

復旦大學

本科毕业论文



论文题目: Small RNA Mpr5 在耻垢分枝杆菌中的功能探索

姓 名: 钱心怡 学 号: 17307110345

院 系: 生命科学学院

专 业: 生物科学

指导教师: 张鹭 职 称: 副教授

单 位: 复旦大学生命科学学院

完成日期: 2021 年 5 月 26 日

Small RNA Mpr5 在耻垢分枝杆菌中 的功能探索

完成人

钱心怡

指导小组成员

张鹭 副教授

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景	1
1.2 结核分枝杆菌中的 sRNA 研究进展	2
1.2.1 结核分枝杆菌中 sRNA 的发现与作用机制	2
1.2.2 结核分枝杆菌的 sRNA 的作用机制研究进展	2
1.3 sRNA 分子伴侣和 sRNA 结构预测	4
1.4 其他分枝杆菌中 sRNA 研究进展	4
1.5 当前 sRNA 研究过程中常用的研究思路和技术方法进展	5
1.6 本研究的意义	6
二、材料与方法	7
2.1 材料	7
2.1.1 耻垢分枝杆菌	7
2.1.2 大肠埃希氏菌	7
2.1.3 质粒	7
2.1.4 引物	7
2.2 试剂	7
2.2.1 培养基	7
2.2.2 常用试剂	8
2.3 实验仪器	8

2.4 实验方法	9
2.4.1 耻垢分枝杆菌感受态的制备	9
2.4.2 菌种保存	9
2.4.3 耻垢分枝杆菌的电转化	9
2.4.4 大肠杆菌的转化	10
2.4.5 耻垢分枝杆菌生长曲线的测定	10
2.4.6 抗酸染色	10
2.4.7 耻垢分枝杆菌的饥饿培养	11
2.4.8 耻垢分枝杆菌的低氧培养	11
三、研究结果	12
3.1 诱导表达 Mpr5 的耻垢分枝杆菌菌株的构建	12
3.1.1 重组质粒的构建	12
3.1.2 重组菌株的构建	13
3.2 绘制生长曲线检测 Mpr5 不同表达水平对耻垢分枝杆菌群体生长的影响	13
3.3 绘制生长曲线检测 Sm74 不同表达水平对耻垢分枝杆菌群体生长的影响	13
3.4 Mpr5 不同表达水平对耻垢分枝杆菌形态的影响	14
3.5 特殊环境下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响	16
3.5.1 饥饿条件下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响	16
3.5.2 低氧条件下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响	17
四、讨论	18

4.1 Mpr5 可能参与压力应答与潜伏感染	18
4.2 结核分枝杆菌 sRNA 功能在分枝杆菌属中的保守性	18
4.3 饥饿与低氧实验中 Mpr-smeg 加入诱导剂后生长受到影响	19
4.4 Mpr5-smeg 中 Mpr5 的表达量有待 Northern blot 验证	19
附录	20
参考文献	21
致谢	23

摘 要

细菌小 RNA (sRNA) 是一种非编码调控 RNA, 可对胞内反应及细菌致病性进行调控, 其作用方式主要为碱基互补配对。目前, 一些 sRNA 已在分枝杆菌中得到验证和解析, 但相关研究仍存在大量空白。引起肺结核的结核分枝杆菌是一种成功的胞内感染细菌, 了解其 sRNA 的作用及机制将有助于疾病防控。Mpr5 是结核分枝杆菌中的一个 sRNA, 实验室前期筛选发现其在耻垢分枝杆菌中高表达可引起生长抑制。为探究其生理功能, 以耻垢分枝杆菌为研究对象, 构建并转入了可诱导表达 Mpr5 的重组质粒 Mpr5-pSI 得到重组菌株, 实现了 Mpr5 的诱导表达。正常培养条件下检测 OD₆₀₀ 值描绘生长曲线, 结果表明 Mpr5 高表达对细菌群体生长无显著影响。另外找到 Mpr5 在耻垢分枝杆菌中的同源序列 Sm74, 同样构建诱导表达菌株, 生长曲线显示 Sm74 高表达对细菌群体生长无显著影响。抗酸染色成片的光学显微镜观察显示, Mpr5 高表达对细菌形态无显著影响。将菌株分别接种于 PBS 模拟饥饿条件, 以及无空气的密封环境模拟低氧条件, 活菌计数结果都显示出 Mpr5 高表达引起活菌数的减少。这些结果暗示 Mpr5 可能参与应激反应。本研究对 Mpr5 的功能解析丰富了分枝杆菌中 sRNA 功能的鉴定, 进一步探索 Mpr5 的作用机制将有望找到新的靶点, 操纵结核分枝杆菌的胞内存活能力。

关键词: 非编码调控 RNA, 分枝杆菌, Mpr5, 环境胁迫

Abstract

Bacterial small RNA (sRNA) is one kind of non-coding regulatory RNAs that regulates intracellular reactions and bacterial pathogenicity. Its function is mainly based on complementary base pairing. At present, some sRNAs have been verified and analyzed in *Mycobacterium*, but there is still a large blank in relevant studies. *Mycobacterium tuberculosis*, which causes tuberculosis, is a successful intracellular infection bacterium. Understanding the role and mechanism of its sRNAs will be helpful for disease prevention and control. Mpr5 is one of the sRNAs in *Mycobacterium tuberculosis*, and our preliminary study found that high expression of Mpr5 in *Mycobacterium smegmatis* could cause growth inhibition. To explore its physiological function, *Mycobacterium smegmatis* was used as the research object, and a recombinant plasmid Mpr5-pSI which could induce the expression of Mpr5 was constructed and transferred into *Mycobacterium smegmatis*, realizing the induced expression of Mpr5. Under normal culture condition, OD₆₀₀ value was detected to plot the growth curve, and the results showed that the high expression of Mpr5 had no significant effect on the growth of bacterial population. In addition, the homologous sequence Sm74 of Mpr5 in *Mycobacterium smegmatis* was found, and the inducible expression strain was constructed in the same way. The growth curve showed that the high expression of Sm74 had no significant effect on the growth of bacterial population. Results of acid fast stain showed high expression of Mpr5 had no significant effect on the morphology of the bacteria. In addition, the strains were inoculated in PBS to simulate starvation condition and in airless sealed environment to simulate hypoxia condition, respectively. The viable count results showed that the high expression of Mpr5 caused the decrease of viable count under both conditions. These results suggest that Mpr5 may be involved in stress response. The functional analysis of Mpr5 in this study enriched the identification of the function of sRNAs in *Mycobacterium*, and further exploration of its mechanism is expected to find new targets to manipulate the intracellular viability of *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words : non-coding regulatory RNA, mycobacterium, Mpr5, environmental stresses

一、前言

1.1 研究背景

近年来, 在各类模式细菌中发现了大量非编码调控 RNA (non-coding regulatory RNA), 并证实了其在一定程度上参与胞内反应及其致病性的调控。与蛋白调控相比, 调控 RNA 的优点在于能量消耗少、调节速度快, 不需多余的翻译步骤等, 这样细菌可以更好地适应快速变化的外部环境, 如宿主体内产生的氧化应激、铁离子浓度的变化、pH 值变化、温度变化等, 可以作为接受外部信息的传感器或调节细菌生长和毒力的有效工具^[1]。非编码调控 RNA 通过改变自身构象、与其他 RNA 碱基配对或与其他蛋白质/DNA 相互作用来调节相关基因的转录或翻译来实现功能^[1]。

细菌小 RNA (small RNA, sRNA) 就是一种非编码调控 RNA, 长度从几十到几百个核苷酸不等^[2]。sRNA 主要分为反式编码 sRNA、顺式编码 sRNA 和与蛋白质结合的 sRNA 三类, 它们主要通过 mRNA 碱基互补配对和与蛋白质直接结合的方式在转录后水平对细菌发挥调控作用。顺式编码 sRNA 主要位于 mRNA 3' 和 5' 端非编码区。它们在外界刺激下如温度变化、停滞的核糖体、游离 tRNA 或一些配体等, 改变构象进而影响基因转录或翻译, 从而调控基因表达。目前研究最广泛的是反式编码 sRNA, 它们通过与靶 mRNA 发生不完全的碱基互补配对来调节靶 mRNA 的翻译过程和稳定性, 机制与真核生物 microRNA 类似^[2]。sRNA 可以感应外界环境压力, 通过转录后过程调控相关基因的表达, 改变细胞表型^[3], 在毒力因子调控、物质代谢、抗生素耐药性等方面发挥着重要作用^[2]。

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是引起人类结核病最主要的病原体, 是一种典型的细胞内感染细菌, MTB 成功感染的原因是它能逃脱巨噬细胞的吞噬作用, 成功地在巨噬细胞中生存并增殖^[4]。结核分枝杆菌感染宿主时, 细菌有激活和潜伏两种状态, 不同状态间的转换和免疫逃逸的完成要求细菌能够根据外界环境快速有效地做出反应, 其中调节 RNA 发挥着重要作用^[5]。分枝杆菌 sRNA 作为感应外界环境并在转录后水平发挥调控作用的 RNA 调控元件, 是一种重要的调节因子, 了解这些 sRNA 的作用和机制将有助于控制分枝杆

菌的毒力。但由于分枝杆菌生长周期长、生长条件苛刻，故对其 sRNA 的相关研究起步较晚^[2]。

1.2 结核分枝杆菌中的 sRNA 研究进展

1.2.1 结核分枝杆菌中 sRNA 的发现与作用机制

顺式编码的 sRNA 长度在<100bp 到几千 bp 之间，通常位于靶 mRNA 的反义链上，通过与靶 mRNA 特异性的碱基互补配对阻断核糖体进入和翻译。反式编码的 sRNA 不位于目标基因组位置，而主要位于基因间区，被认为与细菌应激和对宿主环境的适应密切相关。结核分枝杆菌的转录组分析表明，反义 RNA 和基因间区 sRNA 在结核分枝杆菌的对数期和平台期有不同的表达谱。对数期 65% 的基因具有反义成分，平台期 90% 以上的基因具有反义成分。RNase-III 调控的双链降解模型被认为是微量调节基因表达的一种通用方法。但这些只是生物信息学算法分析的结果^[6]。

2009 年首次验证了结核分枝杆菌编码的 5 个反式编码 sRNA (B11、B55、C8、F6 和 G2) 和 4 个顺式编码 sRNA (desA1、pks12、RV1726 和 Rv1890c)。该团队使用 ³²P-pCp 和 RNA 连接酶对结核分枝杆菌对数期和平台期小片段 RNA 的 cDNA 文库进行标记、分离和测序，并使用 Northern blot 和 RLM-RACE 技术验证了 sRNA 的存在。除了准确验证外，该团队还发现反式编码 sRNA 的表达量明显高于顺式编码 sRNA，且 sRNA 可能有多个 3' 端或 5' 端^[5]。

非编码 sRNA 可以通过阻断翻译起始位点或下游 mRNA 的翻译区域来抑制翻译，或者通过与 mRNA 结合形成稳定的结构以暴露翻译起始位点或干扰 Rho 依赖的终止子来促进翻译^[7]。虽然一些 sRNA 已经在结核分枝杆菌中被实验验证，但只有一小部分的生理功能和调节机制得到阐明。同时，一些 sRNA 在不同结核分枝杆菌菌株间也有不同的功能，例如 Mcr7 在 H37Rv 株中为非编码 sRNA，在 CDC1551 株中则编码两个小蛋白^[6]。

除了与 mRNA 相互作用外，分枝杆菌 sRNA 也可与蛋白质相互作用。例如耻垢分枝杆菌生长平台期高表达的 Ms1 可以直接与 RNA 聚合酶相互作用^[8]。

1.2.2 结核分枝杆菌的 sRNA 的作用机制研究进展

Mcr7 是第一个在结核分枝杆菌中阐明生理功能的 sRNA。它位于 Rv2395 和

PE_PGRS41 基因间区。Mcr7 受 PhoP 双组分信号转导系统调控，与基因 *tatC* 的 mRNA 翻译起始位点相互作用，从而抑制该蛋白的表达。TatC 是 TatABC 通用分泌系统的一部分，因此 Mcr7 进一步影响抗原 Ag85 和 β -内酰胺酶 BlaC 的分泌 [9]。

sRNA F6 (MTS194) 位于 Rv0243 和 Rv0244c 基因之间。模拟宿主免疫巨噬细胞内氧化应激实验发现，在过氧化氢刺激下， σ 因子 sigF 调控转录增加了 F6 的表达量^[10]。F6 在结核分枝杆菌中过表达导致菌株生长缓慢，而耻垢分枝杆菌中 F6 的过表达未引起明显的表型变化^[5]。F6 与 *fadA2* 基因上游序列共转录，在致病性分枝杆菌中高度保守，在非致病性分枝杆菌中保守程度较低^[5]。

与 F6 一样，B11 (也叫 6C 或 ncRv13660c) 在过氧化氢的诱导下表达增加^[5]。B11 通过 C-rich 环与多个靶 mRNA 结合，抑制多种细胞功能，如 DNA 复制和蛋白分泌^[11]。

位于基因间区的 sRNA Mcr11 (ncRv11264Ac) 被认为与小鼠模型中的细菌缓慢生长和慢性感染有关。Mcr11 的稳定表达需要包括 AbmR 在内的多个转录因子的参与。Mcr11 以 Rv3282/*fadA3*/*lipB3* 为靶点，进一步调控结核分枝杆菌在低氧环境中的脂肪酸应激活性。同时，Mcr11 也存在于慢生长菌牛结核分枝杆菌中^[12]。

MTS1338 (DrrS) 对结核分枝杆菌潜伏状态的进入和其在宿主巨噬细胞内的存活至关重要。IFN- γ 诱导宿主巨噬细胞产生 NO，在低氧环境的共同刺激下，DosR 转录调控因子调节 MTS1338 使其过表达，导致结核分枝杆菌转录组漂移，抑制细菌相关翻译和生长，使细菌进入休眠状态^[13, 14]。

Mpr4 (MTS2823) 在结核分枝杆菌的对数生长期高表达，在平台期表达量显著降低。它在许多分枝杆菌中是保守的。其高表达下调了一些与能量代谢相关的基因的表达，其中最显著的是参与甲基柠檬酸循环的 *prpC* 和 *prpD* 基因，使细菌在胞内生长过程中能获得一定的碳源^[6]。然而，目前尚不清楚 Mpr4 是否通过碱基互补配对以 mRNA 为靶点，或是否与蛋白相互作用来发挥调控。当结核分枝杆菌和耻垢分枝杆菌暴露在铁离子饥饿、氧化应激或膜刺激下，MrsI (ncRv11846) 及其同源 sRNA 直接与 *bfrA* 基因的 mRNA 相互作用，形成铁滞留状态^[15]。ncRv12559 (MTS2048) 与结核分枝杆菌感染过程中饥饿诱导的转录信号有关，

为监测感染和非复制滞留状态下的细菌饥饿提供了一个有用的生物标志物^[16]。

虽然已经在结核分枝杆菌中发现了许多 sRNA，并且其中少数 sRNA 的作用机制和生理功能得到了充分阐明，但是对于结核分枝杆菌 sRNA 的理解仍存在很大空白。

1.3 sRNA 分子伴侣和 sRNA 结构预测

在革兰氏阴性菌和一些 GC 含量较低的革兰氏阳性菌中，sRNA 和 mRNA 形成的双链结构依赖于 RNA 伴侣 Hfq 促进、稳定或进一步降解。Hfq 形成一个环面，利用其上四个暴露在外的表面与 sRNA 的 poly U 终止子结构和 mRNA 的 AU-rich 序列相互作用，使它们靠近并促进碱基配对^[17]。除 Hfq 外，另一个分子伴侣 ProQ 也存在于许多细菌中^[17]。

然而，Hfq 或 ProQ 在结核分枝杆菌中并未发现同源蛋白，可能的解释有三个。其一是结核分枝杆菌中有其他 RNA 分子伴侣，例如蛋白 Rv2367 是结核分枝杆菌中 RNA 分子伴侣的候选，因为其在中华根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）中的同源蛋白 YbeY 具有 RNA 分子伴侣的功能^[6]。第二种解释是结核分枝杆菌的 sRNA 内部有一个非常稳定的结构，允许它与目标 mRNA 不受干扰地相互作用。第三种可能是由于 sRNA 核心序列和 mRNA 本身 GC 含量高，更容易相互作用，例如通过 mfold 等生物信息学方法预测结核分枝杆菌中一些 sRNA 的二级结构，发现它们具有未配对的 C-rich 延伸，为强相互作用提供了条件^[6, 11]。Juntao Mai 验证了 6C sRNA (B11) 二级结构中的 C-rich 环对于其引起分枝杆菌生长抑制至关重要，为这一解释提供了证据^[11]。

1.4 其他分枝杆菌中 sRNA 研究进展

其他分枝杆菌中 sRNA 的发现和机制对结核分枝杆菌也有重要意义。广泛用于预防结核病的疫苗卡介苗与结核分枝杆菌的基因相似度是一个研究重点。耻垢分枝杆菌是研究结核分枝杆菌的重要模式菌株，因为它具有基因操作简单、无致病性和生长速度快等特点^[17]。

近年来高通量测序和组学技术快速发展，可以在分枝杆菌的转录组筛出大量 sRNA 候选，同时在卡介苗和耻垢分枝杆菌中已通过分子生物学实验的方法验证

了大量 sRNA 的存在,如前所述,一些 sRNA 的功能和作用机制已有明确的研究。

例如 Tsai 等^[18]利用 SIPHT(sRNA Identification Protocol using High-throughput Technologies) 算法和 ChIP-Seq 数据分析了 *Mycobacterium bovis* BCG 巴斯德株和 *Mycobacterium smegmatis* MC²155 株的候选 sRNA,并在随后的实验中成功验证了 *M. bovis* BCG 中的 23 个 sRNA 和耻垢分枝杆菌中的 17 个 sRNA。Sai Kam Li 等^[19]利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中异源 Hfq 固有的 sRNA 结合能力,通过高通量测序在耻垢分枝杆菌中鉴定出了 12 个靶向转座酶的顺式编码 sRNA 和 12 个反式编码 sRNA。

1.5 当前 sRNA 研究过程中常用的研究思路和技术方法进展

分枝杆菌中 sRNA 的发现总是从对分枝杆菌高通量测序数据的算法分析和筛选开始。通过生物信息学算法分析转录组测序数据,预测大量候选 sRNA,并与不同菌株的 RNA 分类信息数据库 (Rfam) 进行比较,同时结合微阵列芯片技术建立有效的转录组数据并验证其表达^[17]。然后利用 Northern blot 和 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 等分子生物学方法确定 sRNA 的存在和确切的基因组位置。

阐明 sRNA 功能的研究主要依赖于在各种应激条件下,或在 sRNA 过表达/缺失的情况下,使用微阵列进行转录组分析。随着高密度阵列技术的发展,这种技术变得越来越单一。CHIP-seq 技术与微阵列技术相结合可以更有效地预测 sRNA 的调控网络^[17]。RLI-seq (RNA interaction by ligation and sequencing) 技术可以捕获细菌中的 sRNA-target 相互作用关系,并进行高通量测序和后续分析,获得可靠的 sRNA-target 相互作用关系。

在其他细菌的 sRNA 研究中,紫外交联和免疫沉淀 (CLIP) 被用于体内 RNA-蛋白结合位点的深度测序检测。与 CHIP-seq 不同,CLIP-seq 提供了特异的单链数据,可以更好地阐明特异性的单链结合。其他方法如报告基因融合 (GFP, LacZ, Luc)、体外 RNA-RNA 足迹和指纹法也被用于研究 sRNA 互作。sRNA 可用于基因工程、生物合成、生物标记或靶向治疗,具有广泛的应用前景。

1.6 本研究的意义

目前,许多 sRNA 已在结核分枝杆菌和其他分枝杆菌如卡介苗和耻垢分枝杆菌中得到验证和解析。然而,由于多种因素如分枝杆菌中 GC 含量高、RNA 伴侣缺乏等,仍有大量的 sRNA 尤其是基因间区 sRNA 未得到明确解释,我们不知道其如何行使不同外部环境刺激下的调控功能及具体机制,需要进一步挖掘和探索。高通量实验方法将有助于填补预测的候选 sRNA 和功能已知的 sRNA 之间日益增长的差距,使用诸如 ChIP-seq 等技术来绘制基因调控网络,并真正开始了解这些 sRNA 在分枝杆菌物种中的功能作用;此外,增加单个 sRNA 敲除或过表达菌株的表型数据可以增强对 sRNA 调控网络映射^[20]。同时,sRNA 在基因工程、生物标记和药物靶向治疗等方面也有着非常广阔的应用前景,干扰 sRNA 对毒力的调控可作为新的药物靶点。

课题组在前期研究中,从 MTB 数据库中,找出其中已经过 Northern blot 验证的 sRNA,将其转入耻垢分枝杆菌中获得可诱导型表达菌株,以过表达后引起生长缺陷为筛选表型,发现结核分枝杆菌中的 sRNA Mpr5 (MTS0823) 可对细菌生长产生影响。Mpr5 最初在卡介苗中通过一种克隆实验与计算机预测结合的方法被发现,并在结核分枝杆菌与耻垢分枝杆菌鉴定出同源物的存在^[21]。结核分枝杆菌 Mpr5 是基因间区的 sRNA,长度在 91 nt 左右,其功能目前尚无相关报道^[6]。因此本研究集中于结核分枝杆菌中 Mpr5 这一 sRNA 的功能解析,以耻垢分枝杆菌为研究模型,探究了 Mpr5 高表达对耻垢分枝杆菌生理功能的影响,在饥饿和低氧条件下都观察到生长抑制现象,而在正常培养条件下未观察到显著差异,提示 Mpr5 可能与细菌对环境胁迫的应答反应有关。本研究对 Mpr5 的功能解析丰富了对结核分枝杆菌 sRNA 的理解;未来对 Mpr5 的功能与机制进一步深入探索,将可能有助于理解结核分枝杆菌适应胞内存活的机制,找到控制结核分枝杆菌在宿主内存活率或调控其毒力的新靶点,为结核病的防治提供新思路。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 耻垢分枝杆菌

Mycobacterium smegmatis MC²-155, 由本实验室保存。

2.1.2 大肠埃希氏菌

大肠埃希氏菌 *E. coli* DH5 α 感受态: 中国, 康体生命。

2.1.3 质粒

pSI: 空载质粒; Mpr5-pSI: Atc 诱导表达 Mpr5; Sm74-pSI': Atc 诱导表达 Sm74。

抗生素类型: 四环素, 卡那霉素。

pSI, Mpr5-pSI 由实验室前期构建。

2.1.4 引物

测序验证引物: CTAGATCTGACCAGGGAAAAT。

2.2 试剂

2.2.1 培养基

2.2.1.1 LB 培养基

表 1 LB 液体培养基和固体培养基

组成	LB 液体培养基 (100 mL)	LB 固体培养基 (100 mL)
胰蛋白胨	1 g	1 g
氯化钠	1 g	1 g
酵母膏	0.5 g	0.5 g
琼脂	—	1.5 g
ddH ₂ O 定容至	100 mL	100 mL
121°C, 20 min 灭菌		

2.2.1.2 耻垢分枝杆菌培养基

1. 7H9 液体培养基: Middlebrook 7H9 (美国, Gibco); 使用前加入 Tween 80, Tween 80: 7H9 = 1: 2000;

2. 7H10 固体培养基: Middlebrook 7H10 (美国, Gibco)。

2.2.1.3 ADC 和 OADC

表 2 ADC 和 OADC

组成	ADC (100 mL)	OADC (100 mL)
牛血清白蛋白	5 g	5 g
D-(+)-葡萄糖	2 g	2 g
油酸	—	0.05 g
过氧化氢酶	0.003 g	0.004 g
ddH ₂ O 定容至	100 mL	100 mL
完全溶解后, 用 0.22 μm 滤膜抽滤以无菌化		

2.2.2 常用试剂

- 1) Dulbecco's Modified Eagle Medium: 美国, Gibco;
- 2) 卡那霉素: 中国, 生工; 培养分枝杆菌时 25 μg/mL 加入, 培养大肠杆菌时 50 μg/mL 加入;
- 3) 抗酸染色试剂盒: 中国, Baso;
- 4) 过氧化氢酶: 美国, Worthington;
- 5) 牛血清白蛋白组分 V50g: 中国, Roche;
- 6) PBS 缓冲液: 中国, 生工;
- 7) 凝胶回收试剂盒: 美国, Axygen。
- 8) Tween 80: 中国, BBI;
- 9) 无水四环素: 美国, Cayman;
- 10) 油酸: 中国, 生工;
- 11) Quick Start Bradford 1 × Dye Reagent: 美国, Bio-Rad;
- 12) 质粒提取试剂盒: 美国, Axygen。

2.3 实验仪器

- 1) 超声仪: 比利时, Diagenode;
- 2) 单人净化工作台: 中国, 名牌之星;
- 3) 电转仪: 美国, Bio-Rad;
- 4) 电热鼓风干燥箱: 中国, 一恒;
- 5) 金属浴: 中国, Gingko;
- 6) 离心机: 德国, eppendorf;

- 7) 水平电泳仪：中国，Tanon;
- 8) 恒温培养箱：中国，一恒;
- 9) 生物安全柜：美国，LABCONOCO;
- 10) 涡旋混合器：美国，Scientific Industries;
- 11) 4℃冰箱：中国，中科美菱;
- 12) -20℃冰箱：日本，Panasonic;
- 13) -80℃冰箱：美国，Thermo Scientific。

2.4 实验方法

2.4.1 耻垢分枝杆菌感受态的制备

- a. 细菌于 3 mL 7H9 液体培养基中培养至平台期 ($OD_{600} > 1.5$);
- b. 传代至 50 mL 7H9 液体培养基继续培养过夜, 至对数期 ($OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$);
- c. 菌液均分至 2 个 50 mL 无菌圆锥管, 冰浴 20~30 min;
- d. 3500 r/10 min 离心;
- e. 弃上清, 加入 10 mL 无菌 10%甘油轻柔吹打重悬细菌, 合并至一管;
- f. 重复 d, e;
- g. 弃上清, 加入 5 mL 无菌 10%甘油轻柔吹打重悬细菌;
- h. 分装至 1.5 mL EP 管, 每管 400 μ L, 与-80℃冰箱保存。

2.4.2 菌种保存

无菌 EP 管中加入无菌的 50%甘油与菌液各 300 μ L, 混匀, 保存于-20℃冰箱。

2.4.3 耻垢分枝杆菌的电转化

- a. 电转杯中加入 400 μ L 耻垢分枝杆菌感受态菌液与 10 μ L 质粒, 轻柔吹打, 静置 10 min;
- b. 电转杯置于电转仪中, 设置 Ec 2, 点击 Pulse;
(以上两步冰浴操作)
- c. 电转杯中加入 1 mL 无抗 7H9 液体培养基, 混匀后转移至 1.5 mL EP 管, 于 37℃/220 rpm 摇床培养 2~4 h;
- d. 3000 r/3 min 离心;

- e. 吸去上清 1 mL，剩下菌液重悬，平板涂布于 7H10 固体培养基。
- f. 挑取单克隆，验证阳性克隆为转化成功的菌株。

2.4.4 大肠杆菌的转化

- a. E. coli DH5 α 感受态 50 μ L 加入 10 μ L 质粒，轻柔吹打；（此步冰浴操作）
- b. 冰育 30 min；
- c. 42℃热击 1 min；
- d. 冰育 2 min；
- e. 菌液加入 1 mL 无抗 LB 液体培养基，于 37℃/220 rpm 摇床培养 1 h；
- f. 3000 r/3 min 离心；
- e. 吸去上清 1 mL，剩下菌液重悬，平板涂布于 LB 固体培养基。
- f. 挑取单克隆，验证阳性克隆为转化成功的菌株。

2.4.5 耻垢分枝杆菌生长曲线的测定

- a. 玻璃管（加玻璃珠）中加入耻垢分枝杆菌菌种与 3 mL 7H9 液体培养基，于 37℃摇床培养至 OD₆₀₀ = 1.0 ~ 2.0；
- b. 传代至 50 mL 三角瓶（加玻璃珠），加入 20 mL 7H9 培养基与适量菌液，使 OD₆₀₀ = 0.05，于 37℃摇床中培养；
- c. 定时测定菌液 OD₆₀₀ 值，测量时以相同的无菌 7H9 液体培养基为空白对照；
- d. 将测得的 OD₆₀₀ 值对时间作图得到生长曲线。

2.4.6 抗酸染色

- a. 取菌液 10 μ L 于载玻片，充分涂开，晾干；
- b. 距火焰 1 cm 以上固定，过火 4 次，每次 5 s；
- c. 石碳酸复红溶液染色 10 min；
- d. 流水冲洗；
- e. 酸性酒精溶液脱色，1 min；
- f. 流水冲洗；
- g. 亚甲基蓝溶液染色 30 s；
- h. 流水冲洗，吸干水分得到染片。

2.4.7 耻垢分枝杆菌的饥饿培养

- a. 三角瓶(加玻璃珠)中加入耻垢分枝杆菌菌种与 100 mL 7H9 液体培养基, 于 37℃摇床培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 2.0$;
- b. 6000 r/10 min/24℃ 离心;
- c. 弃上清, 加入适量无菌 PBS 重悬后, 加入无菌 PBS 定容至 20 mL;
- d. 6000 r/10 min/24℃ 离心;
- e. 弃尽上清, 加入 5 mL 无菌 PBS 重悬, 涡旋振荡打散后, 用胰岛素针吹打 12 次。
- f. 250 ml 三角瓶(加玻璃珠)加入无菌 PBS 及上述菌液, 调节 OD_{600} 值至 0.2 ~ 0.3;
- g. 摇匀, 分装至 100 mL 三角瓶中, 每瓶加入 30 ml;
- h. 于 37℃/220 rpm 摇床培养。

2.4.8 耻垢分枝杆菌的低氧培养

- a. 三角瓶(加玻璃珠)中加入耻垢分枝杆菌菌种与 100 mL 7H9 液体培养基, 于 37℃摇床培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 2.0$;
- b. 6000 r/10 min/24℃ 离心;
- c. 弃上清, 加入适量无菌 PBS 重悬后, 加入无菌 PBS 定容至 20 mL;
- d. 6000 r/10 min/24℃ 离心;
- e. 弃尽上清, 加入 5 mL 无菌 PBS 重悬, 涡旋振荡打散后, 用胰岛素针吹打 12 次。
- f. 250 ml 三角瓶(加玻璃珠)加入 7H9 培养基及上述菌液, 调节 OD_{600} 值至 0.2 ~ 0.3;
- g. 摇匀, 分装至 1.5 mL EP 管, 每管加入 1.8 mL, 管口缠绕封口膜;
- h. 于 37℃培养箱静置培养。

三、研究结果

3.1 诱导表达 Mpr5 的耻垢分枝杆菌菌株的构建

3.1.1 重组质粒的构建

四环素诱导表达 Mpr5 的重组质粒由实验室前期完成。在先前的研究中实验室构建了质粒 pSI，可通过添加无水四环素（Atc）诱导目的序列的表达，并用 *mCherry* 报告基因验证了该系统。质粒 pSI 的构建方法为：从耻垢分枝杆菌中扩增出启动子 *rrnB*，用 Tet 操纵子（*tetO*）替换 *rrnB* 的-35~-10 区域，生成启动子 Prnb-tetO。Prnb-tetO 的 PCR 产物用 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切，克隆到 pMV261 中。在 *Hind*III 位点插入一个合成的转录终止子。最后通过 PCR 从 pLJR962 中扩增出 *tetR* 基因，并将其克隆到载体的 *Eco*RI 位点，以强启动子 Psmyc 驱动其表达，得到质粒 pSI（图 1A）。Mpr5 在位点 *Bam*HI 和 *Hind*III 间插入到 pSI，得到质粒 Mpr5-pSI（图 1B）。对质粒 Mpr5-pSI 进行测序，结果见附录。

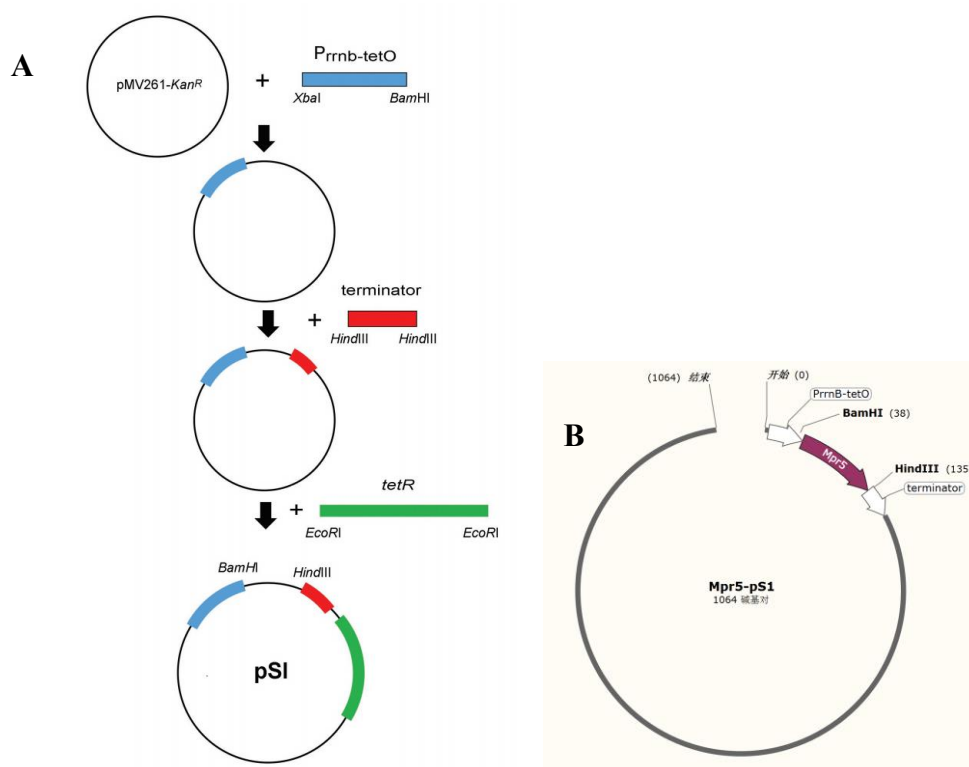


图 1. 空载质粒 pSI 与 Mpr5-pSI 的结构示意图

A，空载质粒 pSI 的构建^[11]；B，质粒 Mpr5-pSI 结构示意图

3.1.2 重组菌株的构建

通过电转化的方法将质粒 pSI 与 Mpr5-pSI 分别转入野生型耻垢分枝杆菌，挑取单克隆得到转入空载质粒 pSI 的菌株 empty-smeg-#1, empty-smeg-#2, 以及转入质粒 Mpr5-pSI 的菌株 Mpr5-smeg-#1, Mpr5-smeg-#2 和 Mpr5-smeg-#3。

3.2 绘制生长曲线检测 Mpr5 不同表达水平对耻垢分枝杆菌群体生长的影响

Mpr5-smeg-#1, #2, #3 分别培养至对数期 ($OD_{600} = 1.0 \sim 2.0$), 传代并调整 OD_{600} 至 0.05, 加/不加 Atc 诱导过夜, 随后每 2 h 测定培养液的 OD_{600} 值, 后期适当延长间隔时间, 绘制、拟合并比较生长曲线。如图 2A, Mpr5 表达水平高低对细菌群体生长情况无显著影响。

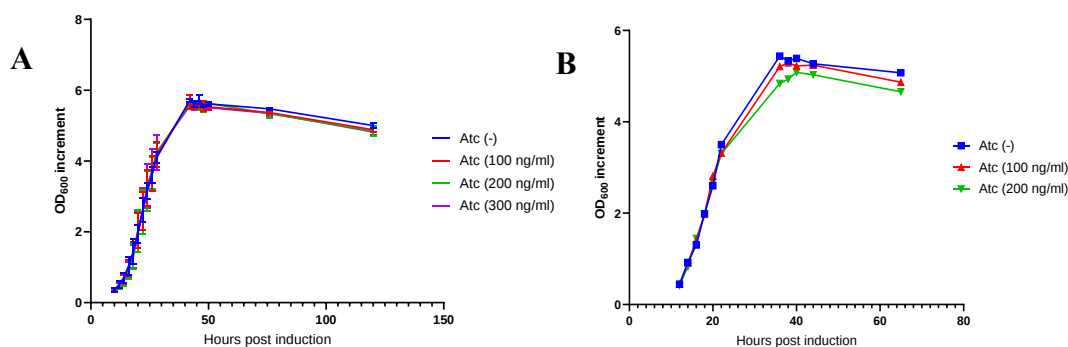


图 2. Mpr5-smeg 生长曲线

A, Mpr5-smeg 生长曲线。取 3 个生物学重复 Mpr5-smeg-#1, #2, #3; B, Mpr5-smeg-#1 不同诱导剂量的生长曲线; 纵坐标 OD_{600} 值为减去初始 OD_{600} 值后的结果

因菌株 Mpr5-smeg-#1 诱导后呈现些微生长抑制情况 (数据为未显示), 对其做重复实验, 得到生长曲线如图 2B。同样, Mpr5 表达水平高低对细菌群体生长情况无显著影响。因 Atc 浓度为 200 ng/mL 时可观察到对数后期及平台期 OD_{600} 值轻微下降, 后续实验确定 Atc 浓度为 200 ng/mL。

3.3 绘制生长曲线检测 Sm74 不同表达水平对耻垢分枝杆菌群体生长的影响

Sm74 是耻垢分枝杆菌中 Mpr5 的同源物^[18]。用 Sm74 序列替换质粒 Mpr5-pSI 中的 Mpr5 序列, 同时用一个更强的重组启动子 (由实验室师兄构建) 替换 Prmb-tetO, 得到质粒 Sm74-pSI'。同样将其转入耻垢分枝杆菌得到三个重组菌株, 测绘生长曲线, Sm74 表达水平高低对细菌群体生长情况无显著影响 (图 3A)。

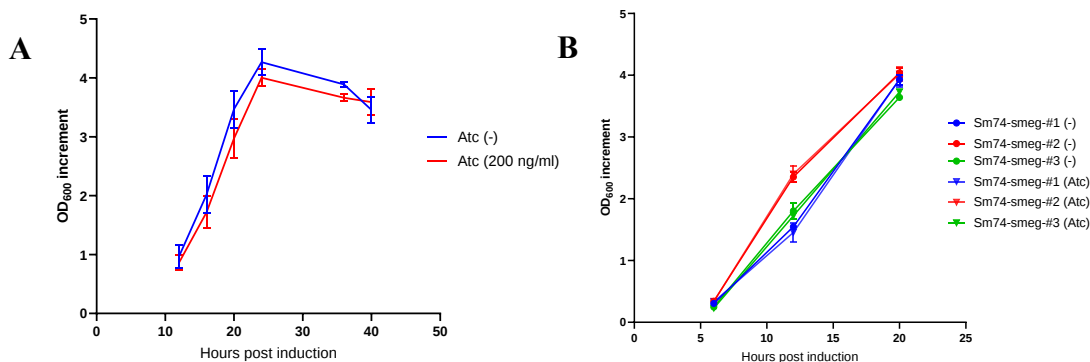


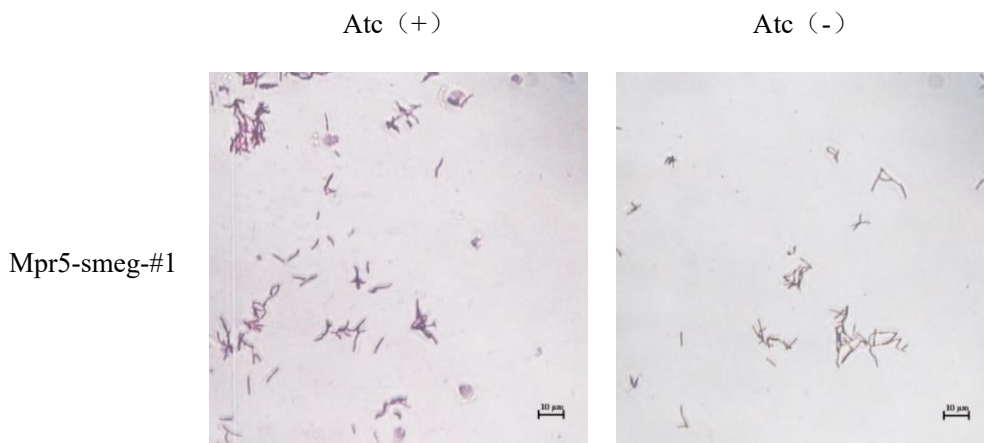
图 3. Sm74-smeg 生长曲线

A, Sm74-smeg 生长曲线第一次实验。取 3 个生物学重复 Sm74-smeg-#1, #2, #3;
B, Sm74-smeg 生长曲线第二次实验。取 3 个生物学重复 Sm74-smeg-#1, #2, #3,
并做 3 个技术重复; 纵坐标 OD₆₀₀ 值为减去初始 OD₆₀₀ 值后的结果

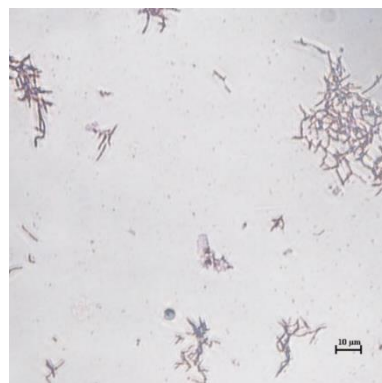
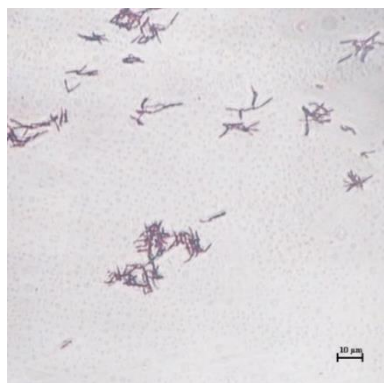
增加技术重复, 改变初始 OD₆₀₀ 值为 0.01, 关注对数期细菌群体的生长情况,
同时增加 Atc 浓度至 400 ng/mL。结果显示, Sm74-smeg 的三个菌株加/不加 Atc
诱导时重叠良好, Sm74 表达水平高低对细菌群体生长情况无显著影响(图 3A)。

3.4 Mpr5 不同表达水平对耻垢分枝杆菌形态的影响

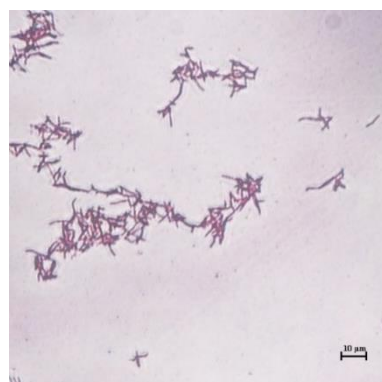
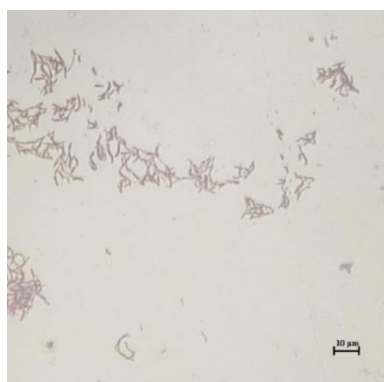
Mpr5-smeg, empty-smeg 分别培养至对数期 (OD₆₀₀ = 1.0 ~ 2.0), 传代并调整
OD₆₀₀ 至 0.05, 加/不加 Atc 诱导 18 h 后做抗酸染色, 光学显微镜 (40×) 下观
察。菌株诱导/不诱导以及各菌株间皆无显著性形态差异, 细菌呈相同的红色杆
状 (图 4), 因此认为 Mpr5 表达水平高低对耻垢分枝杆菌形态影响不大。



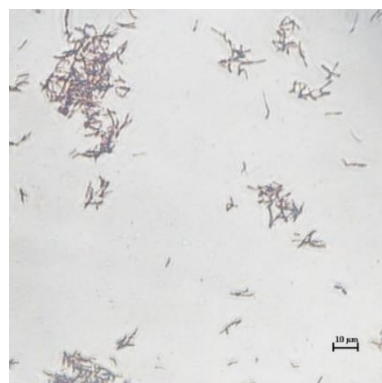
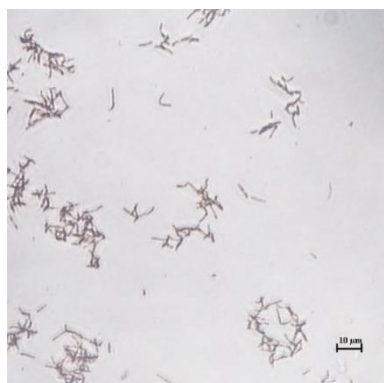
Mpr5-smeg-#2



Mpr5-smeg-#3



empty-smeg-#1



empty-smeg-#2

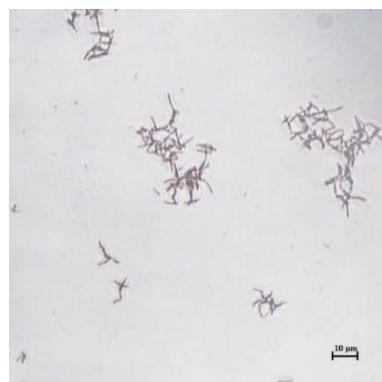
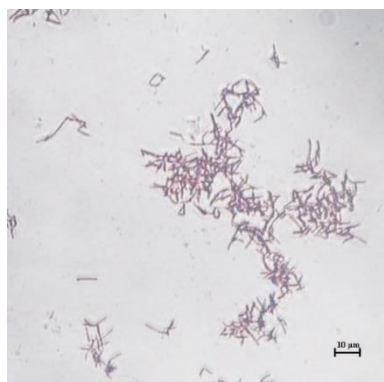


图 4. 光学显微镜下耻垢分枝杆菌形态观察 (40×)

3.5 特殊环境下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响

3.5.1 饥饿条件下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响

用无菌 PBS 代替 7H9 液体培养基以模拟饥饿条件，接种状态良好的耻垢分枝杆菌于无菌 PBS 并调节初始 OD₆₀₀ 值至 0.2 ~ 0.3，定时测定 CFU，将计数结果除以初始时刻的 CFU 计数结果得到 CFU 变化率，对时间作图。对于空载质粒组，不加 Atc 时 CFU 略微下降，于 3 d 降至极小值点后趋于稳定；加入 Atc 时在 1 d 内 CFU 增加至原来的 1.5 倍左右并维持，3~5 d 时开始缓慢下降。empty-smeg 的饥饿培养结果显示，加入 Atc 后其活菌数目更大。对于 Mpr5 组，不加 Atc 时 CFU 略微增加，于 3 d 达到极大值点，随后缓慢下降；加入 Atc 时两个菌株表现不同，Mpr5-smeg-#2 生长情况与不加 Atc 时相似，而 Mpr5-smeg-#1 CFU 发生缓慢下降（图 5）。Mpr5-smeg 的饥饿培养结果显示，加入 Atc 后活菌数有受抑制的情况。综上，耻垢分枝杆菌中诱导表达 Mpr5 可能不利于其在饥饿环境下的生长。

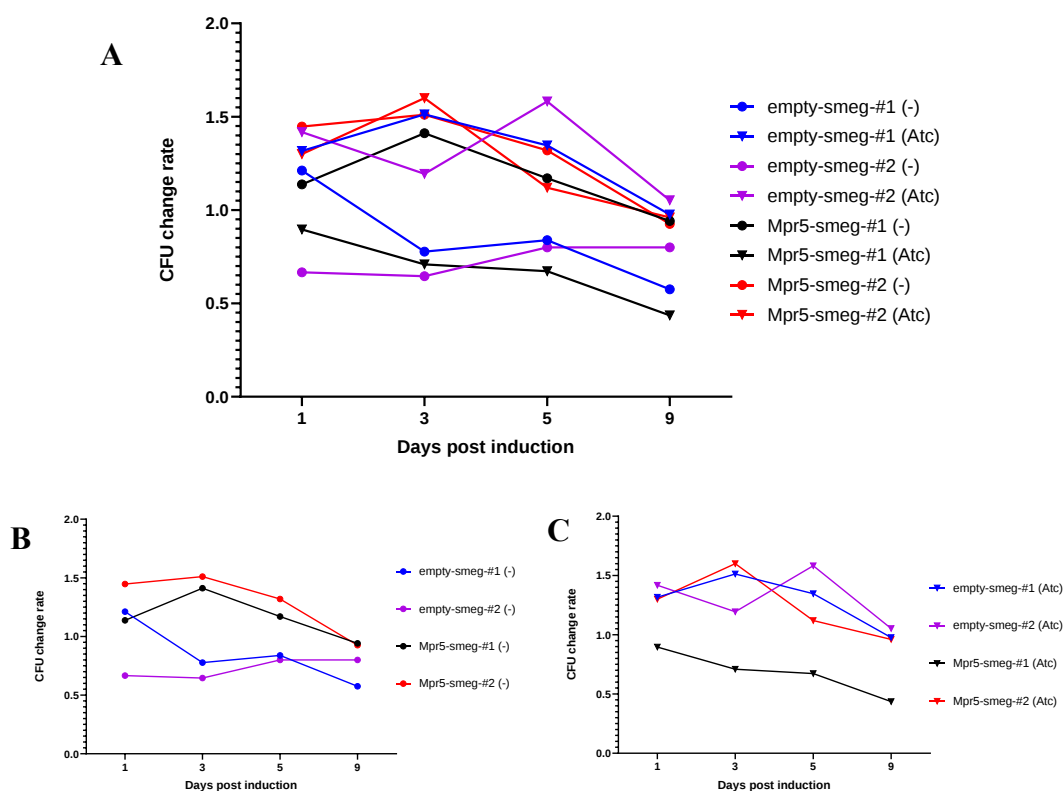


图 5. 耻垢分枝杆菌在饥饿条件下的生长情况

A, 各菌株加/不加 Atc 的 CFU 变化情况；B, 各菌株不加 Atc 的 CFU 变化情况；
C, 各菌株加 Atc 后的 CFU 变化情况

3.5.2 低氧条件下 Mpr5 不同表达水平对细菌群体生长的影响

在 EP 管中装满菌液排除空气的存在，密封后静置培养，以模拟低氧的条件。接种状态良好的耻垢分枝杆菌于无 7H9 液体培养基并调节初始 OD₆₀₀ 值至 0.2 ~ 0.3，加/不加 Atc 后分装至 1.5 mL EP 管，定时测定 CFU，将计数结果除以初始时刻的 CFU 计数结果得到 CFU 变化率，对时间作图。empty-smeg-#1 与 Mpr5-smeg-#3 表现相似，CFU 稍有下降，但总体平稳，且加/不加 Atc 差异不显著。empty-smeg-#2 与 Mpr5-smeg-#1 表现相似，CFU 增加于 3 d 达到最大值，随后快速下降并在较低水平维持。Mpr5-smeg-#1 在加入 Atc 后 CFU 增加幅度减小，在诱导后 3 天活菌数显著减少（t test, $P < 0.000001$ ）（图 6）。因此，耻垢分枝杆菌中诱导表达 Mpr5 可能抑制其在低氧环境下的生长。

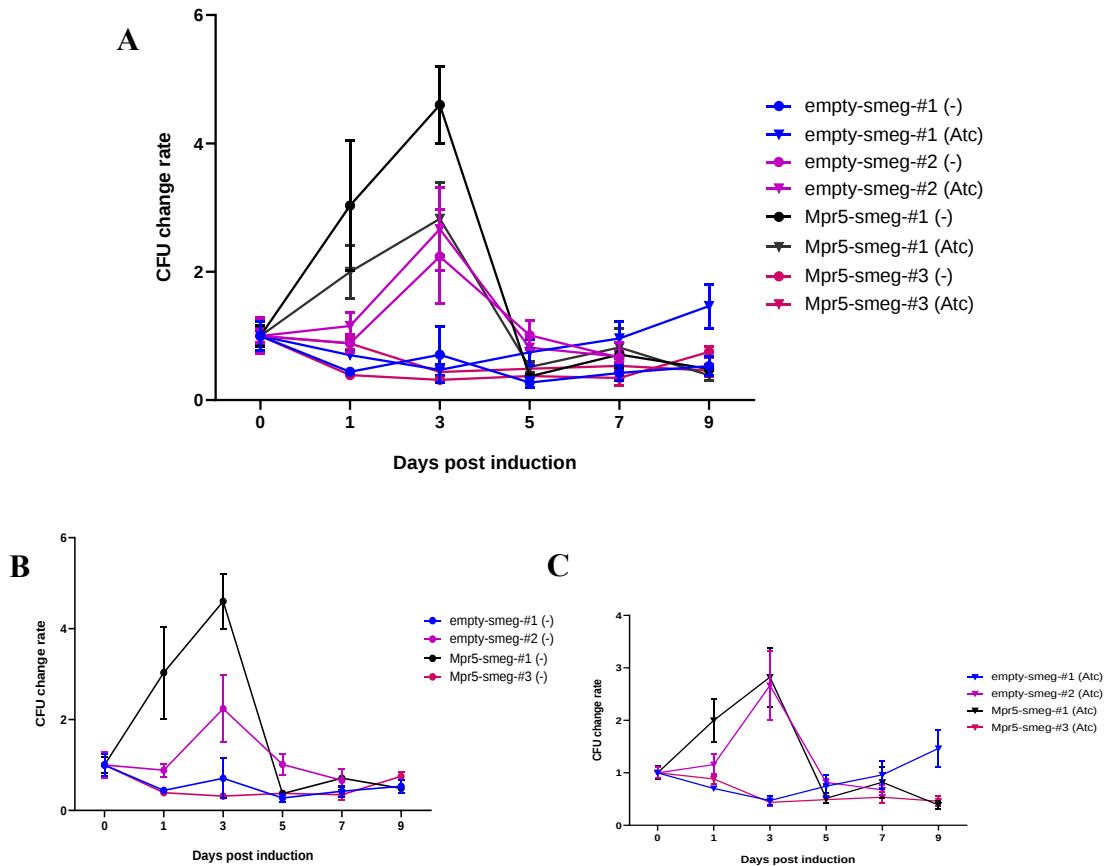


图 6. 耻垢分枝杆菌在低氧条件下的生长情况

A, 各菌株加/不加 Atc 的 CFU 变化情况; B, 各菌株不加 Atc 的 CFU 变化情况;
C, 各菌株加 Atc 后的 CFU 变化情况

四、讨 论

4.1 Mpr5 可能参与压力应答与潜伏感染

本研究旨在探究 MTB 中的 sRNA Mpr5 的生理功能，以模式菌株耻垢分枝杆菌为研究对象，构建了重组质粒 Mpr5-pSI 以实现 Mpr5 的诱导表达。研究结果显示：Mpr5 在耻垢分枝杆菌中高表达对其体外生长及细菌形态无显著影响，在饥饿与低氧条件下都对细菌生长表现出抑制。如前言所述，细菌非编码调节 sRNA 的功能常与环境胁迫、压力应答等有关，Mpr5 在耻垢分枝杆菌中的诱导表达在正常培养条件下为产生显著差异，但在饥饿或低氧的培养条件下显示出对细菌生长的抑制，这提示我们 Mpr5 可能与压力应答与潜伏感染有关，而在一般培养条件下不能发挥足够的调节作用。本研究对 Mpr5 的功能分析丰富了对结核分枝杆菌中 sRNA 功能的鉴定。此外，饥饿与低氧环境实际上与结核分枝杆菌的胞内生存环境更为接近，未来进一步探索 Mpr5 在结核分枝杆菌中的功能及其作用机制，将有望找到操纵结核分枝杆菌胞内活力的新靶点。

4.2 结核分枝杆菌 sRNA 功能在分枝杆菌属中的保守性

耻垢分枝杆菌虽然是研究 MTB 的模式生物，二者基因组相似度较高，但仍存在不同，基因背景的差异可能对 Mpr5 在耻垢分枝杆菌中发挥功能造成影响。根据先前的研究，MTB sRNA 的功能在分枝杆菌属中存在一定保守性。例如过表达 G2 的耻垢分枝杆菌与过表达 G2 的 MTB 同样地发生生长缺陷，尽管在耻垢分枝杆菌中没有与该 G2 明显同源的基因。然而，虽然耻垢分枝杆菌中存在 F6 的同源基因，但相比于 F6 过表达导致结核分枝杆菌的生长减少，在耻垢分枝杆菌中过表达 F6 没有明显的表型^[5]。因此本研究另外找到了 Mpr5 在耻垢分枝杆菌中的同源序列 Sm74，实现了其在耻垢分枝杆菌中的诱导表达，但体外生长结果同样未显示出显著性差异。

4.3 饥饿与低氧实验中 empty-smeg 加入诱导剂后生长受到影响

对于空载质粒组，加/不加 Atc 诱导也产生了变化，可能的原因是空载质粒启动子与终止子之间存在一段垃圾序列，也会发生诱导表达，可能对细菌生长造成了影响。

理想情况下，empty-smeg 加/不加 Atc 以及 Mpr5-smeg 不加 Atc 诱导组的生长情况应相同，因为它们都属于空白对照。但是实验结果显示出差异常，可能的原因除了上述垃圾序列产生影响外，也有可能诱导表达载体存在渗透表达的情况，即不加 Atc 诱导时也有少量序列发生了表达。

在对 CFU 数据进行分析时发现置信区间较大，另外计数时发现平板菌落有大小不一的情况发生，可能的原因是耻垢分枝杆菌未能完全吹散，梯度稀释与平板涂布时仍有部分粘连，导致 CFU 计数结果误差增大。抗酸染色的显微观察结果与这一猜想相符，因为制片时的涂布操作为从里向外画圈 50 次，但成片中仍存在成团的分枝杆菌。

4.4 Mpr5-smeg 中 Mpr5 的表达量有待 Northern blot 验证

因 Mpr5 长度太小，无法通过 qPCR 方法定量，因此本研究为进一步验证 Mpr5-smeg 重组菌株是否转化成功，抽提质粒并转化入大肠杆菌中扩增，再次抽提质粒后测序，结果与质粒 Mpr5-pSI 相同，证明重组菌株构建成功。因为空载质粒 pSI 的诱导表达能力已在先前的工作中^[11]验证，即用 *mCherry* 报告基因替换目的序列，并将其转入耻垢分枝杆菌，在没有 Atc 的情况下，培养物的荧光强度很低；而加入 Atc (100 ng/mL) 后，荧光强度增加了 19.7 倍。但是仍然缺乏直接的证据，因此为后续将通过 Northern blot 方法得到定量结果。在饥饿与低氧模型实验中，不同的 Mpr5-smeg 菌株诱导表达后产生的变化存在差异，原因可能是转入质粒数量不同等的个体差异，后续得到各菌株的 Mpr5 定量结果后或可做出进一步解释。

附 录

质粒 Mpr5-pSI 测序结果:

序列

参数

```
CTTTGGGGTTGACTTCCTATCAGTGATAGATAACTTAGGATCCCGACCAGCGGG
GGATGGCGATGTCCAGCGCGGGCGGGGATCGCGTCGGTCAGGTCGTGGTGCGTGA
GTGCGGAGGCCAGGCAGATCGTAGCGAAGCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTT
TTTTTTAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCCCGGGGATCATCG
AGCCGAGAACGTTATCGAAGTTGGTCATGTGTAATCCCCTCGTTTGAACCTTGG
ATTAAGCGTAGATACACCCTTGGACAAGCCAGTTGGATTCGGAGACAAGCAAAT
TCAGCCTTAAAAAGGGCGAGGCCCTGCGGTGGTGGAACACCGCAGGGCCTCTAA
CCGCTCGACGCGCTGCACCAACCAGCCCCGCGAACGGCTGGCAGCCAGCGTAAGG
CGCGGCTCATCGGGCGGCGTTTCGCCACGATGTCCTGCACTTCGAGCCAAGCCGA
ATTCGGATCGTCGGCACCGTCACGGCCGTGGGAGGCGGCACGATCCGCGACGTG
ATGATCGGCCGCGATCCCCACGGTGCTGCGCAGTGAGCTCTACGCCATCCCGGCG
TTGATCTGTGCGTTCGCACGCACAGGCCCGGTGTGAGAAGGGTCTCTGACGAGC
GGGAGAACCACCCGGGGTGGGCGAGTTTGTCTGCGTGTGCTCGGTTCGAGTAG
GCTCTGGGAGTACCCGTGTGTACGACCAGCACGGCATACATCATTTTCGACGCCG
AGAGATTGCGCGCCCCGAAATGAGCACGATCCTGCAGATGTCTAGATTAGATAAA
AGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGT
TAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGGATT
GGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACCCTTAGCCATTGAGATGTTAGAT
AGGCCCTACTCCTTTTGCCTTTTAAAAGGGAAAGCTGGAAGATTTTACGAAA
AACGCTAAAAGTTTAAATGGGTTTACCAGTCTC
```

参考文献

1. Waters L S, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria[J]. *Cell*, 2009, 136(4):615-628.
2. 李文静, 佟坤宇, 郭美琦, 邓海霞, 穆红: 分枝杆菌小 RNA 的研究进展[J], 继续医学教育, 2020, 34(08): 131-133。
3. Dutta T, Srivastava S. Small RNA-mediated Regulation in Bacteria: A Growing Palette of Diverse Mechanisms[J]. *Gene*, 2019(656): 60-72.
4. Shi Lanbo, Jiang Qingkui, Bushkin Yuri, Subbian Selvakumar, Tyagi Sanjay. Biphasic Dynamics of Macrophage Immunometabolism during Mycobacterium tuberculosis Infection[J]. *mBio*, 2019, 10(2).
5. Arnvig K B, Young D B. Identification of small RNAs in Mycobacterium tuberculosis[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(3):397-408.
6. Arnvig K, Young D. Non-coding RNA and its potential role in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis[J]. *RNA Biology*, 2012, 9(4):427-436.
7. Warner D F, et al. A Riboswitch Regulates Expression of the Coenzyme B12-Independent Methionine Synthase in Mycobacterium tuberculosis: Implications for Differential Methionine Synthase Function in Strains H37Rv and CDC1551[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(9):3655-3659.
8. Hnilicová Jarmila, et al. Ms1, a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria[J]. *Nucleic Acids Research*(18):18.
9. Solans L, et al. The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in Mycobacterium tuberculosis[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5):e1004183.
10. Hartkoorn R C, et al. Genome-Wide Definition of the SigF Regulon in Mycobacterium tuberculosis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(8):2001-2009.
11. Juntao M, et al. Mycobacterium tuberculosis 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones[J]. *Nucleic Acids Research*(8):8.
12. 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]. *Molecular Microbiology*, 2019.
13. Alexandra Moores, Ana B. Riesco, Stefan Schwenk, Kristine B. Arnvig. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in Mycobacterium tuberculosis[J]. *PLOS ONE*, 2017, 12(3).
14. Salina Elena G., et al. MTS1338, A Small Mycobacterium tuberculosis RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019.
15. Gerrick Elias 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 of the United States of America*, 2018, 115(25).
16. Joanna Houghton, et al. A Small RNA Encoded in the Rv2660c Locus of Mycobacterium tuberculosis Is Induced during Starvation and Infection[J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(12).

17. Katie H, Hee C S, Contreras L M. Small RNAs in mycobacteria: an unfolding story[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4.
18. Tsai C H, et al. Identification of Novel sRNAs in Mycobacterial Species[J]. *PLOS ONE*, 2013, 8.
19. Li S K, et al. Identification of small RNAs in Mycobacterium smegmatis using heterologous Hfq[J]. *RNA*, 2013, 19(1):74-84.
20. Schwenk S, Arnvig K B, Regulatory RNA in Mycobacterium tuberculosis, back to basics[J]. *Pathogens and Disease*, 2018.
21. DiChiara Jeanne M, Contreras-Martinez Lydia M, Livny Jonathan, Smith Dorie, McDonough Kathleen A, Belfort Marlene. Multiple small RNAs identified in Mycobacterium bovis BCG are also expressed in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis[J]. *Nucleic acids research*, 2010, 38(12).

致 谢

感谢我的导师张鹭老师对我的悉心教导，是她带我走进实验室，为我打开科研的大门，鼓励我、鞭策我，为我指引方向，耐心指导我设计实验和处理数据，并在生活上给我关心。记得两年前的夏天我们初见，张老师为我介绍了三个课题，一晃其中的一个已成为这篇毕业论文。

感谢实验室所有师兄师姐们的帮助与关心，尤其是带我做实验的李烨雨师姐和刘含梅师姐，不厌其烦地教我做实验，为我解答疑惑，帮我规划实验安排，在我低落时给我鼓励和安慰，让我能够顺利完成实验。

最后感谢亲人与朋友的支持与陪伴，让我能够健康快乐地成长，与你们相遇是我的幸运。