白 OmpD 表达的调控作用。【结果】成功在 *lacZ* 报告菌中构建 *rybB* 全序列缺失、*hfq* 全序列缺失、*hfq* 点序列敲除和 *hfq* 序列截短等双缺失实验菌株, 以及 *rybB* 全序列缺失和 *hfq* 全序列缺失的三突变实验菌株。与野生型(wild type, WT)菌株相比, 在 *lacZ* 报告菌株中, *hfq* 基因截短为 87 个氨基酸序列的突变株中的 OmpD 蛋白活性下调了 2.16%, 其余实验株 OmpD 蛋白的 β -半乳糖苷酶活性均呈上升趋势。与 WT 菌株相比, 实验菌株 *ompD* 基因转录水平除了 STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq65* 的上调不具有显著性外, 其余实验菌株均显著($P < 0.05$)上调, 其中 *lacZ* 报告菌株、*rybB* 全序列缺失和 *hfq* 全序列缺失的三突变实验菌株 *ompD* 基因转录水平上调最明显,

资助项目: 国家自然科学基金(32260884)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260884).

*Corresponding author. E-mail: yangqinmg@163.com

Received: 2023-11-14; Accepted: 2024-01-29; Published online: 2024-01-31

为 1.83 倍。【结论】 *ompD* 基因的转录及蛋白表达主要受 *hfq* 基因和 sRNA RybB 的负反馈调节；Hfq 的远端面在对 *ompD* 基因的转录抑制中起关键作用。通过多个基因突变菌株的构建，阐述了 sRNA 伴侣蛋白 Hfq 与孔蛋白 OmpD 的相互作用关系，探索了 Hfq 对 *ompD* 的调控关键区域，丰富了 sRNA 的调控理论。

关键词：鼠伤寒沙门菌； λ -Red 同源重组；sRNA RybB；Hfq；*ompD*

Small RNA RybB and chaperone protein Hfq of *Salmonella* Typhimurium regulate expression of porin OmpD

CHEN Shixiong^{1,2}, PAN Yong³, LINGHU Yuanfeng^{1,2}, ZHANG Jiali^{1,2}, YANG Wan^{1,2}, WU Shaobi^{1,2}, YE Jingfen^{1,2}, YANG Qi^{1,2*}

1 School of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Institute of Animal Diseases, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of the small RNA (sRNA) RybB and the chaperone protein Hfq in regulating the expression of porin OmpD in *Salmonella*. **[Methods]** In this study, *Salmonella* Typhimurium (STM) was used as the research object. The pCE40 plasmid carrying the reporter gene *lacZ* encoding β -galactosidase was transferred into the single mutant lacking *ompD* to obtain the *lacZ* reporter strain. On this basis, we employed P22 phage-mediated transduction to construct the double mutants lacking full-length *rybB*, full-length *hfq*, partial sequence of *hfq*, or truncated *hfq* sequence and the triple mutant lacking full-length *rybB* and full-length *hfq*. The regulatory effects of RybB and Hfq on the expression of OmpD were probed by β -galactosidase activity assay and RT-qPCR. **[Results]** We successfully constructed the double and the triple mutant. Compared with that in the wild type (WT), the OmpD activity was down-regulated by 2.16% in the *lacZ* reporter strain with truncated sequence (87 residues) of *hfq*, and the β -galactosidase activity of OmpD increased in the rest strains. Compared with WT, except for STM LT2 Δ ompD::*lacZ* Δ hfq6, all the mutants showed up-regulated transcript level of *ompD* ($P < 0.05$), with the most significant up-regulation of 1.83-folds in the triple mutant. **[Conclusion]** The transcription and translation of *ompD* are mainly regulated by the negative feedback of *hfq* and RybB. The distal end of Hfq plays a key role in the transcriptional repression of *ompD*. By construction of several mutants, this article illustrated the interactions of RybB and Hfq with OmpD and explored the key regions of Hfq in regulating *ompD*, which enriched the theory of sRNA regulation.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; λ -Red homologous recombination; sRNA RybB; Hfq; *ompD*

沙门菌(*Salmonella*)是一种革兰氏阴性菌, 已知有超过 2 400 种不同的血清型^[1], 为全球范围内最常见的食源性致病菌之一, 可引起广泛的胃肠道和全身性疾病^[2-3]。

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella* Typhimurium, STM)是通常用于研究非编码 sRNA 功能的病原体之一^[4]。sRNA 在细菌中广泛存在, 其作用在任何生物体中都不容忽视^[5]。STM 中许多非编码 sRNA 都是在静止阶段积累的, 在这个阶段会上调许多应激反应调节因子, 如 sRNA SdsR、sRNA MicC、伴侣蛋白 Hfq 等^[6]。STM 在调节过程中, 部分 sRNA 的调节需要结合伴侣蛋白 Hfq, Hfq 使用端面结合 sRNA 形成的复合物具有保护 sRNA 降解、促使 sRNA 与靶标 RNA 结合、提高 sRNA 靶向特异性等功能^[7-8]。

STM 中孔蛋白以同源或异源三聚体的形式存在, 可形成水通道, 允许小分子量(<600 Da)的亲水分子被动转运^[9]; 细菌能通过孔蛋白形成的通道摄取细胞外营养物质以及排出细胞内废物和有毒物质, 维持细胞外环境中周质的等渗性, 孔蛋白也可作为一种保护系统抵御外来有害大分子^[10]。OmpD 是经典孔蛋白家族的成员, 也是 STM 外膜中最丰富的蛋白质^[11]。OmpD 具有免疫原性, 且在 STM 感染宿主的过程中, 该蛋白表达有利于其在宿主内克服诸多不利条件, 使其能成功感染宿主^[12]。RybB 是一种西格玛因子(σ^E)依赖性 sRNA, 可调节大肠杆菌和沙门氏菌中主要孔蛋白的合成^[13]。OmpD 作为 RybB 和 Hfq 联合调控的靶标, 在国内研究较少。*lacZ* 基因主要编码 β -半乳糖苷酶, 作为一种广泛使用的报告基因可用于研究沙门氏菌和其他病原体在不同条件下的启动子活性, 也可在细菌、出芽酵母、果蝇、小鼠等的研究中作报告基因^[14-15]。

本研究通过同源重组技术构建了 STM *ompD* 单基因缺失株与 *lacZ* 基因融合的 *lacZ* 报

告菌株, 将本课题组保存的 Hfq 远端面核心氨基酸第 25 位氨基酸残基酪氨酸突变为丙氨酸的菌株 *hfqY25A* [STM LT2 *hfq* (*TAT73-75*>*GCG*)::*tet*]、Hfq 近端面核心氨基酸第 56 位氨基酸残基赖氨酸突变为丙氨酸的菌株 *hfqK56A* [STM LT2 *hfq* (*AAG166-168*>*GCG*)::*tet*]、Hfq 蛋白 C 端分别截短至 65、72 和 87 个氨基酸的菌株: *hfq65* [STM LT2*hfq* Δ (196-306)::*tet*]、*hfq72* [STM LT2*hfq* Δ (217-306)::*tet*]、*hfq87* [STM LT2*hfq* Δ (262-306)::*tet*]以及 *hfq* 基因完全缺失株(STM LT2 Δ *hfq*::*tet*), 通过 P22 噬菌体分别与 *lacZ* 报告菌株进行双缺失; 再将 *rybB* 和 *hfq* 基因缺失菌株与 *lacZ* 报告菌株分别进行双缺失、三缺失, 以探究 *rybB*、*hfq* 基因对沙门氏菌 *ompD* 基因转录和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

鼠伤寒沙门菌野生型菌株 STM LT2 (WT)、pKD13 质粒(含有卡那霉素抗性片段)、pCE40 质粒(含有 *lacZ* 基因片段)、STM 12488 株(携带质粒 pCP20)、STM 7455 株(携带质粒 pKD46)、P22 噬菌体, 均由法国国家科学研究中心(National Centre for Scientific Research, CNRS)分子遗传学 Bossi 实验室惠赠; 邻硝基苯 β -半乳糖苷糖苷(*o*-nitrobenzene β -galactopyranoside, ONPG)购自北京索莱宝科技有限公司; 鼠伤寒沙门菌 *hfq* 基因完全缺失株菌株 MA10675 (STM LT2 Δ *hfq*::*tet*)、*hfqY25A* [STM LT2 *hfq* (*TAT73-75*>*GCG*)::*tet*]、*hfqK56A* [STM LT2 *hfq* (*AAG166-168*>*GCG*)::*tet*]、*hfq65* [STM LT2*hfq* Δ (196-306)::*tet*]、*hfq72* [STM LT2*hfq* Δ (217-306)::*tet*]、*hfq87* [STM LT2*hfq* Δ (262-306)::*tet*]、*rybB* 基因缺失株(基因型: STM LT2 Δ *rybB*::*cat*)均由本实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂

Green Taq Mix、琼脂糖、DNA 回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; GeneJET 质粒小提试剂盒、L-阿拉伯糖、R6950 Bacterial RNA Kit 和 HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒购自贵州卓一生物科技有限公司。

实验室配制 Z 缓冲液(Z buffer): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5 g, KCl 0.75 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246 g, β -巯基乙醇 2.7 mL, ddH₂O 定容至 1 L, pH 调至 7.0, 过滤除菌。

1.2 基因缺失株的构建

1.2.1 引物设计

以 NCBI 公布的鼠伤寒沙门菌 LT2 的全基因组序列(序列号为: NC_003197.2)为参考序列, 设计基因 *ompD* 的打靶片段引物及特异性验证引物。打靶片段引物序列如表 1 所示; 引物均送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 打靶片段的制备

用 GeneJET 质粒小提试剂盒提取 pKD13 质粒, 以质粒 pKD13 为模板, P1、P2 为引物进行 Touchdown PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): pKD13 模板(10 mg/L) 8 μL , P1、P2 引物(1×10^{-5} mol/L)

各 2 μL , ddH₂O 13 μL , Green Taq Mix 25 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 55 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1.5 min, 循环 5 次; 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 54 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1.5 min, 循环 5 次; 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 52 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1.5 min, 循环 15 次; 72 $^\circ\text{C}$ 8 min; 取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余产物纯化后进行下一步操作。

1.2.3 *ompD* 基因缺失株的构建

感受态细胞的制备: 挑取 STM 7455 菌株单菌落接种于 5 mL LB 中, 37 $^\circ\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养过夜, 次日 1:100 复接于 70 mL LB 中, 加入 52 μL 20% 的阿拉伯糖, 30 $^\circ\text{C}$ 振荡培养至对数早期(OD_{600} 为 0.2–0.3), 用 10% 甘油洗涤 4 次后重悬于 200 μL 的甘油中, 每管分装 50 μL 并置于冰上备用。

一次重组菌株的构建: 将纯化后 PCR 产物按 1:10 的比例与感受态细胞混合后, 2.5 kV 电压进行电转化, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 取 200 μL 涂布于卡那霉素抗性平板, 37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养, 次日挑取阳性转化子, 利用引物 P3、P4 进行鉴定。构建成功的基因命名为: STM LT2 Δ *ompA::kn*。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
P1	<u>TAAGGATTATTA</u> AAATGAAACTTAAGTTAGTGGCAGTGGC GATCCGTCGACCTGCAGTTC	1 377
P2	TGTTGTCGGTAGACACTTTAGCCGCTTTGGTGAAGTCGCT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
P3	GGCGGGCCGATATTGATATT	725
P4	ATAGCCCAGTAGCTGACATTC	
P5	TGAACTTATGCCACTCCGTC	365
P6	TGCACGGCATACTCCTTATG	
P7	TGAACTTATGCCACACTCCGTC	561
P8	ATGTGAGCGAGTAACAACCC	
P9	AAGTTAGTGGCAGTGGCAGT	115
P10	GCTGAGCGTGAACCTTACCG	

下划线标记区域为基因 *ompD* 的同源臂区域, 未标记下划线为质粒 pKD13 中 Kan 抗性扩增引物

The underlined area represents the homologous arm region of the gene *ompD*, while the unlabeled area represents the Kan resistance amplification primer in plasmid pKD13.

二次重组菌株的构建: 取 1 μL pCP20 质粒与 50 μL STM LT2 $\Delta ompA::kn$ 感受态细胞混合后, 2.5 kV 电压进行电转化, 去除 STM LT2 $\Delta ompA::kn$ 中的卡那抗性基因, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养 1 h 后涂布于氨苄青霉素抗性平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养过夜后挑取单个菌落以 P5、P6 进行验证, PCR 产物送至生工生物(上海)股份有限公司进行测序鉴定。最终获得 STM LT2 $\Delta ompD$ 。

1.3 *lacZ* 报告菌株的构建

利用 λ -Red 同源重组技术, 将 STM LT2 $\Delta ompD$ 菌株接种于 5 mL LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养过夜, 按 1.2.3 方法制备感受态细胞, 取 1 μL 质粒 pCE40 与其混合后, 2.5 kV 电压进行电转化, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养 1 h 后涂布于卡那霉素抗性平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日挑取单个菌落作为模板, 以引物 P7、P8 进行 PCR 验证, 并将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。最终获得 *lacZ* 报告菌株 STM LT2 $\Delta ompD::lacZ$ 。

1.4 缺失 *lacZ* 报告菌株中 *rybB* 和 *hfq* 基因的实验菌株构建

将 MA10675 (STM LT2 $hfq::tet$)、*hfqY25A* [STM LT2 *hfq* (TAT73–75>GCG)::*tet*]、*hfqK56A* [STM LT2 *hfq* (AAG166–168>GCG)::*tet*]、*hfq65* [STM LT2 $hfq\Delta(196–306)::tet$]、*hfq72* [STM LT2 $hfq\Delta(217–306)::tet$]、*hfq87* [STM LT2 $hfq\Delta(262–306)::tet$] 和 *rybB* 基因缺失株为供体菌, STM LT2 $\Delta ompD::lacZ$ 为受体菌, 取 P22 噬菌体肉汤与菌株 STM LT2 $\Delta ompD::lacZ$ 混合培养过夜, 次日 12 000 r/min 离心 3 min, 取离心后上清液, 加入 50 μL 氯仿振荡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后备用。取供体菌 100 μL 与受体菌 50 μL 混匀, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养 1 h 后取 30 μL 涂布于卡那霉素抗性平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 次日挑

取单个菌落进行 PCR 验证。

1.5 实验菌株中 *OmpD* 蛋白表达水平的影响

将所有实验菌株培养至 OD_{600} 为 0.4–0.7, 取菌液 100 μL 与 900 μL Z buffer 混匀, 加入 20 μL 甲苯后水浴 2 h, 再加入 200 μL ONPG (4 mg/mL), 记录起始时间 t_1 , 待溶液变黄, 立即加入 500 μL Na_2CO_3 终止液, 记录终止时间 t_2 , 最后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测 OD_{420} , 记录数值后计算 β -半乳糖苷酶活性。计算公式如下^[16]: β -半乳糖苷酶活性 = $1\ 000 \times OD_{420} / [(t_2 - t_1) \times 0.1 \times OD_{600}]$ 。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测实验菌株中 *ompD* 基因转录水平

将所有实验菌株过夜培养, 根据 R6950 Bacterial RNA Kit 提取菌株总 RNA, 以相应的菌株 RNA 作为模板反转录成 cDNA, 反转录得到的 cDNA 作为模板, 引物为 P9、P10, 进行 RT-qPCR 试验, 每个样品设置 3 个重复, 以 16S rRNA 基因作为内参, 结果采用 C_q 值法^[17] ($Q_f = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) 计算。

1.7 数据统计和分析

试验数据使用软件 GraphPad Prism 7 作图, 比较各组间的变化与差异, 并采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (one-way analysis of variance one-way, ANOVA) 和邓肯氏法 (Duncan's) 多重比较, 结果采用 (平均值 \pm 标准差) 表示。 $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *lacZ* 报告菌株构建结果

以质粒 pKD13 为模板扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 缺失株的目的条带大小为 1 377 bp (图 1A)。

对两次重组结果分别进行 PCR 鉴定, 两次重组菌株均出现与预期大小相符目的条带 (图 1B、1C)。结果显示, 两次重组菌株目的条带大小分别为 725 bp 和 365 bp。

将转入质粒 pCE40 作为模板进行 PCR 扩增, 条带与预期相符(图 1D)。结果显示目的条带大小为 561 bp, *lacZ* 报告菌株成功构建。

2.2 实验菌株构建结果

利用 P22 噬菌体转导技术构建双缺失及三缺失的实验菌株, PCR 鉴定结果显示, *rybB* 基因和 *hfq* 基因缺失菌株与 STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* 的实验菌株成功构建: STM LT2 Δ *ompD* Δ *rybB*::*cat* (图 2A)、STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *rybB*::*cat* Δ *hfq*::*tet*

(图 2B), 将 *lacZ* 报告菌株 STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* 和 *hfq* 全基因缺失、*hfq* 基因定点缺失、*hfq* 基因截短缺失的菌株进行转导, 构建实验菌株: STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*::*tet*、STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*K56A、STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*65、STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*72、STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*87 和 STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ* Δ *hfq*Y25A, PCR 扩增后条带均与预期相符(图 3), 实验菌株成功构建。

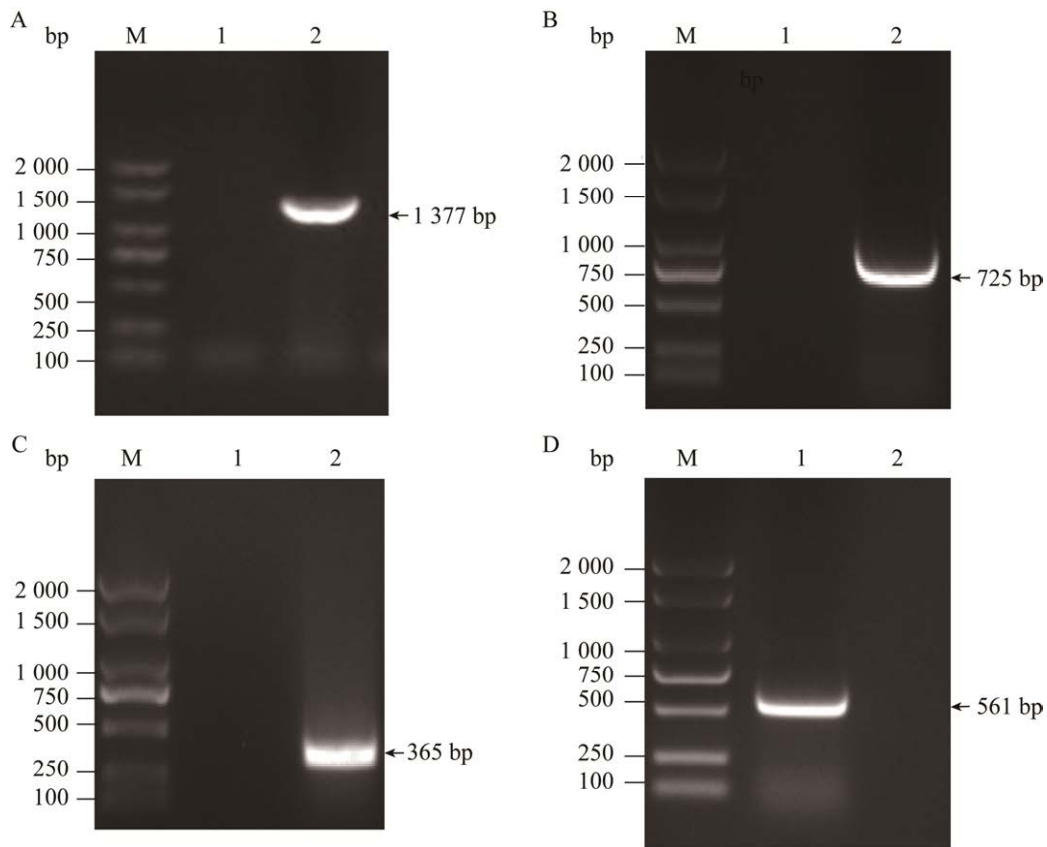


图 1 *lacZ* 报告菌株构建图

Figure 1 *lacZ* report strain construction map. A: Electrophoresis results of PCR products carrying kanamycin resistance. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template; Lane 2: Primers P1 and P2 were amplified to obtain the shooting clip. B: PCR electrophoresis results of bacteria STM LT2 *ompD*::*kn*. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template; Lane 2: Primers P3 and P4 were amplified to obtain the bacteria STM LT2 *ompD*::*kn*. C: PCR electrophoresis results of mutant STM LT2 Δ *ompD*. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template; Lane 2: Primers P5 and P6 were amplified to obtain the mutant STM LT2 Δ *ompD*. D: PCR electrophoresis results of the mutant STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ*. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Primers P7 and P8 were amplified to obtain the mutant STM LT2 Δ *ompD*::*lacZ*; Lane 2: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template.

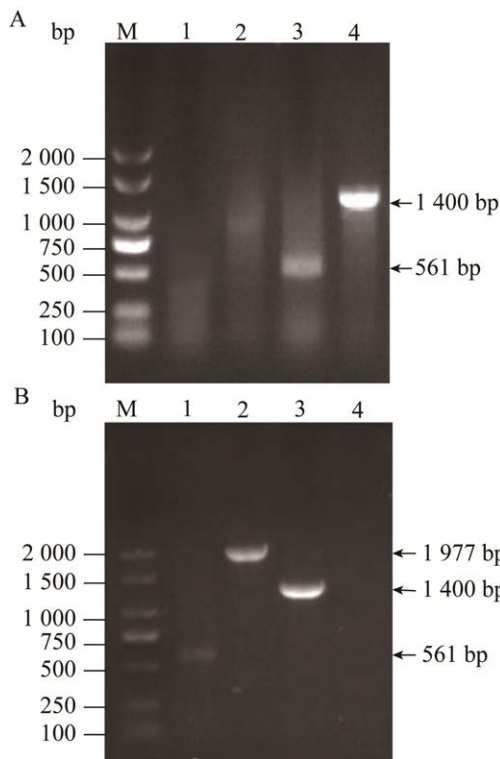


图 2 实验菌株构建结果图

Figure 2 Result map of experimental strain construction. A: Transduction construction results of *rybB* deletion strain and *ompD* of experimental strain. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template; Lane 2: Blank control; Lane 3: Verify *lacZ* gene inserted in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta rybB::cat$ strain; Lane 4: Verify chloramphenicol fragments inserted in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta rybB::cat$ strain. B: *rybB*, *hfq* deletion strains and *ompD* fusion strains transduced to construct three deletions. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Verify *lacZ* gene inserted in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq\Delta rybB$ strain; Lane 2: Verify missing *hfq* gene in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq\Delta rybB$ strain; Lane 3: Verify missing *rybB* gene in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq\Delta rybB$ strain; Lane 4: Negative control using total DNA of the wild type bacteria as the template.

2.3 实验菌株中 OmpD 蛋白表达水平

在实验株构建成功的基础上进行 β -半乳糖苷酶活性分析实验, 探知 *hfq* 基因全缺失、*hfq* 基因定点缺失、*hfq* 基因截短缺失和 *rybB* 基因缺

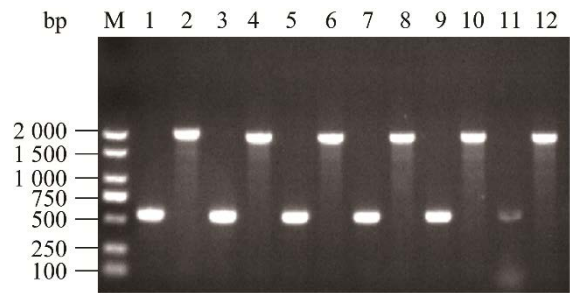


图 3 *hfq* 全序列、点序列敲除、*hfq* 序列截短菌株分别与 *ompD* 融合菌株转导构建结果

Figure 3 Results of transduction constructs of *hfq* full sequence, point sequence knockout, and *hfq* sequence truncation strains with *ompD* fusion strains. M: DL2000 DNA marker; Lane 1, 2: Verify *lacZ* gene and tetracycline fragments inserted in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq::tet$; Lane 3, 4: Verify *lacZ* gene inserted and Hfq protein lacks the 56th amino acid near the end face in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfqK56A$; Lane 5, 6: Verify *lacZ* gene inserted and Hfq protein deletion to the 25th amino acid in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfqY25A$; Lane 7, 8: Verify *lacZ* gene inserted and Hfq protein deletion to the 87th amino acid in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq87$; Lane 9, 10: Verify *lacZ* gene inserted and *hfq* gene deletion to the 72th amino acid in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq72$; Lane 11, 12: Verify *lacZ* gene inserted and the 65th amino acid at the distal end of the Hfq protein was missed in STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq65$.

失对 OmpD 蛋白水平表达的影响, 并使用软件 GraphPad Prism 7 进行作图 and 数据分析。结果显示: 与 WT 菌株相比, 所有实验菌株的 OmpD 的 β -半乳糖苷酶活性除 STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq87$ 外均有所升高, STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfqY25A$ 、STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfqK56A$ 、STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq65$ 、STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq72$ 、STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq$ 、STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta rybB$ 和 STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq\Delta rybB$ 依次上升 1.76、1.29、1.13、1.04、1.79、1.88 和 2.06 倍(图 4), 以上实

实验菌株中所缺失基因对 OmpD 蛋白都具有负反馈调节作用, 其中 STM LT2 Δ ompD::*lacZ* Δ hfq Δ rybB 上调最明显; 与 WT 菌株相比, STM LT2 Δ ompD::*lacZ* Δ hfq87 中 OmpD 蛋白下调了 2.16%。

2.4 实验菌株中 *ompD* 基因转录水平

使用荧光定量 PCR 检测实验菌株中 *ompD*

基因转录水平的影响, 并使用软件 GraphPad Prism 7 进行作图和数据分析。结果显示(图 5), 与 WT 相比, 实验菌株 *ompD* 基因转录水平除 STM LT2 Δ ompD::*lacZ* Δ hfq65 的上调不具有显著性外, 其余菌株均显著($P < 0.05$)上调, 所有实验菌株中 *ompD* 基因转录水平上调趋势依次为 1.67、

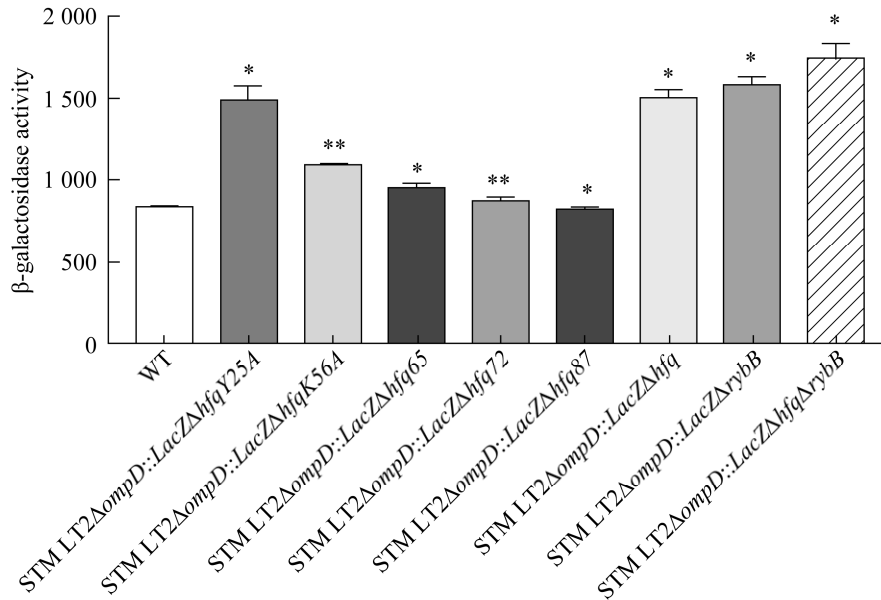


图 4 实验菌株中 OmpD 蛋白表达水平

Figure 4 Expression levels of OmpD protein in experimental strains. * indicates significant difference ($P < 0.05$), **, ***, **** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$). The same below.

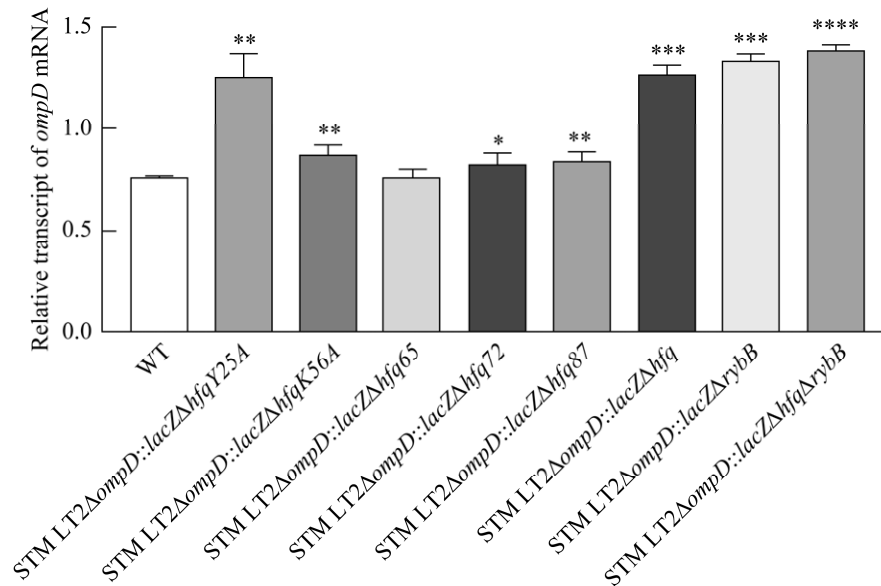


图 5 实验菌株中 *ompD* 基因转录水平

Figure 5 Transcription levels of *ompD* gene in experimental strains.

1.06、1.01、1.10、1.12、1.68、1.77 和 1.83 倍, 其中 STM LT2 $\Delta ompD::lacZ\Delta hfq\Delta rybB$ 实验菌株中 *ompD* 基因转录水平上调最明显。结果表明, Hfq 和 sRNA RybB 对 *ompD* 基因转录水平具有负反馈调节作用。

3 讨论与结论

革兰氏阴性菌的外膜含有密集的孔蛋白, 外膜结合的 β -桶状蛋白有助于运输盐、糖、营养物质、多肽、氨基酸和维生素等^[18]。许多细菌通过孔蛋白来改变其外膜通透性, 以产生对抗生素、抗菌肽等耐药性^[19-20]。大多数肠杆菌科都需要丰富的外膜孔蛋白 OmpA、OmpC、OmpD 和 OmpF 来产生抗生素耐药性, 例如在鼠伤寒沙门氏菌中, OmpA、OmpC、OmpD 和 OmpF 这 4 种孔蛋白在对两种广谱 β -内酰胺类抗生素头孢他啶和美罗培南等产生耐药性方面有着重要作用^[18-21]; Chowdhury 等^[18]研究表明, 敲除 *ompA* 基因后, 增加了外膜通透性并促进抗生素的进入, 使抗生素对其更具杀伤性。所以对孔蛋白的研究有助于了解细菌耐药性, 对开发抗菌药物有重要意义。

细菌包膜应激反应是由包膜损伤或包膜蛋白过度合成、错误折叠不断积累时触发的, 由 σ^E 介导, 激活 σ^E 途径会导致主要 *omp* mRNA 的快速下调, 防止未组装的包膜蛋白大量聚积, 并在需要包膜重塑的条件下释放易位和折叠装置^[23]。在沙门菌中, σ^E 控制的非编码 sRNA RybB 是维持包膜稳态的主要调节因子之一^[13]。如图 4、图 5 所示, 缺失 sRNA RybB 的菌株表现出对 OmpD 蛋白活性及 *ompD* 基因的转录表达的明显上调, 呈现负反馈调节趋势。RNA 伴侣蛋白 Hfq 在细菌生理学中作用众多, sRNA RybB 可以与伴侣蛋白 Hfq 近端面、远端面及侧面 3 个位置分别结

合成复合物, 从而对靶标 mRNA 进行调节^[22]; Hfq 突变远端面的菌株相对于 Hfq 突变近端面和 3 株 Hfq C 端截短突变的菌株, *ompD* 基因的转录量及蛋白表达量增长幅度明显, 显示 Hfq 对 *ompD* 基因的调节主要集中在远端面上, 说明 Hfq 的远端面对 *ompD* 基因的转录抑制中起关键作用。推测 Hfq 远端面的突变, 可能导致 Hfq 与 RybB 的结合障碍, 使两者不能形成相应的复合物, 降低 sRNA RybB 对 *ompD* 基因的抑制; 也可能是影响了 Hfq 蛋白与 *ompD* 基因上的某段序列的直接结合, 从而不能催化 sRNA RybB 对 *ompD* 基因的转录降解作用。

Hfq 蛋白有多个面可与 RNA 结合, 且能同时结合多个 RNA; Hfq 蛋白的 C 端本质上是无序的、灵活的, 该结构特点有助于 Hfq 与 RNA 底物的相互作用^[24]。研究证实 *hfq* mRNA 转录后的表达受 Hfq 反馈调节, Hfq 蛋白同时与 *hfq* mRNA 5'-UTR-55-50 的富 U 以及 -20 至 +4 包含核糖体结合位点的序列结合, 抑制 *hfq* mRNA 的翻译^[25]。在潘永^[26]研究中, 对 Hfq 蛋白的 C 端进行截短后均导致 Hfq 蛋白水平上调。结合本试验, 对 Hfq 蛋白的非结构化 C 端突变后, Hfq 蛋白水平上调, 应该加强其对 *ompD* 基因转录和蛋白的抑制作用, 然而在本实验中 *ompD* 基因转录和蛋白表达并未表现出明显的抑制作用, 甚至表现出轻微的促进作用。据此推测, *hfq* 基因进行突变和截短处理后, 可能改变了 Hfq 蛋白分子构象, 破坏了 *ompD* 基因与 Hfq 六聚体以远端面为主要结合面的关键作用位点, 导致对 Hfq 蛋白 C 端进行截短处理后, *ompD* 基因转录和蛋白表达并未表现出明显变化, 具体调控机制则需进行更为深入的研究确证。

试验通过 β -半乳糖苷酶活性试验、RT-qPCR 试验检测实验菌株中 *ompD* 基因转录水平和蛋白表达水平的变化。缺失 *hfq* 基因和 *rybB* 基因

均使 *ompD* 基因转录和蛋白表达水平上调, 显示 Hfq 和 sRNA RybB 对 *ompD* 基因具有负调控作用; *hfq* 定点突变和截短缺失对 *ompD* 基因转录和蛋白表达水平产生不同程度的影响, 表明 *ompD* 基因在 Hfq 的结合位置主要集中在远端面, Hfq 的近端面和非结构 C 端对 *ompD* 基因也有一定调节作用, 但并非主要调节。目前沙门氏菌中被鉴定出许多具有调节作用的 sRNA, 一些 sRNA 在对 mRNA 调节过程中都有 Hfq 蛋白参与, 三者间相互作用方式不尽相同, 值得进行更深入研究和探索。

参考文献

- [1] MEYER T, STRATMANN-SELKE J, MEENS J, SCHIRRMANN T, GERLACH GF, FRANK R, DÜBEL S, STRUTZBERG-MINDER K, HUST M. Isolation of scFv fragments specific to OmpD of *Salmonella* Typhimurium[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 147(1/2): 162-169.
- [2] AGRAWAL S, KULABHUSAN PK, JOSHI M, BODAS D, PAKNIKAR KM. A high affinity phage-displayed peptide as a recognition probe for the detection of *Salmonella* Typhimurium[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231: 40-45.
- [3] JUNG B, PARK S, KIM E, YOON H, HAHN TW. *Salmonella* Typhimurium lacking *phoBR* as a live vaccine candidate against poultry infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 266: 109342.
- [4] VOGEL J. A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(1): 1-11.
- [5] ADKAR-PURUSHOTHAMA CR, IYER PS, SANO T, PERREAULT JP. sRNA profiler: a user-focused interface for small RNA mapping and profiling[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1771.
- [6] FRÖHLICH KS, PAPPENFORT K, BERGER AA, VOGEL J. A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(8): 3623-3640.
- [7] SAUER E, SCHMIDT S, WEICHENRIEDER O. Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(24): 9396-9401.
- [8] WROBLEWSKA Z, OLEJNICZAK M. Hfq assists small RNAs in binding to the coding sequence of *ompD* mRNA and in rearranging its structure[J]. *RNA*, 2016, 22(7): 979-994.
- [9] NIKAIDO H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(20): 5853-5859.
- [10] VALERO-PACHECO N, BLIGHT J, ALDAPA-VEGA G, KEMLO P, PÉREZ-TOLEDO M, WONG-BAEZA I, KURIOKA A, PEREZ-SHIBAYAMA C, GIL-CRUZ C, SÁNCHEZ-TORRES LE, PASTELIN-PALACIOS R, ISIBASI A, REYES-SANDOVAL A, KLENERMAN P, LÓPEZ-MACÍAS C. Conservation of the OmpC porin among typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* serovars[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 10: 2966.
- [11] CALDERÓN IL, MORALES E, CARO NJ, CHAHÚAN CA, COLLAO B, GIL F, VILLARREAL JM, IPINZA F, MORA GC, SAAVEDRA CP. Response regulator *ArcA* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium downregulates expression of OmpD, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide[J]. *Research in Microbiology*, 2011, 162(2): 214-222.
- [12] IPINZA F, COLLAO B, MONSALVA D, BUSTAMANTE VH, LURASCHI R, ALEGRÍA-ARCOS M, ALMONACID DE, AGUAYO D, CALDERÓN IL, GIL F, SANTIVIAGO CA, MORALES EH, CALVA E, SAAVEDRA CP. Participation of the *Salmonella* OmpD porin in the infection of RAW_{264.7} macrophages and BALB/c mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111062.
- [13] BALBONTÍN R, FIORINI F, FIGUEROA-BOSSI N, CASADESÚS J, BOSSI L. Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in *Salmonella enterica*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(2): 380-394.
- [14] AVIV G, GAL-MOR O. *lacZ* reporter system as a tool to study virulence gene regulation in bacterial pathogens[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1734: 39-45.
- [15] KLIMOVA N, CHU SW, TURCOTTE B. A *lacZ* reporter with high activity in the human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2021, 21(2): foab013.
- [16] 宋洁, 侯兵兵, 叶江, 吴海珍, 张惠展. 大肠杆菌 Small RNA EsrE 的转录调控. *微生物学通报*, 2020,

- 47(5): 1430-1440.
- SONG J, HOU BB, YE J, WU HZ, ZHANG HZ. Transcriptional regulation of small RNA *EsrE* in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1430-1440.
- [17] TAYLOR SC, NADEAU K, ABBASI M, LACHANCE C, NGUYEN M, FENRICH J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 761-774.
- [18] CHOWDHURY AR, MUKHERJEE D, SINGH AK, CHAKRAVORTTY D. Loss of outer membrane protein A (OmpA) impairs the survival of *Salmonella* Typhimurium by inducing membrane damage in the presence of ceftazidime and meropenem[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2022, 77(12): 3376-3389.
- [19] NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2003, 67(4): 593-656.
- [20] PILONIETA MC, ERICKSON KD, ERNST RK, DETWEILER CS. A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(23): 7243-7252.
- [21] HU WS, CHEN HW, ZHANG RY, HUANG CY, SHEN CF. The expression levels of outer membrane proteins STM1530 and OmpD, which are influenced by the CpxAR and BaeSR two-component systems, play important roles in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(8): 3829-3837.
- [22] SITTKA A, PFEIFFER V, TEDIN K, VOGEL J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(1): 193-217.
- [23] PAPPENFORTH K, PFEIFFER V, MIKA F, LUCCHINI S, HINTON JCD, VOGEL J. SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global *omp* mRNA decay[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(6): 1674-1688.
- [24] BEICH-FRANDBSEN M, VECEREK B, KONAREV PV, SJÖBLOM B, KLOIBER K, HÄMMERLE H, RAJKOWITSCH L, MILES AJ, KONTAXIS G, WALLACE BA, SVERGUN DI, KONRAT R, BLÄSI U, DJINOVIC-CARUGO K. Structural insights into the dynamics and function of the C-terminus of the *E. coli* RNA chaperone Hfq[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(11): 4900-4915.
- [25] MORITA T, AIBA H. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene[J]. *RNA*, 2019, 25(2): 264-276.
- [26] 潘永. 沙门菌中伴侣蛋白 Hfq 与小 RNA GcvB 及其靶基因 *oppA* 的调控机理分析[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2021.
- PAN Y. Analysis of the regulatory mechanism of the chaperone protein Hfq with the small RNA GcvB and its target gene *oppA* in *Salmonella*[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2021 (in Chinese).