

DOI:10.13350/j.cjpb.250411

• 论著 •

## 鼠伤寒沙门菌未知功能蛋白 YchJ 的抗逆功能研究\*

袁西露, 李丽, 谢荣现, 程龙云, 李冰清\*\*, 王玮玮\*\*

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系, 山东济南 250000)

**【摘要】** 目的 了解 *ychJ* 基因及其编码蛋白 YchJ 对鼠伤寒沙门菌抗逆能力的影响。方法 基于 ExPASy ProtParam tool 和 Clustal Omega 对 YchJ 蛋白质性质及氨基酸序列保守性等生物信息学进行分析和预测。采用 CRISPR-Cas9 法构建鼠伤寒沙门菌 ATCC14028s 的 *ychJ* 基因敲除株  $\Delta ychJ$ , 并通过 DNA 扩增技术进行鉴定。分别对野生株和敲除株进行抗逆功能试验, 通过结晶紫半定量法和刚果红染色法确定 YchJ 对沙门菌生物膜形成的影响; 采用生长曲线测定法和菌落计数法确定 YchJ 对沙门菌抗生素耐受能力的影响; 利用半固体平板移动法检测 YchJ 对沙门菌运动能力的影响。结果 YchJ 是一种稳定的亲水性蛋白, 其氨基酸序列相对保守, *ychJ* 基因敲除株构建成功。与野生株的 RDAR 表型(红色、干燥和粗糙)相比, 该敲除株表现为 SAW 表型(光滑、白色、湿润)。经结晶紫染色后, 野生株的  $A_{570}/A_{600}$  值为  $0.8345 \pm 0.1016$ , 显著高于 *ychJ* 敲除株的  $0.2633 \pm 0.05051$ 。在抗生素耐受性实验中, 低浓度氨苄青霉素或诺氟沙星压力下, *ychJ* 敲除株的生存能力显著降低, 仅为野生型的 10%-60%。在半固体平板实验中, *ychJ* 敲除株的扩散直径达到  $(5.00 \pm 0.10)$  cm, 显著大于野生株的  $(1.933 \pm 0.1155)$  cm, 表明 *ychJ* 敲除株表现出更强的移动能力。结论 未知功能蛋白 YchJ 的缺失会影响鼠伤寒沙门菌的运动能力、生物膜形成能力和抗生素耐受能力, 为沙门菌及其他胞内寄生菌 YchJ 功能的确定提供理论基础。

**【关键词】** 鼠伤寒沙门菌; YchJ 蛋白; 运动能力; 生物膜形成; 抗生素耐受

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2025)04-0466-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Apr.; 20(04):466-470, 476.]

Exploratory study on the anticorrosive function of a functionally unknown protein YchJ in *Salmonella typhimurium*

YUAN Xilu, LI Li, XIE Rongxian, CHENG Longyun, LI Bingqing, WANG Weiwei (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine (Institute of Basic Medicine), Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Science), Jinan 250000, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** This study aimed to investigate the effect of the *ychJ* gene and its encoded protein YchJ on the resistance of *Salmonella typhimurium*. **Methods** Bioinformatics such as YchJ protein properties and amino acid sequence conservation were analyzed and predicted based on ExPASy ProtParam tool and Clustal Omega. The *ychJ* knockout strain  $\Delta ychJ$  of *S. typhimurium* ATCC14028s was constructed by CRISPR-Cas9 method and characterized by DNA amplification technique. Resistance function experiments were performed on the wild and knockout strains separately; the effect of YchJ on *Salmonella* biofilm formation was determined by crystal violet semiquantitative method and Congo red staining; the effect of YchJ on *Salmonella* antibiotic tolerance was determined by growth curve assay and colony counting; and the effect of YchJ on *Salmonella* motility was detected by semi-solid plate movement method.

**Results** YchJ is a stable hydrophilic protein with a relatively conserved amino acid sequence. The *ychJ* knockout strain was constructed successfully. Compared with the RDAR phenotype (red, dry and rough) of the wild strain, the knockout strain exhibited the SAW phenotype (smooth, white and wet). In addition, after crystal violet staining, the  $A_{570}/A_{600}$  value of the wild strain was  $0.8345 \pm 0.1016$ , which was significantly higher than that of the *ychJ* knockout strain of  $0.2633 \pm 0.05051$ . In antibiotic tolerance experiments, the viability of the *ychJ* knockout strain was significantly reduced by low concentrations of ampicillin or norfloxacin pressure to only 10%-60% of that of the wild type. However, in semi-solid plate experiments, the diffusion diameter of the *ychJ* knockout strain reached  $(5.00 \pm 0.10)$  cm, which was significantly larger than that of the wild strain of  $(1.933 \pm 0.1155)$  cm, indicating that the *ychJ* knockout strain exhibited a stronger ability to move. **Conclusion** Deletion of the unknown functional protein YchJ affects motility, biofilm formation, and

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 32170034), 山东省自然科学基金面上项目(No. ZR2024MC045), 山东省青创团队资助(No. 2023KJ170)。

\*\* **【通信作者】** 王玮玮, E-mail: wangweiwei\_fly@126.com; 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com

**【作者简介】** 袁西露(1999-), 女, 江苏人, 硕士在读, 主要研究方向: 病原菌致病基因的相关研究。E-mail: 18299182829@163.com

antibiotic tolerance in *S. typhimurium*, providing a theoretical basis for determining the function of YchJ in *Salmonella* and other intracellular parasites.

**【Keywords】** *Salmonella typhimurium*; YchJ protein; motility; biofilm formation; antibiotic tolerance

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, STM)是一种兼性胞内寄生的革兰阴性菌,能通过污染的水和食物进入人体肠道,侵入小肠绒毛上皮细胞进入宿主体内,而后被巨噬细胞吞噬,随巨噬细胞扩散到淋巴结、肝脏和脾脏,进而引发全身多器官感染和菌血症<sup>[1]</sup>。据估计,全球每年有超过9万人死于与沙门菌感染引发的疾病<sup>[2]</sup>,且其耐药性也不断增强,已被世界卫生组织认定为“15种严重耐药的病原菌”之一。因此,沙门菌作为“对公共卫生最具威胁的细菌”之一,对其致病机制的深入备受关注。

在侵染宿主过程中,沙门菌面临一系列生存压力,包括营养匮乏、环境变化、宿主免疫系统的攻击、以及抗生素的杀伤,宿主通过这些不利压力环境来快速杀灭沙门菌<sup>[4]</sup>。然而,在与宿主相互作用过程中,沙门菌通过一系列适应性防御机制来应对这些挑战<sup>[5-6]</sup>。鞭毛作为沙门菌的运动器官,不仅通过趋化性引导沙门菌找到最佳的感染部位,还帮助其逃避宿主免疫细胞的捕获<sup>[7]</sup>。生物膜可作为自我保护屏障帮助沙门菌抵御宿主各种环境压力、免疫系统攻击和抗生素杀伤,从而提高沙门菌的生存能力<sup>[8]</sup>。此外,沙门菌还可以通过调节关键蛋白的表达水平来增强其对抗生素的耐受性<sup>[9]</sup>。这些机制不仅增强了沙门菌在宿主体内的生存和繁殖能力,还可导致其耐药性的产生,增加治疗的难度<sup>[10]</sup>。因此,探究沙门菌所面临的生存压力及其应对机制对开发新的抗菌药物靶标和制定有效预防策略至关重要。

YchJ是细菌的未知功能蛋白之一,其相关研究鲜有报道。前期研究表明,YchJ影响大肠埃希菌生物膜的形成<sup>[11]</sup>和蛋白质的分泌<sup>[12]</sup>,提示YchJ可能在大肠埃希菌的抗逆能力中发挥重要作用。目前,沙门菌YchJ蛋白功能的相关及该基因缺失后对于菌株的影响尚不清楚。因此,本研究基于CRISPR-Cas9技术成功构建鼠伤寒沙门菌 ychJ 基因敲除株,比较野生株和敲除株的运动能力、生物膜形成能力和抗生素耐受能力,旨在为沙门菌及胞内寄生菌 YchJ 功能的确定提供理论基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 菌株及质粒** 鼠伤寒沙门菌 ATCC14028s(WT菌株)菌株购于美国 ATCC 菌种库,CRISPR-B 质粒购于广州源井生物科技有限公司。

**1.2 主要试剂和仪器** 引物序列由铂尚公司合成;PCR 基因扩增仪购自美国 Thermo 公司;氨苄青霉素(Amp)和诺氟沙星购自北京索莱宝科技有限公司;mRNA 逆转录试剂盒购自南京诺维赞公司;mRNA 提取试剂盒购自山东思科捷生物技术有限公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 宝日生物技术(北京)有限公司;全自动生长曲线分析仪以及生长曲线分析仪专用微孔板均购自芬兰 BioScreen C 公司。

### 2 方法

**2.1 YchJ 生物信息学分析** 从 UniProt 数据库中得到 YchJ 蛋白的氨基酸序列,使用 ExPASy ProtParam tool 对 YchJ 蛋白的基本理化性质进行预测。从 NCBI 数据库中得到 13 种病原菌,包括 *Salmonella typhimurium*、*Escherichia coli*、*Shigella sonnei*、*Aliivibrio fischeri*、*Burkholderia pseudomallei*、*Legionella pneumophila*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudonocardia dioxanivorans*、*Serratia plymuthica*、*Shewanella baltica*、*Isoptericola variabilis*、*Nitrosomonas*、*Stenotrophomonas maltophilia* 的 YchJ 蛋白氨基酸序列,使用 Clustal Omega 进行序列比对,分析 YchJ 蛋白序列的保守性。

### 2.2 ychJ 敲除菌株构建及验证

**2.2.1 ychJ 敲除菌株的构建** 使用表 1 中包含同源臂序列的引物 JD-ychJ-F 和 JD-ychJ-R 进行 PCR 扩增打靶区域,对 PCR 产物进行测序,确认 gRNA 打靶位点序列的正确性。将 CRISPR-B 质粒电转入 ATCC14028s 感受态细胞,将线性打靶 DNA 片段电转化入 ATCC14028s-CRISPR-B 感受态细胞,选择测序正确的克隆,将 CRISPR-B 质粒消除,获得敲除阳性克隆菌株 ATCC14028s  $\Delta$ ychJ。

表 1 PCR 扩增引物  
Table 1 Primers used in PCR amplification

引物名称 Segment	引物序列(5'-3') Sequences of primer
JD-ychJ-F	CCGGATTAACGACTGCGCCA
JD-ychJ-R	GCAGGAATGAGTGGTGGATA
ychJ-F	ATAGGATCCGTGTCTCAGCCTGTCCCTGTG GTAGC
ychJ-R	ATACTCGAGTTATCACTGGCCGAGCACTTT TTAAATTTTTTGGC
ychJ-5'	GAACAAGGGAAAAACGGGGC
ychJ-3T	GCAGGGATCATTTCGACCCA
16sRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16sRNA-R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT

**2.2.2 *y*chJ 敲除菌株的验证** 将过夜培养的 WT 及  $\Delta ychJ$  按 1 : 100 转接于 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至  $A_{600}$  值约为 0.5。以菌液为模板,使用表 1 中 *y*chJ-F 和 *y*chJ-R 为引物对两菌株进行基因扩增验证。其余菌液经 5 000 r/min 离心 2 min 后弃上清,收集菌体。用 RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA,然后使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 试剂盒加入 *y*chJ 基因特异引物 *y*chJ-5' 和 *y*chJ-3T 进行实时定量 PCR 实验。内参选用 16sRNA。引物序列如表 1。

**2.3 生物膜形成能力检测**

**2.3.1 刚果红染色法** 配制刚果红培养基,配方为蛋白胨 10 mg/mL,酵母粉 5 mg/mL,琼脂粉 7.5 mg/mL,刚果红 40  $\mu$ g/mL,121 °C 高压灭菌 30 min,获得刚果红平板。取 2  $\mu$ L 过夜培养的菌液轻轻点在刚果红平板上,37 °C 继续培养 48 h,观察细菌生物膜表型。

**2.3.2 结晶紫半定量法** 将过夜培养的 WT 及  $\Delta ychJ$  菌株按 1 : 100 转接于 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至  $A_{600}$  值约为 0.5,随后再次按 1 : 100 稀释于 LB 液体培养基中。将稀释后的菌液转接至 96 孔板中,30 °C 静置培养 72 h。测量每孔  $A_{600}$  值后,弃去菌液。测量每孔  $A_{600}$  值后,用 PBS 冲洗,加入甲醇固定 20 min,0.1% 的结晶紫染色液,静置染色 15 min,最后加入乙酸溶液,溶解结晶紫染料。在 570 nm 下测定每孔吸光度, $A_{570}/A_{600}$  与生物膜生长量成正比。

**2.4 抗生素耐受性检测**

**2.4.1 生长曲线测定法** 将过夜培养的 WT 及  $\Delta ychJ$  菌株按 1 : 100 转接于 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至  $A_{600}$  值约为 0.5,随后再次按 1 : 100 稀释于 LB 液体培养基中,加入终浓度为 0.5  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素或 0.1  $\mu$ g/mL 诺氟沙星。在 96 孔生长曲线测定板中加入 300  $\mu$ L/孔的菌液,随后将孔板放入生长曲线仪中进行  $A_{600}$  值的测定。仪器参数设定:温度为 37 °C,测定波长为 600 nm,振荡频率为 10 s/ min,间隔检测时间为 5 min,连续记录 24 h。

**2.4.2 菌落计数法** 分别取生长曲线测定实验中培养 5 h(对数期)及 12 h(平台期)的菌液,用 PBS 进行 10 倍稀释,稀释后的菌液涂布于 LB 琼脂平板上,37 °C 静置培养过夜,计数平板中细菌数目。

**2.5 移动性检测** 将过夜培养的 WT 及  $\Delta ychJ$  菌株按 1 : 100 转接于 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至  $A_{600}$  值约为 0.5。取 1 mL 菌液 3 000 r/min 低速离心 5 min,弃上清后用 20  $\mu$ L PBS 重悬,吸取 1  $\mu$ L 重悬液滴在含 0.25% 琼脂的半固体

培养基上,25 °C 培养 24 h,测量菌圈直径,以确定运动能力的差异。

**3 统计与分析**

数据分析使用 Graphad Prism 8(Mann Whitney test, GraphPad Software INC, San Diego, CA, USA) 统计作图软件对数据进行统计分析,数据比较采用 *t* 检验分析法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**结果**

**1 YchJ 蛋白理化性质及氨基酸保守性分析**

从 UniProt 数据库中获取沙门菌 ATCC14028s YchJ 蛋白的氨基酸序列:MSQPCPCGSADEYSLCCGRIVSGERVAPDPSHLMRSRYCAFVMKDADYLIKSWHPTCNAAAFRDDIIAGFANTRWLGLTIFEHTWSEAENTGYVSFIARFSEQGGKGTGAIERSRFIKENGQWYYIDGTRPQLGRNDPCPCGSGKKFKKCCGQ。ProtParam 在线软件分析显示,YchJ 蛋白由 152 个氨基酸组成,相对分子质量 17 065.35,等电点(pI)为 8.33,是一种碱性蛋白,不稳定系数为 29.37,推测此蛋白较稳定且全长可溶性好。使用多序列比对工具 Clustal Omega 对包括沙门菌在内的 13 种病原菌的 YchJ 蛋白进行了氨基酸序列比对。YchJ 蛋白在上述 13 种病原菌中序列相对保守(图 1),尤其是在 Met-34 到 Arg-37 这一段序列,该区域的保守性超过了 95%,提示其可能在维持 YchJ 蛋白功能中不可或缺。

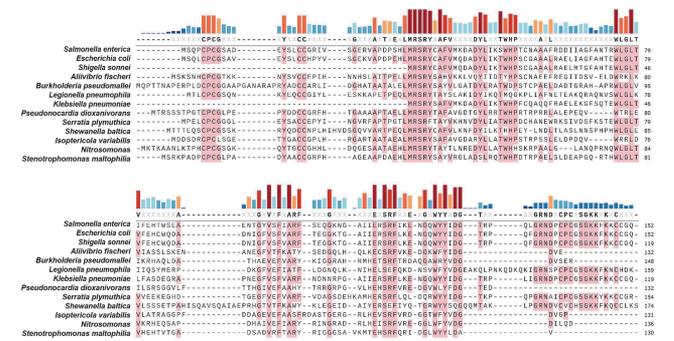
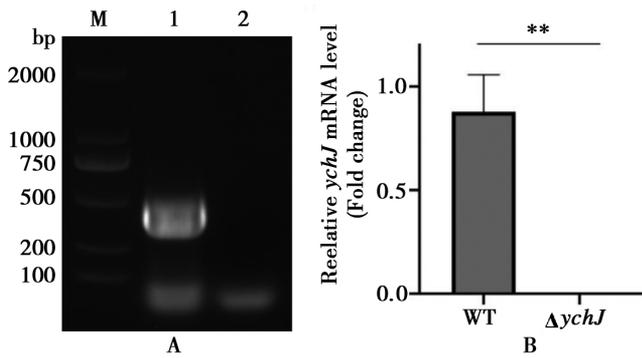


图 1 YchJ 蛋白氨基酸序列保守性分析  
Fig. 1 Analysis of amino acid conservation of the YchJ protein

**2 *y*chJ 敲除菌株的鉴定**

沙门菌 *y*chJ 基因序列全长为 459 bp,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,发现 WT 菌株的 PCR 扩增条带大小与预期相符, $\Delta ychJ$  菌株没有相应大小条带(图 2A)。此外,qPCR 扩增结果也显示  $\Delta ychJ$  菌株的 *y*chJ 基因表达量接近于零,而 WT 菌株中的 *y*chJ 基因表达量显著高于敲除株(图 2B)。*y*chJ 敲除菌株构建成功。



A *ychJ* 基因 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL-2000) 1 以 WT 为模板 PCR 产物 2 以  $\Delta ychJ$  为模板 PCR 产物 B *ychJ* 基因 mRNA 表达情况

图 2 *ychJ* 敲除菌株鉴定

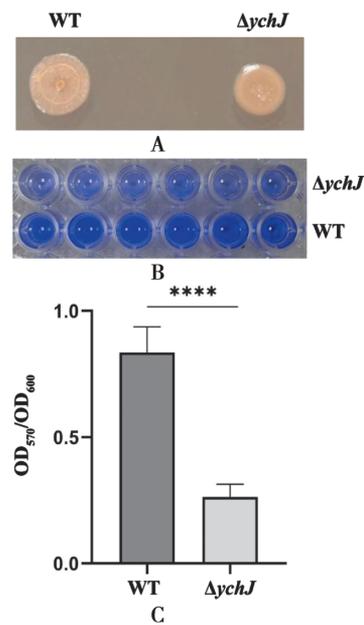
A *ychJ* PCR Amplification M DNA marker(DL-2000) 1 PCR product 2  $\Delta ychJ$  PCR product B Relative *ychJ* mRNA level  
Fig. 2 Identification of *ychJ* knockout strains

### 3 YchJ 提高沙门菌生物膜的形成能力

刚果红染色结果显示,  $\Delta ychJ$  菌株的生物膜形成能力明显低于 WT 菌株。野生株菌落形态呈红色、干燥、粗糙的典型 RDAR 表型, 而  $\Delta ychJ$  株菌落形态则表现为 SAW 表型(光滑、白色、湿润)(图 3A)。结晶紫半定量染色结果表明, WT 株与结晶紫染料的结合能力显著高于  $\Delta ychJ$  株(图 3B)(图 3C)。此外, WT 株的  $A_{570}/A_{600}$  值( $0.8345 \pm 0.1016$ )显著高于  $\Delta ychJ$  ( $0.2633 \pm 0.05051$ ) ( $t = 17.47, P < 0.01$ ), 说明 WT 株在 72 h 内形成了厚重的生物膜, 而  $\Delta ychJ$  株形成的生物膜则较薄。两种生物膜形成能力检测结果均表明  $\Delta ychJ$  株的生物膜形成能力低于野生株, 说明 *ychJ* 基因的敲除显著降低了沙门菌的生物膜形成能力。

### 4 YchJ 提高沙门菌的抗生素耐受能力

结果如图 4 所示, 在氨苄青霉素压力下, WT 与  $\Delta ychJ$  的生长速度在培养前 6 h 几乎完全一致。培养 6 h 之后,  $\Delta ychJ$  生长速度逐渐变慢, 最终在平台期, 两株菌的  $A_{600}$  值差别最大(图 4A)。与在氨苄青霉素压力下的生长特性相一致, 在诺氟沙星压力下, 培养 4 h 后,  $\Delta ychJ$  的生长速度受到抑制, 在平台期其  $A_{600}$  值低于 WT 菌株 37%(图 4C)。此外, 分别在培养 5 h(对数期)和 12 h(稳定期)的时间点对两株菌进行活菌计数。计数结果表明, 在氨苄压力下, 对数期(培养 5 h)的 WT 与  $\Delta ychJ$  菌的活菌数目无显著差异, 而在平台期(培养 12 h), WT 活菌数目显著高于  $\Delta ychJ$  ( $t = 7.044, P < 0.05$ )(图 4B)。在诺氟沙星压力下, 无论是在对数期(培养 5 h)还是在平台期(培养 12 h),  $\Delta ychJ$  的存活细菌数均显著下降 ( $t = 19.17, P < 0.01$ )(图 4D)。

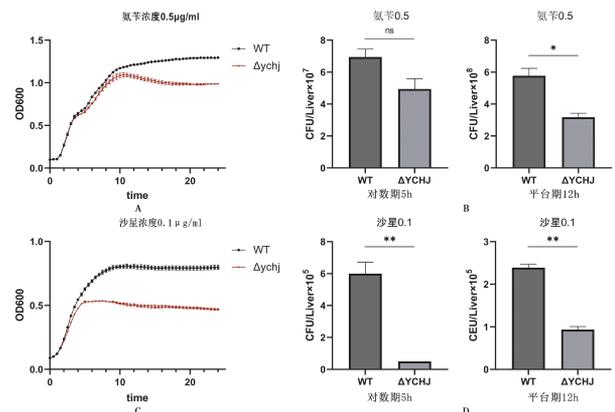


A WT 与  $\Delta ychJ$  在刚果红平板上的菌落形态 B 结晶紫半定量法检测 WT 与  $\Delta ychJ$  生物膜形成 C 结晶紫半定量法 WT 与  $\Delta ychJ$   $A_{570}/A_{600}$  值统计

图 3 WT 与  $\Delta ychJ$  生物膜形成能力检测

A Colony morphology of WT and  $\Delta ychJ$  strains on congo red agar plate B semiquantitative detection of WT and  $\Delta ychJ$  biofilm formation using crystal violet assay C statistical analysis of WT and  $\Delta ychJ$   $A_{570}/A_{600}$  values in crystal violet assay

Fig. 3 Detection of Biofilm Formation Ability in WT and  $\Delta ychJ$



A  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素 LB 中 24 h 生长曲线测定 B 氨苄生长曲线中 5 h 和 12 h WT 与  $\Delta ychJ$  菌落计数 C  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  诺氟沙星 LB 中 24 h 生长曲线测定 D 诺氟沙星生长曲线中 5 h 和 12 h WT 与  $\Delta ychJ$  菌落计数

图 4 WT 与  $\Delta ychJ$  抗生素环境生长曲线及菌落计数

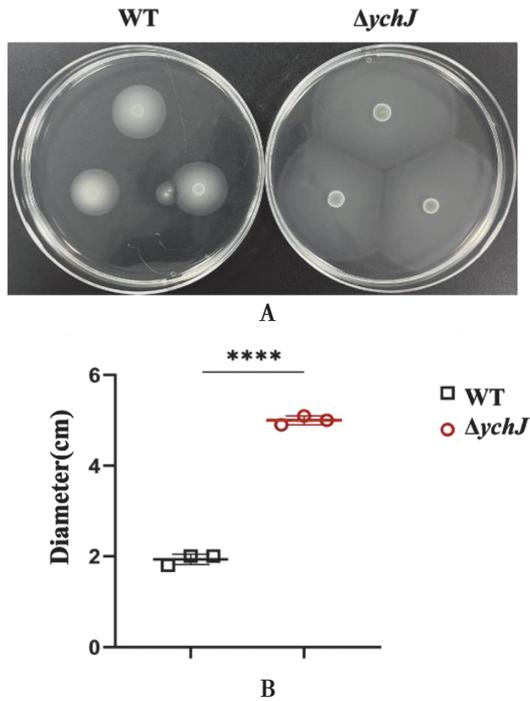
A Growth curve measurement in LB with  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin for 24 hours B WT and  $\Delta ychJ$  colony count at 5 h and 12 h in the ampicillin growth curve C Growth curve measurement in LB with  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  norfloxacin for 24 hours D WT and  $\Delta ychJ$  colony count at 5 h and 12 h in the norfloxacin growth curve

Fig. 4 Growth curve and colony count of WT and  $\Delta ychJ$  in antibiotic environment

### 5 YchJ 降低沙门菌的移动能力

WT 与  $\Delta ychJ$  的运动性检测结果表明, WT 在 24 h 内形成了直径为  $(1.933 \pm 0.1155)$  cm 的扩散圈, 而

$\Delta ychJ$  的扩散直径明显增大,为(5.00 ± 0.10) cm。WT 菌株与  $\Delta ychJ$  菌株之间的移动性具有显著性差异( $t=34.77, P<0.01$ )(图 5),表明 *ychJ* 基因的缺失显著提高鼠伤寒沙门菌的运动能力。



A WT 与  $\Delta ychJ$  在半固体培养基上扩散情况 B WT 与  $\Delta ychJ$  扩散直径统计

图 5 WT 与  $\Delta ychJ$  移动性实验

A WT and  $\Delta ychJ$  diffusion on semi-solid medium B Statistical analysis of WT and  $\Delta ychJ$  diffusion diameter

Fig. 5 Motility Assay of WT and  $\Delta ychJ$

## 讨论

YchJ 隶属于 UPF0225 (unknown protein function 0225) 家族成员,该家族的结构和功能未知,归类为细菌的未知功能蛋白。目前,YchJ 的相关研究极少,其结构未知,PDB 数据库中也无与 YchJ 同源性较高的蛋白结构。生物信息学分析表明,YchJ 含有 SecA 样金属结合域。该域可以与 SecB 和核糖体结合,从而影响蛋白质分泌过程。前期研究表明,大肠埃希菌的 YchJ 通过其 SecA 样金属结合域与铁结合<sup>[13]</sup>,敲除 *ychJ* 大肠埃希菌的蛋白分泌量显著提高,提示 YchJ 可能通过与 SecA 蛋白竞争影响蛋白质的分泌过程。此外,*ychJ* 基因的缺失还显著增强了大肠埃希菌生物膜的形成<sup>[11]</sup>。生物膜作为细菌的重要生存形式,为细菌提供了一层物理屏障,使得其能够在各种不利环境中生存和繁殖。因此,YchJ 可能通过影响生物膜形成、优化蛋白质分泌和应对环境压力等方面增强大肠埃希菌的抗逆能力。

为了探究鼠伤寒沙门菌 YchJ 蛋白的生物学功能,本研究采用系统化的生物信息学方法对 YchJ 蛋

白进行了全面分析,通过对 13 种病原菌中 YchJ 蛋白氨基酸序列进行保守性分析,清晰地展示了 YchJ 保守性氨基酸残基的位置和保守程度。在成功构建了鼠伤寒沙门菌 *ychJ* 基因敲除株 ATCC14028s  $\Delta ychJ$  的基础上,鉴于 YchJ 在大肠埃希菌中具有抑制生物膜形成的作用,首先用刚果红染色法和结晶紫半定量法对两株菌的生物膜形成能力进行了测定。结果显示,WT 和  $\Delta ychJ$  在生物膜形成能力上存在差异,敲除株的生物膜形成能力显著降低,表明 YchJ 蛋白在沙门菌中促进生物膜的形成。这一结果与之前大肠埃希菌的相关研究结果相矛盾,除了实验中所用菌种的不同,本实验使用的培养基为 LB 培养基,而之前的大肠埃希菌研究中使用培养基为含有葡萄糖的 LB 培养基。葡萄糖作为一种重要的碳源,可以通过促进细菌的快速生长和胞外多糖的合成,以及调控相关基因表达和群体感应系统,影响细菌生物膜的形成和稳定性<sup>[14]</sup>,这一差异可能导致了不同的实验结果。

基于沙门菌鞭毛合成和生物膜形成之间的反调控关系<sup>[15-16]</sup>,本研究在半固体培养基上检测了两株菌的运动能力。 $\Delta ychJ$  表现出更强的运动能力。此外,在正常培养基中连续培养 24 h, $\Delta ychJ$  和野生株的生长速率和菌体密度均无显著差异,这表明 *ychJ* 基因的缺失对沙门菌的初级代谢无显著影响。然而,在氨苄和诺氟沙星两种不同抑菌作用机制的抗生素压力条件下,野生型的生长速度、最大菌体密度及生存能力均显著高于  $\Delta ychJ$ 。这表明 *ychJ* 基因在沙门菌的普遍抗药性机制中扮演了重要角色,其缺失可能影响了某些关键代谢途径,使得细菌在面对不同抗生素时缺乏必要的代谢适应能力。因此,沙门菌的 YchJ 蛋白具有增强生物膜形成、提高抗生素耐受性和抑制细菌运动的功能,从而调控沙门菌的抗逆能力。

前期的大规模遗传筛选并没有显示 YchJ 蛋白质具有明显的功能<sup>[17]</sup>,表明 YchJ 在实验室培养条件下可能不发挥其功能或不正常表达,YchJ 需要在特定培养条件下才能发挥其真正功能,与推测并验证的其影响沙门菌抗逆能力相一致。目前在不同环境和压力条件下 YchJ 的表达水平和功能变化尚不完全清楚,研究其机制可能为开发新的抗菌策略提供理论基础,对解决日益严重的抗生素耐药问题具有重要意义。

### 【参考文献】

- [1] Fabrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 308-341.
- [2] WHO. *Salmonella* (non-typhoidal)[R]. Geneva; WHO, 2018.
- [3] WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed[R]. Geneva; WHO, 2017. (下转 476 页)

何一个环节出现问题,都可能导致最终检验结果的不准确,从而影响诊断和治疗的效果。针对这些问题,医院应加强对检验人员的培训,提升标本采集、处理和运输的标准化操作,以减少不合格标本的产生。

如今,MALDI-TOFMS技术在病原菌的鉴定以及细菌耐药性的检测方面取得了显著的进步,并且展现出了巨大的发展潜力。为了充分利用这一技术,需要不断地进行优化和深入发掘其潜力。各个微生物实验室应当根据自身的特点和需求,建立一套适合自己的MALDI-TOFMS检测体系。这包括规范标本的前处理流程、选择合适的基质等关键步骤,以确保检测结果的准确性和可靠性。通过这些努力,可以显著缩短检测的周转时间,从而为临床提供更为迅速和准确的微生物检测报告,进而指导细菌感染患者的抗生素使用,提高治疗效果。

#### 【参考文献】

- [1] Kurutkan MN, Kara O, Eraslan IH. An implementation on the social cost hospital acquired infections[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3):433-445.
- [2] Ahmed EB. Bacterial infections, alloimmunity, and transplantation tolerance[J]. Transplant Rev(Orlando), 2021, 25(12):127-135.
- [3] Shukla SD. Hypoxia-inducible factor and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respirology, 2020, 25(11):253-263.
- [4] Seemann TL, Nybo M. Continuous quality control of the blood sampling procedure using a structured observation scheme[J]. Biochem Med, 2016, 26(3):337-345.
- [5] Lippi G, Becan-McBride K, Behulova D, et al. Preanalytical quality improvement; in quality we trust[J]. Clin Chem Lab Med, 2021, 51(2):229-241.
- [6] 王治国, 费阳, 康凤凤, 等. 国家卫生计生委发布临床检验专业15项医疗质量控制指标(2015年版)内容及解读[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(11):777-781.
- [7] Fussen R, Lemmen S. Prevention of transmission of multidrug-resistant bacteria[J]. Internist(Berl), 2015, 56(11):246-254.
- [8] Bassetti M, De Waele JJ, Eggimann P, et al. Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(5):776-795.
- [9] Burillo A, Bouza E. Faster infection diagnostics for intensive care unit (ICU) patients[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2022, 22(3):347-360.
- [10] Girard V, Monnin V, Girard D, et al. Multicenter evaluation of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry system for identification of bacteria, including Brucella, and yeasts[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(9):1909-1917.
- [11] 周航, 王飞, 李建萍, 等. 神经外科手术患者医院感染特点与影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(19):2969-2972.
- [12] 苏祥, 宗呈祥, 王霞, 等. 风险评估体系在不同科室医院感染分类管理中的运用[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(9):841-852.
- [13] 马静, 张晓晓, 周永红, 等. 2018-2022年郑州地区部分三甲医院医院感染监测结果分析[J]. 华南预防医学, 2023, 49(10):1339-1342.
- [14] 赵越, 修云霞, 于琦, 等. 临床血液生化检验标本分析过程中影响检测准确性的单因素分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(21):151-154.
- [15] 魏红雨. 探讨微生物检验标本不合格原因分析及质量控制对策[J]. 中国医药指南, 2023, 21(13):117-119.
- [16] Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? [J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 44(6):750-759.
- 【收稿日期】 2024-11-06 【修回日期】 2025-01-29
- 
- (上接 470 页)
- [4] Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems[J]. Microb Infect, 2001, 3(7):549-559.
- [5] Arkenberg A. Mechanisms of anaerobic nitric oxide detoxification by *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*[D]. University of East Anglia; School of Biological Sciences, 2013.
- [6] Addington E. *Salmonella typhimurium*: Mechanisms of nitric oxide detoxification and regulation of the periplasmic nitrate reductase[D]. University of East Anglia; School of Biological Sciences, 2016.
- [7] Bjur E. Virulence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and innate antibacterial host responses [D]. Department of Microbiology, Tumour and Cell Biology; Karolinska Institutet, 2006.
- [8] Newson J. The SseK effector proteins of *Salmonella typhimurium* target host cell signaling proteins [D]. The University of Melbourne Australia; Department of Microbiology and Immunology, 2019.
- [9] Kary SC, Yoneda JRK, Olshefsky SC, et al. The global regulatory cyclic AMP receptor protein (crp) controls multifactorial fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*[J]. Antimicrob Agen Chem, 2017, 61(11):e01666-17.
- [10] Singh V. Host factors and compartments accessed by *Salmonella typhimurium* for intracellular growth and survival [D]. Humboldt-Universität zu Berlin: Lebenswissenschaftliche Fakultät, 2015.
- [11] Li M, Wang Z, Zhou M, et al. Continuous production of human epidermal growth factor using *Escherichia coli* biofilm[J]. Front Microb, 2022, 13:855059.
- [12] Cho D, Lau I, Li M, et al. Development of a microtiter plate assay for real time analysis of t7 bacteriophage mediated lysis of *Escherichia coli*[J]. J Exper Microb Immun, 2017, 21:38-43.
- [13] Cranford-Smith T, Jamshad M, Jeeves M, et al. Iron is a ligand of SecA-like metal-binding domains *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2020, 295(21):7516-7528.
- [14] Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, et al. The biofilm matrix; multitasking in a shared space[J]. Nat Rev Microb, 2023, 21(2):70-86.
- [15] Fuentes DN, Calderon PF, Acuña LG, et al. Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella typhimurium* [J]. FEMS Microb Lett, 2015, 362(17):fnn135.
- [16] Le Guyon S, Simm R, Rehn M, et al. Dissecting the cyclic diguanylate monophosphate signalling network regulating motility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [J]. Environ Microbiol, 2015, 17(4):1310-1320.
- [17] Cranford-Smith T, Jamshad M, Jeeves M, et al. Iron is a ligand of SecA-like metal-binding domains *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2020, 295(21):7516-7528.
- 【收稿日期】 2024-11-13 【修回日期】 2025-01-30