志贺菌福氏 2a入侵上皮细胞诱导表达的毒力相关基因筛选与鉴定*

史兆兴[①†] 王恒樑[①†] 胡 堃[②] 冯尔玲[①] 姚 潇[③] 黄留玉[①**]
苏国富[①] 黄培堂[①] 黄翠芬[①]

(①军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; ②山东师范大学生命科学学院, 济南 250014;
③西安交通大学环境化学工程学院, 西安 710049)

摘要 采用体内表达技术的研究策略筛选了志贺菌福氏 2a 侵入上皮细胞后诱导表达的基因, 用基因突变技术进一步对它们的功能进行了鉴定. 结果共筛选到 13 个胞内诱导基因, 其中 2 个 DNA 甲基化相关基因、1 个代谢相关基因、1 个转录调控基因、3 个插入成分、3 个反义转录体、3 个未知功能基因. 突变体分析发现, 3-甲基糖基化酶 II, 柠檬酸裂合酶的编码基因和未知功能基因 *wcaJ* 的突变体在细胞和动物感染实验中都显示其存活增殖能力的降低, 表明这些基因可能参与了志贺菌在上皮细胞内的存活和增殖. 同时也表明, 这种在上皮细胞内的存活增殖能力是志贺菌主要的毒力体现之一. 但是, 未知功能基因 *yaiC* 的突变体只在动物体内表现出明显的毒力缺陷, 在上皮细胞内没有明显的增殖缺陷, 这表明 *yaiC* 基因参与其他毒力作用机制. 研究结果对深入认识志贺菌的致病机理有重要意义.

关键词 志贺菌福氏 **2a** 体内表达技术 胞内诱导基因 毒力相关基因

福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)是发展中国家痢疾流行的主要致病菌株, 对人类健康和公共卫生造成了极大威胁. 我国科学家成功地完成了对志贺菌福氏 2a 301 株全基因组的测序[1,2], 获得了对志贺菌福氏 2a基因组水平的全面认识. 要想更深刻地认识志贺菌福氏 2a的致病机制, 需要用功能基因组学的研究手段全局性分析志贺菌全基因组中参与致病的基因.

志贺菌的致病是志贺菌与结肠细胞相互作用的结果, 此相互作用在痢疾的发病机制中起到关键作用[3]. 志贺菌的致病过程主要包括细菌在结肠粘膜侵入上皮细胞, 在肠上皮细胞中繁殖扩散, 引起肠上皮

2003-09-29 收稿, 2004-01-19 收修改稿
* 国家重大基础研究计划(批准号: G1999054103)和高技术研究计划(批准号: 2001AA215211)资助项目
** 联系人, E-mail: huangly@nic.bmi.ac.cn
† 同等贡献

的炎性反应，最终造成肠粘膜的破坏和脱落．致病的关键环节为志贺菌在上皮细胞中的存活繁殖，某些毒力相关基因(例如高亲和性磷酸转运基因*pstS*，操纵元调控基因*trpR*和可溶性裂解转糖基酶基因*sltY*)的诱导表达为志贺菌在上皮细胞中的存活繁殖提供了物质基础[4,5]．本文采用体内表达技术(*in vivo* expression technology，简称IVET)，以HeLa细胞感染实验为筛选模型，研究了志贺菌福氏 2a侵入上皮细胞后诱导表达的毒力相关基因．

1　材料和方法

1.1　菌株和质粒

本文所用的菌株和质粒见表 1．

表 1　菌株和质粒

菌株和质粒	特　性	文献或来源
菌株		
S_{17-1}λpir	*thi*-1 *thr leu tonA lacY supE recA*::*RP4*-2-*Tc*::*Mu*, Sm^r, λpir	C. A. Guzman
MC1061	*hsdR2 mcrB araD139* Δ*(ara ABC-leu)*7679 Δ*lacX74 galU galK rpsL thi*, Sm^r	本实验室
2457T	*S. flexneri 2a*毒株, Nal^r	A. T. Maurelli
STD	Δ*asd*, 2457T衍生株, Nal^r	本实验室
STD21	STD/pASD21, Nal^r, Ap^r	本实验室
质粒		
pXL275	诱动型自杀质粒, *ori R6K*, *mob RK2*, *sacBR*, Cm^r	文献[6]
pXLasd	插入了无启动子序列的*asd*基因的pXL275, Cm^r	本研究
pASD21	插入了*asd*基因的pUC18, Ap^r	文献[7]
pKNAC6	插入了组合基因片段(5′*asd*末端-*ctxB*-3′*asd*末端)的pXL275, Cm^r	文献[7]
pMT999	温度敏感型RP4 衍生质粒, Km^r, Tc^r, Ap^r, Hg^r	本实验室

1.2　分子生物学操作

基因组DNA制备、部分酶切以及其他常规分子生物学方法见文献[8]．

1.3　HeLa细胞感染实验[9]

人子宫上皮细胞株HeLa细胞培养在含有 10% FBS无支原体感染的RPMI-1640 培养基中．用感染实验筛选文库时，总文库分成 40 个小库(每个小库约含 1000 个克隆)，每个小库分别进行实验．按照细胞：细菌数量=10^6：10^8的比例混合，37℃作用 3 h，PBS洗涤 3 次感染后的细胞，加入新鲜培养基(含 20 μg/mL 的庆大霉素)以杀死细胞外的细菌，筛选文库的具体条件按照文献[10]进行．用野生型福氏 2a 2457T和STD21 作对照感染HeLa细胞，进行染色检查．用甲醇：冰醋酸(3：1)固定 15 min，Giemsa染色 10 min，检测HeLa细胞中细菌的数量(每个细胞内含有细菌数约 10 个)．

1.4　结合转移克隆

为了把整合在染色体上的重组质粒从染色体上脱落下来，按照文献[11]的方法进行，略有改进．将过夜培养的供体菌(从文库中筛选到的菌株，Nal^r和Cm^r)、辅助菌(MC1061/pMT999，Ap^r，Hg^r，Tc^r和Km^r)和受体菌(S_{17-1}λpir，Sm^r)按照 2：2：1(*v*/*v*/*v*)的比例混合 3 种菌株，涂布于含二氨基庚二酸(DAP，*asd*基因营养缺陷株必需的氨基酸)的LB培养基上，30℃温育 6~8 h，用培养液洗下混合菌苔，稀释适当浓度后，在含Cm和Sm的LB培养基上筛选重组子．

1.5　序列测定与生物信息学分析

酶切初步鉴定的重组质粒用于双向测定插入片段的序列，测序服务由上海博亚生物技术有限公司提供．用 BLAST 程序搜索测序片段对应基因，并根据大肠杆菌启动子序列(包括–10 区序列 TATAAT 和 –35 区序列 TTGACA)预测基因测序部分的体内诱导启动子序列．

1.6　胞内存活实验

用感染实验检测突变体胞内的存活增殖能力，将野生型 2457T(作为阳性对照)、突变体菌株和大肠杆菌 MC1061(作为阴性对照)分别按照上述细胞/细菌比例混合，感染细胞，用含庆大霉素(20 μg/mL)的培养基孵育 45 h 后，收集细胞(3000×*g* 离心 10 min)，用 0.1%去氧胆酸钠破碎细胞以释放胞内细菌，活菌计数．实验重复 3 次．用 *Dunnett t* 检验分析实验数据．

1.7　竞争性实验

竞争性实验可以反映菌株毒力大小的变化，而小鼠肺感染模型是评价志贺菌致病性强弱的常规模型[12]．单独用野生型菌株 2457T鼻滴小鼠后 24 h，小

鼠出现早期的急性支气管炎, 解剖小鼠发现, 肺组织明显地充血. 在进行竞争性实验时, 过夜培养的突变体菌株和MC1061(阴性对照)分别与 2457T等体积混合, 并用PBS洗 1 次. 待麻醉的BALB/c小鼠(购自军事医学科学院动物中心)处于深度昏迷状态, 鼻腔滴注 20 μL菌液. 根据不同菌株的抗性, 分别计算出混合菌液中不同菌株的数目. 攻毒 24 h后, 取小鼠的肺, 分别计算小鼠肺组织内不同菌株的活菌数. 根据文献[13]计算竞争性指数的方法, 计算各突变体菌株的竞争性指数. 每组 10 只小鼠, 实验重复 3 次. 用*sign*检验分析实验数据.

2 结果

2.1 志贺菌福氏 2a *asd* 基因融合文库的构建

志贺菌 *asd* 基因编码天冬氨酸半醛脱氢酶, 是细菌二氨基庚二酸(DAP)合成途径的关键酶, 而DAP是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分. 因此, *asd*基因的缺失导致菌株的生长依赖DAP. 为了构建福氏 2a *asd*基因融合文库, 用全菌PCR从野生型福氏 2a 2457T中扩增出无启动子序列的*asd*基因, 与自杀载体pXL275 连接, 得到重组质粒pXLasd. 再从福氏 2a菌中分离基因组DNA, 用*Sau3A* Ⅰ部分酶切后得到约 2 kb的随机片段, 将它们插入重组质粒pXLasd中*asd*基因上游的*Bam*H Ⅰ位点, 将重组质粒pXLasd::X电击转化入大肠杆菌$S_{17\text{-}1}\lambda$pir. 经随机挑取 20 个克隆, 酶切鉴定表明重组率约为 96%. 将上述电击转化获得的全部转化子与福氏志贺菌STD(*asd*基因的营养缺陷株)结合转移, 在含有Cm, Nal和DAP的固体培养基上筛选克隆, 最终得到志贺菌福氏 2a *asd*基因的融合文库. 文库约有 40000 个克隆, 约覆盖基因组 8 倍. 在该文库中pXLasd::X都整合在福氏 2a STD菌的染色体上. 整个文库的构建过程见图 1.

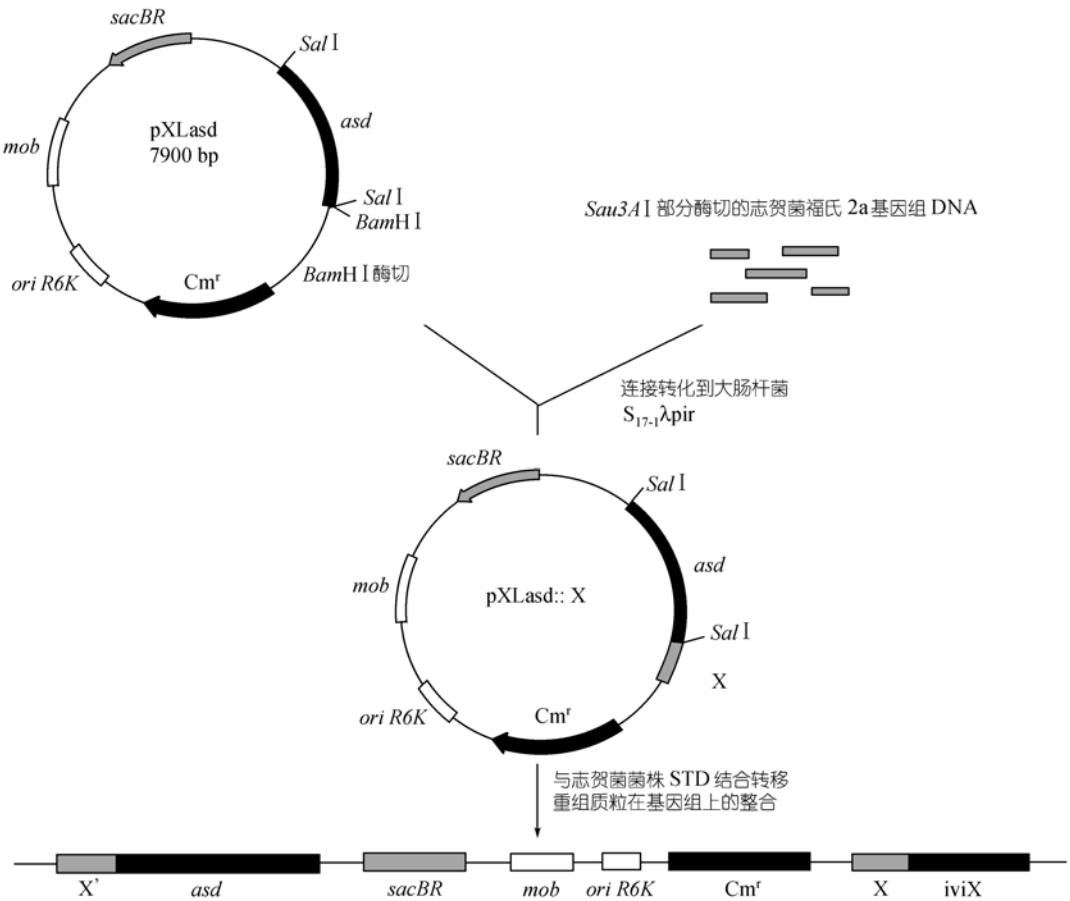

图 1 志贺菌福氏 2a *asd* 基因融合文库的构建

2.2　胞内诱导启动子的筛选和胞内诱导基因的鉴定

胞内诱导基因是指细菌在组织细胞内被诱导启动子激活表达的、而在体外不表达的基因. 本研究用 HeLa 细胞感染实验对福氏 2a *asd* 基因融合文库筛选志贺菌只在上皮细胞内诱导表达、 胞外不表达的基因, 这个过程中, 只有表达 *asd* 基因的菌株才会在上皮细胞中存活并被筛选到, *asd* 基因不表达的菌株不会在上皮细胞内生存和繁殖. 能表达 *asd* 基因的重组菌表明在 *asd* 基因上游已捕获到志贺菌染色体上的启动子序列(图 1). 胞内筛选后, 还需要进行体外 DAP 的负筛选, 体外不依赖 DAP 能生长的克隆是捕获到组成性启动子, 体外依赖 DAP 才能生长的克隆才是只在上皮细胞内诱导表达的, 最后筛选到约 400 个胞内诱导表达的克隆. 在整个筛选过程中, 我们发现胞内筛选前约有 31.9%的克隆体外生长不依赖 DAP, 胞内筛选后, 不依赖 DAP 的克隆上升到 65%, 表明胞内筛选十分有效. 因为体外生长不依赖 DAP 的克隆百分比高是由于胞内筛选时去除了胞内不能诱导表达 *asd* 基因的菌株. 筛选到的菌株是重组质粒整合到志贺菌基因组后形成的融合菌株. 为了对这些诱导表达 *asd* 基因的融合菌株进行研究, 用结合转移克隆方法重新诱动环化, 使融合在基因组上的重组质粒脱落下来, 得到了环形的重组质粒. 经酶切鉴定, 共有约 100 个克隆酶切片段大小不同. 测定插入片段的序列后, 进行 BLAST 和启动子序列分析, 结果见表 2. 共筛选到胞内诱导基因 13 个, 包括参与代谢、DNA 修复、基因水平转移和转录调控的基因 10 个, 未知功能基因 3 个.

2.3　胞内诱导基因的功能分析

为了评估胞内诱导基因在志贺菌致病中的作用, 从筛选到的 13 个胞内诱导基因中选择了 8 个构建插入突变体. 根据基因的序列, 分别设计引物, 扩增出每个基因阅读框内部约 500 bp 的片段, 连接到自杀载体 pXL275, 将重组自杀质粒转化到野生型福氏志贺菌 2457T, 抗生素(Cm 和 Nal)筛选得到基因插入失活的突变体. 所有突变体均用 PCR 方法证实重组自

表 2　福氏 2a 2457T 侵入上皮细胞后筛选到的胞内诱导基因

菌　株	阅读框大小和可能的启动子序列			基因组位置	基因描述
	大小/bp	区域	序列		
S0401	819	–35	TTAATC	染色体	插入成分(*IS600*)
		–10	TTGAA		
S0302	276	–35	TTACTG	染色体	插入成分(*insA*)
		–10	TTTAAG		
S0304	804	–35	CTGACT	染色体	*agaC* 基因的反义转录体
		–10	TAATAT		
S2401	2301	–35	TAGAAT	染色体	转录调控蛋白(*hypF*)
		–10	GATA		
S0509	711	–35	TGAACA	毒力质粒	腺嘌呤 DNA 甲基转移酶(*CP0198*)
		–10	TATT		
S0501	411	–35	TAGACT	染色体	插入成分(*IS2*)
		–10	TATCA		
S1104	1059	–35	TTGCAA	染色体	柠檬酸裂合酶(*citC*)
		–10	TACTAT		
S1201	1116	–35	TTCATA	染色体	未知功能基因 (*yaiC*)
		–10	TATAAT		
S1601	807	–35	TTTATG	染色体	未知功能基因(*ygdL*)
		–10	TTTAAT		
S2504	849	–35	TTATGCT	染色体	3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 II (*alkA*)
		–10	ATGAAT		
S1622	1578	–35	TTTATA	染色体	*guaA* 基因的反义转录体
		–10	AATAAG		
S3410	1374	–35	TAATCA	染色体	*cysG* 基因的反义转录体
		–10	TTAATT		
S3605	1395	–35	TTCTGA	染色体	未知功能基因(*wcaJ*)
		–10	TAATAA		

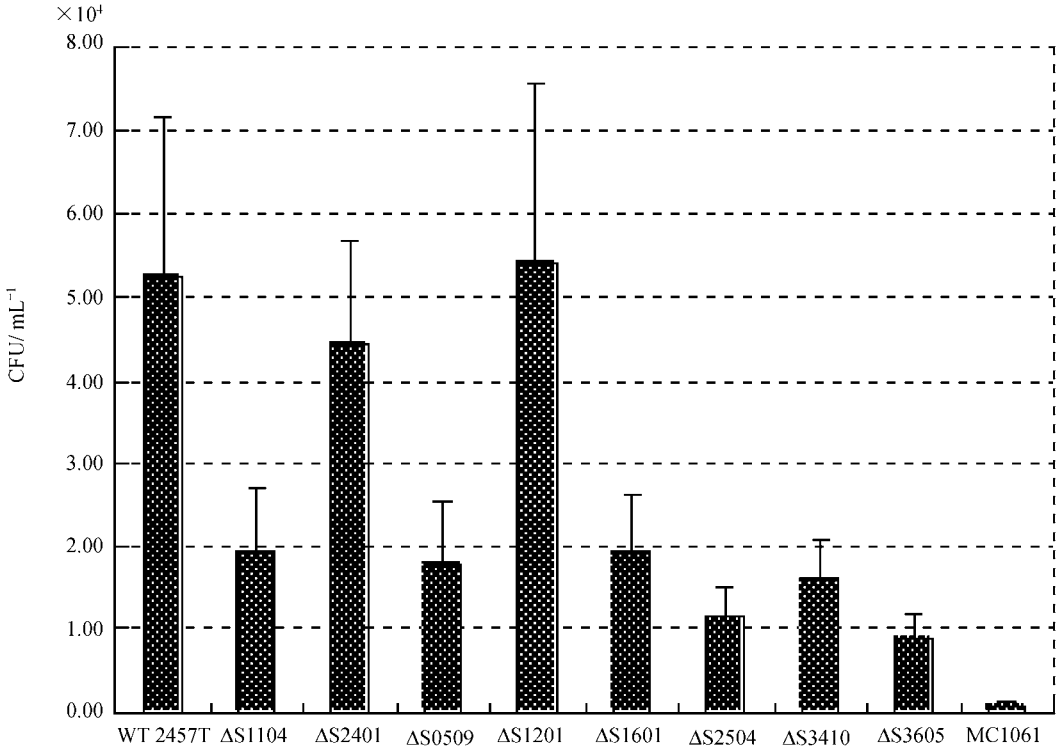

图 2 福氏志贺菌突变体菌株侵入上皮细胞后的存活增殖力

杀质粒整合于志贺菌基因组上, 基因阅读框被重组质粒分开, 没有完整的阅读框.

用 HeLa 细胞感染实验分析了突变体在上皮细胞中的存活增殖能力, 结果见图 2. 突变体 ΔS3605, ΔS2504, ΔS0509, ΔS1601, ΔS3410 和 ΔS1104 的胞内 CFU 水平明显低于野生型菌株 2457T, 表明这些突变体在上皮细胞内的存活增殖能力明显降低. 为了进一步确认上述结果, 用 HeLa 细胞感染实验进行了竞争性分析, 将野生型志贺菌福氏 2a 2457T 和突变体菌株等体积混合后感染 HeLa 细胞, 计算各突变体的竞争性指数(表 3). 在感染实验中显示存活能力降低的 6 个突变体菌株在竞争性分析中其竞争性指数明显低于 1, 进一步证实了此 6 个突变体在上皮细胞中存活增殖能力很弱.

用小鼠肺感染实验分析了 5 个突变体在动物整体中的存活增殖能力, 各突变体的竞争性指数总结在表 3 中. 5 个突变体均显示不同程度地增殖缺陷, 其中 ΔS3605 的竞争性指数和阴性对照一致, 表明此突变体几乎没有竞争性增殖能力. 另外, 突变体 ΔS1201 也显示了明显地增殖缺陷, 但在 HeLa 细胞感染实验中没有显示明显地存活增殖能力的降低, 其原因还有待进一步研究.

表 3 福氏志贺菌突变体菌株的竞争性分析

菌 株	竞争性指数 (CI) [a]	
	BALB/c 小鼠感染	HeLa 细胞感染
ΔS3410	0.48±0.21#	0.52±0.13#
ΔS1201	0.27±0.22#	1.29±0.09
ΔS3605	0.02±0.01#	0.18±0.08#
ΔS1104	0.37±0.25#	0.51±0.09#
ΔS2504	0.23±0.05#	0.22±0.13#
ΔS0509	–	0.34±0.10#
ΔS1601	–	0.37±0.15#
ΔS2401	–	0.84±0.16
MC1061	0.03 ± 0.02#	0.02±0.01#

a) 竞争性指数是指突变体菌株和野生型菌株按照 1∶1 比例混合侵染细胞或动物后回收到的突变体菌株和野生型菌株之比. #示 $P<0.0078$; –示未实验

3 讨论

志贺菌侵入结肠上皮细胞内增殖和扩散是其致病的关键环节之一. 在此过程中已经鉴定到的诱导表达基因包括: 代谢相关基因(*uhpT*, *bioA*, *lysA*, *sltY*, *yrbH*, *ppC*和*hemB*)、调控基因(*sufA*, *sitA*, *fhuA*, *acp*和*trpR*)、转运相关基因(*accBC*, *pstS*和*phoA*)和插入成分(*IS600*, *IS2* 和*issfl4*)[4,5]. 本文采用体内表达技术研究了福氏志贺菌入侵上皮细胞后诱导表达的基因, 并用突变体技术评价了胞内诱导基因在上皮细胞内存活增殖能力和在动物体内的竞争力. 构建的 8 个突变体中有 7 个突变体显示增殖缺陷, 表明这 7 个胞内诱导基因可能与志贺菌致病毒力相关. 现重点对这 8 个胞内诱导基因分类分析如下.

(1) DNA甲基化相关基因*alkA*和*CPO198*: DNA甲基化的合适水平可能对福氏志贺菌致病毒力的保持起到重要作用. DNA甲基化是调控基因表达的重要方式. 当福氏志贺菌侵入上皮细胞后, 为维持其致病力, 通过DNA甲基化诱导调控多个基因的表达, 但过多的甲基化往往造成DNA的甲基化损伤. *CPO198* 基因编码DNA甲基转移酶, 涉及DNA甲基化, 调控基因的表达. 而*alkA*基因在大肠杆菌中被确定为诱导表达基因, 编码 3-甲基糖基化酶 II, 参与甲基损伤DNA的修复反应[14]. 这两个基因的突变体在细胞和动物感染实验中均显示存活增殖力的缺陷, 表明甲基化水平的过高、过低都会影响志贺菌的毒力.

(2) 代谢相关基因*citC*: *citC*基因编码柠檬酸裂合酶, 是三羧酸循环中的第 3 个酶. 三羧酸循环中的酶活性在很多情况下都是诱导表达的[15]. 枯草杆菌柠檬酸裂合酶基因的缺失, 使得枯草杆菌孢子形成阻断在 I 期, Matsuno等人[16]认为*citC*基因的诱导表达降低了柠檬酸的合成, 从而抑制了孢子的形成. 在志贺菌中, *citC*基因的突变体ΔS1104 显示了明显的增殖力下降, 表明*citC*基因对志贺菌在上皮细胞中存活增殖是很重要的. 这可能是因为志贺菌要在缺乏营养的上皮细胞中生存增殖需要合成特定的营养成分, 从而诱导*citC*基因表达, 增加合成代谢. 但由于三羧酸循环中的其他酶没有筛选鉴定为诱导表达基因, 这一推测仍有待进一步实验证实.

(3) 转录调控基因 *hypF*: *hypF* 鉴定为胞内诱导基因, 编码一转录调控蛋白, 在上皮细胞内的诱导表达可能调控志贺菌毒力相关基因的表达. 但是, 其突变体在上皮细胞内不存在明显地增殖缺陷, 推测此基因不参与增殖相关基因的调控.

(4) 未知功能基因 *ygdL*, *wcaJ* 和 *yaiC*：HeLa 细胞感染实验共筛选鉴定到 3 个未知功能基因 *ygdL*, *wcaJ* 和 *yaiC*. *ygdL* 基因的突变体在上皮细胞中的增殖力降低, 可能参与志贺菌在上皮细胞中的存活和增殖. *wcaJ* 基因的突变体在细胞和动物体内的存活增殖能力都很低, 表明此基因与致病菌的毒力息息相关, 推测 *wcaJ* 基因编码 UDP-葡萄糖脂类载体转移酶, 可能参与转运脂质类成分, 而脂类物质与细菌的致病有一定的关系. 值得注意地是, *yaiC* 基因的突变体在细胞内没有显示增殖能力的降低, 而在动物体内竞争力大大降低, 表明此基因与细菌增殖无关, 可能参与细菌其他方面的毒力过程.

(5) *cysG*基因的反义转录体: 人们用IVET技术从不同致病菌中鉴定到了不同基因的反义转录体, 涉及O抗原的合成、膜孔蛋白的表达、氨甲酰代谢和趋化运动等不同功能的基因[13,17~19]. 这些基因反义转录体诱导表达的意义目前尚不清楚, 但推测与毒力相关基因的表达调控相关. 我们鉴定到 3 个基因的反义转录体, 分别是*cysG*(尿卟啉原 III 甲基化酶), *agaC*(PTS系统成分)和*guaA*(GMP合成酶)基因. 有报道*agaC*和*guaA*基因与细菌毒力相关, *cysG*基因在厌氧条件下诱导高表达, 其反义转录体的诱导, 可能用于调控*cysG*基因的表达. 针对此*cysG*基因的反义转录体构建的突变体在细胞和动物实验中存活增殖力的缺陷, 表明了此反义转录体与细菌毒力的关系. 这种反义转录体还可能是一种新型的RNA基因, 行使其独特的基因功能.

另外, 我们的实验筛选到 3 个插入成分*IS600*, *insA*和*IS2*. 插入成分与细菌毒力密切相关. 插入成分一般存在于毒力基因附近, 是致病岛的标志之一, 并参与基因的水平转移[20]. 插入成分本身可能存在启动子序列, 还可能在插入位点产生启动子序列, 这些启动子序列主要用于调控毒力基因的表达. 此外, 插入成分在致病岛剪切和整合过程中也起一定作用, 从而有利于致病菌适应不同的外界环境. 福氏志贺菌基因组序列中已经包含了不同的插入成分, 并参与了基因组的重排[1,21]. *IS600* 和*IS2* 已经报道为诱导表达基因[4,5], 我们的实验进一步证实了这一结论,

同时鉴定到插入成分*insA*也为胞内诱导基因.

值得注意地是, 我们筛选到的 13 个胞内诱导基因与已有报道的志贺菌诱导表达基因明显不同, 可能存在下列三方面的原因: (ⅰ) 采用的报告系统不同, 灵敏度存在一定的差异; (ⅱ) 实验筛选条件中诱导表达的时间不同, 诱导表达的基因可能不同; (iii) 采用了不同的菌株, 可能存在不同的基因表达模式. 另外, 在 13 个胞内诱导基因中有 12 个是染色体基因, 表明染色体基因也参与志贺菌的致病, 可能主要起到间接调控和维持细菌存活增殖的作用.

从上面的分析可以看到, 多数诱导基因参与志贺菌在上皮细胞中的存活和增殖, 这些方面需要从细菌与宿主的分子相互作用入手, 深入研究, 才可能发现新的毒力作用机制.

本文采用的是体内表达技术的研究策略, 其关键环节是诱导基因筛选模型的确定. 为了保证筛选诱导基因的可信性, 我们进行了大量的预实验(数据未显示), 最终才确定了筛选的模型和条件[10]. 同时, 我们和其他类似的研究[4,13,17~19]都表明, 体内表达技术是一个发现新毒力基因强有力的工具. 新毒力基因的发现和新型毒力作用特征的鉴定会加深对致病菌复杂致病机理的认识, 也会对预防和治疗相应疾病提供新的研究方向.

致谢 感谢英国伦敦 P. B. Rainy 教授在结合转移克隆方法上的技术指导和本课题组刘润艳、张慧萍在实验中的协助.

参 考 文 献

1 Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, Wang J, Liu H, Yang J, Yang F, Zhang X, Zhang J, Yang G, Wu H, Qu D, Dong J, Sun L, Xue Y, Zhao A, Gao Y, Zhu J, Kan B, Ding K, Chen S, Cheng H, Yao Z, He B, Chen R, Ma D, Qiang B, Wen Y, Hou Y, Yu J. Genome sequence of *Shigella flexneri 2a*: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli K12* and *O157*. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 4432~4441[DOI]

2 张继瑜, 刘 红, 张笑兵, 杨 剑, 杨 帆, 杨国威, 沈 岩, 侯云德, 金 奇. 志贺菌福氏 2a 毒力大质粒 DNA 全序列的测定与基因分析. 中国科学, C 辑, 2003, 33(1): 40~46

3 Fernandez M I, Sansonetti P J. *Shigella* interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. Int J Med Microbiol, 2003, 293: 55~67

4 Bartoleschi C, Pardini M C, Scaringi C, Martino M C, Pazzani C, Bernardini M L. Selection of *Shigella flexneri* candidate virulence genes specifically induced in bacteria resident in host cell cytoplasm. Cellul Microbiol, 2002, 4: 613~626[DOI]

5 Runyen-Janecky L J, Payne S M. Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. Infect Immun, 2002, 70: 4379~4388[DOI]

6 芮贤良, 徐永强, 王 红, 苏国富, 黄翠芬. 稳定、无抗药的痢疾福氏 2a 和宋内双价菌苗候选株的构建. 生物工程学报, 1996, 12: 134~139

7 王恒樑, 冯尔玲, 林 云, 廖 翔, 金 明, 黄留玉, 苏国富, 黄翠芬. 痢疾基因工程三价菌苗候选株的构建. 中国科学, C 辑, 2001, 31(5): 445~452

8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Habor Press, 1989

9 Niesel D W, Chambers C E, Stockman S L. Quantitation of HeLa cell monolayer invasion by *Shigella* and *Salmonella* species. J Clin Microbiol, 1985, 22: 897~902

10 史兆兴 王恒樑 胡 堃, 冯尔玲, 姚 潇, 苏国富, 黄留玉. 痢疾杆菌体内诱导基因筛选方法的建立. 生物技术通讯, 2003, 14(2): 97~100

11 Rainey P B, Heithoff D M, Mahan M J. Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusions involved in microbe-host interactions. Mol Gen Genet, 1997, 256: 84~87[DOI]

12 Mallett C P, VanDeVerg L, Collins H H, Hale T L. Evaluation of *Shigella* vaccine safety and efficacy in an intranasal challenged mouse model. Vaccine, 1993, 11: 190~196[DOI]

13 Camilli A, Mekalanos J J. Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. Mol Microbiol, 1995, 18: 671~683[DOI]

14 Furuichi M, Yu C G, Anai M, Sakumi K, Sekiguchi M. Regulatory elements for expression of the *alkA* gene in response to alkylating agents. Mol Gen Genet, 1992, 236: 25~32

15 Freese E, Marks C L. Developmental block in citric acid mutants of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1973, 116: 1466~1468

16 Matsuno K, Blais T, Serio A W, Conway T, Henkin T M, Sonenshein A L. Metabolic imbalance and sporulation in an isocitrate dehydrogenase mutant of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1999, 181: 3382~3391

17 Mahan M J, Slauch J M, Mekalanos J J. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science, 1993, 259: 686~688

18 Wang J, Mushegian A, Lory S, Jin S. Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 10434~10439[DOI]

19 Wu Y, Lee S W, Hillman J D, Progulske-Fox A. Identification and testing of *Porphyromonas gingivalis* virulence genes with a pPGIVET system. Infect Immun, 2002, 70: 928~937[DOI]

20 Hsu W B, Chen J H. The IS1 elements in *Shigella boydii*: horizontal transfer, vertical inactivation and target duplication. FEMS Microbiol Lett, 2003, 222: 289~295

21 Wei J, Goldberg M B, Burland V, Venkatesan M M, Deng W, Fournier G, Mayhew G F, Plunkett G, Rose D J, Darling A, Mau B, Perna N T, Payne S M, Runyen-Janecky L J, Zhou S, Schwartz D C, Blattner F R. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri serotype 2a* strain 2457T. Infect Immun, 2003, 42: 2775~2786[DOI]