

DOI:10.13350/j.cjpb.220405

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌未知功能蛋白 STM14-0100 晶体培养与酶活测定^{*}

李慧, 李冰清^{***}, 宋楠楠^{**}

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系, 山东济南 250062)

【摘要】 目的 克隆表达 STM14-0100 蛋白, 纯化后培养蛋白晶体并测试蛋白酶活, 为 STM14-0100 蛋白的结构与功能研究提供基础。方法 采用生物信息学方法预测 STM14-0100 蛋白基本性质。构建 STM14-0100-pGLO1 重组质粒并诱导蛋白表达, 层析纯化得到目的蛋白。通过晶体普筛找到适合蛋白晶体生长的条件并进行优化。收集单晶良好的晶体进行 X-射线衍射, 数据采集用 HKL2000 软件处理。分别检测 STM14-0100 与突变体蛋白的酶活, 然后加入梯度浓度的 DTT 和 H₂O₂ 以观察氧化还原状态对蛋白酶活性的影响。结果 预测 STM14-0100 蛋白第 109 和第 165 位氨基酸可能为活性中心内的关键位点。将重组表达质粒化到感受态细胞中, 诱导表达蛋白, 纯化后浓度为 20 mg/mL。在含有 0.04 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH7.0, 50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pencanediol 条件下, 蛋白结晶晶型良好。经过 X-射线衍射检测, 得到一套分辨率为 3.3 Å, 完整性为 94% 的数据。STM14-0100 蛋白有较强的硫酸酯酶活性, 加入 H₂O₂ 后其硫酸酯酶活性显著降低, 而突变体蛋白 STM14-0100-C109A 则失去这两种酶的活性, 突变体蛋白 STM14-0100-H165A 尚保留一定的酸性磷酸酯酶活性。结论 STM14-0100 蛋白可在原核表达体系中稳定表达, 并培养出晶体。该蛋白具有硫酸酯酶活性, 在氧化状态下酶活降低。突变第 109 位的半胱氨酸对酶的活性影响较大, 推测该位点为位于酶活中心的关键氨基酸。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌; STM14-0100 蛋白; 蛋白纯化; 晶体培养; 酶活测定

【中图分类号】 R378.23

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)04-0400-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Apr;17(4):400-405.]

Crystallization and enzyme activity determination of unknown functional protein STM14-0100 from *Salmonella typhimurium* enzyme activity determination

LI Hui, LI Bing-qing, SONG Nan-nan (Department of Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)^{***}

【Abstract】 **Objective** STM14-0100 protein was cloned, expressed and purified. Then the protein crystal was cultured and the protease activity was tested, which provided a basis for the further study of the structure and function of STM14-0100 protein. **Methods** Firstly, the basic properties of the protein were predicted by bioinformatics method, and then the recombinant plasmid STM14-0100-pGLO1 was constructed and induced to express the protein. The target protein was purified by chromatography. Through crystal screening, the conditions suitable for protein crystal growth were found, and the crystal culture conditions were further optimized. The crystals with good single crystal were collected for X-ray diffraction, and the data were processed with HKL2000 software. The enzymatic activity of STM14-0100 and mutant proteins was measured separately, followed by the addition of graded concentrations of DTT and H₂O₂ to observe the effect of redox status on protease activity. **Results** Structural analysis predicted that positions 109 and 165 may be the key sites in the active center. The recombinant expression plasmid was transformed into competent cells. The protein was induced and purified at a concentration of 20mg/mL. Protein crystallization was regular with 0.04 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH7.0, 50% V/V (+/-)-2-methyl-2,4-pencanediol. Through X-ray diffraction detection, a set of data with resolution of 3.3 Å and integrity of 94% was obtained. In terms of enzyme activity, STM14-0100 protein has strong sulfatase activity, but its sulfatase activity decreases significantly after adding H₂O₂. Mutant protein STM140100-C109A loses these two enzyme activities, and mutant protein STM14-0100-H165A still retains certain acid phosphatase activity.

Conclusion STM14-0100 protein can be stably expressed in prokaryotic expression system, and crystals can be success-

* 【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(No. 32170034); 国家自然科学基金青年基金项目(No. 32000095); 山东省重点研发计划项目(No. 2019GSF107026, 2019GSF107055)。

** 【通讯作者】 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 宋楠楠, E-mail: songnn05@sina.com

【作者简介】 李慧(1996-), 女, 山东潍坊人, 硕士, 主要研究方向为微生物致病蛋白的结构和功能。E-mail: lihui960202@163.com

fully cultured. The protein has obvious sulfatase activity, and the enzyme activity decreases significantly in the oxidation state. The mutation of cysteine at position 109 has a great impact on the enzyme activity, inferred that this site is the key amino acid located in the enzyme activity center.

【Key words】 *Salmonella typhimurium*; STM14-0100; Protein purification; crystal culture; enzyme activity determination

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, STM)属沙门氏菌B群,为人畜共患病原菌,主要经口传播。鼠伤寒沙门菌在自然界中分布广泛,是食源性疾病的主要致病菌^[1],可通过污染食物或水造成感染性疾病爆发^[2]。为深入了解鼠伤寒沙门菌的致病机制,作者前期将细菌入侵巨噬细胞之后进行了转录组学测序分析,发现细菌中许多蛋白编码基因在转录水平发生了明显的变化,其中STM14-0100(STM0084)蛋白的基因转录水平上调约26.5倍。

STM14-0100蛋白是一种假定的硫酸酯酶,属于ALP-Like超家族,功能结构未知。该蛋白编码基因高度保守。硫酸酯酶和硫酸酯酶修饰基因在鼠伤寒沙门菌基因组中广泛存在,这些酶的活性位点上存在特征序列-(C/S)XPXR^{-[3]},在进行翻译后修饰时需要将硫酸酯酶活性部位的半胱氨酸或丝氨酸氧化为Cα-甲酰甘氨酸(FGly)残基。根据修饰的氨基酸残基,这些酶被分类为Cys型或Ser型硫酸酯酶,STM14-0100属于Cys型硫酸酯酶。大多数细菌中的硫酸酯酶受硫的含量调节^[4],当细菌在有机硫源中生长时这些酶被释放,而在无机硫酸盐中生长时这些酶被抑制。酪胺、多巴胺^[5]和肾上腺素等单胺化合物对硫酸酯酶也具有调节作用^[6]。调节蛋白MoaR^[7]可以协同单胺调节子调节硫酸酯酶的活性。但有研究表明,STM14-0100蛋白的表达与酶的活性可能受酸信号的诱导,在pH5.5时硫酸酯酶的活性较强^[8]。细菌在肠道中生存需要各种营养物质的支持^[9],肠粘蛋白是碳水化合物的重要来源^[10],硫酸酯酶可促进肠道一些高度硫酸化的粘蛋白脱硫,从而更充分地被糖苷酶降解,为细菌的生存提供营养^[11]。硫酸酯酶还参与许多生物过程,如硫的同化、激素调节、细胞信号传导、细胞降解和细菌致病机制等^[12]。为了深入解STM14-0100蛋白的功能,本研究拟培养蛋白晶体,为解析结构奠定基础;通过验证其酶活,以有助于筛选其作用底物及其发挥作用的通路。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞及载体 大肠埃希菌BL21感受态细胞和由pET15b载体改造而来的pGl01载体(氨苄抗性,N端His标签加PPase酶切位点)均为本实验室制作及保存。

1.2 仪器与试剂 梯度PCR仪购自新加坡ABI公司;AKTA蛋白纯化仪购自美国GE公司;全波长酶标仪购自上海美谷分子仪器公司。限制性核酸内切酶BamHI和XhoI,T4DNA连接酶,dNTP,DNA聚合酶均购自美国Thermo公司;L-硒代甲硫氨酸购自美国anatrace公司;磷酸酯酶试剂盒购自上海碧云天公司;硫酸酯酶试剂盒购自英国abcam公司。

2 方法

2.1 生物信息学预测分析 从Uniprot数据库中获得STM14-0100蛋白氨基酸序列及功能信息,在NCBI数据库中查找其同源结构蛋白,用Protean软件预测蛋白的基本性质。

2.2 STM14-0100蛋白基因的克隆与表达载体的构建 设计STM14-0100蛋白基因核酸序列引物。上游引物:5'-ATAGGATCCATGAGTAATAAAAAAAAATCTGTCCGCAGAAGAGACGG-3'(下划线为BamH I酶切位点);下游引物:5'-ATACTCGAGTTAACATTGCTC-3'(下划线为Xho I酶切位点)。以鼠伤寒沙门菌ATCC14028菌株核酸为模板,用上述引物进行PCR扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。使用BamH I和Xho I限制性内切酶将PCR回收产物与pGl01载体进行双酶切,酶切目的片段经T4连接酶连接,连接产物转入到大肠埃希菌BL21感受态细胞中,恢复培养后涂布在氨苄抗性固体培养基上。挑取数个单菌落转接,培养至A₆₀₀值为0.5时分别吸出部分菌液保种,其余菌液加入IPTG,37℃诱导1.5 h,SDS-PAGE凝胶电泳分析阳性单克隆。相应细菌培养后提取质粒,测序正确的为阳性重组质粒。采用两步PCR方法分别将第109位半胱氨酸和第165位组氨酸突变为丙氨酸,得到重组质粒并转入到大肠埃希菌BL21感受态细胞中。突变体蛋白表达纯化与STM14-0100蛋白一致。

2.3 目的蛋白的诱导表达与纯化 将含有正确重组质粒的大肠埃希菌转接到氨苄抗性的LB培养基中,培养至A值约为0.6,降低温度至16℃,1 h后加入诱导剂IPTG诱导培养过夜。4 000 r/min离心收集菌液,超声破碎后收集上清,采用镍离子亲和层析柱纯化,蛋白吸附后加入PPase过夜酶切,然后洗脱蛋白,使用AKTA蛋白纯化仪、阴离子交换柱(Q柱)和凝胶层析柱(分子筛)依次层析纯化。依据目的蛋白洗脱峰

位置,收集其对应的蛋白分装管进行 SDS-PAGE 电泳,分析蛋白纯度,收集纯度和浓度较高的蛋白。

2.4 蛋白质晶体培养与条件优化 用 768 种晶体生长试剂条件对 STM14-0100 蛋白进行普筛,48 孔板的每个中间孔需加入 105 μ L 的晶体生长池液,然后在两边圆孔内各加入 1.05 μ L 的蛋白与池液,18 ℃ 静置培养。两周左右查看蛋白结晶情况,记录结晶较好的试剂条件并进行优化,以便得到单晶性好,内部无断裂,个体较大的晶体,经 X-射线衍射得到更好的数据。本实验晶体优化首先采用平衡透析法进行优化,将缓冲液 pH 值分梯度设置,间隔 0.2,原沉淀剂设置梯度浓度,间隔 3%,分别取 2 μ L 蛋白与混合好的池液点于玻璃片上,混匀,然后盖在池液上方,18 ℃ 静置结晶。粗拉 pH 值与沉淀剂浓度后,再用同样的方法减小间隔进行细拉缓冲液 pH 值与沉淀剂浓度。

2.5 STM14-0100 蛋白结构晶体衍射数据收集 在显微镜下用 loop 环捞取单晶状态的晶体,迅速冻于液氮中,随后进行 X-射线衍射。首先确定晶体照射部位。选一个角度进行 text,调整探测器与晶体的距离,根据衍射点疏密排列情况,确定曝光间隔时间,然后根据设定的角度、时间和距离进行照射。收集到的数据用 HKL2000 进行处理,最终得到一套由独立衍射点构成的完整数据。

2.6 STM14-0100 蛋白酶活测定 根据生物信息学预测 STM14-0100 为假定的硫酸酯酶,其家族蛋白功能可能有磷酸酯酶活性,所以采用磷酸酯酶试剂盒与硫酸酯酶试剂盒来检测 STM14-0100 蛋白与突变体蛋白的酶活。首先需要根据标准曲线找到蛋白与试剂反应的适合浓度,将标准品稀释到终浓度为 0.5 mmol/L,取 6 个梯度浓度标准品,将蛋白按梯度稀释,加入显色底物,37 ℃ 静置反应 30 min,加入反应终止液,利用酶标仪检测其 A_{405} 值。STM14-0100 蛋白分解底物越多,得到的产物也越多,其检测的 A 值也相对较高,所以反应后检测到的 A 值可在酶浓度和底物浓度确定的情况下反映酶活性的强弱,酶活性强,A 值则高,反之则低。根据标准品孔确定检测范围,超出或低于标准品检测范围的样品意味着检测值可能不准确,所以根据检测范围确定蛋白稀释的合适浓度。硫酸酯酶试剂盒成分及原理与磷酸酯酶试剂盒相同,同样需要确定标准曲线,蛋白适合的反应浓度,然后设置实验,反应完毕后测 A_{515} 值。再分别加入梯度浓度的 DTT 和 H₂O₂,观察蛋白的酶活性是否因氧化还原状态不同发生变化。

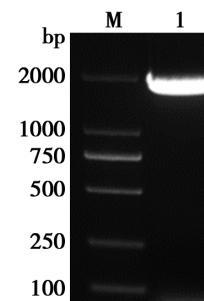
结 果

1 STM14-0100 生物信息学预测分析

STM14-0100 氨基酸序列全长 629 个,等电点为 5.84,预测可溶性好,结构同源性 25%。数据库内信息显示第 109 位的半胱氨酸和第 165 位的组氨酸可能位于蛋白酶活性中心。

2 目的基因克隆与表达

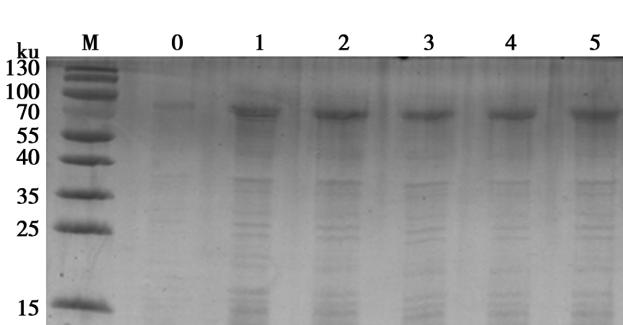
STM14-0100 蛋白基因 PCR 扩增产物大小约为 1 900 bp(图 1),与预期一致。挑取单克隆菌株,加入 IPTG 诱导蛋白表达,表达产物进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 2。STM14-0100 相对分子质量单位约为 69 ku,与预期相符。选取 2 号测序,结果正确。



M DNA 标志物(DL-2000) 1 目的基因 PCR 产物

图 1 目的基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNAmarker(DL-2000) 1 Target gene PCR product



M 蛋白分子质量标准 0 阴性对照 1~5 重组克隆菌株

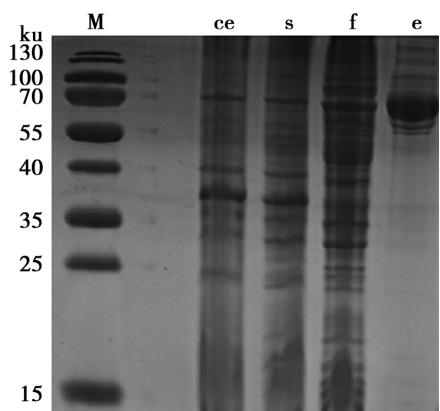
图 2 阳性克隆菌株表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker 0 Negative control 1~5 Five recombinant

Fig. 2 The result of protein expression-test of recombinants

3 表达蛋白 STM14-0100 蛋白的纯化

表达产物经镍柱层析纯化后进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 3),STM14-0100 蛋白表达量大,可溶性好。Q 柱层析纯化,蛋白洗脱峰位置如图 4。收集第 10-15 管蛋白进行取样,进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 5。收集第 11-14 管蛋白溶液离心浓缩。凝胶层析纯化的蛋白洗脱峰位置如图 6。收集第 22-34 管蛋白并取样,经 SDS-PAGE 电泳分析(图 7)后将蛋白纯度较高的第 21-33 管蛋白集中混匀,测量其浓度为 20 mg/mL。



M 蛋白分子质量标准 ce IPTG 诱导重组菌超声破碎全部蛋白
 s IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 f IPTG 诱导重组菌超声破碎上清镍离子亲和层析柱流穿液 e PPase 酶切洗脱液

图 3 镍柱层析纯化 STM14-0100 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker ce Recombinant bacteria total protein s After centrifugal supernatant f Flow through e Total elution

Fig. 3 SDS-PAGE result of STM14-0100 protein purification via Ni-NTA

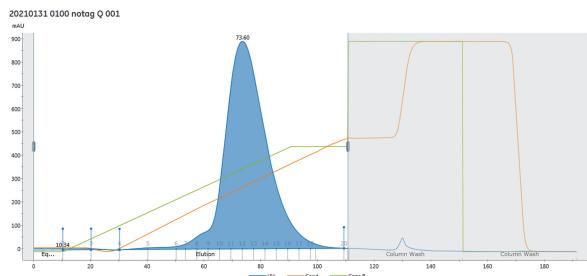
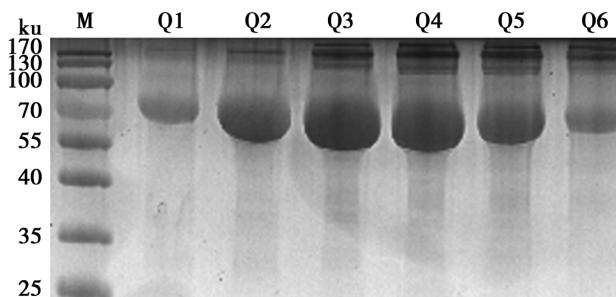


图 4 阴离子交换柱层析纯化 STM14-0100 蛋白洗脱液峰值图
 Fig. 4 The purification result of STM14-0100 protein by Q column



M 蛋白分子质量标准 Q1-Q6 Q 柱 10—11 管洗脱液
 图 5 阴离子交换柱层析纯化 STM14-0100 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker Q1-Q6 Protein eluent from 10—11 tubes of Q column

Fig. 5 SDS-PAGE result of STM14-0100 protein purification by Q column

4 STM14-0100 蛋白晶体培养与优化

将蛋白稀释到 8 mg/mL 进行普筛，在含有 0.04 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH7.0, 50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pencanediol 条件下晶体核相对较少但较大，经过多次优化后，在 0.04 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH6.7, 51.5% v/v (+/-)-2-

Methyl-2,4-pencanediol 条件下得到的结晶状态良好(图 8)。

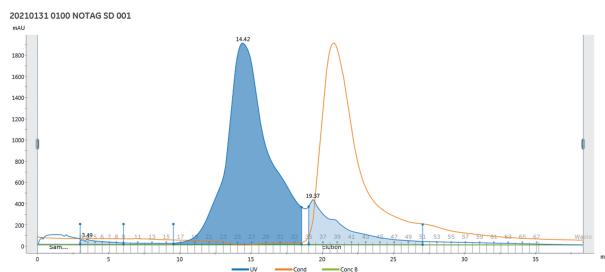
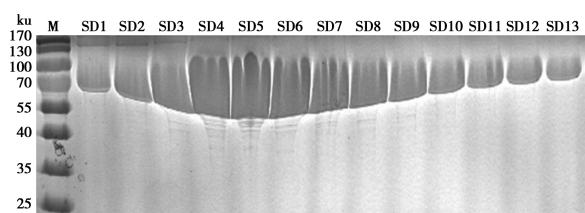


图 6 凝胶层析纯化 STM14-0100 蛋白洗脱液峰值图

Fig. 6 The purification result of STM14-0100 protein by gel chromatography



M 蛋白分子质量标准 SD1-SD13 分子筛 21-33 管洗脱液
 图 7 凝胶层析纯化 STM14-0100 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker SD1-SD13 Protein eluent from 21-33 tubes of molecular sieve

Fig. 7 SDS-PAGE result of STM14-0100 protein purification by gel chromatography

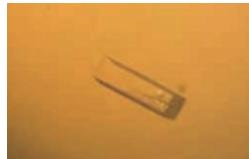


图 8 STM14-0100 蛋白晶体
 Fig. 8 Crystals STM14-0100

5 晶体衍射及数据收集

选择曝光时间为 0.5 s, 以 1°为单位照射晶体 360°, 收集到一套分辨率为 3.3 Å 的数据, 属 C2 空间群, 数据完整度为 94%。

6 STM14-0100 蛋白酶活性

将提取的 3 种蛋白分别稀释到 0.5 mg/ml, 检测到 STM14-0100 有较强的硫酸酯酶活性和较弱的酸性磷酸酯酶活性, 几乎没有碱性硫酸酯酶活性; STM14-0100-C109A 蛋白失去酶活性, STM14-0100-H165A 有较弱的酸性磷酸酶活性(图 9)。加入梯度浓度 DTT 对蛋白的酸性磷酸酯酶和硫酸酯酶的活性影响不大, 加入 H₂O₂ 后 STM14-0100 蛋白硫酸酯酶活性降低程度与加入的 H₂O₂ 浓度呈正相关, 而 H₂O₂ 对其酸性磷酸酯酶的活性无显著影响(图 10-11)。

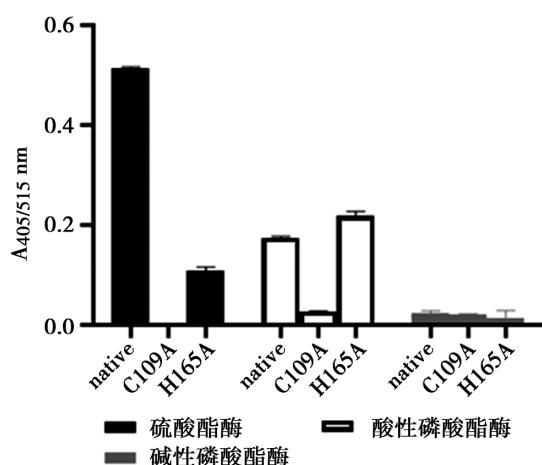


图 9 STM14-0100 蛋白与两种突变体蛋白酶活性比较
Fig. 9 The result of three kinds protein enzyme activity

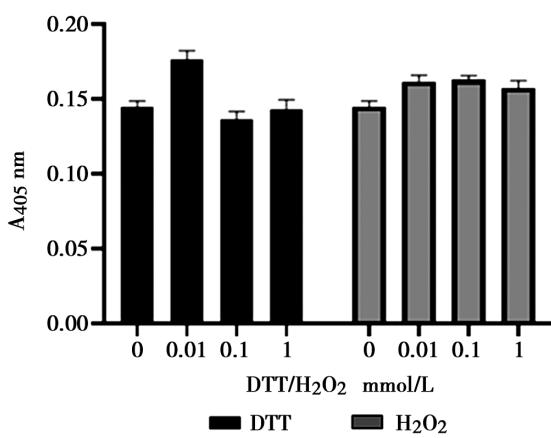


图 10 梯度浓度的 DTT 和 H₂O₂ 对 STM14-0100 蛋白酸性磷酸酯酶活性的影响
Fig. 10 The changes of phosphatase activity of STM14-0100 protein after adding gradient concentration DTT and H₂O₂

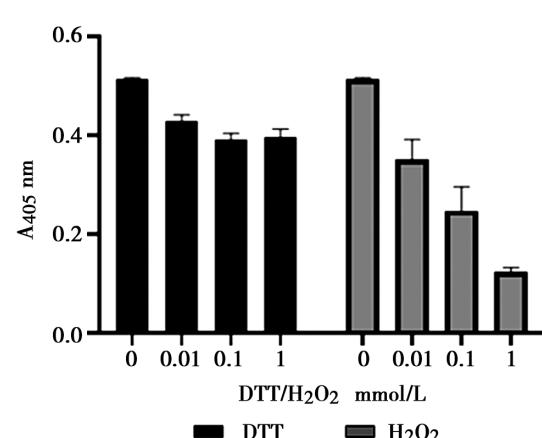


图 11 梯度浓度的 DTT 和 H₂O₂ 对 STM14-0100 蛋白硫酸酯酶活性的影响
Fig. 11 The changes of sulfatase activity of STM14-0100 protein after adding gradient concentration DTT and H₂O₂

讨 论

沙门菌感染宿主并在宿主细胞内生存繁殖的过程

十分复杂,由多个系统、多种因子协同完成。鼠伤寒沙门菌经口进入人或动物体内,在经过胃时大部分被胃酸和一些消化酶杀死^[13],部分侵入到宿主小肠上皮细胞从而被巨噬细胞吞噬^[14]。为了防止被巨噬细胞中的溶酶体融合后杀死,鼠伤寒沙门菌可在巨噬细胞内形成沙门菌囊泡(SCV)^[15],沙门菌囊泡为鼠伤寒沙门菌逃避机体的免疫防御反应提供了相对安全的生存环境^[16],造成宿主感染加重^[17]。沙门菌还容易产生耐药性,为临床预防和治疗增加了困难。

本研究通过分子克隆得到重组质粒并转化到大肠埃希菌 BL21 感受态菌株中,经过培养得到可大量表达目的蛋白的大肠埃希菌菌种。在 LB 培养基中大量培养细菌并低温诱导蛋白表达,经过镍离子亲和层析,阴离子交换层析柱和凝胶层析柱纯化得到纯度较高、浓度为 20 mg/mL 的蛋白,将蛋白稀释后进行蛋白晶体培养,最终得到结晶状态较优质的蛋白晶体,经 X-射线照射成功收集到完整性较好的数据。但由于 STM14-0100 蛋白无同源结构(同源性<30%),无法通过分子置换的方法解析结构,所以可尝试提取纯化 STM14-0100 硒代蛋白,将目的蛋白中的甲硫氨酸替换为硒代甲硫氨酸,以此来确定蛋白中其他氨基酸位置,进一步解析蛋白结构。本研究通过检测确定 STM14-0100 蛋白具有一定的硫酸酯酶活性和相对较弱的酸性磷酸酯酶活性,这对研究其功能具有一定的提示。

本实验成功克隆表达了 STM14-0100 蛋白,收集到蛋白质晶体结构数据,并证明该蛋白具有硫酸酯酶和酸性磷酸酯酶活性。关于蛋白结构解析、作用底物筛选以及该蛋白在鼠伤寒沙门菌中的具体功能尚待深入研究。

【参考文献】

- [1] Malaeb M, Bizri AR, Ghosn N, et al. *Salmonella* burden in Lebanon[J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(8): 1761-1769.
- [2] Majowicz SE, Jennie M, Elaine S, et al. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 882.
- [3] Dierks T, Schmidt B, Figura KV. Conversion of cysteine to formylglycine: A protein modification in the endoplasmic reticulum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(22): 11963-11968.
- [4] Kertesz MA, Leisinger T, Cook AM. Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 1993, 175(4): 1187-1190.
- [5] Das S, Sreevidya VS, Udvadia AJ, et al. Dopamine-induced sulfatase and its regulator are required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenesis [J]. Microbiology (Reading, England), 2019, 165(3): 302-310.
- [6] Murooka Y, Harada T. Regulation of derepressed synthesis of arylsulfatase by tyramine oxidase in *Salmonella typhimurium*[J]. J

- Bacteriol, 1981, 145(2):796-802.
- [7] Murooka Y, Azakami H, Yamashita M. The monoamine regulon including syntheses of arylsulfatase and monoamine oxidase in bacteria[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(6):935-941.
- [8] Ganguly A, Joerger RD. Sugar sulfates are not hydrolyzed by the acid-inducible sulfatase AslA from *Salmonella enterica* Enteritidis NalR and Kentucky 3795 at pH 5.5[J]. Can J Microbiol, 2017, 63(8):739-744.
- [9] Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, et al. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(19):7427-7432.
- [10] Robbe C, Capon C, Coddeville B, et al. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract[J]. Biochem J, 2004, 384(Pt 2):307-316.
- [11] Bell A, Juge N. Mucosal glycan degradation of the host by the gut microbiota[J]. Glycobiology, 2020, 31(6):691-696.
- [12] Hanson SR, Best MD, Wong CH. Sulfatases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility[J]. An-
- gew Chem Int Ed Engl, 2004, 43(27):3526-3548.
- [13] Vishal C, Siddharth M, Praveen R. Tumour necrosis factor alpha mediated apoptosis in murine macrophages by *Salmonella enterica* serovar Typhi under oxidative stress[J]. Fems Immunol Med Microbiol, 2010, 47(2):278-286.
- [14] M naco A, Canales-Huerta N, Jara-Wilde J, et al. *Salmonella typhimurium* triggers extracellular traps release in murine macrophages[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021(11):639768.
- [15] Halici S, Zenk SF, Jantsch J, et al. Functional analysis of the *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated inhibition of antigen presentation in dendritic cells[J]. Infect Immun, 2008, 76(11):4924-4933.
- [16] Bueno SM, Riquelme S, Riedel CA, et al. Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity[J]. Immunology, 2012, 137(1):28-36.
- [17] Zha L, Garrett S, Sun J. *Salmonella* infection in chronic inflammation and gastrointestinal cancer[J]. Diseases, 2019, 7(1):28.

【收稿日期】 2022-01-02 【修回日期】 2022-03-15

(上接 399 页)

- [20] 张晓明,焦新安,唐丽华,等.鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 SifA~突变株的构建和鉴定[J].微生物学报,2005,45(3):349-354.
- [21] Goldstein LD, Cao Y, Pau G, et al. Prediction and quantification of splice events from RNA-seq data [J]. Plos One, 2016, 11(5):e0156132.
- [22] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nature Methods, 2012, 9(4):357-359.
- [23] Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq [J]. Nature Biotechnol, 2013, 31(1):46.

- [24] 宋楠楠,杜忠君,岳盈盈,等.鼠伤寒沙门菌 ydiU 基因敲除株的构建及其在压力培养条件下的生长特性研究[J].中国病原生物学杂志,2019,156(12):57-61,70.
- [25] Galperin M, Koonin EV. ‘Conserved hypothetical’ proteins: prioritization of targets for experimental study[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(18):5452-5463.
- [26] 何丹妮,张琪丽,倪欢欢,等. microProtein 调控拟南芥开花时间的机理研究[C]// 第三届全国植物开花·衰老与采后生物学大会.

【收稿日期】 2021-12-11 【修回日期】 2022-03-05