

假结核耶尔森氏菌 T6SS 效应蛋白 TseN 功能鉴定

任兆锐¹,刘永德^{*2},顾亚洲²,杨彦涛¹,汪宇迪¹,宋莉¹,李长富¹,朱玲芳¹, 王瑶^{*1},沈锡辉¹

- 1 西北农林科技大学 生命科学学院 作物抗逆与高效生产全国重点实验室 陕西省农业与环境微生物重点 实验室,陕西 杨凌 712100
- 2 庆阳陇沣海绵城市建设管理运营有限责任公司, 甘肃 庆阳 745000

任兆锐, 刘永德, 顾亚洲, 杨彦涛, 汪宇迪, 宋莉, 李长富, 朱玲芳, 王瑶, 沈锡辉. 假结核耶尔森氏菌 T6SS 效应蛋白 TseN 功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1491-1506.

REN Zhaorui, LIU Yongde, GU Yazhou, YANG Yantao, WANG Yudi, SONG Li, LI Changfu, ZHU Lingfang, WANG Yao, SHEN Xihui. Functional characterization of the T6SS effector TseN in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1491-1506.

摘 要:【背景】细菌六型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)广泛分布于革兰氏阴性细菌,在 细菌定殖、环境适应、细菌-宿主互作等过程中发挥重要作用; T6SS 对致病菌假结核耶尔森氏菌 (Yersinia pseudotuberculosis)的致病性有重要作用。【目的】探究假结核耶尔森氏菌 T6SS 基因簇编 码的潜在效应蛋白 T6SS 分泌型效应核酸酶(T6SS secreted effector nuclease, TseN)的生理生化特性 及其生物学功能。【方法】通过生物信息学分析锁定潜在的 T6SS 效应蛋白 TseN 及其免疫蛋白 T6SS 分泌型免疫核酸酶(T6SS secreted immune nuclease, TsiN); 构建相关重组质粒转化大肠杆菌 (Escherichia coli),利用生长曲线测定等方法探究 TseN 的细菌毒性及 TsiN 免疫活性;通过细菌 双杂交试验验证 TseN 与 TsiN 的相互作用; 纯化蛋白, 通过体外 DNA 酶活实验明确 TseN 的 DNA 酶活特性;利用同源重组等技术构建假结核耶尔森氏菌 tseN基因缺失菌株(ΔtseN),并构建回补菌 株[ΔtseN(tseN)],确证 TseN 在细菌竞争、抵抗胁迫等方面的功能。【结果】表达 TseN 的大肠杆菌 生长受到显著抑制,共表达 TsiN 的菌株生长恢复,并且 TsiN 通过与 TseN 直接相互作用来中和其 毒性。TseN 可以结合 DNA, 具有 Mn²⁺依赖的 DNA 水解酶活性。相较于野生型菌株, ΔtseN 介导 细菌种内或种间竞争的能力显著减弱,并且 $\Delta tseN$ 的生物膜形成受到显著影响,面对高盐、低 pH 等胁迫条件时存活率显著降低,以上情况在回补菌株中得到一定恢复。【结论】TseN 是假结核耶 尔森氏菌 T6SS 分泌的 Mn²⁺依赖的 DNA 水解酶,具有较强的细菌毒性作用; TsiN 是其免疫蛋白, 保护假结核耶尔森氏菌免受 TseN 的毒性作用。TseN 介导假结核耶尔森氏菌参与细菌竞争,有助

资助项目:国家重点研发计划(2018YFA0901200);国家自然科学基金(32170130, 31970114)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200) and the National Natural Science Foundation of China (32170130, 31970114).

^{*}Corresponding authors. E-mail: WANG Yao, wangyao@nwsuaf.edu.cn; LIU Yongde, qy_lyd@sina.com Received: 2024-07-02; Accepted: 2024-08-19; Published online: 2024-09-25

于其占据生态位。同时,能促进假结核耶尔森氏菌的生物膜形成、高盐和低 pH 等胁迫耐受能力。 关键词: 假结核耶尔森氏菌; T6SS; 效应蛋白; 免疫蛋白; 功能鉴定

Functional characterization of the T6SS effector TseN in *Yersinia pseudotuberculosis*

REN Zhaorui¹, LIU Yongde^{*2}, GU Yazhou², YANG Yantao¹, WANG Yudi¹, SONG Li¹, LI Changfu¹, ZHU Lingfang¹, WANG Yao^{*1}, SHEN Xihui¹

1 State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Qingyang Longfeng Sponge City Construction Management Operation Co., Ltd., Qingyang 745000, Gansu, China

Abstract: [Background] The type VI secretion system (T6SS) with wide distribution in Gram-negative bacteria plays important roles in bacterial colonization, environmental adaptation, and bacterium-host interactions. T6SS is crucial for the pathogenicity of Yersinia To investigate the physiological and biochemical pseudotuberculosis. [Objective] characteristics and the biological function of the potential effector TseN encoded by the T6SS gene cluster of Y. pseudotuberculosis. [Methods] The bioinformatics analysis was performed to identify the potential T6SS effector TseN and its immune protein TsiN. Recombinant plasmids were constructed and transformed into Escherichia coli, and growth curves were established to evaluate the toxicity of TseN to bacteria and the immune activity of TsiN. The bacterial two-hybrid system was used to verify the interaction between TseN and TsiN. The in vitro DNA nuclease activity assay was employed to confirm the DNA nuclease activity of the purified TseN. Y. pseudotuberculosis mutant with tseN deletion ($\Delta tseN$) was constructed by homologous recombination, and a complemented strain ($\Delta tseN(tseN)$) was generated to examine the roles of TseN in bacterial competition and stress resistance. [Results] The expression of TseN significantly inhibited the growth of E. coli, which was restored in the strain co-expressing TseN and TsiN. The result indicated that TsiN neutralized the toxicity of TseN by direct interaction. TseN could bind to DNA and exhibited Mn²⁺-dependent DNA nuclease activity. Compared with the wild-type strain, $\Delta tseN$ showed significantly reduced ability in mediating intra- or inter-species bacterial competition, and its biofilm formation was significantly affected. In addition, $\Delta tseN$ showcased decreased survival rate under high salt, low pH, and other stress conditions, with partial recovery observed in the complemented strain. [Conclusion] TseN is a Mn²⁺-dependent DNA nuclease secreted by the T6SS of Y. pseudotuberculosis, with strong toxicity to bacteria. TsiN is the immune protein of TseN, protecting Y. pseudotuberculosis from the toxic effects of TseN. TseN play a role in the bacterial competition of Y. pseudotuberculosis by helping the bacterium occupy ecological niches, promoting biofilm formation, and enhancing tolerance to stress conditions such as high salt and low pH.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*; type VI secretion system (T6SS); effector; immune protein; functional characterization

假结核耶尔森氏菌(Yersinia pseudotuberculosis) 是耶尔森氏菌属(Yersinia)中的一种革兰氏阴性 短杆菌,生长的适宜温度范围为 22–30 ℃,其 具有广泛的宿主谱,主要通过粪-口途径进行传 播,是一种常见的人畜共患肠道致病菌^[1]。假结 核耶尔森氏菌可以在小肠中通过派尔集合淋巴 结和淋巴管入侵并感染肠系膜淋巴结,主要临床 表现为肠系膜淋巴结炎^[2];有时原发性感染后会 出现自身免疫后遗症,如反应性关节炎^[3]。

细菌六型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是一种广泛分布于革兰氏阴性细菌中的针 状跨膜复合物,以接触依赖或接触非依赖的方式 将效应物易位到邻近的细胞或环境中^[4-5]。部分 细菌可以通过T6SS将抗真核效应物传递到宿主 细胞借以侵染宿主,但T6SS被认为主要是一种 杀菌武器,帮助细菌在肠道微生物群等复杂的微 生物群落中与其他物种竞争,借此争夺有限的空 间和营养资源,其杀菌作用主要通过向受体细胞 注射靶向其细胞特定组分的效应蛋白实现^[6-7]。 一般而言,具有毒力的效应蛋白通常与同源免疫 蛋白共表达,以保护细胞免受自身毒害^[8]。

核酸酶型效应蛋白是一类重要的毒素效应 蛋白,主要包括脱氧核糖核酸酶(DNase)和核糖核 酸酶(RNase)。近年来,T6SS分泌的DNase类效 应蛋白是该领域的研究热点之一。例如,Ma等^[9] 在根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)中发 现了具有DNA水解酶活性的T6SS效应蛋白Tde, Tde 介导的细菌间竞争帮助其在植物中定殖。 Pissaridou 等^[10]在铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)中发现T6SS核酸酶效应蛋白Tse7 具有Tox-GHH2结构域,这种毒素的表达会诱 导细菌DNA损伤修复反应(SOS response),使得 细菌生长停滞并最终导致DNA降解。Pei等^[11] 在嗜水气单胞菌亚种(Aeromonas dhakensis)中 发现了首个能够进行自剪切的T6SS效应蛋白 Tsel,并且他们在多种病原微生物中均发现了 具有类似特性的 T6SS 效应蛋白, 所以将 Tsel 及其同源蛋白定义为一类新型的含分子内伴侣 的自剪切效应蛋白。Luo 等^[12]发现,鲍氏不动 杆菌(Acinetobacter baumannii)通过 T6SS 将 DNase 效应物 TafE 注射到竞争对手的细胞中, 从而杀死真菌,同时通过免疫蛋白 Tael 保护其 免受 TafE 的自毒害, 该结果表明, Tael 的靶向 降解可能是杀死鲍氏不动杆菌的有效策略。 2021年, Song 等^[5]在假结核耶尔森氏菌发现了 DNase 型效应蛋白 Tce1,不仅可以发挥接触依 赖型杀菌作用,还能发挥接触非依赖型杀菌作 用,打破了对于 T6SS 只能接触杀菌的传统认 知。2024年, Song 等^[13]在假结核耶尔森氏菌中 发现了一种双功能效应蛋白 TepC, 既能发挥 DNA 水解酶功能,又能作为蛋白型铁载体帮助 细菌获取铁离子,最终以"特洛伊木马"方式诱 杀敌对细菌,防止群落中的欺骗行为。由此可 见,针对 T6SS 分泌的 DNA 水解酶类效应蛋白 的相关研究往往伴随着新现象或新机制的发 现,有助于人们挖掘更多的 DNase 型效应蛋白 作用机制,丰富 T6SS 杀菌研究的理论基础。

细菌的 T6SS 除具有上述靶向真核和原核 细胞的杀伤能力外,还被证实与细菌生物膜的 形成有关,部分 T6SS 相关基因还有助于抵抗 氧化、温度、渗透压及酸碱等逆境胁迫^[14]。生 物膜可有效帮助细菌定殖,增强细菌对抗菌物 质的耐药性和宿主免疫反应,并促进细菌社群 之间的细胞-细胞信号交换^[15]。近年来,有部分 研究报道了 T6SS 可能与生物膜形成之间存在 关联。医院临床分离菌株分析发现,肺炎克雷 伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌 等细菌的生物膜形成能力与 T6SS 相关基因具 有强相关性,T6SS 中有一些关键蛋白能够影响 生物膜的形成过程^[16-18]。在假结核耶尔森氏菌 中, RpoS 能调节 T6SS-4 的表达,对抵抗多种 环境压力至关重要,研究表明,假结核耶尔森 氏菌可以通过 RpoS 及 T6SS-4 对抗外界渗透压 胁迫^[19];敲除假结核耶尔森氏菌 T6SS 关键组 分基因如 *clpV4、hcp4* 后,其 pH 4.0 酸处理存 活率明显下降^[20],表明假结核耶尔森氏菌 T6SS 及效应蛋白参与其抗胁迫能力。

本研究通过生物信息学分析筛选到假结核 耶尔森氏菌(Yersinia pseudotuberculosis) YPIII T6SS 基因簇上一个潜在的效应蛋白,其同时属 于 T6SS_VgrG/RHS 家族及 HNH/ENDO VII 核 酸酶超家族。本研究旨在证实该蛋白是否具有 预期的 DNase 活性,并进一步探究 T6SS 分泌 型效应核酸酶(T6SS secreted effector nuclease, TseN)是否与假结核耶尔森氏菌的细菌竞争、生 物膜形成、逆境胁迫抵抗等功能有关,以期为 假结核耶尔森氏菌逆境适应和致病机制提供新 证据。

1 材料与方法

1.1 样品

大肠杆菌(Escherichia coli)、鼠伤寒沙门氏 菌(Salmonella typhimurium)和假结核耶尔森氏 菌,本实验室保藏^[5]。本研究构建使用的主要 质粒、菌株及其特性和用途见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

本研究设计的所有 PCR 引物(表 2)均由西 安擎科泽西生物科技有限责任公司合成; 2×Accurate *Taq*预混液、2×ApexHF FS 聚合酶预 混液、T4 DNA 连接酶,湖南艾科瑞生物工程有 限公司; Trans 2000 PlusII DNA marker,北京全 式金生物技术有限公司; DNA 限制性内切酶和 λ -DNA,宝日医生物技术(北京)有限公司;结晶 紫染液、2-硝基苯基 β -D-吡喃半乳糖苷 (2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, ONPG)及 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, X-Gal)等,北京 索莱宝科技有限公司;竞争实验所使用的滤膜 为 0.22 μm 孔径混合膜,上海市新亚净化器件 厂。本实验所使用抗生素类试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。缓冲液、洗脱液等常规试 验中所使用的试剂均为分析纯化学试剂。

化学发光凝胶成像仪和电穿孔仪,Bio-Rad 公司;核酸蛋白电泳仪,北京六一生物科技有 限公司;基因扩增 PCR 仪,杭州博日科技有限 公司;恒温培养摇床、隔水式恒温培养箱,上 海益恒科技有限公司;超净工作台,苏州净化 设备有限公司;冷冻离心机,安徽中科中佳科 学仪器有限公司;AKTA Pure 仪器,陕西旭辰 仪器设备有限公司。

1.3 培养基

常规培养基:用于培养大肠杆菌及鼠伤寒 沙门氏菌的 LB 培养基;用于细菌营养缺乏条 件培养的 M9 无机盐培养基^[5]。

假结核耶尔森氏菌适用型 LB (YLB)培养 基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0, 用于培养假结核耶尔森氏菌。

X-Gal 琼脂培养基:LB 培养基中加入终浓 度 0.04 g/L 的 X-Gal,用于培养大肠杆菌 BTH101 及互作菌株筛选。

蔗糖筛选培养基:添加 200 g/L 蔗糖的 YLB 固体培养基,用于同源重组法敲除菌株的筛选。

1.4 生长曲线的测定

热激转化 4 种不同质粒(pET-28a、pET-28atseN、pET-28a-tseN-tsiN、pET-28a-tseN^{H81A/H82A}) 到 BL21(DE3)PlysS 菌株中, 37 ℃、200 r/min 培养过夜后转接于 5 mL LB(Km⁵)培养基中, 26 ℃、160 r/min 培养 2 h 后加入 0.1 mmol/L IPTG,连续培养 14 h,其间每隔 2 h 取样 1 次, 测量 *OD*₆₀₀ 值。

Plasmid/Strain	Relevant characteristic	Source
Plasmid		
pET15bS	Expression vector with N-terminal hexahistidine affinity tag and SUMO tag, Amp ^r	This lab
pET15bS-tseN	Used for protein purification	This study
pET-28a	Expressing vector, Km ^r	This lab
pET-28a- <i>tseN</i>	Used for measuring growth curve	This study
pET-28a-tseN-tsiN	Used for measuring growth curve	This study
pET-28a- <i>tseN</i> ^{H81A/H82A}	Used for measuring growth curve, mutate histidine at positions 81 and 82 to alanine	This study
pKT25-tsiN	Used for bacterial two-hybrid, Km ^r	This study
pUT18C-tseN	Used for bacterial two-hybrid, Amp ^r	This study
pDM4- <i>tseN</i> overlap	Used for in-frame deletion of <i>tseN</i>	This study
pDM4- <i>tseN-tsiN</i> overlap	Used for in-frame deletion of tseN-tsiN	This study
pKT100-tseN	Used to reintroduce <i>tseN</i> into $\Delta tseN$ mutant	This study
pACYC184	Used for modify receptor bacteria, Cm ^r	This lab
Strain		
ER2566 (pET15bS- <i>tseN</i>)	ER2566 containing pET15bS-tseN, Amp ^r	This study
BL21(DE3)PlysS	Suitable for the expression of exogenous toxic proteins, Cm ^r	This lab
BL21(DE3)PLysS (pET-28a-tseN)	Contain pET-28a- <i>tseN</i> , Cm ^r Km ^r	This study
BL21(DE3)PLysS (pET-28a-tseN ^{H81/82A})	Contain pET-28a-tseN ^{H81/82A} , Cm ^r Km ^r	This study
BL21(DE3)PLysS (pET-28a-tseN-tsiN)	Contain pET-28a-tseN-tsiN, Cmr Kmr	This study
BL21(DE3)PLysS (pET-28a)	Contain pET-28a, Cm ^r Km ^r	This study
S17-1	For conjugative transfer of plasmids	This lab
BTH101	Adenylate cyclase deficiency type	This lab
BTH101 (pKT25-ZIP, pUT18C-ZIP)	Positive control for bacterial two-hybrid	This lab
BTH101 (pKT25, pUT18C)	Negative control for bacterial two-hybrid	This study
BTH101 (pKT25-tsiN, pUT18C)	Negative control for bacterial two-hybrid	This study
BTH101 (pKT25, pUT18C-tseN)	Negative control for bacterial two-hybrid	This study
BTH101 (pKT25-tsiN, pUT18C-tseN)	Experimental group for bacterial two-hybrid	This study
Escherichia coli DH5a (pACYC184)	Contain pACYC184, Cm ^r	This study
Salmonella typhimurium (pACYC184)	Contain pACYC184, Cm ^r	This study
YPIII (WT)	Yersinia pseudotuberculosis, Nal ^r	This lab
YPIII ($\Delta tseN$)	Lack of the gene <i>tseN</i> , Nal ^r	This study
YPIII (ΔtseN (pKT100))	Transformed a pKT100 plasmid, Km ^r Nal ^r	This study
YPIII (ΔtseN (pKT100-tseN))	Reintroduce <i>tseN</i> into the $\Delta tseN$ mutant, Km ^r Nal ^r	This study
YPIII ($\Delta tseN$ -tsiN)	Lack of the gene <i>tseN-tsiN</i> , Nal ^r	This study
YPIII (ΔtseN-tsiN (pACYC184))	Transformed a pACYC184 plasmid, Cm ^r Nal ^r	This study

表1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Cm^r: 氯霉素抗性; Km^r: 卡那霉素抗性; Amp^r: 氨苄青霉素抗性; Nal^r: 萘啶酮酸抗性。

Cm^r: Chloramphenicol resistance; Km^r: Kanamycin resistance; Amp^r: Ampicillin resistance; Nal^r: Nalidixic acid resistance.

Primer name	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
tseN-tsiN-up-F-Bgl II	GAGAGCTCAGGTTACCCGCATGCA <u>AGATCTgg</u> atggaatattgatggagttcggac
tseN-tsiN-up-R	agcatcatcatataaaaatcaagaaagcgcagcggctggct
<i>tseN-tsiN-</i> down-F	tttcttgatttttatatgatgatgct
tseN-tsiN-down-R-Sal I	GTGTATATCAAGCTTATCGATACC <u>GTCGAC</u> gcctgtgatcatcgatct
tseN-F-Sma I	CC <u>CCCGGG</u> atgcagggccaatattac
tseN-R-EcoR I	CG <u>GAATTC</u> ttaatatcctccaaaaactgactg
tseN-F-EcoR I	CCG <u>GAATTC</u> atgcagggccaatattacga
tseN-R-Xho I	CCG <u>CTCGAG</u> ttaatatcctccaaaaactgactg
tseN-F-Sac I	C <u>GAGCTC</u> atgcagggccaatattac
tsiN-R-Xho I	CCG <u>CTCGAG</u> tcaagaaaacctatttataaattca
tsiN-F-Sma I	CC <u>CCCGGG</u> ttcaagaaaacctatttataaattca
tsiN-R-Xho I	CCG <u>CTCGAG</u> tcaagaaaacctatttataaattca
tsiN-F-Sma I	CC <u>CCCGGG</u> gatcaagaaaacctatttataaattca
tsiN-R-Xho I	CCG <u>CTCGAG</u> tcaagaaaacctatttataaattca
tseN-F-Sal I	GC <u>GTCGAC</u> tatgcagggccaatattac
tseN-R-EcoR I	CG <u>GAATTC</u> ttaatateeteeaaaaetgaetg

表 2 本研究所用主要引物

Table 2 Main primers used in this study

划线部分表示所使用的限制性酶切位点。

Restriction enzyme sites are underscored.

1.5 蛋白纯化

构建重组质粒 pET15bS-*tseN*并将该质粒转 化到大肠杆菌表达菌株 ER2566 中,利用常规 生化方法进行目的蛋白的大量诱导表达(16 ℃ 低温诱导,加入 0.2–0.5 mmol/L 的 IPTG),而 后通过 AKTA Pure 仪器进行 HisTrap 亲和层析 分离纯化蛋白,最后对蛋白进行浓缩。

1.6 凝胶迁移试验及蛋白酶活试验

凝胶迁移试验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA):用 pUC19 质粒作为探针,实验 组的反应缓冲体系中蛋白浓度逐渐增加,阴性对 照组不加入蛋白。反应体系(10 μ L):10×buffer 1 μ L,200 ng/ μ L pUC19 2 μ L,目的蛋白 0–4 μ L, ddH₂O 补足 10 μ L。加样完毕后混匀,37 °C恒 温箱中反应 20 min。4 °C条件下预电泳 1 h。将反 应结束的样品补加 DNA loading buffer 后点样, 恒压 120 V 电泳完毕后用化学发光凝胶成像仪 观察实验结果。 蛋白酶活试验:通过设定反应体系中不同 的 DNA 底物类型、TseN 融合蛋白的浓度梯度、 酶活反应时间温度、加入离子类型等探究 TseN 蛋白的 DNA 酶活性、最适反应条件、金属离子 依赖等特性。10 μL 反应体系成分主要为 10×buffer、不同种类 DNA 底物、目的蛋白、金 属离子溶液和 ddH₂O。酶活试验在 26 ℃恒温箱 中反应 10–30 min,完成后加入 DNA loading buffer, 1%琼脂糖凝胶电泳,电泳完毕后在用 化学发光凝胶成像仪观察实验结果。

1.7 细菌双杂交试验

构建效应蛋白基因的重组克隆(pUT18C-tseN) 和免疫蛋白基因的重组克隆(pKT25-tsiN),共同 电击转化至大肠杆菌 BTH101 中;同时,构建 阴性和半阴性对照克隆组:pKT25 和 pUT18C、 pKT25-tsiN和 pUT18C、pKT25 和 pUT18C-tseN。 阳性对照组克隆为共同转化含有 pKT25-ZiP 和 pUT18C-ZiP 重组质粒分子的 BTH101 菌株。将 转化菌株涂布 X-Gal 筛选培养基上,30 ℃静置 培养;挑取实验组呈蓝绿色的单克隆,将其用 划线法转接于新的 X-Gal 筛选培养基上,继续 培养至阳性菌落变蓝,然后接菌培养至相同 OD₆₀₀ 值进行点板试验。

测定 β-半乳糖苷酶活性:挑取阳性单克隆 菌落和对照组的单克隆菌落,转接至 5 mL 的 LB 培养基(Amp', Km', 1 mmol/L IPTG)中, 30 °C、180–200 r/min 培养过夜后转接至新的 LB 培养基中,继续培养至 *OD*₆₀₀ 为 1.0。取 1.5 mL 的 EP 管,每管加入 50 μL 菌液、420 μL Z Buffer、 20 μL 氯仿、10 μL 0.1% SDS,颠倒混匀后于 37 °C培养箱放置 1 h。在 EP 管中加入 100 μL 4 mg/mL ONPG 底物工作液,置于 30 °C培养箱 反应至液体变黄,加入 250 μL Na₂CO₃,颠倒混 匀,静置 5–10 min。取 200 μL 的上清测 *OD*₄₂₀ 和 *OD*₅₅₀ 并采用公式计算结果。β-半乳糖苷酶活 性单位数(U)=1 000–(*OD*₄₂₀–1.75×*OD*₅₅₀)/[*t* (min)× *V*(mL)×*OD*₆₀₀]。

1.8 敲除菌株及回补菌株的构建

采用同源重组技术构建 YPIII 的 ΔtseN 和 ΔtseN-tsiN 敲除株。选取目的敲除基因上下游的 基因片段进行扩增和重叠 PCR,本研究使用的 主要 PCR 引物见表 2,直接使用单菌落作为基 因组 DNA 模板。反应体系(100 µL): 2×ApexHF FS 聚合酶预混液 50 µL,基因组 DNA 模板,浓 度为 10 µmol/L 的上、下游引物(如 tseN-tsiN-up/ down-F/R)各 4 µL, ddH₂O 42 µL。重叠 PCR 中 DNA 模板为上下游基因片段,各加入 1–3 µL。 PCR 反应条件:98 ℃变性,相应温度退火,72 ℃ 延伸,根据片段大小调整扩增时间。构建 pDM4-tseN overlap 及 pDM4-tseN-tsiN overlap 重 组质粒,将重组质粒转化大肠杆菌 S17-1 后与 受体菌 YPIII (WT)以适当比例进行接合(37 ℃, 12–24 h),接合完成后稀释涂布菌液到双抗 YLB 固体培养基(Nal^r, Cm^r)上, 30 ℃培养 24–36 h 后,进行菌落 PCR 验证。然后将单交换筛选验 证正确的菌株菌液涂板到蔗糖含量为 20%的 YLB 固体培养基(Nal^r)上, 30 ℃培养 24–48 h。 待长出单克隆菌落后,在 2 个分别带有 Nal^r和 Cm^r抗性的 YLB 固体培养基的 96 孔板中,使 用牙签用划线法将每个菌落对应划线到 96 个小 格子里,30 ℃培养过夜,筛选在 Cm^r培养基上 未生长而在对应的 Nal^r培养基上生长的菌落, 进行菌落 PCR 验证,将筛选出的条带正确的菌 株冻存。通过向 Δ*tseN* 中电击转化重组质粒 pKT100-*tseN* 的方式构建回补菌株。

1.9 细菌竞争试验

为了便于竞争实验之后通过不同抗性将供体细菌和受体细菌区分开,本实验通过常规的 电击转化法构建了转化有 pACYC184 质粒的 YPIII Δ*tseN-tsiN*、*Escherichia coli* DH5α、 *Salmonella typhimurium* 作为受体菌株。

将供体菌 YPIII 接入 3 mL YLB 培养基中, 30 ℃、200 r/min 培养过夜。受体菌接入 3 mL LB/YLB 培养基中, 30 ℃、200–220 r/min 培养过 夜。各自转接至 5 mL YLB/LB 液体培养基培养至 *OD*₆₀₀ 为 1.0 左右。取 1 mL 菌液,室温 4 500 r/min 离心 3 min; 弃上清,加 1 mL M9 无机盐培养 基洗涤菌体 2 次,最后用 1 mL 的 M9 无机盐培 养基重悬菌体。取 300 µL 供体菌菌液与 300 µL 受体菌菌液按照 1:1 或 10:1 的比例充分混合均 匀,首先将竞争前混合菌液稀释适宜梯度后滴 5 µL 在不同抗性的平板上,待长出可供计数的 单菌落后对单菌落分别进行计数。

提前在无抗的 M9 固体培养基上铺 3 张 0.22 µm 的滤膜, 然后将各 5 µL 混合菌液点在 0.22 µm 的滤膜中心,待菌液自然风干后移至 26 ℃培养箱进行竞争培养。培养 12--24 h 后将 滤膜取下,置于装有 1 mL M9 无机盐培养基的 5 mL 离心管中, 菌体充分混匀后取 100 μL 混 合液并适当稀释, 取 5 μL 滴在不同抗性的平板 上。待平板上长出可供计数的单菌落时, 对单 菌落分别计数并进行统计分析, 计算竞争指数 (competitive index), 竞争倍数=(竞争后供体菌 的数目/竞争后受体菌的数目)/(竞争前供体菌 的数目/竞争前受体菌的数目)。

1.10 生物膜形成试验

将菌株 YPIII接种至 YLB 培养基,培养过 夜后按 1:50 转接到 M9 培养基,26 ℃、100 r/min 竖直试管摇菌,72 h 后结束培养,ddH₂O 轻洗 2 次后倒置吹干,加入 5 mL 0.1%结晶紫,盖好 盖子置于通风橱 30-40 min,用 ddH₂O 洗去浮 色后晾干拍照。冰醋酸溶解 1 h 后测量 *OD*595。

1.11 细菌胁迫试验

挑取待试菌落接种于 3 mL 液体 YLB,加 入相应的抗生素。30 ℃、220 r/min 培养 12 h 左右至稳定期。各取 1 mL 菌液,用 PBS 洗菌。 每组实验取 18 支 5 mL 离心管,其中一半加入 1 mL M9 (对照组),剩余一半加入含 2 mol/L NaCl 或 pH 4.0 的 M9 培养基(处理组),转接 20 µL 菌液至各离心管中。26 ℃、180–200 r/min 处理 40 min。处理组和对照组分别用 M9 稀释至适宜 浓度梯度,取稀释菌液 5–10 µL 滴板。放置于 30 ℃恒温培养箱培养 24 h,计数每个组别菌落 数,计算细胞存活率。

1.12 数据分析

本研究中实验设置 3-5 个平行实验组并独 立重复 2-3 次,结果使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。显著性分析采用 Student's *t*-test, *P*<0.05 代表结果差异显著。

2 结果与分析

2.1 TseN 蛋白功能分析预测

通过分析 Yersinia pseudotuberculosis YPIII 基因组,在其第二套 T6SS 基因簇上发现一个 可能编码潜在 T6SS 效应蛋白的基因 ypk_0768 (图 1A)。InterPro 等网站保守结构域分析显示 YPK_0768 属于 T6SS_VgrG/RHS 家族,同时在 C 端具有 AHH 保守结构域(图 1B)。T6SS VgrG/





Figure 1 Bioinformatics analysis of the potential effector TseN in YPIII. A: *tseN* gene localization diagram; B: Conserved domain analysis results schematic.

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

RHS 家族的成员在细菌竞争、迁移、生物膜形成和杀虫活性中起着关键作用,其中一些成员会受到不同环境条件诱导分泌。含 AHH 结构域的蛋白属于 HNH/ENDO VII 超家族核酸酶,含有保守的 4 个 His 残基,用于结合金属离子和水解底物。因此,我们推测 YPK_0768 蛋白是一个潜在的核酸酶类 T6SS 效应蛋白,将其命名为TseN,可能参与 YPIII 的细菌竞争、生物膜形成等生理过程;推测 ypk_0768 临近基因ypk_0769 编码蛋白为 TseN 的免疫蛋白,并命名为 T6SS 分泌型免疫核酸酶(T6SS secreted immune nuclease, TsiN)。

2.2 TseN 与 TsiN 是毒素蛋白-免疫蛋白对

为了探究 TseN 的杀菌毒性功能,本实验将 其在大肠杆菌 BL21(DE3) PlysS 中异源表达并进 行生长曲线测定和点板试验。在生长 2 h 后,加 入 0.1 mmol/L 的 IPTG,测定其生长曲线(图 2A)。 结果显示,相较于对照组,诱导效应蛋白 TseN 表达的菌株生长受到显著抑制,并在 4 h 后完 全停滞;而共表达其假定免疫蛋白 TsiN 的菌株 生长可以恢复到与对照组接近;表达 AHH 保守 结构域中组氨酸位点突变型蛋白 TseN^{H81A/H82A} 的菌株生长抑制情况得到部分缓解。固体平板毒 性实验的结果(图 2B)与上述结论一致,表明 TseN 对大肠杆菌具有毒性作用,而 TsiN 的共同表达 能够中和其毒性。

为了进一步验证 TsiN 通过与 TseN 直接相互 作用来中和毒性,我们构建了相关菌株并进行细 菌双杂交试验。结果如图 2C 所示,分析 β-半乳 糖苷酶活性发现,实验组(共转化 pUT18C-tseN 和 pKT25-tsiN)与阳性对照组(CK+)β-半乳糖苷 酶活性相近,与阴性对照组(CK-)差异显著,而 半阴性对照(共转化 pUT18C 和 pKT25-tsiN、共 转化 pUT18C-tseN和 pKT25)与阴性对照无显著 差异,均无明显酶活。此外,阳性对照组与实 验组的菌落在 X-Gal 平板上变为蓝绿色,而其 余阴性对照不变色。该实验结果表明,TsiN 与 TseN 通过直接相互作用发挥了免疫功能。

TseN 是一个依赖 Mn²⁺的 DNA 酶 TseN 是一个 DNA 酶

由于 TseN 可能是潜在的 DNase,我们首先 通过 EMSA 探究 TseN 与 DNA 的结合活性。将 质粒 pUC19 与不同浓度 TseN 在含有 1 mmol/L 金属离子螯合剂 EDTA 的溶液中孵育 20 min, 随后通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3A 所示。当依次增加 TseN 用量时,pUC19 质粒 DNA 的迁移逐渐变慢,表明 TseN 能够与 DNA 结合形成蛋白-DNA 复合体。

为了探究 TseN 是否具有 DNase 活性,将 pUC19 质粒 DNA 与不同浓度 TseN 在含有 1 mmol/L Mn²⁺的溶液中孵育 30 min 后用 1%琼 脂糖凝胶电泳检测,如图 3B 所示,随着 TseN 浓度增加,质粒 DNA 的水解程度加剧,表明 TseN 具有质粒 DNA 水解活性。此外,本研究 还以大肠杆菌 DH5α基因组 DNA 和噬菌体基因 组 λ-DNA 等不同类型的 DNA 作为底物进行体 外 DNA 水解实验,结果如图 3C、3D 所示。TseN 对 λ-DNA 的降解较为高效,对大肠杆菌基因组 DNA 的降解效果稍弱。综上,TseN 是一个 DNase。

2.3.2 TseN 的 DNase 生化性质分析

DNase 发挥切割活性通常需要依赖于某种 离子,本研究测试了 TseN DNase 活性的二价金 属离子依赖性。如图 4A 所示,只有在 Mn²⁺存 在的条件下,TseN 才能够降解底物 DNA,而 Fe³⁺与 Zn²⁺有助于 TseN 解开质粒 DNA 的双螺 旋结构。如图 4B、4C 所示,当体系中的 Mn²⁺ 浓度达到 0.8 mmol/L 时,TseN 即可高效地降解 DNA 底物,而 Mn²⁺浓度逐渐增加到 8 mmol/L 并 不会对 TseN 的酶活活性产生抑制作用。如图 4D 所示,在 26 ℃的条件下将 TseN 与底物 DNA





进行不同时间的孵育,我们发现 TseN 具有 DNA 降解高效性,与底物孵育 4 min 后即可完全降 解底物 DNA。另外,温度对酶活性影响很大, 不同的 DNase 最适温度可能差异较大。因此, 本研究设置了不同的温度组,旨在探究 TseN 发 挥切割活性的最适温度。由图 4E 可知,26 ℃ 是 TseN 发挥 DNase 酶活的最适温度,低于或 高于 26 ℃均会对其酶活性产生显著抑制效果。

2.4 TseN 能够参与 YPIII的细菌竞争作用

为了探究毒力蛋白 TseN 是否能够参与到 细菌的种内竞争过程中,我们构建了 Δ*tseN* 单 敲除(pKT100)及 Δ*tseN* (pKT100-*tseN*)回补菌 株,与野生型菌株(pKT100)一起组成 3 种竞争实 验供体菌株;同时构建了转化 pACYC184 质粒 的 YPIII Δ*tseN-tsiN* 作为受体菌株。将供体菌株 分别与受体菌 Δ*tseN-tsiN* 按 1:1 孵育 24 h 后,统



图 3 TseN 的 DNase 活性研究 A: 凝胶迁移试验。不同浓度(10、20和 30 μmol/L)的蛋白在缓冲液 中与 200 ng/μL 的 pUC19 质粒共孵育。B: TseN 对 pUC19 质粒的降解情况。不同浓度(0.6、0.9、1.2 和 3.0 μmol/L)的蛋白在反应缓冲液中与 200 ng/μL 的 pUC19 质粒共孵育。C: 大肠杆菌 DH5α 基因组 DNA 的降解情况。缓冲体系中的蛋白浓度逐渐增加(浓度为 1.25、2.50 和 5.00 μmol/L)。D: λ-DNA 的 降解情况。缓冲体系中的蛋白浓度逐渐增加(浓度为 1.25、2.50 和 5.00 μmol/L)。M: DNA marker。

Figure 3 TseN DNase activity assay. A: EMSA. Various amount (10, 20, 30 μ mol/L) of protein was incubated with 200 ng/ μ L pUC19 plasmid in binding buffer. B: Degradation efficiency on pUC19. Various amount (0.6, 0.9, 1.2, 3.0 μ mol/L) of protein was incubated with 200 ng/ μ L pUC19 plasmid in reaction buffer. C: Degradation efficiency on gDNA from *E. coli* DH5 α . The amount of protein in the buffer system is gradually increased (with a protein concentration of 1.25, 2.50, 5.00 μ mol/L). D: Degradation efficiency on λ -DNA. the amount of protein in the buffer system is gradually increased (with a protein in the buffer system is gradually increased (with a protein of 1.25, 2.50, 5.00 μ mol/L). M: DNA marker.

计竞争前后的菌落数量,计算竞争指数。结果如 图 5A 所示,野生型相较于 ΔtseN 单敲除突变型取 得了 2 倍以上的竞争优势,而回补了 tseN 的菌株 竞争能力得到了显著恢复,表明 TseN 能够通过 接触依赖的方式参与到 YPIII的种间竞争作用中。

与种内竞争所使用方法类似,我们使用转 化了相应载体的 YPIII WT、Δ*tseN*、Δ*tseN*(*tseN*) 作为供体细菌,进行了与受体细菌 *E. coli* DH5α (pACYC184)及 *Salmonella typhimurium* (pACYC184) 的种间竞争实验。图 5B 表明,在与 *E. coli* 的 竞争过程中,野生型菌株相较于 Δ*tseN* 敲除菌 株具有 3 倍左右的竞争优势,这种优势在回补 菌株中也能够观察到显著差异。图 5C 表明, TseN 在 YPIII与 S. typhimurium 的竞争过程中也 发挥重要作用,缺失该蛋白基因的菌株相较于 野生型菌株存在 3-4 倍的竞争劣势。综上所述, TseN 能够通过接触依赖的方式介导假结核耶 尔森氏菌与 E. coli DH5α及 S. typhimurium 的种 间竞争作用,可能通过降解受体细菌 DNA 来发 挥毒力作用,帮助 YPIII获得竞争优势。

2.5 TseN 对 YPIII的生物膜形成具有重要作用

生物膜是指附着于有生命或无生命物体表 面,被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群 体。在活宿主或环境中发现的许多类型的细菌 物种可以形成生物膜。为了探究 TseN 是否与



图 4 TseN 的 DNase 生化性质分析 A: TseN 的酶活金属离子依赖性探究(-: 阴性对照; 0-4 mmol/L 代 表添加的浓度)。B、C: 锰离子浓度依赖实验(-: 阴性对照; 0-8 mmol/L: 添加的浓度)。D: 最佳反应 时间探究,逐渐增加反应时长。E: 最佳反应温度探究,设置不同的温度梯度进行反应。

Figure 4 Analysis of TseN's DNase biochemical properties. A: Metal ion dependence experiment of TseN enzyme activity (-: Negative control; 0-4 mmol/L: The added concentration). B, C: Mn²⁺ ion concentration dependence experiment (-: Negative control; 0-8 mmol/L: The added concentration). D: Exploration of optimal reaction time: increasing reaction duration sequentially. E: Exploration of optimal enzyme activity temperature: experiments conducted at different temperature gradients.

YPIII的生物膜形成有关,我们进行了结晶紫染 色试验,结果如图 6 所示。从试管等容器表面 的附着生物膜染色情况可以清晰地看出,敲除 *tseN* 的菌株生物膜形成受到严重影响,附着圈 较浅,而野生型和回补型菌株附着圈染色颜色 较深。冰醋酸溶解结晶紫后,测量 *OD*595 值发 现,敲除 *tseN* 的菌株与野生或回补型的菌株具 有显著差异。缺失 *tseN* 的菌株生物膜产量受到 了严重影响,这表明 TseN 可能是促进 YPIII生 物膜形成过程中的一种关键蛋白质。

2.6 TseN 能够帮助 YPIII抵抗高盐及酸性环境胁迫

假结核耶尔森氏菌等肠道致病菌在侵染宿 主后常常面临低 pH 的恶劣生长环境;另外, 高盐离子带来的渗透压胁迫,也是细菌在生长 过程中常遇到的胁迫情况。为了探究效应蛋白 TseN 是否参与 YPIII 抗胁迫功能,我们实施了 相关的胁迫条件存活率测定实验。如图 7A、7B 所示,在 2 mol/L NaCl 和 pH 4.0 的逆境胁迫条 件下,野生型菌株相较于 Δ*tseN* 菌株具有明显



图 5 TseN 参与 YPIII 种内及种间竞争实验 A: YPIII 的种内竞争实验(供体菌和受体菌按 1:1 的比例混合后在 M9 培养基上共培养 24 h)。B: YPIII 与 *E. coli* DH5α 的种间竞争实验(供体菌和受体菌按 10:1 的比例混合后在 M9 培养基上共培养 12 h)。C: YPIII 与 *Salmonella typhimurium* 的种间竞争实验(供体菌和受体菌和受体菌和受体菌和受体菌和受体菌称 10:1 的比例混合后在 M9 培养基上共培养 12 h)。

Figure 5 Intraspecific and interspecific competition experiment of YPIII. A: Intraspecific competition experiment of YPIII (Donor bacteria and recipient bacteria were mixed in a 1:1 ratio and placed on M9 medium for 24 hours of competition). B: Interspecific competition experiment between YPIII and *E. coli* DH5 α (YPIII and *E. coli* DH5 α were co-cultured at a ratio of 10:1 on M9 medium for 12 hours). C: Interspecific competition experiment between YPIII and *Salmonella typhimurium* were co-cultured at a ratio of 10:1 on M9 medium for 12 hours). **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001; ****: *P*<0.000 1.

的存活优势,这表明 TseN 可能对 YPIII响应外 界压力胁迫具有重要作用。

3 讨论

从 Hood 等^[21]研究人员发现铜绿假单胞菌中存在 Tse2-Tsi2 效应毒蛋白-免疫蛋白对以来,已有较多的文献报道了不同细菌 T6SS 中存在类似的效应蛋白-免疫蛋白对(E-I 对),其中大部分的效应蛋白通过靶向细胞膜、细胞壁或者核酸类物质发挥作用^[8]。但是,对于假结核耶尔森氏菌 T6SS 中有关 E-I 对仍知之甚少,此次鉴定到的 TseN-TsiN 蛋白对拓展了该部分的研究。本实验室前期在假结核耶尔森氏菌中鉴定到4对 E-I 对,其中,Tce1-Tci1 的发现首次揭示了 T6SS

效应蛋白能够介导 YPIII 接触非依赖杀菌^[5]; 双功能效应蛋白 TepC 能够同时发挥铁离子摄 取与 DNA 水解的功能^[13],而 CccR 蛋白的发 现则证实 T6SS 效应蛋白也能同时作为转录因 子发挥作用^[22]; YPK_0952 也被鉴定为一个能 够参与细菌种间竞争的 T6SS 效应蛋白^[23]。本 研究所鉴定的 TseN 属于 Rhs 类蛋白,该类蛋 白常具有多态可变的 C 末端,异源表达通常对 大肠杆菌具有毒性,并且能够介导细菌的竞争 作用^[24-25]。我们通过实验证实,TseN 是假结 核耶尔森氏菌中一种能够通过接触依赖的方 式杀死同生态位中其他细菌的效应蛋白,在其 参与到细菌种间竞争的过程中具有重要毒力 作用。



图 6 生物膜形成试验 生物膜的结晶紫染色图 为 5 mL 菌液培养 72 h 后染色得到。

Figure 6 Biofilm formation assay. The crystal violet staining image of the biofilm was obtained after staining 5 mL of bacterial liquid in a test tube after 72 hours of cultivation. ***: P < 0.001.





生物膜能够支持微生物在抗生素暴露等不 利条件下的生存,有生物膜的细菌往往具有更 强的抗生素耐药性及更高的生存能力[10]。有部 分研究报道了 T6SS 相关蛋白可能与生物膜形 成之间存在关联。对医院临床分离出的菌株进 行分析发现肺炎克雷伯氏菌的生物膜形成能力 与 T6SS 相关基因具有较强相关性^[16]。一些研究 表明 T6SS 中有一些关键蛋白能够影响铜绿假 单胞菌、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens) 等细菌生物膜的形成过程[17-18,26]。细菌生物膜 除包含细菌本身外,还具有一些胞外的组分如 蛋白、多糖、胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)等,这些物质与菌体共同组成生物膜的 完整结构。有研究报道, 霍乱弧菌(Vibrio cholerae)中的 2 种 DNA 水解酶 Dns 和 Xds 在 其细菌生物膜结构的切割塑造中具有重要作 用,同时还能够降解生物膜中的 eDNA 成分, 从而为生物膜中的细菌提供营养^[27]。本研究发 现, TseN 作为假结核耶尔森氏菌 T6SS 分泌的 一种效应蛋白,对于该菌的生物膜形成具有重 要作用。该蛋白的缺失使得假结核耶尔森氏菌 生物膜的形成受到严重影响。我们推测 TseN 能 够对 DNA 进行合理的剪切加工从而让生物膜 结构中的重要组成部分 eDNA 能够正常组成、 排列,从而提高生物膜的形成效率。

细菌在生长过程中经常会遇到严重的环境 胁迫,如氧化胁迫、酸胁迫、渗透胁迫和温度变 化等。为了在这些不利的条件下生存,微生物已 经发展了多种复杂的应对机制,而 T6SS 也能够 参与其中。假结核耶尔森氏菌可以通过 RpoS 及 T6SS4 对抗外界渗透压变化,以及低 pH 环境等 胁迫,相应基因敲除菌株的逆境生存能力大幅 下降^[19]。2013 年,Zhang 等^[20]报道,OmpR 蛋 白能够直接结合 T6SS4 操纵子的启动子并调节 其表达,OmpR 调节的 T6SS4 对于酸性条件下

的细菌存活至关重要,其表达能够由低 pH 条 件诱导。有研究表明,假结核耶尔森氏菌中 T6SS4 和精氨酸依赖的耐酸系统(AR3)的表达 模式还受到 LysR 型调节蛋白 RovM 的协同调 控^[28]。此外、假结核耶尔森氏菌中还有一些 T6SS 效应蛋白能够通过特殊的方式参与到胁 迫抵抗的过程中,如效应蛋白 YezP 被证实能够 结合转运 Zn²⁺, 效应蛋白 TssS 被证实可以实现 细菌对 Mn²⁺的摄取,具有摄取金属离子等非传 统作用的效应蛋白能够在有害环境中提高细菌 的生存能力[29-30]。经过不同的条件筛选,本研 穷发现缺失 tseN 基因的菌株在抵抗高盐浓度渗 透胁迫以及酸胁迫时的存活率明显下降。TseN 作为 T6SS 分泌的一种多功能效应蛋白,我们 推测其可能通过某种方式参与到细菌的应激反 应中,从而提高了假结核耶尔森氏菌的抗胁迫 能力。以上实验结果表明, TseN 蛋白对于假结 核耶尔森氏菌适应环境、侵染宿主可能具有重 要作用,针对该蛋白的消除可能帮助降低该致 病菌的生存能力。

4 结论

本研究报道了假结核耶尔森氏菌中一种新 发现的能够参与到细菌间竞争作用的核酸酶类 T6SS 效应蛋白 TseN,鉴定该蛋白为一种 Mn²⁺ 依赖的 DNase,具有较强的毒力作用,异源表 达具有极强的杀菌活性。在研究过程中我们发 现,该蛋白还具有介导 YPIII的生物膜形成、抵 抗渗透胁迫及酸胁迫等多重功能。其下游蛋白 TsiN 被鉴定为其免疫蛋白,通过与 TseN 直接 相互作用来中和毒性,防止细菌产生自毒害。 本研究为假结核耶尔森氏菌效应蛋白的研究提 供了新的见解,也为该肠道致病菌的防治提供 了新的思路。

REFERENCES

- [1] PUTZKER M, SAUER H, SOBE D. Plague and other human infections caused by *Yersinia* species[J]. Clinical Laboratory, 2001, 47(9/10): 453-466.
- [2] BLISKA JB, BRODSKY IE, MECSAS J. Role of the *Yersinia pseudotuberculosis* virulence plasmid in pathogen-phagocyte interactions in mesenteric lymph nodes[J]. EcoSal Plus, 2021, 9(2): eESP-0014-2021.
- [3] VASALA M, HALLANVUO S, RUUSKA P, SUOKAS R, SIITONEN A, HAKALA M. High frequency of reactive arthritis in adults after *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 outbreak caused by contaminated grated carrots[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014, 73(10): 1793-1796.
- [4] CIANFANELLI FR, MONLEZUN L, COULTHURST SJ. Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon[J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(1): 51-62.
- [5] SONG L, PAN JF, YANG YT, ZHANG ZX, CUI R, JIA SK, WANG Z, YANG CX, XU L, DONG TG, WANG Y, SHEN XH. Contact-independent killing mediated by a T6SS effector with intrinsic cell-entry properties[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 423.
- [6] HACHANI A, WOOD TE, FILLOUX A. Type VI secretion and anti-host effectors[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 29: 81-93.
- [7] SINGH RP, KUMARI K. Bacterial type VI secretion system (T6SS): an evolved molecular weapon with diverse functionality[J]. Biotechnology Letters, 2023, 45(3): 309-331.
- [8] YANG XB, LONG MX, SHEN XH. Effector-Immunity pairs provide the T6SS nanomachine its offensive and defensive capabilities[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1009.
- [9] MA LS, HACHANI A, LIN JS, FILLOUX A, LAI EM. Agrobacterium tumefaciens deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta[J]. Cell Host & Microbe, 2014, 16(1): 94-104.
- [10] PISSARIDOU P, ALLSOPP LP, WETTSTADT S, HOWARD SA, MAVRIDOU DAI, FILLOUX A. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(49): 12519-12524.
- [11] PEI TT, LI H, LIANG XY, WANG ZH, LIU GF, WU LL, KIM H, XIE ZP, YU M, LIN SJ, XU P, DONG TG. Intramolecular chaperone-mediated secretion of an Rhs effector toxin by a type VI secretion system[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1865.
- [12] LUO JJ, CHU X, JIE J, SUN Y, GUAN QT, LI D, LUO ZQ, SONG L. Acinetobacter baumannii kills fungi via a type VI DNase effector[J]. mBio, 2023, 14(1): e0342022.
- [13] SONG L, XU L, WU T, SHI ZK, KAREEM HA, WANG Z, DAI QY, GUO CH, PAN JF, YANG MM, WEI XM, WANG Y, WEI GH, SHEN XH. Trojan horselike T6SS effector TepC mediates both interference competition and exploitative competition[J]. The ISME Journal, 2024, 18(1): wrad028.

- [14] LIN JS, XU L, YANG JS, WANG Z, SHEN XH. Beyond dueling: roles of the type VI secretion system in microbiome modulation, pathogenesis and stress resistance[J]. Stress Biology, 2021, 1(1): 11.
- [15] WANG XY, LIU M, YU CJ, LI J, ZHOU XK. Biofilm formation: mechanistic insights and therapeutic targets[J]. Molecular Biomedicine, 2023, 4(1): 49.
- [16] MOHAMED NA, ALRAWY MH, MAKBOL RM, MOHAMED AM, HEMDAN SB, SHAFIK NS. Type VI secretion system (T6SS) in *Klebsiella pneumoniae*, relation to antibiotic resistance and biofilm formation[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2023, 15(5): 601-608.
- [17] CHEN LH, ZOU YR, KRONFL AA, WU Y. Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation[J]. MicrobiologyOpen, 2020, 9(3): e991.
- [18] YANG YT, PAN DM, TANG YN, LI JL, ZHU KX, YU ZL, ZHU LF, WANG Y, CHEN P, LI CF. H3-T6SS of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 contributes to environmental adaptation via secretion of a biofilm-promoting effector[J]. Stress Biology, 2022, 2(1): 55.
- [19] GUAN JY, XIAO X, XU SJ, GAO F, WANG JB, WANG TT, SONG YH, PAN JF, SHEN XH, WANG Y. Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(9): 633-642.
- [20] ZHANG WP, WANG Y, SONG YH, WANG TT, XU SJ, PENG Z, LIN XL, ZHANG L, SHEN XH. A type VI secretion system regulated by OmpR in *Yersinia pseudotuberculosis* functions to maintain intracellular pH homeostasis[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(2): 557-569.
- [21] HOOD RD, SINGH P, HSU F, GÜVENER T, CARL MA, TRINIDAD RRS, SILVERMAN JM, OHLSON BB, HICKS KG, PLEMEL RL, LI M, SCHWARZ S, WANG WY, MERZ AJ, GOODLETT DR, MOUGOUS JD. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7(1): 25-37.
- [22] WANG DD, ZHU LF, ZHEN XK, YANG DY, LI CF, CHEN YT, WANG HN, QU YC, LIU XZ, YIN YL, GU HW, XU L, WAN CX, WANG Y, OUYANG SY, SHEN XH. A secreted effector with a dual role as a toxin and as a transcriptional factor[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 7779.

- [23] YANG LL, JIA SK, SUN SH, WANG L, ZHAO BB, ZHANG MS, YIN YL, YANG MM, FULANO AM, SHEN XH, PAN JF, WANG Y. A pyocin-like T6SS effector mediates bacterial competition in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(6): e0427823.
- [24] KOSKINIEMI S, LAMOUREUX JG, NIKOLAKAKIS KC, de ROODENBEKE CT, KAPLAN MD, LOW DA, HAYES CS. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(17): 7032-7037.
- [25] POOLE SJ, DINER EJ, AOKI SK, BRAATEN BA, de ROODENBEKE CT, LOW DA, HAYES CS. Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition (CDI) and rearrangement hotspot (Rhs) systems[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(8): e1002217.
- [26] 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[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170770.
- [27] SEPER A, FENGLER VHI, ROIER S, WOLINSKI H, KOHLWEIN SD, BISHOP AL, CAMILLI A, REIDL J, SCHILD S. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation[J]. Molecular Microbiology, 2011, 82(4): 1015-1037.
- [28] SONG YH, XIAO X, LI CF, WANG TT, ZHAO RX, ZHANG WP, ZHANG L, WANG Y, SHEN XH. The dual transcriptional regulator RovM regulates the expression of AR3- and T6SS4-dependent acid survival systems in response to nutritional status in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(11): 4631-4645.
- [29] WANG TT, SI MR, SONG YH, ZHU WH, GAO F, WANG Y, ZHANG L, ZHANG WP, WEI GH, LUO ZQ, SHEN XH. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(7): e1005020.
- [30] ZHU LF, XU L, WANG CG, LI CF, LI MY, LIU QM, WANG X, YANG WH, PAN DM, HU LF, YANG YD, LU ZQ, WANG Y, ZHOU DS, JIANG ZF, SHEN XH. T6SS translocates a micropeptide to suppress STING-mediated innate immunity by sequestering manganese[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(42): e2103526118.