

变异链球菌CRISPR-Cas9系统 $csn2$ 基因突变株的转录组学分析*

何晓雅, 张安琪, 龚涛, 李雨庆[△]

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】 目的 对变异链球菌CRISPR-Cas9系统 $csn2$ 基因突变株的转录组基因表达差异进行分析。方法 培养变异链球菌UA159、 $csn2$ 基因的缺失菌株 $\Delta csn2$ 及回补菌株。提取总RNA,采用高通量测序技术,进行转录组测序,基于差异表达基因GO和KEGG数据库分析的基础上,对其参与的生物学过程进行挖掘,采用qRT-PCR的方法验证转录组测序结果。结果 转录组结果显示与UA159相比, $\Delta csn2$ 中基因表达量变化在1倍以上的基因有176个($P < 0.05$),其中上调表达基因72个,下调表达基因104个,通过GO功能富集分析及KEGG代谢通路富集分析,发现上调和下调的差异表达基因(DEG)均参与的功能为氨基酸转运和代谢。除此之外,上调的DEG参与的生物过程主要与碳水化合物代谢、能量产生和转化、转录等有关;下调的DEG主要与脂质代谢、DNA的复制、重组和修复、信号转导机制、核苷酸转运和代谢等生物过程有关,还有部分DEG的功能尚不清楚。qRT-PCR验证发现,与UA159及 $\Delta csn2/pDL278-csn2$ 菌株相比,与支链氨基酸形成相关的基因 $leuA$ 、 $leuC$ 和 $leuD$ 在 $\Delta csn2$ 中的表达显著下调。结论 通过转录组测序和qRT-PCR验证发现 $\Delta csn2$ 中与支链氨基酸合成与细胞膜通透性相关的基因表达量发生了明显变化。

【关键词】 变异链球菌 CRISPR-Cas $csn2$ 转录组

Transcriptomic Analysis of $csn2$ Gene Mutant Strains of *Streptococcus mutans* CRISPR-Cas9 System HE Xiao-ya, ZHANG An-qi, GONG Tao, LI Yu-qing[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: liyuqing@scu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the differences in transcriptional levels between mutant strains of $csn2$ gene of CRISPR-Cas9 system of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and wild-type strains. **Methods** The *S. mutans* UA159, $csn2$ -gene-deleted strains ($\Delta csn2$) and $csn2$ -gene-covering strains ($\Delta csn2/pDL278-csn2$) of *S. mutans* were cultivated. Total RNA was extracted, and high-throughput sequencing technology was used for transcriptome sequencing. Based on the GO analysis and the KEGG analysis of the differentially expressed genes, the biological processes involved were thoroughly examined. The qRT-PCR method was used to verify the transcriptome sequencing results. **Results** The transcriptome results showed that, compared with UA159, there were 176 genes in $\Delta csn2$ whose gene expression changed more than one fold ($P < 0.05$), of which 72 were up-regulated and 104 were down-regulated. The GO enrichment analysis and the KEGG enrichment analysis revealed that both the up-regulated and down-regulated differentially expressed genes (DEG) were involved in amino acid transport and metabolism. In addition, the biological processes that up-regulated DEGs participated in were mainly related to carbohydrate metabolism, energy production and conversion, and transcription; down-regulated DEGs were mainly related to lipid metabolism, DNA replication, recombination and repair, signal transduction mechanisms, nucleotide transport and metabolism. The functions of some DEGs were still unclear. Results of qRT-PCR verified that the expressions of $leuA$, $leuC$ and $leuD$ (genes related to the formation of branched-chain amino acids) were significantly down-regulated in $\Delta csn2$ when compared with UA159 and $\Delta csn2/pDL278-csn2$. **Conclusion** Through transcriptome sequencing and qRT-PCR verification, it was found that the expression of genes related to branched-chain amino acid synthesis and cell membrane permeability in $\Delta csn2$ changed significantly.

【Key words】 *Streptococcus mutans* CRISPR-Cas $csn2$ Transcriptome

龋病是人类常见的口腔疾病之一,其发病率高、分布广,已被世界卫生组织(WHO)列为人类三大重点防治疾病之一。变异链球菌(*Streptococcus mutans*)作为主要致龋微生物之一,其致龋毒力包括产酸和耐酸性、产生细胞外多糖和对牙面的黏附作用等,在龋病的发生发展中起

着至关重要的作用。

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins(简称CRISPR-Cas系统),是细菌为应对病毒或质粒不断攻击演化而来的获得性免疫防御系统。研究发现,大约40%的细菌和90%的古细菌拥有CRISPR-Cas系统,其结构主要由CRISPR array和cas genes两大部分组成^[1-4]。CRISPR-Cas系统抵抗外源

* 国家自然科学基金(No. 31870065)资助

[△] 通信作者, E-mail: liyuqing@scu.edu.cn

遗传物质入侵主要分为3个阶段: 适应、表达和干扰, 即以小片段RNA为向导, 通过碱基互补配对对入侵的外源遗传物质进行靶向定位, 最终Cas酶对外源核酸进行剪切和降解^[5]。

近期研究发现, 某些口腔致病菌也含有CRISPR-Cas系统, 如变异链球菌^[6-7]、牙龈卟啉单胞菌^[8]以及粪肠球菌^[9-10]。研究表明, 变异链球菌UA159菌株(*S. mutans* UA159)含有两种CRISPR-Cas系统: CRISPR1(type II -A)和CRISPR2(type I -C)^[11]。除了抵抗外源遗传物质入侵之外, CRISPR-Cas系统还参与该细菌其它生理活动的调节, 包括生物膜的形成、DNA修复、环境应激(pH、温度、氧化应激)等^[12]。前期研究发现*csn2*基因缺失会影响变异链球菌胞外多糖合成以及酸耐受能力^[13], 我们推测这些结果与*csn2*基因缺失引发复杂的网络调控相关。因此, 本研究拟通过转录组测序(RNA-sequence, RNA-seq)与实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)对*csn2*基因突变株 $\Delta csn2$ 与UA159菌株中差异表达的基因进行分析, 并初步探讨*csn2*对变异链球菌耐酸能力的影响机制。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

S. mutans UA159和*S. mutans* $\Delta csn2$ (本实验室构建)采用牛脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基(OXOID, 美国)培养。*csn2*基因回补菌株($\Delta csn2$ /pDL278-*csn2*)采用壮观霉素(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)选择性BHI培养基培养。菌株的生长条件均为37 $^{\circ}\text{C}$, 过夜静置厌氧培养(体积分数10%CO₂、10%H₂、80%N₂)。

1.2 RNA-seq与数据分析

将UA159及 $\Delta csn2$ 的过夜培养物在BHI中1:10稀释, 生长至光密度(OD)₆₀₀≈0.5再取20 mL菌液冻存于液氮15 min, 送样至上海美吉生物医药科技有限公司。本实验RNA-Seq检测及原始数据质控均委托上海美吉生物医药科技有限公司完成, RNA建库、富集, 采用IlluminaHiSeq 4000测序平台行2×150 bp测序。参考Gene Ontology(GO)数据库及Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)数据库对测序所得同源基因转录本进行功能注释和富集分析。

1.3 耐酸性相关基因的qRT-PCR验证

本课题组前期研究发现*csn2*基因的缺失影响变异链球菌耐酸能力^[13], 为了探索*csn2*缺失菌株耐酸系统对酸胁迫的响应以及验证RNA测序结果的可靠性, 选取 $\Delta csn2$ /pDL278-*csn2*菌株与UA159及 $\Delta csn2$ 变异株进行qRT-PCR检测。将UA159及 $\Delta csn2$ 、 $\Delta csn2$ /pDL278-*csn2*菌株的

过夜培养物在BHI中1:10稀释, 生长至OD₆₀₀≈0.5后, 离心收菌, 提取细菌总RNA。然后使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒将RNA逆转录为cDNA。选用16S rRNA^[14]作为内参引物, qRT-PCR检测支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)形成相关的基因*leuA*、*leuC*和*leuD*, 见表1。根据TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)说明书加样, 各基因引物设置不含cDNA的阴性对照。通过LightCycler 480 II System程序上机扩增, 获得目的基因及内参基因的Ct(cycle threshold)值。采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法对目的基因的相对表达水平进行计算分析, 得到各目的基因差异表达情况。

表1 qPCR反应所用引物
Table 1 Primers used in qPCR

Primer	Sequence (5'-3')
16S rRNA-F	AGCGTTGTCCGGATTTATTG
16S rRNA-R	CTACGCATTTCAACCGCTACA
<i>leuA</i> -F	TTTCTTGACACAACGCTCCG
<i>leuA</i> -R	ACGAGCCAGACCTGATACAG
<i>leuC</i> -F	AGATGCTGGCTTTGAATGGC
<i>leuC</i> -R	GCCTCCGGTAATTGACGAAC
<i>leuD</i> -F	ACCGACAGATGAAGTAACCGT
<i>leuD</i> -R	GCTTGACGGTTTTGCTCAT

1.4 统计学方法

所有实验均重复3次。各组实验数据用Levene's test对样本进行方差齐性检验, 若样本方差齐, 则进行两独立样本t检验或单因素方差分析, 若样本方差不齐, 则进行Kruskal-wallis非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达基因的筛选

对UA159和 $\Delta csn2$ 之间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行分析, 构建火山图(图1)。如火山图所示, 以 $|\log_2(\text{差异倍数})| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 为筛选条件时, UA159和 $\Delta csn2$ 之间共鉴定出176种DEGs。其中与UA159相比, $\Delta csn2$ 菌株中72种DEGs趋于上调, 104种DEGs趋于下调。

2.2 差异表达基因的GO及KEGG富集分析

如图2~图4所示, 通过对上调的DEGs和下调的DEGs进行GO功能富集分析及KEGG代谢通路富集分析, 我们发现上调的DEGs参与的生物过程主要与碳水化合物代谢、氨基酸转运和代谢、能量产生和转化、转录等有关; 下调的DEGs同样参与氨基酸转运和代谢, 除此以外

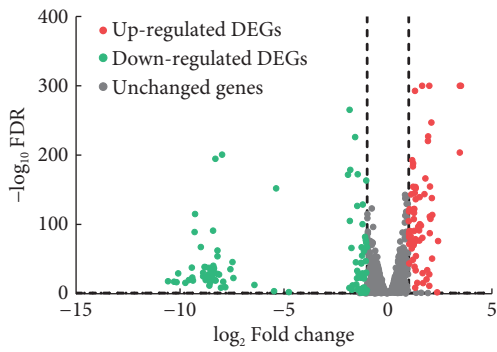


图 1 变异链球菌UA159和Δ*csn2*菌株差异表达基因的火山图

Fig 1 Volcano plots of DEGs in isolates UA159 and Δ*csn2* of *Streptococcus mutans*

还参与脂质代谢、DNA的复制、重组和修复、信号转导机制、核苷酸转运和代谢等生物过程。

2.3 *csn2*基因缺失菌株的耐酸性相关基因qRT-PCR分析

由转录组数据分析可知, *csn2*缺失菌株中与氨基酸的合成代谢相关的基因存在明显表达差异, 为了探索 *csn2*缺失菌株耐酸系统对酸胁迫的响应以及验证RNA测序结果的可靠性, 选取差异表达基因中与支链氨基酸形成相关的基因*leuA*、*leuC*和*leuD*进行qRT-PCR检测。如图5所示, 与UA159及Δ*csn2*/pDL278-*csn2*菌株相比, *leuA*、*leuC*和*leuD*在Δ*csn2*中的表达显著下调($P < 0.05$), UA159与Δ*csn2*/pDL278-*csn2*菌株中*leuA*、*leuC*和*leuD*的表达差异无统计学意义。

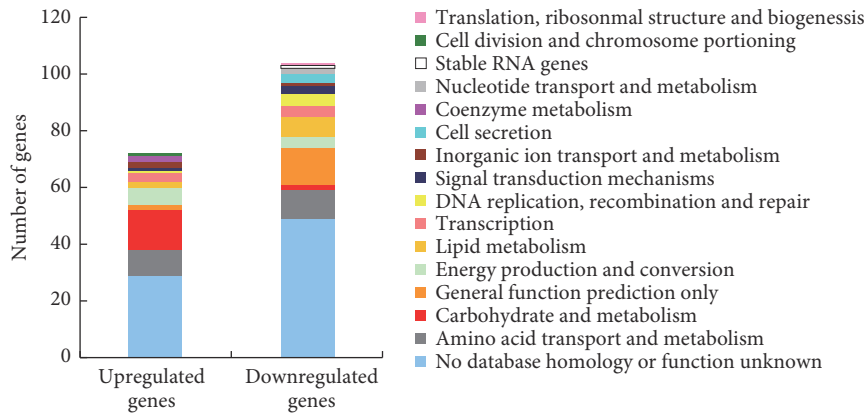


图 2 差异表达基因的分类和占比

Fig 2 Classification and percentage of the DEGs

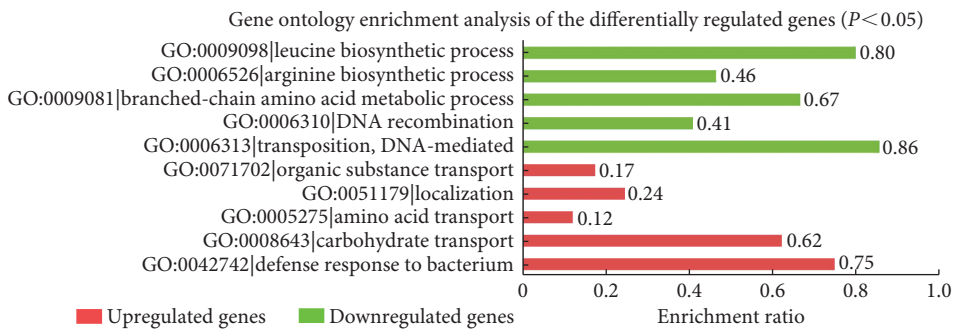


图 3 差异表达基因的GO富集分析

Fig 3 GO enrichment analysis of DEGs

3 讨论

变异链球菌首先将碳水化合物摄入细胞中, 经过一系列代谢途径, 从而发挥产酸、黏附、生物膜形成等与致龋相关的生物学特性。研究表明变异链球菌主要通过磷酸酶转移系统(phosphotransferase system, PTS)完成对碳水化合物的转运^[15]。转录组学分析揭示了*csn2*基因突变株编码碳水化合物摄取系统中表达变化的基因。在

Δ*csn2*中, 编码PTS酶 II (E II)复合物的基因表现出上调趋势。如: 编码PTS系统葡萄糖特异性转运子亚单位EIIABC的*ptsG*上调了2.3倍; 甘露醇特异性的PTS操纵子(*mtlA1*)和*lev*操纵子(*SMU_1956c-1961c*)的表达也受到高度诱导。

ABC(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白可以利用三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水解的能量转运各种生物分子, 在变异链球菌中参与包括营养摄取、细

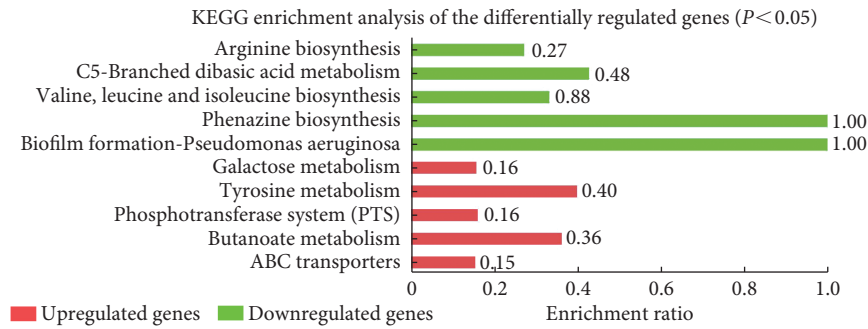


图 4 差异表达基因的KEGG富集分析

Fig 4 KEGG enrichment analysis of DEGs

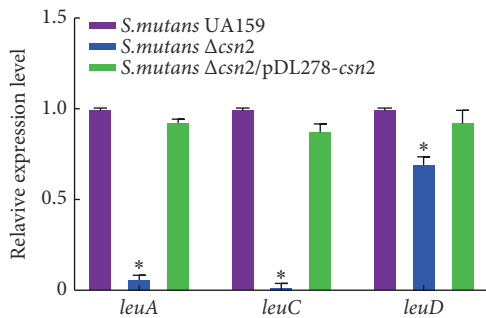
图 5 变异链球菌UA159、 $\Delta csn2$ 和 $\Delta csn2/pDL278-csn2$ 耐酸性相关基因的qRT-PCR结果

Fig 5 qRT-PCR assays for expression of genes related to acid tolerance ability

* $P < 0.05$, vs. *S. mutans* UA159 and *S. mutans* $\Delta csn2/pDL278-csn2$.

菌素分泌、抗原呈递、免疫调节等在内的多种生物学过程。其中MalX、MalF和MalG是负责麦芽糖摄取的ABC转运蛋白, *csn2*缺失菌株中其编码基因表达量显示出2.1倍的增加^[16]。

变异链球菌的多糖代谢(multiple sugar metabolism, msm)位点构成了一个非PTS糖摄取系统, 负责棉子糖、蜜三糖和异麦芽三糖的转运和利用。转录组学分析显示编码msm簇的8个基因*agaL*、*msmE*、*msmF*、*msmG*、*msmK*、*msmR*、*gtfA*和*dexB*表达上调。除此以外, 其他与糖代谢相关的基因包括*SMU_636*、*citB*、*SMU_870*和*galK*同样上调。与糖原生物合成有关的基因*glgP*和*malQ*被高度诱导。而与胞外多糖合成密切相关的基因如*gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*gbpB*和*fffI*以及调控乳酸生成过程的主要基因*ldh*的表达水平基本保持不变。

与UA159相比, *csn2*缺失菌株中与氨基酸的合成代谢相关的基因存在明显表达差异。在 $\Delta csn2$ 中, 与支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)形成密切相关的基因*leuA*、*leuC*和*leuD*显著下调。能为苯丙氨酸和酪氨酸的生物合成提供前体的分支酸变位酶(chorismate mutase, CM), 其编码基因*SMU_531*下调。在色氨酸生物

合成中发挥关键作用的色氨酸操纵子*trpE*和*trpG*表达下调。参与精氨酸生物合成途径的*argC*、*argB*和*argJ*也同样下调。而编码半胱氨酸合成酶A的*cysK*上调。

ComEA是一种与DNA具有高亲和结合力的双位膜蛋白, 能够控制DNA的摄取速率^[17], 转录组结果显示其编码基因呈现下调趋势。其他与DNA的复制、重组与修复相关的基因中, 编码ComYA、ComYB、ComYC、ComYD、ComX1的基因同样下调。

此外, 对细菌形态、代谢和应激反应具有重要作用的乙酰基转移酶的基因*SMU_1392c*和*SMU_639*明显下调。与生物活性多样化的细菌天然产物——聚酮化合物合成有关的*SMU_1343c*和*SMU_1344c*下调。编码胞膜蛋白的基因*SMU_1286c*、*SMU_1365c*、*bacA2*下调。

CRISPR-Cas系统已被证明参与某些细菌生理的调控, 例如DNA修复、致病性和毒力^[18]。研究发现在丝裂霉素C或紫外线辐照诱导的DNA损伤条件下, 只敲除CRISPR1系统Cas蛋白和CRISPR1、CRISPR2系统Cas蛋白均被敲除的变异链球菌菌株存活率均表现大幅下降, 证明Cas蛋白在DNA修复中起到积极作用^[19]。*csn2*基因突变株转录组结果显示大量与DNA复制、重组和修复的基因表达下调, 提示*csn2*基因的缺失可能影响变异链球菌的DNA修复功能。此外, 研究发现存在CRISPR位点的菌株对包括酸胁迫、氧化胁迫以及高温胁迫在内的环境压力表现出更好的耐受性^[7, 19], 本课题组前期研究发现*csn2*基因的缺失影响变异链球菌耐酸能力, 同时转录组结果显示对细菌应激反应具有重要作用的乙酰基转移酶的编码基因明显下调, 与细菌耐受环境压力有关的控制DNA结合、水解和重组的基因同样下调。因此合理推测*csn2*基因的缺失可能也对变异链球菌的氧化应激能力以及热应激能力产生影响。既往研究表明具有两个CRISPR位点的变异链球菌形成生物膜并产生胞外多糖的能力显著大于没有CRISPR位点的菌株^[11]。*csn2*基因突变株转录组结果显示大量与碳水化合物的转运和代谢、能量产生和转化以及

氨基酸转运和代谢相关的编码基因差异表达,而这些生物过程与细菌胞外多糖的产生以及生物膜形成密切相关,这可能解释了前期研究中 *csn2* 基因缺失菌株在酸适应后生物膜及胞外多糖合成增加的相关机制。

完整的细胞膜结构及成分是细菌维持正常生命活动的基础,在细菌的生长代谢以及维持胞内微环境的稳定方面具有重要作用。对变异链球菌生理学的研究发现细胞膜在酸碱调节中起主要作用,这些作用包括影响变异链球菌质子通透性和质子移位膜腺苷三磷酸酶(H^+ -translocating adenosine triphosphatase, H^+ -ATPase)的活性^[20-22],以及改变膜相关蛋白和脂肪酸组成^[23]。本课题组前期实验结果显示 $\Delta csn2$ 的细胞膜通透性增强,而转录组结果中未发现编码质子挤出泵F1F0-ATPase的基因有表达差异,但编码膜脂蛋白的基因SMU_1286c、SMU_1365c、*bacA2*显著下调,另外,与乙酰化和聚酮化合物合成相关的基因同样表现出下调,推测可能是 *csn2* 基因缺失通过影响乙酰化修饰的过程而改变细菌细胞壁结构和通透性。同时,乙酰化在脂肪酸合成过程中起重要作用^[24],而细菌利用聚酮合成酶途径合成多不饱和脂肪酸是脂肪酸合成的重要途径之一^[25]。研究表明膜脂脂肪酸可以直接影响脂质双分子层的质子通透性或间接地通过影响 H^+ -ATPase活性而影响质子通透性,进而影响细菌耐酸性^[26]。在酸性环境下,变异链球菌胞膜不饱和脂肪酸的质量分数会增加从而降低细菌胞膜的质子通透性以应对环境酸化^[23]。基于此,我们推测 *csn2* 基因的缺失影响了膜脂蛋白和脂肪酸的合成,导致细菌对低pH值非常敏感且无法降低细胞内的pH值。

细菌在长期的进化过程中形成了自身面对环境压力的多种耐受机制。对于变异链球菌的耐酸系统来说,除了利用F1F0-ATP酶和分子外排泵将质子或酸类物质排出细胞、改变细胞壁和细胞膜对质子的通透性以外,还可以通过消耗质子和生成氨来中和胞内质子,防止酸类物质对生物大分子造成损害^[27]。在 $\Delta csn2$ 中,与BCAA形成相关的基因*leuA*、*leuC*和*leuD*显著下调,此结果被qPCR再次验证。由于支链氨基酸的合成需要丙酮酸和NADH的参与,因此合成支链氨基酸可以消耗丙酮酸和NADH的同时减少甲酸的含量。而甲酸的酸性强于乳酸和乙酸,因此BCAA生物合成既可将碳重新导向酸性较低的终产物,又可通过生成 NH_3 碱化细胞质^[28],从而减少酸胁迫对细胞的损伤。编码精氨酸生物合成的关键酶的基因*argC*、*argJ*和*argB*也下调,精氨酸可以通过精氨酸脱亚氨酶途径(ADI)代谢产生 NH_3 中和胞内质子,同时产生的ATP通过ATPase将胞内质子泵出细胞外从而显著提高

pH^[29-30]。这些基因的显著下调可能在中性生长条件下就赋予 $\Delta csn2$ 较低的耐酸性。

口腔链球菌的碳水化合物代谢产酸,在调节口腔环境pH中起着重要作用^[31]。转录组结果显示,参与形成碳代谢阻遏(carbon catabolite repression, CCR)系统的基因表达显著变化,PTS和*msm*簇表现出显著上调。这些都提示 *csn2* 的缺失导致变异链球菌使用替代性底物和转运方法进行碳水化合物代谢,从而影响变异链球菌的能量产生和酸性终产物的生成。另外,调控乳酸生成过程的主要基因*ldh*的转录水平保持不变与前期实验发现 $\Delta csn2$ 的产酸能力并未表现出明显差异相符合。因此我们推测编码碳水化合物摄取与代谢系统中的基因表达变化可能达到动态平衡,因此未检测到酸产生的明显波动,或者存在冗余机制或转录后调控可以补偿转录组中观察到的基因表达变化。

综上所述,本研究通过转录组测序联合生物信息学发现了 *csn2* 基因在变异链球菌中调控的差异表达基因,并且进一步分析了鉴定的差异表达基因可能参与的生物学过程。*csn2* 基因缺失菌株中大量基因表达量发生了显著变化,主要集中在碳水化合物的转运和代谢、氨基酸转运和代谢、能量产生和转化、核苷酸转运和代谢等方面。其中,支链氨基酸合成降低以及细胞膜通透性增高可能是前期发现 $\Delta csn2$ 耐酸性下降的主要机制。

参 考 文 献

- [1] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [2] KOONIN E V, MAKAROVA K S. CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 679-686.
- [3] BARRANGOU R, MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 234-244.
- [4] VAN DER OOST J, WESTRA E R, JACKSON R N, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(7): 479-492.
- [5] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [6] VAN DER PLOEG J R. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology (Reading)*, 2009, 155(Pt 6): 1966-1976.
- [7] SERBANESCU M A, CORDOVA M, KRASTEL K, et al. Role of the *Streptococcus mutans* CRISPR-Cas systems in immunity and cell physiology. *J Bacteriol*, 2015, 197(4): 749-761.

- [8] BURMISTRZ M, DUDEK B, STANIEC D, *et al.* Functional analysis of *Porphyromonas gingivalis* W83 CRISPR-Cas systems. *J Bacteriol*, 2015, 197(16): 2631–2641.
- [9] BURLEY K M, SEDGLEY C M. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, 2012, 38(11): 1511–1515.
- [10] TONG Z, DU Y, LING J, *et al.* Relevance of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats of *Enterococcus faecalis* strains isolated from retreatment root canals on periapical lesions, resistance to irrigants and biofilms. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5491–5496.
- [11] CHEN J, LI T, ZHOU X, *et al.* Characterization of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats sites in *Streptococcus mutans* isolated from early childhood caries patients. *Arch Oral Biol*, 2017, 83: 174–180.
- [12] GONG T, ZENG J, TANG B, *et al.* CRISPR-Cas systems in oral microbiome: from immune defense to physiological regulation. *Mol Oral Microbiol*, 2020, 35(2): 41–48.
- [13] ZHANG A, CHEN J, GONG T, *et al.* Deletion of *csn2* gene affects acid tolerance and exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 2020, 35(5): 211–221.
- [14] ZHENG X, ZHANG K, ZHOU X, *et al.* Involvement of *gshAB* in the interspecies competition within oral biofilm. *J Dent Res*, 2013, 92(9): 819–824.
- [15] AJDIC D, CHEN Z. A novel phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* is responsible for transport of carbohydrates with α -1,3 linkage. *Mol Oral Microbiol*, 2013, 28(2): 114–128.
- [16] WEBB A J, HOMER K A, HOSIE A H. Two closely related ABC transporters in *Streptococcus mutans* are involved in disaccharide and/or oligosaccharide uptake. *J Bacteriol*, 2008, 190(1), 168–178.
- [17] SALZER R, KERN T, JOOS F, *et al.* The *Thermus thermophilus* comEA/comEC operon is associated with DNA binding and regulation of the DNA translocator and type IV pili. *Environ Microbiol*, 2016, 18(1): 65–74.
- [18] LOUWEN R, STAALS R H, ENDTZ H P, *et al.* The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(1): 74–88.
- [19] LEBLANC D J, LEE L N, ABU-AL-JAIBAT A. Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid*, 1992, 28(2): 130–145.
- [20] LEMOS J A, ABRANCHES J, BURNE R A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*, 2005, 7(1): 95–107.
- [21] MATSUI R, CVITKOVITCH D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*, 2010, 5(3): 403–417.
- [22] COTTER P D, HILL C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(3): 429–453.
- [23] FOZO E M, QUIVEY R G. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 929–36.
- [24] CROSBY H A, HEINIGER E K, HARWOOD C S, *et al.* Reversible N epsilon-lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodospseudomonas palustris*. *Mol Microbiol*, 2010, 76(4): 874–888.
- [25] KOHLI G S, JOHN U, VAN DOLAH F M, *et al.* Evolutionary distinctiveness of fatty acid and polyketide synthesis in eukaryotes. *ISME J*, 2016, 10(8): 1877–1890.
- [26] BOYD D A, CVITKOVITCH D G, BLEIWEIS A S, *et al.* Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 6055–6065.
- [27] LU P, MA D, CHEN Y, *et al.* L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Res*, 2013, 23(5): 635–644.
- [28] BAKER J L, ABRANCHES J, FAUSTOFERRI R C, *et al.* Transcriptional profile of glucose-shocked and acid-adapted strains of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 2015, 30(6): 496–517.
- [29] KANAPKA J A, KLEINBERG I. Catabolism of arginine by the mixed bacteria in human salivary sediment under conditions of low and high glucose concentration. *Arch Oral Biol*, 1983, 28(11): 1007–1015.
- [30] HUANG X, ZHANG K, DENG M, *et al.* Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol*, 2017, 82: 256–262.
- [31] WELIN-NEILANDS J, SVENSÅTER G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5633–5638.

(2020-12-02收稿, 2020-12-23修回)

编辑 汤洁