

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20240823.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240823.1807.004>

类鼻疽伯克霍尔德菌非编码 RNA BprsB 的生物学功能初步评价

谭君¹, 李雪苗¹, 罗妮妮¹, 王彦双², 陈垂这¹, 邓泽芳¹, 罗江慧¹, 方俊德¹, 夏乾峰¹✉

(1. 海南医科大学热带医学院, 海南 海口 571199; 2. 海南医科大学第二附属医院检验科, 海南 海口 571199)

[摘要] **目的:** 探讨 Hfq 相关 sRNA (BprsB) 对类鼻疽伯克霍尔德菌的生长速率、泳动能力、生物被膜形成以及耐药性等多方面生物学功能的影响。**方法:** 以依赖 Hfq 蛋白的类鼻疽伯克霍尔德菌 BprsB 为靶标, 利用同源重组技术构建 BprsB 缺失株 (Δ BprsB); 选取野生型类鼻疽伯克霍尔德菌株 (HNBP001) 作为对照组, Δ BprsB 作为实验组; 通过酶标仪测定细菌的生长曲线, 从而评估生长速率的变化; 采用点板培养法和测量群区直径进而评价细菌泳动能力; 通过结晶紫染色法测量生物膜形成情况; 最后, 通过 MIC 试验判断细菌对抗菌药物的敏感情况。**结果:** Δ BprsB 生长速率低于 HNBP001; 与 HNBP001 相比, Δ BprsB 的群区直径小 ($P < 0.0001$); Δ BprsB 的生物被膜形成比 HNBP001 少 ($P < 0.0001$); 与 HNBP001 相比, Δ BprsB 对喹诺酮类抗菌药物 (左氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星) 以及 β -内酰胺类抗菌药物 (氨曲南) 的敏感性升高。**结论:** BprsB 促进了类鼻疽伯克霍尔德菌的生长速率、泳动、生物被膜形成和耐药, 为进一步研究 BprsB 在类鼻疽伯克霍尔德菌致病机制中所扮演的角色提供了证据。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌; sRNA; 基因敲除; 生物学功能

[中图分类号] R378 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2025)06-0401-07

Preliminary evaluation of the biological function of non-coding RNA BprsB in *Burkholderia pseudomallei*

TAN Jun¹, LI Xuemiao¹, LUO Nini¹, WANG Yanshuang², CHEN Chuizhe¹, DENG Zefang¹, LUO Jianghui¹, FANG Junde¹, XIA Qianfeng¹✉

(1. School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Foundation Project]: This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81960002)

[Author]: TAN Jun, E-mail: 1617307859@qq.com; LI Xuemiao, E-mail: 2087449130@qq.com.

[Correspondence to]: XIA Qianfeng, Professor, Doctoral Supervisor, E-mail: xiaqianfeng@hainmc.edu.cn.

Received: 2024-05-13

Revised: 2024-08-14

JHMu, 2025;31(6):401-407

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Hfq related sRNA (BprsB) on the growth rate, motility, biofilm formation, and drug resistance of *Burkholderia pseudomallei*. **Method:** Using homologous recombination technology, BprsB of *Burkholderia pseudomallei* dependent on Hfq protein was used as the target to construct a BprsB mutant strain (Δ BprsB); The wild-type *Burkholderia pseudomallei* strain (HNBP001) was used as the control group, and the Δ BprsB was used as the experimental group; The bacterial growth curve was measured by a multimode reader to evaluate changes in growth rate; Using point plate culture method and measuring the diameter of the colony to evaluate motility; The formation of biofilm was measured by crystal violet staining method; Finally, the sensitivity of bacteria to antibiotics is determined through MIC experiments. **Result:** The growth rate of Δ BprsB was lower than that of HNBP001; Compared with HNBP001, the population diameter of Δ BprsB was smaller ($P < 0.0001$); The biofilm formation of Δ BprsB was less than that of HNBP001 ($P < 0.0001$); Compared with HNBP001, the Δ BprsB was more sensitive to quinolone antibiotics (Levofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin) and β -lactam antibiotics (Aztreonam). **Conclusion:** sRNA BprsB promotes the growth rate, motility, biofilm formation, and drug resistance of *B. pseu-*

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81960002)

[作者简介] 谭君, E-mail: 1617307859@qq.com; 李雪苗, E-mail: 2087449130@qq.com。

[通讯作者] 夏乾峰, 教授, 博士生导师, E-mail: xiaqianfeng@hainmc.edu.cn。

[收稿日期] 2024-05-13

[修回日期] 2024-08-14

网络出版时间: 2024-08-26 14:24:47

domallei, laying a solid foundation for further research on the role of sRNA BprsB in the pathogenesis of *B. pseudomallei*.

[Key words] *Burkholderia pseudomallei*; sRNA; Gene knockout; Biological function

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)是一种兼性胞内革兰阴性菌,广泛存在于土壤和水中,可以经破损的伤口或者摄入受到污染的食物和水感染,引起人畜共患的传染性疾病类鼻疽^[1]。全球报道的类鼻疽病例和死亡率逐年增加,海南省作为我国类鼻疽伯克霍尔德菌分离率最高的地区,多发生于沿海区域,且致死率较高^[2,3]。类鼻疽伯克霍尔德菌的致病机理复杂,作为胞内菌,容易逃避宿主的免疫机制,在宿主体内长期存在,耐药性强,对许多抗菌药物存在抗药性,导致治疗难度增加,因此,在类鼻疽伯克霍尔德菌的致病机理和治疗方面引起了越来越多的关注^[4,5]。在伯克霍尔德菌的sRNA研究中发现sRNA在表型变化、毒力强弱、环境适应能力等方面发挥显著的作用^[6,7]。

Hfq,一种Sm/Lsm型RNA结合蛋白,它已经被证明在稳定和调节方面发挥了关键作用,其相应基因的突变经常与复杂的表型改变有关,包括缺乏生物膜形成和丧失毒力等^[8]。Hfq在细菌内的一个主要功能之一是作为sRNA的伴侣蛋白,稳定sRNA的二级结构,帮助sRNA与靶mRNA之间的碱基互补配对^[9]。在原核生物和真核生物中存在着具有重要调控功能的非编码RNA(ncRNA),在细菌中被统称为small RNA(sRNA),这些sRNA是一种多功能的调节器,通常在40到500核苷酸(Nucleotide, nt)左右^[10]。反式编码的sRNAs是最丰富的sRNAs类型,它们与Hfq蛋白结合,调控目的mRNA^[11]。基于本课题组前期对类鼻疽伯克霍尔德菌分子伴侣Hfq蛋白进行表达和纯化的研究^[12],

在HNBP001内新发现一个依赖Hfq的sRNA,并将其命名为BprsB,本课题对BprsB进行基因敲除,获得ΔBprsB,进一步探讨其对生长、泳动、生物膜形成和耐药的影响。

1 材料与方法

1.1 细菌和质粒

所有实验均以类鼻疽伯克霍尔德菌菌株HN-BP001进行。通过同源重组的方法构建了BprsB缺失突变体。pK18mobSacB-TPR重组质粒由本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

T4 DNA连接酶、BamH I、Xba I、Hind III (NEB,货号:M0202、R0136、R0145、R0104);基因组提取试剂盒(天根,货号:DP348);PCR产物纯化试剂盒、质粒提取试剂(Omega,货号:D6492-00、D6943-01);胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID,货号:LP0042、LP0021);氯化钠、蔗糖(西陇,货号:1000582、1001110);PrimeSTAR Max DNA Polymerase(Takara,货号:R045A);50×TAE Buffer(生工,货号:B548101);多功能酶标仪(Biotek,型号:SYNERGYH1);凝胶成像分析系统(君意,型号:JY04S-31);PCR扩增仪(Eppendorf,型号:Mastercycler pro)。

1.3 引物

根据NCBI的序列对比分析,BprsB位于2号染色体上,并根据BprsB序列的上下游1 000 bp片段设计引物。所用的引物(如表1)均由生工公司合成。

表1 引物序列及酶切位点
Tab 1 Primer sequences and restriction site

Primer	Sequence(5'-3')
F	AGGTAGTCCGAAAAGTC
R	GTAGGAAAACAAACGCG
S-F	ATATAAGCTTTGAAGGTCTTCCAGTTGTAATTGCACT (Hind III)
S-R	TTTCTAGAGAGCGCCATCTCGTAGTTTTTCAGG (Xba I)
X-F	TTTCTAGAAAACGCGTGCGTCCGCTGCT (Xba I)
X-R	AATTGGATCCCGATGGTTTTTCAGCAAGTCGTACATCGTCGTT (BamH I)

1.4 重组载体构建

首先利用PCR扩增出BprsB基因的上下同源臂(UP和Down),接着使用酶切酶连的方法将同源臂连接到pK18mobSacB-TPR,限制性内切酶Hind

III,Xba I,BamH I对上下同源臂和pK18mobSacB-TPR进行酶切,采用T4DNA连接酶进行连接。将重组成功的质粒转化DH5α感受态细胞利用甲氧苄啶抗性进行筛选,最后送提取质粒

送至华大基因公司进行测定。

1.5 BprsB缺失株构建

将测序成功的质粒转化S17-1感受态细胞。挑取新鲜培养的HNBP001和含有重组质粒的S17-1感受态在LB肉汤中过夜培养至对数期,再分别取1 mL菌液至EP管中,离心弃上清,用无菌LB重悬,按1:1的比例将HNBP001和S17-1混匀后孵育4 h促进接合。将孵育好的细菌按照一定的比例稀释涂布含有硫酸庆大霉素(Gm)和甲氧苄啶(TPR)的固体培养基中,37℃培养36~48 h。将接合成功的细菌稀释涂布于终浓度为15%(w/V)的蔗糖培养基,诱导游离重组质粒丢失。最后使用验证引物对缺失株进行验证,并送测序进行BprsB缺失确认。

1.6 生长曲线测定

在圆底96孔微量滴定板中,使用多功能酶标仪测定。细胞以 10^6 CFU/mL和光密度($OD_{600}=0.1$)接种。每30 min测量1次,测量时间>60 h。实验组为 Δ BprsB,选择HNBP001野生型为阳性对照组,阴性对照组为同等体积的LB培养基。每个样本至少6个重复进行测试。

1.7 泳动能力分析

将细菌在含有10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母提取物,10 g/L氯化钠的LB培养基中培养过夜培养,接种到含有0.3%琼脂的LB培养基琼脂平板的中心。培养皿在37℃下孵育24 h,观察并测量圆形菌群直径。对每个菌株进行3次重复试验。

1.8 生物被膜测定

将培养过夜的新鲜菌液用LB培养基稀释

($OD_{600}=0.1$),取200 μ L于24孔板中,3个重复样本在37℃下培养48 h后,用蒸馏水洗涤孔两次以去除浮游细胞,然后用甲醇固定过夜。弃甲醇,用纯水洗涤2次,在室温下用200 μ L 1%(wt/vol)结晶紫(CV)染色30 min。用200 μ L的蒸馏水仔细清洗三次,然后风干。每孔加入200 μ L 33%(vol/vol)醋酸使染色剂溶解,在595 nm波长下测定吸光度。

1.9 MIC测定

挑取单克隆菌落于MH汤中,用肉汤稀释至0.5麦氏浊度,根据迪尔96孔药敏板的说明书对HNBP001和 Δ BprsB进行MIC测定并分析两者之间的差异。实验进行3次独立重复。

1.10 实验数据处理

使用GraphPad Prism 9.0版本进行作图,组间差异通过 t 检验进行统计学分析,ns表示无显著差异, $P<0.05$ 为具有显著性差异。每个实验次数及组间数据样本重复次数均为3次。

2 结果

2.1 重组载体和 Δ BprsB的构建

将BprsB的上下同源臂连接至pK18mobSacB-TPR上,如图1A所示。利用PCR对BprsB的上游和下游进行扩增,扩增产物纯化后通过酶切酶连进行连接成功的质粒使用Hind III和BamH I进行酶切验证,如图1B的泳道1和2所示,成功获得重组质粒;对接合后筛选得到的 Δ BprsB使用验证引物进行检测,如图1C所示,泳道1为阳性对照,泳道2为 Δ BprsB条带,说明成功获得 Δ BprsB。

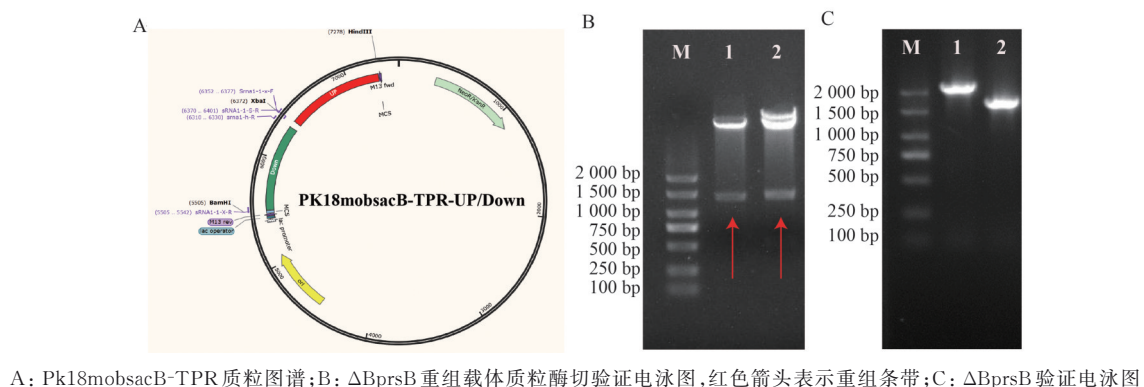


图1 质粒图谱及 Δ BprsB电泳图
Fig 1 Plasmid profile and Electrophoresis results of Δ BprsB

2.2 BprsB对HNBP001生长的影响

使用多功能酶标仪对野生型的HNBP001和 Δ BprsB生长速度进行连续检测,每30 min检测一次 OD_{600} ,共检测32 h。如图2所示,经过统计发现野生

型生长速率较快,而 Δ BprsB生长速率较慢。两株菌株都能在8 h内进入生长对数期,当培养至10 h时,HNBP001的 OD_{600} 值约为1.1左右;而 Δ BprsB约为0.7左右,且比野生株更早进入平台期,表明

BprsB 促进了 HNBP001 的生长。

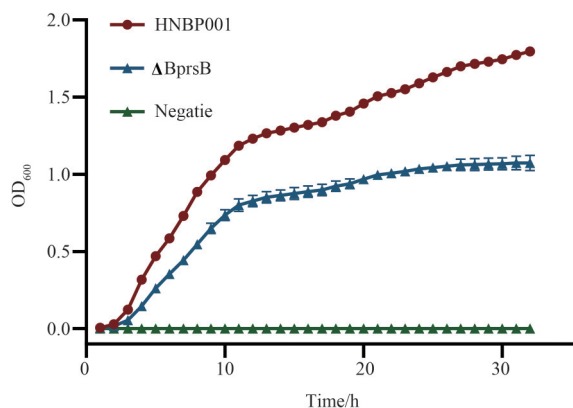


图2 HNBP001 和 Δ BprsB 的生长曲线

Fig 2 Growth curves of HNBP001 and Δ BprsB

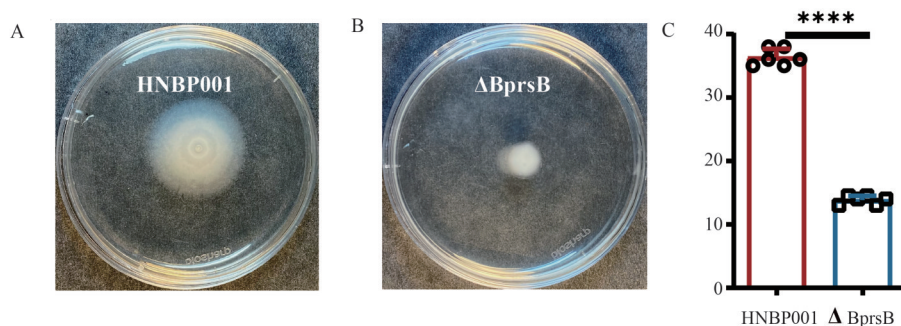
2.3 BprsB 对细菌泳动能力的影响

细菌的泳动能力在细菌获取营养物质、逃避不利环境、传递信息以及致病性等方面发挥着重要作用。通过比较野生株和 Δ BprsB 在 0.3% 软琼脂 LB

半固体培养基中 24 h 的泳动直径大小来观察 BprsB 对 HNBP001 泳动能力的影响。如图 3 所示,相对于 HNBP001, 观察到 Δ BprsB 的泳动直径小于 HNBP001, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$), Δ BprsB 的泳动能力减弱,表明 BprsB 基因缺失可抑制 HNBP001 的泳动。

2.4 BprsB 对 HNBP001 生物被膜形成的影响

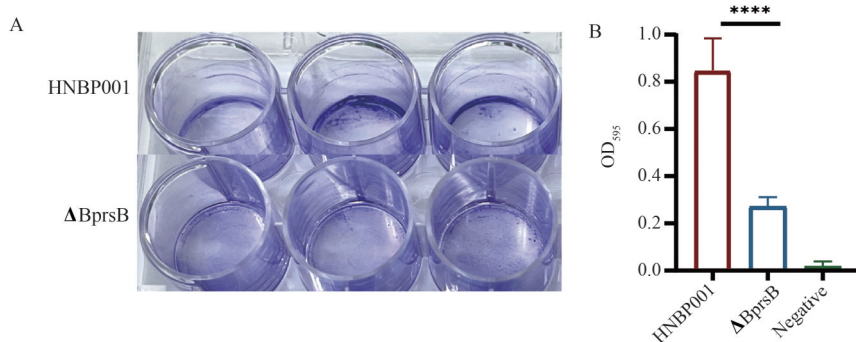
细菌生物被膜为细菌提供了一个安全的避风港。在生物被膜的保护下,细菌可以免受外部环境中的不利因素。接下来测试了 BprsB 是否影响了生物被膜的形成。检测了 24 孔微滴定板中 HNBP001 和 Δ BprsB 在 LB 培养基中形成的生物膜,在 37°C 培养 48 h。孵育后,用 ddH₂O 洗涤去除浮游细胞,生物膜中附着的细胞用结晶紫染色,通过在 595 nm 处的吸光度进行定量。如图 4A 所示,可以观察到在野生株在气液交界处出现了较厚的生物膜,而 Δ BprsB 的生物膜形成不明显。定量检测结果表明,与野生株相比, Δ BprsB 生物膜的形成相对减少,且 $P < 0.0001$ 差异具有统计学意义(图 4B)。因此, BprsB



A: HNBP001 泳动图; B: Δ BprsB 泳动图; C: Δ BprsB 与 HNBP001 的泳动性比较,与 HNBP001 相比, $t = 36.08$, **** $P < 0.0001$

图3 HNBP001 和 Δ BprsB 的泳动性

Fig 3 The motility of HNBP001 and Δ BprsB



A: HNBP001 和 Δ BprsB 的生物被膜结晶紫染色结果图; B: 结晶紫法定量生物被膜形成,与 HNBP001 相比, $t = 7.10$, **** $P < 0.0001$

图4 HNBP001 和 Δ BprsB 的生物被膜形成

Fig 4 Biofilm formation of HNBP001 and Δ BprsB

的存在正向调控了HNBP001的生物膜形成。

2.5 BprsB对抗菌药物的敏感性

类鼻疽伯克霍尔德菌复杂的固有耐药性,导致临床治疗上类鼻疽伯克霍尔德菌存在一定的困难。为了验证BprsB是否对类鼻疽伯克霍尔德菌的耐药性存在一定的影响,使用含有临床常用抗菌药物的药敏板,检测BprsB缺失前后对抗菌药物的敏感程度。发现与野生型相比, Δ BprsB对喹诺酮类抗菌药物(左氧氟沙星,诺氟沙星,环丙沙星)以及 β -内酰胺类抗菌药物(氨曲南)的敏感性升高。

表2 MIC试验
Tab 2 The MIC test

抗菌药物	MIC (μ g/mL)	
	HNBP001	Δ BprsB
左氧氟沙星	2	1
诺氟沙星	8	4
氨曲南	16	8
环丙沙星	1	0.5
庆大霉素	8	8
阿米卡星	32	32
妥布霉素	8	8
头孢他啶	2	1
头孢吡肟	16	8
多粘菌素B	4	4
头孢噻肟	8	8
美罗培南	1	1
亚胺培南	1	1
头孢哌酮钠	16/8	16/8
替加环素	1	1
米诺环素	4	4
复方新诺明	38/2	38/2

3 讨论

类鼻疽伯克霍尔德菌是一种兼性胞内革兰阴性菌,广泛存在于自然环境中,通常通过呼吸道、消化道及外伤伤口等途径侵入人体,引发类鼻疽^[13]。类鼻疽伯克霍尔德菌的致病机理复杂,作为胞内菌,容易逃避宿主的免疫机制,潜伏期长,耐药性强,导致类鼻疽具有多种临床症状和高死亡率(40%),对早期疾病诊断和治疗构成挑战^[5,14]。因此,在类鼻疽伯克霍尔德菌的致病机理和治疗方面引起了越来越多的关注。

本课题组前期研究中,通过表达Hfq蛋白并鉴定了其相关的新的sRNA。本研究以其中一个新的sRNA BprsB为研究对象,阐述BprsB对类鼻疽伯克霍尔德菌潜在的毒力调控机制。Hfq作为分子伴侣,可以帮助稳定sRNA的二级结构,并协助sRNA

与靶mRNA的配对互作。sRNA在细菌中具有重要调控功能,其通过感应外界环境条件变化,参与转录后基因的表达调控,影响和调节细菌的多种生理功能,包括物质代谢、群体感应、生物膜形成、致病力、耐药性和应激反应等^[15-17]。近年来,在伯克霍尔德菌的sRNA研究中发现sRNA在生长、耐药和其他生物学功能变化发挥显著的作用,如类鼻疽伯克霍尔德菌的sRNA9与relA减缓了的生长、运动与生物被膜形成^[6,18],洋葱伯克霍尔德菌的sRNA ncS35抑制细菌生长^[7]。

为了进一步研究BprsB对类鼻疽伯克霍尔德菌的影响,本研究构建了BprsB的缺失株 Δ BprsB。首先通过生长速率的比较,发现 Δ BprsB的生长速率明显低于野生株的生长速率,这可能是由于BprsB参与了细菌的物质代谢等调节过程,例如,在大肠杆菌(Spot 42)和枯草芽孢杆菌(RnaC)中已经描述了减缓生长的RNA^[19,20]。Spot 42的表达受到cAMP的负调控,并在含有葡萄糖的培养基中增加。Spot 42在中心碳代谢中起作用,过表达Spot 42的突变体表现出小集落表型。RnaC参与了枯草芽孢杆菌的生长速率和进入固定阶段的调控。

通过比较 Δ BprsB的生物被膜形成能力,发现 Δ BprsB的形成能力减弱,生物被膜的形成量减少。许多细菌病原体形成生物被膜,包围细菌,促进细胞附着和相互作用^[21]。此外,生物被膜还使病原体对抗菌剂和宿主免疫分子更具耐受性,同时帮助细菌在营养缺乏的条件下生存。根据实验结果,发现BprsB可能参与了类鼻疽伯克霍尔德菌的生物膜形成过程,而生物膜的形成复杂,由生物或非生物表面的微生物细胞聚集组成的,由细胞外聚合物(EPSs)和蛋白质、多糖、核酸(DNA)、脂多糖(LPS)和水组成。成功的生物膜形成包括4个主要阶段:(1)表面细菌附着,(2)微菌落形成,(3)生物膜结构的成熟,(4)触发细胞扩散到浮游状态的信号和环境线索^[22,23],而BprsB具体参与生物膜形成哪一步的调控有待后续继续研究。此外本研究还发现了, Δ BprsB的泳动能力下降,而细菌的运动能力与鞭毛密切相关。类鼻疽伯克霍尔德菌是具有鞭毛的革兰阴性菌,运动能力由鞭毛参与调节,而鞭毛由60多个基因调控,包括主要的合成调控基因*flhD*,*flhC*,*fliA*等,且这些基因是通过级联调控进行控制表达,进而促进鞭毛的合成^[24]。 Δ BprsB的泳动能力下降,表明BprsB可能作为调控因子参与到了鞭毛合成的基因调控中,而BprsB是如何被其他信号分子激活,从而高表达后在Hfq的协助下与

鞭毛基因互补配对,如何达到调节鞭毛基因表达水平的目的,后续会继续深入研究。

此外,本研究还发现 BprsB 的缺失影响了类鼻疽伯克霍尔德菌对喹诺酮类和 β -内酰胺酶类抗菌药物的敏感性。这可能 BprsB 参与了细菌的外排泵系统或是由于生物膜形成的减弱引起的。小 RNA 在调节细菌包膜的组成方面具有显著的作用,并通过这些功能控制许多人类病原体的内在抗菌素耐药性,大量文献也表明,sRNA 有望成为新抗菌药物治疗的靶标^[25]。例如,为了了解 sRNAs 对铜绿假单胞菌形成生物膜病原体中抗菌药物耐药性的贡献,研究发现当过表达 sRNA,AS1974 时,增加了对氨基糖苷、头孢菌素、美罗培南和厄他培南抗菌药物的敏感性。AS1974 负调控生物膜相关的抗菌药物耐药蛋白 NdvB,*ndvB* 的缺失使铜绿假单胞菌生物膜对庆大霉素和环丙沙星敏感,表明 sRNA AS1974 可能通过抑制 *ndvB* 的表达使细胞对抗菌药物敏感。在大肠杆菌中,sRNA RyhB 在缺铁条件下生长时促进了持久性连锁表型。*ryhB* 缺失显示对左氧氟沙星、头孢噻肟和庆大霉素的敏感性增加。在大肠杆菌中,一些多药物外排泵系统包括外膜蛋白 TolC,它受到高度保守的 sRNA SdsR 的负调控。SdsR 受一般应激反应 sigma 因子 RpoS 的调控,sRNA 的过表达增加了对新生霉素和结晶紫的敏感性,与 *tolC* 表达的降低相关^[26]。但是,BprsB 影响了细菌的生长代谢,所以 Δ BprsB 的生物膜形成,泳动能力下降以及对药物敏感性增加均有可能是由生长速率减弱引起,而其中具体的调控机制有待后续进一步深入研究。

综上所述,BprsB 在类鼻疽伯克霍尔德菌的生长、代谢和致病中起重要作用,为进一步研究 BprsB 在类鼻疽伯克霍尔德菌的致病机制奠定了基础。

作者贡献度说明:

谭君、李雪苗贡献一致:负责课题的设计与实验,撰写论文;夏乾峰:课题设计、论文审阅与修改;罗妮妮、王彦双、陈垂这、邓泽芳、罗江慧、方俊德:参与实验和数据统计。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Wang Y, Li X, Dance DAB, et al. A novel lytic phage potentially effective for phage therapy against *Burkholderia pseudomallei* in the tropics[J]. Infect Dis Poverty, 2022, 11(1): 1-13.
- Meumann EM, Limmathurotsakul D, Dunachie SJ, et al. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis[J]. Nat Rev Microbiol, 2024, 22(3): 155-169.
- 董素芳,林学姝,符生苗,等.海南省46例类鼻疽的流行病学特征与临床分析[J].中国病原生物学杂志, 2017, 12(6): 579-582.
- Dong SF, Lin XS, Fu SM, et al. Epidemiological features and clinical manifestations of melioidosis in 46 patients in Hainan[J]. J Pathogen Biol, 2017, 12(6): 579-582.
- Currie BJ. Melioidosis and burkholderia pseudomallei: Progress in epidemiology, diagnosis, treatment and vaccination[J]. Curr Opin Infect Dis, 2022, 35(6): 517-523.
- Bzdyl NM, Moran CL, Bendo J, et al. Pathogenicity and virulence of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Virulence, 2022, 13(1): 1945-1965.
- 吴兴勇,李雪苗,刘成利,等.类鼻疽伯克霍尔德菌 Δ relA 缺失株的构建及其生物学特性比较[J].海南医学院学报, 2022, 28(15): 1135-1140.
- Wu XY, Li XM, Liu CL, et al. Construction of *Burkholderia pseudomallei* Δ relA mutant and comparison of their biological characteristics [J]. J Hainan Med Univ, 2022, 28(15): 1135-1140.
- Sass A, Kiekens S, Coenye T. Identification of small RNAs abundant in *Burkholderia cenocepacia* biofilms reveal putative regulators with a potential role in carbon and iron metabolism[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15665.
- Papenfort K, Melamed S. Small RNAs, large networks: Posttranscriptional regulons in gram-negative bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 2023, 77: 23-43.
- Pearl Mizrahi S, Elbaz N, Argaman L, et al. The impact of Hfq-mediated sRNA-mRNA interactome on the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Sci Adv, 2021, 7(44): eabi8228.
- Jia T, Wu P, Liu B, et al. The phosphate-induced small RNA EsrL promotes *E. coli* virulence, biofilm formation, and intestinal colonization[J]. Sci Signal, 2023, 16(767): eabm0488.
- Basu P, Elgrably-Weiss M, Hassouna F, et al. RNA binding of Hfq monomers promotes RelA-mediated hexamerization in a limiting Hfq environment[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2249.
- 陈垂这,吴文东,瞿先华,等.类鼻疽伯克霍尔德菌 sRNA 伴侣蛋白 Hfq 的表达与纯化[J].中国病原生物学杂志, 2018, 13(4): 5.
- Chen CZ, Wu WD, Qu XH, et al. Expression and purification of the sRNA chaperone protein Hfq from *Burkholderia pseudomallei* [J]. J Pathogen Biol, 2018, 13(4): 5.
- Chomkatekaw C, Boonklang P, Sangphukieo A, et al.

- An evolutionary arms race between *Burkholderia pseudomallei* and host immune system: What do we know[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 612568.
- 14 Mariappan V, Vellasamy KM, Barathan M, et al. Hijacking of the host's immune surveillance radars by *Burkholderia pseudomallei* [J]. Front Immunol, 2021, 12: 718719.
 - 15 McKellar SW, Ivanova I, Arede P, et al. RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3560.
 - 16 Walling LR, Kouse AB, Shabalina SA, 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.
 - 17 Desgranges E, Barrientos L, Herrgott L, et al. The 3'UTR-derived sRNA RsaG coordinates redox homeostasis and metabolism adaptation in response to glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus* [J]. Mol Microbiol, 2022, 117(1): 193-214.
 - 18 宋心怡, 厉安洋, 李艳梅, 等. 类鼻疽伯克霍尔德 sRNA 敲除株的构建及生物学功能初步评价[J]. 海南医学院学报, 2023, 28(15): 641-646.
Song XY, Li AY, Li YM, et al. Construction and biological characterization of *Burkholderia pseudomallei* sRNA gene deletion strain [J]. J Hainan Med Univ, 2023, 28(15): 641-646.
 - 19 Durica-Mitic S, Göpel Y, Görke B. Carbohydrate utilization in bacteria: Making the most out of sugars with the help of small regulatory RNAs [J]. Microbiol Spectr, 2018, 6(2).
 - 20 Arraiano C, Andrade J, Domingues S, et al. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression [J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34(5): 883-923.
 - 21 Winans JB, Wucher BR, Nadell CD. Multispecies biofilm architecture determines bacterial exposure to phages [J]. PLoS Biol, 2022, 20(12): e3001913.
 - 22 Nyanasegran PK, Nathan S, Firdaus-Raih M, et al. Biofilm signaling, composition and regulation in *Burkholderia pseudomallei* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2023, 33(1): 15-27.
 - 23 Condinho M, Carvalho B, Cruz A, et al. The role of RNA regulators, quorum sensing and c-di-GMP in bacterial biofilm formation [J]. FEBS Open Bio, 2023, 13(6): 975-991.
 - 24 Ma Y, Yue Y, Jia H, et al. Switching off bacterial flagellar biogenesis by YdiU-mediated UMPylation of Flh-DC [J]. mBio, 2022, 13(3): e0024922.
 - 25 Mediati DG, Wu S, Wu W, et al. Networks of resistance: Small RNA control of antibiotic resistance [J]. Trends Genet, 2021, 37(1): 35-45.
 - 26 Gan IN, Tan HS. A small RNA decreases the sensitivity of *Shigella sonnei* to norfloxacin [J]. BMC Res Notes, 2019, 12(1): 97.

[本文编辑] 雷燕 宋睿璞 朱昊