

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2018.03.004

• 论著 •

## 外环境压力对福氏志贺菌荚膜异多糖酸合成调节子转录的影响

叶立娜,蔡霞,林志伟,吕智慧,王小飞,尚永朋,瞿涤

复旦大学基础医学院病原生物学系,医学分子病毒学教育部/卫生部重点实验室,上海 200032

**摘要:** 荚膜异多糖酸合成调节子(regulator of colanic acid capsule synthesis, Rcs)对大肠埃希菌适应外环境压力具有重要调控功能,但其在志贺菌中的功能尚未见报道。为探索外环境压力对福氏志贺菌 Rcs 编码基因 *rccs* 转录水平的影响,本研究采用核苷酸序列比对及蛋白结构域预测等生物信息学方法分析福氏志贺菌的 Rcs 编码基因簇 *rccsBDC*,利用实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR),对该菌不同生长时期的 *rccsB*、*rccsD*、*rccsC* 基因转录水平进行分析,并检测在不同 pH 值培养基、渗透压条件下的基因转录水平。结果显示,福氏志贺菌 *rccsBDC* 在培养 5~6 h(对数中期)时转录水平较高,8~10 h(稳定期)时转录水平较低( $P < 0.001$ );10 h 时, *rccsB* 和 *rccsD* 在酸性、渗透压条件下的转录水平平均显著高于正常条件下的转录水平( $P < 0.05$ )。结果提示,外环境刺激可提高福氏志贺菌在稳定期的 *rccsB* 和 *rccsD* 转录水平,为志贺菌适应胃肠道酸性、渗透压环境的机制研究提供了一定理论基础。

**关键词:** 荚膜异多糖酸合成调节子;福氏志贺菌;双组分信号转导系统;外环境压力

### Impact of environmental stresses on transcriptional regulation of Rcs in *Shigella flexneri*

YE Lina, CAI Xia, LIN Zhiwei, LÜ Zhihui, WANG Xiaofei, SHANG Yongpeng,  
QU Di

Department of Medical Microbiology and Parasitology, Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministries of Education and Health, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** The regulator of colanic acid capsule synthesis (Rcs) is a complicated two-component signal transduction system. Although details of Rcs in most Enterobacteria are known, its regulation in *Shigella* has not been reported yet. This study aims to explore the influences of environmental stresses on Rcs transcription in *Shigella*. Based on biological informatics analysis of RcsBDC in *Shigella flexneri* 2a 301, the transcriptional levels of *rccsB*, *rccsD*, *rccsC* at different growth stages were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR), and the changes in the transcriptional levels of the three genes in acid and osmotic pressure conditions were examined. The transcriptional levels of the three genes were higher in 5–6 h (logarithmic phase), and lower in 8–10 h (stationary phase). The transcriptional levels of *rccsB* and *rccsD* in acid and osmotic pressure conditions were higher than in normal condition, suggesting environmental stimuli

---

基金项目:国家自然科学基金(81571955)

通信作者:瞿涤

Corresponding author. QU Di, E-mail: dqu@shmu.edu.cn

promote the transcriptional levels of *rcsB* and *rccD* in *Shigella flexneri* during stationary phase.

**Key words:** Rcs; *Shigella flexneri*; Two-component signal transduction system; Environmental stress

双组分信号转导系统(two component signal transduction system, TCS)广泛存在于原核生物,多由组氨酸激酶(histidine kinase)和反应调节蛋白组成,调控细菌的毒力、环境适应力等<sup>[1-4]</sup>。然而,肠杆菌科中的荚膜多糖酸合成调节子(regulator of colanic acid capsule synthesis, Rcs)是一种复杂的TCS,主要含RcsB(反应调节蛋白)、RcsC(组氨酸激酶)、RcsD(磷酸转移蛋白)3个组分。在大肠埃希菌、沙门菌等肠杆菌科细菌中,Rcs可调控细菌抗酸性、毒力等生物学特性<sup>[5-11]</sup>,但其在志贺菌中的调控功能尚未见报道。

志贺菌为胞内寄生菌,其进入人体后需感受宿主细胞内外环境变化而调节相应蛋白的表达以适应所处的微环境。在志贺菌的4个亚群中,福氏志贺菌2a型为我国主要型别<sup>[12-14]</sup>。本研究拟在福氏志贺菌2a 301株(*Shigella flexneri* 2a str. 301,*Sf301*)*rccBDC*基因簇生物信息学分析的基础上,分析外环境压力如酸性及高渗条件下Rcs表达情况,为后续探索志贺菌Rcs调控抗环境压力及毒力机制打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** *Sf301* 由中国医学科学院/北京协和医学院病原生物学研究所病毒基因工程国家重点实验室提供,本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂** 胰蛋白胨、酵母提取物购于英国OXIOD公司,氯化钠、盐酸购于国药集团化学试剂有限公司,2×*Taq* DNA聚合酶、细菌基因组DNA提取试剂盒、DNA Marker购于天根生化科技(北京)有限公司,NucleoSpin Gel and PCR Clean-up购于德国MACHEREY-NAGEL公司,RNeasy Mini Kit购于德国Qiagen公司,PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex *Taq*购于日本TaKaRa公司。引物由生工生物(上海)工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 福氏志贺菌 *rccBDC* 基因簇的生物信息学

**分析** 自美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)下载细菌的*rccB*、*rccD*、*rccC*核苷酸序列,菌株包括福氏志贺菌2a 301(NC\_004337.2)、其他志贺菌亚群的菌株[痢疾志贺菌 *Sd*197(NC\_007606.1)、鲍氏志贺菌 *Sb*227(CP000036.1)、宋内志贺菌 *Ss*046(CP000038.1)],以及肠杆菌科的菌株[大肠埃希菌UMN026(NC\_011751.1)、鼠伤寒沙门菌 LT2(NC\_003197.2)、伤寒沙门菌 CT18(NC\_003197.2)、肺炎克雷伯菌 MGH 78578(NC\_009648.1)、梨火疫病菌 ATCC 49946(NC\_013971.1)、迟缓爱德华菌 FL6-60(NC\_017309.1)、鼠疫耶尔森菌 CO92(NC\_003143.1)、奇异变形杆菌 HI4320(NC\_010554.1)].利用Vector NTI Advance 11-Alignment进行相似性比对,生成进化树。利用SMART数据库对*Sf301* RcsB、RcsD、RcsC蛋白的氨基酸序列进行结构域预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。

**1.2.2 福氏志贺菌 RNA 的提取和反转录** 取*Sf301*按1:200接种于LB培养基,37℃振荡培养过夜,再按1:200转种于LB培养基培养6 h。收取菌液,离心,用含15 mg/mL溶菌酶的TE重悬菌体。采用RNeasy Mini Kit提取细菌RNA:加入RLT和无水乙醇裂解细菌,将裂解液转移至吸附柱进行离心吸附,用RW1和RPE洗脱, RNA-free水收集RNA。RNA在去除DNA(gDNA Eraser)后,反转录为cDNA(PrimeScript RT Enzyme Mix, 37℃ 15 min, 85℃ 5 s)。

#### 1.2.3 福氏志贺菌 *rccBDC* 操纵子共转录分析

根据*Sf301*基因组中*rccB*(2)、*rccC*(3)、*rccD*(4)的核苷酸序列及其上下游基因*ompC*(1)和*SF2303*(5)序列,在两两基因之间设计引物(表1)。用细菌基因组DNA(genomic DNA, gDNA)提取试剂盒提取*Sf301*gDNA。以cDNA为模板, RNA为阴性对照, gDNA为阳性对照, 进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增(2×*Taq* DNA聚合酶)。反应条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 10 min。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

| Primers                            | Sequences (5'-3')     | Location        | Product length (bp) |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|
| Co-transcriptional analysis by PCR |                       |                 |                     |
| 12-F                               | CTACAGACTTGTCTCAGAG   | 2334002-2334021 | 1 097               |
| 12-R                               | ACGTAACGCCAGGTATCGAC  | 2335098-2335079 |                     |
| 23-F                               | TCCATGCCAGCGGCTATTAT  | 2337303-2337322 | 424                 |
| 23-R                               | CATCCAGTTCCGGCAGGTTG  | 2337726-2337707 |                     |
| 34-F                               | TTACGGTGACAAGCGTCTCT  | 2338013-2338032 | 577                 |
| 34-R                               | TGCCGGTAATCGGAGTAAC   | 2338589-2338570 |                     |
| 45-F                               | CTGAGCCTGATCGGAACCTCA | 2341099-2341118 | 627                 |
| 45-R                               | GGCGCTATCAGGTGTATATC  | 2341725-2341706 |                     |
| Transcription detection by qRT-PCR |                       |                 |                     |
| rsmC-F                             | CTGCCCCGGCGGTAGAAC    | 4573886-4573868 | 126                 |
| rsmC-R                             | ACGGCGGGTTGGAGATGAT   | 4573761-4573779 |                     |
| rcsB-F                             | ATAGTCTTGTTCGGTATTG   | 2337618-2337637 | 83                  |
| rcsB-R                             | AGTGCTGTAGAGTCTTC     | 2337700-2337683 |                     |
| rcsC-F                             | GCATCGTCGTTACAACATA   | 2339090-2339072 | 76                  |
| rcsC-R                             | TTACTCACTACCTCGTCAG   | 2339015-2339033 |                     |
| rcsD-F                             | AAGTTGAAGAGGAAGAAG    | 2336934-2336951 | 194                 |
| rcsD-R                             | AGAGGCAGTAAGATTAGA    | 2337127-2337110 |                     |

**1.2.4 福氏志贺菌 rcsB、rcsD、rcsC 不同时间点的转录水平分析** 取过夜培养的 Sf301 按 1:200 转种于 LB 培养基,于不同时间点(4、5、6、8、10 h)收取菌液,按 1.2.2 提取 RNA 并反转录。以 16S RNA 基因 rsmC 为内参,根据 Sf301 的 rcsB、rcsD、rcsC 及 rsmC 核苷酸序列,用 Beacon Designer 7 设计引物(表 1),以 cDNA 为模板,用 Eppendorf RealPlex 4(德国 Eppendorf 公司)进行 qRT-RCR (SYBR Premix Ex Taq)。反应条件为:95 °C 2 min;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环。计算 3 孔循环阈值(cycle threshold, Ct)的平均值,设生长 4 h 时所测基因和内参基因的 Ct 平均值分别为  $\bar{C}_0$  和  $\bar{C}_{rsmC}$ ,其他各生长时间点所测基因和内参基因的 Ct 平均值分别为  $\bar{C}$  和  $\bar{C}_r$ ,采用相对定量法计算各时间

点的基因转录水平的相对值 X:  $X = 2^{-[(C - Cr) - (C_0 - C_{rsmC})]}$ 。重复 3 次实验,用 Graphpad Prism 5 进行统计学分析和作图。

**1.2.5 不同 pH 和渗透压条件下福氏志贺菌的生长曲线测定** 配制不同 pH 值的 LB 培养基(pH 2.5、pH 3.5、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.5、pH 7.5),以及不同渗透压的 LB 培养基(NaCl 浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mol/L)。取上述 LB 培养基各 200 μL 加入 96 孔板,每 3 孔重复加 1 种培养基。取过夜培养的 Sf301 按 1:200 转种于各培养基,用全自动生长曲线分析仪(Bioscreen,芬兰)测定 OD<sub>600</sub>,每 0.5 h 测 1 次,连续测 24 h。用 GraphPad Prism 5 制作生长曲线。

**1.2.6 酸性和渗透压条件下福氏志贺菌 rcsB、**

**rcsD、rcsC 的转录水平分析** 取过夜培养的 *Sf301* 按 1:200 转种于正常 LB 培养基, pH 5.5 和 pH 6.5 的酸性 LB 培养基, 以及 NaCl 浓度为 0.4 和 0.8 mol/L 的高渗 LB 培养基, 于 6 h 和 10 h 收取菌液, 按 1.2.2 提取 RNA 并反转录, 按 1.2.4 进行 qRT-PCR。设正常 LB 培养基培养时所测基因和内参基因的 Ct 平均值为  $\bar{C}_0$  和  $\bar{C}_{r0}$ , 其他各压力条件下培养时所测基因和内参基因的 Ct 平均值为  $\bar{C}$  和  $\bar{C}_r$ , 按 1.2.4 中公式计算各压力条件下基因转录水平的相对值。重复 3 次实验, 用 Graphpad Prism 5 进行统计学分析和作图。

### 1.3 统计学方法

使用 Graphpad Prism 5 软件进行统计学分析。在不同培养时间点的基因转录水平分析中, 采用 Two-way ANOVA 双因素方差分析, 统计学结果选取以时间点为因素的统计量 F 值和 P 值。在不同 pH 值和渗透压条件下的基因转录水平分析中, 采用 Two-way ANOVA 双因素方差分析结合 Bonferroni post hoc test 多重检验方法, 统计学结果选取各压力条件和正常条件下基因转录水平两两

比较的 P 值。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 福氏志贺菌 *rcsBDC* 基因簇的生物信息学分析

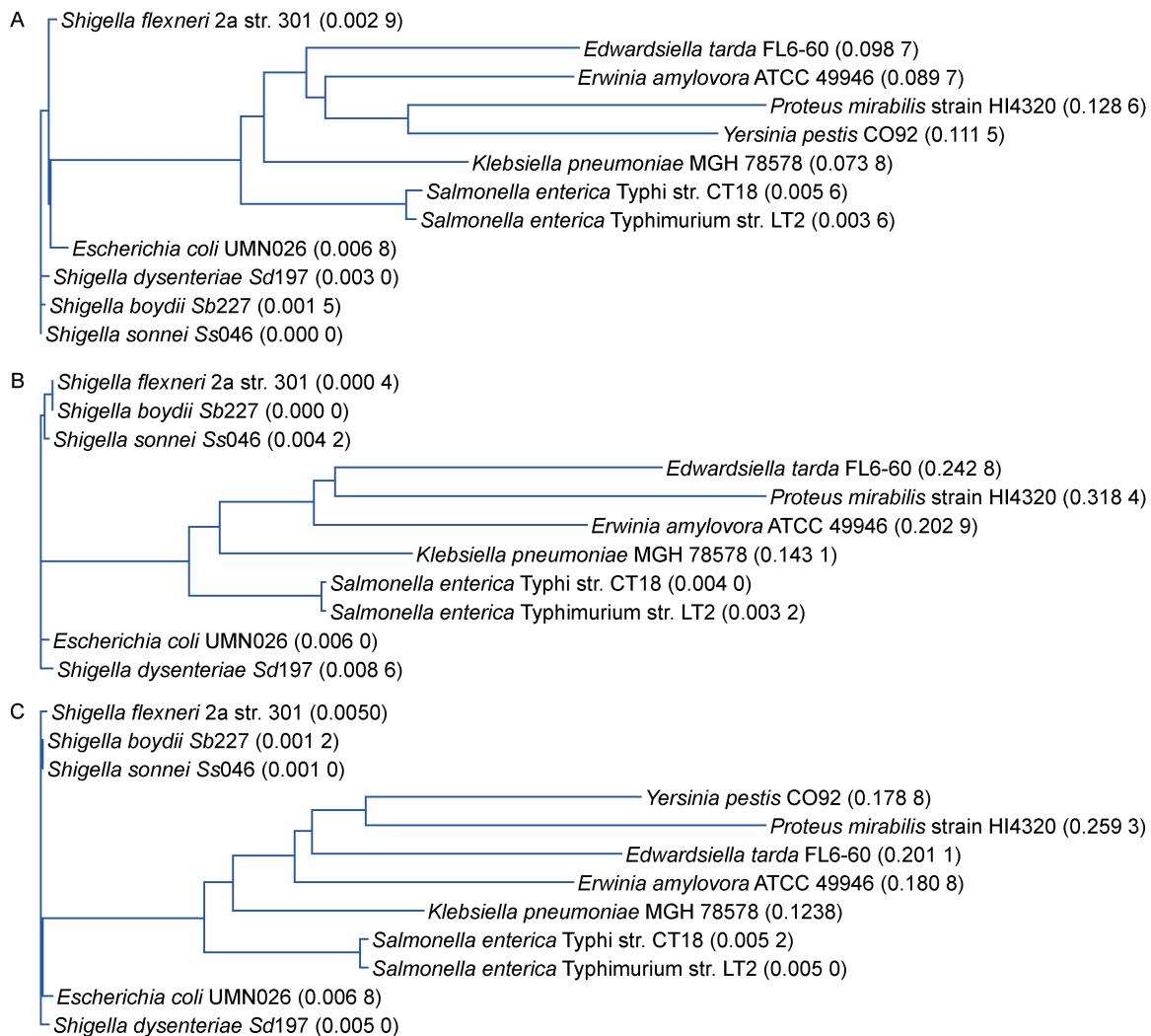
为研究福氏志贺菌 *rcsBDC* 基因簇的同源性和蛋白结构域, 进行生物信息学分析。通过比对 *Sf301* 与其他细菌 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 核苷酸序列的相似性, 发现 *Sf301* 与其他亚群志贺菌 (*Ss046*、*Sb227*、*Sd197*) 相比, *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 序列的同源性分别为 99.1%~99.4%、98.0%~100.0%、98.9%~99.2%。*Sf301* 与大肠埃希菌 UMN026 的 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 同源性均高达 98.4% 以上。*Sf301* 与肠杆菌科其他细菌相比, *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 的同源性分别为 (80.90±4.68)%、(64.03±12.96)%、(66.90±9.52)% (表 2)。进化树分析显示, *Sf301* 与其他亚群志贺菌及大肠埃希菌在进化上距离最近, 与沙门菌亲缘性次之, 而与肠杆菌科其他细菌相对较远(图 1)。

表 2 福氏志贺菌 2a 301 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 核苷酸序列相似性

Tab. 2 The *rcsB*, *rcsD* and *rcsC* nucleotide sequence identity of *Shigella flexneri* 2a 301

| Strains                                    | <i>rcsB</i>    |                 | <i>rcsD</i>    |                 | <i>rcsC</i>    |                 |
|--|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
|  | Length<br>(nt) | Identity<br>(%) | Length<br>(nt) | Identity<br>(%) | Length<br>(nt) | Identity<br>(%) |
| <i>Shigella sonnei</i> Ss046               | 651            | 99.4            | 2 673          | 98.9            | 2 850          | 99.2            |
| <i>Shigella boydii</i> Sb227               | 651            | 99.2            | 2 673          | 100.0           | 2 850          | 99.2            |
| <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197          | 651            | 99.1            | 2 673          | 98.0            | 2 850          | 98.9            |
| <i>Escherichia coli</i> UMN026             | 651            | 98.9            | 2 673          | 98.4            | 2 850          | 98.6            |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 | 666            | 84.7            | 2 686          | 77.3            | 2 847          | 77.7            |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhi CT18      | 651            | 86.3            | 2 670          | 77.7            | 2 847          | 77.6            |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH 78578     | 651            | 84.5            | 2 658          | 70.8            | 2 841          | 74.3            |
| <i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946        | 648            | 80.0            | 2 658          | 57.7            | 2 964          | 62.2            |
| <i>Edwardsiella tarda</i> FL6-60           | 654            | 80.8            | 2 697          | 53.2            | 2 871          | 61.9            |
| <i>Yersinia pestis</i> CO92                | 654            | 76.5            | Not found      | Not found       | 2 874          | 60.9            |
| <i>Proteus mirabilis</i> HI4320            | 657            | 73.5            | 2 694          | 47.5            | 2 829          | 53.7            |

Gene *rcsD* was not found in the genome of *Yersinia pestis* CO92. nt: nucleotide.



A: *rcsB*. B: *rcsD*. C: *rcsC*.

图1 肠杆菌科细菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of *rcsB*, *rcsD* and *rcsC* in Enterobacteriaceae

利用 SMART 数据库,根据 *Sf301* 的 RcsB、RcsD、RcsC 氨基酸序列预测蛋白结构域,发现 RcsC 含 2 个跨膜区和 PAS(Per-Arnt-Sim)、HisKA(histidine kinase)、HATPase\_c(histidine kinase/HSP90-like ATPase)、REC(receiver)域;RcsD 含 1 个跨膜区和 HPT(histidine phosphotransferase)、HATPase\_c 域;RcsB 含 REC 和 HTH\_LUXR(LuxR-type DNA binding helix-turn-helix)域(图 2A)。

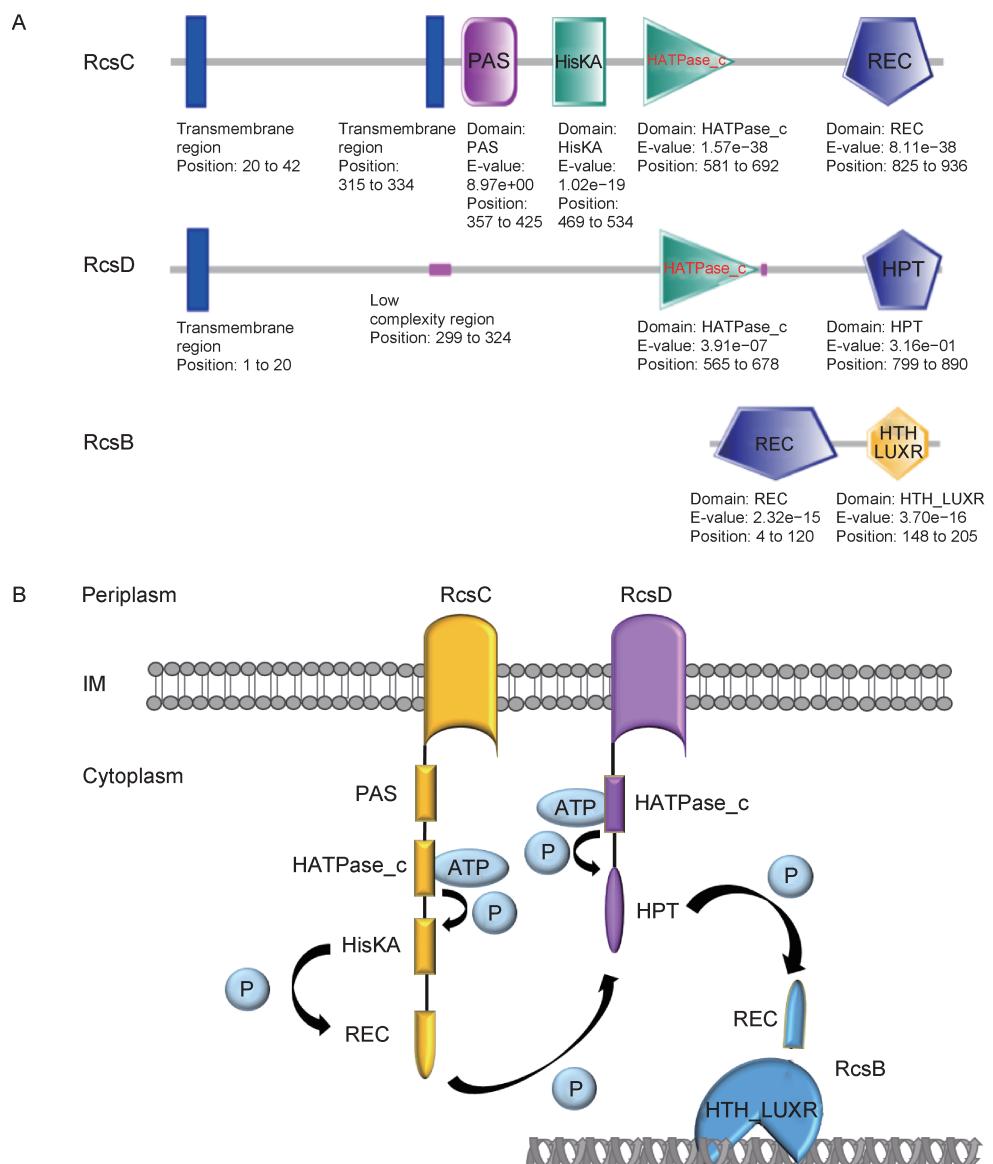
## 2.2 福氏志贺菌 *rcsBDC* 操纵子共转录分析

为研究福氏志贺菌 *Sf301* 的 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 之间及其与上下游基因之间是否存在共转录,设计 4 对引物(图 3A),以 *Sf301* cDNA 为模板进行 PCR,gDNA 为对照。结果显示,以 gDNA 为模板

可扩增出 1 097 bp(12-F/12-R)、424 bp(23-F/23-R)、577 bp(34-F/34-R)和 627 bp(45-F/45-R)的片段,而以 cDNA 为模板仅扩增出 424 bp(23-F/23-R)片段(图 3B)。提示在 *Sf301* 中,*rcsB* 和 *rcsD* 处于同一条 mRNA 链,*rcsB* 与 *rcsC* 之间及 *rcsBDC* 与上下游基因之间均不存在共转录。

## 2.3 福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 不同时间点的转录水平分析

为分析福氏志贺菌不同生长时间点的 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 表达水平,分别提取 *Sf301* 生长 4、5、6、8 和 10 h 的 RNA,通过 qRT-PCR 检测 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 转录水平。结果显示,*rcsB*、*rcsD* 基因转录水平在生长 5 h(对数中期)时达高峰,6 h 后逐渐下降;*rcsC* 基因转录水平在生长 6 h 时达高峰,8 h 后



A: The domains were predicted by SMART database according to the amino acid sequences of RcsC, RcsD, RcsB in *Sf*301. B: The phosphotransfer among the domains of RcsBDC was inferred from references<sup>[6,16-17]</sup>. Upon PAS sensing signals, HisKA undergoes autophosphorylation of the histidine with ATP under the catalysis of HATPase\_c domain, and transfers the phosphate group to the aspartate on REC. The phosphate group is then transferred to histidine on HPT and further to aspartate on the terminal REC of RR (His-Asp-His-Asp). After activation by phosphorylation of REC, HTH\_LUXR binds DNA in the major groove and works as a transcriptional regulator.

图2 福氏志贺菌 RcsC、RcsD、RcsB 蛋白结构域

Fig. 2 The domains of RcsC, RcsD and RcsB in *Shigella flexneri*

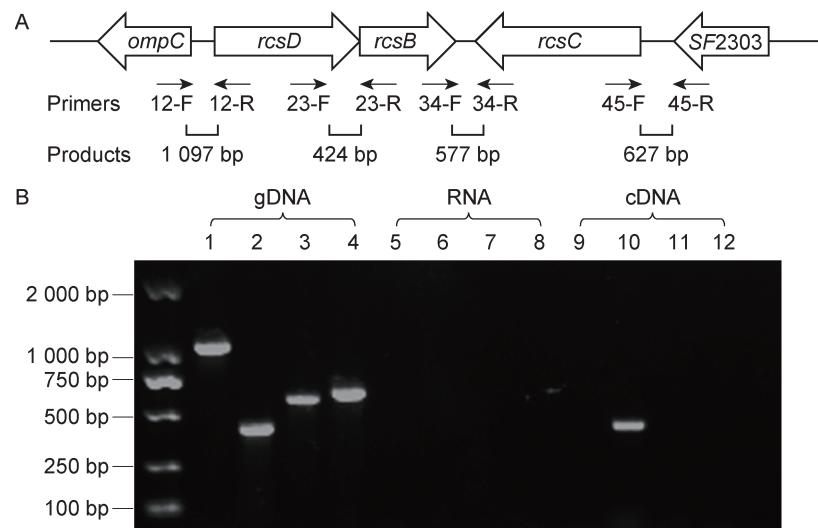
(对数晚期)逐渐下降( $F = 23.97, P < 0.001$ ) (图4)。

#### 2.4 酸性环境对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录水平的影响

为研究酸性环境对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录水平的影响,首先检测不同 pH 条件下 *Sf*301 的生长曲线。结果显示, *Sf*301 在 pH 6.5 条

件下的生长曲线与 pH 7.5 时一致,于 2 h 进入对数期,8 h 进入稳定期;在 pH 5.5 条件下,细菌生长明显变慢,于 4 h 进入对数期,10 h 进入稳定期,其稳定期的  $OD_{600}$  稍高于 pH 6.5 和 pH 7.5 条件下的稳定期;在 pH 5.0 及以下的酸性环境中,细菌的生长基本停滞(图 5A)。

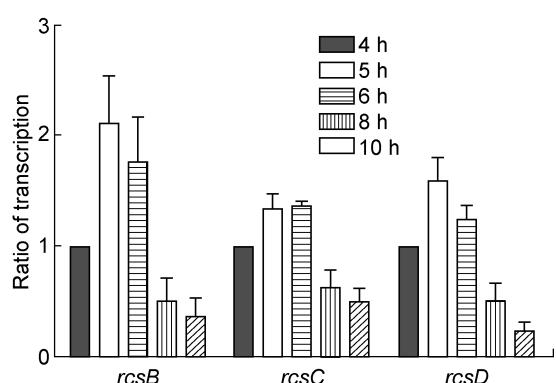
进一步选取对数中期(6 h)和稳定期(10 h)两



A: The primers 12-F/12-R, 23-F/23-R, 34-F/34-R, 45-F/45-R were designed. B: Genomic DNA (gDNA), RNA and cDNA of *Sf301* were used as templets. Primers 12-F/12-R were used in columns 1/5/9, 23-F/23-R in columns 2/6/10, 34-F/34-R in columns 3/7/11, and 45-F/45-R in columns 4/8/12.

图3 福氏志贺菌 *Sf301* 的 *rcsBDC* 操纵子共转录分析

Fig. 3 Co-transcriptional analysis of *rcsBDC* operon in *Sf301*



Overnight cultures were inoculated at 1:200 into LB and harvested at 4 h, 5 h, 6 h, 8 h and 10 h of growth. Their total RNAs were isolated and reversely transcribed into cDNAs, which were used as templets. The transcriptional levels of *rcsB*, *rcsC* and *rcsD* were analyzed by qRT-PCR.

图4 福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 不同时间点的转录水平

Fig. 4 Transcriptional levels of *rcsB*, *rcsC* and *rcsD* at different time points in *Shigella flexneri*

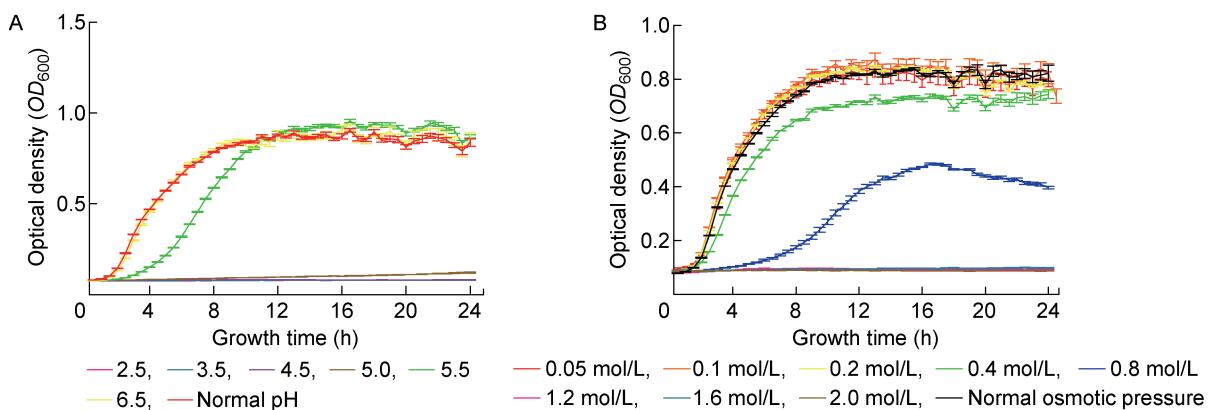
个时间点,检测 *Sf301* 在酸性培养条件下 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 的转录水平。结果显示,当细菌在 pH 6.5 或 pH 5.5 条件下培养 6 h 时, *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 转录水平无明显改变(图 6A)。在 pH 6.5 或 pH 5.5 条件下培养 10 h 时,细菌 *rcsB* 转录水平明显高于 pH 7.5 条件 [(4.30 ± 0.96) 倍,  $P < 0.05$ ; (5.64 ± 1.18) 倍,  $P < 0.001$ ], *rcsD* 转录水平也明显升高 [(3.83 ± 0.77) 倍,  $P < 0.05$ ; (4.82 ± 1.30)

倍,  $P < 0.01$ ]。 *rcsC* 转录水平在 pH 6.5、pH 5.5 及 pH 7.5 条件下无明显差异 ( $P > 0.05$ )(图 6B)。

## 2.5 渗透压对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录水平的影响

为研究渗透压对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录的影响,首先测定 *Sf301* 在不同渗透压下的生长曲线。结果显示, *Sf301* 在 0.2 mol/L NaCl 及以下渗透压中的生长曲线与正常渗透压中一致,于 2 h 进入对数期,8 h 进入稳定期;在 0.8 mol/L NaCl 渗透压中生长明显变慢,于 6 h 进入对数期,14 h 进入稳定期,且其在对数期和稳定期的  $OD_{600}$  明显低于正常值;在 1.2 mol/L NaCl 及以上渗透压中,志贺菌生长停滞(图 5B)。

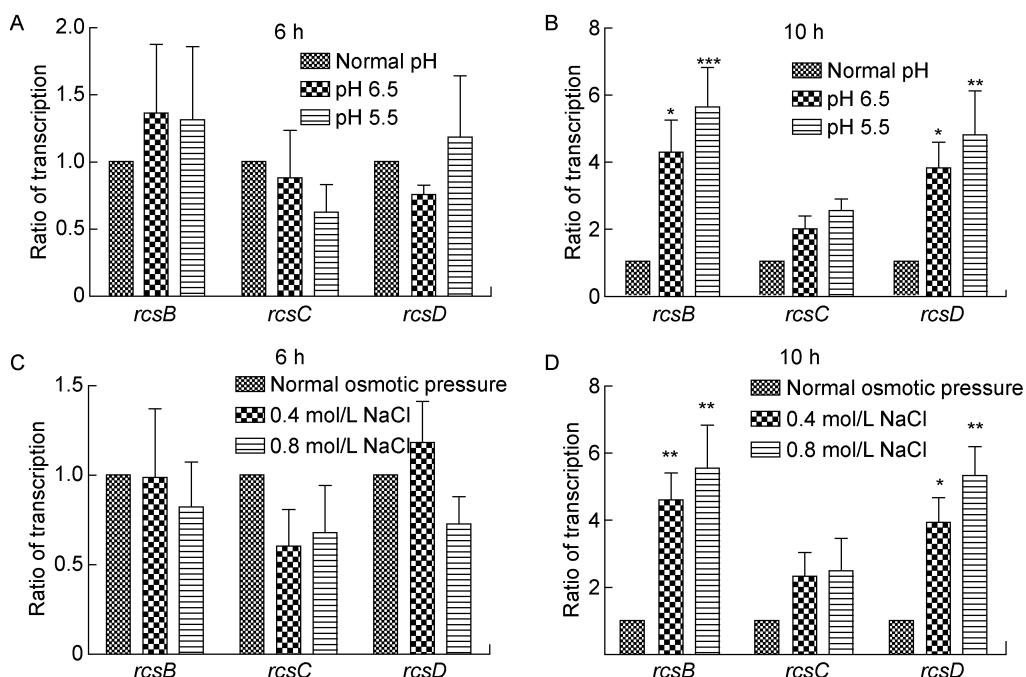
进一步选取对数中期(6 h)和稳定期(10 h)两个时间点,检测 *Sf301* 在高渗培养条件下 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 的转录水平。结果显示,细菌在 0.4 mol/L 或 0.8 mol/L NaCl 渗透压中培养 6 h 时, *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 转录水平无明显改变(图 6C)。在 0.4 mol/L 或 0.8 mol/L NaCl 渗透压中培养 10 h 时,细菌 *rcsB* 转录水平明显高于正常渗透压 [(4.60 ± 0.81) 倍,  $P < 0.01$ ; (5.55 ± 1.28) 倍,  $P < 0.01$ ], *rcsD* 的转录水平也明显升高 [(3.94 ± 0.74) 倍,  $P < 0.05$ ; (5.34 ± 0.86) 倍,  $P < 0.01$ ]。 *rcsC* 转录水平在 0.4 mol/L、0.8 mol/L NaCl 及正常渗透压中无明显差异 ( $P > 0.05$ )(图 6D)。



The growth curves of *Shigella flexneri* under different pH (A) and osmotic pressure (B). Overnight cultures were inoculated at 1 : 200 into LB under different conditions. The  $OD_{600}$  was tested every half an hour. Three replications were tested for each strain grown under each condition to obtain mean and standard deviation.

图 5 福氏志贺菌在环境压力中的生长曲线

Fig. 5 The growth curves of *Shigella flexneri* under environmental stresses



Overnight cultures were inoculated at 1 : 200 into LB under normal condition, pH 6.5, pH 5.5, 0.4 mol/L NaCl and 0.8 mol/L NaCl, and were harvested at 6 h and 10 h. Total RNAs were extracted and reversely transcribed into cDNAs. The transcriptional levels of *rcsB*, *rcsD* and *rcsC* were detected by qRT-PCR. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

图 6 环境压力对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录水平的影响

Fig. 6 The effect of environmental stresses on transcriptional levels of *rcsB*, *rcsD*, *rcsC* in *Shigella flexneri*

### 3 讨论

大肠埃希菌中, Rcs 调控细菌的抗酸性和生物膜形成等生物学特性<sup>[5]</sup>。志贺菌与大肠埃希菌的亲缘性非常近, 又进化出特定的致病性和生理特性<sup>[15]</sup>。因此, 分析志贺菌的 Rcs 系统对其分子致病

机制研究具有重要意义。通过生物信息学分析发现, 福氏志贺菌的 *rcsBDC* 除与其他亚群志贺菌高度同源外, 与大肠埃希菌和沙门菌也有较高的同源性。在进化树上, 志贺菌中 *rcsBDC* 与大肠埃希菌最为靠近, 沙门菌次之, 提示志贺菌 Rcs 系统可能与大肠埃希菌和沙门菌一样, 对细菌生物学功能具

有重要调控作用。

Rcs 系统主要含 RcsB、RcsC、RcsD 3 个组分,各组分的结构和功能较典型 TCS 更为复杂。分析福氏志贺菌 RcsB、RcsC、RcsD 的结构域,结合文献报道,推测当 RcsC-PAS 感受信号后,HATPase\_c 催化 ATP 水解产生磷酸基团,将 HisKA 的 His 磷酸化(此过程称自磷酸化),继而磷酸转移至 REC 域的 Asp<sup>[16]</sup>。RcsC-REC 将磷酸传递给 RcsD-HPT,使 His 磷酸化后又转移至 Asp<sup>[17]</sup>。此外,RcsD 含 HATPase\_c,提示 RcsD 可能在信号刺激下自磷酸化,形成不依赖 RcsC 的信号转导通路<sup>[6]</sup>。RcsB-REC 接受来自 RcsD 的磷酸基团激活 HTH\_LUXR,后者结合下游基因启动子区域 DNA 而调控靶基因表达(图 2B)。因此,福氏志贺菌 *Sf301* 的 RcsBDC 蛋白具备完整的 TCS 功能域,可通过磷酸转移机制实现信号转导。

在鼠伤寒沙门菌中,*rcsB* 基因由  $P_{rcsDB}$  和  $P_{rcsB}$  两个启动子启动转录,其中  $P_{rcsDB}$  为 *rcsD* 与 *rcsB* 共同启动子<sup>[18-19]</sup>。在福氏志贺菌 *Sf301* 基因组中,*rcsD* 位于 *rcsB* 上游,与 *rcsB* 同向,两者仅相距 17 bp;*rcsC* 位于 *rcsB* 下游,与 *rcsB* 反向且相距 200 bp。本研究对 *rcsBDC* 及其上下游基因的 cDNA 进行 PCR 分析,发现 *rcsD* 与 *rcsB* 之间存在共转录,提示福氏志贺菌与鼠伤寒沙门菌一样,*rcsD* 与 *rcsB* 具有共同的启动子。

志贺菌在感染过程必须经过胃肠道中的酸性、渗透压环境,因此分析外环境对志贺菌 Rcs 系统的影响对其致病性研究具有重要意义。大肠埃希菌中,酸性、渗透压、葡萄糖、锌离子和低温环境等均可激活 Rcs 系统,从而影响其下游基因表达<sup>[20-22]</sup>,但外环境压力对 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 基因转录水平的影响尚未见报道。本研究发现,在福氏志贺菌对数生长中期(6 h),酸性、高渗条件对 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 的转录水平均无明显影响,这可能是由于 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 在生长 6 h 时的转录水平较高,已能满足其发挥功能所需的表达量;而在 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 转录水平较低的稳定期(10 h),酸性、渗透压条件下 *rcsB* 和 *rcsD* 的转录水平显著高于正常条件,提示外环境压力使福氏志贺菌生长稳定的 *rcsB*、*rcsD* 基因转录水平上调。此外,本研究还检测了多黏菌素 B 条件下 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 的转录水平,未发现明显变化。

综上所述,本研究初步探索了外环境对福氏志贺菌 *rcsB*、*rcsD*、*rcsC* 基因转录的影响,发现酸性和高渗透压环境可促进 *rcsB* 和 *rcsD* 基因转录,为志贺菌 Rcs 系统的功能机制研究提供了一定理论基础。

## 参考文献

- [1] Wuichet K, Cantwell BJ, Zhulin IB. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems [J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(2): 219-225.
- [2] Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems [J]. J Bacteriol, 2018. doi: 10.1128/JB.00681-17.
- [3] Casino P, Rubio V, Marina A. The mechanism of signal transduction by two-component systems [J]. Curr Opin Struct Biol, 2010, 20(6): 763-771.
- [4] 陈嘉瑜,蔡霞,瞿涤.沙门菌 PhoP-PhoQ 双组分信号转导系统 [J].微生物与感染,2010,5(4): 239-242.
- [5] Pannen D, Fabisch M, Gausling L, Schnetz K. Interaction of the RcsB response regulator with auxiliary transcription regulators in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2016, 291(5): 2357-2370.
- [6] Pescaretti ML, Farizano JV, Morero R, Delgado MA. A novel insight on signal transduction mechanism of RcsCDB system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72527.
- [7] Llobet E, Campos MA, Gimenez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors [J]. Infect Immun, 2011, 79(9): 3718-3732.
- [8] Howery KE, Clemmer KM, Rather PN. The Rcs regulon in *Proteus mirabilis*: implications for motility, biofilm formation, and virulence [J]. Curr Genet, 2016, 62(4): 775-789.
- [9] Li Y, Hu Y, Francis MS, Chen S. RcsB positively regulates the *Yersinia Ysc-Yop* type III secretion system by activating expression of the master transcriptional regulator LcrF [J]. Environ Microbiol, 2015, 17(4): 1219-1233.
- [10] Ancona V, Chatnaparat T, Zhao Y. Conserved aspartate and lysine residues of ResB are required for amylovoran biosynthesis, virulence, and DNA binding in *Erwinia amylovora* [J]. Mol Genet Genomics, 2015, 290(4): 1265-1276.
- [11] Xu Y, Xu T, Wang B, Dong X, Sheng A, Zhang XH. A mutation in *rcsB*, a gene encoding the core component of the Rcs cascade, enhances the virulence of *Edwardsiella*

- tarda [J]. Res Microbiol, 2014, 165(3): 226-232.
- [12] Livio S, Stockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Oundo JO, Qureshi S, Ramamurthy T, Tamboura B, Adegbola RA, Hossain MJ, Saha D, Sen S, Faruque AS, Alonso PL, Breiman RF, Zaidi AK, Sur D, Sow SO, Berkeley LY, O'Reilly CE, Mintz ED, Biswas K, Cohen D, Farag TH, Nasrin D, Wu Y, Blackwelder WC, Kotloff KL, Nataro JP, Levine MM. Shigella isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development [J]. Clin Infect Dis, 2014, 59 (7): 933-941.
- [13] Marteyn B, Gazi A, Sansonetti P. Shigella: a model of virulence regulation in vivo [J]. Gut Microbes, 2012, 3(2): 104-120.
- [14] 王传清, 何磊艳, 王爱敏, 张文宏. 2007 年上海市儿童社区获得性腹泻致病菌谱分析 [J]. 微生物与感染, 2009, 4(2): 97-100.
- [15] Ud-Din A, Wahid S. Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation [J]. Braz J Microbiol, 2014, 45 (4): 1131-1138.
- [16] Vierstra RD, Davis SJ. Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction [J]. Semin Cell Dev Biol, 2000, 11(6): 511-521.
- [17] Janiak-Spens F, Sparling DP, West AH. Novel role for an HPt domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain [J]. J Bacteriol, 2000, 182(23): 6673-6678.
- [18] Pescaretti ML, Lopez FE, Morero RD, Delgado MA. Transcriptional autoregulation of the RcsCDB phosphorelay system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 12): 3513-3521.
- [19] Pescaretti ML, Morero R, Delgado MA. Identification of a new promoter for the response regulator rcsB expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 300(2): 165-173.
- [20] Sledjeski DD, Gottesman S. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 [J]. J Bacteriol, 1996, 178(4): 1204-1206.
- [21] Kannan G, Wilks JC, Fitzgerald DM, Jones BD, Bondurant SS, Slonczewski JL. Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 37.
- [22] Hagiwara D, Sugiura M, Oshima T, Mori H, Aiba H, Yamashino T, Mizuno T. Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2003, 185(19): 5735-5746.

(收稿日期:2018-04-04)