

σ^B 因子在单核细胞增生李斯特菌环境应激反应中的调控作用

杨丽红¹, 张再超¹, 孟庆玲^{1,2*}, 乔军^{1*}, 才学鹏², 蔡扩军¹, 王为升¹,
王俊伟¹, 陈创夫¹

(1. 石河子大学 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 石河子 832000;

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 为了解 σ^B 因子在单核细胞增生李斯特菌 (LM) 环境应激反应中的调控作用, 笔者用基因重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 和同源重组的方法构建了 *SigmaB* 基因缺失株, 分析该缺失株在不同温度、pH 和高盐压力条件下的应激反应能力及应激相关基因的转录水平。结果表明: 与野毒株相比, *SigmaB* 基因缺失株在压力条件下的应激能力减弱, *rsbV*、*rsbW*、*hpt*、*clpP*、*ctsR* 等环境应激相关基因转录水平均降低。本研究提示 σ^B 因子在 LM 温度、pH 和高盐环境应激反应中具有重要的调控作用, 这为揭示 LM 环境应激反应的分子机制及药物作用新靶点的筛选提供了重要的理论依据。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; *SigmaB* 基因; 环境应激反应; 调控作用

中图分类号: R378.99.4; S852.617

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)03-0441-06

Regulating Role of σ^B Factor in the Environmental Stress Response of *Listeria monocytogenes*

YANG Li-hong¹, ZHANG Zai-chao¹, MENG Qing-ling^{1,2*}, QIAO Jun^{1*}, CAI Xue-peng²,
CAI Kuo-jun¹, WANG Wei-sheng¹, WANG Jun-wei¹, CHEN Chuang-fu¹

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases of Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Key Laboratory of National Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: This experiment was conducted to understand the role of the σ^B factor in regulating the environmental stress of *Listeria monocytogenes* (LM). We constructed *SigmaB* gene deletion LM strain by using gene overlap extension PCR (SOE-PCR) and homologous recombination, and the environmental stress response of the strain on the different temperature, different pH condition and high osmotic pressure conditions were detected, and the transcription level of the genes that related with environment stress were tested by using qRT-PCR. The results showed that the environmental stress abilities of the *SigmaB* gene deletion mutant at the non-suitable conditions weakened and the transcriptional level of genes corresponding to environmental stress (*rsbV*, *rsbW*, *hpt*, *clpP*, *ctsR*) decreased significantly comparing with the standard strain. The results indicated that σ^B factor plays an important role in responding to environmental stress (temperature,

收稿日期: 2012-09-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30960274); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金 (Keylab200908); 石河子大学高层次人才专项 (RCZX200801)

作者简介: 杨丽红 (1984-), 女, 新疆五家渠人, 硕士, 主要从事病原分子生物学研究, E-mail: aybtor@163.com; 张再超 (1987-), 男, 山东聊城人, 硕士, 主要从事病原分子生物学研究。杨丽红和张再超为并列第一作者

* 通信作者: 孟庆玲, E-mail: xjmlqj@163.com, Tel: 0993-2055036; 乔军, E-mail: qj710625@yahoo.com.cn

pH and osmotic pressure) of LM. The study provides an important theoretical basis for further studies on its molecular mechanisms of environmental stress response and new target for drug action.

Key words: *Listeria monocytogenes*; *SigmaB* gene; environmental stress response; regulating role

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种胞内寄生的革兰氏阳性短杆菌, 广泛存在于土壤、污水、动物性食品及饲草等环境中, 主要通过消化道引起人和动物感染, 被列为四大食源性致病菌之一^[1-2]。

LM 具有极强的环境耐受能力, 能在酸性、碱性、氧化、高渗透压、高温等环境压力胁迫下生存^[3]。 σ^B 因子是由 *SigmaB* 基因编码的一种蛋白。研究发现, σ^B 因子是 LM 环境应激反应中一个重要的调节因子^[4], 通过识别并结合到特定基因启动子上的结合位点来启动基因的转录, 实现对相关基因的表达调控^[5]。本研究通过构建 LM *SigmaB* 基因缺失株, 以期了解 σ^B 因子在 LM 环境应激(温度、pH 和高盐)反应中的调控作用, 为揭示 LM 环境应激反应的分子机制及药物作用新靶点的筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

LM-XS5 野毒株为新疆塔里木地区发病绵羊脑组织分离得到的致病菌, 经过形态学、生化特性及分子生物学鉴定后由石河子大学新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室保存。Taq plus DNA 聚合酶、*pfu* DNA Polymerase、dNTPs、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自上海生物工程公司。pMD19-T 载体购自大连 TaKaRa 公司。细菌基因组提取试剂盒购自诺维森公司。限制性核酸内切酶 (*Sal* I、*Eco*R I) 购自 Promega 公司。pKSV7 穿梭质粒由扬州大学朱国强博士馈赠。

1.2 引物设计

根据 GenBank 登录的 LM *SigmaB*、*ropB*、*rsbV*、*rsbW*、*hpt*、*clpP*、*ctsR* 基因序列, 选择保守区域, 用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。引物由上海生物工程公司合成。

表 1 引物名称与序列

Table 1 Name and sequences of primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence
P1	CGGGAATTCCGTGATACTGACCACATAGA
P2	TCATTCTGCAACGCCTCTCGTTTCATGAAAAGATTTACCTT
P3	AAGGTAATCTTTTCATGAACGAGAGGCGTTGCAGAATGA
P4	CGG GTCGAC AAAAGCACCAGTTGGGCCGG
P5	CAACTTCCTGCCAAGCCTTA
P6	AGGAAAGACTTGCTTGCGGG
ropB-sense	AGAACCGTGATGCAAACCTAT
ropB-anti-sense	GAACGTACCCATTTTCAGTCA
rsbV-sense	CTTGAGATCGATGCTTATAC
rsbV-anti-sense	TAGCACCGGATTAGGCGTAT
rsbW-sense	ATCACTAATTCCGTAAAGCA
rsbW-anti-sense	TATGATGGACGAGGATGCTC
hpt-sense	CAAGCGCTAGGATGGAGCAC
hpt-anti-sense	AATTAGTTATTCGCAAGTTA
clpP-sense	CAGGTGGAAGTATTGCAGCT
clpP-anti-sense	ACATTCTTACTAACAGCTGG
ctsR-sense	AGTGAAAATGAATGATAAAC
ctsR-anti-sense	GCATTGGACAGGGAAGTTA

1.3 LM XS5- Δ *SigmaB* 缺失株的构建

1.3.1 *SigmaB* 基因的缺失 提取 LM XS5 株的基因组,先用引物 P1、P2 和 P3、P4 分别扩增上、下游同源臂(上游同源臂长 923 bp,下游同源臂长 1 070 bp);然后以 P1 和 P4 为引物,用 SOE-PCR 技术融合上、下游同源臂。先用 *pfu* DNA Polymerase 对上、下游同源臂互补延伸 10 个循环,再加入 P1 和 P4 引物各 0.4 μ L 扩增融合片段的全长。采用 20 μ L 反应体系(上、下游同源臂各 2 μ L,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 2 μ L, ddH₂O 11.2 μ L,5 U \cdot μ L⁻¹ *pfu* DNA Polymerase 0.3 μ L),反应条件:96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳后切胶回收,连接 pMD19-T 载体,转入 DH5 α 感受态细胞内,构建重组质粒 pMD19-T- Δ *SigmaB*,经 PCR 和酶切验证后送样测序。

1.3.2 穿梭载体的构建及电转化 pMD19-T- Δ *SigmaB* 和 pKSV7 37 $^{\circ}$ C 用 *Sal* I、*Eco*R I 双酶切 3 h,分别回收目的基因和载体片段,用 T₄DNA 连接酶连接回收产物,转入 DH5 α 感受态细胞内,得到重组质粒 pKSV7- Δ *SigmaB*。用 HEPES 缓冲液制备 LM 感受态细胞,在 100 μ L LM 感受态细胞中加入 1 μ g 重组质粒 pKSV7- Δ *SigmaB*,电击条件:2.5 kv \cdot cm⁻¹、0.5 ms。电击后向感受态细胞加入 BHI 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养(150 r \cdot min⁻¹)3 h。涂于 BHI 琼脂平板上(Amp^r 60 mg \cdot mL⁻¹),于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落,经 PCR 和酶切鉴定后得到带有重组质粒的阳性菌。

1.3.3 LM XS5- Δ *SigmaB* 缺失株的筛选与鉴定 将带有重组质粒的阳性菌,在氯霉素抗性(10 μ g \cdot mL⁻¹)的 BHI 液体培养基、42 $^{\circ}$ C 条件下传代,每传一代做菌液 PCR 验证,传至 25 代时,用 P5 和 P6 引物 PCR 验证,以重组质粒 pKSV7- Δ *SigmaB* 为阳性对照,预期值为 1 502 bp;以 XS5 为阴性对照,预期值为 2 177 bp。在 25 代时,若缺失后的条带(1 502 bp)依然稳定存在,即可确定同源重组成功,获得 LM XS5- Δ *SigmaB* 缺失株。

1.4 *SigmaB* 基因缺失对 LM 环境应激反应的影响

1.4.1 温度应激反应 将野毒株 XS5 和缺失株 LM XS5- Δ *SigmaB* 在平板上划线培养,然后挑取单菌落分别接种在 20 mL BHI 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 180 r \cdot min⁻¹ 条件下培养 12 h,OD 值 \approx 0.6 时,

将野毒株和 *SigmaB* 基因缺失株菌液以 1:100 的比例接入到 BHI 液体培养基(2 份),一份放于 37 $^{\circ}$ C 250 r \cdot min⁻¹ 条件下培养,另一份放于 42 $^{\circ}$ C 250 r \cdot min⁻¹ 条件下培养,每 2 h 从培养液中吸取菌液 200 μ L,稀释后,取 200 μ L 涂于 BHI 固体培养基,重复 3 组,做单菌落计数。

1.4.2 酸性应激反应 用 HCl 配制 pH=3 的 HCl-BHI 液体培养基,分别将野毒株和缺失株菌液分别接种在 HCl-BHI 液体培养基,参照 1.4.1 的方法进行单菌落计数。

1.4.3 碱性应激反应 用 NaOH 配制 pH=9 的 NaOH-BHI 液体培养基,将野毒株和缺失株分别接种在 NaOH-BHI 液体培养基,参照 1.4.1 的方法进行菌落计数。

1.4.4 高渗透压应激反应 配制含有 10% NaCl 的 BHI 液体培养基,将野毒株和缺失株分别接种在 NaCl-BHI 培养基中,参照 1.4.1 的方法进行菌落计数。

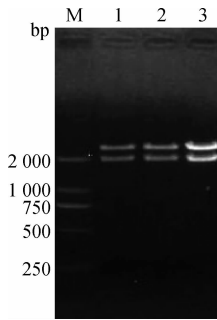
1.4.5 qRT-PCR 试验 将野毒株和缺失株分别接种 BHI 液体培养基过夜培养,用 Trizol 分别提取野毒株 LM-XS5 和缺失株 LM-XS5- Δ *SigmaB* 总 RNA,用 30~50 μ L DEPC 处理过的无菌水溶解,然后用随机引物和 TaKaRa 公司的 AMV 逆转录酶进行逆转录反应。将 RT 产物稀释 10 倍,采用 SYBR *Premix Ex Taq*TM 试剂盒(TaKaRa Code: DRR420A),在 Bio-Rad Chromo 4 仪器上进行 qRT-PCR 检测,具体试验步骤按照说明书进行。每个样品重复 3 次。以 LM-XS5- Δ *SigmaB* 为试验组,LM-XS5 为对照组,*ropB* 基因为看家基因,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算 *rsbV*、*rsbW*、*hpt*、*clpP*、*ctsR5* 个应激相关基因的相对表达量,其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{试验组}} - \Delta CT_{\text{对照组}}$, $\Delta CT = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}}$ 。

2 结果

2.1 *SigmaB* 基因缺失株的构建

以 LM 野毒株 XS5 的基因组为模板,用引物 P1-P2 和 P3-P4 扩增分别得到与预期大小一致的 923 和 1 070 bp 相符的目的条带。P1-P4 引物可扩增出与预期值相符的 1 993 bp 目的条带。重组质粒 pMD19-T- Δ *SigmaB* 和 pKSV7- Δ *SigmaB* 经 PCR 和酶切证实条带正确(图 1、图 2 酶切结果),缺失菌传至 25 代时 PCR 验证缺失条带依然存在(图

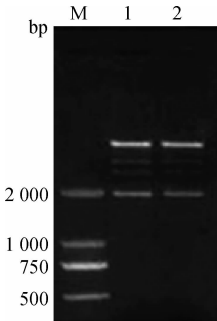
3), 表明构建的 LM-XS5- Δ *SigmaB* 具有良好的遗传稳定性。



M. DNA 相对分子质量标准; 1~3. 双酶切产物
M. DL2000 DNA marker; 1-3. The products from pMD19-T- Δ *SigmaB* digested

图 1 pMD19-T- Δ *SigmaB* 的酶切鉴定

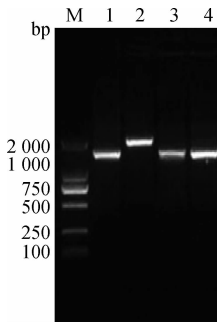
Fig. 1 Identification of pMD19-T- Δ *SigmaB* by enzyme digestion



M. DNA 相对分子质量标准; 1, 2. 双酶切产物
M. DL2000 DNA marker; 1, 2. The products from pKSV7-T- Δ *SigmaB* digested

图 2 pKSV7-T- Δ *SigmaB* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pKSV7-T- Δ *SigmaB* by enzyme digestion



M. DNA 相对分子质量标准; 1. pKSV7- Δ *SigmaB* 阳性对照; 2. XS5 阴性对照; 3, 4. 重组菌的 PCR 产物
M. DL2000 DNA marker; 1. The pKSV7- Δ *SigmaB* positive control; 2. The XS5 negative control; 3, 4. The PCR products of recombinant bacteria

图 3 重组菌的 PCR 鉴定

Fig. 3 The PCR identification of recombinant bacteria

2.2 *SigmaB* 基因缺失对 LM 环境应激反应的影响

2.2.1 温度应激反应 在 LM 最适温度 37 °C 条件下, 野毒株和缺失株的活菌量在前 8 h 存在明显差异(图 4), 而在高温 42 °C 条件下, 野毒株和缺失株在前 8 h 的差异更明显, 表明缺失株耐高温的能力弱于野毒株(图 5)。

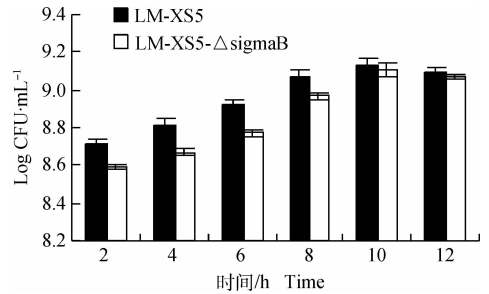


图 4 2 株细菌在 37 °C 条件下的活菌量

Fig. 4 The bacterial numbers of two strains at 37 °C

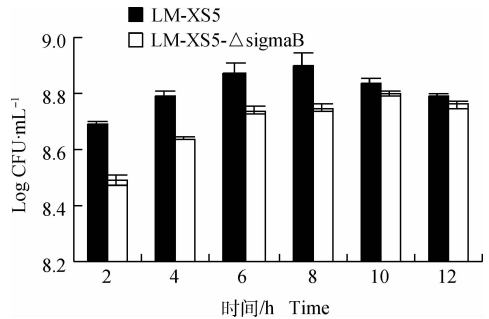


图 5 2 株细菌在 42 °C 条件下的活菌量

Fig. 5 The bacterial numbers of two strains at 42 °C

2.2.2 酸性应激反应 在 pH=3 的 HCl-BHI 液体培养基中, 无论是野毒株还是 *SigmaB* 基因缺失株均无生长, 活菌量随着培养时间的增加而减少(图 6), 表明在酸性环境中, *SigmaB* 缺失株的耐酸能力减弱。

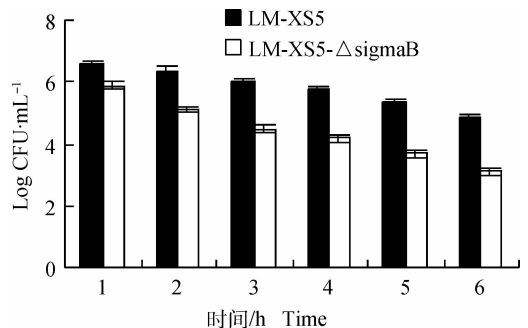


图 6 2 株细菌在 pH=3 条件下的活菌量

Fig. 6 The bacterial numbers of two strains of at pH=3

2.2.3 碱性应激反应 在 pH=9 的 NaOH-BHI 液体培养基中,在碱性环境中,缺失株的活菌量少于野毒株(图 7),即 *SigmaB* 基因缺失株的耐碱能力减弱。

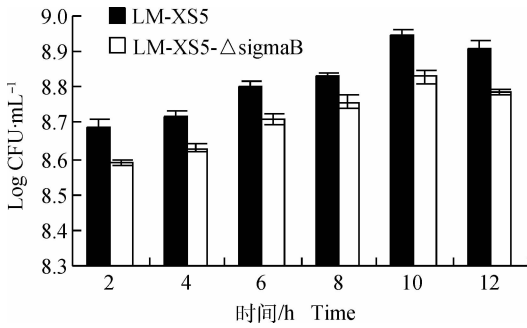


图 7 2 株细菌在 pH=9 条件下的活菌量
Fig. 7 The bacterial numbers of two strains at pH=9

2.2.4 高渗透压应激反应 在含 10% NaCl 液体培养基中,单菌落计数显示,2 株菌的活菌量存在差异(图 8),即在高渗透压环境中,*SigmaB* 基因缺失株耐高渗透压的能力弱于野毒株。

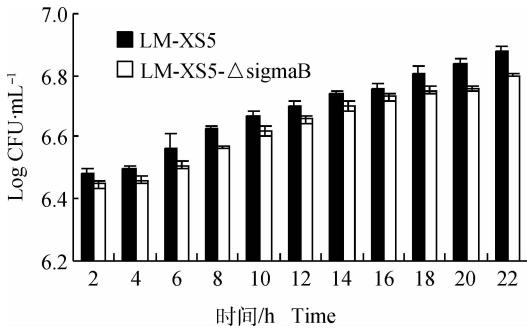


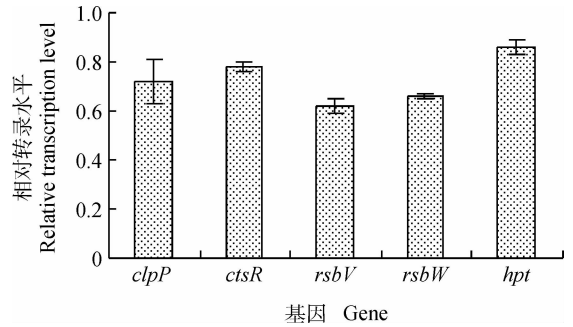
图 8 2 株细菌在 10% NaCl 条件下的活菌量
Fig. 8 The bacterial numbers of two strains of bacteria at 10% NaCl

2.2.5 qRT-PCR 试验 qRT-PCR 对 5 个应激相关基因转录水平的检测结果发现:与野毒株相比,缺失株的这 5 个应激基因的表达量均下降,其中 *rsbV* 和 *rsbW* 下降最显著($P < 0.05$)(图 9)。

3 讨论

SigmaB 基因编码的 σ^B 因子是 LM RNA 聚合酶全酶的一个亚基,通过识别并结合到特定基因启动子上的结合位点来启动基因的转录,从而实现相关基因的调控,目前研究发现,在 LM 中有众多基因受到 σ^B 因子的调控,其中包括一些毒力基因和新陈代谢的调节基因^[6-7]。本试验构建的缺失株 LM

XS5- Δ *SigmaB* 在 37 °C 的生长试验结果表明,其繁殖能力弱于野毒株,提示 σ^B 因子参与了 LM 新陈代谢的调控^[8],qRT-PCR 试验结果也进一步证明了这一推测。*SigmaB* 基因的缺失使得这些基因的表达也在一定程度上受到抑制,影响到细菌新陈代谢,因而缺失株的繁殖能力表现出明显的差异。



图中数据是缺失株基因相对于野毒株的表达量,即以野毒株基因的表达量为 1 时缺失株基因的相对表达量
Data is showed in the form of relative expression of gene deletion strain to the gene expression level of the wild strain

图 9 缺失株 5 个基因的相对转录水平

Fig. 9 Relative expression levels of five genes of gene deletion strain

高温应激反应试验结果表明,缺失株对高温环境的应激能力减弱。已有的研究发现,在 LM 中存在 1 个负调节子 *CtsR*,通过负调控 *clp* 基因的表达来调控 LM 对高温环境的耐受^[9]。*clp* 基因包括 *clpB*、*clpC*、*clpE* 和 *clpP* 这 4 个基因,其编码产物 Clp 蛋白具有肽链内切酶(Endopeptidase)和分子伴侣的作用,能促使 LM 耐受高温胁迫^[10]。由于 *CtsR* 和 *clp* 基因在一定程度上受到 σ^B 因子的调控, σ^B 因子通过调控 *CtsR* 活性或通过调控 *clpP* 和 *clpB* 基因的转录来参与 LM 耐受高温的胁迫作用^[11]。在本研究中,构建的 *SigmaB* 基因缺失株不能表达 σ^B 因子,且 qRT-PCR 检测 *clpP*、*ctsR* 的转录水平降低,因而表现出耐受高温应激的能力降低。

低 pH 应激反应试验结果表明,缺失株能在低 pH 的酸性环境中生存,但生存能力明显减弱,提示 σ^B 因子对 LM 在酸性条件下的耐受具有调控作用。 σ^B 因子促使 LM 耐受酸性环境的作用机制可能是 σ^B 因子能调控一些与耐受酸性环境相关基因的表达^[12]。高 pH 应激反应试验结果表明,缺失株对高 pH 的应激能力差于野毒株,LM 耐受碱的机理目前尚不明确^[13-14]。高渗透压应激反应试验结果表明,在含有 10% 的 NaCl 的环境中,缺失株适应高渗透

压的能力降低。P. McGann 等研究发现, LM 内有一套完整的甜菜碱和肉毒碱的运输系统, 能够转运甜菜碱、肉毒碱这些小分子物质作为细菌的渗透保护剂, 而 σ^B 因子能调控与这些运输体系有关的基因的表达^[15], *SigmaB* 基因缺失后, 该转运系统相关的基因受到影响, 在应激条件下不能顺利地转运渗透保护剂, 从而缺失株表现出适应高渗透压的能力降低。

4 结 论

研究了 *SigmaB* 基因对 LM 环境应激反应的调控作用, 证实 *SigmaB* 基因缺失株环境应激反应能力明显下降, 提示 *SigmaB* 基因对 LM 应对环境应激反应过程中发挥了重要的作用, 为揭示 LM 环境应激反应的分子机制及药物作用新靶点的筛选提供了重要的理论依据。

参考文献:

[1] 孟庆玲, 乔 军, 才学鹏, 等. 单核细胞增多性李氏杆菌缺失株 InlB 的分子特征及其表达和纯化研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 1098-1101.

[2] 乔 军, 孟庆玲, 陈创夫, 等. 塔里木马鹿单核细胞增多性李氏杆菌的分离与鉴定[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 9-12.

[3] ZHOU X, JIAO X, WIEDMANN M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial actA sequencing and tissue-culture pathogenicity assays[J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(3): 217-224.

[4] FRASER K R, SUE D, WIEDMANN M, et al. Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes* osmotic induction of opuC is sigmaB dependent [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 2015-2022.

[5] 冯莹颖, 张晓莉, 罗 勤, 等. SigmaB 因子活性的调节及其在几种革兰阳性食源性致病菌中的作用[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 839-843.

[6] SUE D, FINK D, WIEDMANN M, et al. SigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment[J]. *Mi-*

crobiology, 2004, 150(11): 3843-3855.

- [7] ADRIANA F, MICHAEL G, MARTIN W, et al. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other gram-positive bacteria [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 48(1): 39-46.
- [8] SCOTT J M, MITCHELL T, HALDENWANG W G. Stress triggers a process that limits activation of the *Bacillus subtilis* stress transcription factor σ^B [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 1452-1456.
- [9] ROBERTS A J, WIEDMAN N M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(5): 904-918.
- [10] NADON C A, BOWEN B M, WIEDMANN M, et al. SigmaB contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes* [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3948-3952.
- [11] KAZMIERCZAK M J, MITHOE S C, BOOR K J, et al. *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(19): 5722-5734.
- [12] HARDWICK S W, PANE-FARRE J, DELUMEAU O, et al. Structural and functional characterization of partner switching regulating the environmental stress response in *Bacillus subtilis* [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11562-11572.
- [13] SINGH V K, SCHMIDT J L, JAYASWAL R K, et al. Impact of sigB mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 21(3): 256-261.
- [14] BANDOW J E, BROTZ H, HECKER M. *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the SigmaB-dependent general and multiple stress response [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(2): 459-467.
- [15] MCGANN P, WIEDMANN M, BOOR K J. The alternative Sigma factor σ^B and the virulence gene regulator PrfA both regulator transcription of *Listeria monocytogenes* internalins [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(9): 2919-2930.

(编辑 白永平)