

肺炎克雷伯菌 CRP 对 *kfuABC* 操纵子的转录调控机制研究杨世亚¹, 张义全², 王 丽¹, 杨瑞馥², 周冬生², 李迎丽¹, 邱景富¹

(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与食品卫生教研室, 重庆 400016;

2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所、病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

【摘要】目的:利用分子生物学实验研究肺炎克雷伯菌环磷酸腺苷受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)对 *kfuABC* 操纵子的转录调控机制。**方法:**设计相关跨基因引物,用 Real-time PCR 方法验证 *kfuABC* 的转录结构。以肺炎克雷伯菌野生株 NTUH-K2044(wild type, WT)的总 RNA 为模板,利用引物延伸的方法寻找 *kfuA* 的转录起始位点,确定其核心启动子区。构建含 *kfuA* 启动子区 DNA 序列的 *LacZ* 重组质粒,并将其转入突变株 Δcrp (肺炎克雷伯菌野生株基因组中 *crp* 基因敲除)和 WT 中,通过测定比较两株菌中 β -半乳糖苷酶活性差异来判定 CRP 调控子对 *kfuA* 的调控关系;分别提取 Δcrp 和 WT 的总 RNA,进一步采用实时定量 Real-time PCR 的方法验证 CRP 对 *kfuA* 的调控关系。通过凝胶阻滞实验验证 His-CRP 是否对 *kfuA* 启动子区具有直接的结合作用,进一步采用 DNase I 足迹实验确定具体的结合位点。**结果:**肺炎克雷伯菌 *kfuA*、*kfuB* 和 *kfuC* 位于同一个操纵子 *kfuABC*;引物延伸实验结果显示 *kfuABC* 只有一个转录起始位点 T;CRP 能够结合到 *kfuABC* 启动子区-204 到-171 之间的碱基序列上(转录起始位点为+1),抑制其转录表达。**结论:**CRP 能直接结合到 *kfuABC* 启动子区抑制其转录表达。

【关键词】肺炎克雷伯菌;环磷酸腺苷受体蛋白;*kfuABC*;转录调控**【中图分类号】**R378.99*6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-22Study of transcriptional regulation mechanism of *kfuABC* operon by cAMP receptor protein in *Klebsiella pneumoniae*Yang Shiya¹, Zhang Yiquan², Wang Li¹, Yang Ruifu², Zhou Dongsheng², Li Yingli¹, Qiu Jingfu¹

(1. Teaching and Research Section of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University; 2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences)

【Abstract】Objective: To investigate the transcriptional regulation mechanism of *kfuABC* operon by cAMP receptor protein (CRP) in *Klebsiella pneumoniae*. **Methods:** Real-time PCR was firstly used to validate the operon structure of *kfuABC* by using the intergenic region spanning primers. Primer extension assay was employed to detect the transcriptional start site of *kfuA* by using the total RNAs of wild type (WT) as template. The entire promoter-proximal region of *kfuA* was amplified and cloned into the plasmid pHRP309 containing a promoterless *lacZ* reporter gene. The recombinant *LacZ* reporter plasmid *kfuA* :: pHRP309 was transformed into the *crp* null mutant (Δcrp) and WT, respectively, to measure the promoter activity (the β -Galactosidase activity) of *kfuA* by using the β -Galactosidase enzyme assay system. Then, total RNAs were extracted from Δcrp and WT strains, and the quantitative Real-time PCR was carried out to calculate the transcriptional variation of *kfuA* in the Δcrp and WT. The over-expressed His-CRP was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham), and the entire promoter-proximal region of the *kfuA* gene was amplified by PCR from WT strain. Then, the electrophoretic mobility shift assay and DNase I footprinting experiment were applied to analyze the DNA-binding site of His-CRP to *kfuA* promoter region in vitro. **Results:** The transcription of *kfuABC* operon was regulated by CRP negatively. Primer extension assay detected only one transcriptional start site. The DNase I footprinting assays showed that the binding site was located from 204 bp to 171 bp upstream of *kfuABC*. **Conclusion:** The transcription of *kfuABC* operon is repressed by CRP via directly combination with promoter region of *kfuABC* operon in *Klebsiella pneumoniae*.

作者介绍:杨世亚, Email: sophieysy@126.com,

研究方向:肺炎克雷伯菌转录调控机制研究。

通信作者:李迎丽, Email: liylyl@yahoo.com.cn。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:31071093、31170129、31200064、30871370 和 81000763)。**优先出版:**http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000228.htmlon is repressed by CRP via directly combination with promoter region of *kfuABC* operon in *Klebsiella pneumoniae*.**【Key words】***Klebsiella pneumoniae*; cAMP receptor protein; *kfuABC*; transcription regulation

肺炎克雷伯菌为革兰氏阴性肠杆菌,主要引起医院内感染和社区获得性感染,临床上以肺炎、泌尿道感染和细菌性肝脓肿较为常见^[1]。绝大多数临床分离株的菌体表面均具有一层厚厚的荚膜,它是肺炎克雷伯菌最主要的毒力因子,具有抗吞噬和抗细胞因子杀伤的功能^[2-3]。根据其荚膜抗原(K 抗原)分型,肺炎克雷伯菌共分 77 个血清型,其中 K1 和 K2 血清型毒力最强,近年来流行趋势日益严重,已引起国内外学者广泛关注^[4]。

铁元素(Fe)几乎是所有微生物生存繁殖所必需的营养元素,但是 Fe³⁺的不可溶性及致病过程中宿主(哺乳动物)所分泌的大量铁结合蛋白,使得能被病原菌利用的 Fe²⁺微乎其微,病原菌必须利用自己的铁摄取系统来获取足够的铁,以满足生长需求^[5]。肺炎克雷伯菌有多个与铁摄取有关的系统,*kfuABC* 系统(由 *kfuA*、*kfuB* 和 *kfuC* 基因编码)是其中之一。当 *kfuA* 基因缺失后,肺炎克雷伯菌在铁匮乏培养基中的生长速度明显减慢,同时其对小鼠的毒力也大大降低,这说明 *kfuA* 与肺炎克雷伯菌铁摄取能力及毒力均有关联^[6]。

环磷酸腺苷受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)是细菌中普遍存在的整体调控子,其与伴侣分子 cAMP 结合引起构象改变而具有转录调节活性。大肠杆菌 CRP 能调节大约一百多个基因的表达,包括许多分解代谢基因^[7];鼠疫菌 CRP 至少能直接调控 36 个基因的转录表达,特别是能直接激活 *pla* 的表达,使其与腺鼠疫和原发性肺鼠疫的发病密切相关^[8]。在肺炎克雷伯菌中,cAMP-CRP 复合体能直接抑制荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)的合成,这被认为是肺炎克雷伯菌在感染阶段逃避宿主免疫杀伤的机制之一^[3]。然而,肺炎克雷伯菌 CRP 对毒力基因的转录调控机制研究还仅处于起步阶段。

本课题通过生物信息学预测,发现在 *kfuABC* 启动子区中含有一段与 CRP 基序(TGTGA-N6-TCA-CA^[8])高度相似的重叠序列 TATGA-N6-TCACA,这表明 CRP 可能对 *kfuABC* 具有直接的调控作用。进而利用凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)、DNase I 足迹实验、real-time PCR、引物延伸及 *LacZ* 报告基因融合实验等方法,证明了肺炎克雷伯菌 CRP 可以直接抑制操纵子 *kfuABC* 的转录表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 肺炎克雷伯菌野生株 NTUH-K2044 (Wild type, WT)及其 *crp* 突变株(Δcrp)、His-CRP 蛋白表达株、*lacZ* 报告基因重组质粒 *kfuA* :: pHRP309(pHRP309 质粒无启动子区的 β -半乳糖苷酶基因上游克隆入 *kfuA* 的启动子区序列,庆大霉素抗性)均由军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 试剂(MBI Fermentas 公司产品),DNA marker DL2000(TaKaRa BIOTECH 公司产品),PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒(QIAGEN 公司产品),Gel Shift Assay System、fmol[®] DNA Cycle Sequencing System、Core Footprinting System、Primer Extension System、 β -Galactosidase Enzyme Assay System(Promega 公司产品),TRIzol Reagent (Invitrogen 公司产品),LightCycler[®] 480 SYBR Green Master(Roche 公司产品),DNA-free[™] Kit(Ambion 公司产品)。

1.2 细菌培养

从保存的菌种甘油管里取 20 μ l 接种于 15 ml 的 LB 肉汤中(50 ml 的三角烧瓶),37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至平台期,按 1:100 稀释接种至新鲜的 LB 肉汤(50 ml 的三角烧瓶)中,37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至 A_{600 nm} $\approx$ 1.0,再按 1:100 稀释接种至新鲜的 LB 肉汤(50 ml 的三角烧瓶)中,37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养至对数中期,收集菌体,供后续的分子生化试验用。

1.3 引物延伸实验

采用 TRIzol 法提取 WT 的总 RNA。将与 *kfuA* 的 mRNA 互补的特异性引物(表 1)5'-末端用 $[\gamma$ -³²P]ATP 进行放射性标记^[9]。而后以 WT 的总 RNA 为模板,在 AMV 逆转录酶的作用下,将 *kfuA* 的 mRNA 逆转录成 cDNA。cDNA 产物配伍测序条带进行 6%聚丙烯酰胺变性胶电泳,经放射自显影后,通过引物延伸条带的位置即可确定转录起始位点。

1.4 EMSA

PCR 扩增 *kfuA* 的启动子区序列(引物见表 1),纯化回收扩增产物。用 T4 多聚核苷酸激酶(T4 PNK)和 $[\gamma$ -³²P]ATP 对 DNA 片段 5'末端进行标记^[9]。利用 Ni-NTA 柱法纯化 His-CRP^[10]。将不同浓度的 His-CRP 与标记的 DNA 探针在特定的反应体系中(反应体系成分如表 2),室温共同孵育 20 min 后,进行 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影后分析结果。

1.5 DNase I 足迹实验

选择合成 *kfuA* 启动子区 DNA 片段的上游或下游引物(表 1),用 $[\gamma$ -³²P]ATP 进行标记^[9],而后以 WT 的基因组 DNA 为模板,用被标记的引物 and 对应未标记的配对引物进行 PCR 扩增,PCR 产物回收后,可作为足迹实验的探针。探针和不同浓度梯度的 His-CRP 在结合体系中共同室温孵育 30 min 后,用合适浓度的 DNase I 消化适当的时间(30~60 s),消化产物配伍测序条带进行 6%聚丙烯酰胺变性胶电泳,放射自显影并分析结果。

表 1 所用引物汇总
Tab.1 Oligonucleotide primers used in this study

靶基因	引物(5'→3', 正义链/反义链)
EMSA <i>kfuA</i>	CGCCAGCAAGAAATACCA/TCCATCCACCCACGACTT
DNase I 足迹实验 <i>kfuA</i>	TTAGGCATAAAGGGAACC/CTCTGGATGGGAAAATGC
<i>LacZ</i> 报告基因融合实验 <i>kfuA</i>	GCCGTCGACCGCCAGCAAGAAATACCA/CCGAATTCTCCATCCACCCACGACTT
Real-time PCR <i>kfuA</i>	GACGCTCAGAACGGGATTG/CTCGGTCAGAAACACATCGG
Real-time PCR 引物 I	CGCACCAATAACGCCTTC/GCCGAGCACAATACTGATG
Real-time PCR 引物 II	CTCACCGCCCACTACTG/CGATATTGTCCGCAACATTAAG
Real-time PCR 引物 III	TCCTGCTGGCGAAGGTAG/ACGGCAATGTGGCTCATC
引物延伸实验 <i>kfuA</i>	GAGGGGCGATAAGCTAAATT

表 2 EMSA 体系反应成分
Tab.2 Reaction component of electrophoretic mobility shift assays

成分	泳道						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
His-CRP (pmol)	0	1.3	2.5	5.1	5.1	5.1	0
cAMP (pmol)	1	1	1	1	1	1	1
冷探针 (pmol)	0	0	0	0	2	0	0
阴性探针 (pmol)	0	0	0	0	0	2	0
无关蛋白 (pmol)	0	0	0	0	0	0	2

1.6 *LacZ* 报告基因融合试验

利用生物学软件设计 *kfuA* 启动子区序列的特异性引物对(表 1),PCR 扩增后将其克隆入质粒 pHRP309 的 β-半乳糖苷酶基因(无启动子区)上游,得到重组质粒 *kfuA* :: pHRP309。将该重组质粒分别转入 WT 和 Δ*crp* 菌株中。细菌按 1.2 的方法培养后,收集菌体,并分别检测 WT 和 Δ*crp* 菌株中的 β-半乳糖苷酶活性的差异,从而判定 CRP 对 *kfuA* 的调控关系。

1.7 Real-time PCR

提取 WT 和 Δ*crp* 的总 RNA,并用 DNA-free™ Kit 消化去除其中的 DNA 污染,再用 N6 随机引物将其逆转录成 cDNA,最后用 Roche 的 LightCycler system 作 real-time PCR。以 16S rRNA 的表达量为内参,利用 Ct 值对基因表达水平进行相对定量。

2 结果和分析

2.1 *kfuABC* 操纵子结构

提取肺炎克雷伯菌 WT 的总 RNA,并将其逆转录成 cDNA,采用 real-time PCR(RT-PCR)的方法鉴定 *kfuABC* 的转录结构,结果如图 1 所示:以基因组 DNA 为模板的引物对均能扩增出与理论值大小一致的产物;当以 cDNA 为模板时,引物对 I 和 II 均能扩增出与理论值大小一致的产物,而引物对 III 扩增不出任何条带,表明 *kfuA*、*kfuB* 和 *kfuC* 在同一个操纵子上共转录,后续实验只选取首基因 *kfuA* 作为本研究的靶基因,研究 CRP 对 *kfuABC* 操纵子的调控机制。

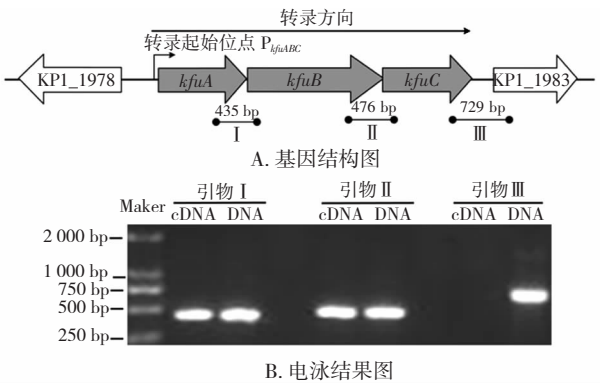


图 1 *kfuABC* 操纵子结构鉴定
Fig.1 Transcriptional organization of the *kfuABC*

2.2 *kfuABC* 的转录起始位点

提取肺炎克雷伯菌 WT 的总 RNA,利用引物延伸实验寻找 *kfuA* 的转录起始位点,其结果如图 2 所示:根据“GATC”测序条带,可以看出 *kfuA* 的转录起始位点为碱基 T,序列分析后发现转录起始位点位于翻译起始位点上游 87 bp 的位置。

2.3 His-CRP 可以直接结合到 *kfuA* 的启动子区

利用 EMSA 实验验证 CRP 能否直接作用于 *kfuA* 的启动子区,结果如图 3 中 A 所示:当 His-CRP 蛋白量达到 2.5 pmol 时,*kfuA* 探针出现了明显的阻滞带(泳道 T3);当蛋白量达到 5.1 pmol 时,*kfuA* 探针出现了完全阻滞现象(泳道 T4);当只加入无关蛋白(鼠疫苗 F1 抗原蛋白,泳道 T7)时,未见阻滞带;当先加入未标记 *kfuA* 启动子 DNA 片段(泳道 T5)作为竞

竞争性冷探针时,由于 His-CRP 蛋白先与冷探针结合,就不能再与探针结合,此时游离探针增多,但加入 16 S rDNA(泳道 T6)作为阴性对照时就没有此效应。而在所有浓度梯度下,阴性对照 16 S rDNA 均未出现阻滞条带。以上结果表明 His-CRP 能特异性的结合到 *kfuA* 启动子区。

进一步利用 *DNase* I 足迹实验寻找 His-CRP 对 *kfuA* 启动子区的结合位点,其结果如图 3 中 B 所示;若转录起始位点为“+1”,则根据“GATC”测序条带,就可以直接得出 His-CRP 对 *kfuA* 启动子区的结合位置为-204 至-171 之间的碱基。

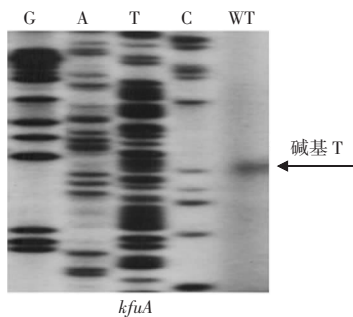


图 2 *kfuA* 的转录起始位点分析

Fig.2 Primer extension analysis of the transcriptional start site of *kfuA*

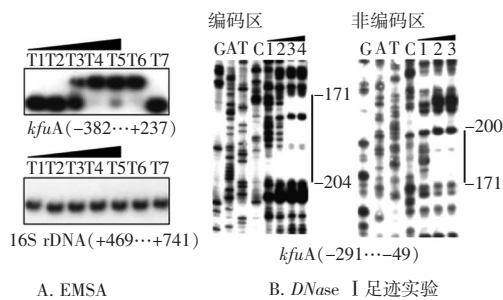


图 3 EMSA 和 *DNase* I 足迹实验结果图

Fig.3 Result of EMSA and *DNase* I footprinting

2.4 CRP 抑制 *kfuA* 的转录表达

利用 *LacZ* 报告基因融合实验和 qRT-PCR 实验研究 CRP 对 *kfuA* 的调控关系。图 4 中 A 为 *LacZ* 实验结果:在 Δcrp 中检测出的 β -半乳糖苷酶活性明显高于 WT 的,表明 CRP 能抑制 *kfuA* 的转录。进一步利用 qRT-PCR 实验验证 CRP 对 *kfuA* 的调控关系,结果如图 4 中 B 所示:*kfuA* 在 Δcrp 中的相对表达量约是 WT 中的 5 倍,表明 CRP 能抑制 *kfuA* 的转录。

2.5 *kfuA* 启动子区结构

综合本文以上研究结果,*kfuA* 的启动子区结构如图 5,图中包含转录起始位点、CRP 结合位点、-10 区和-35 区以及核糖体识别位点序列。

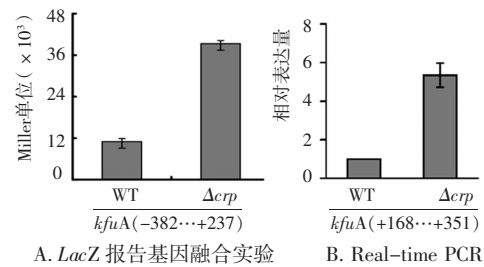


图 4 CRP 抑制 *kfuA* 的转录

Fig.4 CRP represses the transcription of *kfuA*

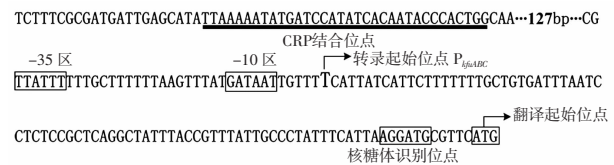


图 5 *kfuA* 启动子区结构

Fig.5 Organization of *kfuA* promoter DNA region

2.6 生长曲线

菌株 WT、 Δcrp 和 C- Δcrp 在 LB 培养基中的生长曲线测定结果如图 6 所示:在 LB 中, Δcrp 的生长速率明显比 WT 慢,且其在平台期的 A_{600nm} 值(≈ 1.6)也比 WT 的(≈ 2.0)低很多,这说明 *crp* 的缺失对肺炎克雷伯菌在 LB 中的生长状态具有较大影响;而 C- Δcrp 的生长状态基本与 WT 趋于一致,这表明本研究所使用的 Δcrp 菌株为非极性突变株。

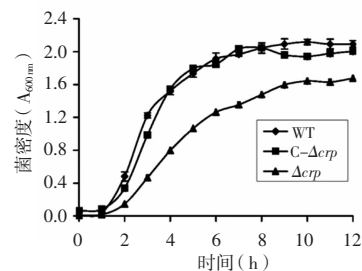


图 6 肺炎克雷伯菌在 LB 肉汤中的生长曲线

Fig.6 *Klebsiella pneumoniae* growth curves in LB broth

3 讨论

铁是细菌生长繁殖所必须的金属元素,然而 Fe^{3+} 的不可溶性及宿主细胞内大量的铁螯合蛋白,使得细菌必需具备自己的铁获取系统以满足生长繁殖的需要。肺炎克雷伯菌 *kfuABC* 与鼠疫菌 *yfuABC* 具有较高的同源性,在氨基酸序列上 *kfuA*、*kfuB* 和 *kfuC* 分别与鼠疫菌 CO92 的 *yfuA*、*yfuB* 和 *yfuC* 分别有 79.3%、68.6%和 60.1%的一致性。因此,*kfuABC* 可能和 *yfuABC* 一样^[1],编码一个 ABC 铁转运系统,

其中 *kfuA* 基因编码周质蛋白, *kfuB* 基因编码内膜通透性酶, 而 *kfuC* 基因编码 ATP 水解酶^[6]。已有研究表明肺炎克雷伯菌的 *kfuABC* 突变株 ($\Delta kfuABC$) 在铁缺乏条件下的生长速度明显慢于野生株的, 这说明 *kfuABC* 确实与铁摄取有关^[6]。*kfuABC* 也与肺炎克雷伯菌毒力有关, 当通过胃内途径感染小鼠时, $\Delta kfuABC$ 的 LD50 明显高于野生株的^[6]; 但是当通过腹膜注射感染时, $\Delta kfuABC$ 对肺炎克雷伯菌毒力就无影响^[12], 这表明 *kfuABC* 操纵子对肺炎克雷伯菌的毒力影响与感染途径相关, $\Delta kfuABC$ 可能对胃酸更为敏感。

CRP 是最“古老”的转录调控子之一, 参与细菌糖代谢和毒力基因的表达调控。在鼠疫菌中, CRP 能调控一些关键毒力位点的表达, 如强毒力岛、Ⅲ型分泌系统等, 特别是能直接激活纤维蛋白酶原激活因子 Pla 的表达, 使其与腺鼠疫和原发性肺炎型鼠疫的发病直接相关^[8]。在肺炎克雷伯菌中, 已有研究表明它能直接抑制关键毒力因子 CPS 的合成, 这被认为有利于逃避宿主的免疫杀伤^[3]。而 CRP 对 *kfuABC* 的转录抑制, 不利于肺炎克雷伯菌在宿主体内的生长繁殖, 但这可能和抑制 CPS 的表达一样, 有利于肺炎克雷伯菌逃避宿主的免疫杀伤。CRP 抑制肺炎克雷伯菌一些毒力因子的表达, 是否会使 *crp* 突变株 (Δcrp) 毒力增强呢? 实际上, 通过腹膜注射感染时, Δcrp 对小鼠的毒力是明显减弱的 (未发表数据), 这除了和 CRP 调节大量的糖代谢基因有关外, 也提醒研究者不能孤立的看待毒力因子的转录调控。

本研究利用 EMSA、DNase I 足迹实验、real-time PCR、*LacZ* 报告基因融合实验及引物延伸实验等技术, 首次证明了肺炎克雷伯菌 *kfuABC* 的转录表达直接受 CRP 的抑制。*kfuABC* 启动子区结构分析发现 CRP 的结合位点远离 -35 元件和转录起始位点, 与鼠疫菌 CRP 对 *ompX* 的调控具有相同的抑制机制^[13]。另外, 在 *kfuABC* 启动子区结构分析中发现, *kfuABC* 启动子区除含有 CRP 结合位点外, 还含有 Fur 蛋白识别基序的相似序列 (Fur box), 表明 *kfuABC* 的转录表达极可能还受 Fur 蛋白的直接调控。Fur 蛋白也是一个重要的调控子, 不仅参与毒力因子 CPS 的调控, 还与碳代谢和铁摄入有关^[14]。可见, 毒力因子的表达是一个受多调控子协同调控的过程, 后续的实验将解析肺炎克雷伯菌毒力因子的转录表达调控网络, 从而阐明肺炎克雷伯菌

的致病机制。

参 考 文 献

- [1] Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns[J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(2): 160-166.
- [2] Yu VL, Hansen DS, Ko WC, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7): 986-993.
- [3] Lin CT, Chen YC, Jinn TR, et al. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54430.
- [4] Fung CP, Hu BS, Chang FY, et al. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(6): 2075-2079.
- [5] Jurado R L. Iron, infections, and anemia of inflammation[J]. *Clin Infect Dis*, 1997, 25(4): 888-895.
- [6] Ma LC, Fang CT, Lee CZ, et al. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection[J]. *J Infect Dis*, 2005, 192(1): 117-128.
- [7] McDonough KA, Rodriguez A. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 10(1): 27-38.
- [8] Zhan L, Han Y, Yang L, et al. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in *Yersinia pestis* biovar microtus[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(11): 5028-5037.
- [9] 张义全, 高 鹤, 王 丽, 等. 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析[J]. *微生物学报*, 2011, 51(5): 615-621.
- [10] 杨 琳, 高 鹤, 张义全, 等. 鼠疫菌、副溶血弧菌及肺炎克雷伯菌 CRP 蛋白的表达及其 DNA 结合活性分析[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2011, 22(3): 251-256.
- [11] Gong S, Bearden SW, Geoffroy VA, et al. Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(5): 2829-2837.
- [12] Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, et al. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(12): 1717-1727.
- [13] Gao H, Zhang Y, Yang L, et al. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis*[J]. *BMC Microbiol*, 2011(11): 40.
- [14] Zhang Z, Gosset G, Barabote R, et al. Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, *crp* and *fur*, in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(3): 980-990.

(责任编辑: 关蕴良)