

高通量转录组测序技术在克罗诺杆菌 毒力基因研究中的应用进展

李道凡¹, 陈 沁¹, 钮 冰¹, 杨捷琳^{2*}

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

摘 要: 克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是一种兼性厌氧的革兰氏阴性菌, 会引起婴幼儿脑膜炎等多种疾病, 严重危害人类健康。高通量转录组测序技术是一种具体测定各基因表达量的测序方法, 不仅可以全面研究全新的转录本, 还能获得更准确、详细的研究结果。本文综述了近年来高通量转录组测序技术在克罗诺杆菌新毒力因子相关基因的发现、毒力基因表达量与菌株毒力间的变化关系, 以及不同时间段上毒力基因表达量的差异方面的研究成果, 并展望该技术在克罗诺杆菌毒力研究中的应用前景, 以期为克罗诺杆菌的研究方法、防控防治提供意见和建议。

关键词: 高通量转录组测序技术; 克罗诺杆菌; 毒力因子; 毒力基因

Application progress of high-throughput transcriptome sequencing in the study of virulence genes of *Cronobacter*

LI Xiao-Fan¹, CHEN Qin¹, NIU Bing¹, YANG Jie-Lin^{2*}

(1. College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

ABSTRACT: *Cronobacter* is a parthenogenic anaerobic Gram-negative bacterium that causes a variety of diseases such as meningitis in infants and children, which seriously endangers people's health. High-throughput transcriptome sequencing technology is a sequencing method to specifically determine the expression of each gene, which not only allows the study of new transcripts completely, but also obtains more accurate and detailed results. This paper reviewed the recent research results of high-throughput transcriptome sequencing technology in the discovery of new virulence factor related genes, the relationship between virulence gene expression and strain virulence, as well as the difference in virulence genes expression in different time periods, and looked forward to the application prospect of this technology in the virulence research of *Cronobacter*, in order to provide suggestions for the research method, food safety control and clinical treatment of *Cronobacter*.

KEY WORDS: high-throughput transcriptome sequencing; *Cronobacter*; virulent factors; virulent genes

基金项目: 上海市科委项目(22N31900500)

Fund: Supported by the Shanghai Science and Technology Commission Project (22N31900500)

*通信作者: 杨捷琳, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检验。E-mail: 15900893603@qq.com

*Corresponding author: YANG Jie-Lin, Ph.D, Professor, Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Room 2-1050, No.1208, Mingsheng Road, Pudong New Area, Shanghai 200135, China. E-mail: 15900893603@qq.com

0 引言

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是一种从肠杆菌科中划分出的新食源性致病菌, 原名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)。克罗诺杆菌入侵人体后会引发肺、尿道、胃肠道等多个部位的炎症反应, 甚至会使婴儿、老年人等免疫力低下人群患上败血症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等严重疾病, 且致死率高达 40%~80%^[1-5]。目前, 奶粉、香料、谷物等多种干粮以及蔬菜水果中均检测到了克罗诺杆菌的污染, 其中, 中国的肉类、食用菌、生蔬菜等多种食物中也存在克罗诺杆菌污染的情况^[6-11]。克罗诺杆菌具有较强的生存能力, 可在酸性、高盐和干燥的环境中生存, 难以被彻底杀灭^[12]。为此, 对克罗诺杆菌毒力机制的研究可以为克罗诺杆菌引起的疾病提供防治防控上的帮助。

2003 年, COSTA 等^[13]首次研究了克罗诺杆菌的毒力, 发现克罗诺杆菌能够通过口服引起小鼠死亡, 而且不同菌株之间的毒力存在明显差异。自此以后, 研究者们对克罗诺杆菌的毒力机制展开了一系列研究, 相继发现了外膜蛋白、含锌金属蛋白酶、LysR 型转录调节剂(LysR-type of transcriptional regulators, LTTRs)等一系列毒力因子^[14]。近年来, 研究者们广泛应用高通量转录组测序的方法进行大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)、变形杆菌(*Proteus*)等肠杆菌科细菌的研究, 通过比较各基因在不同条件下的表达差异, 说明了各基因在代谢、抗逆、毒力等过程中的作用^[15-18]。然而, 鲜少有整理高通量转录组测序技术在克罗诺杆菌上的研究成果。因此, 本文以肠杆菌科细菌克罗诺杆菌为对象, 详细综述了近年来高通量转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)在克罗诺杆菌毒力研究中的成果, 说明了应用 RNA-seq 进行研究的优势, 以为为克罗诺杆菌的毒力研究、防控防治上提供方法上的指导和建议。

1 高通量转录组测序技术简介

RNA-seq 是一种用以量化基因表达水平的 RNA 高通量测序技术。相较于传统的转录组测序技术, RNA-seq 不仅可以用于基因组谱尚未完成的物种, 或者全新的转录本, 而且具有获得更宽的范围、更深的测序覆盖度、更多的低水平表达产物的能力^[19-23]。目前, RNA-seq 已经成为了转录组分析中最先进的技术。

RNA-seq 的测序、分析流程如图 1 所示, 它首先将样品中的信使 RNA 反转录成互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA)并构建 cDNA 文库, 而后用下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)对文库中的 cDNA 进行测序, 接着将 DNA 片段回贴到参考基因组上并组装, 用以量化基因表达水平, 最终获得了基因表达矩阵^[24-25]。而后对基因表达矩阵进行差异表达分析, 从

中筛选出表达差异较显著的基因, 筛选结果常用火山图呈现。针对表达差异显著的基因, 可用富集分析的方法进行研究, 常用的富集分析方法包括京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析、基因本体(gene ontology, GO)分析等。

RNA-seq 可以获取各基因表达水平的差异, 并进行基因表达差异分析, 从而用于研究样本亲缘关系、细胞代谢通路、蛋白质互作网络等生物学差异, 具有定量准确、可重复性高、检测范围广等优点, 是一种常用于基因表达研究的技术手段。

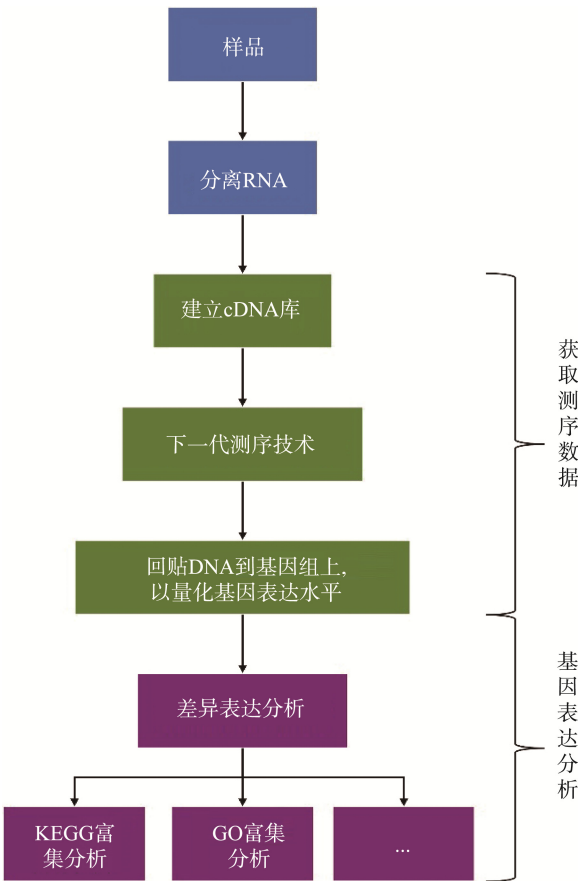


图 1 RNA-seq 测序的基本流程图
Fig.1 Basic flow chart of RNA-seq sequencing

2 RNA-seq 在克罗诺杆菌毒力基因研究中的应用

近年来, 克罗诺杆菌的毒力研究集中于外膜蛋白、双组分系统、脂多糖、鞭毛、溶血素、群体感应、铁获取系统、能量代谢、营养物质等方面。表 1 列举了本文涉及的毒力因素的主要基因和毒力机制。

2.1 外膜蛋白

克罗诺杆菌中的外膜蛋白(outer membrane protein,

OMP)被外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)包裹,以囊泡的形式感染宿主细胞膜顶端和基底外侧的受体,诱导疾病的发生^[26]。人们对 OMP 的研究集中于外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA)和外膜蛋白 X (outer membrane protein X, OmpX)两种,其中,OmpA 能通过结合细胞基质中的纤连蛋白,提高菌株侵入细胞的能力^[27]。2010 年,KIM 等^[28]通过构建缺失 *ompA* 和 *ompX* 基因的菌株,首次发现 OmpA 和 OmpX 是阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)侵袭和黏附过程中的必需组分,但具体的作用机制尚不明确。

表 1 各毒力因子的相关基因和毒力机制
Table 1 Related genes and virulence mechanisms of each virulence factor

毒力因子	涉及的主要基因	毒力机制
外膜蛋白	<i>ompA</i> 、 <i>ompX</i> 、 <i>ompW</i>	以囊泡形式感染细胞受体
双组分系统	<i>pmrA</i> 、 <i>pmrB</i>	抵抗抗菌剂
脂多糖	<i>lpxP</i> 、 <i>spr</i> 、 <i>eptB</i> 、 <i>lptA</i> 、 <i>lptB</i> 、 <i>lptC</i> 、 <i>lptD</i> 、 <i>lptE</i> 、 <i>lptF</i> 、 <i>lptG</i>	诱发感染
鞭毛	<i>flgA</i> 、 <i>flgB</i> 、 <i>flgC</i> 、 <i>flgD</i> 、 <i>flgE</i> 、 <i>flgF</i> 、 <i>flgG</i> 、 <i>fliC</i> 、 <i>fliD</i> 、 <i>fliE</i> 、 <i>fliR</i> 、 <i>fliT</i>	运动、黏附、形成生物膜、免疫反应
溶血素	<i>hlyIII</i> 、 <i>hha</i>	破坏膜完整性
群体感应	<i>LuxR</i>	释放信号分子以调控群体行为
铁获取蛋白	<i>fepE</i> 、 <i>entC</i>	维持感染过程
能量代谢酶	<i>nuoB</i> 、 <i>nuoI</i> 、 <i>nuoM</i> 、 <i>nuoN</i> 、 <i>cyoA</i> 、 <i>atpH</i> 、 <i>iscU</i> 、 <i>hscA</i> 、 <i>fdx</i>	能量供应
营养代谢酶	<i>suhB</i> 、 <i>glpF</i> 、 <i>glpT</i> 、 <i>glpK</i> 、 <i>glpD</i> 、 <i>glpQ</i>	营养供给

为了确定克罗诺杆菌感染宿主细胞的机制,JING 等^[29]使用了 RNA-seq 的方法研究了克罗诺杆菌在与宿主细胞相互作用后基因表达量的变化,发现菌株在感染人结肠上皮细胞后 OmpA 和 OmpX 的表达量均出现上调现象,结果直接证实了菌株会通过上调 OmpA 和 OmpX 的表达,促进感染、致病过程的发生。

由于 RNA-seq 结果说明了 OmpA 和 OmpX 与克罗诺杆菌的致病过程息息相关,且这两种外膜蛋白暴露于细胞的表面,因此,它们可以作为疫苗研制的候选抗原^[30-31]。为此,李远宏等^[30]和孙敏等^[31]分别进行了苏黎世克罗诺杆菌(*Cronobacter turicensis*)和阪崎克罗诺杆菌疫苗的研究,结果表明这两种蛋白可以作为疫苗研制的候选靶点。

除了 OmpA 和 OmpX 外,外膜蛋白 W (outer membrane protein W, OmpW)也是一种近年新发现的具有致病性的克罗诺杆菌外膜蛋白。它是由 YE 等^[14]基于 RNA-seq 的方法通过比较阪崎克罗诺杆菌毒力株 G362 和减毒株 L3101 的

基因表达差异首次发现的,进一步研究表明,*ompW* 基因能提高克罗诺杆菌在抗生素或高渗胁迫时的存活率和细胞膜完整性,而这种在逆境中的生存能力有利于提高菌株的致病性,但其毒力机制尚不清晰^[32-33]。

2.2 PmrA/PmrB 双组分系统

双组分系统(two-component system, TCS)是克罗诺杆菌信号转导的主要形式之一,主要由组氨酸激酶(histidine kinases, HK)和反应调节器(response regulator, RR)两部分组成^[34]。在 PmrA/PmrB TCS 中,反应调节器基因 *pmrA* 和组氨酸激酶基因 *pmrB* 会在磷酸乙醇胺(phosphorylethanolamine, pEtN)转移酶 PmrC 的帮助下,修饰脂质 A (lipid A)的 pEtN,提高克罗诺杆菌对抗菌剂的抵抗力,以维持在宿主细胞中的感染作用^[34]。

由于生物膜为菌株的生存提供了屏障^[35],且 *pmrA* 基因已在肠道沙门氏菌等多种细菌中证明是影响菌株毒力的关键因素,BAO 等^[36-37]希望通过研究 *pmrA* 基因与克罗诺杆菌生物膜形成的关系,探索影响克罗诺杆菌毒力的因素。该课题组^[36-37]率先构建了敲除 *pmrA* 基因的阪崎克罗诺杆菌菌株模型(s-3),并运用 RNA-seq 的方法分析发现了 s-3 菌株中促进生物膜形成的基因 *flhE*、参与生物膜形成和纤维素合成的基因 *bcsG* 表达量较低,说明 *pmrA* 基因具有促进生物膜形成的功能。同时, RNA-seq 结果显示, s-3 菌株中编码毒力因子 *SrfB*、*MviM*、*PhoQ* 的基因表达下调,而编码毒力因子 *FliZ*、*NlpD* 和 *UvrY* 的基因表达上调,这证明了 *pmrA* 基因会对克罗诺杆菌的毒力产生极其复杂的影响^[37]。

XU 等^[38]比较了 s-3 菌株与正常菌株的生物量含量差异,发现前 24 h 内 s-3 菌株含量较高,而在 7~14 d 中 s-3 菌株含量较低。除此之外,该课题组还运用 RNA-seq 的方法发现了不同毒力因子在不同时间段的表达含量存在差异,例如,在 24 h 时,编码毒力因子 *SrfB* 基因的表达没有观察到显著差异,而在第 3 d 时表达上调。上述结果说明了不同的毒力因子可能是在不同时间段对菌株产生影响的,也完善了 *pmrA* 基因对不同毒力因子表达差异的影响。因此, RNA-seq 技术可以用于研究克罗诺杆菌毒力基因表达的时间差异。

侵入肠细胞,并在巨噬细胞内存活是阪崎克罗诺杆菌感染的主要特征。HUA 等^[34]进一步应用 RNA-seq 技术进行疾病研究,发现,促进细菌运动、黏附的基因 *ompX* 以及一系列菌毛蛋白、鞭毛蛋白基因在 s-3 菌株中表达上调,结果说明 *pmrA* 基因的表达会降低菌株的侵袭、黏附能力且 *pmrA* 基因在阪崎克罗诺杆菌感染人体正常细胞的过程中有重要作用。

2.3 脂多糖

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种克罗诺杆菌外膜的重要组成部分,也是引发人体炎症和免疫反应的主要

原因之一^[39]。脂质 A 位于 LPS 的活性中心, 是 LPS 引起炎症反应的病原体相关分子模式。为了解脂质 A 在参与坏死性肠炎发展过程中的基因表达变化, JING 等^[29]使用 RNA-seq 的方法研究了阪崎克罗诺杆菌在与人结直肠上皮细胞相互作用后的转录组谱变化, 发现菌株在与宿主细胞相互作用后, 有 3 种基因的表达显著上调, 包括棕榈酰转移酶基因 *lpxP*、假定的膜脂蛋白基因 *spr* 和磷酸乙醇胺转移酶基因 *eptB*, 而上述基因均参与了脂质 A 的合成, 这说明了 LPS 会诱导克罗诺杆菌促进坏死性肠炎的发生, 但 LPS 引发坏死性肠炎的分子机制仍有待进一步研究。

脂多糖运输系统(lipopolysaccharide transport system, Lpt)是一条脂多糖的运输途径, 主要由 LptA、B、C、D、E、F、G 7 种运输蛋白组成, 负责将脂多糖运输并正常装配到细菌的外膜上。为了确定 Lpt 系统各组分的动态变化, XU 等^[38]基于 RNA-seq 的方法对 LptC、LptE 和 LptF 在第 1、3、10 d 时的基因表达情况进行了比较。研究发现, ABC 转运蛋白 LptF 在第 1 d 时达到峰值, LPS 转运协同蛋白 LptC 在第 3 d 时达到峰值, LPS 组装蛋白 LptE 在第 10 d 时达到峰值, 这说明了 3 种运输蛋白发挥功能的顺序是从 LptF 到 LptC 再到 LptE。由此可见, RNA-seq 也可以用于研究克罗诺杆菌毒力作用的发生过程。

2.4 鞭毛

鞭毛由基体、钩形鞘和鞭毛丝组成, 主要参与了细菌运动、黏附、生物膜形成和免疫反应的过程^[40]。而在克罗诺杆菌中, 鞭毛不仅参与了生物膜形成的初始阶段, 还通过提高菌株的运动能力及其与上皮细胞的黏附作用增加了病原体与宿主细胞相互作用的机会, 并利用鞭毛 Toll 样受体 5 (toll-like receptor 5, TLR5)诱导白细胞介素-8、肿瘤坏死因子等细胞促炎因子的活化与释放, 提高菌株的致病能力^[41-43]。

YE 等^[14]从基因的角度探讨了克罗诺杆菌的毒力机制, 分别将阪崎克罗诺杆菌毒力株 G362 和减毒株 L3101 接种到胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)中培养, 并运用 RNA-seq 的方法比较了不同毒力菌株的基因表达差异。研究发现, 在鞭毛蛋白合成相关基因中, *fliT*、*flgN*、*flgK*、*flgL*、*fliD*、和 *flgB* 基因在 G362 菌株中相较于 L3101 菌株表达上调, 而 *fliC* 和 *fliR* 基因表达下调。上述结果表明了毒性强的菌株会促进鞭毛调节蛋白和大部分结构蛋白的合成, 抑制菌株自聚集形成生物膜, 而这种抑制作用可能有利于菌株在形成成熟的鞭毛后感染宿主细胞。

克罗诺杆菌会引发坏死性肠炎, 因此, JING 等^[29]通过 RNA-seq 的方法比较了阪崎克罗诺杆菌(ATCC BAA-894)在与人结直肠上皮细胞 HCT-8 相互作用后的转录组谱差异, 以此了解克罗诺杆菌引发坏死性肠炎的分子机制。研究不仅发现菌株在与宿主细胞相互作用后, 鞭毛钩基因 *flgB* 的表达也出现了上调现象, 还发现鞭毛基因 *flgA*、*flgC*、*flgD*、*flgF*、*flgG* 和 *fliE* 的表达同样上调, 且感染的早期阶段上调

更明显, 这暗示了鞭毛可能在阪崎克罗诺杆菌的黏附过程产生作用, 促进菌株感染过程。值得注意的是, JING 等^[29]获得的阪崎克罗诺杆菌转录组谱与 YE 等^[14]有显著差异, 这可能与选取的菌株以及宿主差异相关。

多项研究已经发现了影响克罗诺杆菌致病性的多种鞭毛基因, 但不同时间点上鞭毛基因的表达差异却鲜有文献报道, 为此, XU 等^[38]将阪崎克罗诺杆菌(ATCC BAA-894)接种到 TSB 中, 然后采用 RNA-seq 的方法比较了生物膜细胞在不同时间段(第 8、16 h、第 1、3、10 d)时的基因表达差异。结果表明, *flgA*、*flgB*、*flgD*、*flgE*、*flgF*、*flgG*、*flgL*、*flgJ*、*flgK*、*flgN*、*fliC*、*fliD*、*fliE*、*fliT* 等基因表达变化相似, 在生物膜形成的中早期阶段(第 8~24 h)和成熟后阶段(第 3~10 d), 基因表达逐渐增加, 而在生物膜形成的成熟阶段(第 1~3 d), 基因表达下降。同时, *flgC* 和 *fliR* 基因的表达变化类似, 在生物膜形成中早期和成熟阶段, 基因表达逐渐增加, 而在生物膜形成的成熟后阶段, 基因表达下降。研究表明, 菌株的鞭毛基因表达量在时间上整体呈上升趋势, 尤其是中早期阶段, 但这种趋势并非直线上升的。

对比 XU 等^[38]获得的转录组数据与 JING 等^[29]数据的差异, 发现 JING 等^[29]分析的基因 XU 等^[38]均有涉及, 且这些基因都在感染宿主细胞后表达升高, 只是 XU 等^[38]额外发现了 *flgB* 等 7 种基因, 这表明了 TSB 与 HCT-8 细胞的培养体系对 ATCC BAA-894 的影响不大。而将 XU 等^[38]获得的转录组数据与 YE 等^[14]的实验结果对比, 除了发现 XU 等^[38]的结果多了 *flgA* 等 6 种基因存在差异表达外, *fliC* 和 *fliR* 基因感染宿主细胞后表达量的变化方向也不同, 这可能与两组实验选取的菌株差异相关, 结果暗示了菌株差异对实验结果的影响可能比宿主差异更大。

2.5 溶血素

溶血素是靶向细胞膜的细胞毒性蛋白, 主要通过破坏细胞膜完整性发挥毒力作用^[44]。先前研究发现, 克罗诺杆菌中存在编码溶血素的基因, 但这种溶血素与毒性作用的相关性并不清晰^[45-46]。YE 等^[14]运用 RNA-seq 的方法进行研究, 首次发现毒力因子溶血素 *hlyIII* 和溶血素表达调节蛋白基因 *hha* 在阪崎克罗诺杆菌毒力株 G362 和减毒株 L3101 之间存在表达差异, *hlyIII* 基因在 G362 中表达上调, *hha* 基因在 G362 中表达下调, 证实了溶血素相关基因与毒性作用有关, 但其对克罗诺杆菌的毒力机制尚不清晰。

2.6 群体感应

群体感应(quorum sensing, QS)是生物群体根据周围环境中的细菌数量释放信号分子, 以调控群体的一系列生理行为, 包括运输营养物质、去除代谢产物等^[47]。这种行为可以减少由于细菌过度生长引起的空间和营养物质缺乏问题, 从而促进生物膜的形成, 并进一步影响细菌群体对宿主细胞的侵袭。

LuxR 基因是 QS 基因家族的重要成员, 其表达产生的蛋白能识别阪崎克罗诺杆菌群体感应系统中的常见信号分子——N-酰基-L-高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactone, AHL)。当 AHL 的浓度由于细菌密度过大而达到临界值时, AHL 会与 *LuxR* 大量结合, 激活下游基因的表达^[48]。为了了解阪崎克罗诺杆菌的毒力相关基因, YE 等^[14]基于 RNA-seq 的结果, 首次发现 G362 的 *LuxR* 的同源物基因 *sdiA* 表达量相对较低, 说明了 *sdiA* 基因会抑制阪崎克罗诺杆菌毒力作用的发生, 完善了阪崎克罗诺杆菌毒力作用的信号通路。

2.7 铁获取蛋白

克罗诺杆菌在入侵宿主细胞后的感染过程需要铁元素支持, 但宿主细胞的含氧条件使大多数铁以氢氧化铁的形式存在, 而克罗诺杆菌难以获取这种形式的铁元素, 因此, 克罗诺杆菌进化出了高效的铁获取系统, 以提高其在宿主环境中的铁竞争能力^[49]。JING 等^[29]使用 RNA-seq 的方法比较了阪崎克罗诺杆菌和与人结直肠上皮细胞 HCT-8 相互作用后的转录组谱差异, 发现与宿主细胞相互作用后, 铁肠杆菌素转运蛋白基因 *fepE* 和异分支酸合酶基因 *entC* 的表达显著上调, 除此之外肠杆菌素、气杆菌素系统和铁复合物运输系统中的许多基因也出现表达上调现象。RNA-seq 结果为克罗诺杆菌毒力过程与铁元素代谢、运输的相关性提供了充分的证据, 但这些基因的作用尚未得到明确研究。

2.8 能量代谢酶

在与宿主细胞的相互作用过程中, 病原体会消耗大量能量来克服渗透应激反应, 并产生毒力因子和代谢因子, 从而维持它们在宿主细胞中的生存状态^[29]。JING 等^[29]使用 RNA-seq 的方法比较了阪崎克罗诺杆菌与人结直肠上皮细胞 HCT-8 相互作用后的转录组谱差异, 发现与宿主细胞相互作用后, 编码 NADH-醌氧化还原酶亚基(将质子泵过质膜)的基因 *nuoB*、*nuoI*、*nuoM* 和 *nuoN* 以及参与氧化磷酸化的基因 *cyoA*、*atpH*、*iscU*、*hscA* 和 *fdx* 表达上调。RNA-seq 结果表明了克罗诺杆菌在感染宿主细胞时一些呼吸酶的表达会增加, 由此可以推断出, 克罗诺杆菌会通过促进呼吸作用, 诱发感染作用的进行。

2.9 营养代谢酶

营养物质的摄取是病原体毒力进化的驱动因素, 因此, 病原体的毒力与其对营养物质的代谢能力有很大的相关性^[50]。JING 等^[29]基于 RNA-seq 的方法研究了阪崎克罗诺杆菌在与人结直肠上皮细胞 HCT-8 相互作用后的转录组谱差异。研究发现, 与宿主细胞相互作用后, 编码肌醇单磷酸酶的基因 *suhB* 表达上调 5 倍, 因此, 该基因参与了毒力因子的形成^[29]。同时, 参与甘油、甘油酯和甘油磷脂代

谢的基因 *glpF*、*glpT*、*glpK*、*glpD* 和 *glpQ* 表达也出现了上调现象^[29]。甘油醛 3-磷酸(glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)是阪崎克罗诺杆菌的重要碳源, 甘油摄取促进剂(glycerol uptake facilitator, GlpF)、甘油激酶(glycerol kinase, GlpK)以及甘油磷酸二酯磷酸二酯酶(glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, GlpQ)参与了 G3P 的产生, 其中, GlpQ 主要通过切割细菌和真核生物中的主要细胞膜成分磷脂酰胆碱提供 G3P^[29]。在有氧条件下, G3P 会被 G3P 脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GlpD)氧化成磷酸二羟基丙酮, 后者会通过糖酵解途径进一步代谢。除此之外, GlpD 会将电子转移到水中并产生对宿主细胞有毒性的过氧化氢, 而 GlpQ 会裂解真核生物细胞膜的主要成分磷脂酰胆碱, 由此推测, 基因 *glpD* 和 *glpQ* 可能是参与阪崎克罗诺杆菌侵袭或黏附的毒力因子, 但具体的致病机制需要进一步研究。这些基因被推定与克罗诺杆菌的毒性作用相关, 但仍需进一步研究确定。由此可见, 基于 RNA-seq 技术的基因表达差异结果, 结合毒力基因下游蛋白的作用机制, 可以推断出克罗诺杆菌毒力因子的毒力过程。应用 RNA-seq 进行克罗诺杆菌毒力的研究可以获得各毒力因子相关基因表达的差异, 从而基于这些基因下游蛋白的生物学功能, 分析各毒力因子影响克罗诺杆菌毒力过程的作用方式。这样的研究方法不仅准确、可靠, 还可以针对不同时间段上的基因表达差异进行分析, 结果更为丰富、全面。但目前, 仍有一部分毒力基因对克罗诺杆菌毒力的具体作用机制尚不清晰, 有待进一步研究。

3 结束语

RNA-seq 是转录组学研究的首选方法之一。近年来, 为了确定克罗诺杆菌各毒力因子影响菌株毒力的具体机制, 众多研究者将 RNA-seq 应用于克罗诺杆菌毒力的研究, 探索了众多毒力因子对其他克罗诺杆菌毒力因子以及菌株表型影响。

在研究对象上, 研究者们往往选用阪崎克罗诺杆菌进行研究, 可能是因为阪崎克罗诺杆菌是克罗诺杆菌的临床分离株中占比最大的一类。在研究方法上, 研究者主要比较高、低毒菌株间以及菌株感染宿主细胞前后各毒力因子表达水平的差异, 发现外膜蛋白、双组分系统、脂多糖、鞭毛、溶血素、群体感应、铁获取系统、能量代谢和营养物质都会对克罗诺杆菌毒力产生影响, 而克罗诺杆菌毒力机制的发挥主要是通过侵袭作用、黏附作用、形成生物膜、破坏宿主细胞膜、抵抗抗菌剂等方式诱发、维持菌株的感染过程来实现, 且能量代谢和营养物质为菌株提供了基本所需。除此之外, 研究者们还发现了一系列新的潜在毒力因子, 但这些毒力因子是否确实具有致病性仍需进一步证实, 且它们对菌株毒力影响的分子机制尚不清晰。

综上所述, 选用 RNA-seq 的方法研究克罗诺杆菌的

毒力过程, 可以具体量化菌株各毒力因子的表达差异, 更清晰、直观地确定各毒力因子调控克罗诺杆菌毒力的具体过程。为此, RNA-seq 确实是一种可用于研究克罗诺杆菌毒力的切实可行的方法, 有理由相信将 RNA-seq 应用于克罗诺杆菌的毒力研究是具有光明前景的。

参考文献

- [1] CHEN Z, ZHANG Y, LIN R, *et al.* *Cronobacter sakazakii* induces necrotizing enterocolitis by regulating NLRP3 inflammasome expression via TLR4 [J]. *J Med Microbiol*, 2020, 69(5): 748–758.
- [2] HAYASHI S, TAKINAMI Y, WATARI T, *et al.* Urinary tract infection caused by *Cronobacter sakazakii* [J]. *Cureus*, 2021, 13(6): e15780.
- [3] TALL BD, GANGIREDLA J, GRIM CJ, *et al.* Use of a pan-Genomic DNA microarray in determination of the phylogenetic relatedness among *Cronobacter* spp. and its use as a data mining tool to understand *Cronobacter* biology [J]. *Microarrays*, 2017, 6(1): 6.
- [4] OUCHENIR L, RENAUD C, KHAN S, *et al.* The epidemiology, management, and outcomes of bacterial meningitis in infants [J]. *Pediatrics*, 2017, 140(1): e20170476.
- [5] HOLÝ O, ALSONOSI A, HOCHÉL I, *et al.* Antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from clinical samples [J]. *Pol J Microbiol*, 2019, 68(1): 5–14.
- [6] HAYMAN MM, EDELSON-MAMMEL SG, CARTER PJ, *et al.* Prevalence of *Cronobacter* spp. and salmonella in milk powder manufacturing facilities in the united states [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(10): 1685–1692.
- [7] LIU M, HU G, SHI Y, *et al.* Contamination of *Cronobacter* spp. in Chinese retail spices [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(10): 637–644.
- [8] LOU X, YU H, WANG X, *et al.* Potential reservoirs and routes of *Cronobacter* transmission during cereal growing, processing and consumption [J]. *Food Microbiol*, 2019, 79: 90–95.
- [9] ZENG H, LI C, LING N, *et al.* Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 321: 108549.
- [10] LI C, ZENG H, ZHANG J, *et al.* Prevalence, antibiotic susceptibility, and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from edible mushrooms in China [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 283.
- [11] LING N, LI C, ZHANG J, *et al.* Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1149.
- [12] YE YW, LI H, WU QP, *et al.* Isolation and phenotypic characterization of cronobacter from dried edible macrofungi samples [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(7): 1382–1386.
- [13] COSTA PV, SIQUEIRA RMD, GUIMARES ACR, *et al.* Cytotoxicity profile of *Cronobacter* species isolated from food and clinical specimens in Brazil [J]. *J Appl Microbiol*, 2021, 130(5): 1758–1769.
- [14] YE Y, ZHANG X, ZHANG M, *et al.* Potential factors involved in virulence of *Cronobacter sakazakii* isolates by comparative transcriptome analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(11): 8826–8837.
- [15] COHEN H, ADANI B, COHEN E, *et al.* The ancestral stringent response potentiator, DksA has been adapted throughout *Salmonella* evolution to orchestrate the expression of metabolic, motility, and virulence pathways [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 1997294.
- [16] LAN L, SHI H. New insights into the formation and recovery of sublethally injured *Escherichia coli* O157:H7 induced by lactic acid [J]. *Food Microbiol*, 2022, 102: 103918.
- [17] SILUE N, MARCANTONIO E, CAMPBELL-VALOIS FX. RNA-Seq analysis of the T3SA regulon in *Shigella flexneri* reveals two new chromosomal genes upregulated in the on-state [J]. *Methods*, 2020, 176: 71–81.
- [18] TIPPING MJ, GIBBS KA. Growth recovery assay and facs-based population sorting following territorial exclusion in proteus mirabilis [J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(5): e3543–e3543.
- [19] BIRZELE F, SCHAUB J, RUST W, *et al.* Into the unknown: Expression profiling without genome sequence information in CHO by next generation sequencing [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 38(12): 3999–4010.
- [20] ZHANG JP, DENG CC, LI JL, *et al.* Transcriptome-based selection and validation of optimal house-keeping genes for skin research in goats (*Capra hircus*) [J]. *BMC Genom*, 2020, 21(1): 493.
- [21] KORIR PK, GEELEHER P, SEOIGHE C. Seq-ing improved gene expression estimates from microarrays using machine learning [J]. *BMC Bioinform*, 2015, 16(1): 286.
- [22] COSTA V, ANGELINI C, FEIS ID. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 853916.
- [23] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57–63.
- [24] LI B, DEWEY CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [25] MARDIS E, MCCOMBIE WR. RNA-Seq: RNA conversion to cDNA and amplification [J]. *Cold Spring Harb Protocols*, 2017. DOI: 10.1101/pdb.prot094672
- [26] KIM JH, LEE J, PARK J, *et al.* Gho gram-negative and gram-positive bacterial extracellular vesicles [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 97–104.
- [27] MAERANI M, DEWANTI-HARIYADI R, NURJANAH S. Expression of stress regulator and virulence genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a as a response to acid stress [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(9): 1273–1279.
- [28] KIM K, KIM KP, CHOI J, *et al.* Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5188–5198.
- [29] JING CE, DU XJ, LI P, *et al.* Transcriptome analysis of *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 after interaction with human intestinal epithelial cell line HCT-8 [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2016, 100(1): 311–322.
- [30] 李远宏, 姜华, 焦阳. 苏黎世克罗诺杆菌 DSM 18703 株外膜蛋白 OmpA 基因克隆及生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(2): 101–105, 109.

- LI YH, JIANG H, JIAO Y. Cloning and bioinformatics analysis of OmpA gene of *Cronobacter* Zurich DSM 18703 strain [J]. J Pathog Biol, 2017, 12(2): 101–105, 109.
- [31] 孙敏, 向月, 姜华, 等. 阪崎克罗诺杆菌 OmpX 蛋白的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(3): 249–252, 257.
- SUN M, XIANG Y, JIANG H, *et al.* Bioinformatics analysis of OmpX protein of *Cronobacter sakazakii* [J]. J Pathog Biol, 2021, 16(3): 249–252, 257.
- [32] YE Y, LING N, GAO J, *et al.* Short communication: Roles of outer membrane protein W (OmpW) on survival and biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* under neomycin sulfate stress [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(4): 2927–2931.
- [33] YE Y, LING N, GAO J, *et al.* Roles of outer membrane protein W (OmpW) on survival, morphology, and biofilm formation under NaCl stresses in *Cronobacter sakazakii* [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(5): 3844–3850.
- [34] HUA J, JIA X, ZHANG L, *et al.* The characterization of two-component system PmrA/PmrB in *Cronobacter sakazakii* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 903.
- [35] LING N, ZHANG JM, LI CS, *et al.* The glutaredoxin gene, *grxB*, affects acid tolerance, surface hydrophobicity, auto-aggregation, and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 133.
- [36] BAO X, JIA X, CHEN L, *et al.* Effect of polymyxin resistance (pmr) on biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* [J]. Microb Pathog, 2017, 106: 16–19.
- [37] BAO X, YANG L, CHEN L, *et al.* Virulent and pathogenic features on the *Cronobacter sakazakii* polymyxin resistant pmr mutant strain s-3 [J]. Microb Pathog, 2017, 110: 359–364.
- [38] XU Z, LIU Z, SOTEYOME T, *et al.* Impact of pmrA on *Cronobacter sakazakii* planktonic and biofilm cells: A comprehensive transcriptomic study [J]. Food Microbiol, 2021, 98: 103785.
- [39] LIU L, LI Y, WANG X, *et al.* A phosphoethanolamine transferase specific for the 4'-phosphate residue of *Cronobacter sakazakii* lipid A [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(5): 1444–1456.
- [40] ZHAO BR, WANG XX, WANG XW, *et al.* Shoc2 recognizes bacterial flagellin and mediates antibacterial Erk/Stat signaling in an invertebrate [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(1): e1010253.
- [41] MA Y, ZHANG Y, SHAN Z, *et al.* Involvement of PhoP/PhoQ two-component system in biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Control, 2022, 133: 108621.
- [42] CRUZ A, ROCHA-RAMÍREZ LM, GONZÁLEZ-PEDRAJO B, *et al.* Flagella from *Cronobacter sakazakii* induced an inflammatory response in humans monocytes [J]. Cytokine, 2011, 56(1): 95.
- [43] CRUZ-CORDOVA A, ROCHA-RAMÍREZ LM, OCHOA SA, *et al.* Flagella from five *Cronobacter* species induce pro-inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52091.
- [44] LECLERCQ SY, SULLIVAN MJ, IPE DS, *et al.* Pathogenesis of streptococcus urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 29000.
- [45] SINGH N, RAGHAV M, NARULA S, *et al.* Profiling of virulence determinants in *Cronobacter sakazakii* isolates from different plant and environmental commodities [J]. Curr Microbiol, 2017, 74(5): 560–565.
- [46] CRUZ A, XICOHTENCATL-JONES J, GONZÁLEZ-PEDRAJO B, *et al.* Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources [J]. Can J Microbiol, 2011, 57(9): 735–744.
- [47] JAYARAMAN A, WOOD TK. Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2008, 10(1): 145–167.
- [48] GUAN W, WANG T, HUANG Q, *et al.* Transcriptomic and functional analyses reveal roles of AclR, a luxR-type global regulator, in regulating motility and virulence of *Acidovorax citrulli* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2021, 34(8): 952–961.
- [49] GRIM CJ, KOTHARY MH, GOPINATH G, *et al.* Identification and characterization of *Cronobacter* iron acquisition systems [J]. APPL ENVIRON MICROB, 2012, 78(17): 6035–6050.
- [50] EISENREICH W, DANDEKAR T, HEESEMANN J, *et al.* Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(6): 401–412.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



李逍凡, 硕士研究生, 主要研究方向为生物信息学。

E-mail: lixiaofan@shu.edu.cn



杨捷琳, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检验。

E-mail: 15900893603@qq.com