

鼠伤寒沙门菌 *greA/B* 基因缺失株的构建及生物学特性

叶景芬^{1,2}, 陈世雄^{1,2}, 武绍碧^{1,2}, 杨婉^{1,2}, 潘永³, 廖怡雯^{1,2}, 罗雪^{1,2},
杨琦^{1,2*}

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

叶景芬, 陈世雄, 武绍碧, 杨婉, 潘永, 廖怡雯, 罗雪, 杨琦. 鼠伤寒沙门菌 *greA/B* 基因缺失株的构建及生物学特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 644-654.

YE Jingfen, CHEN Shixiong, WU Shaobi, YANG Wan, PAN Yong, LIAO Yiwen, LUO Xue, YANG Qi. Construction and biological characterization of *greA/B*-deleted *Salmonella* Typhimurium strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 644-654.

摘要: 沙门菌作为一种常见的人畜共患病原体, 可导致多种食源性疾病, 其中鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella* Typhimurium, STM) 是关键血清型之一, 其研究与防控对公共卫生具有重要意义。【目的】探究 *greA* 和 *greB* 基因对鼠伤寒沙门菌生物学特性和致病性的影响。【方法】运用 Red 同源重组技术构建 *greA* 和 *greB* 基因缺失株及其回补株, 并对其生长特性、生物被膜形成能力、对 Caco-2 细胞的黏附及侵袭能力进行检测; 利用小鼠模型评估了 *greA* 和 *greB* 基因缺失对 STM 致病性的影响。【结果】成功构建了突变株 STM LT2Δ*greA* 和 STM LT2Δ*greB*; 与野生株相比, *greA* 和 *greB* 基因的缺失均不影响其生长速度, 但导致 STM 的生物被膜形成能力、黏附力、侵袭力均有所下降; *greA* 和 *greB* 缺失降低了 STM 对小鼠肝、脾的定殖力, 并使得 STM 的 LD₅₀ 分别上升了 39.81 倍和 2.5 倍。【结论】*greA* 和 *greB* 基因的缺失均可降低鼠伤寒沙门菌的致病性, 本研究结果为进一步揭示沙门菌的致病机理提供了理论基础。

关键词: 鼠伤寒沙门菌; 转录延伸因子; *greA*; *greB*; 生物特性

资助项目: 国家自然科学基金(32260884); 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2024]一般086号)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260884) and the Guizhou Provincial Program on Commercialization of Scientific and Technological Achievements (QKH [2024] 086).

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

Received: 2024-07-13; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-11-22

Construction and biological characterization of *greA/B*-deleted *Salmonella* Typhimurium strains

YE Jingfen^{1,2}, CHEN Shixiong^{1,2}, WU Shaobi^{1,2}, YANG Wan^{1,2}, PAN Yong³, LIAO Yiwen^{1,2}, LUO Xue^{1,2}, YANG Qi^{1,2*}

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

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

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

Abstract: *Salmonella* as common zoonotic pathogens can cause a variety of foodborne diseases. *Salmonella* Typhimurium (STM) is one of the key serotypes, and the research, prevention, and control of STM are of great significance to public health. **[Objective]** To investigate the effects of *greA* and *greB* on the biological characteristics and pathogenicity of STM. **[Methods]** Red homologous recombination was employed to construct the *greA*- and *greB*-deleted STM strains well as the complemented strains. The strains were then characterized in terms of growth characteristics, biofilm formation, and adhesion and invasion in Caco-2 cells. Mouse models were used to evaluate the effects of *greA* and *greB* deletion on STM pathogenicity. **[Results]** The mutant strains STM LT2Δ*greA* and STM LT2Δ*greB* were successfully constructed. Compared with the wild-type strain, the deletion of *greA* and *greB* did not affect the cell growth rate, while inhibiting the biofilm formation, adhesion, and invasion of STM. In addition, the deletion of *greA* and *greB* decreased the colonization of STM in the liver and spleen of mice, increasing the LD₅₀ of STM by 39.81 times and 2.5 times, respectively. **[Conclusion]** The deletion of *greA* and *greB* could reduce the pathogenicity of STM. This finding provides a theoretical basis for further revealing the pathogenicity of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; transcription elongation factor; *greA*; *greB*; biological characteristics

肠炎沙门菌(*Salmonella enterica*)是全球范围内重要的食源性病原体, 而鼠伤寒沙门菌(*Salmonella* Typhimurium, STM)则是导致人类及家畜感染的主要血清型之一, 宿主感染 STM 后会引发胃肠炎、败血症等疾病, 严重时甚至可致宿主死亡^[1-2]。因此, 加强 STM 的监测、预防与控制, 对于保障人类健康与促进畜牧业的可持续发展具有重要意义。此外, 鼠伤寒沙门菌因其感染率高、生长条件简单以及容易培养等特性,

长期以来一直被视为研究沙门菌的模型菌株^[3]。

转录延伸因子(transcription elongation factor)广泛分布于原核生物中。基因表达的首要环节是转录, 然而, 转录过程往往会遭遇 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)的暂停与回溯, 这些现象能导致转录异常, 而转录延伸因子通过与 RNAP 二级通道发生相互作用, 有效预防转录延伸过程中的停滞, 从而增强转录效率, 并进而调控基因的表达^[4]。目前, 细菌中的转录延伸因

子 GreA 和 GreB (统称 Gre 因子)已被证实有 3 方面的作用。(1) 增强细菌的环境适应力与生存竞争力: 多项研究数据表明, 在面临诸如营养饥饿、酸性环境、热休克等环境压力时, GreA 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[5]、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)^[6]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[7]、热带根瘤菌 (*Rhizobium tropici*)^[8]、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)^[9]等多种细菌中, 能够通过调节自身表达水平, 从而提高细菌对环境压力的适应性和生存能力;(2) 关联细菌致病性机制: Gaviria-Cantin 等^[10]通过敲除 STM 的 *greA* 和 *greB* 基因, 证明 Gre 因子介导了 *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1)毒力岛的主要调控因子 *hilD* 的转录调控路径, 进而间接削弱了 STM 对宿主上皮细胞的侵袭能力;(3) 调控细菌生物膜形成: 研究表明, Gre 因子能够抑制 *csgD* 基因的表达, 导致生物膜细胞外基质中的 2 个主要促进成分——淀粉样纤维和胞外多糖的产生减少, 从而影响了细菌生物膜的形成^[11]。

鉴于 Gre 因子在多种细菌中的重要功能, 以及 STM 中 Gre 因子的编码基因 *greA*、*greB* 高度保守, 本研究利用 Red 同源重组技术构建了 STM 转录延伸因子 *greA* 和 *greB* 单基因突变株 STM LT2Δ*greA* 及 STM LT2Δ*greB*, 并对其生物学相关特性进行检测, 旨在为进一步研究 *greA* 和 *greB* 对细菌致病性的作用研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞

鼠伤寒沙门菌野生株 MA3409 (STM LT2)、MA6950 (含 pKD13 质粒)、MA7455 菌株 (含 pKD46 质粒)、MA12488 (含 pCP20 质粒)、P22 噬菌体均由法国巴黎第十一大学分子遗传学波

西实验室惠赠; Caco-2 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

2×Taq PCR Master Mix、DL2000 Plus DNA Marker 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、结晶紫均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; L-阿拉伯糖、DMEM 高糖培养基、胎牛血清 FBS、绿色荧光核酸染料均购自北京索莱宝科技有限公司; GeneJET 质粒小提试剂盒购自赛默飞世尔科技公司; 其余试剂均为分析纯。

1.1.3 实验动物

实验动物为 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 购自江苏华创信诺医药科技有限公司; 该研究已通过贵州大学实验动物伦理分委员会审批(审批号: EAE-GZU-2022-E060)。

1.2 *greA* 和 *greB* 基因缺失株及回补株的构建

1.2.1 构建菌株的引物设计

基于 NCBI 上公布的 STM LT2 的全基因组序列 (NC_003197.2), 针对 *greA* 基因设计替换 *greA* 的外源 DNA 扩增引物 P1/P2、回补株构建的 *greA* 全基因扩增引物 P3/P4、*greA* 基因缺失及回补鉴定的 P5/P6; 针对 *greB* 基因设计替换 *greB* 的外源 DNA 扩增引物 P7/P8、回补株构建的 *greB* 全基因扩增引物 P9/P10、*greB* 基因缺失及回补鉴定的 P11/P12。引物信息如表 1 所示, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 *greA* 和 *greB* 基因缺失株的构建

基于 Red 同源重组原理, 构建 *greA* 和 *greB* 基因缺失株, 基因缺失原理如图 1A 所示(以 *greA* 缺失为例): (1) 以 pKD13 质粒为模板, 通过含有靶基因同源序列的 F1Fa、F2Fb (即表 1 中的引物对 P1/P2)扩增含有 Kn 抗性基因及 FRT 位点的打靶片段; (2) 将(1)中获得的打靶片段电

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size (bp)
P1	<u>TCCACTTTAAGCACTTCGTATTCCACATCG</u> <u>CCGCCAGGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u>	1 377
P2	<u>TGCGCGAAGAGCTGGATTTTCTGAAATCTGTGCGCCGTC</u> <u>CGATCCGTCGACCTGCAGTTC</u>	
P3	ACTGCTTAAAGGTATTCCAC	510
P4	CTACAGGAATGTTCAAGAGG	
P5	CTCATCGTCGCCAACAAT	254
P6	AAATCATCGCCGCTATCG	
P7	<u>GACAGCAAAGGTAAATCAACGAGATGAAAA</u> <u>CGCCCTGATGATCCGTCGACCTGCAGTTC</u>	1 377
P8	<u>GACGTATTTCGATCGCATTGACGTACCAGTTT</u> <u>GCTTCGCCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u>	
P9	CCGTGTGCGCAATATCGACAG	533
P10	GGCTTAGGATTCTTCTTGTC	
P11	TCAATTATCTCTGGCGTGAA	267
P12	CGACAATGCGGAACTTCA	

表中下划线部分为靶基因的同源重组区两侧的同源序列。

The underlined part of the table is the homologous sequence on both sides of the homologous recombination region of the target gene.

转至含 pKD46 质粒的感受态细胞中；(3) 在 pKD46 质粒中，3 种酶(Exo、Bet、Gam)的作用下发生同源重组，将 Kn 抗性基因置换入宿主染色体，37 °C 培养消除 pKD46 质粒，次日挑取阳性转化子；(4) 将 pCP20 质粒二次电转至(3)中获得的阳性转化子内以消除 Kn 抗性基因，37 °C 培养消除 pCP20 质粒，获得 *greA* 缺失株。以上述相同方式构建 *greB* 缺失株。

分别使用引物对 P5/P6、P11/P12 对基因缺失株进行 PCR 验证，若无扩增条带，表明 *greA* 和 *greB* 基因成功缺失，并将验证正确的缺失株分别命名为 STM LT2Δ*greA* 和 STM LT2Δ*greB*。

1.2.3 *greA* 和 *greB* 基因回补株的构建

构建 *greA* 和 *greB* 基因缺失回补株，基因缺失回补原理如图 1B 所示(以 *greA* 缺失为例)：(1) 以 STM LT2 基因组为模板，使用引物对 P3/P4 扩增 *greA* 全序列，将其连接入 pMD19-T

载体；(2) 将(1)中获得的重组质粒电击转化入 STM LT2Δ*greA* 感受态细胞中，获得 *greA* 缺失回补株。以上述相同方式构建 *greB* 缺失回补株。

分别使用引物对 P5/P6、P11/P12 对基因缺失回补株进行 PCR 验证，若扩增条带分别为 254 bp 和 267 bp，表明回补株构建成功，并将验证正确的回补株分别命名为 STM LT2Δ*greA*::*greA* 和 STM LT2Δ*greB*::*greB*。

1.3 生长特性检测

将 STM LT2、STM LT2Δ*greA* 及 STM LT2Δ*greB*、STM LT2Δ*greA*::*greA*、STM LT2Δ*greB*::*greB* 分别接种于 5 mL LB 内，置于 37 °C、170 r/min 振荡条件下培养约 12 h 后，转接至新的 5 mL LB 内，并将各菌液初始 *OD*₆₀₀ 调整为 0.01；将调整后的菌液继续置于 37 °C、170 r/min 振荡条件下培养 8 h，培养期间每隔 1 h 测量并记录各菌液 *OD*₆₀₀ 值，实验重复 3 次。

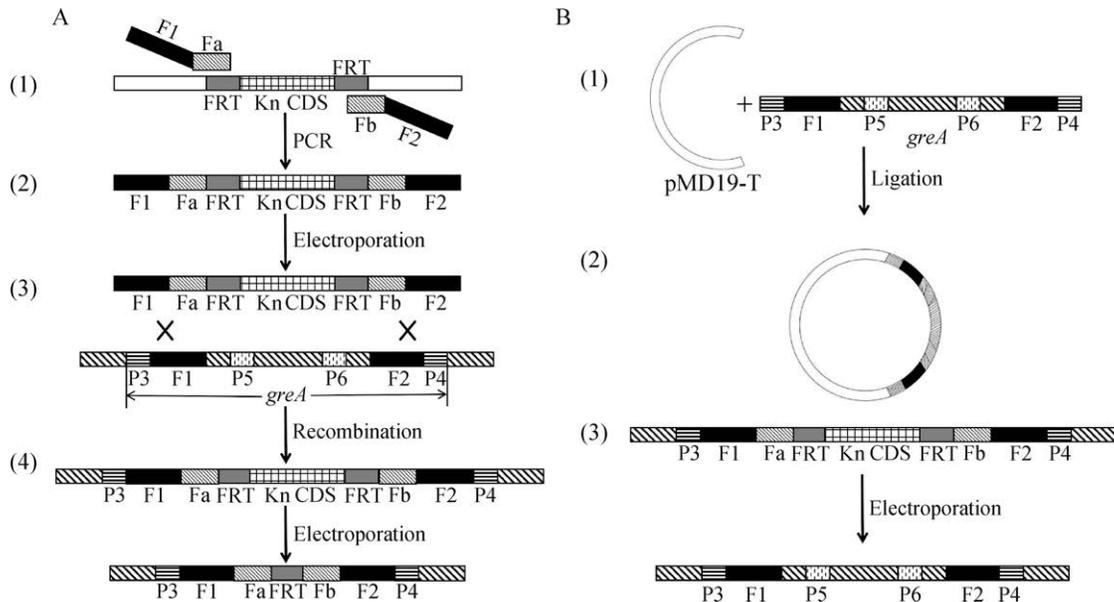


图1 基因缺失及基因缺失回补原理模式图。A: 基因缺失原理模式图; B: 基因缺失回补原理模式图。F1: 目的基因上游同源臂; F2: 目的基因下游同源臂; Fa: pKD13上游引物; Fb: pKD13下游引物; FRT: 同源重组酶识别位点; Kn CDS: 卡那霉素抗性基因编码序列; P3/P4: *greA*全基因扩增引物; P5/P6: *greA*基因缺失验证引物。

Figure 1 Schematic diagram of gene deletion and gene deletion compensation. A: Schematic diagram of gene deletion; B: Schematic diagram of gene deletion compensation. F1: Upstream homology arm of the target gene; F2: Downstream homology arm of the target gene; Fa: pKD13 upstream primer; Fb: pKD13 downstream primer; FRT: Homologous recombinase recognition site; Kn CDS: Kanamycin resistance gene coding sequence; P3/P4: *greA* whole gene amplification primers; P5/P6: *greA* gene deletion validation primers.

1.4 生物被膜形成能力检测

取复苏后 STM LT2、STM LT2 Δ *greA*、STM LT2 Δ *greB*、STM LT2 Δ *greA::greA* 及 STM LT2 Δ *greB::greB* 菌液各 50 μ L 复接于 5 mL LB 中, 培养至生长对数期($OD_{600}=0.8-0.9$), 96 孔板中每孔加入 150 μ L LB 和 5 μ L 菌液, 其中两排不加菌液作空白对照, 将 96 孔板置入 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h; 小心弃净 96 孔板中培养液, 无菌 PBS 洗板 3 次; 甲醛固定 15 min 后弃去, 无菌 PBS 洗板 3 次; 2% 结晶紫染色 20 min 后弃去, 无菌 PBS 洗板 3 次; 95% 的乙醇溶解孔内结晶紫, 检测孔内液体 OD_{575} 值。实验重复 3 次。

1.5 细菌黏附、侵袭试验

将 24 孔板内生长至 90% 的 Caco-2 细胞用无菌 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入经抗 MEM 重悬后的 STM LT2、STM LT2 Δ *greA*、STM LT2 Δ *greB*、STM LT2 Δ *greA::greA* 及 STM LT2 Δ *greB::greB* 菌液[感染复数(MOI)=100]各 20 μ L 以侵染 Caco-2 细胞, 室温 1 000 r/min 离心 5 min, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 1 h, 培养结束后用 PBS 洗涤细胞板 3 次, 每孔加入 1 mL 1% Triton X-100 裂解细胞, 倍比稀释后取 100 μ L 细胞裂解液进行涂板计数, 测定细菌的黏附率, 重复 3 次。同时, 将上述各菌株感染后的细胞以 1 mL/孔加入含 100 μ g/mL 庆大霉素的 20% DMEM, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 1 h,

PBS 洗去未黏附的细胞, 每孔加入 1 mL 1% Triton X-100 裂解细胞, 倍比稀释后取 20 μ L 细胞裂解液进行涂板计数, 测定细菌的侵袭率, 实验重复 3 次。黏附率计算如公式(1)所示, 侵袭率计算如公式(2)所示。

$$\text{黏附率} = (\text{黏附细胞细菌数} / \text{孔内感染细菌数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{侵袭率} = (\text{侵入胞内细菌数} / \text{孔内感染菌数}) \times 100\% \quad (2)$$

1.6 小鼠体内致病性实验

将 110 只雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠, 随机分为 22 组, 其中, STM LT2 感染组、STM LT2 Δ *greA* 感染组、STM LT2 Δ *greB* 感染组各 7 组为实验组, 剩余 1 组为空白对照组; 根据活菌计数结果, 将浓度梯度分别为 $1.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^1$ CFU/mL 的各菌液以 0.2 mL/只腹腔注射接种小鼠, 同时设立腹腔注射等量 PBS 对照组, 每间隔 6 h 观察 1 次小鼠死亡数量及精神状况, 连续观察 21 d, 利用寇氏改良法公式计算各实验菌株的半数致死量(LD₅₀)。

将 36 只雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 12 组, 每组 3 只, 其中, 1-4 组、5-8 组、9-12 组小鼠分别腹腔注射 1.0×10^4 CFU/mL 的各菌株菌液 0.1 mL; 在攻毒后 24 h 时取 1、5、9 组, 48 h 时取 2、6、10 组, 72 h 时取 3、7、11 组, 96 h 时取 4、8、12 组, 分别进行颈椎脱臼处死后, 无菌采集肝脏及脾脏; 按照每 0.05 g 组织加入 995 μ L PBS 进行研磨, 研磨液 10 倍稀释至适宜浓度进行涂板计数, 计算小鼠肝、脾脏的载菌量, 结果取平均值。

1.7 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 8.0 对各菌株生长特性、生物被膜形成能力、侵染 Caco-2 细胞的结果、小鼠肝、脾组织载菌量进行差异显著性分析。实验结果以平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表

示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, ns 表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *greA*、*greB* 基因缺失株及回补株的构建结果

使用引物对 P5/P6、P11/P12 分别验证缺失株 STM LT2 Δ *greA*、STM LT2 Δ *greB*, 以及回补株 STM LT2 Δ *greA*::*greA*、STM LT2 Δ *greB*::*greB*。*greA* 缺失、回补验证中, STM LT2 及 STM LT2 Δ *greA*::*greA* 条带大小均为 254 bp 且 STM LT2 Δ *greA* 无条带; *greB* 缺失、回补验证中, STM LT2 及 STM LT2 Δ *greB*::*greB* 条带大小均为 267 bp 且 STM LT2 Δ *greB* 无条带, 与预期相符(图 2A、2B)。结果表明, 缺失株 STM LT2 Δ *greA*、STM LT2 Δ *greB*, 以及回补株 STM LT2 Δ *greA*::*greA*、STM LT2 Δ *greB*::*greB* 均构建成功。

2.2 生长特性检测结果

分别将 STM LT2、STM LT2 Δ *greA*、STM LT2 Δ *greB*、STM LT2 Δ *greA*::*greA*、STM LT2 Δ *greB*::*greB* 在同等条件下培养 8 h, 每间隔 1 h 测定细菌的 OD₆₀₀ 值, 并绘制生长曲线。结果如图 3 所示, *greA*、*greB* 缺失株及回补株的生长速度相对于野生株无明显差异。

2.3 生物被膜形成能力检测结果

各菌株的生物被膜形成能力如图 4 所示, 与野生株相比, *greA* 和 *greB* 基因的敲除均使 STM 的生物被膜形成能力极显著($P < 0.01$)下降, 但 *greA* 基因缺失较 *greB* 基因缺失影响更为显著; 而回补株 STM LT2 Δ *greA*::*greA*、STM LT2 Δ *greB*::*greB* 的生物被膜形成能力并无显著变化。

2.4 黏附力、侵袭力检测结果

如图 5A、5B 所示, 与野生株相比, STM LT2 Δ *greA* 对 Caco-2 细胞的黏附力、侵袭力均极

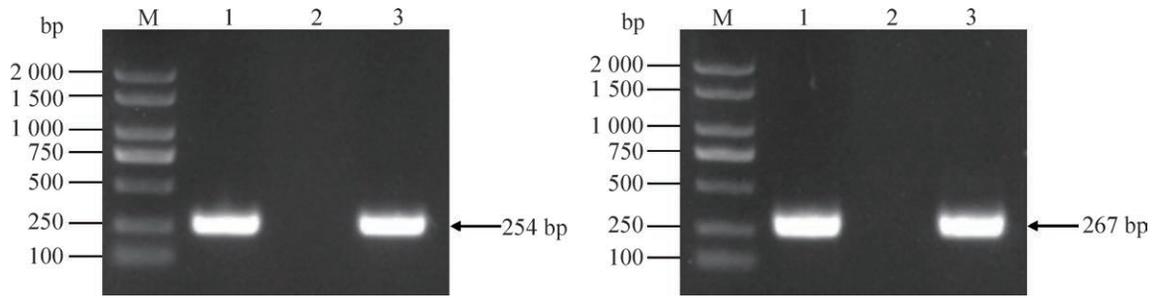


图2 *greA*、*greB*基因缺失株及回补株的构建结果。A: *greA*重组菌株构建的PCR电泳结果(M: DL2000 DNA Marker; 1: STM LT2; 2: STM LT2 Δ *greA*; 3: STM LT2 Δ *greA*::*greA*); B: *greB*重组菌株构建的PCR电泳结果(M: DL2000 DNA Marker; 1: STM LT2; 2: STM LT2 Δ *greB*; 3: STM LT2 Δ *greB*::*greB*)。

Figure 2 The results of the construction of *greA* and *greB* gene deletion strains and the back strains. A: PCR electrophoresis results of *greA* recombinant strains (M: DL2000 DNA Marker; 1: STM LT2; 2: STM LT2 Δ *greA*; 3: STM LT2 Δ *greA*::*greA*); B: PCR electrophoresis results of *greB* recombinant strains construction (M: DL2000 DNA Marker; 1: STM LT2; 2: STM LT2 Δ *greB*; 3: STM LT2 Δ *greB*::*greB*).

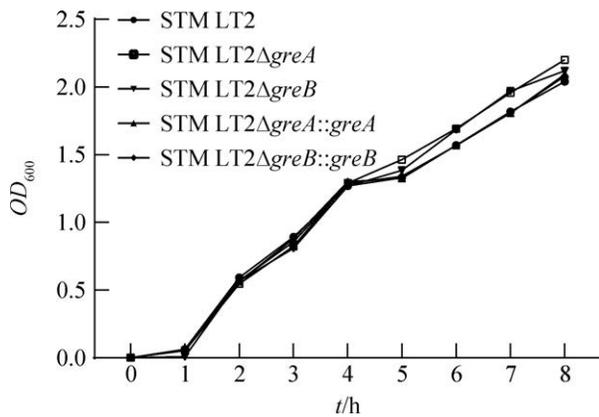


图3 生长曲线的测定结果

Figure 3 Growth curves measurement results.

显著($P < 0.01$)降低; STM LT2 Δ *greB* 对 Caco-2 细胞的黏附力极显著($P < 0.01$)降低, 侵袭力显著($P < 0.05$)降低; 而回补株 STM LT2 Δ *greA*::*greA*、STM LT2 Δ *greB*::*greB* 的黏附力、侵袭力均无显著变化。

2.5 小鼠体内致病性检测结果

野生株和基因缺失株感染小鼠的致病力结果如表 2 所示, 通过寇氏改良法公式计算得出 STM LT2、STM LT2 Δ *greA* 和 STM LT2 Δ *greB* 的 LD₅₀ 分别为 $1 \times 10^{1.9}$ 、 $1 \times 10^{3.5}$ 、 $1 \times 10^{2.3}$; 相对于

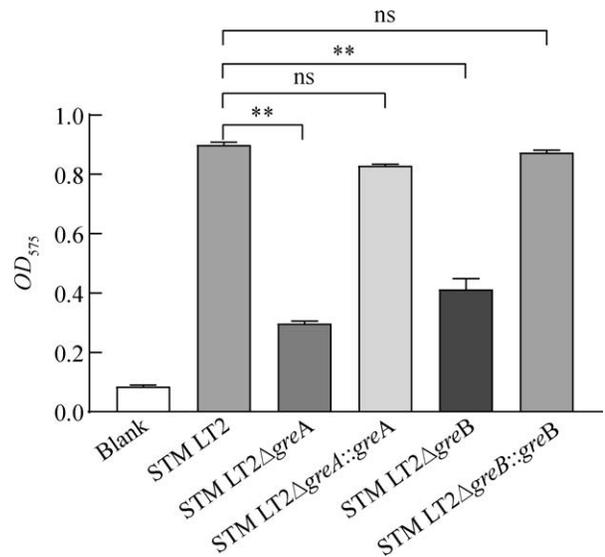


图4 细菌生物被膜96孔板检测结果。**: 差异极显著($P < 0.01$); ns: 无显著性差异。

Figure 4 Bacterial biofilm 96-well plate assay results. **: Extremely significant difference ($P < 0.01$); ns: No significant difference.

STM LT2, *greA*、*greB* 基因缺失导致 STM 的 LD₅₀ 值分别上升了 39.81 倍和 2.5 倍, 表明 *greA* 和 *greB* 基因对沙门氏菌的毒力有明显的影响。

野生株和基因缺失株的肝、脾载菌能力结

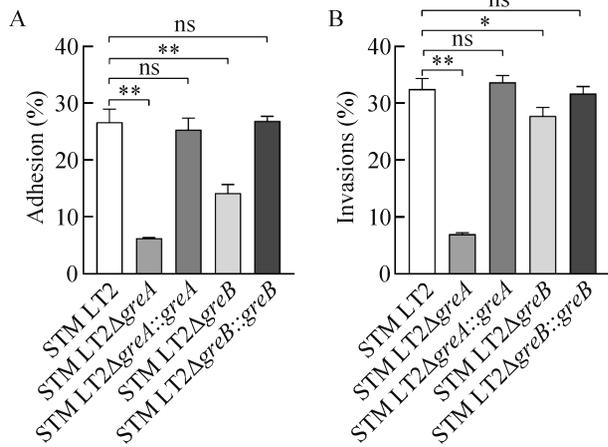


图5 细菌的黏附力、侵袭力结果。A: 黏附性结果; B: 侵袭力结果。*: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$); ns: 无显著性差异。

Figure 5 Results of bacterial adhesion and invasion. A: Adhesion results; B: Invasion results. *: Significant difference ($P<0.05$); **: Extremely significant difference ($P<0.01$); ns: No significant difference.

表2 细菌LD₅₀测定

Table 2 Determination of LD₅₀ for bacteria

攻毒剂量 Challenge dose	小鼠死亡数量/每组总数 Number of mouse deaths/Total number per group			
	PBS	STM LT2	STM LT2ΔgreA	STM LT2ΔgreB
1×10^7	0/5	5/5	5/5	5/5
1×10^6		5/5	5/5	5/5
1×10^5		5/5	5/5	5/5
1×10^4		5/5	4/5	5/5
1×10^3		5/5	1/5	5/5
1×10^2		3/5	0/5	1/5
1×10^1		0/5	0/5	0/5
LD ₅₀		$1 \times 10^{1.9}$	$1 \times 10^{3.5}$	$1 \times 10^{2.3}$

果如图 6、图 7 所示, 与野生株相比, STM LT2ΔgreA 的肝脏载菌量在所有检测时间段均发生极显著下降($P<0.01$), 脾脏载菌量除 24 h 无显著变化外, 其余时间段均发生极显著下降($P<$

0.01); STM LT2ΔgreB 的肝脏载菌量在所有检测时间段均发生显著下降($P<0.05$), 脾脏载菌量除 24 h 无显著变化外, 其余时间段均发生显著下降($P<0.05$)。

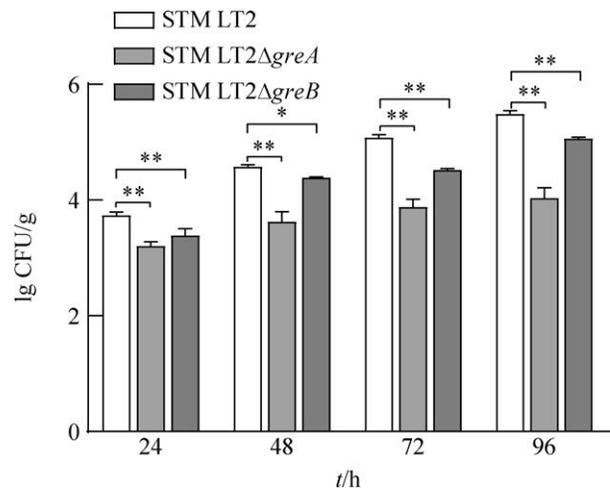


图6 肝脏载菌量。*: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$)。

Figure 6 Bacterial load in liver. *: Significant difference ($P<0.05$); **: Extremely significant difference ($P<0.01$).

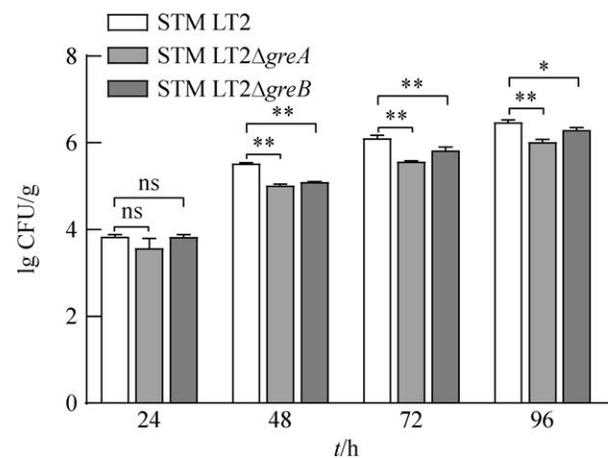


图7 脾脏载菌量。*: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$); ns: 无显著性差异。

Figure 7 Bacterial load in spleen. *: Significant difference ($P<0.05$); **: Extremely significant difference ($P<0.01$); ns: No significant difference.

3 讨论与结论

greA 和 *greB* 基因编码的 Gre 转录延伸因子在 DNA 的转录过程中发挥着重要作用^[12]。在基因表达的首个步骤——转录中的延伸阶段，DNA 常因调控序列的错误结合导致 RNAP 回溯失活，进而引起转录异常，但 Gre 转录延伸因子能够加速异常 RNA 复合物的裂解，从而重新激活转录^[10,13-14]。近年来的研究表明，Gre 不仅确保转录过程的正常进行，还作为细菌的全局调控因子发挥着重要作用。因此，本研究采用 Red 同源重组技术，缺失了 STM 菌株中转录延伸因子编码基因 *greA* 和 *greB*，并比较了野生株与基因缺失株之间的相关特性，探究了 Gre 转录延伸因子对细菌生物学特性的影响。

Gre 因子的反回溯活性可影响细菌基因组的精确、高效表达，进而为细菌供应生长过程中必需的蛋白质及其他生物分子，以保证细菌正常生长与代谢。Stepanova 等^[15]通过比较分析大肠杆菌野生株与大肠杆菌 *greA* 缺失株转录组，发现 GreA 上调的操纵子主要负责蛋白质合成及细菌能量代谢过程。然而，在本研究中，*greA/B* 基因的敲除对于细菌的生长速度并无明显影响，这表明在特定条件下，Gre 因子对 STM 生长特性的影响可能相对有限，或者存在其他具有相似作用的调控因子以补偿 Gre 因子的缺失。这一推测在大肠杆菌中得到验证：Vinella 等^[16]发现大肠杆菌 GreA 过表达可抑制 *dksA* 突变体的生长缺陷，表明 DksA 和 GreA/GreB 具有相似的功能。同样作为转录调控因子的 DksA，其突变往往导致转录过程异常，进而破坏基因表达的整体平衡^[17]；而 GreA 的过表达能够补偿 *dksA* 突变带来的这种不平衡，暗示了 GreA 在转录延伸阶段的作用与 DksA 在转录起始及早期延伸阶段的调控之间存在某种协同或互补关系。尽管在本研究中 *greA/B* 的缺失对 STM 菌株的生

长速度无显著影响，但这并不排除 Gre 因子在特定环境条件下或特定基因表达背景下发挥关键作用的可能性。细菌作为高度适应性的生物体，其基因表达调控网络往往包含多个层次的备份机制，以确保在面临各种环境压力时能够维持生存和繁殖能力。因此，下一步研究应通过结合不同的实验条件和环境因素以全面评估 Gre 因子在细菌生长与代谢中的贡献。

生物被膜，作为细菌在生物或非生物表面形成的复杂结构，其内部细菌群体被胞外聚合物基质紧密包裹，这一特性显著增强了细菌的生存、繁殖及致病潜能^[18]。在本研究中，与野生株相比，缺失株 STM LT2Δ*greA*、STM LT2Δ*greB* 的生物被膜形成能力出现了不同程度的降低，尤其是 STM LT2Δ*greA* 的生物被膜形成能力受损明显。Gaviria-Cantin 等^[11]、Liu 等^[19]研究发现，Gre 因子的存在与 *csgD* 基因的表达水平高度相关，而 *csgD* 作为 STM 生物被膜形成的主要调节因子，能够激活胞外多糖纤维素、卷曲菌毛以及生物膜相关蛋白的生物合成，促使细菌从浮游状态过渡到群体状态转变，从而推动生物被膜的形成；当 *greA/B* 基因缺失后，*csgD* 基因的表达受到抑制，进而降低了 STM 的生物被膜形成能力。此外，STM 成功定植于组织后，会迁移到组织表面形成生物被膜，并借助生物被膜进行大量增殖，同时产生相应的侵入性组织细胞蛋白以发挥致病作用。因此，生物被膜形成能力的降低不仅揭示了细菌群体行为的变化，还从机制上解释了缺失菌株在小鼠感染模型中肝、脾载菌量减少的原因，凸显了生物被膜在细菌致病过程中的重要性。

细菌的黏附性、侵袭力及在小鼠体内的致病性实验结果均表明，*greA/B* 基因的缺失会导致 STM 致病性降低。Gaviria-Cantin 等^[10]的研究进一步揭示了 Gre 因子缺失导致细菌致病性降

低的具体机制: Gre 因子的缺失会间接导致 STM 中 SPI-1 (*Salmonella* pathogenicity island 1) 负责编码的效应蛋白(如 SipA、HilD、SopE 等)表达降低, 这些效应蛋白是细菌侵入宿主细胞和细胞内生存的关键毒力因子, 其表达水平的降低直接影响了 STM 的侵袭能力和在宿主内的定殖能力, 最终导致了细菌整体毒力的显著下降。此外, STM 的基因组结构复杂, 携带了大量辅助基因, 这些辅助基因包括与细菌致病性相关的不同遗传元件, 如基因组岛、质粒和噬菌体^[20]。值得注意的是, 这些辅助基因的表达则需要 Gre 因子的存在^[12]; Gre 通过调控辅助基因的表达, 间接影响细菌的毒力、生存能力和适应性, 进一步证明 Gre 因子在细菌致病过程中的重要性。

综上所述, *greA/greB* 基因在 STM 的致病性中发挥重要作用。然而, 要深入了解这些基因具体的调节机制, 以及 *greA/B* 基因之间是否存在协同或拮抗效应, 还需要进行更为深入的实验研究。通过对 *greA/B* 基因缺失株的生物学特性的探究, 为沙门氏菌毒力及致病性研究及沙门氏菌减毒活疫苗的开发提供了实验证据和理论依据。

参考文献

- [1] 路娟娥, 张彪, 邓磊, 刘素可, 武陶, 阮海华. 胞嘧啶单碱基编辑技术与 λ -Red同源重组技术构建鼠伤寒沙门氏菌 SlyA 敲除菌株的比较研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2545-2559.
LU JE, ZHANG B, DENG L, LIU SK, WU T, RUAN HH. Comparative study on construction of SlyA knockout strain of *Salmonella typhimurium* using CRISPR/Cas9-guided-cytidine base editor and λ -Red homologous recombination technology[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2545-2559 (in Chinese).
- [2] 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 SX, PAN Y, LINGHU YF, ZHANG JL, YANG W, WU SB, YE JF, YANG Q. Small RNA RybB and chaperone protein Hfq of *Salmonella Typhimurium* regulate expression of porin OmpD[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1263-1273 (in Chinese).
- [3] NEWSON JP, GAISSMAIER MS, McHUGH SC, HARDT WD. Studying antibiotic persistence *in vivo* using the model organism *Salmonella Typhimurium*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 70: 102224.
- [4] JHA RK, UDUPA S, RAI AK, RANI P, SINGH PR, GOVIND S, NAGARAJA V. Conditional down-regulation of GreA impacts expression of rRNA and transcription factors, affecting *Mycobacterium smegmatis* survival[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 5802.
- [5] VÖLKER U, ENGELMANN S, MAUL B, RIETHDORF S, VÖLKER A, SCHMID R, MACH H, HECKER M. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 1994, 140 (Pt 4): 741-752.
- [6] FENG SY, LIU Y, LIANG WF, EL-SAYED AHMED MAE, ZHAO ZH, SHEN C, ROBERTS AP, LIANG LJ, LIAO LY, ZHONG ZJ, GUO ZW, YANG YQ, WEN X, CHEN HT, TIAN GB. Involvement of transcription elongation factor GreA in *Mycobacterium* viability, antibiotic susceptibility, and intracellular fitness[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 413.
- [7] SUSA M, KUBORI T, SHIMAMOTO N. A pathway branching in transcription initiation in *Escherichia coli* [J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(6): 1807-1817.
- [8] NOGALES J, CAMPOS R, BenABDELKHALEK H, OLIVARES J, LLUCH C, JUAN SJ. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(3): 225-232.
- [9] 崔国林. 转录调节因子 GreA 对土拉弗朗西斯菌环境适应性和致病性的影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
CUI GL. Effects of transcription regulator GreA on environmental adaptability and pathogenicity of *Lafranchise terrestris*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [10] GAVIRIA-CANTIN T, EL MOUALI Y, le GUYON S, RÖMLING U, BALSALOBRE C. Gre factors-mediated control of *hilD* transcription is essential for the invasion of epithelial cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(4): e1006312.
- [11] GAVIRIA-CANTIN T, VARGAS AF, MOUALI YE, JIMÉNEZ CJ, CIMDINS-AHNE A, MADRID C, RÖMLING U, BALSALOBRE C. Gre factors are required for biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by targeting transcription of the *csgD* gene[J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 1921.
- [12] GAVIRIA-CANTIN T, FERNÁNDEZ-COLL L, VARGAS AF, JIMÉNEZ CJ, MADRID C, BALSALOBRE C. Expression of accessory genes in *Salmonella* requires the presence of the Gre factors[J]. Genomics, 2024, 116(1): 110777.
- [13] PROSHKIN S, RAHMOUNI AR, MIRONOV A,

- NUDLER E. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation[J]. *Science*, 2010, 328(5977): 504-508.
- [14] QIAN J, CARTEE A, XU WX, YAN Y, WANG B, ARTSIMOVITCH I, DUNLAP D, FINZI L. Reciprocating RNA Polymerase batters through roadblocks[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3193.
- [15] STEPANOVA E, LEE J, OZEROVA M, SEMENOVA E, DATSENKO K, WANNER BL, SEVERINOV K, BORUKHOV S. Analysis of promoter targets for *Escherichia coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(24): 8772-8785.
- [16] VINELLA D, POTRYKUS K, MURPHY H, CASHEL M. Effects on growth by changes of the balance between GreA, GreB, and DksA suggest mutual competition and functional redundancy in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 261-273.
- [17] MYKA KK, GOTTESMAN ME. DksA and DNA double-strand break repair[J]. *Current Genetics*, 2019, 65(6): 1297-1300.
- [18] 贺丽莎, 杨灼, 冉蕾, 陈红伟, 杨洪早. 噬菌体防治细菌生物被膜相关感染的研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(10): 3670-3684.
- HE LS, YANG Z, RAN L, CHEN HW, YANG HZ. Research progress of phages in prevention and treatment of bacterial biofilm-associated infections[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(10): 3670-3684 (in Chinese).
- [19] LIU Z, NIU H, WU SY, HUANG R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(1): e1.
- [20] FÀBREGA A, VILA J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 308-341.