

VicK 激酶活性对变异链球菌的生物学影响*

张琼¹, 王诗达¹, 周学东¹, 程磊¹, 李雨庆¹,

Dilani B. Senadheera², Dennis G. Cvitkovitch^{2△}

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科(成都 610041);

2. 多伦多大学 牙学院牙学研究所(安大略省 M5G1G6)

【摘要】 目的 研究 VicK 蛋白的激酶活性对变异链球菌(*S. mutans*)生理及毒力因子的调控作用。**方法** 使用 PCR 连接突变技术构建 *vicK* 基因敲出株,利用质粒搭载、表达 VicK 激酶活性废除蛋白。研究实验株菌落形态、隔夜培养菌液的变化、生物膜形成以及生物膜形成相关重要基因转录水平的改变。**结果** VicK^{H217A} 的菌落表面较野生株 UA159 及互补株 SMCVicK 平滑,且菌落也较之高耸;VicK^{H217A} 隔夜培养的菌液中细胞共聚堆积在玻璃管底部;VicK^{H217A} 形成的生物膜未发生明显改变;*gcbB*、*ftf*、*gtfD* 的表达受抑制而 *gtfB/C* 基因的表达上调($P<0.05$)。**结论** VicK 的激酶活性对变异链球菌正常生长、生物膜形成及与编码生物膜形成相关蛋白基因的表达起着重要的调节作用。

【关键词】 变异链球菌 双组分信号传导系统 VicK 生物学作用

Functional Analysis of VicK Kinase Activity in *Streptococcus Mutans* ZHANG Qiong¹, WANG Shi-da¹, ZHOU Xue-dong¹, CHENG Lei¹, LI Yu-qing¹, Dilani B. Senadheera², Dennis G. Cvitkovitch^{2△}. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Operative Dentistry and Endodontics, West China Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dental Research Institute, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G1G6, Canada

△ Corresponding author, E-mail: D. Cvitkovitch@dentistry.utoronto.ca

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory function on physiology and virulence of VicK kinase activity in *Streptococcus mutans*. **Methods** PCR ligation mutagenesis was used to construct a *vicK* knock-out mutant, and kinase activity abolished VicK was expressed by a streptococcal vector in this *vicK* null mutant. Colony morphology, overnight culture, biofilm formation and gene expression involved in biofilm formation were analyzed. ΔVicK, strains harboring a complemented wild-type *vicK*, and a vector without insert were used as controls. **Results** Colonies of VicK^{H217A} were smoother and more elevated than that of wild-type UA159 and complementary strain SMCVicK; cells from VicK^{H217A} overnight culture coaggregated on the bottom of glass tubes; no obvious alteration was observed in VicK^{H217A} biofilm; expressions of *gcbB*, *ftf*, *gtfD* were repressed while *gtfB/C* were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** VicK kinase activity is important for maintaining normal growth, biofilm formation and expression of genes involved in biofilm formation in *Streptococcus mutans*.

【Key words】 *Streptococcus mutans* Two-component signal transduction systems VicK Biological function

变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)是公认的与龋病发生、发展密切相关的细菌之一,其毒力因子主要包括有利用膳食碳水化合物快速产生有机酸的能力、耐酸的能力以及生成细菌生物膜的能力。已发现变异链球菌的基因组中包含编码 14 对完整双组分信号传导系统(two-component signal transduction systems, TCSTSs)以及 1 个缺失同源组氨酸蛋白激酶的效应调节因子的基因^[1-8]。VicRK 作为变异链球菌基因组里其中一对 TCSTS,主体由组氨酸蛋白激酶 VicK 及效

应调节因子 VicR 组成。过去我们对 VicK 蛋白结构认识有限,只能将 *vicK* 基因完整敲除而笼统地分析整个蛋白对变异链球菌生理的作用,而无法分别对其激酶和磷酸酶活性进行讨论。本研究在近期 VicK 蛋白胞内部分晶体结构解码的基础上,运用基因定点突变的方法将 VicK 蛋白 His217 突变为丙氨酸,在不影响 VicK 磷酸酶活性的前提下针对性地废除了其激酶活性,对包含这一点突变的 VicK 蛋白对变异链球菌产生的影响进行了一般生物学表型及基因转录水平的分析。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒以及培养基

* 国家自然科学基金(No. 81170959)资助

△ 通讯作者, E-mail: D. Cvitkovitch@dentistry.utoronto.ca

本研究所使用的菌株、质粒见表 1。变异链球菌野生株 UA159 (由加拿大多伦多大学牙学院 Dennis Cvitkovitch 实验室提供) 以及其衍生物常规保存在包含特定抗生素以及不含抗生素的 THYE [Todd-Hewitt (Becton Dickinson, MD) + 0.3% yeast extract (Difco Laboratories)] 琼脂平板上。对突变株使用的抗生素浓度分别为: 红霉素 10 μg/mL, 氯霉素 20 μg/mL。各菌株常规接种于不含抗

生素的 THYE 培养基中, 在 37 ℃、含 5%CO₂ 需氧培养箱过夜培养(12~16 h)。包含不同构建质粒 pCRT7/NT、pIB166 的大肠杆菌 DH5α 常规保存在含特定抗生素的 Luria-Bertani (LB) 琼脂平板上。抗生素浓度分别为: 氨苄西林(Ampicillin) 100 μg/mL, 氯霉素 20 μg/mL。经转化后的 DH5α 大肠杆菌常规被接种于含对应抗生素的 LB 培养基中, 在 37 ℃、225 r/min 摇床过夜培养(12~16 h)。

表 1 实验菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source
Strains		
VicK ^{H217A}	Conserved histidine for phosphorylation replaced by alanine of VicK protein in <i>S. mutans</i> ; Erm ^r &-Cm ^r	This study
SMCVicK	ΔVicK strain complemented with the wild type <i>vicK</i> gene; Erm ^r &-Cm ^r	This study
SMPIB166	ΔVicK strain harboring empty vector pIB166; Erm ^r &-Cm ^r	This study
ΔVicK	<i>vicK</i> -null mutant; Erm ^r	This study
UA159	Wild type <i>S. mutans</i>	Dennis Cvitkovitch, University of Toronto
E. 812	<i>E. coli</i> cell DH5α harboring plasmid 812; Amp ^r	This study
Plasmids		
812	Site-directed mutated (H217A) <i>vicK</i> gene in plasmid pCRT7/NT; Amp ^r	Aidong Han, University of Xiamen
pIB812	Site-directed mutated (H217A) <i>vicK</i> gene in plasmid pIB166; Cm ^r	This study
pIB166	Streptococcal shuttle vector; Cm ^r	Dennis Cvitkovitch, University of Toronto
pIBVicK	Wild type <i>vicK</i> gene in plasmid pIB166	This study

1.2 方法

1.2.1 *vicK* 基因敲除株的建立 基于 NCBI 数据库中变异链球菌野生株 UA159 的染色体序列, 利用 MacVecor 软件设计引物, 以 PCR 连接突变诱导技术 (PCR ligation mutagenesis strategy) 将 *vicK*

基因主体序列同红霉素抗性基因相置换。突变克隆由红霉素筛选, 经 PCR 初步确定红霉素抗性基因将 *vicK* 取代, 并由核苷酸测序确认 *vicK* 上下游基因序列以选出最终突变株^[5]。基因敲出相关引物见表 2。

表 2 PCR 连接突变引物
Table 2 Primers for PCR-ligation mutagenesis

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Target gene
VicK-P1	GTTACCAGAACTAGACGGTCTTGAAG	<i>vicK</i> upstream region (547 bp)
VicK-P2	GG·CGCGCCTTAGTCATATGATTTTCATGTAATAACCAAC	
VicK-P3	GGCCGG·CCATGACAGAAACAGGTTTTAGATAC	<i>vicK</i> downstream region (557 bp)
VicK-P4	AAACTCCAAGGGTAGATACCTG	
Erm cst-F	GG·CGCGCCCCGGGCCAAAATTTGTTTGAT	Erythromycin cassette
Erm cst-R	GGCCGG·CCAGTCGGACGCACTCATAGAAT	

1.2.2 点突变质粒载体的构建及表达 编码包含点突变 H217A 的 *vicK* 基因由厦门大学生命科学学院韩爱东教授课题组根据截短 VicK 蛋白晶体结构设计诱导并构建于克隆质粒 pCRT7/NT (Invitrogen) 中, 命名为 812, 转化 DH5α 后命名为 E. 812。本研究中野生型 *vicK* 基因被连接在链球菌穿梭质粒 pIB166 的 *Bam*H I 及 *Eco*R I 酶切位点之间, 作为野生型互补组载体, 命名为 pIBVicK; 为

在不影响 VicK 磷酸酶活性的前提下探究该蛋白激酶活性对变异链球菌生理的影响, 质粒 812 中包含 H217A 突变的 *vicK* 基因片段以同样的方式被构建于 pIB166 上, 作为实验组载体, 命名为 pIB812。以上两个构建质粒及空质粒被分别转化 DH5α 大肠杆菌、筛选、繁殖培养约 12 h 后提取并纯化质粒, 在感受态刺激肽 (competence-stimulating peptide) 的辅助下被导入变异链球菌 *vicK* 基因缺失株 (ΔVicK)。

经转化后的突变株在含有红霉素及氯霉素的 THYE 琼脂平板上被筛选出来, *vicK* 基因以引物 pIB166-F: 5'-CAGACCTAAGACTGATGAC-3'、pIB166-R: 5'-CCTGTACAATTGTCATCACC-3' 经 PCR 反应扩增, 由核苷酸测序确认野生型互补株 (SMCVicK) 及 VicK 激酶活性废除株 (VicK^{H217A})。同时空质粒 pIB166 也以同样的方法导入 Δ VicK, 作为阴性对照, 被命名为 SMPIB166。

1.2.3 菌落形态、过夜培养细胞共聚观察及生物膜形成分析 使用划线分离法将各实验株、对照株及野生株接种于不含抗生素的同一批 THYE 琼脂平板上, 37℃、含 5%CO₂ 需氧培养箱培养 48 h 后于体式显微镜下观察独立菌落形态并保存图像资料。该实验至少重复 2 次。上述菌株被接种于含 THYE 培养基的玻璃培养管中, 在 37℃、含 5%CO₂ 需氧培养箱过夜培养 (12~16 h), 次日观察细菌在培养管中的生长状态及共聚现象。20 μ L 过夜培养菌液被接种于每孔含有 2 mL 1/4THYE + 10 mmol/L 蔗糖培养基的聚苯乙烯 12 孔板, 在 37℃、含 5%CO₂ 需氧培养箱培养 16 h 后用移液枪小心移除上液, 干燥后用 0.1% 的结晶紫染色观察。以上两项实验每菌株每次含 3 个技术重复, 3 个生物学重复, 分 3 d 独立完成^[5]。

1.2.4 RNA 提取及实时定量 PCR 为检测 VicRK 系统调节子 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*ftf*、*gbpB* 以及 *vicK* 基因的转录水平, 菌株 UA159、 Δ VicK、VicK^{H217A} 的总 RNA 被提取、纯化、合成 cDNA 并进行 RT-PCR 的分析。简要说来, 各菌株被接种于不含抗生素的 10 mL THYE 液体培养基过夜培养, 次日以 1:20 稀释于预热 (37℃) 的 19 mL 新鲜 THYE 液体培养基, 常规条件下培养至指数生长中期 (光密度 OD_{600nm} 值 0.4 左右), 用提前冷却至 4℃ 的离心机以 4 500 r/min 收集细菌菌体, 将菌体标本立即放入液氮中固定, 标本置于 -80℃ 保存或直接进行总 RNA 的提取。菌体被重悬浮于 TRIzol 试剂 (Invitrogen), 总 RNA 用 FastPrep 系统 (Bio 101 FastPrep) 提取, 随后进行 DNase 处理、cDNA 合成^[5]。最后进行实时定量 PCR 分析, 目的基因的相对拷贝数以管家基因 16S rRNA 的转录水平作为内参、以野生株 UA159 中待测基因的转录水平作为标准, 进行 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法比较计算。实验保证每菌株至少 3 个生物学重复, 且每生物学重复含 3 个技术重复。用于检测对应基因转录水平的引物见表 3。

1.2.5 统计学方法 各突变株与野生株 UA159

数据之间两两比较使用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 VicK 激酶活性的缺失对变异链球菌的菌落形态及生长的影响

表 3 实时定量 PCR 引物

Table 3 Primers for real time-PCR

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Target gene
VicK-RT-Fwd	CACTTTACGCATTCTGTTTTGCC	<i>vicK</i>
VicK-RT-Rev	CGTTCTTCTTTTCTGTTTCGGTC	
GtfB-Fwd	ACACTTTCGGGTGGCTTG	<i>gtfB</i>
GtfB-Rev	GCTTAGATGTCACTTCGGTTG	
16S-Fwd	CTTACCAGGTCTTGACATCCCC	16S rRNA
16S-Rev	ACCCAACATCTCACGACACGAG	
GtfC-Fwd	CCAAAATGGTATTATGGCTGTCTG	<i>gtfC</i>
GtfC-Rev	TGAGTCTCTATCAAAGTAACGCAG	
Ftf-Fwd	ATTGGCGAACGCGCACTTACTC	<i>ftf</i>
Ftf-Rev	CCTGCGACTTCATTACGATTGGTC	
GbpB-RT-F	ACAGCAACAGAAGCACAAACCATC	<i>gbpB</i>
GbpB-RT-R	CCACCATTACCCAGTAGTTTCC	
GtfD-RT-F	CACAGGCAAAGCTGAATTAACA	<i>gtfD</i>
GtfD-RT-R	GAATGGCCGCTAAGTCAACAG	

见图 1。对 THYE 琼脂平板上各实验菌株的观察发现, Δ VicK、空质粒对照株 SMPIB166 及 VicK 激酶活性废除株 VicK^{H217A} 的菌落表面均较野生型 UA159 平滑, 且菌落较之高耸。而野生型互补株 SMCVicK 的菌落形态介于上述 3 个菌株与野

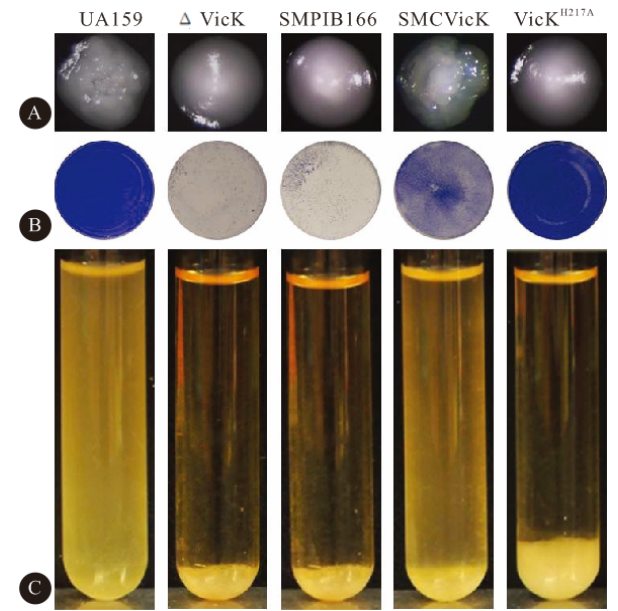


图 1 变异链球菌表型分析: 菌落形态(A), 生物膜形成(B)以及 16 h 浮游细菌生长状态(C)

Fig 1 Phenotypic analysis of *S. mutans*: colony morphology (A), biofilm formation (B) and 16 h planktonic culture (C)

UA159: Wild-type strain; Δ VicK: *vicK* knock-out strain; SMPIB166: Δ VicK with empty vector strain; SMCVicK: wild-type *vicK* complementary strain; VicK^{H217A}: VicK kinase activity abolished mutant

生株 UA159 之间,它的菌落除略较野生型 UA159 高耸外,其表面粗糙程度没有明显改变。观察过夜培养的菌液发现当 *vicK* 基因被敲除后,与分布均匀的野生株 UA159 不同, Δ VicK 细胞共聚并堆积在玻璃管的底部,相似的现象同样出现在空质粒对照株 SMP166,而载有野生型 *vicK* 基因的互补株 SMCVicK 在这一表型上得到部分的恢复。在 VicK^{H217A} 中,当激酶核心中用于磷酸化的保守组氨酸被丙氨酸替代后,大量细胞共聚堆积在玻璃管底部,此表型与 Δ VicK 及 SMP166 十分相似。

2.2 VicK 激酶活性的缺失对变异链球菌生物膜形成的影响

见图 1。观察在孔板中形成的生物膜,空质粒对照株 SMP166 与 *vicK* 基因敲除株 Δ VicK 相似,几乎没有细胞粘附于孔板底部形成生物膜。而在这种实验条件下, VicK 激酶活性的缺失 (VicK^{H217A}) 并未对变异链球菌生物膜的形成造成明显的影响。载有野生型 *vicK* 基因的互补株 SMCVicK 的生物膜形成能力与 UA159 相比没有

得到明显的恢复。

2.3 VicRK 调节子以及 *vicK* 基因转录水平测定

RT-PCR 分析表明在指数生长中期, Δ VicK、VicK 激酶活性废除株 (VicK^{H217A}) 中 *gtfD*、*ftf* 基因的表达量与野生株 UA159 相比均受到了明显抑制,基因表达下调 ($P < 0.05$)。与野生株 UA159 相比, *gtfC* 基因在 Δ VicK 和 VicK^{H217A} 中转录上调,得到了高表达 ($P < 0.05$)。在 Δ VicK 里上调不明显的 *gtfB* 基因 [约为 UA159 的 1.42 倍 ($P = 0.31$)] 在 VicK^{H217A} 中表达明显上调,约为 UA159 的 3.08 倍 ($P = 0.002$)。而 Δ VicK 里下调明显的 *gbpB* 基因 [约为 UA159 的 0.34 ($P = 0.02$)] 在 VicK^{H217A} 中下调无统计学意义 [约为 UA159 的 0.66 ($P = 0.16$)] (图 2A)。此外,对 *vicK* 基因在突变株中的表达检测显示, Δ VicK 中 *vicK* 的表达量与野生株 UA159 相比下调 ($P = 0.0001$),再次印证了 *vicK* 基因的成功敲除;而 VicK^{H217A} 与 UA159 中 *vicK* 基因的表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2B。

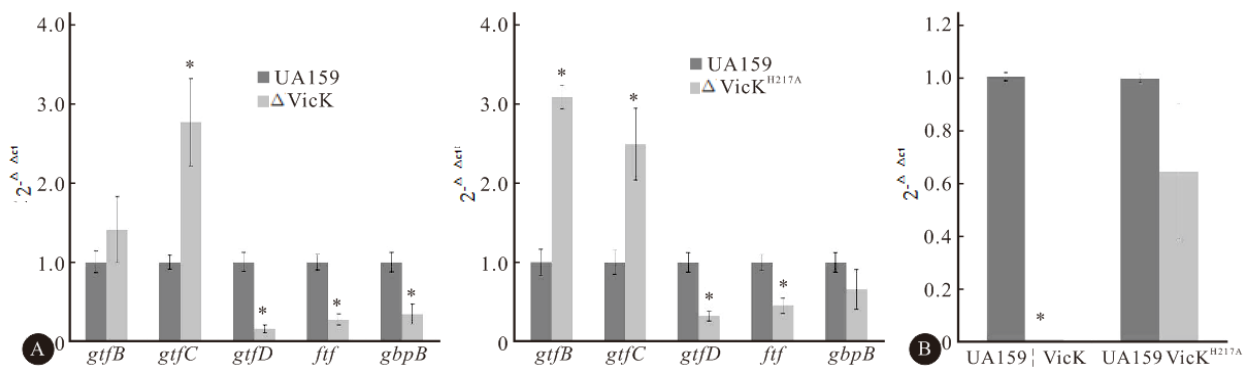


图 2 指数生长期变异链球菌基因转录水平检测 (A), 各实验菌株在指数生长期 *vicK* 基因表达水平分析 (B) (* $P < 0.05$, vs. UA159)

Fig 2 Transcriptional analysis of *S. mutans* at exponential growth phase (A), expression of *vicK* at exponential growth phase of each experimental strain (B) (* $P < 0.05$, vs. UA159)

3 讨论

TCSTSs 通常由一个跨膜的组氨酸蛋白激酶 (histidine kinase, HK) 以及与其同源的胞内的效应调节因子 (response regulator, RR) 组成。TCSTSs 广泛分布于原核生物基因组中, 其功能像“分子开关”, 精确控制着细菌的遗传及生理应答, 帮助它们适应不断变化的外部环境。大量证据显示, TCSTSs 在细菌适应环境、维持自身存活和调整毒力等方面起着至关重要的调节作用, 因此它们被考虑为治疗细菌性感染性疾病的潜在靶点^[9-11]。

VicRK 是变异链球菌基因组编码的一对重要

的 TCSTSs, 其中 VicR 对变异链球菌的调节作用是不可或缺的, 而作为编码其同源组氨酸激酶的 *vicK* 基因则可以被移除^[5, 6]。近年来对变异链球菌 VicK 的研究分为体外结构及活性、体内功能分析两大部分。其中体外分析主要包括 VicK 蛋白结构及其生物学活性的关系、不同条件下 VicK 与同源及非同源效应调节因子间磷酸基团的转移等; 体内研究主要是对 VicK 突变株表型的分析。而由于 VicR 的不可敲除性, 对它的研究主要集中在分析其与下游基因启动子序列的结合作用以及不同刺激条件下相关基因的转录水平变化^[5-8, 12-14]。前期结果显示 VicRK TCSTSs 全局性地调控着变异链球

菌毒力因子的表达,其调控的范围包括:生物膜的形成、胞外多糖合成、糖酵解速率、耐酸性、遗传感受态、细菌素的表达、氧化应急、胞壁质的生物合成及完整性^[5-8, 12]。凝胶电泳迁移率改变分析(EMSA)显示 VicR 蛋白直接与 *gtfB/C*、*gbpB*、*ftf* 等与变异链球菌生物膜形成密切相关蛋白基因的启动子区域相结合^[5]。作为一对典型 TCSTS 的主体, VicRK 系统对变异链球菌的调节作用被认为与该系统磷酸基团的转移相关。因此,了解 VicRK 系统磷酸基团的转移在变异链球菌生理及应激状态下的传递机制,对于人类控制变异链球菌的毒力因子进而加强对龋病的预防十分必要。

最近 VicK 蛋白晶体结构被解析,体外激酶活性实验证明位于 DHp 结构域上的 His217 为 VicK 上用于接受磷酸基团的保守组氨酸,当它被丙氨酸取代后, VicK 蛋白失去其激酶活性,但其磷酸酶活性没有明显变化^[14]。基于这一特点,本研究运用基因定点突变的方法,对 VicK 蛋白上用于接受磷酸基团的保守组氨酸进行了丙氨酸的置换(H217A),从而针对性地废除了其激酶活性,并对它对变异链球菌产生的影响进行了一般生物学表型及基因转录水平的分析。菌落形态、过夜培养菌液状态以及生物膜相关基因转录水平研究发现, VicK 激酶活性废除株(VicK^{H217A})与野生株 UA159 之间存在着明显的差异,而与 ΔVicK 十分相似。与此同时, VicKH217A 与 VicK 磷酸酶活性缺失时的表型明显不同(未公布数据),这些结果均提示 VicK 的激酶活性在维持变异链球菌正常生理活动中发挥着重要作用。而在这种实验条件下, VicK 激酶活性的缺失并未对变异链球菌生物膜的形成造成明显的影响,这一现象并不能用本研究对生物膜形成相关基因的转录水平的测定结果进行直接解释,提示 VicRK 这对 TCSTS 的复杂性。

综上所述, VicK 蛋白上具有的激酶活性对变异链球菌正常生长、生物膜形成及与生物膜形成密切相关基因的转录起着重要的调节作用。失去 VicK 激酶活性的变异链球菌产生了明显的表型改变,而这些改变是否由 VicK 同源效应调节因子 VicR 的磷酸化水平的变化所直接介导尚需进一步研究。另一方面 VicK 蛋白的磷酸酶活性在变异链球菌体内的作用也有待讨论。

参 考 文 献

- specific partial duplication mutants (merodiploid mutants) to identify the regulatory gene for the glucan-binding protein C gene *in vivo* in *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett, 2000;186(2):187-191.
- Idone V, Brendtro S, Gillespie R, *et al*. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. Infect Immun, 2003;71(8):4351-4360.
- Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol, 2006;188(3):988-198.
- Dunning DW, McCall LW, Powell WF, *et al*. SloR modulation of the *Streptococcus mutans* acid tolerance response involves the GcrR response regulator as an essential intermediary. Microbiology, 2008;154(Pt 4):1132-1143.
- Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, *et al*. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. J Bacteriol, 2005;187(12):4064-4076.
- Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, *et al*. CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. PLoS One, 2013;8(3):e58271.
- Deng DM, Liu MJ, ten Cate JM, *et al*. The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. J Dent Res, 2007;86(7):606-610.
- Senadheera DB, Cordova M, Ayala EA, *et al*. Regulation of bacteriocin production and cell death by the VicRK signaling system in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol, 2012;194(6):1307-1316.
- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Stock AM, *et al*. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. J Biol Chem, 1989;264(36):21770-21778.
- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Burlingame AL, *et al*. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. J Bacteriol, 1992;174(15):5117-5122.
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol Rev, 1989;53(4):450-490.
- Senadheera D, Krastel K, Mair R, *et al*. Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol, 2009;191(20):6415-6424.
- Senadheera MD, Lee AW, Hung DC, *et al*. The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. J Bacteriol, 2007;189(4):1451-1458.
- Wang C, Sang J, Wang J, *et al*. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. PLoS Biol, 2013;11(2):e1001493.

(2013-06-05 收稿, 2013-09-09 修回)

编辑 吕 熙