

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.19.001

· 基础研究 ·

海分枝杆菌中 sRNA5.85 的功能及调控机制探索*

黄炜莉¹ 刘含梅¹ 唐雨婷¹ 张世凤¹ 钟发刚^{3Δ} 张鹭^{1,2Δ}

(1 复旦大学生命科学学院微生物系 上海 200438; 2 上海市工业菌株工程中心 上海 200438;

3 新疆农垦科学院畜牧兽医所 新疆 石河子 832000)

摘要 目的: 鉴定海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)中 sRNA5.85 的存在,探究 sRNA5.85 对分枝杆菌的生理影响及调控机制。**方法:** Northern-blot 验证分枝杆菌中 sRNA5.85 的存在后,利用 pMV261 质粒,构建 sRNA5.85 过表达重组海分枝杆菌(5.85-OE 株),观察重组菌株在体外生长、滑动能力及菌落形态变化。通过人源巨噬细胞感染模型,评估重组菌株的入胞及胞内增殖能力,LDH 检测感染后的细胞活力。利用斑马鱼感染模型,验证 sRNA5.85 对细菌毒力的影响。结合 targetRNA2 与 IntaRNA 预测工具,预测 sRNA5.85 的潜在靶标及互作位点,并使用 qRT-PCR 验证。**结果:** 海分枝杆菌基因组中存在 sRNA5.85。过表达 sRNA5.85 不改变重组菌株的体外生长、滑动能力和菌落形态;5.85-OE 株感染巨噬细胞 48 h 后,不影响 THP-1 的细胞活力,细菌胞内增殖能力与野生型无显著差异;sRNA5.85 过表达会提高海分枝杆菌长期感染过程中,在斑马鱼体内的载菌量。targetRNA2 预测的 4 个潜在靶基因 *MMAR_3476*、*MMAR_4052*、*MMAR_3482*、*MMAR_2920* 的转录水平随 sRNA5.85 过表达而显著上调,*MMAR_3476* 及 *MMAR_4052* 共享同样的与 sRNA5.85 的互作位点。**结论:** sRNA5.85 可通过调控低氧响应相关基因的表达,提高长期感染过程中对斑马鱼的毒力。本研究为致病性分枝杆菌中 sRNA 的挖掘和功能解析提供了重要线索。

关键词: 海分枝杆菌;斑马鱼;sRNA;靶标基因

中图分类号:Q-33;Q915.862;Q959.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)19-3601-08

Exploration of the Function and Regulatory Mechanism of sRNA5.85 in *Mycobacterium Marinum**

HUANG Wei-li¹, LIU Han-mei¹, TANG Yu-ting¹, ZHANG Shi-feng¹, ZHONG Fa-gang^{3Δ}, ZHANG Lu^{1,2Δ}

(1 Department of Microbiology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai, 200438, China;

2 Shanghai Engineering Research Center of Industrial Microorganisms, Shanghai, 200438, China;

3 Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science,

Shihezi, Xinjiang, 832000, China)

ABSTRACT Objective: To identify the presence of sRNA5.85 and investigate its physiological effects and regulatory mechanisms in *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*). **Methods:** The presence of sRNA5.85 was validated through Northern blot analysis in *M. marinum*. Following this, the sRNA5.85 overexpression recombinant strain (referred to as the 5.85-OE strain) was constructed using the pMV261 plasmid. And *M. marinum* wild type strain with empty pMV261 plasmid was used as control strain (referred to as the WT-EV strain). In vitro experiments were conducted to observe the growth kinetics, sliding motility, and colony morphology of the 5.85-OE strain. To examine its behavior within human macrophages THP-1, an infection model was employed to assess the entry and intracellular proliferation of the 5.85-OE strain, with cell viability post-infection determined using LDH assays. Furthermore, a zebrafish infection model was utilized to validate the impact of sRNA5.85 on bacterial virulence. Prediction of potential target genes and interaction sites of sRNA5.85 was carried out using targetRNA2 and IntaRNA tools, with subsequent validation performed using qRT-PCR. **Results:** The sRNA5.85 was found to exist in the *M. marinum*. Overexpression of sRNA5.85 did not alter the in vitro growth, sliding ability, or colony morphology of the recombinant strain. After infecting macrophages with the 5.85-OE strain for 48 hours, THP-1 cell viability was not affected, and bacterial intracellular proliferation ability was not significantly different from the wild type strain. Overexpression of sRNA5.85 increased the bacterial load in zebrafish during long-term infection. The transcription levels of four potential target genes (*MMAR_3476*, *MMAR_4052*, *MMAR_3482*, *MMAR_2920*) predicted by targetRNA2 were significantly upregulated with sRNA5.85

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82272353);兵团科技计划项目(2022BC005)

作者简介:黄炜莉(1998-),女,硕士研究生,主要研究方向:微生物遗传学,E-mail: weilihuang98@163.com

Δ 通讯作者:张鹭,女,博士生导师,副教授,主要研究方向:微生物遗传学,E-mail: zhanglu407@fudan.edu.cn;

钟发刚,男,研究员,主要研究方向:结核病综合防控,E-mail: zfg125@sohu.com

(收稿日期:2024-04-25 接受日期:2024-05-23)

overexpression. *MMAR_3476* and *MMAR_4052* shared the same interaction site with sRNA5.85. **Conclusions:** The findings reveal that sRNA5.85 enhances virulence towards zebrafish during extended infection periods by modulating the expression of low-oxygen response-related genes. This study offers crucial insights into understanding and unraveling the role of sRNA in pathogenic mycobacteria.

Key words: *Mycobacterium marinum*; Zebrafish; sRNA; Target gene

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q915.862; Q959.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)19-3601-08

前言

海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*, *M. marinum*)是一种慢生长的致病性非结核分枝杆菌,可导致鱼类患病。它也会感染人类引发皮肤溃烂,是肺外分枝杆菌感染的原因之一^[1]。*M. marinum*与结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)亲缘关系相近,二者同属胞内病原菌^[2],对天然宿主的毒力和免疫病理相对保守^[3,4],因此也是研究 *M. tb* 的重要模式菌株。

病原菌感染过程中,需要对抗宿主体内高度异质化的生理环境,如营养限制、活性氧和活性氮、缺氧和酸胁迫等^[5]。细菌 sRNA 通过转录后调控功能,可迅速响应及应对多变的应激环境^[6],并且与细菌生长代谢^[7]及毒力^[8]密切相关。目前,分枝杆菌中的 sRNA 研究主要集中在 *M. tb*, 已有 60 多个 sRNA 已得到实验证实,其中具有功能表征的仅有 8 个^[9,10]。而在 *M. marinum* 中仅有 15 个 sRNA 被预测到,有且只有 1 个 sRNA 被鉴定^[11,12], 尚未有 sRNA 的功能被表征。

在本研究中,我们参照 Arnvig 的 sRNA 预测方案^[13],基于 *M. marinum* 转录组数据,预测并证实了 sRNA5.85 的存在。通过构建 sRNA5.85 过表达重组 *M. marinum*, 利用巨噬细胞及斑马鱼感染模型探究其具有的功能;使用 RNAtarget2 进一步预测并验证其潜在的靶标 mRNA,初步揭示 sRNA5.85 的调控机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)Trans DH5 α 感受态菌株(擎科生物技术股份有限公司购入);海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*, *M. marinum*)野生型 1218R 菌株,多伦多大学 Liu lab 惠赠;pMV261 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒,本实验室保存;人单核细胞系 THP-1,本实验室保存;3-4 月龄 AB 品系斑马鱼(*Danio rerio*)购自南京一树梨花;细菌基因组抽提试剂盒购自天根生化科技公司;质粒小量抽提试剂盒购自天根生化科技公司;通用型 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技公司;逆转录试剂盒购自日本 TaKara 公司;T7 体外转录试剂盒购自日本 TaKara 公司;化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒购自碧云天生物技术公司;miScript SYBR[®] Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司;Middlebrook 7H9 培养基粉末购自美国 BD 公司;Middlebrook 7H10 培养基粉末购自美国 BD 公司;乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH)购自碧云天生物技术公司;ABI Pro FlexTM PCR 仪(ABI);Power Pac basic 电泳仪购自美国伯乐公司;凝胶成像系统购自美国 UVP 公司;紫外联仪购自美国 UVP 公司;宏观变倍体式显微镜 Axio Zoom.V16 购自德国蔡司公司;荧光定量 PCR 仪购自美国 LifeTechnologies 公司;分子杂交仪 FYY3 型购自兴化市分析仪器厂;化学发光成像仪

CLINE 购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 海分枝杆菌培养及基因组提取 在不含或含有卡那霉素抗生素(工作浓度为 50 μ g/mL)和 10% OADC 的 7H10 固体培养基上将 *M. marinum* 甘油菌划线(WT-EV 及 5.85-OE 为卡那霉素抗性),30 $^{\circ}$ C 恒温培养 7 天左右。挑取单克隆在含 OADC 及抗生素的 7H9 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 恒温震荡培养至对数期。收集对数生长期的 *M. marinum* 1218R 野生型菌株菌体,采用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)按照说明书进行基因组提取。

1.2.2 引物设计合成及质粒测序 从 Mycobrowser(<https://mycobrowser.epfl.ch>)上获取 1218R 菌株中 sRNA5.85 的序列信息及内参 5S rRNA 的序列信息,使用 Primer7 软件设计 PCR 的引物,并在 R 端引物前插入 T7 promoter 序列。根据靶标基因序列信息,利用 Primer7 软件设计引物;聚合酶链反应(PCR)所需的引物合成和测序都由北京擎科生物科技公司完成

1.2.3 sRNA 的预测及 Northern 印迹鉴定 参照 Arnvig 等人^[13]的 sRNA 预测筛选方案,在 *M. marinum* 转录组数据中筛选 sRNA (GEO database, BioProject ID:PRJNA588556)。收集对数生长期的 *M. marinum* 菌体用 TRIzol (Invitrogen)充分重悬菌体并转移至装有石英砂的研磨管中,放入组织研磨仪中 5000 rpm 研磨 30 s,重复研磨 4 次。用三氯甲烷-异丙醇-乙醇(4 $^{\circ}$ C 预冷)提取总 RNA,加入 30 μ L RNase free 水使沉淀充分溶解并测定 RNA 浓度,按所需 RNA 量进行分装,保存于 -80 $^{\circ}$ C。使用表 1 中的引物,从野生型 *M. marinum* 1218R 菌株的基因组中扩增带有 T7 启动子序列信息的内参 5S rRNA 及 sRNA5.85 的 DNA 片段,并利用体外转录试剂盒转录合成含有生物素标记的单链 RNA 探针。按照刘等人的方法^[14]进行总 RNA 分离、转膜及杂交,并使用碧云天 D3308 化学发光生物素标记核酸检测试剂盒进行显影,完成 Northern 印迹鉴定。

1.2.4 sRNA5.85 过表达重组菌株构建及验证 参考 Arnvig 等人^[15]的 sRNA 过表达重组质粒的构建方案。pMV261 的 Hsp60 强启动子替换为耻垢分枝杆菌的 PrnB 启动子,选择的插入位点为 *Not I-Xba I*;在 *Hind III* 酶切位点上单酶切插入终止序列(Term);在 PrnB 启动子以及终止序列之间,即 *Xba I* 与 *Hind III* 酶切位点中间插入 sRNA 的基因序列。根据预测得到的 sRNA 序列信息设计引物(如表 2),从 1218R 菌株基因组中 PCR 扩增获得目的片段插入 pMV261 质粒,将测序正确的重组质粒和空质粒分别电转入野生型 *M. marinum* 1218R 菌株中,在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 7H10 平板上筛选获得阳性克隆。按照 1.2.3 的方法抽提重组菌株的总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gRNA Eraser 试剂盒(Takara)逆转录为 cDNA,用表 2 的引物通过 qRT-PCR 验证 sRNA5.85 过表达情况以及相关的靶标基因的表达情况。

表 1 探针模版 PCR 引物序列信息
Table 1 Probe Template PCR Primer Sequence Information

Primer	Sequence
T7-5.85-F	GGTTT <u>GAGCCCCAAAACCGCG</u>
T7-5.85-R	TAATACGACTCACTATAGGGT <u>AGGCGCCCATTTGCGAAAATTG</u>
Mm 5s-F	TTACGGCGCCACAGCGACAGG
Mm 5s-R	TAATACGACTCACTATAGGGT <u>GTCGCGGTGTCCTACTTTTCCAC</u>

Note: The underlined portion represents the T7 promoter sequence.

表 2 sRNA PCR 及 qRT-PCR 引物信息
Table 2 sRNA PCR and qRT-PCR Primer Information

Primer	Sequence
sRNA-5.85 F	CTAGTCTAGAGGTTT <u>GAGCCCCAAAACCGCGGGT</u>
sRNA-5.85 R	CCCAAGCTTTAGGCGCCCATTTGCGAAAATTGAAGC
q 5.85-F	GCTGGAACAGTTGCGCTTGC
q 5.855-R	CCACGGGCACACCTTCTTGAT
q Mm sigA-F	GGTGGATGCCGTGTCGTTCA
q Mm sigA-R	TCGATCTGGCGGATGCGTTC
q M3476F	TCTGGCGATGGACCTGGAGTTC
q M3476R	CCTCTGGTTTGCCTTGCACAG
q M1420F	AGGCTATGGGTGTTGGCGTGTA
q M1420R	CATCGCTGATCGGATCGCATCG
q M4052F	CTGACCAAGACCGTCCAGGAGA
q M4052R	GCTTGAGCACGACATCGCAGA
q M3482F	AGAGGTCGTGGTGGTGTGCGTT
q M3482R	GCAATGCCCAACCGAACCGA
q M4681F	GCGTGCTGGCTCAGATGATGT
q M4681R	GCGAAGAAGTGGCGCTCGAT
q M1639F	GGAATCGCCAACCTGGGTAACA
q M1639R	CGTTGCCGAATCCGACATTGC
q M4939F	GCCTGTCCAACCCAATACGA
q M4939R	ACAGCGAGGCGAACGATGAC
q M0947F	CATCTGGCGTCTACAGCTCAC
q M0947R	GACCACCGAGTCCAACACCATC
q M2920F	GCGACGACATGACACTGGAAGA
q M2920R	CTGGTTGTTGGACAGGGTGAGG
q M0410F	CGCACCTGATGGGCTACCTT
q M0410R	CGCATGACGAACCAGCACTG

Note: The underlined portion indicates the enzyme cleavage site.

1.2.5 细菌体外生长及菌落形态观察 培养 WT-EV 及 5.85-OE 至 OD₆₀₀ 为 0.5, 按 1:100 比例接种至含有 Kan 抗性的 50 mL 7H9 中, 调整起始 OD₆₀₀ 为 0.005, 每株菌 3 个生物学重复, 放入 220 rpm 30 °C 摇床中避光培养。在相应的时间点取样进行 OD₆₀₀ 的测定并绘制生长曲线。

1.2.6 细菌菌落形态观察 使用接种环蘸取对数生长期的 WT-EV 及 5.85-OE 菌液, 用 " 五线法 " 涂布于含有 Kan 抗性

的 7H10 平板上, 置于 30 °C 培养箱中, 倒置培养 4-6 天, 利用宏观变倍体式显微镜观察单菌落的菌落形态。

1.2.7 细菌滑动实验 按照 Li 等人的方法^[6], 取 1.5 mL 对数生长期的 WT-EV 及 5.85-OE 菌液于 2 mL 的 EP 管中, 用 0.5 mL 胰岛素针轻轻地反复吹吸, 制备单细胞悬液。用 7H9 培养基稀释单细菌悬液至 OD₆₀₀ 为 0.5, 取 5 μL 菌液, 垂直点在 7H9- 甘油 - 琼脂糖培养基上, 待菌液全部被吹干, 放置于 30 °C 培养箱

中正置培养若干天,统计平板上菌斑的直径变化。

1.2.8 斑马鱼感染及全鱼载菌量计数 使用三卡因麻醉斑马鱼成鱼使用 WPI 的 NANOFil 10 μ L 注射器,搭配 NF33BV-2 型号的针头进行腹腔注射。每条鱼注射 2 μ L 菌液,对照组注射等体积的 PBS。在感染第 2 天以及第 9 周,每组随机选取 4 条斑马鱼安乐死后,于 75%乙醇中浸泡 5 min,使用无菌 PBS 漂洗后装入含有 1 mL 10%甘油 PBS 的组织研磨振荡管中。将研磨管装入组织振荡破碎仪中,5000 rpm 研磨 30 s,总共研磨 4 次,将得到的匀浆选取合适的稀释梯度用 PBST 进行稀释涂板。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad prism 9.0.0 软件进行数据处理画图及统计学分析。2 组之间的显著性差异比较采用 T 检验(t-test)及单因素方差分析(one-way ANOVA)多组数据之间的显著性差异比

较采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。当分析结果 $P>0.05$ 表示无统计学差异,而 $P<0.05$ 时表示有统计学差异, $P<0.001$ 时有显著性差异。

2 结果

2.1 海分枝杆菌中 sRNA 的预测及鉴定

参照 Arnig 等人^[13]的 sRNA 预测筛选方案,在 *M.marinum* 转录组数据中,预测到 sRNA5.85 位于 *MMAR_2628* 与 *MMAR_2629* 的基因间区(图 1A),长度为 425 nt (3207969-3208394,反义链)。通过 Northern 印迹实验,证实了 sRNA5.85 存在于 *M.marinum* 基因组中(图 1C)。利用 RNAfold 预测 sRNA5.85 的二级结构,结果如图 1B 所示,可以发现 sRNA5.85 具有多长茎环结构。

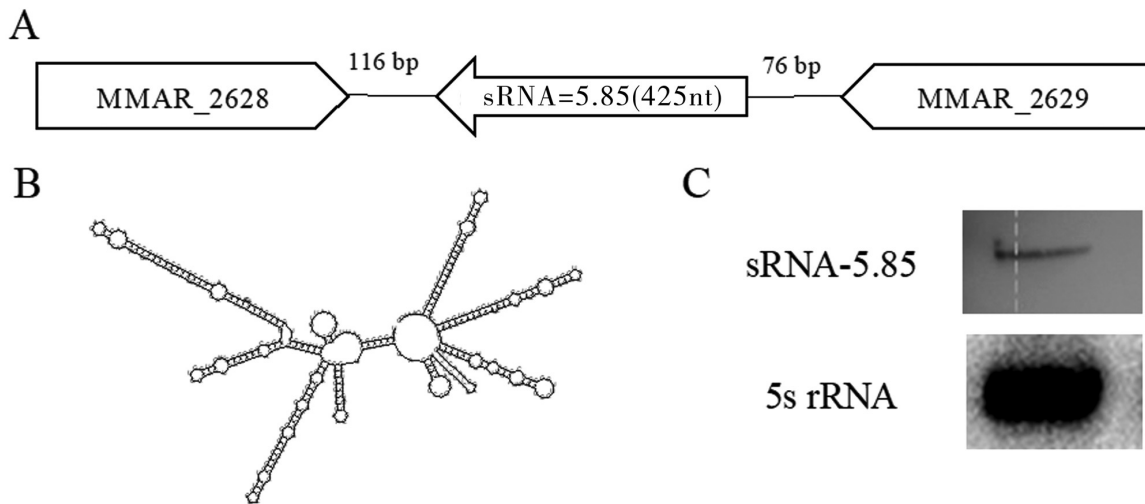


图 1 (A) sRNA5.85 的在基因组上位置信息;(B) sRNA5.85 二级结构预测;(C) Northern 印迹。

Fig.1 (A) Genomic position information of sRNA5.85; (B) Predicted secondary structure of sRNA5.85; (C) Northern Blot.

2.2 sRNA5.85 过表达重组海分枝杆菌的 qRT-PCR 验证

构建 sRNA5.85 过表达重组 pMV261 质粒(图 2 A)。通过 qRT-PCR 验证 3 个卡那霉素平板上的阳性克隆中 sRNA 的表达情况。结果如图 2B 所示,3 个单克隆的 sRNA 的表达量

相较于空载对照(WT-EV)分别发生了 79 倍、146 倍以及 140 倍的上调。sRNA5.85 能够在 *M.marinum* 中稳定过表达,选取 sRNA-5.85-1 单克隆进行后续的实验,并命名为 5.85-OE。

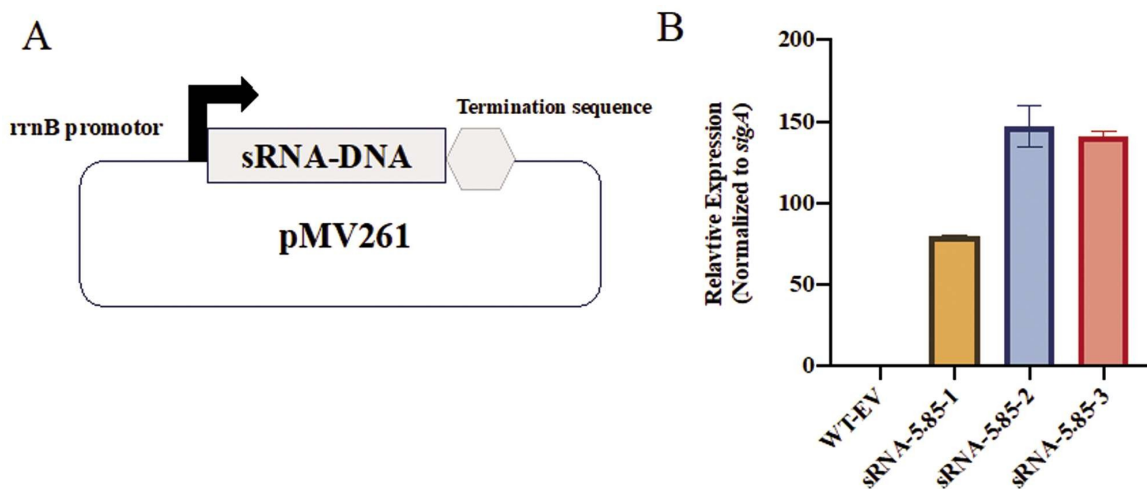


图 2 (A) pMV261 重组过表达质粒构建示意图;(B) sRNA5.85 过表达重组菌株的过表达情况验证(n=3), Mean \pm SD。

Fig.2 (A) Schematic diagram of pMV261 recombinant overexpression plasmid construction; (B) Validation of overexpression status of sRNA5.85 recombinant strains (n=3), Mean \pm SD.

2.3 sRNA5.85 过表达不影响海分枝杆菌的体外生长、滑动能力以及菌落形态

利用 7H9 完全培养基,在氧气充足的情况下,探究过表达 sRNA5.85 对菌株生长状态的影响。根据生长曲线所示(图 3 A), 5.85-OE 过表达重组菌株同 WT-EV 的生长速率相当, sRNA5.85 过表达后并不影响 *M.marinum* 的在体外常氧情况下的生长速率。

同时,将对数生长期的 WT-EV 与 5.85-OE 涂布于 7H10 完全培养基上,使用宏观变倍体显微镜观察菌落形态。如图 3C 所

示,WT-EV 与 5.85-OE 菌落形态均呈较为规则的圆形,菌落中央为褶皱样隆起,边缘褶皱形态减轻较为光滑。过表达 sRNA5.85 不会改变 *M.marinum* 在 7H10 完全培养基上的菌落形态。

进一步评估 sRNA5.85 对于 *M.marinum* 滑动能力的影响,如图 3B 所示,5.85-OE 与 WT-EV 在 7H9-甘油-琼脂糖固体平板上的滑动速率没有显著性差异。同时观察重组菌株在滑动平板上的菌落形态,如图 3D 所示,5.85-OE 与 WT-EV 的菌落均呈规则的圆形,以颜色为分界形成了同心圆。

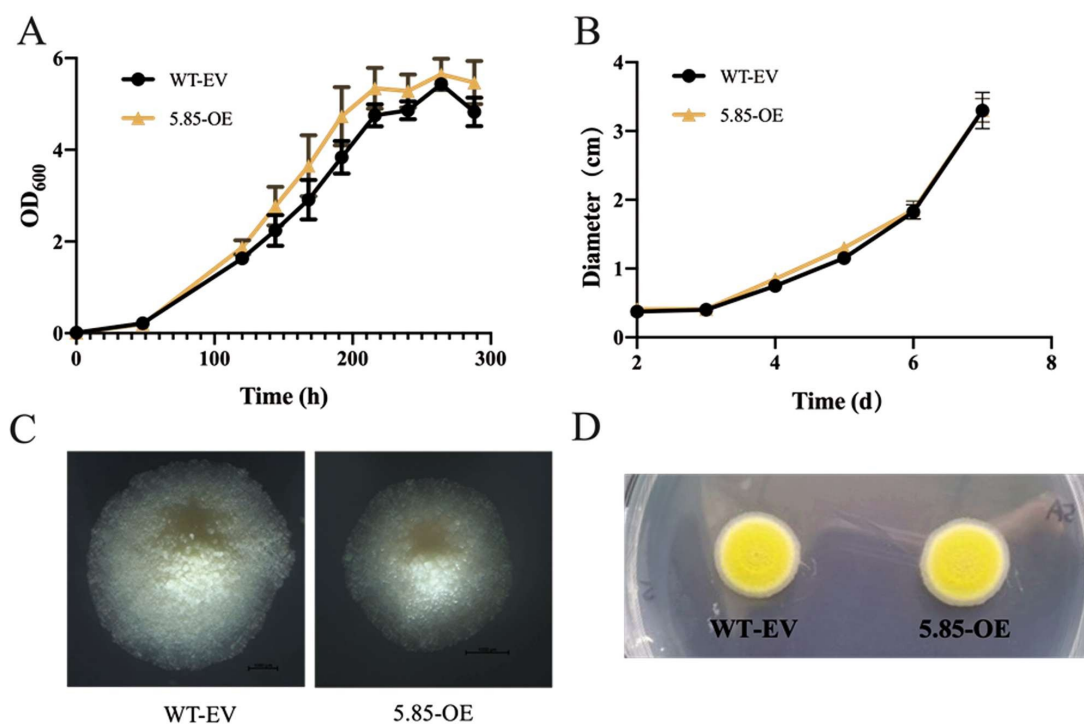


图 3 (A) sRNA5.85 过表达重组海分枝杆菌生长曲线测定, Mean \pm SD, Unpaired t test; (B) 5.85-OE 与 WT-EV 在 7H9-琼脂糖-甘油平板上菌落直径变化统计, Means \pm SEM, Unpaired t test; (C) sRNA 过表达重组菌株菌落形态(7H10 培养基), 标尺为 1000 μ m(底部右侧); (D) WT-EV 与 5.85-OE 在滑动能力平板上的菌落形态。

Fig.3 (A) Growth curve of sRNA5.85 overexpression recombinant *M.marinum*, Mean \pm SD, Unpaired t test; (B) Statistical analysis of colony diameter changes of 5.85-OE and WT-EV on 7H9-agar-glycerol plates, Means \pm SEM, Unpaired t test; (C) Colony morphology of sRNA overexpression recombinant Strains (7H10 Medium), scale bar: 1000 μ m (bottom right); (D) Colony morphology of WT-EV and 5.85-OE on sliding ability plates.

2.4 sRNA5.85 过表达不影响海分枝杆菌感染巨噬细胞的能力

采用高感染复数(MOI=10)感染巨噬细胞系 THP-1,感染后 2 h 后取细胞涂板计数,比较重组菌株的入胞情况,结果如图 4A 所示, 5.85-OE 侵染 THP-1 的入胞率为 28%,与 WT-EV 22.0%的入胞率无显著性差异。统计 WT-EV 与 5.85-OE 在 THP-1 内的增殖情况,结果如图 4B 所示,均不存在显著性差异。同时,采用 LDH 法检测 5.85-OE 及 WT-EV 高剂量感染 THP-1 后,导致的细胞死亡情况,结果如图 4C 所示,两组在感染 4 h、24 h 以及 48 h 时均不存在显著性差异。

2.5 sRNA5.85 过表达提高海分枝杆菌在宿主斑马鱼体内的载菌量

将 WT-EV 和 5.85-OE 通过腹腔注射的方式分别感染斑马鱼,感染 2 天后,各组取 4 条鱼进行体内载菌量统计做为起始感染剂量,各组的平均感染剂量分别为 4.99 个 log(WT-EV)、5.00 个 log(5.85-OE)。比较感染后第 12 周斑马鱼体内的载菌

量,结果如图 5 所示, 5.85-OE 感染组斑马鱼体内的平均载菌量为 4.90 个 log,显著高于 WT-EV(4.53 个 log)组。推测 sRNA5.85 过表达会提高 *M.marinum* 在宿主斑马鱼体内长期感染后的毒力。

2.6 sRNA5.85 的潜在靶标 mRNA 的预测及转录水平验证

利用 targetRNA2^[17]预测并获得了 13 个 sRNA5.85 的潜在靶标(表 3)。通过 qRT-PCR 验证 sRNA5.85 过表达后,潜在靶标基因的转录水平变化。结果如图 6 所示,相较于 WT-EV, 5.85-OE 中潜在靶标 *MMAR_3476*、*MMAR_4052*、*MMAR_3482* 以及 *MMAR_2920* 的转录水平显著上调。使用 IntaRNA^[18]来进一步探究, sRNA5.85 与这四个潜在靶标的 mRNA 及 5'-UTR 区的互作位点,筛选条件为有 10-25 个碱基发生互补配对^[19],结果如图 7 (A-C) 所示, sRNA5.85 与 *MMAR_3476* (3 种)、*MMAR_4052* (2 种)及 *MMAR_3482* (2 种)可能的互作模式;而 sRNA5.85 与 *MMAR_2920* 之间不存在符合上述筛选条件的互作模式。

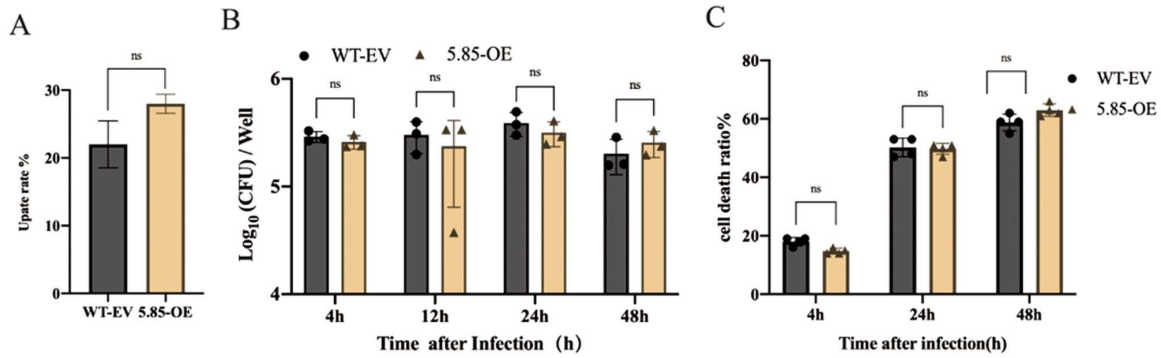


图4 (A)WT-EV 与 5.85-OE 侵染 THP-1(MOI=10)的入胞情况, Mean \pm SD, Unpaired T test, ns; $P > 0.05$; (B)WT-EV 与 5.85-OE 的胞内增殖情况, Mean \pm SD, Two-way ANOVA, ns; $P > 0.05$; (C)LDH 法检测 WT-EV 与 5.85-OE 侵染后 THP-1 的细胞死亡情况。Mean \pm SD, Unpaired t test, ns; $P > 0.05$ 。

Fig.4 (A) Intracellular invasion of WT-EV and 5.85-OE into THP-1 Cells at MOI=10 (n=3), Mean \pm SD, Unpaired T test, ns: $P > 0.05$; (B) Intracellular proliferation of WT-EV and 5.85-OE in THP-1 Cells after infection at MOI=10, Mean \pm SD, Two-way ANOVA, ns: $P > 0.05$; (C) Cell death detection by LDH assay after infection of WT-EV and 5.85-OE into THP-1 Cells at MOI=10 for 4 h, 24 h, and 48 h, Mean \pm SD, Unpaired t test, ns: $P > 0.05$.

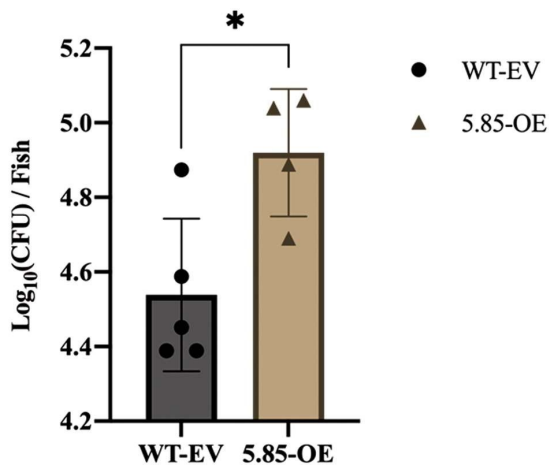


图5 WT-EV 与 5.85-OE 分别感染 12 周后斑马鱼体内载菌量 CFU 计数 (n=4-5), Mean \pm SD, Two-way ANOVA, *: $P < 0.05$ 。

Fig.5 Bacterial load CFU count of WT-EV and 5.85-OE in zebrafish at 12 weeks post-infection (n=4-5), Mean \pm SD, Two-way ANOVA, *: $P < 0.05$.

3 讨论

细菌 sRNA 通常在特定条件下产生,与基于蛋白的调控相比,sRNA 合成的能量成本较低,可以快速响应营养缺乏^[20]、氧化应激^[21-23]、缺铁应激^[24]、氧应激^[25]等的环境应激,与靶标结合以迅速地参与到细菌生理功能的调控中去。对于病原菌,sRNA 在毒力和疾病发展中也发挥着重要作用^[26-28]。但在高 GC 含量的致病性分枝杆菌中,由于缺乏 Hfq 或 ProQ 样的 RNA 伴侣蛋白,限制了对 sRNA 的发现及功能探索^[29]。尤其在分枝杆菌中,迄今为止仅预测到 15 个 sRNA,严重阻碍了对 *M. marinum* 致病及感染机制的解析。在本研究中,我们利用已有的转录组学数据,首次预测并验证出海分枝杆菌中 sRNA5.85 的存在。并通过构建 sRNA 过表达重组 *M. marinum*,进一步探究了 sRNA5.85 的功能,发现 sRNA5.85 的过表达能够显著提高 *M. marinum* 长期感染过程中,在斑马鱼体内的细菌负荷。同时,在 sRNA5.85 的潜在靶标中,我们发现了 *MMAR_3476* 及

表 3 sRNA5.85 潜在靶标基因

Table 3 Potential Target Genes of sRNA5.85

Rank	Gene	Synonym	P value
1	-	MMAR_3476	0.000
2	cynT	MMAR_1420	0.000
3	Mce3B_1	MMAR_4052	0.001
4	pfkB_1	MMAR_3482	0.001
5	Far	MMAR_4681	0.001
6	-	MMAR_1639	0.003
7	-	MMAR_3940	0.007
8	-	MMAR_4939	0.013
9	-	MMAR_0947	0.017
10	mmaA2_1	MMAR_2920	0.017
11	yrbE1A	MMAR_0410	0.031
12	-	MMAR_4698	0.046
13	-	MMAR_2146	0.046

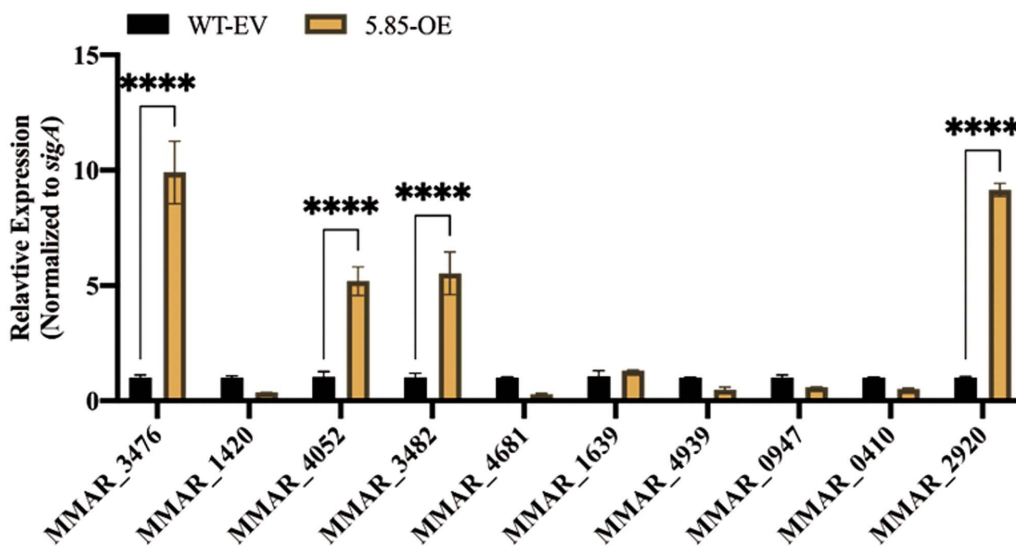


图 6 qRT-PCR 验证 sRNA5.85 潜在靶标的转录水平, Mean \pm SEM, Two-way ANOVA, ns: $P>0.05$, ****: $P<0.0001$ 。
Fig.6 Validation of transcription levels of potential target genes of sRNA5.85 by qRT-PCR, Mean \pm SEM, Two-way ANOVA, ns: $P>0.05$, ****: $P<0.0001$.

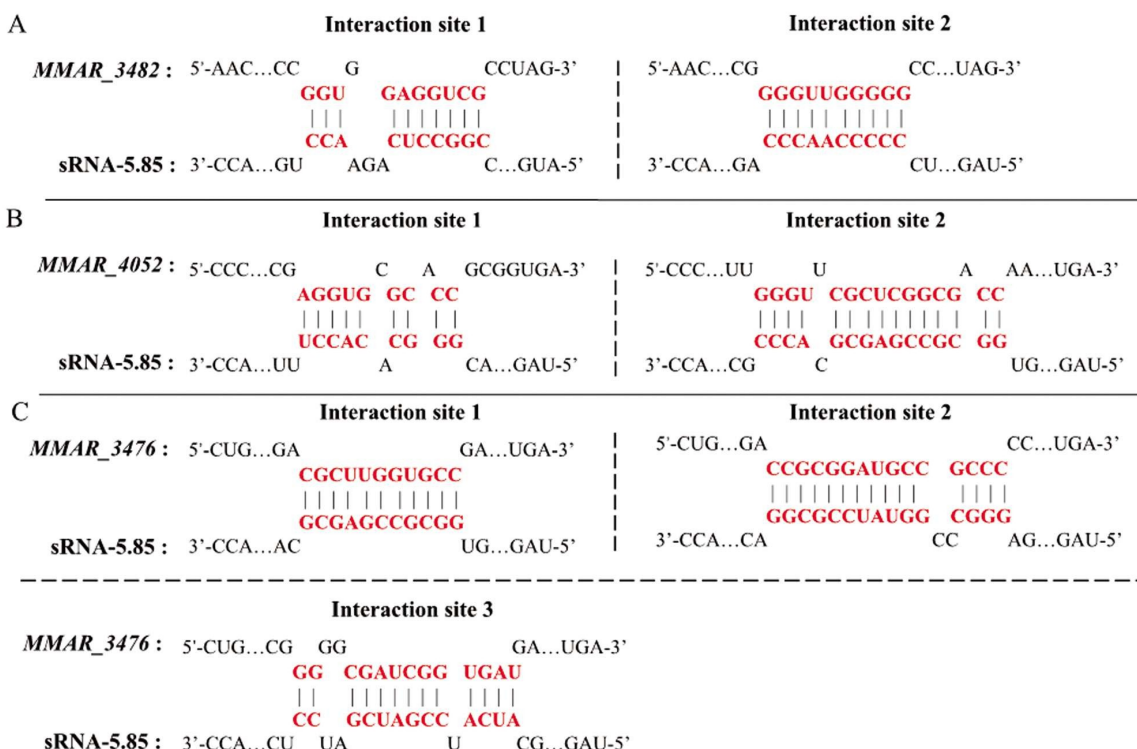


图 7 (A-C)IntaRNA 预测 sRNA5.85 与 *MMAR_3482*、*MMAR_4052* 以及 *MMAR_3476* 的互作位点

Fig.7 (A-C) IntaRNA prediction of interaction sites between sRNA5.85 and *MMAR_3482*, *MMAR_4052* and *MMAR_3476*

MMAR_3482 在 5.85-OE 中转录水平显著上调,它们在 *M.tb* 中的同源基因分别为 *Rv2004c* 及 *Rv2029c*,均属于 DOS 调节子,与低氧响应、结核潜伏感染密切相关,参与调节 *M.tb* 的能量代谢水平^[30-32]。因此,我们推测 sRNA5.85 可能是通过调控 *MMAR_3476* 与 *MMAR_3482* 的表达,使得 5.85-OE 菌株能够适应宿主体内低氧环境,从而提高长期感染中斑马鱼体内的细菌负荷。而在巨噬细胞感染实验中,sRNA5.85 过表达不会影响 *M.marinum* 对巨噬细胞的感染能力及被感染细胞的死亡情况,这可能由于菌株对巨噬细胞的感染时间较短,且离体的单一巨噬细胞系难以模拟在宿主体内由多细胞聚集形成的肉芽肿结构中的低氧环境^[33]。

目前,分枝杆菌中 sRNA 的靶标及功能探索更多集中在大型结核菌致病菌结核分枝杆菌中。在具有功能表征的 sRNA 中,仅有 4 个 sRNA 即 Mcr7、Mrs I、Ms1 以及 B11 找到了其所调控的靶标。其中 Mcr 7 与 Mrs I 都是通过与它们各自的靶标 *tatC* 与 *bfiA* 的 5'-UTR 结合,导致核糖体无法结合从而影响蛋白的翻译^[34,35]。Ms1 则是通过与缺乏 δ 因子 RNA 聚合酶核心结合来调控转录的起始^[36]。而 B11 最为特别,Mai 等人的研究发现,B11 可以调控大量基因的表达,具有多个靶标 mRNA。它能够与靶标 mRNA 在没有 RNA 伴侣蛋白的参与下形成稳定的结构,依赖于其具有的 C 含量丰富的环状结构^[37]。B11 分子调控机制的发现,为高 GC 含量的革兰氏阳性菌中的 sRNA 提供

了新的研究思路。在本研究中,我们分析了 sRNA5.85 与转录水平显著上调的潜在靶标 mRNA 的互作位点,发现 *MMAR_3476* 及 *MMAR_4052* 与 sRNA5.85 发生互作的位点都发生在 sRNA5.85 的 229-244 nt 之间,含有 5 个胞嘧啶、7 个鸟嘌呤,这意味着该区间可能是 sRNA5.85 发挥调控作用的关键位点。未来的工作中,可以通过单碱基突变等技术,深入解析其分子调控机制。

总之,本研究鉴定并探究了 *M.marinum* 中 sRNA5.85 的生理功能及其具有的调控潜能,将扩大并深化对 *M.marinum* 中 sRNA 功能的研究。在一定程度上,有利于肺外分枝杆菌感染机制的进一步阐明。

参考文献(References)

- [1] HASHISH E, MERWAD A, ELGAML S, et al. Mycobacterium marinum infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review [J]. Veterinary Quarterly, 2018, 38 (1): 35-46.
- [2] VERMA A, GHOSHAL A, DWIVEDI V P, et al. Tuberculosis: The success tale of less explored dormant Mycobacterium tuberculosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1079569.
- [3] CHIRAKOS A E, BALARAM A, CONRAD W, et al. Modeling Tubercular ESX-1 Secretion Using Mycobacterium marinum [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2020, 84(4): e00082-19.
- [4] ROCA F J, WHITWORTH L J, REDMOND S, et al. TNF Induces Pathogenic Programmed Macrophage Necrosis in Tuberculosis through a Mitochondrial-Lysosomal-Endoplasmic Reticulum Circuit [J]. Cell, 2019, 178(6): 1344-61.e11.
- [5] CHUNG E S, JOHNSON W C, ALDRIDGE B B. Types and functions of heterogeneity in mycobacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(9): 529-541.
- [6] LALAOUNA D, BAUDE J, WU Z, et al. RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of Staphylococcus aureus during manganese starvation[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(18): 9871-9887.
- [7] GRÜTZNER J, REMES B, EISENHARDT K M H, et al. sRNA-mediated RNA processing regulates bacterial cell division[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(12): 7035-7052.
- [8] JIA X, PAN Z, YUAN Y, et al. Structural basis of sRNA RsmZ regulation of Pseudomonas aeruginosa virulence [J]. Cell Res, 2023, 33(4): 328-330.
- [9] AMI V K G, BALASUBRAMANIAN R, HEGDE S R. Genome-wide identification of the context-dependent sRNA expression in Mycobacterium tuberculosis[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 167.
- [10] GIRARDIN R C, MCDONOUGH K A. Small RNA Mcr11 requires the transcription factor AbmR for stable expression and regulates genes involved in the central metabolism of Mycobacterium tuberculosis[J]. Mol Microbiol, 2020, 113(2): 504-520.
- [11] WANG S, DONG X, ZHU Y, et al. Revealing of Mycobacterium marinum Transcriptome by RNA-seq [J]. PLOS ONE, 2013, 8(9): e75828.
- [12] FURUSE Y, FINETHY R, SAKA H A, et al. Search for MicroRNAs Expressed by Intracellular Bacterial Pathogens in Infected Mammalian Cells[J]. PLOS ONE, 2014, 9(9): e106434.
- [13] ARNVIG K B, COMAS I, THOMSON N R, et al. Sequence-Based Analysis Uncovers an Abundance of Non-Coding RNA in the Total Transcriptome of Mycobacterium tuberculosis [J]. PLOS Pathogens, 2011, 7(11): e1002342.
- [14] 刘含梅, 钱心怡, 唐雨婷, 等. 结核分枝杆菌 sRNA Mpr5 的功能验证[J]. 微生物学报, 2022, 62(07): 2850-2858.
- [15] ARNVIG K B, YOUNG D B. Identification of small RNAs in Mycobacterium tuberculosis [J]. Mol Microbiol, 2009, 73 (3): 397-408.
- [16] LI Y Y, LIU H M, WANG D, et al. Arabinogalactan enhances Mycobacterium marinum virulence by suppressing host innate immune responses[J]. Front Immunol, 2022, 13: 879775.
- [17] KERY M B, FELDMAN M, LIVNY J, et al. TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W124-W9.
- [18] MANN M, WRIGHT P R, BACKOFEN R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W435-w9.
- [19] WATERS L S, STORZ G. Regulatory RNAs in Bacteria [J]. Cell, 2009, 136(4): 615-628.
- [20] WALLING L R, KOUSE A B, SHABALINA S A, et al. A 3' UTR-derived small RNA connecting nitrogen and carbon metabolism in enteric bacteria[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(17): 10093-10109.
- [21] FRÖHLICH K S, GOTTESMAN S. Small Regulatory RNAs in the Enterobacterial Response to Envelope Damage and Oxidative Stress [M]. Regulating with RNA in Bacteria and Archaea. 2018: 211-228.
- [22] SEIXAS A F, QUENDERA A P, SOUSA J P, et al. Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation [J]. Front Genet, 2021, 12: 821535.
- [23] KRIEGER M C, DUTCHER H A, ASHFORD A J, et al. A Peroxide-Responding sRNA Evolved from a Peroxidase mRNA [J]. Mol Biol Evol, 2022, 39(2): msac020.
- [24] CORONEL-TELLEZ R H, POSPIECH M, BARRAULT M, et al. sRNA-controlled iron sparing response in Staphylococci [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(15): 8529-8546.
- [25] GRIGOROV A, BYCHENKO O, SALINA E G, et al. Small RNA F6 Provides Mycobacterium smegmatis Entry into Dormancy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11536.
- [26] OLIVA G, SAHR T, BUCHRIESER C. Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(3): 331-349.
- [27] DIALLO I, PROVOST P. RNA-Sequencing Analyses of Small Bacterial RNAs and their Emergence as Virulence Factors in Host-Pathogen Interactions [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1627.
- [28] LE HUYEN K B, GONZALEZ C D, PASCREAU G, et al. A small regulatory RNA alters Staphylococcus aureus virulence by titrating RNase III activity[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(18): 10644-10656.
- [29] TANEJA S, DUTTA T. On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation [J]. Noncoding RNA Res, 2019, 4(3): 86-95.
- [30] ROCHA D M G C, VIVEIROS M, SARAIVA M, et al. The Neglected Contribution of Streptomycin to the Tuberculosis Drug Resistance Problem[J]. Genes, 2021, 12(12): 2003. (下转第 3688 页)

- at baseline predict the development of severe respiratory failure and mortality in COVID-19 patients[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 787.
- [4] Kazancioglu S, Yilmaz FM, Bastug A, et al. Assessment of galectin-1, galectin-3, and prostaglandin e2 levels in patients with COVID-19[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2021, 74(6): 530-536.
- [5] 中国医师协会急诊医师分会. 中国急诊重症肺炎临床实践专家共识[J]. *中国急救医学*, 2016, 36(2): 97-107.
- [6] 文小兰, 吉雪芳, 赵仕玉, 等. 急性呼吸衰竭患者死亡危险因素分析及其预测价值 [J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2021, 16(6): 710-712.
- [7] 马群, 李卫阳, 许蒙. 老年重症肺炎并呼吸衰竭患者血清可溶性 CD40 配体和正五聚体蛋白 -3 水平变化及临床意义[J]. *新乡医学院学报*, 2023, 40(7): 659-663.
- [8] Sivaraman K, Wrenger S, Liu B, et al. Mice inflammatory responses to inhaled aerosolized LPS: effects of various forms of human alpha1-antitrypsin[J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 113(1): 58-70.
- [9] 鄞晓斌, 邱名耀, 吴海琴, 等. 血清 α 1-AT 和 NE 水平变化与 AECOPD 患者病情程度关系及预测呼吸衰竭的价值[J]. *临床急诊杂志*, 2022, 23(6): 390-394.
- [10] Sakamoto N, Hara S, Ishimoto H, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor is a biomarker for pneumocystis jirovecii pneumonia among patients with rheumatoid arthritis under methotrexate therapy [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2019, 248(3): 209-216.
- [11] Jang HJ, Leem AY, Chung KS, et al. Soluble IL-2R levels predict in-hospital mortality in COVID-19 patients with respiratory failure[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(18): 4242.
- [12] Shemesh A, Pickering H, Roybal KT, et al. Differential IL-12 signaling induces human natural killer cell activating receptor-mediated ligand-specific expansion [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(8): e20212434.
- [13] Sunil VR, Francis M, Vayas KN, et al. Regulation of ozone-induced lung inflammation and injury by the β -galactoside-binding lectin galectin-3[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 284(2): 236-245.
- [14] Cervantes-Alvarez E, la Rosa NL, la Mora MS, et al. Galectin-3 as a potential prognostic biomarker of severe COVID-19 in SARS-CoV-2 infected patients[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1856.

(上接第 3608 页)

- [31] DODDAM S N, PEDDIREDDY V, AHMED N. Mycobacterium tuberculosis DosR Regulon Gene Rv2004c Encodes a Novel Antigen with Pro-inflammatory Functions and Potential Diagnostic Application for Detection of Latent Tuberculosis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 712.
- [32] CHUGH S, BAHAL R K, DHIMAN R, et al. Antigen identification strategies and preclinical evaluation models for advancing tuberculosis vaccine development[J]. *npj Vaccines*, 2024, 9(1): 57.
- [33] BO H, MOURE U A E, YANG Y, et al. Mycobacterium tuberculosis-macrophage interaction: Molecular updates[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1062963.
- [34] SOLANS L, GONZALO-ASENSIO J, SALA C, et al. The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in Mycobacterium tuberculosis [J]. *PLOS Pathogens*, 2014, 10(5): e1004183.
- [35] GERRICK E R, BARBIER T, CHASE M R, et al. Small RNA profiling in Mycobacterium tuberculosis identifies MrsI as necessary for an anticipatory iron sparing response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(25): 6464-6469.
- [36] HNILICOVÁ J, JIRÁT MATĚJČKOVÁ J, ŠIKOVÁ M, et al. Ms1, a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(18): 11763-11776.
- [37] MAI J, RAO C, WATT J, et al. Mycobacterium tuberculosis 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(8): 4292-4307.