

DOI:10.13350/j.cjpb.231023

• 综述 •

衣原体遗传操作的研究进展*

李舒怡, 陈超群**

(南华大学衡阳医学院病原生物学研究所医学免疫学教研室, 湖南衡阳 421001)

【摘要】 衣原体(*Chlamydiae*)感染可引起人和动物的多种疾病。长期以来,衣原体固有的细胞内周期和使用抗生素作为可选择标记的限制阻碍了对该病原体进行基因操作分子工具的发展。然而,最近各类遗传操作工具的发展使我们对改变衣原体基因组的能力有了显著提高,这将加速阐明这种顽固性病原体的生物学和发病机制。本综述中阐述了衣原体遗传操作的挑战和可行性分析,以及其相关分子遗传工具的进展。

【关键词】 衣原体;遗传操作;分子遗传工具;综述

【中图分类号】 R375

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)10-1226-05

[*Journal of Pathogen Biology*, 2023 Oct;18(10):1226-1230.]

Advances in genetic manipulation of *Chlamydiae*

LI Shuyi, CHEN Chaoqun (Department of Medical Immunology, Institute of Pathogenic Biology, Hengyang Medical School of University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

【Abstract】 *Chlamydiae* infection can cause a variety of diseases in humans and animals. For a long time, the inherent intracellular cycle of chlamydia and the limitations of using antibiotics as selectable markers have hindered the development of molecular tools for gene manipulation of this pathogen. However, the recent development of various genetic manipulation tools has significantly improved our ability to alter the chlamydia genome, which will accelerate the elucidating of the biology and pathogenesis of this stubborn pathogen. In this review, we discuss the challenges and feasibility of genetic manipulation of chlamydia, as well as the development of related molecular genetic tools.

【Key words】 *Chlamydiae*; genetic manipulation; molecular genetic tools; review

***衣原体(*Chlamydiae*)是一类严格真核细胞内寄生、具有独特发育周期的病原菌,从单细胞生物到人类均可受其感染,引起严重的临床症状。基于核糖体 RNA(rRNA)基因的同源性,衣原体建立了独立的门、纲和目,衣原体目分为8个科和11个属;衣原体属包括沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)、肺炎衣原体(*C. pneumoniae*, Cpn)和鸚鵡热衣原体(*C. psittaci*, Cps)等12个种^[1];其中Ct感染可引发沙眼、生殖道感染以及性病性淋肉芽肿等疾病^[2];Cpn可引起慢性感染,并与一系列慢性肺部疾病有关,包括哮喘、慢性支气管炎和慢性阻塞性肺疾病(COPD)^[3];Cps主要感染动物,但可在人类中引起严重的人畜共患传染病。

衣原体疾病的预防和治疗,需要对其致病机制和毒力因子进行深入剖析,但衣原体分子遗传操作工具的缺乏一直是研究的一大阻碍。在过去的几年里,这种专性胞内病原菌的遗传分析系统取得了重大的进展,现代分子操作工具的发展从根本上改变了衣原体的研究格局。本文将综述衣原体基因组学研究所面临的挑战和目前已建立的遗传工具及其应用。

1 衣原体遗传操作面临的挑战

1.1 衣原体独特的发育周期 衣原体在宿主细胞中的发育周期在原体(elementary body, EB)和始体(reticulate body, RB)之间交替^[4];EB具有感染性,有细胞壁和致密的类核结构,稳定地存在于细胞外环境;RB是衣原体的繁殖形式,代谢活跃,不具有感染性。EB黏附在宿主细胞表面并诱导其内化是感染的第一步,由此产生含有EB的胞内囊泡(也称之为包涵体);内化

后,包涵体内的EB分化成RB,RB则通过二分裂进行增殖,最终分化为EB,成熟的子代EB通过细胞裂解或“胞吐”外排等途径被释放到细胞外,开始新的感染^[5]。

衣原体独特的发育周期给外源DNA的传递带来了挑战。进行遗传操作时虽可以针对EB或RB,但是RB存在于宿主细胞内,在细胞外极其不稳定,外源DNA需要通过四层膜(宿主质膜、包涵体膜和RB内外膜)才能到达细菌胞浆^[6];而EB在外界环境中虽然可以稳定存在,但其细胞壁是一系列紧密交联的蛋白质,坚硬的细胞壁使得EB难以吸收大分子,从而限制了对外源DNA的摄取^[7]。

1.2 标记抗生素的选择转化 衣原体的阳性选择通常是通过抗药性标记进行的。在治疗衣原体感染性疾病时,抗生素被广泛应用于临床,这在一定程度上限制了适合转化研究的抗生素耐药标记物的使用。此外,由于衣原体存在于宿主细胞的包涵体中,用于标记的抗生素必须穿透至少两层脂质双分子层(细胞膜和包涵体膜),因此需要选择更高的抗生素浓度,而较高的MIC可能对宿主细胞产生毒性,这进一步地限制了标记抗生素

* **【基金项目】** 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(No. 18k072)。

** **【通讯作者】** 陈超群, E-mail: chaoqunch@163.com

【作者简介】 李舒怡(1998-),女,湖南娄底人,硕士研究生,主要从事分子疫苗和抗感染免疫分子机制研究。
E-mail: 1483610696@qq.com

的选择。目前,几种抗生素已成功用于衣原体的遗传选择,包括四环素、利福平、大观霉素、氯霉素等^[8]。然而,衣原体抗生素耐药基因的突变通常呈隐性(如 16S RNA、RpoB 和 GyrA),导致可选择标志物的使用有限^[9]。

1.3 转化子的克隆分离 衣原体与外源 DNA 共同孵育后,在抗生素存在的条件下,可以筛选出转化子;然而,克隆分离转化子必须尽快进行,以便最大限度地减少其他未转化细菌的携带潜力。衣原体与可以在琼脂平板上自由克隆分离的细菌不同,由于其专性细胞内存活的特性,通常采用空斑试验(plaque assay);这种方法通过在衣原体感染的单层细胞上铺加含有琼脂糖凝胶的培养液,使其只向邻近细胞扩散,在几轮感染后形成肉眼可见的空斑,空斑内的细菌可以从琼脂糖层中挑选出来,并进一步扩大^[10]。但大多数衣原体临床分离株形成斑块的能力较差,对于只能在阿米巴宿主中繁殖的衣原体也无空斑试验分离克隆群的报道^[11]。在这种情况下,有限稀释法、流式细胞术和显微操作器的使用^[12],通常被用来分离感染细菌的细胞。

2 衣原体遗传操作的可行性

在过往的研究中发现,衣原体具有许多与 DNA 摄取、重组和修复有关的基因,可以实现种间和种内的侧向基因转移。20 世纪 90 年代,在对编码主要外膜蛋白(MOMP)的 *ompA* 基因进行特异性序列分析时,第一次发现了 Ct 菌株内的基因重组^[13]。随着全基因组测序技术的出现,证明了在 Ct 进化过程中,整个基因组发生了重组事件^[14]。2007 年, Demars 等^[15]建立了体外侧向基因转移系统,用具有两种不同耐药性的 Ct 菌株同时感染宿主细胞,分离出双重耐药菌株的频率比单感染自发突变产生的菌株频率高 10^4 倍,表明不同血清型 Ct 之间可以发生体外基因重组。虽然缺乏可识别的结合机制、能力诱导基因或途径和限制修饰系统,很难确定衣原体 DNA 交换的机制,但这种“天然的能力”可以用来开发衣原体转化系统,为衣原体遗传操作的发展提供了更多可能性。

3 衣原体的分子遗传操作

3.1 遗传转化 重组 DNA 的稳定转化,一直是衣原体分子遗传操作的最大障碍。1994 年首次报道了衣原体的成功转化, Tam 等^[16]构建了含氯霉素抗性的穿梭质粒 pPBW100,利用电穿孔技术将其导入到 Ct 的 EB 中,证明外源 DNA 可以通过电穿孔进入 EB。2009 年,电穿孔技术再次应用于大肠埃希菌 pUC 质粒对 Cps 6BC 的转化^[17]。虽然这两项研究中的电穿孔条件相似,但其对 EB 活性的影响不同,可能与缓冲液的不同相关。尽管早期就完成了对衣原体的成功转化,但是电穿孔技术并没有成为当前衣原体转化实验的主流方法。Wang 等^[18]进行衣原体转化研究时,构建了携带有大肠埃希菌质粒和衣原体质粒的重组质 pBR325::L2,将重组质粒和 EB 混合物在 CaCl_2 缓冲液中进行孵育,形成了含有内酰胺酶(*Bla*)和氯霉素乙酰转移酶(*cat*)基因的转化子,进一步转化衣原体质粒缺失(plasmid-free)菌株,可以恢复 Ct 质粒操控糖原合成的能力,为衣原体基因功能的全面研究铺平了道路。基于 CaCl_2 的化学转化可以产生稳定的转化子,目前已成为衣原体转化的首选技术,并且产生了具有多种不同抗生素耐药的穿梭质粒。电穿孔和 CaCl_2 转化促进 DNA 进入 EB,而在宿主细胞内复制的 RB 则通过树状大分子进行 DNA 转化;有研究开发了一种非细胞毒性纳米结构传递载体称为树状大分子(dendrimers),将其插

入到 pL2 菌株中进行转化^[19]。这种转化系统不涉及电穿孔或其他手段的感染细胞培养,使用少量的 DNA 复合物与树状大分子结合,就能产生与其一致的转化群体,同时也用于 Cpn 的转化^[20],将有助于对该病原体的基因功能及致病机制的研究。衣原体的成功转化是其遗传操作发展史上的一个重要转折点,将加速我们对这些重要病原体生物学的理解。

3.2 穿梭质粒载体 随着转化系统的发展,可用于衣原体研究的分子遗传工具库迅速扩大,具有多克隆位点(MCS)、荧光蛋白报告基因、诱导启动子和新的可选择标记的穿梭质粒载体产生。早期研究设计了两种穿梭质粒载体,基于 Ct L2 内源性质粒的 pBR325::L2^[21]和基于瑞典 LGV L2 临床分离株且携带 CDS1(*pgp7*)缺失的 pGFP::SW2^[22],被用作质粒缺失 Ct L2 菌株的转化。穿梭质粒的研究中最引人注目的是增加了编码各种荧光蛋白基因,以便于对病原体进行活细胞成像。例如,穿梭质粒载体 pBOMB4 及其衍生物 pBOMB4-MCI 可分别表达绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(mCherry)^[23],这为确认重组质粒在转化子中的存在和维持提供了一个方便的标记。另一个显著的进步是引入了四环素调节的控制元件,以精确地控制衣原体发育周期中不同时间的基因表达。Wickstrum 等^[24]的研究生成了一种新的穿梭载体 pASK-GFP-L2,其 GFP 的表达受到四环素抑制剂和无水四环素的严格调控,表明代谢的多样性会影响 GFP 的诱导或表达,这些观察结果表明了该分子工具的具有强大潜力,使许多实验分析能够更好地阐释衣原体的生物学和发病机制。四环素诱导系统的应用对衣原体是有利的,因为四环素的衍生物,如脱水四环素,可以穿过生物膜,在对衣原体无毒的浓度下激活基因表达。大多数质粒载体均以 β -内酰胺酶作为选择标记,而 β -内酰胺类药物在临床上用于治疗孕妇的宫颈炎,因此该抗生素标记只用于 Ct LGV 型的遗传研究。对于其他衣原体的研究,将采用由替代的抗生素耐药标记产生的两个质粒。pGFPBSD/Z::SW2^[25]是 pGFP::SW2 的衍生体,其中 *cat* 基因被杀虫素 S 脱氨酶基因(*bsd*)取代,携带该质粒的转座子可以用杀虫素来选择;另一个质粒载体 pGFP-CAT::SW2^[26]是通过从 pGFP::SW2 中删除 β -内酰胺酶基因而得到的,可用作氯霉素选择。这些穿梭质粒的开发扩大了衣原体遗传的工具库,也适用于突变、基因过表达或条件表达,以及 III 型分泌效应因子^[27]的研究。

3.3 正向和反向遗传分析 衣原体的分子遗传研究遵循的策略方法是:从随机突变开始,然后筛选感兴趣的特定表型(正向遗传学)或携带特定基因改变(反向遗传学)的突变体。微生物基因组的随机突变方法多种多样,如插入转座子、紫外线照射和化学诱变等,其中转座子诱变技术成功应用于其他专性胞内病原菌^[28],而衣原体的遗传变异需要依赖于化学诱变剂。将受感染的细胞暴露于甲基磺酸乙酯(*Ethylmethylsulfone*, EMS)或乙酰基亚硝基脲(*N-ethyl-N-nitrosourea*, ENU)中,可产生零、条件、亚态和超形态等位基因^[29],然后利用空斑试验分离克隆突变体。在描述衣原体反向遗传应用的第一份报告中(如图 1 所示),Kari 等^[30]使用低浓度的 EMS 诱导 Ct,产生了每个基因组含有少于一个单核苷酸变异(SNV)的衣原体,结合错配特异性内切酶 CEL I 和定向诱导基因组局部突变技术(TILLING)对克隆株进行扩增和筛选,最后分离并鉴定了一个色氨酸合酶基因(*trpB*)的零突变体。随后的研究报道,对于分

离筛选转录因子 ChxR^[31]、PmpD^[32] 和 Pgp3^[33] 的零突变体, 这种反向遗传性方法具有广泛的适用性。

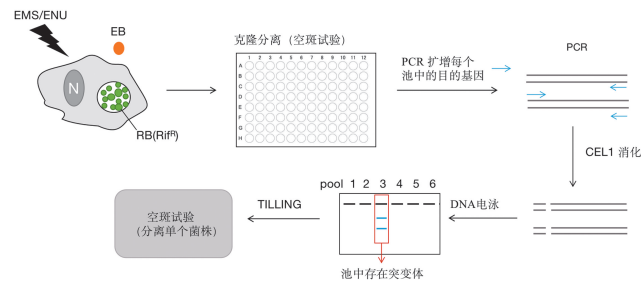


图 1 反向遗传方法
Fig.1 Reverse genetics approach

正向遗传学在微生物学领域有着悠久的历史, 现在已被应用于几种衣原体功能的鉴定。Nguyue 等^[34] 将化学诱变和全基因组测序(WGS)相结合(图 2), 利用衣原体菌株之间的侧向基因转移系统, 产生了具有不同表型的衣原体突变株, 研究证实了 *glgB* 突变和糖原沉淀物形成的联系并定义编码 T2S 中心成分的 *gspE* 在上皮细胞糖原积累和复制中的作用。利用正向遗传学进行筛选发现了衣原体多种功能因子, 包括介导包涵体周围 F-肌动蛋白组装细菌因子 InaC^[35]、干扰素抗性因子 CpoS^[36] 和 Igs4^[37]、干扰素刺激因子 Ptr/CTL0175^[38] 以及温度敏感等位基因^[39]。目前, 化学诱变结合 WGS 或 TILLING 进行突变定位的方法是对衣原体进行全基因组分析的唯一策略。此外, 由于这种方法不受 DNA 转化效率的限制, 且随着全基因组测序成本的不断下降, 这一策略显然适用于所有衣原体的遗传研究。

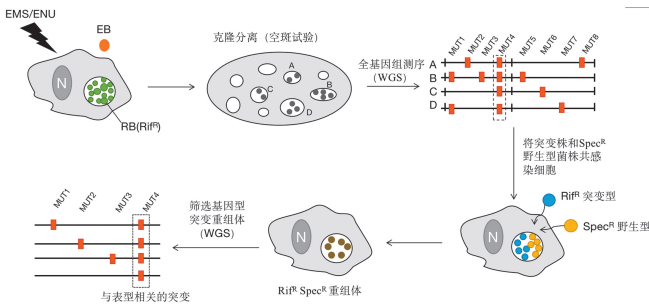


图 2 正向遗传方法
Fig.2 Forward genetics approach

通过化学诱变剂(EMS/ENU)对 Ct RB 进行突变以产生足够数量的突变体, 将其置于 96 孔板中进行克隆, 从每个池中 Ct 扩增出 *trpB* 操作子, CEL1 酶切结合 DNA 凝胶电泳鉴定携带 *trpB* 突变的亚群, TILLING 技术可以识别靶基因中的 SNV, 以筛选出含有靶基因突变的突变株。

通过化学诱变剂(EMS/ENU)对 Ct RB 进行突变产生利福平耐药的菌株, 利用空斑试验分离出具有共同斑块形态的突变体, 对其进行基因组测序以识别遗传损伤。为了建立基因损伤与特定斑块形态之间的联系, 在利福平和壮观霉素的存在下, 用 Rif^R 突变体和野生型 Spec^R 株感染 HeLa 细胞, 选择重组 Rif^R Spec^R 株。通过全基因组测序筛选出相关表型的突变株。

3.4 靶向诱导基因 失活质粒转化方案的建立使基于质粒的

衣原体染色体 DNA 靶向基因破坏方法的发展成为可能。目前, 已经产生了三种针对衣原体基因失活的靶向方法: 插入可移动的 II 型内含子(TargeTron)、荧光报告的等位基因交换突变(FRAEM)和 CRISPR 干扰(CRISPRi)。

3.4.1 插入可移动的 II 型内含子(TargeTron) TargeTron 系统依赖于以原核基因组为靶点的可移动的第二组内含子, 通过改变内含子底物识别区域内的 DNA 序列, 可以被重新定向, 以插入到特定的靶点。在衣原体的首次应用中, 通过对质粒载体 pACD4K-C 进行修饰以引入 *bla* 基因, 并用氨苄西林筛选到一个稳定的 *incA::GII(bla)* 突变体, 这是衣原体中第一个位置特异性染色体基因失活^[40]。随后, Lowden 等^[41] 在 Johnson 等^[42] 的研究上利用氨基糖苷 3' 腺苷转移酶(*aadA*)基因创建了一个大观霉素可选择的 *GII* 内含子, 然后使用 *GII(aadA)* 内含子和 *GII(bla)* 内含子创建了一个 *incA::GII(aadA), rsbV1::GII(bla)* 双突变体。TargeTron 技术一直是在衣原体中使用最广泛的靶向基因破坏方法, 现已被用于靶向基因失活、基因组编辑(通过 *Cre-lox* 系统^[43])、遗传物质传递, 以及对与染色体整合的单拷贝结构进行突变约束互补。

3.4.2 荧光报告的等位基因交换突变(FRAEM) 衣原体遗传学研究进展迅速, 但基因组修饰仅限于点突变和 *GII* 内含子插入, 从而截断蛋白质产物, 对基因缺失或更复杂的基因组整合(如等位基因交换)很难处理。Mueller 等^[44] 开发了一种 FRAEM 的方法, 使用条件自杀载体 pSU6 迫使片状染色体上的 DNA 同源区域之间进行重组, 并引入了一个选择盒和双报告基因(*bla* 和 *gfp*), 以促进重组体的鉴定。FRAEM 载体上重组区内外的荧光标记基因允许对单交叉和双交叉(等位基因交换)事件进行视觉区分, 因此该系统可用于产生基因的插入和缺失。然而, 对于操纵子内基因的删除, 该方法可能会对下游基因产生极性效应。Keb 等^[45] 的研究解决了这一问题, 将 FRAEM 介导的基因缺失与 *Cre-lox* 介导的选择盒切除结合起来, 成功产生了一个无标记的 *tmeA* 缺失但对 *tmeB* 的表达没有负面影响。FRAEM/FLAEM^[46] 已成功地用于删除 III 型分泌因子的基因, 如 *tmeA* 和 *tarP*^[47], 为衣原体的毒力研究提供了一种有效的分子遗传操纵工具。

3.4.3 CRISPR 干扰(CRISPRi) 最近一项新的技术被提出可以对衣原体基因组进行条件性敲除-CRISPR 干扰(CRISPRi), 是基于一种不具有催化活性的 Cas9 变体 dCas9 识别其同源 gRNA 并结合目标序列的能力; 在可诱导启动子(gRNA 通常具有组成性表达)的控制下, 用 dCas9 编码载体转化感兴趣的生物体, 通过诱导 dCas9 的表达来选择性地阻断目标序列的转录, 该技术现已成功在大肠埃希菌^[48] 和结核分枝杆菌^[49] 中得到证实。在最初的研究中, Ouellette^[50] 选择 *incA* 作为设计靶点, 将同时编码 Sa_dCas9 和靶向 Sa_gRNA 的质粒转化至 Ct 中, 可观察到宿主细胞中 RB 表达的 IncA 显著性减少, 表明构建的质粒载体抑制了衣原体中 *incA* 的表达。在对载体的稳定性进行了一些微调之后, Ouellette 研究组随后使用 CRISPRi 生成了衣原体转化子来抑制 ClpP2X_{cr} 的表达, 导致衣原体生长下降, 并表明 ClpX 和 ClpP2 同源基因是 Ct LGV 正常发育所必需的^[51]。CRISPRi 成功地诱导抑制衣原体的靶向基因表达, 进一步丰富衣原体的遗传工具箱, 可用于专性病原菌中必要基因功能的研究。

4 结语

衣原体的成功转化是其遗传学研究历史上具有里程碑意义的事件,为其他遗传方法和工具的开发应用提供了关键性的第一步。目前,衣原体的遗传操作工具层出不穷,但其中多数是针对Ct的研究,限制了对衣原体发病机制关键方面的解剖,因此还需要开发新的遗传工具以扩展进其他衣原体种属。此外,随着衣原体工具箱的不断扩大,也将出现新的研究方向,例如选择适当的动物模型来测试转基因菌株的毒力,接种方式,以及使用适当的衣原体菌株。

【参考文献】

- [1] Gunn A, Lofstedt R. Chlamydiaceae: an update on nomenclature [J]. Vet Rec, 2016, 179(8): 193-194.
- [2] 李鹏, 端青, 宋立华. 衣原体最新分类体系与分类鉴定方法研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(12): 1262-1266.
- [3] Filardo S, Di Pietro M, Sessa R. Towards a deeper understanding of *Chlamydia trachomatis* pathogenetic mechanisms: Editorial to the special issue "*Chlamydia trachomatis* pathogenicity and disease" [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3943.
- [4] Calmes D, Huynen P, Paulus V, et al. Chronic infection with *Chlamydia pneumoniae* in asthma: a type-2 low infection related phenotype [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 72.
- [5] Cosse MM, Hayward RD, Subtil A. One face of *Chlamydia trachomatis*: the infectious elementary body [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2018, 412: 35-58.
- [6] Gitsels A, Sanders N, Vanrompay D. Chlamydial infection from outside to inside [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2329.
- [7] Enciso G, Sutterlin C, Tan M, et al. Stochastic chlamydia dynamics and optimal spread [J]. Bull Math Biol, 2021, 83(4): 24.
- [8] Omsland A, Sager J, Nair V, et al. Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(48): 19781-19785.
- [9] Fisher DJ, Adams NE, Maurelli AT. Phosphoproteomic analysis of the *Chlamydia caviae* elementary body and reticulate body forms [J]. Microbiology, 2015, 161(8): 1648-1658.
- [10] Marti H, Bommana S, Read TD, et al. Generation of tetracycline and rifamycin resistant chlamydia suis recombinants [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 630293.
- [11] Mestrovic T, Ljubin-Sternak S. Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23(4): 656-670.
- [12] Banhart S, Saied EM, Martini A, et al. Improved plaque assay identifies a novel anti-*Chlamydia ceramide* derivative with altered intracellular localization [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5537-5546.
- [13] Beare PA, Sandoz KM, Omsland A, et al. Advances in genetic manipulation of obligate intracellular bacterial pathogens [J]. Front Microbiol, 2011, 2: 97.
- [14] Alzhanov DT, Suchland RJ, Bakke AC, et al. Clonal isolation of chlamydia-infected cells using flow cytometry [J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(1): 201-208.
- [15] Hayes LJ, Yearsley P, Treharne JD, et al. Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis* [J]. Infect Immun, 1994, 62(12): 5659-5663.
- [16] Jeffrey BM, Suchland RJ, Quinn KL, et al. Genome sequencing of recent clinical *Chlamydia trachomatis* strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination [J]. Infect Immun, 2010, 78(6): 2544-2553.
- [17] Demars R, Weinfurter J, Guex E, et al. Lateral gene transfer in vitro in the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(3): 991-1003.
- [18] Tam JE, Davis CH, Wyrick PB. Expression of recombinant DNA introduced into *Chlamydia trachomatis* by electroporation [J]. Can J Microbiol, 1994, 40(7): 583-591.
- [19] Binet R, Maurelli AT. Transformation and isolation of allelic exchange mutants of *Chlamydia psittaci* using recombinant DNA introduced by electroporation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(1): 292-297.
- [20] Wang Y, Kahane S, Cutcliffe LT, et al. Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(9): e1002258.
- [21] Kannan RM, Gard HC, Mishra MK, et al. Dendrimer-enabled transformation of *Chlamydia trachomatis* [J]. Microb Pathog, 2013, 65: 29-35.
- [22] Gerard HC, Mishra MK, Mao G, et al. Dendrimer-enabled DNA delivery and transformation of *Chlamydia pneumoniae* [J]. Nanomedicine, 2013, 9(7): 996-1008.
- [23] Wang Y, Cutcliffe LT, Skilton RJ, et al. Transformation of a plasmid-free, genital tract isolate of *Chlamydia trachomatis* with a plasmid vector carrying a deletion in CDS6 revealed that this gene regulates inclusion phenotype [J]. Pathog Dis, 2013, 67(2): 100-103.
- [24] Bauler LD, Hackstadt T. Expression and targeting of secreted proteins from *Chlamydia trachomatis* [J]. J Bacteriol, 2014, 196(7): 1325-1334.
- [25] Wickstrum J, Sammons LR, Restivo KN, et al. Conditional gene expression in *Chlamydia trachomatis* using the tet system [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76743.
- [26] Ding H, Gong S, Tian Y, et al. Transformation of sexually transmitted infection-causing serovars of *Chlamydia trachomatis* using Blasticidin for selection [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80534.
- [27] Xu S, Battaglia L, Bao X, et al. Chloramphenicol acetyltransferase as a selection marker for chlamydial transformation [J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 377.
- [28] Soules KR, LaBrie SD, May BH, et al. Sigma 54-Regulated transcription is associated with membrane reorganization and type III secretion effectors during conversion to infectious forms of *Chlamydia trachomatis* [J]. MBio, 2020, 11(5): e01725-20.
- [29] McClure EE, Chavez ASO, Shaw DK, et al. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(9): 544-558.
- [30] Kedzior M, Bastidas RJ. Forward and reverse genetic analysis of *Chlamydia* [J]. Methods Mol Biol, 2019; 2042: 185-204.
- [31] Kari L, Goheen MM, Randall LB, et al. Generation of targeted

- Chlamydia trachomatis* null mutants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(17):7189-7193.
- [32] Yang C, Kari L, Sturdevant GL, et al. *Chlamydia trachomatis* ChxR is a transcriptional regulator of virulence factors that function in *in vivo* host-pathogen interactions[J]. Pathog Dis, 2017, 75(3):ftx035.
- [33] Kari L, Southern TR, Downey CJ, et al. *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a virulence factor involved in early host-cell interactions[J]. Infect Immun, 2014, 82(7):2756-2762.
- [34] Yang C, Kari L, Lei L, et al. *Chlamydia trachomatis* plasmid gene protein 3 is essential for the establishment of persistent infection and associated immunopathology[J]. MBio, 2020, 11(4):e01902-20.
- [35] Nguyen BD, Valdivia RH. Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* revealed by forward genetic approaches[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(4):1263-1268.
- [36] Kokes M, Dunn JD, Granek JA, et al. Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of *Chlamydia* [J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(5):716-725.
- [37] Sixt BS, Bastidas RJ, Finethy R, et al. The *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein cpos counteracts sting-mediated cellular surveillance and suicide programs [J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(1):113-121.
- [38] Giebel AM, Hu S, Rajaram K, et al. Genetic screen in *Chlamydia muridarum* reveals role for an interferon-induced host cell death program in antimicrobial inclusion rupture[J]. MBio, 2019, 10(2):e00385-19.
- [39] Panzetta ME, Lujan AL, Bastidas RJ, et al. Ptr/CTL0175 is required for the efficient recovery of *Chlamydia trachomatis* from stress induced by gamma-interferon[J]. Front Microbiol, 2019, 10:756.
- [40] Brothwell JA, Muramatsu MK, Toh E, et al. Interrogating genes that mediate *Chlamydia trachomatis* survival in cell culture using conditional mutants and recombination [J]. J Bacteriol, 2016, 198(15):2131-2139.
- [41] Johnson CM, Fisher DJ. Site-specific, insertional inactivation of *incA* in *Chlamydia trachomatis* using a group II intron [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e83989.
- [42] Lowden NM, Yeruva L, Johnson CM, et al. Use of aminoglycoside 3' adenylyltransferase as a selection marker for *Chlamydia trachomatis* intron-mutagenesis and *in vivo* intron stability [J]. BMC Res Notes, 2015, 8:570.
- [43] nyearth PJ, Chirieleison SM, Dao MN, et al. Generalized bacterial genome editing using mobile group II introns and Cre-lox [J]. Mol Syst Biol, 2013, 9:685.
- [44] Mueller KE, Wolf K, Fields KA. Gene deletion by fluorescence-reported allelic exchange mutagenesis in *Chlamydia trachomatis* [J]. MBio, 2016, 7(1):e01817-15.
- [45] Keb G, Hayman R, Fields KA. Floxed-Cassette allelic exchange mutagenesis enables markerless gene deletion in *Chlamydia trachomatis* and can reverse cassette-induced polar effects [J]. J Bacteriol, 2018, 200(24):e00479-18.
- [46] Keb G, Fields KA. Markerless gene deletion by floxed cassette allelic exchange mutagenesis in *Chlamydia trachomatis* [J]. J Vis Exp, 2020, (155):10.3791/60848.
- [47] Keb G, Ferrell J, Scanlon KR, et al. *Chlamydia trachomatis* TmeA directly activates n-wasp to promote actin polymerization and functions synergistically with TarP during invasion [J]. MBio, 2021, 12(1):e02861-20.
- [48] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. Cell, 2013, 152(5):1173-1183.
- [49] Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform [J]. Nat Microbiol, 2017, 2:16274.
- [50] Ouellette SP. Feasibility of a conditional knockout system for *Chlamydia* based on CRISPR interference [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:59.
- [51] Wood NA, Blocker AM, Seleem MA, et al. The ClpX and ClpP2 Orthologs of *Chlamydia trachomatis* perform discrete and essential functions in organism growth and development [J]. MBio, 2020, 11(5):e02016-20.

【收稿日期】 2023-05-18 【修回日期】 2023-08-02

(上接 1225 页)

- [18] Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance [J]. Future Microbiol, 2012, 7(9):1061-1072.
- [19] Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, et al. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells [J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(6):764-777.
- [20] Luo JJ, Li CY, Liu S, et al. Overexpression of *Helicobacter pylori* VacA N-terminal fragment induces proinflammatory cytokine expression and apoptosis in human monocytic cell line through activation of NF- κ B [J]. Can J Microbiol, 2013, 59(8):523-533.
- [21] Parker H, Keenan JI. Composition and function of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles [J]. Microbes Infect, 2012, 14(1):9-16.
- [22] van der Pol E, B ing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(3):676-705.
- [23] Olofsson A, Vallstr m A, Petzold K, et al. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles [J]. Mol Microbiol, 2010, 77(6):1539-1555.

【收稿日期】 2023-04-28 【修回日期】 2023-07-16