

DOI:10.13350/j.cjpb.220704

• 论著 •

类鼻疽伯克霍尔德菌 AraC 转录因子基因的原核表达及纯化^{*}

曾慧, 黄玮晨, 高洁, 江昱颖, 胡琪, 修皓^{**}

(海南医学院热带医学院, 海南海口 571199)

【摘要】 目的 从海南类鼻疽伯克霍尔德菌菌株 BPHN001 中克隆得到 AraC 转录因子基因, 构建类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*) AraC 转录因子基因原核表达质粒, 对该转录因子基因进行原核表达, 并对表达产物进行纯化。方法 根据 AraC 转录因子基因设计特异性扩增引物, 将 PET-28a(+) 质粒和扩增得到的 AraC 转录因子基因产物同时用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 构建带 His 标签的重组质粒。经测序验证后, 将重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3), 采用最佳浓度 IPTG 进行诱导, 采用 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的表达情况。通过 Ni²⁺ 柱纯化目的蛋白, 采用 Western blot 检测纯化蛋白的免疫反应性。结果 特异性引物扩增得到的产物大小约为 1 000 bp, 与目的基因片段 1 032 bp 基本一致。将扩增产物与 PET-28a(+) 载体连接后测序, 与预期完全一致。重组载体转化 BL21(DE3) 后用最适 IPTG 浓度 (0.5 mmol/L) 诱导过夜 (约 16 h), SDS-PAGE 检测表达产物分子质量在 40~55 ku 之间, 与预期相符。表达蛋白纯化后进行 Western blot, 能被相应抗体识别。结论 成功克隆得到 AraC 转录因子基因, 构建的含 AraC 转录因子基因原核表达载体转化 DE3 后经 IPTG 诱导可表达出融合蛋白, 经 Ni²⁺ 柱纯化得到具有免疫反应原性的 AraC 转录因子蛋白, 为 AraC 转录因子的功能研究奠定了基础。

【关键词】 类鼻疽伯克霍尔德菌; AraC 转录因子; 原核表达

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0761-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul.;17(7):761-765.]

Prokaryotic expression and purification of AraC transcription factor from *Burkholderia pseudomallei*

ZENG Hui, HUANG Wei-chen, GAO Jie, JIANG Yu-ying, HU Qi, XIU Hao (School of Tropical Medicine, Haian Medical University, Haikou 571199, China)

【Abstract】 Objective Cloned a new AraC transcription factor from BPHB001 which was isolated from HaiNan. Constructed the prokaryotic expression plasmid of AraC transcription factor, expressed and purified the AraC transcription factor protein in prokaryotic expression system. Methods The AraC transcription factor gene was cloned and verified by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. The recombination vector pET28a(+) -AraC contain His-taq was constructed and verified by PCR and enzyme digestion (BamH I and Hind III). The recombination vector pET28a(+) -AraC was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The expression of fusion protein was induced with Optimum IPTG concentration and detected with SDS-PAGE and purified with Ni²⁺ chelate column. Then the purification products was identified by Western blot. Results A fragment was amplified using specific primer, the size of the fragment was bigger than 1 000 bp which was consistent with expectation (1 032 bp). The recombination vector pET28a(+) -AraC was verified by sequencing. The *E. coli* BL21(DE3) strain containing pET28a(+) -AraC vector was induced with IPTG (0.5 mmol/L) and cultured for overnight (almost 16 hours). The expression of fusion protein was detected by SDS-PAGE, and verified by western blot assay. Conclusion An AraC transcription factor gene was cloned and a recombination vector carrying AraC gene was successfully constructed. The target protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by IPTG inducing. The fusion AraC transcription factor protein with Immunoreactivity was purified by using Ni²⁺ chelate column. These results will lay the foundation for further function study on AraC transcription factor.

【Key words】 *Burkholderia pseudomallei*; AraC transcription factor; prokaryotic expression^{***}

* 【基金项目】 海南省自然科学基金项目(No. 819QN236); 海南医学院科研培育基金项目(No. HYPY201904); 海南医学院大学生创新创业训练计划项目(No. X202011810024)。

** 【通讯作者】 修皓, E-mail: hy0211064@hainmc.edu.cn

【作者简介】 曾慧(1998-), 女, 海南澄迈人, 本科在读。E-mail: 2638969068@qq.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, Bp)属兼性胞内菌,Bp 感染引发的人畜共患病称为类鼻疽。该病原菌热带及亚热带地区,广泛分布于东南亚、澳洲北部、等地区,主要存在于土壤中^[1-3]。非洲地区也有 Bp 感染的报道,但由于医疗等条件的限制,非洲地区报道的病例数较少^[4]。尽管类鼻疽尚未被世界卫生组织正式纳入被忽视的热带病行列,但类鼻疽所带来的疾病负担和病死率比其他被忽视的热带病还要高,特别是在中低收入国家^[5]。在我国,类鼻疽主要分布在地处热带的海南,亚热带的广东、广西及台湾等地。感染 Bp 患者无典型症状,其临床表现与多种疾病相似,如发烧,肺结核,局部脓肿等,极易导致误诊^[6-7]。Bp 具有对多种常用抗生素天然耐药的特性,由于广谱抗生素的不规范使用,Bp 对抗生素的耐药率也在不断上升^[8]。

AraC 家族转录调节蛋白是一类普遍存在的正向调控转录因子之一,其家族成员约有 100 个,每个成员含有 200~300 个氨基酸。该蛋白含有两个结构域:C 端的长度约为 99 个氨基酸的 AraC DNA 结合结构域及 N 端的可变结构域^[9]。AraC 家族转录调节蛋白根据其功能可分为三类:碳代谢相关、胁迫反应相关及致病性相关^[10-13]。其致病性在不同病原微生物中存在差异,主要表现在:影响细菌菌毛生长^[14];调节细菌毒力因子表达^[15];干扰细菌生物被膜形成等^[16-17]。

AraC 家族转录调节蛋白作用非常广泛,且在不同的致病菌中作用有所差异,前期研究在 BPHN001 发现了一个 AraC 家族转录调节蛋白,但 BPHN001 中该 AraC 家族转录调节蛋白的具体功能尚不清楚。本实验旨在克隆验证 Bp 的 AraC 转录因子基因,并原核表达纯化得到该蛋白,为其功能研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与质粒 BPHN001 为本室分离的海南株; PET-28a(+) 表达载体由本室保存; *E. coli* BL21 (DE3) 菌株购于碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要试剂 T4 DNA 连接酶购于美国 Thermo 公司;鼠源 His 一抗和山羊抗小鼠 IgG(H+L) 购于英国 Abcam 公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒,5×SDS-PAGE 上样缓冲液购于中国 Biosharp 公司;BCA 法蛋白定量测定试剂盒,His 标签蛋白纯化试剂盒及 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒均购于碧云天生物科技有限公司;质粒小题试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购于诺唯赞生物科技有限公司;Protein ladder 购于加拿大 Fermentas 公司。

2 方法

2.1 AraC 转录因子基因扩增

2.1.1 BPHN001 基因组 DNA 提取 BPHN001 用含 100 mg/L 的庆大霉素液体 LB 培养基于 37 °C、200 r/min 震荡培养过夜,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)操作说明书提取总 DNA。

2.1.2 特异性引物的设计、合成 根据 RNA 文库中筛选到的 AraC 转录因子基因序列设计带酶切位点的原核表达引物。上游引物 F: 5'-CGCGGATCCAT-GCCGGTAGCCAACGTG-3'(下划线部分为 BamH I 酶切位点); 下游引物 R: 5'-CCCAAGCTTTCA-ATCTCCAGCGAGCTT-3'(下划线部分为 Hind III 酶切位点)。引物由天一辉远生物科技有限公司合成。

2.1.3 目的基因扩增体系及程序 AraC 转录因子基因扩增体系为 25 μl:2×TaqMaster Mix 12.5 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, 基因组 DNA 1 μl, ddH₂O 9.5 μl。扩增程序:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物 4 °C 保存, 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.1.4 扩增产物纯化 根据大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP210)标准步骤胶回收 PCR 产物, 用 nanodrop 测定回收产物浓度。

2.2 原核表达质粒的构建、筛选及鉴定 将纯化的扩增产物及 PET-28a(+) 用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切。酶切体系: 目的基因/载体 1 μg, 10×Smart buffer 5 μl, BamH I 0.2 U, Hind III 0.2 U, 加 ddH₂O 补齐至 50 μl。反应体系置 37 °C 水浴酶切 1 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收并测定回收产物浓度。将酶切目的片段与酶切 PET-28a(+) 载体连接。连接体系: 线性化载体(PET-28a(+))100 ng, 目的基因与线性化载体摩尔比为 5:1, T4 DNA ligase buffer 2 μl, T4 DNA ligase 5U, ddH₂O 补齐至 20 μl。反应体系置 22 °C 连接 1 h 或 4 °C 连接过夜。连接产物转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 于固体 LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)37 °C 培养过夜, PCR 筛选阳性菌落, 经测序验证后提取质粒并保存。

2.3 目的蛋白表达的最佳诱导 IPTG 浓度优化 测序鉴定正确的重组质粒按标准步骤转化至大肠埃希菌表达菌株 BL21(DE3) 中, PCR 筛选阳性菌落。将含重组质粒的 BL21(DE3) 菌株接种至 5 ml 加有 100 mg/L 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 震荡培养过夜。按 1:100 的比例将重组菌株接种至 5 ml 含 100 mg/L 卡那霉素 100 mg/L 的液体 LB 培养基中, 共接种 168 管, 每 2 管为一组。菌液于 37 °C、200 r/min 震荡培养至 A₆₀₀ 值为 0.4~0.6 时, 取其中 4 组, 每组中取 1 管分别加入对应终浓度为 0.5、1.0, 1.5、2.0 mmol/L 的 IPTG, 另一管加入对

应体积的蒸馏水,于 16 ℃以 200 r/min 诱导 24 h,取 1 ml 离心后收集菌体,处理后进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色观察目的蛋白表达情况,确定 IPTG 最佳诱导浓度。

2.4 目的蛋白的纯化及 Western blot 鉴定 将鉴定正确的含重组质粒的 BL21(DE3) 菌株接种至 5 ml 加有含 100 mg/L 卡那霉素 100 mg/L Kan+ 抗生素的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 震荡培养过夜。按 1 : 100 的比例将重组菌株接种至 1 L 含 100 mg/L 卡那霉素 100 mg/L 的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 震荡培养, 待菌液 A_{600} 值为 0.4~0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/ 的 IPTG, 于 16 °C、200 r/min 震荡培养诱导过夜(16 h 左右)。将诱导表达后的大肠埃希菌培养液以 6 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 称重, 以重悬缓冲液 : 菌重 = 10 mL : 1 g 的比例重悬在含有 100 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 300 mmol NaCl, 2 mmol DTT, 10 mmol 咪唑的重悬缓冲液中。菌体经高压(800bar) (超声)破碎后 11 000 r/min 离心 35 min, 取上清, 选用镍柱(1~2 ml)进行蛋白纯化。镍柱使用前用 50 倍柱体积含有 100 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 300 mmol/L NaCl、10 mmol 咪唑的平衡缓冲液进行平衡, 加入重组菌超声破碎上清液后依次用 20 倍柱体积含 0、50、150、300 mmol/L 咪唑的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液进行 SDS-PAGE 检测。最终确定用含 300 mmol/L 咪唑的洗脱液对 AraC 目的蛋白进行洗脱。将含有 AraC 目的蛋白的洗脱液再经凝胶层析作进一步纯化(凝胶层析柱型号: Superdex™ 200 Increase 10/300 GL。凝胶层析缓冲液: 25 mmol/L HEPES, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 质量分数 5% 的甘油)。收集出峰体积的液体, 得到目的蛋白并进行 Western blot 鉴定。

结 果

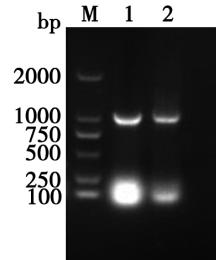
1 AraC 转录因子基因的扩增及鉴定

以BPHN001基因组为模板,以设计的特异性引物F、R扩增AraC转录因子基因,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,大小约为1 000 bp,与理论值1 032 bp基本一致(图1)。

2 PET-28a(+)重组质粒构建及测序鉴定

特异性扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 回收产物与 PET-28a(+) 质粒分别用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 并分别进行琼脂糖凝胶回收, 将目的片段与载体用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α , 经卡那霉素筛选后采用 PCR 对重组菌株进行鉴定(图 2)。阳性菌落提取重组质粒, 交由天一辉远生物科技有限公司测序, 采用 DNAMAN 对

序列进行比对,结果显示重组质粒序列与目标序列完全一致(图3)。

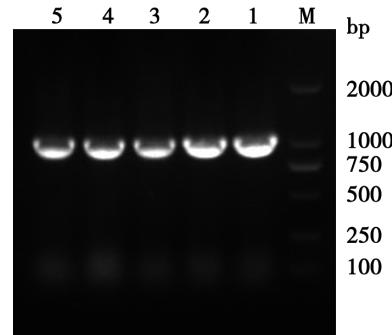


M DNA 标志物(DL 2000) 1、2 AraC 转录因子基因 PCR 产物

图 1 AraC 转录因子基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker 2000 1,2 the amplification products

Fig. 1 The amplification result of AraC transcription factor gene by PCR



M DNA 标志物(DL 2000) 1~4 重组菌单菌落 PCR 产物

图 2 重组子菌落 PCR 鉴定

M DNA marker 2000 1-4 Single colony

Fig. 2 Verify the recombination vector by colony PCR

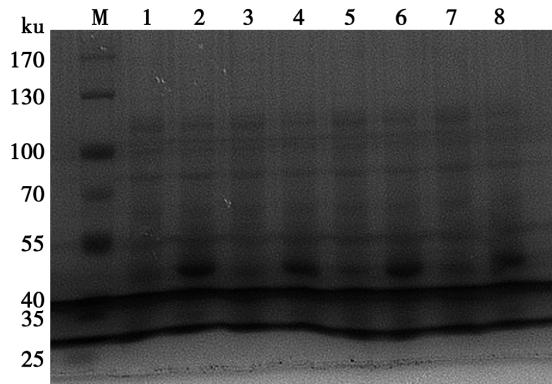
图 3 AraC 转录因子基因扩增产物序列与 RNA 文库中的序列 Blast 比对

Fig. 3 Sequence blast between PCR amplify products and original sequences

3 重组菌蛋白表达 IPTG 最佳诱导浓度

将测序验证正确的 PET-28a(+) 重组质粒转化至 BL21(DE3) 表达菌株, 经抗生素和 PCR 筛选出阳性菌落。挑取 1 个阳性菌落进行活化并接种转接 8 管,

随机分为4组,每组随机取1管分别加入终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L的IPTG。余下4管分别加入对应体积ddH₂O作为对照。重组菌于16℃、200 r/min诱导4 h,诱导产物进行SDS-PAGE电泳分析,结果显示融合蛋白相对分子质量在40~55 ku之间(目的蛋白大小约为43 ku),与预期相符。且重组菌诱导后的蛋白表达量明显高于未诱导重组菌,但不同浓度IPTG诱导表达的蛋白量无明显差别,故选择IPTG终浓度为0.5 mmol/L(图4)。



M 蛋白分子质量标准 1、3、5、7 未诱导对照 2、4、6、8 分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L IPTG诱导4 h

图4 不同浓度IPTG诱导AraC转录因子蛋白原核表达情况

M Protein marker 1,3,5,7 Control 2,4,6,8 Induce with different concentration of IPTG(0.5,1.0,1.5,2.0 mmol/L)

Fig. 4 The prokaryotic expression of AraC transcription factor induced with different concentration of IPTG

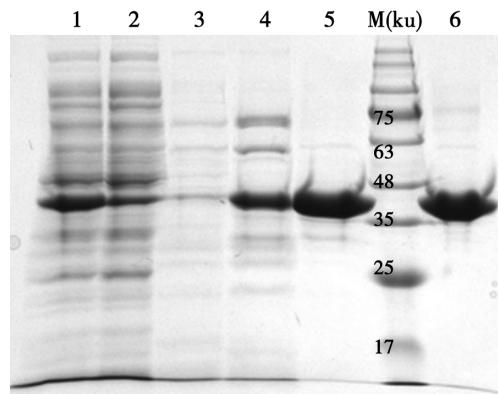
4 融合蛋白的纯化及Western blot检测

目的蛋白经Ni²⁺柱纯化,收集含不同浓度咪唑的洗脱液进行SDS-PAGE,确定最佳咪唑洗脱浓度(图5),结果显示300 mmol/L咪唑为最佳洗脱浓度。Ni²⁺柱纯化的目的蛋白经凝胶层析进行进一步纯化,纯化后的蛋白采用SDS-PAGE检测蛋白纯度(图6),结果显示经凝胶层析后目的蛋白条带单一,纯化效果好。采用鼠源His一抗,山羊抗鼠二抗,对经凝胶层析纯化得到的AraC转录因子蛋白进行Western blot检测,在35~48 ku之间有一特性反应条带(图7),证明纯化蛋白具有免疫反应性。

讨 论

转录因子是一类可调控DNA表达的蛋白质,通过与基因启动子区域的特异性序列结合上调或下调基因的表达^[18]。AraC家族转录调节蛋白是一类普遍存在的正向调控转录因子之一,其功能在不同微生物中存在差异。目前对AraC家族蛋白的研究主要集中在其致病性方面,如影响菌毛生长、调节毒力因子等,研究的对象也主要集中在一些常见致病菌中,如霍乱弧菌、化脓链球菌、肠球菌及金黄色葡萄球菌等^[19],但针

对类鼻疽伯克霍尔德菌中AraC转录因子的研究鲜有报道。海南地处热带,拥有其独特的地理环境,是热带病高发地区,是类鼻疽伯克霍尔德菌的主要疫源地之一,类鼻疽发病率居全国首位。



M 蛋白分子质量标准 1 IPTG诱导重组菌裂解上清 2 IPTG诱导重组菌裂解流穿液 3,4,5,6 分别为0,50,150,300 mmol/L咪唑洗脱液

图5 SDS-PAGE检测不同浓度咪唑液洗脱效果

M Protein marker 1 Lysis supernatant 2 Lysis supernatant after flow past Ni²⁺ chelate column 3,4,5,6 Elution products with different concentration of imidazole

Fig. 5 SDS-PAGE assay to detect the elution effect

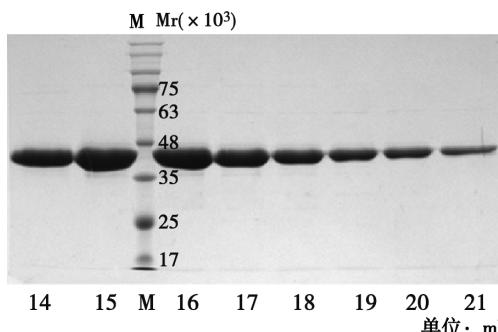


图6 纯化重组蛋白的SDS-PAGE检测

Fig. 6 The proteins corresponding to different peak volumes were detected after purification by SDS-PAGE



M 蛋白分子质量标准; 1,2 纯化的重组蛋白

图7 纯化重组蛋白的Western blot检测

M Protein marker; 1,2 The purified Recombinant protein

Fig. 7 The purified recombinant protein were detected by Western blot

本研究从海南株类鼻疽伯克霍尔德菌 BPHN001 中新克隆得到一个 AraC 转录因子基因，并选用含有强启动子的 PET-28a(+) 质粒对该 AraC 转录因子蛋白进行原核表达。该质粒可在表达的蛋白 N 端加入 6 个组氨酸重复标签，以用于蛋白的纯化。实验中观察了 IPTG 浓度对蛋白的诱导情况，结果显示 0.5~2.0 mmol/L 的 IPTG 对蛋白的诱导表达并无显著差异，故选择 IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L。同时对诱导温度进行了优化，结果显示 16 °C 和 37 °C 诱导效果并无差别，16 °C 低温诱导有利于蛋白活性的保持，因此确定 16 °C 为最佳诱导温度。为了得到高纯度的目的蛋白，对镍柱纯化的蛋白采用凝胶层析法进行了进一步的纯化，最终得到了高纯度的目的蛋白。

本实验克隆表达得到的 AraC 转录因子蛋白来源于海南株类鼻疽伯克霍尔德菌,可为开展 AraC 转录因子在调节鼻疽伯克霍尔德菌毒力等致病性方面的研究奠定基础。

【参考文献】

- [1] Limmathurotsakul D, Golding N, Dance DA, et al. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis[J]. Nat Microbiol, 2016, 1(1):15008.

[2] Anandraj VK, Priyadarshini A, Sunil SS, et al. *Burkholderia pseudomallei* infection in a healthy adult from a rural area of South India[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2012, 55(4):578-579.

[3] Banerjee R, Roy A, Ahmad F, et al. Evolutionary patterning of hemagglutinin genes sequence of 2009 H1N1 pandemic[J]. J Biol Mol Struct Dyn, 2012, 29 (4):733-742

[4] Birnie E, James A, Peters F, et al. Melioidosis in Africa: Time to raise awareness and build capacity for its detection, diagnosis, and treatment[J]. Am J Trop Med Hyg, 2022, 106(2):394-397.

[5] Savelkoel J, Dance DAB, Currie BJ, et al. A call to action: time to recognise melioidosis as a neglected tropical disease[J]. Lancet Infect Dis, 2021; S1473-3099(21)00394-7.

[6] Hautbergue GM, Wilson SA. BLF1, the first *Burkholderia pseudomallei* toxin, connects inhibition of host protein synthesis with melioidosis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(4):842-845.

[7] Jacob D, Sauer U, Housley R, et al. Rapid and high-throughput audience genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107 (7): 2860-2865.

[15] Nakata M, Podbielski A, Kreikemeyer B. MsmR, a specific positive regulator of the *Streptococcus pyogenes* FCT pathogenicity region and cytolysis-mediated translocation system genes[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(3):786-803.

[16] Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection[J]. J Infect Dis, 2011, 204(6):937-941.

[17] Lei MG, Cue D, Roux CM, et al. Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing fnbA in *Staphylococcus aureus* MW2[J]. J Bacteriol, 2011, 193(19):5231-5241.

[18] Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Transcription factor drug targets[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(12):2693-2696.

[19] Withey JH, DiRita VJ. Activation of both acfA and acfD transcription by *Vibrio cholerae* ToxT requires binding to two centrally located DNA sites in an inverted repeat conformation[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4):1062-1077.

(上接 760 页)

- [6] Grenier K, Kao J, Diamandis P. Three-dimensional modeling of human neurodegeneration: brain organoids coming of age[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(2):254-274.
 - [7] Yew SM, Chan CL, Lee KW, et al. A five-year survey of dematiaceous fungi in a tropical hospital reveals potential opportunistic species[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e104352.
 - [8] Lin M, Gao M, Cavnar MJ, et al. Utilizing gastric cancer organoids to assess tumor biology and personalize medicine[J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(7):509-517.
 - [9] Seidlitz T, Koo B K, Stange DE. Gastric organoids—an *in vitro* model system for the study of gastric development and road to personalized medicine[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(1):68-83.
 - [10] Seidlitz T, Merker S R, Rothe A, et al. Human gastric cancer

detection of highlypathogenic bacteria by Ibis PLEX-ID technology[J]. PLo S One,2012,7(6):e39928.

- [8] Mc Kenney ES, Sargent M, Khan H, et al. Lipophilic prodrugs of FR900098 are antimicrobial against *Francisella novicida* in vivo and in vitro and show Glp T independent efficacy[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e38167.
 - [9] Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, et al. Melioidosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 1(4):17107.
 - [10] Yang J, Tauschek M, Robins-Browne RM. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals[J]. Cellpress, 2011, 19(3):128-135.
 - [11] Sahebi M, Tarighi S, Taheri P. The AraC-like transcriptional regulator YqhC is involved in pathogenicity of *Erwinia amylovora* [J]. J Appl Microbiol, 2022, 132(2):1319-1329.
 - [12] Marghani D, Ma Z, Centone AJ, et al. An AraC/XylS family transcriptional regulator modulates the oxidative stress response of *Francisella tularensis* [J]. J Bacteriol, 2021, 203 (23): e0018521.
 - [13] Lim BS, Chong CE, Zamrod Z, et al. Genome-wide prediction and annotation of *Burkholderia pseudomallei* AraC/XylS family transcription regulator[J]. In Silico Biol, 2007, 7(4-5):389-397.
 - [14] Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, et al. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107 (7): 2860-2865.
 - [15] Nakata M, Podbielski A, Kreikemeyer B. MsmR, a specific positive regulator of the *Streptococcus pyogenes* FCT pathogenicity region and cytolysis-mediated translocation system genes [J]. Mol Microbiol, 2005, 57(3):786-803.
 - [16] Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection[J]. J Infect Dis, 2011, 204(6):937-941.
 - [17] Lei MG, Cue D, Roux CM, et al. Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing fnbA in *Staphylococcus aureus* MW2[J]. J Bacteriol, 2011, 193(19):5231-5241.
 - [18] Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Transcription factor drug targets[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(12):2693-2696.
 - [19] Withey JH, DiRita VJ. Activation of both acfA and acfD transcription by *Vibrio cholerae* ToxT requires binding to two centrally located DNA sites in an inverted repeat conformation[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4):1062-1077.

【收稿日期】 2022-02-22 【修回日期】 2022-05-09

modelling using organoids[J]. Gut,2019,68(2):207-217.

- [11] Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. Cell, 2018, 173(2): 515-528.
 - [12] Nam SY, Lee SJ, Lim HJ, et al. Clinical risk factors and pattern of initial fungal contamination in endoscopic biopsy-derived gastrointestinal cancer organoid culture[J]. Korean J Intern Med, 2021, 36(4): 878-887.
 - [13] Najafzadeh MJ, Sutton DA, Keisari MS, et al. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5629-5631.

【收稿日期】 2022-02-19 【修回日期】 2022-05-06