

鼠伤寒沙门菌 *rpoN* 基因缺失株构建 及生物学特性研究

苏洋洋, 黄 骏, 吴 白, 印云聪, 刘 珍, 陈素娟, 彭大新*, 刘秀梵
(扬州大学兽医学院, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

摘 要: 为了探索 σ 因子 RpoN 在鼠伤寒沙门菌生物被膜形成过程中的作用, 对两株生物被膜形成能力较强的鼠伤寒沙门菌利用 Red 同源重组系统构建 *rpoN* 基因缺失株, 利用原核表达载体构建回复株; 比较野生株、缺失株和回复株的生物被膜形成能力和对环境应激抵抗力的差异, 并通过建立的 *csgA* 和 *bcsA* 基因实时定量 PCR 方法检测编码生物被膜成分基因的表达差异。结果显示, 与野生株相比, $\Delta rpoN$ 缺失株生物被膜形成能力增强, 主要由卷曲菌毛表达量显著增加引起。回复株生物被膜形成能力与野生株相似。 $\Delta rpoN$ 缺失株在酸性应激和碱性应激条件下对外界环境应激的抵抗力均显著增强。RpoN 为鼠伤寒沙门菌中生物被膜形成相关 σ 因子之一, 为进一步研究沙门菌生物被膜形成的调控机制提供理论基础。

关键词: 鼠伤寒沙门菌; 生物被膜; *rpoN* 基因; 突变株; 环境应激

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)04-0771-08

Construction and Biological Characterization of *rpoN* Gene Deletion Mutants of *Salmonella Typhimurium*

SU Yang-yang, HUANG Jun, WU Bai, YIN Yun-cong, LIU Zhen, CHEN Su-juan,
PENG Da-xin*, LIU Xiu-fan

(Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The aim of this study was to understand the role of *rpoN* gene on biofilm formation of *S. Typhimurium*. Two *S. Typhimurium* strains with strong biofilm-forming ability were selected for construction of deletion mutants with deficiency of gene *rpoN* using the Red recombination system, and complemented strains were constructed by using prokaryotic expression vector. The biofilm-forming ability, and resistance to environmental stress of the wild-type, *rpoN* mutant and *rpoN* complemented strains were compared. A quantitative real-time PCR method based on *csgA* and *bcsA* genes was established to compare the expression of their biofilm components. The results showed that the biofilm formation, mainly contributed by increased expression of curli, was significantly enhanced in the *rpoN* gene deletion mutants when compared with that of the wild-type strains. The biofilm formation of revertants was similar to that of the wild-type strains. Furthermore, deletion of *rpoN* gene of *S. Typhimurium* strains resulted in their increased resistance to acid and alkali environment. Therefore, RpoN was identified as one of the associated sigma factors involved in biofilm formation of *S. Typhimurium*. These data may be helpful for elucidating

收稿日期: 2015-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572530); 公益行业(农业)科研专项(201303044); 江苏高校优势学科建设工程; 江苏省家禽疫病防控工程技术研究中心(BM2013450)

作者简介: 苏洋洋(1992-), 江苏涟水人, 硕士生, 主要从事微生物学研究, E-mail: 1106610036@qq.com

* 通信作者: 彭大新, E-mail: pengdx@yzu.edu.cn

the regulatory mechanism of *Salmonella* biofilm formation.

Key words: *Salmonella Typhimurium*; biofilm formation; *rpoN* gene; mutants; environmental stress

沙门菌属是肠杆菌科中重要的病原菌属,人感染后常引起肠炎和急性胃肠炎等。全球每年感染沙门菌病例约有 9 千多万,其中死亡人数高达 15 万^[1]。鼠伤寒沙门菌为泛嗜性的沙门菌,能引起家禽、哺乳动物和人的感染,是目前世界各国分离率最高的菌型之一,具有重要的公共卫生意义^[2]。

σ 因子是 RNA 聚合酶全酶的重要组成成分,专一地识别特定的启动子并起始转录。肠杆菌科的细菌中存在多种 σ 因子^[3],其中 RpoS(由 *rpoS* 基因编码)能够在细菌的指数生长期和稳定生长期受到环境应激时调控特定基因的转录与表达。*rpoS* 基因的缺失可影响沙门菌生物被膜形成,降低其对环境应激的抵抗力。除 *rpoS* 基因外,其他 σ 因子也参与了卷曲菌毛和纤维素的合成及生物被膜的形成。由于这种 *rpoS* 基因不依赖调控途径在鼠伤寒沙门菌占有一定的比例,有必要鉴定出沙门菌中参与卷曲菌毛和纤维素的合成及生物被膜形成的其他 σ 因子,并阐明其调控通路。前期研究发现,RpoN、RpoE、FliA、RpoH、RpoS、RpoD 等 6 个 σ 因子在沙门菌指数期和生物被膜形成期的基因表达存在差异^[4]。本研究运用 Red 同源重组法构建出两株生物被膜的形成能力较强的鼠伤寒沙门菌的 *rpoN* 基因缺失株,通过结晶紫染色法测定其生物被膜的形成能力,利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测了编码卷曲菌毛合成的 *csgA* 基因和编码纤维素合成的 *bcsA* 基因的表达差异,最终确定 *rpoN* 基因缺失可导致鼠伤寒沙门菌生物被膜形成能力增强。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 鼠伤寒沙门菌 S016、S025 为本实验室临床病料分离株;大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存;质粒 pKD46 含有温度敏感型复制子;质粒 pKD3 含氯霉素抗性基因和 FRT 位点;质粒 pCP20 含氨基青霉素抗性和氯霉素抗性的温度敏感性复制子,为美国马萨诸塞大学医学院 Murphy 教授惠赠。

1.1.2 仪器和试剂 酶标仪(BIO-TEK),Light-

Cycler[®] Nano 实时荧光 PCR 仪(Roche)。结晶紫(Crystal Violet)、刚果红(Congo red)和考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)购自上海生工生物工程有限公司;胰酪胨大豆肉汤培养基 TSB 购自 Fluka 公司;限制性核酸内切酶、*Taq* 酶、dNTP、T4 连接酶等购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,质粒抽提试剂盒 QIAprep Spin Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司;反转录试剂盒 Prime-Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser,荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 均购自 TaKaRa 生物工程公司(大连)。

1.2 生物被膜的结晶紫染色测定

参照 L. A. Pratt 等^[5]方法,利用 96 孔聚苯乙烯 U 型细胞培养板,进行沙门菌生物被膜结晶紫染色定量测定。每次试验重复 2 个孔,置于酶标仪测定 OD_{550 nm} 值,重复三次取其平均值。

1.3 生物被膜成分的检测

挑取单个菌落接种于液体 TSB 中,37 °C、220 r·min⁻¹ 过夜振荡培养,取 10 μ L 培养液分别接种于含刚果红(40 mg·L⁻¹)和考马斯亮蓝(20 mg·L⁻¹)平板或含荧光增强剂(200 mg·L⁻¹)的无盐 LB 平板,置于 28 °C 静置培养,4 d 后比较各菌落的形态,后者于紫外灯下观察各菌落的荧光强度^[6]。

1.4 *rpoN* 因子基因缺失株的构建

缺失株构建方法按照 K. C. Murphy 等^[7]的方法进行, λ Red 同源重组所用引物由两部分组成,分别是 5'端 50 bp 的序列与目的基因两侧序列同源,和 3'端 20 bp 的序列与 pKD3 质粒中氯霉素抗性基因(*cat*)两端序列同源,打靶引物 rpoN-D1/rpoN-D2 序列见表 1。所有引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。以鼠伤寒沙门菌 S016 和 S025 为母本进行同源重组操作,煮沸裂解法提取缺失株的 DNA,以引物 rpoN-F/rpoN-R 进行 PCR 扩增鉴定,野生株、*cat* 基因插入株和无抗性缺失株 PCR 扩增预期的片段大小分别为 1 434、1 192 和 263 bp。鉴定正确的缺失株分别命名为 S016 Δ rpoN 和 S025 Δ rpoN。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primers used for amplification of PCR

引物 Primers	序列(5'→3') PCR Prime sequences	用途 Purpose
rpoN-F	ATGAAGCAAGGTTTGCAACTCAGGC	Primers used for amplification of <i>rpoN</i> genes
rpoN-R	TCAAACCAGCTGTTTGCCTGGTTT	
rpoN-D1	ATGACGCCTCAGCTACAACAGGCCATCCGTCTGTT GCAGTTGTCTACGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primers used for amplification of fragments with <i>cat</i> gene
rpoN-D2	ATGGATAAAGACTCTCGGTACTTCGCAACAGTGCG GCGCGCCACCATGATCATATGAATATCCTCCTTAG	
rpoN-HF	CGGGATCCATGAAGCAAGGTTTGCAACTCAGGC	Primers used for gene complementation
rpoN-HR	CCGCTCGAGTCAAACCAGCTGTTTGCCTGGTTT	
csgA-F	ATGAAACTTTTAAAAGTGGCAGC	Primers used for amplification of <i>csgA</i> genes
csgA-R	TTAATACTGGTTAGCCGTGG	
bcsA-F	CATTTACGCTTCGCTTGG	Primers used for amplification of <i>bcsA</i> genes
bcsA-R	TCCCTTTGTGCGGATTGA	
csgA-QF	TCGACCAGTGGAAACGCTAAAA	qRT-PCR
csgA-QR	ACCAACCTGACGCACCATTAC	
bcsA-QF	CGGGCGTGAATCATTTTCGTC	
bcsA-QR	TCAGGAACCAGCCATTGTC	

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 *csgA* 基因和 *bcsA* 基因的表达

1.5.1 引物设计 根据 *csgA* 基因和 *bcsA* 基因的核苷酸序列,设计 PCR 扩增引物和 qRT-PCR 引物,引物序列见表 1。

1.5.2 标准品制备 以细菌 DNA 为模板,*csgA*-F/R 和 *bcsA*-F/R 为引物 PCR 扩增 *csgA* 基因和 *bcsA* 基因,克隆至 pEASY-T₃ 载体获得重组质粒。用 *EcoR* I 酶切后,1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,阳性质粒送测序。

1.5.3 细菌总 RNA 的提取与 RNA 反转录 取 37 °C 220 r · min⁻¹ 过夜培养的菌液用 1:10 稀释的 TSB 培养基按 1:100 稀释,接种到聚丙烯一次性细胞培养瓶,28 °C 静置培养 4、8 和 24 h。使用 RNA-pure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒提取样品菌液的 RNA,按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明去除 DNA 进而反转录。以反转录 cDNA 和标准品质粒 DNA 作为模板,*csgA*-QF/QR 和 *bcsA*-QF/QR 为引物进行荧光定量 PCR 扩增。

1.5.4 实时荧光定量 RT-PCR 荧光定量 PCR 反应体系:SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 ×) 10.0 μL, PCR Forward Primer (10 μmol · L⁻¹), PCR Reverse Prime (10 μmol · L⁻¹) 各 0.4 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, DNA 模板 2.0 μL,

dH₂O(灭菌蒸馏水) 6.8 μL,共 20.0 μL。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 20 s,共 40 个循环;熔解曲线阶段:60 °C 15 s,95 °C 1 s。以扩增曲线、Ct 值为标准,通过软件分析得到相应的标准曲线,计算目的基因的拷贝数。

1.6 回复株的构建

根据 GenBank 中的 *rpoN* 基因序列设计扩增引物(rpoN-HF/rpoN-HR),并在上下游引物中分别加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,以细菌基因组 DNA 为模板扩增 *rpoN* 基因。克隆至 pEASY T₃ 载体后获得重组质粒 pEASY-rpoN。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别对重组质粒 pEASY-rpoN 和原核表达载体 pGEX-6p-1 进行双酶切,经 DNA 纯化试剂盒回收目的片段后连接过夜。连接产物转化 JM109 感受态细胞后,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 过夜培养。鉴定阳性克隆,测序验证。将构建成功的重组表达质粒通过电击转化分别转入 S016Δ*rpoN* 和 S025Δ*rpoN* 中,并分别命名为 S016Δ*rpoNR* 和 S025Δ*rpoNR*。

1.7 生长曲线的测定

挑取野生株(S016、S025)、基因突变株(S016Δ*rpoN*、S025Δ*rpoN*)和回复株(S016Δ*rpoNR*、S025Δ*rpoNR*)的单个菌落接种于液体 LB 培养基,37 °C 过夜振荡培养。将过夜培养液接种于新鲜 LB

培养基, $OD_{600\text{ nm}}$ 值调至 0.1, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 8 h, 每隔 1 h 测定菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 绘制出各菌株的生长曲线。

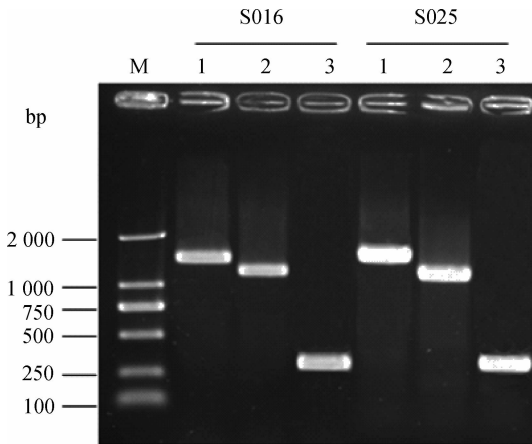
1.8 对环境应激抵抗力的测定

挑取单个菌落接种于液体 LB 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用等量的 PBS 重悬菌体, 并将其 $OD_{600\text{ nm}}$ 调至 0.5。酸性应激条件 ($\text{pH}=5.0$) 下, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 20 min; 碱性应激条件 ($\text{pH}=10.0$) 下, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 30 min; $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热应激条件下, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 重悬菌液热击 3 min; 氧化应激条件 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$) 下, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 30 min。取各应激条件下所得菌液按 10 倍倍比稀释, 接种于麦康凯琼脂平板, 过夜培养后计数^[8]。

2 结果

2.1 基因缺失株的鉴定

以引物 RpoN-F/RpoN-R PCR 扩增 2 株鼠伤寒沙门菌 *rpoN* 基因, 测序显示开放阅读框架全长 1 434 bp, 相似性 99.9%。运用 λ Red 同源重组系统构建出 S016 Δ rpoN、S025 Δ rpoN 基因缺失株。PCR 鉴定, 所有缺失株均扩增出预期大小的条带(图 1)。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 野生型菌株扩增条带; 2. *cat* 基因插入株扩增条带; 3. 缺失株扩增条带
M. DL2000 marker; 1. The amplified fragments of wild-type strain; 2. The amplified fragments of mutants with *cat* gene; 3. The amplified fragments of mutants without *cat* gene

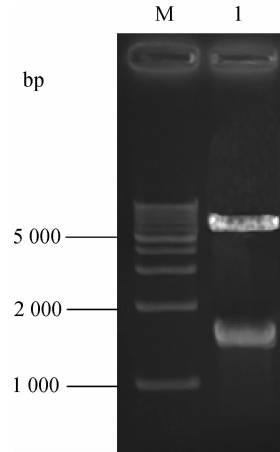
图 1 S016 和 S025 突变株的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of S016 and S025 mutants by PCR

2.2 回复株的构建

重组表达质粒 pGEX-6p-rpoN 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切成约 5 kb 大小的 pGEX-6p-1 载体片

段以及 1.5 kb 左右的 *rpoN* 目的片段, 结果与预期相符, 证明重组表达质粒构建成功(图 2)。将表达质粒 pGEX-6p-rpoN 分别导入两株 Δ rpoN 缺失株中获得回复株 S016 Δ rpoNR 和 S025 Δ rpoNR。



M. 1 kb DNA 相对分子质量标准; 1. pGEX-6p-rpoN
M. 1 kb marker; 1. pGEX-6p-rpoN

图 2 重组质粒的酶切鉴定图谱

Fig. 2 Restriction endonuclease digestion pattern of recombinant plasmid

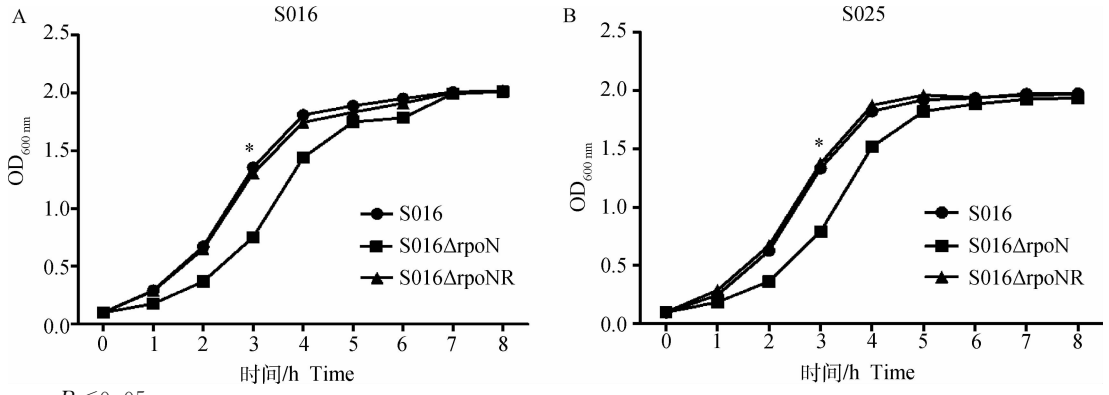
2.3 生长曲线的测定

对野生株 (S016、S025)、基因突变株 (S016 Δ rpoN、S025 Δ rpoN) 和回复株 (S016 Δ rpoNR、S025 Δ rpoNR) $OD_{600\text{ nm}}$ 值的测定, 绘制出生长曲线(图 3)。由图可见, 与野生株相比, 两株 *rpoN* 基因缺失株的生长速度低于野生株。回复株的生长速度与野生株相似。

2.4 生物被膜形成能力及成分的测定

以结晶紫染色定量法测定生物被膜形成能力, 结果显示, 野生株 S016 和 S025 的 $OD_{550\text{ nm}}$ 值分别为 1.568 ± 0.176 和 1.031 ± 0.015 , 缺失株 S016 Δ rpoN 和 S025 Δ rpoN 的 $OD_{550\text{ nm}}$ 值分别为 3.367 ± 0.025 和 1.391 ± 0.053 。与野生株相比, S016 Δ rpoN 缺失株能形成较强的生物被膜, 差异极显著 ($P<0.01$); 而 S025 Δ rpoN 缺失株形成生物被膜的能力稍有增强(图 4)。

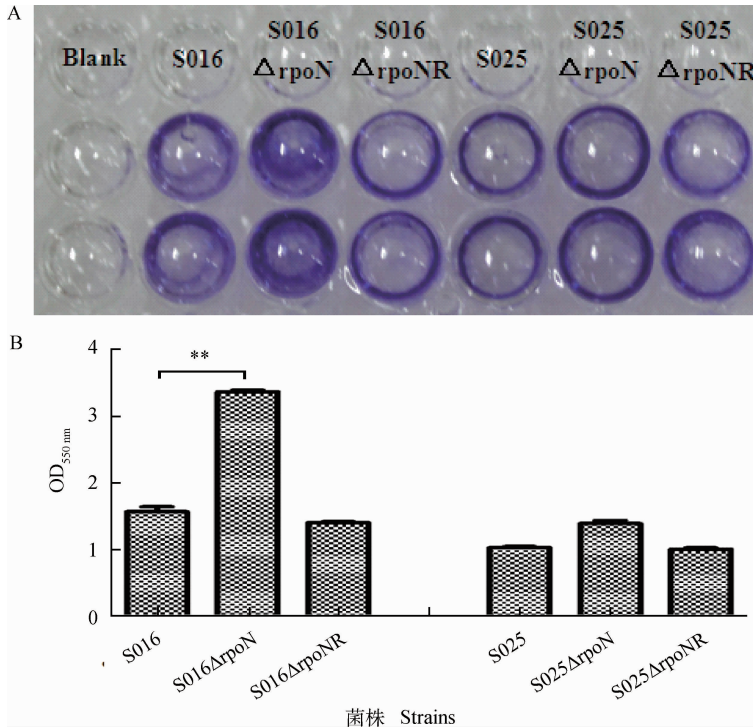
刚果红和考马斯亮蓝平板法测定生物被膜成分结果显示, 野生株 S016 和 S025 均呈红色干燥粗糙型菌落, 紫外灯下荧光板的荧光强。与野生株相比, S016 Δ rpoN 缺失株呈更为明显的红色干燥粗糙型菌落, 表面更为粗糙, 同时紫外灯下荧光板荧光增强; 而 S025 Δ rpoN 缺失株表型变化与 S016 Δ rpoN 缺失株类似, 但程度弱于后者(图 5)。



*. $P < 0.05$

图 3 野生株 S016(A)和 S025(B)及各自缺失株和回复株的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of wild-type strains S016(A) and S025(B) and their mutants and revertants



** . $P < 0.01$

图 4 96 孔细胞板上形成生物被膜后结晶紫染色结果 (A) 以及 OD_{550nm} 测定 (B)

Fig. 4 Biofilm formed on 96-well plate and stained by CV (A) and determination of OD_{550nm} (B)

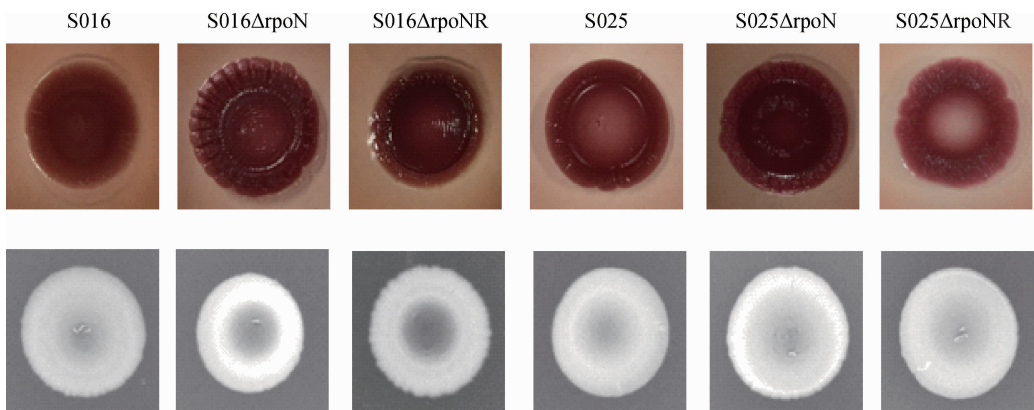


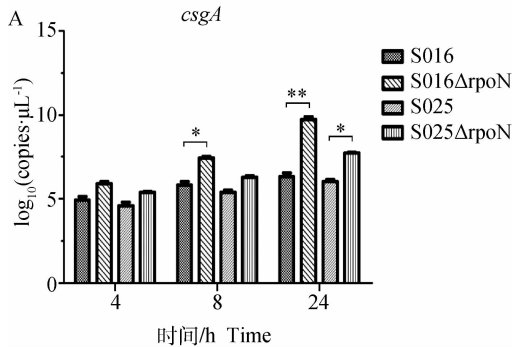
图 5 野生株、缺失株及回复株的生物被膜表型及纤维素的表达测定

Fig. 5 The morphotype and expression of cellulose by wild-type strains, mutants and revertants

回复试验结果显示,回复株 S016 Δ rpoNR 和 S025 Δ rpoNR 的 OD_{550 nm} 值分别为 1.405±0.015 和 1.046±0.020,且菌落均呈现红色干燥粗糙型,荧光强度与野生株相似,说明 rpoN 回复株恢复了类似野生株的生物被膜形成能力。

2.5 qRT-PCR 检测 *csgA* 基因和 *bcsA* 基因的转录差异

以引物 *csgA*-QF/QR 和 *bcsA*-QF/QR 建立的

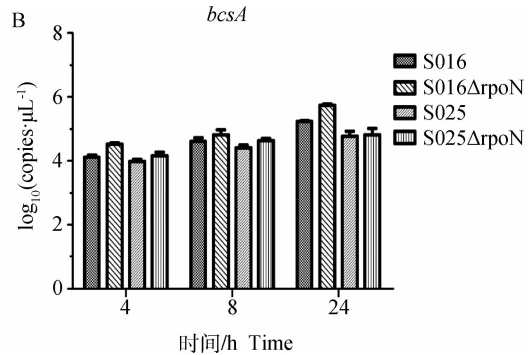


*. $P < 0.05$; *. *. $P < 0.01$

图6 荧光定量 PCR 检测细菌在生物被膜形成过程中 *csgA* 基因(A)和 *bcsA* 基因(B)的转录量

Fig.6 Transcription of *csgA* (A) and *bcsA* (B) genes in *Salmonella* strains during the period of biofilm formation detected by the quantitative real-time PCR

qRT-PCR 呈现单峰,说明特异性较好;扩增曲线显示重组质粒浓度在 $10^2 \sim 10^9$ 可形成标准曲线。qRT-PCR 检测结果显示,在生物被膜形成过程中,特别是在 24 h,两株缺失株编码卷曲菌毛合成的 *csgA* 基因的转录量与野生株相比均显著增加,其中 S016 Δ rpoN 缺失株 *csgA* 基因的转录量增加极显著;而缺失株编码纤维素合成的 *bcsA* 基因的转录较野生株相比没有显著差异(图 6)。



2.6 对环境应激抵抗力的检测

与野生株 S016 相比,S016 Δ rpoN 缺失株在酸性应激和碱性应激条件下对外界环境应激的抵抗力均显著增强($P < 0.05$);在热应激、氧化应激条件下抵抗力轻度增强。与野生株 S025 相比,S025 Δ rpoN 缺失株对各种外界应激的抵抗力均略有增强(图 7)。

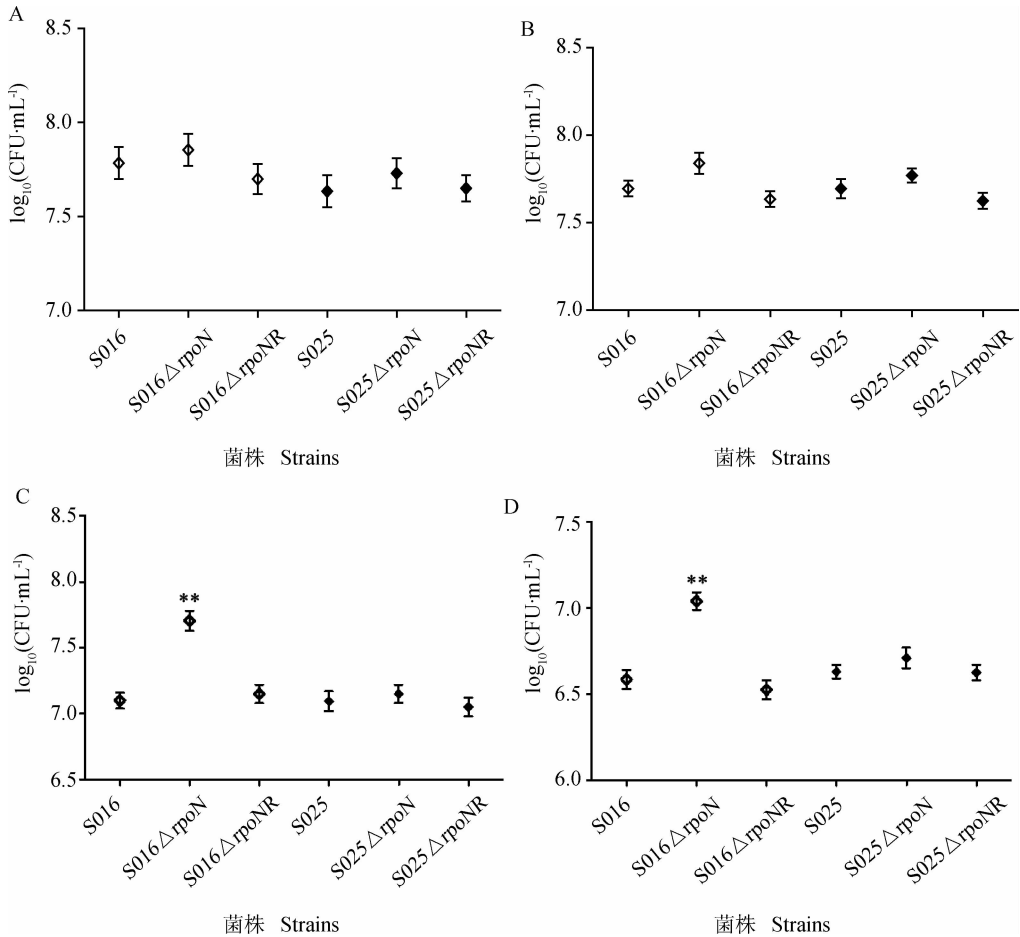
3 讨论

鼠伤寒沙门菌是一种能引起人畜共患病的常见致病菌,能够在动物体内以及动物肉产品的包装和转运过程中形成生物被膜。从而起到抵御外界不利环境和宿主免疫系统的作用,最终导致疾病的发生和持续反复感染^[9-11]。目前已发现多种与沙门菌生物被膜形成有关的基因,启动生物被膜形成的中心基因是 *csgD*,*rpoS* 基因可通过直接或间接激活 *csgD* 基因调控卷曲菌毛和纤维素的合成,进而影响生物被膜的形成^[12-13]; *rpoE* 基因也能通过调控卷曲菌毛的表达影响生物被膜的形成^[14]。在本实验室前期研究的基础上,作者运用 Red 同源重组法构建出两株生物被膜形成能力较强的鼠伤寒沙门菌的 *rpoN* 基因缺失株,发现其生物被膜形成能力增强,由此推断 *rpoN* 基因与鼠伤寒沙门菌生物被膜形成

相关。

转录起始是细菌基因调控的关键一步,*rpoN* 基因能够促进活化剂依赖的转录起始,从而调节各种代谢和细菌的发病有关的基因表达。V. S. Iyer 等研究发现,*rpoN* 基因缺失可使粪肠球菌对自体溶解产生耐受,生物被膜的形成能力增强^[15]。A. S. Belik 等研究也表明,在大肠杆菌 K-12 中,*rpoN* 基因缺失能增强细菌生物被膜的形成^[16]。本研究构建的两株 *rpoN* 基因缺失株的生物被膜形成能力较野生株相比均有增强,同时在刚果红和考马斯亮蓝平板上菌落更为粗糙,荧光定量 PCR 检测显示在生物被膜形成时期缺失株 *csgA* 基因的表达显著增加,说明其卷曲菌毛表达量增多;紫外灯下荧光板中 *rpoN* 基因缺失株的荧光强度与野生株相似,荧光定量 PCR 检测显示在生物被膜形成时期缺失株 *bcsA* 基因的表达量与野生株也无明显差异,说明纤维素表达量没有变化。因此,在鼠伤寒沙门菌中,*rpoN* 基因的缺失也同样可以增强细菌生物被膜的形成,并通过影响卷曲菌毛的合成而导致其生物被膜形成能力增强。

细菌处于外界不利条件(如极端的营养条件及温度变化、氧化、抗菌素和消毒剂等)时,可产生胞外



A. 热应激;B. 氧化应激;C. 酸应激;D. 碱应激。* * . $P < 0.01$

A. Heat shock;B. Oxidative stress;C. Acid endurance;D. Alkali endurance. * * . $P < 0.01$

图7 野生株、缺失株和回复株对于环境应激抵抗力的测定

Fig. 7 Determination of resistance to environmental stress for wild-type strains, mutants and revertants

聚合物黏附在介质表面,以固着的方式形成生物被膜,从而更好地适应环境^[17-19]。环境应激试验结果表明,*rpoN* 基因缺失使细菌在酸应激和碱应激条件下对外界抵抗力增强,这可能与其生物被膜形成能力增强有关。因此,RpoN 是一个重要的压力调控因子。本研究鉴定出 *rpoN* 基因为鼠伤寒沙门菌中生物被膜形成相关 σ 因子之一,同时 *rpoN* 基因能够通过影响卷曲菌毛的合成从而影响沙门菌生物被膜形成。这一发现不仅能丰富 σ 因子对生物被膜调控的机制,而且为新型药物的设计和新型疫苗的研制提供靶标。

4 结论

成功构建了 2 株鼠伤寒沙门菌 *rpoN* 基因缺失株。*rpoN* 基因缺失株生物被膜形成能力增强,对外界环境应激的抵抗力也显著增强。以上结果表明

RpoN 为鼠伤寒沙门菌中生物被膜形成相关 σ 因子之一。

参考文献 (References):

- [1] MAJOWICZ S E, MUSTO J, SCALLAN E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(6): 882-889.
- [2] PATI N B, VISHWAKARMA V, JAISWAL S, et al. Deletion of *invH* gene in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* limits the secretion of Sip effector proteins[J]. *Microbes Infect*, 2013, 15(1): 66-73.
- [3] ISHIHAMA A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 499-518.
- [4] 黄 骏, 陈素娟, 黄 凯, 等. 鸡白痢沙门氏菌生物被膜形成相关基因 *rpoE* 的鉴定[J]. *微生物学报*, 2015, 55(2): 156-163.

- HUANG J, CHEN S J, HUANG K, et al. Identification of *rpoE* gene associated with biofilm formation of *Salmonella pullorum* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(2):156-163. (in Chinese)
- [5] PRATT L A, KOLTER R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation; roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2):285-293.
- [6] ANRIANY Y, SAHU S N, WESSELS K R, et al. Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7):5002-5012.
- [7] MURPHY K C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(8):2063-2071.
- [8] CHI F, WANG Y, GALLAHER T K, et al. Identification of IbeR as a stationary-phase regulator in meningitic *Escherichia coli* K1 that carries a loss-of-function mutation in *rpoS* [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009:520283.
- [9] LEDEBOER N A, FRYE J G, MCCLELLAND M, et al. *Salmonella enterica serovar Typhimurium* requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(6):3156-3169.
- [10] HAMILTON S, BONGAERTS R J, MULHOLLAND F, et al. The transcriptional programme of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:599.
- [11] CRULL K, ROHDE M, WESTPHAL K, et al. Biofilm formation by *Salmonella enterica serovar Typhimurium* colonizing solid tumours [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(8):1223-1233.
- [12] BROWN P K, DOZOIS C M, NICKERSON C A, et al. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 41(2):349-363.
- [13] GRANTCHAROVA N, PETERS V, MONTEIRO C, et al. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica serovar typhimurium* [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(2):456-466.
- [14] YOO A Y, YU J E, YOO H, et al. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(1):131-136.
- [15] IYER V S, HANCOCK L E. Deletion of sigma(54) (*rpoN*) alters the rate of autolysis and biofilm formation in *Enterococcus faecalis* [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(2):368-375.
- [16] BELIK A S, TARASOVA N N, KHMEL' I A. Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: effect of mutations in HNS, StpA, lon, and *rpoN* genes [J]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 2008(4):3-5.
- [17] COSTERTON J W, STEWART P S. Battling biofilms [J]. *Sci Am*, 2001, 285(1):74-81.
- [18] DE SILVA G D, KANTZANOU M, JUSTICE A. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2):382-388.
- [19] DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(9):881-890.

(编辑 白永平)