

高温对体外唾液链球菌 *clpP* 基因表达的影响*

朱铭慧¹, 秦波¹, 徐卫华¹, 付雪飞^{1**}, 胡晓霞^{2**}

(1. 贵州医科大学附属口腔医院 口腔正畸科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨高温对体外培养的唾液链球菌(*S. salivarius*) *clpP* 基因表达的影响。方法: 取10例人唾液样本在55℃培养, 挑选生成的菌落进行分离培养、16S rDNA扩增及DNA序列测定, 采用BLAST分析及构建系统发育树, 鉴定得到*S. salivarius*临床株; 采用PCR方法对*S. salivarius* ATCC 13419模式株(阳性对照)和获得的*S. salivarius*临床株进行*clpP*基因的片段克隆及序列分析, 再用实时荧光定量PCR方法比较*S. salivarius*在37℃及55℃下培养2h时的*clpP*基因相对表达水平。结果: 在55℃培养下, 10例唾液样本中仅有2例有少量菌落生成, 最终经分离鉴定得到2株*S. salivarius*临床株, 分别命名为HS_01和HS_02; 利用PCR方法克隆*S. salivarius* ATCC 13419模式株、HS_01及HS_02菌株的*clpP*基因片段, 经实时荧光定量PCR方法检测显示, 3个*S. salivarius*菌株在55℃条件下*clpP*基因的相对表达水平高于37℃培养时, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 高温刺激下获得的*S. salivarius*临床株的*ClpP*基因表达水平升高。

[关键词] 高温; DNA序列测定; 唾液链球菌; *clpP*基因; BLAST分析法; 聚合酶链式反应; 实时荧光定量PCR

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)12-1396-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.007

Effects of *clpP* Gene Expression at High Temperature in *Streptococcus Salivarius* in Vitro

ZHU Minghui¹, QIN Bo¹, XU Weihua¹, FU Xuefei¹, HU Xiaoxia²

(1. Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Physiology, School of Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To detect the expression of *clpP* gene at high temperature in *Streptococcus salivarius* in vitro. **Methods:** Ten human saliva samples were cultured at 55℃ and colonies were selected for cultivation, isolation, 16S rDNA amplification and DNA sequencing. BLAST analysis and phylogenetic tree were used to identify *S. salivarius* clinical strains, which along with *S. salivarius* ATCC 13419 type strains, were used for *ClpP* gene fragment cloning and sequencing by PCR method. And then real-time quantitative PCR method is applied to determine whether the strains have the difference or not in relative expressive amount of *clpP* gene while the temperature is at 37℃ and 55℃. **Results:** Our study gets two *S. salivarius* clinical strains-*S. salivarius* HS_01 and *S. salivarius* HS_02-under the temperature condition of 55℃. With PCR method, we cloned the partial *clpP* gene of *S. salivarius* ATCC 13419, *S. salivarius* HS_01 and *S. salivarius* HS_02. Real-time quantitative PCR showed that the relative expression levels of *clpP* gene in three *S. salivarius* strains at 55℃ were higher than those at 37℃. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression level of *ClpP* gene in *S. salivarius* clinical strains obtained in high temperature stress is increased.

[Key words] high temperature; DNA sequencing; *S. salivarius*; *clpP* gene; BLAST analysis; polymerase chain reaction; real-time quantitative PCR

*[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合 LH字(2017)7201号]

** 通信作者 E-mail: 2405465771@qq.com; 251982143@qq.com

网络出版时间: 2018-12-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181222.1447.022.html>

自从 1969 年, Brock 等^[1] 在美国黄石公园发现了能在 70 °C 以上生长的水生栖热菌以来, 越来越多的耐高温微生物及温度调节基因被发现, 细菌耐热的相关研究也成为了热点。口腔作为消化的最始端, 最容易受到外界的刺激, 其中温度变化是最常见的刺激之一。口腔中存在 800 多种细菌, 其中链球菌群所占的比例最高, 约占 30%。Kawamura 等^[2] 通过链球菌的 16S rRNA 序列构建了系统发育树, 将主要的口腔链球菌分为 6 类, 其中的唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*, *S. salivarius*) 与嗜热链球菌的亲缘关系和同源性最接近, 2 者都被划分入了唾液链球菌群, 但 *S. salivarius* 是否具备某些嗜热链球菌的耐高温特性尚不清楚。研究发现, 当细菌遭遇不同程度的热刺激时, 热休克蛋白组起着重要作用。热休克蛋白组又称为热休克蛋白 (HSP), 包括伴侣分子、蛋白酶及调节因子^[3]。所有的链球菌都具有 5 个 *clp* ATP 酶 (*clpB*、*clpC*、*clpE*、*clpL* 及 *clpX*), 它们都只编码一个 *clpP* 蛋白酶^[4]。已有研究发现, 缺少 *clpP* 基因的细菌突变株, 在高温的条件下生长会受限制, 比如枯草芽孢杆菌, 单核细胞增生性李斯特杆菌, 金黄色葡萄球菌及变异链球菌及无乳链球菌^[5-9]。基于 *clpP* 基因在细菌高温应激耐受中表现出重要作用, 本研究取人唾液样本在 55 °C 培养, 获得 2 株 *S. salivarius* 临床株, 采用实时荧光定量 PCR 方法比较 2 株 *S. salivarius* 临床株和 1 株 *S. salivarius* 模式株在 37 °C 及 55 °C 条件下培养 2 h 时的 *clpP* 基因相对表达水平, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

MS 培养基 (BD DifcoTM, USA)、BHI 培养基 (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)、厌氧培养箱 YQX - II 型 (上海新苗医疗器械有限公司)、PCR 基因扩增仪 Gradient PCR Thermal Cycle (Bio - RAD Ltd, USA)、Bio - Rad 凝胶成像系统 (Gel - Doc 2000, USA)、7300 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA)。

1.2 方法

1.2.1 高温下分离鉴定唾液中 *S. salivarius* 采集 10 名健康人唾液样本, 稀释后接种于 MS 培养基, 55 °C、80% N₂、10% H₂ 及 10% CO₂ 兼性厌氧培养 18 h, 实验设 2 个相同平行组, 并重复 3 次。

观察培养基上菌落生长情况。并用形态学特征、革兰染色及生理生化检测对挑选菌落进行粗筛, 再将选出的分离株进行 16S rDNA 扩增及序列测定, 并将测定出的序列提交 Genbank, 获得登录号。进入 NCBI, 输入分离株序列, 运用 BLAST 程序在 Genbank 中比对, 从结果中挑选同源性最高的菌株, 并下载其它口腔常见链球菌和同属中与耐热有关链球菌的 16S rDNA 基因公认标准全序列数据作为外群, 用 MEGA 7.0 软件包以 Neighbor Join 法绘制系统发育树, 最终鉴定获得的 2 株 *S. salivarius* 临床株, 命名为 HS_01 和 HS_02。

1.2.2 *S. salivarius* 的 *clpP* 基因片段克隆及序列分析 根据 *S. salivarius* 的 *clpP* 基因的保守序列设计特异性引物, 具体为从 Genbank 中下载 *S. salivarius* SK126 和 *S. salivarius* ATCC 25975 (Genbank: L07793) 的 *clpP* 基因序列, 根据其保守区域, 利用 Primer5.0 软件设计引物。在 Genbank 上用 BLAST 程序检测引物, 结果显示引物特异性较高。引物由 TaKaRa 公司 (TaKaRa, 大连, 中国) 合成, 引物上游序列为 CACGCGGTGAGGCTTCTTAT, 下游序列为 CCATATTC AAGCGTTTCTTGAG, 产物大小为 523 bp。将 *S. salivarius* ATCC 13419 模式株 (阳性对照, 四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供), 临床株 HS_01 和 HS_02 置于 BHI 琼脂培养基 37 °C 复苏, 兼性厌氧培养 24 h 后传代, 接种于液体 BHI 培养基, 37 °C 兼性厌氧培养 12 h, 调节菌液终浓度为 5 × 10¹¹ CFU/L 备用。细菌总 RNA 抽提按 Trizol 总 RNA 抽提试剂说明进行, 逆转录 cDNA 采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒, PCR 采用 TaKaRa 公司的 Premix Taq[®] Version 2.0 试剂进行, 扩增获得的 PCR 产物送至 TaKaRa 宝生物 (大连) 有限公司进行 DNA 序列测定, 测序结果与 Genbank 中 *S. salivarius* ATCC 25975 的 *clpP* 基因序列进行比较, 用 Clustal 软件进行序列比对。结果证明 *S. salivarius* 的标准株及临床株中存在 *clpP* 基因, 获得 *clpP* 基因的核苷酸序列。

1.2.3 高温下 *S. salivarius* 中 *clpP* 基因表达 以 *S. salivarius* 的 16S 基因为内参, 检测在 37 °C 和将温度提高到 55 °C 作用 2 h 后 *S. salivarius* ATCC 13419 模式株、临床株 HS_01 及 HS_02 中 *clpP* 基因的基因表达水平, 根据 3 个样本的 *clpP* 基因片段的核苷酸序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物 (表 1), 在 Genbank 上用 BLAST 程序检测引物特

表 1 3 株 *S. salivarius* 中 *clpP* 及内参基因 PCR 扩增引物序列及产物大小

Tab. 1 PCR amplification primer sequences and product sizes of *clpP* and internal reference genes in 3 strains of *S. Salivarius*

引物名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
<i>S. salivarius</i> ATCC 13419	ATGGCAGCATCTATGGGAACA	133
	CCATGTCTGTTTGTTCGCTACC	
HS_01	CAAACCTCAATTATCGCCCAACTC	119
	TGTATCAACAATGGCAAGACCTG	
HS_02	ATGGCAGCATCTATGGGAACA	133
	CCATGTCTGTTTGTTCGCTACC	
16S 内参	GGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	121
	CCACTCTCACACTCGTCTTGAC	

异性,结果显示其与 *clpP* 基因的匹配率最高。引物由 TaKaRa 公司(TaKaRa, 大连, 中国)合成。实时荧光定量 PCR 反应采用 TaKaRa 公司的 SYBR *Premix Ex Taq*TM II(Perfect Real Time) 试剂盒进行。以上步骤重复 3 次。实验结果用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

1.3 统计学分析

实验结果使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 高温下分离纯化唾液中 *S. salivarius*

10 例唾液样本经 55 °C 高温培养后,观察仅有 2 号和 6 号样本有菌落生成,每次生成菌落 < 5 个,重复性高。经形态学观察、革兰染色及生理生化检测筛选后,2 号和 6 号样本均成功分离纯化到 1 株菌株,初步鉴定为 *S. salivarius*,分别编号为 HS_01 和 HS_02,并进一步行 16S rDNA 序列测定。

2.2 临床株的 16S rDNA 扩增及序列测定

16S rDNA 基因序列分析显示,HS_01 和 HS_02 的 16S rDNA 基因序列长度均为 1 462 bp。将 HS_01 和 HS_02 测定序列提交到 Genbank,获得登录号分别为 HS_01(Genbank: HQ877765) 和 HS_02(Genbank: HQ877766)。

2.3 构建系统发育树

从 16S rDNA 构建的系统发育树可见(图 1), HS_01 和 HS_02 与 *S. salivarius* ATCC 7073 分在同一个簇中。而 *S. salivarius* 在这些链球菌中,与嗜热链球菌的亲缘关系最接近。BLAST 序列比对结果显示,HS_01 与 *S. salivarius* ATCC 7073(Genbank: AY188352) 序列的同源性为 100%, HS_02 与 *S. salivarius* ATCC 7073 同源性为 99%,最终可鉴定以上两个临床株均为 *S. salivarius*。

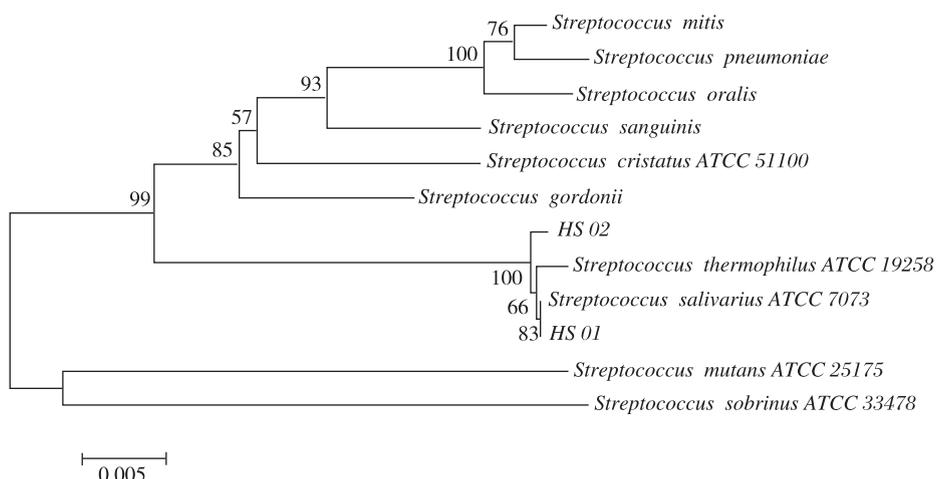


图 1 2 株唾液样本分离的临床菌株 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of clinical strain 16S rDNA gene sequence from two saliva samples

2.4 *clpP* 基因片段克隆及测序分析

将 *S. salivarius* ATCC 13419 模式株、临床株 HS_01 及 HS_02 样本的 *clpP* 基因进行 PCR 扩增、并对产物纯化后进行 DNA 序列测定,最后用 Clust-

al 软件比对 3 个样本的 *clpP* 基因片段核苷酸序列与 *S. Salivarius* ATCC 25975 *clpP* 基因的核苷酸序列,结果显示 *S. Salivarius* ATCC 25975 的 *clpP* 基因全长为 591 bp, *S. Salivarius* ATCC 13419 模式

株、临床株 HS_01 及 HS_02 的 *clpP* 基因克隆片段长度分别为 525、525 及 524 bp;BLAST 比对结果显示, *S. salivarius* ATCC 13419、HS_01 及 HS_02 的

clpP 基因片段与 *S. Salivarius* ATCC 25975 的 *clpP* 基因片段的同源性分别为 100%、97% 及 99%,提示 3 个样本中的 *clpP* 基因均扩增成功。见图 2。

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

ATCC 13419          -----TCACGCGGTGAGGCTTCTTATGATATTTACTCA 33
HS_02              -----CACGCGGTGAGGCTTTTTATGATATTTACTCA 32
ATCC 25975         ATGATTCCTGTAGTAATTGAACAAACATCAGCGGTGAGGCTTCTTATGATATTTACTCA 60
HS_01              -----TCACGCGGTGAGGCTTCTTATGATATTTACTCA 33
                    *****
                    *****

ATCC 13419          CGTTTGCTCAAGGATCGTATCATCATGTTAACAGGTCCTGTTGAAGATAAATATGGCAAAC 93
HS_02              CGTTTGCTCAAGGATCGTATCATCATGTTAACAGGTCCTGTTGAAGATAAATATGGCAAAC 92
ATCC 25975         CGTTTGCTCAAGGATCGTATCATCATGTTAACAGGTCCTGTTGAAGATAAATATGGCAAAC 120
HS_01              CGTTTGCTCAAGGATCGTATCATCATGTTAACAGGTCCTGTTGAAGATAAATATGGCAAAC 93
                    *****

ATCC 13419          TCAATTATTGCCCAACTCTTGTITTTGGATGCTCAAGACAATACAAAAGATATCTATCTTT 153
HS_02              TCAATTATTGCCCAACTCTTGTITTTGGATGCTCAAGACAATACAAAAGATATCTATCTTT 152
ATCC 25975         TCAATTATTGCCCAACTCTTGTITTTGGATGCTCAAGACAATACAAAAGATATCTATCTTT 180
HS_01              TCAATTATTGCCCAACTCTTGTITTTGGATGCTCAAGACAATACAAAAGATATCTATCTTT 153
                    *****

ATCC 13419          TATGTTAATACACCAGGTGGATCCGTTTCGGCTGGTCTTGCCATTGTTGATACAATGAAC 213
HS_02              TATGTTAATACACCAGGTGGATCCGTTTCGGCTGGTCTTGCCATTGTTGATACAATGAAC 212
ATCC 25975         TATGTTAATACACCAGGTGGATCCGTTTCGGCTGGTCTTGCCATTGTTGATACAATGAAC 240
HS_01              TATGTTAATACACCAGGTGGATCCGTTTCGGCTGGTCTTGCCATTGTTGATACAATGAAC 213
                    *****

ATCC 13419          TTCATCAAAGTCTGATGTTTCAGACTATCGTTATGGGGATGGCAGCATCTATGGGAACAGTT 273
HS_02              TTCATCAAAGTCTGATGTTTCAGACTATCGTTATGGGGATGGCAGCATCTATGGGAACAGTT 272
ATCC 25975         TTCATCAAAGTCTGATGTTTCAGACTATCGTTATGGGGATGGCAGCATCTATGGGAACAGTT 300
HS_01              TTCATCAAAGTCTGATGTTTCAGACTATCGTTATGGGGATGGCAGCATCTATGGGAACAGTT 273
                    *****

ATCC 13419          ATCGCTTCCAGCGGTACCAAAGGTAAACGTTTCATGTTGCCAAATGCAGAGTACATGATT 333
HS_02              ATCGCTTCCAGCGGTACCAAAGGTAAACGTTTCATGTTGCCAAATGCAGAGTACATGATT 332
ATCC 25975         ATCGCTTCCAGCGGTACCAAAGGTAAACGTTTCATGTTGCCAAATGCAGAGTACATGATT 360
HS_01              ATCGCTTCCAGCGGTACCAAAGGTAAACGTTTCATGTTGCCAAATGCAGAGTACATGATT 333
                    *****

ATCC 13419          CACCAACCAATGGGCGGTACTGGTGGCGGTACGCAACAAACAGACATGGCTATCGCAGCT 393
HS_02              CACCAACCAATGGGCGGTACTGGTGGCGGTACGCAACAAACAGACATGGCTATCGCAGCT 392
ATCC 25975         CACCAACCAATGGGCGGTACTGGTGGCGGTACGCAACAAACAGACATGGCTATCGCAGCT 420
HS_01              CACCAACCAATGGGCGGTACTGGTGGCGGTACGCAACAAACAGACATGGCTATCGCAGCT 393
                    *****

ATCC 13419          GAACACTTGCTCAAGACACGTAATAATTTGGAGCAAATCTTGGCAGATAAATCTGGACAA 453
HS_02              GAACACTTGCTCAAGACACGTAATAATTTGGAGCAAATCTTGGCAGATAAATCTGGACAA 452
ATCC 25975         GAACACTTGCTCAAGACACGTAATAATTTGGAGCAAATCTTGGCAGATAAATCTGGACAA 480
HS_01              GAACACTTGCTCAAGACACGTAATAAATCTTGGAGCAAATCTTGGCAGATAAATCTGGACAA 453
                    *****

ATCC 13419          CCAATTGAAAAAGTTCATGTAGACGCTGAACGTGACAATTTGGATGAGTGTCTCAAGAAACG 513
HS_02              CCAATTGAAAAAGTTCATGTAGACGCTGAACGTGACAATTTGGATGAGTGTCTCAAGAAACG 512
ATCC 25975         CCAATTGAAAAAGTTCATGTAGACGCTGAACGTGACAATTTGGATGAGTGTCTCAAGAAACG 540
HS_01              CCAATTGAAAAAGTTCATGTAGACGCTGAACGTGACAATTTGGATGAGTGTCTCAAGAAACG 513
                    *****

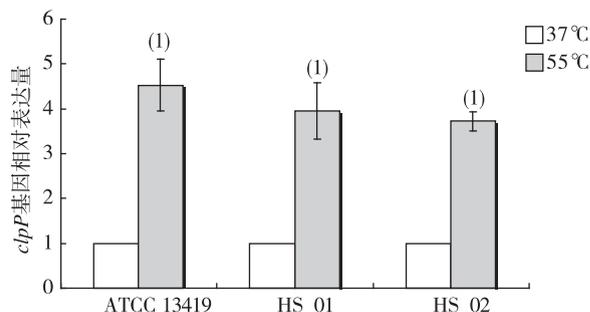
ATCC 13419          CTTGAATATGGA----- 525
HS_02              CTTGAATATGGA----- 524
ATCC 25975         CTTGAATATGTTTCATCGATGAAATCATGGCTAATAACCAATTAATAA 591
HS_01              TTTGAATATGGA----- 525
                    *****
    
```

图 2 *S. salivarius* ATCC 13419、HS_01、HS_02 及 *S. Salivarius* ATCC 25975 的 *clpP* 基因核苷酸系列比对结果

Fig. 2 Comparison of *clpP* gene nucleotide sequences in *S. salivarius* ATCC 13419, HS_01, HS_02 and *S. Salivarius* ATCC 25975

2.5 高温下 *S. Salivarius* 中 *clpP* 基因表达

如图 3 所示, *S. salivarius* ATCC 13419 模式株、临床株 HS_01 及 HS_02 中 *clpP* 基因在 55 °C 刺激 2 h 后的表达水平均高于 37 °C 时表达水平, 分别达到 4.53 ± 0.58 倍、 3.96 ± 0.63 倍及 3.72 ± 0.22 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



(1) 与 37 °C 比较, $P < 0.05$

图 3 热刺激对 *S. salivarius clpP* 基因表达的影响

Fig. 3 Effect of thermal stimulation on the expression of *clpP* gene in *S. salivarius*

3 讨论

温度是影响生物生命活动的最重要的环境因子之一。一般能在 45 °C 以上生长和繁殖的细菌可称为高温菌, 主要包括部分细菌, 古菌和真菌^[10]。ClpP 存在于细菌和真核生物中, 除了柔膜细菌和部分真菌外^[11]。它是高度保守的丝氨酸蛋白酶。ClpP 最早发现于大肠杆菌中^[12]。ClpP 的结构有一个共同点: 它包含了 14 个亚单元, 有两个七瓣环形成一个圆柱样结构, 该结构围成一个大腔室内含蛋白酶的活性部位^[13]。ClpP 能形成 AAA + (ATP 酶联合不同细胞间的活性) 伴侣蛋白复合物, 它可以使底物变性以及通过轴孔把它们转移到蛋白酶的蛋白水解腔室中进行降解, 将蛋白降解成 7 ~ 8 个残基后从腔室中释放出来^[14]。

在革兰阳性细菌中, 应激基因分为 4 类^[15]。第一类, 编码经典的分子伴侣 (DanK, GroES 和 GroEL), 由具有高度保守的 CIRCE 操纵子序列 (TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA) 的 HrcA 抑制子控制。第二类, 编码一般的应激蛋白, 它们的表达需要 σ_B 应激 σ 因子。第三类, 热休克基因受 CtsR 抑制, CtsR 有一前一后重复的 7 个核苷酸序列 (A/GGTCAAANANA/GGTCAA)。第四类, 不受 HrcA, σ_{Ba} 或 CtsR 所控制。ClpP 属于第三类热休克

基因^[16]。Chastanet 等^[17]研究发现, 把枯草芽孢杆菌作为同源性宿主, 发现 *S. salivarius* 的 *clpP* 基因既受 CtsR 的负向调控, 同时也受 HrcA 抑制, 但当 *S. salivarius* 在 48 °C 的高温中生长时, CtsR 的负向调控不起作用。

Gaillot 等^[6]学者研究发现, 单核细胞增生性李斯特杆菌的 *clpP* 在 42 °C 条件下生长表达升高了 4 倍。再将野生株和敲除 *clpP* 的突变株置于 42 °C 条件下, 观察 20 h 发现, 对比野生株, 突变株的生长受到严重破坏, 几乎不能生长。突变株最高只能在 40 °C 下生长。还有研究发现, 将肺炎链球菌的 *clpP* 突变株分别置于 40 °C、42 °C、44 °C 观察 3 h, 发现随温度的升高, 菌株生长量是递减的^[18]。Msadek^[5]将枯草芽孢杆菌的模式株和敲除 *clpP* 基因的突变株, 同时放在 37 °C 和 54 °C 的环境下观察 5 h 并测定生长曲线。结果发现在 37 °C 和 54 °C 时模式株都能正常生长, 但突变株只能在 37 °C 下生长, 54 °C 时不生长。

Lemos 等^[8]学者研究发现, 变异链球菌 UA159 在受到 42 °C 热刺激 30 min 后, *clpP* 基因 mRNA 的水平升高了 3 倍, 而敲除 *clpP* 的变异链球菌突变株能够在 40 °C 以上生长, 但生长很慢, 在 42 °C 时有菌体被破坏的表现。把 *clpP* 缺陷突变株和野生株均置于 42 °C 的条件下观察了 8 h, 发现两种菌株都能生长, 但突变株生长量明显低于野生株。Kajfasz 等^[19]也有同样发现, 变异链球菌的 *clpP* 突变株在 42 °C 和 pH 5.5 的条件下, 生长很慢, 且最终达到的生长量比野生株低。为了更好的认识变异链球菌的 *clpP* 蛋白酶在细胞的自身调节中起的作用, Chattoraj 等^[20]学者用敲除 *clpP* 的突变株来进行转录组研究, 结果发现, 与野生株相比, 100 多个基因的表达水平上调或下调了, 其中有几种与应激相关的基因, 基因编码的细菌素以及许多转录因子也发生了改变。Liu T Y 等^[21]发现在 51 °C 热刺激时敲除 *clpP* 的枯草芽孢杆菌会严重损害 *sigI* 表达, 而 *sigI* 在热刺激时能对其自身表达及参与细胞壁稳态和耐热性的表达起正向调节作用。Xie F 等^[22]在电镜下观察敲除 *clpP* 的胸膜肺炎放线杆菌, 其表面较野生型菌株更粗糙和不规则且细胞体积会增大。在 52 °C 下培养 20 min 的胸膜肺炎放线杆菌野生株存活率为 81.4%, 而敲除 *clpP* 的突变株存活率仅为 50.5%, 表明 *clpP* 的缺失削弱了胸膜肺炎放线杆菌应对热休克的能力。在本研究中, 将 *S. salivarius* 置于 55 °C 下培养过夜, 光

镜下观察菌体胀大,同一条链上的菌体大小不一,与以往研究类似。Huang J 等^[23]研究发现敲除 *clpP* 的猪副嗜血杆菌突变株对于热、氧化和渗透压的抵抗力下降。Knudsen GM 等^[24]发现鼠伤寒沙门氏菌的 *clpP* 突变株在 10 °C 低温时生长也会受到严重影响,表现为针尖状菌落。以上研究充分说明 *clpP* 会对细菌的抗温度应激能力产生影响。

本研究在细菌初筛阶段先利用高温培养,再通过传统的微生物系统分类法,用选择性培养基培养唾液样本,根据细菌形态学以及生理生化检测,对待测菌种进行分离培养的粗筛后,在此基础上,结合 16S rDNA 序列分析法进一步准确鉴定获得 *S. salivarius* 临床株,结果准确可靠。进一步通过实时荧光定量 PCR 技术,测定 *S. salivarius* 的 *clpP* 基因在 37 °C 下培养以及 55 °C 高温刺激 2 h 后的相对表达量,结果发现 *S. salivarius* ATCC 13419, HS_01, HS_02 的 *clpP* 基因,在 55 °C 刺激 2 h 后的表达量均比 37 °C 时高。该结果与 Gaillot 等^[6]及 Lemos 等^[8]学者研究报道的 *clpP* 基因在热刺激下表达升高的研究结果相类似。根据实验结果推测,*S. salivarius* 在受到高温的刺激时,胞内可能产生异常蛋白,这时 *clpP* 蛋白酶的表达式及活性升高,来降解这些异常蛋白,使细菌在高温下还能够存活。尽管 *clpP* 有着高度的保守性,但它在不同细菌处于热休克时的表现和调节机制却是不同的。本研究初步探索了 *S. salivarius* 的 *clpP* 基因在不同温度下基因表达水平上的差异,结果对进一步研究 *S. salivarius* 的耐热机制和 *clpP* 基因应对高温刺激的作用机制打下了基础。

4 参考文献

- [1] BROCK T D, FREEZE H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile [J]. J Bacteriol, 1969, 98(1):289-297.
- [2] KAWAMURA Y, HOU X G, SULTANA F, et al. Determination of 16s rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2):406-408.
- [3] SEGAL G, Ron E Z. Regulation of heat-shock response in bacteria [J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 851:147-151.
- [4] FREES D, SAVIJOKI K, VARMANEN P, et al. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria [J]. Mol Microbiol, 2007, 63(5):1285-1295.
- [5] MSADEK T, DARTOIS V, KUNST F, et al. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation [J]. Mol Microbiol, 1998, 27(5):899-914.
- [6] GAILLOT O, PELLEGRINI E, BREGENHOLT S, et al. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(6):1286-1294.
- [7] FREES D, QAZI S N, HILL P J, et al. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence [J]. Mol Microbiol, 2003, 48(6):1565-1578.
- [8] LEMOS J A, BURNE R A. Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans* [J]. J Bacteriol, 2002, 184(22):6357-6366.
- [9] NAIR S, POYART C, BERETTI J L, et al. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest [J]. Microbiology, 2003, 149:407-417.
- [10] 和致中,彭谦,陈俊英. 高温菌生物学 [M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [11] WONG P, HOURY W A. Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells [J]. J Struct Biol, 2004, 146:79-89.
- [12] KATAYAMA-FUJIMURA Y, GOTTESMAN S, MAURIZI M R. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 1987, 262(10):4477-4485.
- [13] YU A Y, HOURY W A. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases [J]. FEBS Lett, 2007, 581(19):3749-3757.
- [14] CHOI K H, LICHT S. Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP [J]. Biochemistry, 2005, 44(42):13921-13931.
- [15] CHASTANET A, FERT J, MSADEK T. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria [J]. Mol Microbiol, 2003, 47(4):1061-1073.
- [16] NAIR S, DERRE I, MSADEK T, et al. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes* [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(4):800-811.
- [17] CHASTANET A, MSADEK T. ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria [J]. J Bacteriol, 2003, 185(2):683-687.