

研究报告

## *rmlB* 基因在单核细胞增生李斯特菌耐药性、生物被膜形成和毒力方面的作用

于新惠 张颖 王文静 罗勤\*

(华中师范大学生命科学学院遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室 湖北 武汉 430079)

**摘要:**【目的】探究单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm) *rmlB* 基因在细菌耐药、生物被膜形成和毒力方面的作用。【方法】通过同源重组的方法敲除 Lm 染色体上的 *rmlB* 基因, 比较野生株与 *rmlB* 缺失株在耐药性方面的差异; 利用微孔板法观测 *rmlB* 缺失菌株生物被膜形成能力的变化; 利用 RT-PCR 检测缺失菌株中主要毒力基因转录表达, 并观察 *rmlB* 缺失对细菌溶血活性的影响。【结果】同野生菌株相比, *rmlB* 缺失菌株对头孢菌素和杆菌肽等作用位点在细菌细胞壁和细胞膜的敏感性显著增加( $P \leq 0.01$ ), 生物被膜形成能力显著降低( $P \leq 0.01$ ), 细菌主要毒力基因 *hly* 的转录表达及溶血活性也发生显著降低( $P \leq 0.01$ )。【结论】*rmlB* 基因在 Lm 生物被膜形成和耐受作用位点位于细胞壁和细胞膜的抗生素及细菌毒力方面具有重要作用。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特菌, *rmlB*, 抗药性, 生物被膜, 毒力

## Contribution of *rmlB* in envelope-acting antibiotic resistance, biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes*

YU Xin-Hui ZHANG Ying WANG Wen-Jing LUO Qin\*

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the function of *rmlB* gene on antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence in *Listeria monocytogenes*. [Methods] The *rmlB* gene was deleted through homologous recombination. Antibiotic resistance differences between the wild-type and the *rmlB* deletion mutant were compared. The biofilm formation ability of the mutant was measured using the microtiter plate assay. The transcription of major virulence genes in *L. monocytogenes* and hemolytic activity of the mutant were studied. [Results] Compared to the wild-type strain, the deletion of *rmlB* increased

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31571931); The Project of Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology (No. GRIB201404); Self-determined Research Funds of CCNU from the Colleges' basic Research and Operation of MOE (No. CCNU15A02026)

\*Corresponding author: E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

Received: January 31, 2016; Accepted: April 14, 2016; Published online (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31571931); 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室开放课题项目(No. GRIB201404); 华中师范大学中央高校基本科研业务费项目(No. CCNU15A02026)

\*通讯作者: E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-31; 接受日期: 2016-04-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

susceptibility to envelope-acting antibiotics such as several cephalosporins and bacitracin ( $P \leq 0.01$ ) and decreased bacterial biofilm formation ( $P \leq 0.01$ ). The transcription expression of the well-known virulence gene *hly* in *L. monocytogenes* and bacterial haemolytic activity were also significantly reduced in the *rmlB* deletion mutant ( $P \leq 0.01$ ). [Conclusion] *rmlB* plays a crucial role in *L. monocytogenes* against the envelope-acting antibiotics, biofilm formation and virulence.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, *rmlB*, Antibiotic resistance, Biofilm formation, Virulence

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 以下简称 Lm) 是一种短小的革兰氏阳性无芽胞兼性厌氧杆菌, 属于李斯特菌属, 是人畜共患传染病李斯特菌病 (Listeriosis) 的主要病原菌, 能引起人和动物脑膜炎、败血症、流产和单核细胞增多等症状<sup>[1]</sup>。Lm 在自然界分布广泛, 并能在多数固体表面 (如食品及食品加工运输和储藏的接触面, 甚至非食品加工接触面) 形成高度组织化和系统化的生物被膜 (Biofilm) 结构, 从而具有更强的抗逆性, 常规杀菌方法不能有效杀灭它们, 严重威胁食品卫生安全<sup>[2]</sup>。虽然到目前为止 Lm 对绝大多数常见的抗生素都是敏感的, 临床上也通常使用氨苄西林、利福平、盘尼西林或者与庆大霉素结合治疗李斯特菌病, 但越来越多的文献报道显示 Lm 耐药性已逐渐增强<sup>[3-4]</sup>。因此深入研究 Lm 对抗生素的耐受性机制不仅具有重要的基础科研意义, 而且具有潜在的临床应用价值。

细胞壁是细菌赖以生存的重要结构基础。细菌细胞壁的结构和成分与机体对细菌的特异性反应, 以及自然因素对细菌的选择性作用 (抗生素、噬菌体等) 等密切相关<sup>[5]</sup>。L-鼠李糖 (Rhamnose) 是一种 6-脱氧己糖, 广泛存在于许多病原菌的细胞壁及荚膜中。合成该糖的 4 种关键酶分别由 *rmlA*、*rmlB*、*rmlC*、*rmlD* 四个基因所形成的操纵子编码, 其核苷酸组成在不同细菌中较为保守<sup>[6]</sup>。由于人体内不存在 L-鼠李糖, 针对 L-鼠李糖合成中相关酶系的药物可能具有较好的选择毒性, 因此, 以 dTDP-L-鼠李糖的合成途径作为潜在的药物靶点是近几年病原菌的研究热点<sup>[6]</sup>。Lm 中也存在编码鼠李糖合成途径所需酶的基因, 但其对于细菌的生存和致病力方面的研究报道并不多见。本研究通过同源重组的方法构建了 Lm 中 L-鼠李糖合成过程关键酶 dTDP-D-葡萄

糖-4,6-脱氢酶的编码基因 *rmlB* 的缺失突变株, 并对其生物学特征、生物被膜形成能力、抗生素耐受性和毒力基因的转录表达等进行分析, 证实了 *rmlB* 基因在 Lm 生物被膜的形成、耐受作用位点位于细胞壁和细胞膜的抗生素以及细菌毒力等方面具有重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株、质粒及引物:** 单核细胞增生李斯特菌野生菌株 EGDe (血清型 1/2a; 全基因组序列已知<sup>[7]</sup>) 和温度敏感型穿梭整合质粒 pLSV101 为德国维尔茨堡大学微生物系 Werner Goebel 教授馈赠。引物 (表 1) 由天一辉远生物科技有限公司合成。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、Prime STAR Max、DNA 连接酶、RNA 反转录试剂盒, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 爱思进生物技术有限公司; DNA 纯化试剂盒, 天根生化科技有限公司; 2×EsTaq Master Mix, 康为世纪生物科技有限公司; PCR 仪, Applied Biosystems; 分光光度计, HACH; 酶标仪, BioTek。

**1.1.3 培养基和培养条件:** BHI 培养基 (g/L): 脑心浸液 37; LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0。Lm 菌株于 37 °C、180 r/min 振荡培养。

### 1.2 EGDeΔ*rmlB* 缺失突变株的构建

采用 SOEing PCR 方法 (即 PCR-mediated recombination method<sup>[8]</sup>) 构建缺失菌株: 以 EGDe 基因组 DNA 为模板用引物 P1 和 P2、P3 和 P4 分别扩增 *rmlB* 基因 ORF 上下游同源臂 A (452 bp) 和 B (406 bp) 片段; PCR 产物经纯化后作为模板, 以 P1 和 P4 为引物进行再一次 PCR, 从而获得含有 *Bam*H

表 1 本研究所用的引物  
Table 1 The primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
P1: <i>rmlB</i> -A-BamHI-F	TCTGGATCCGTGGAAGCGGGTGT
P2: <i>rmlB</i> -A-R	CCAATAAAACCTGCCCCACCTGTTACTAATAAAAT
P3: <i>rmlB</i> -B-F	GGCAGGTTTTATTGGGATTACGTTATGCTATTGACCCT
P4: <i>rmlB</i> -B-EcoRI-R	CCAGAAATCTTTACTTCCCAGT
P5: <i>rmlB</i> -ck-F	TATTTCTGTGGAAGCGGGTGT
P6: <i>rmlB</i> -ck-R	CTTTGCGCGTGATTTTAGTGG
P7: <i>rpoB</i> -F	TGCCATTTATGCCAGAC
P8: <i>rpoB</i> -R	TTCTTCCACTGTGCTCC
P9: <i>prfA</i> -F	TTAGCGAGAACGGGACCAT
P10: <i>prfA</i> -R	TGCGATGCCACTTGAATAT
P11: <i>plcA</i> -F	ACGATGAGCTATAACGGAGAC
P12: <i>plcA</i> -R	GCCGAATTTGCGGAGT
P13: <i>plcB</i> -F	GCAAATGCCTGTTGTGATG
P14: <i>plcB</i> -R	TATTGGCGTGCATAGGTTG
P15: <i>actA</i> -F	GGCGAAAGAGTCACTTGC
P16: <i>actA</i> -R	GTTGGAGGCGGTGGAAAT
P17: <i>mpl</i> -F	TGCTCCAGAGGCCACTACAT
P18: <i>mpl</i> -R	CTGATTGCCCTTCGTATTCC
P19: <i>hly</i> -F	TGTAAACTTCGGCGCAATC
P20: <i>hly</i> -R	TAAGCAATGGGAATCCTG
P21: <i>lmo0441</i> -F	CGCCGAAGACATTGAG
P22: <i>lmo0441</i> -R	AGTAATCCCGAGCACC
P23: <i>lmo2229</i> -F	CTCCAAGTGCGTATGACC
P24: <i>lmo2229</i> -R	TCCACCAGTAGCTGGGTC
P25: <i>lmo0540</i> -F	ATCACAACCTGGGAAATG
P26: <i>lmo0540</i> -R	CCATCCGGTCACAACCTC
P27: <i>lmo1438</i> -F	CTACGCAATGGGCTCTG
P28: <i>lmo1438</i> -R	TTTGTTACCTGGGAGG
P29: <i>lmo2754</i> -F	CATGCGAATGGTGGAG
P30: <i>lmo2754</i> -R	TTACCAACTTCCGTGCC
P31: <i>lmo1892</i> -F	GCAATGTTGTTTCCGTCC
P32: <i>lmo1892</i> -R	TCTCCAGGATTACCGCC
P33: <i>lmo2039</i> -F	GTCCTTCCTTCAACCCTG
P34: <i>lmo2039</i> -R	ATCGTGCCGTCACCTGC

I 和 *EcoR* I 酶切位点的 AB 融合片段 *rmlB* (A+B) (987 bp)。PCR 反应体系:EGDe 基因组 2  $\mu$ L, Prime STAR Max 25  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 超纯水补足至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 45 s, 60  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。

用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 对融合片段 *rmlB*(A+B)和质粒 pLSV101 进行双酶切,将酶切并纯化后的融合片段 *rmlB*(A+B)连接到质粒 pLSV101 上,构建重组穿梭质粒 pLSV101-*rmlB*(A+B),然后将其电转入 EGDe 感受态细胞中,按照张强等的方法<sup>[8]</sup>进行同源重组和筛选 *rmlB* 基因缺失的突变子 EGDe $\Delta$ *rmlB*。所得突变子经 PCR (以 *rmlB* 基因上下游引物对 P5 和 P6 PCR 扩增 EGDe $\Delta$ *rmlB* 中的 *rmlB* 基因片段,以 EGDe 基因组为对照来验证 *rmlB* 基因的缺失)和测序验证。

### 1.3 细菌鞭毛运动性试验

采用半固体琼脂穿刺法观察细菌鞭毛的运动性<sup>[9]</sup>:将待测菌株培养至  $OD_{600}$  达 0.8–1.0,用直的接种针挑取菌液后穿刺接种于半固体 BHI 培养基中,24  $^{\circ}$ C (Lm 鞭毛蛋白的表达受到温度严格调控,30  $^{\circ}$ C 以上鞭毛蛋白不表达)静置培养 1–2 周,每天观察。如果细菌由穿刺线向四周云雾状扩散,则判定该细菌有运动性。

### 1.4 细菌抗生素敏感性实验

**1.4.1 最低抑菌浓度法 (Minimal inhibitory concentration, MIC):** 将待测菌株培养至对数期 ( $OD_{600}$  达 0.5),在 96 孔微孔板中加入含有两倍倍比稀释抗生素的 BHI 培养基,取适量菌液加入 96 孔微孔板中使其终浓度约  $5 \times 10^5$  CFU/mL。同时设置 2 种对照:(1) 培养物对照,接种同数量的菌液,不加抗生素;(2) 培养基对照,不接种菌液,不加抗生素。将微孔板置于 37  $^{\circ}$ C,静置培养 18–22 h 后取出在酶标仪(BioTek, Synergy 2)下测定其  $OD_{600}$  值,以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC,每次试验重复 3 次<sup>[10]</sup>。

**1.4.2 K-B 纸片琼脂扩散法 (Disc agar diffusion method):** 将待测菌株培养至对数期 ( $OD_{600}$  达 0.5)

稀释至  $5 \times 10^6$  CFU/mL 后,取固定量菌液 0.35 mL 均匀涂布于 BHI 平板<sup>[11]</sup>。将含有待测抗生素的药敏纸片(Oxoid)均匀贴在涂好菌的平板表面,37  $^{\circ}$ C 培养 22–24 h 后,测量纸片周围没有细菌生长的完全抑制区直径,统计数据,每种抗生素重复 3 次。

**1.4.3 抗生素耐受试验 (The tolerance assay):** 将待测菌株培养至稳定期( $OD_{600}$  达 2.5),1:50 接种于新鲜的含有 32 mg/L Penicillin G<sup>[12–13]</sup>的 BHI 培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至相应时间后(0、0.3、3、6、9、12、24 h),取菌液稀释至适当倍数后涂布于 BHI 平板,37  $^{\circ}$ C 培养约 22 h 后,计数平板中菌落数,绘制细菌存活曲线,每次试验重复 3 次。

### 1.5 微孔板法检测菌株的生长和生物被膜的形成

具体方法参照冯飞飞等<sup>[14]</sup>和 Djordjevic 等<sup>[15]</sup>的报道进行:将待测菌株培养至对数期早期( $OD_{600}$  达 0.2)稀释后加入 96 孔微孔板。37  $^{\circ}$ C 静置培养至相应时间(1、2、3、5、7 d)后,先用酶标仪测定其生长情况( $OD_{600}$ ),然后弃去各孔培养基,经草酸铵结晶紫染色,95%乙醇溶液脱色后,用酶标仪测定其  $OD_{595}$  值。将脱色并干燥后的生物被膜直接放在倒置显微镜下(重光 COIC XDS-1B)观察,选取最佳视野拍照。所获得实验数据使用 Origin 6.1 和 SPSS 进行分析处理。

### 1.6 细菌溶血活性检测

取 1 mL 无菌脱纤维绵羊血,2 600 r/min 离心 5 min,弃上清。用生理盐水洗涤血细胞沉淀,清洗 3 次。用 50 倍体积生理盐水重悬血细胞,并以每支 1 mL 分装于 1.5 mL 离心管中。将待测菌培养至  $OD_{600}$  达 1.0 左右,取待测菌液 10、20、30、50、100  $\mu$ L 不同量的菌液加入含有血细胞的离心管中,37  $^{\circ}$ C 静置培养 30 min 后,2 600 r/min 离心 5 min,收集上清,在分光光度计上检测 543 nm 处吸光度值。以只含有血细胞的上清作为阴性对照,加入了等量无菌水的上清作为阳性对照。试验重复 3 次。

### 1.7 RT-PCR 检测基因的转录表达水平

将离心收集的细菌在液氮中充分地研磨成粉,之后采用 Trizol 法提取细菌总 RNA<sup>[16]</sup>。按照反转录试剂盒(TaKaRa)操作说明将总 RNA 反转录成

cDNA。应用 PrimerPremier 5.0 软件设计目的基因引物(见表 1),以 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因(以管家基因 *rpoB* 为内参基因)。试验重复 3 次。PCR 反应体系:cDNA 1.6  $\mu$ L, 2 $\times$ EsTaq Master Mix 10  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L,超纯水补足至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,62  $^{\circ}$ C to 52  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,20 个循环;95  $^{\circ}$ C 30 s,52  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,10 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。用 Quantity One 软件分析 RT-PCR 凝胶电泳图灰度值。所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 EGDe $\Delta$ *rmlB* 缺失突变株的构建及其生物学特性

**2.1.1 EGDe $\Delta$ *rmlB* 缺失突变株的构建:**如图 1 所示:用 *rmlB* 基因两端引物 P5 和 P6 进行 PCR 扩增,以 EGDe $\Delta$ *rmlB* 为模板所得片段比 EGDe 为模板短约 790 bp,其长度与预期结果一致。表明 EGDe $\Delta$ *rmlB* 成功缺失了 *rmlB* 基因,同时 DNA 测序结果也进一步证明 EGDe $\Delta$ *rmlB* 构建成功。

**2.1.2 缺失菌株 EGDe $\Delta$ *rmlB* 的生物学特性:**如图 2A 所示,野生株 EGDe 和缺失株 EGDe $\Delta$ *rmlB* 在营养丰富的 BHI 培养基中生长快速且生物量较高,而在营养相对贫瘠的 LB 培养基中生长较为缓慢,但

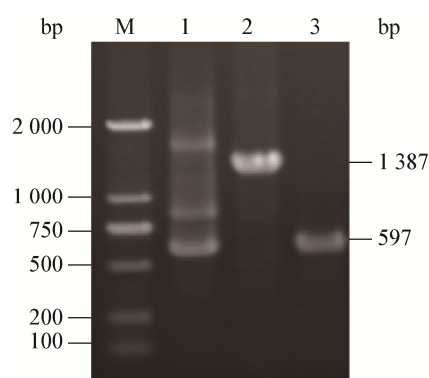


图 1 PCR 验证 EGDe $\Delta$ *rmlB* 中 *rmlB* 基因的缺失  
Figure 1 Verification of the deletion of *rmlB* in EGDe $\Delta$ *rmlB* by PCR

Note: M: Marker; 1: pLSV101-*rmlB* (A+B); 2: EGDe; 3: EGDe $\Delta$ *rmlB*.

是两种菌株的生长趋势基本一致。在 24  $^{\circ}$ C 条件下两种菌株均能形成鞭毛,致使其都能够半固体培养基中扩散,从而形成了伞状结构(图 2B);两种菌株在油镜下均为短杆状,大小约 0.5  $\mu$ m–2.0  $\mu$ m,形态和大小没有明显区别(图 2C)。

以上结果表明,缺失 *rmlB* 基因并未对单核细胞增生李斯特菌的生长、细胞形态及其运动性造成影响。

### 2.2 *rmlB* 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成的影响

如图 3A 所示:在 1、2、3、5、7 d 的培养过程中,野生菌株和 EGDe $\Delta$ *rmlB* 在各时间段的生长量无明显差异;与野生菌株 EGDe 相比,EGDe $\Delta$ *rmlB* 形成的生物被膜量显著降低,在 1、2、3、5、7 d 分别下降了 27.10%、37.52%、46.42%、37.97%和 38.85% (图 3B)。

显微镜下两种菌株形成的生物被膜结构显示(图 3C):野生型菌株 EGDe 形成的链网状生物被膜结构致密,孔隙很小;而 EGDe $\Delta$ *rmlB* 虽然能形成完整的链网状生物被膜,但其结构疏松、孔隙较大。该结果与上述微孔板定量检测结果相符合,表明 *rmlB* 基因的缺失降低了 Lm 生物被膜形成的能力。

### 2.3 *rmlB* 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌耐药性的影响

**2.3.1 比较 EGDe 和 EGDe $\Delta$ *rmlB* 对抗生素的敏感性:**如表 2 所示,与 EGDe 相比,EGDe $\Delta$ *rmlB* 对盘尼西林(Penicillin G)、氨苄西林(Ampicillin)和红霉素(Erythromycin)的 MIC 值以及对利福平(Rifampicin)的抑菌圈直径大小没有显著差异( $P \geq 0.05$ ),但对杆菌肽(Bacitracin)的 MIC 值显著下降,抑菌圈直径显著增加( $P \leq 0.01$ )。同时,EGDe $\Delta$ *rmlB* 对头孢菌素类(头孢呋辛 Cefuroxime、头孢噻肟 Cefotaxime、头孢吡肟 Cefepime)的抑菌圈直径明显增大( $P \leq 0.01$ )。由于杆菌肽、头孢菌素、盘尼西林和氨苄西林都是常用的作用位点在细菌细胞壁和细胞膜的抗生素,而红霉素和利福平则是作用于细菌蛋白质合成的抗生素,因此,上述结果暗示 *rmlB* 基因的缺失可能专一性地影响细菌对作

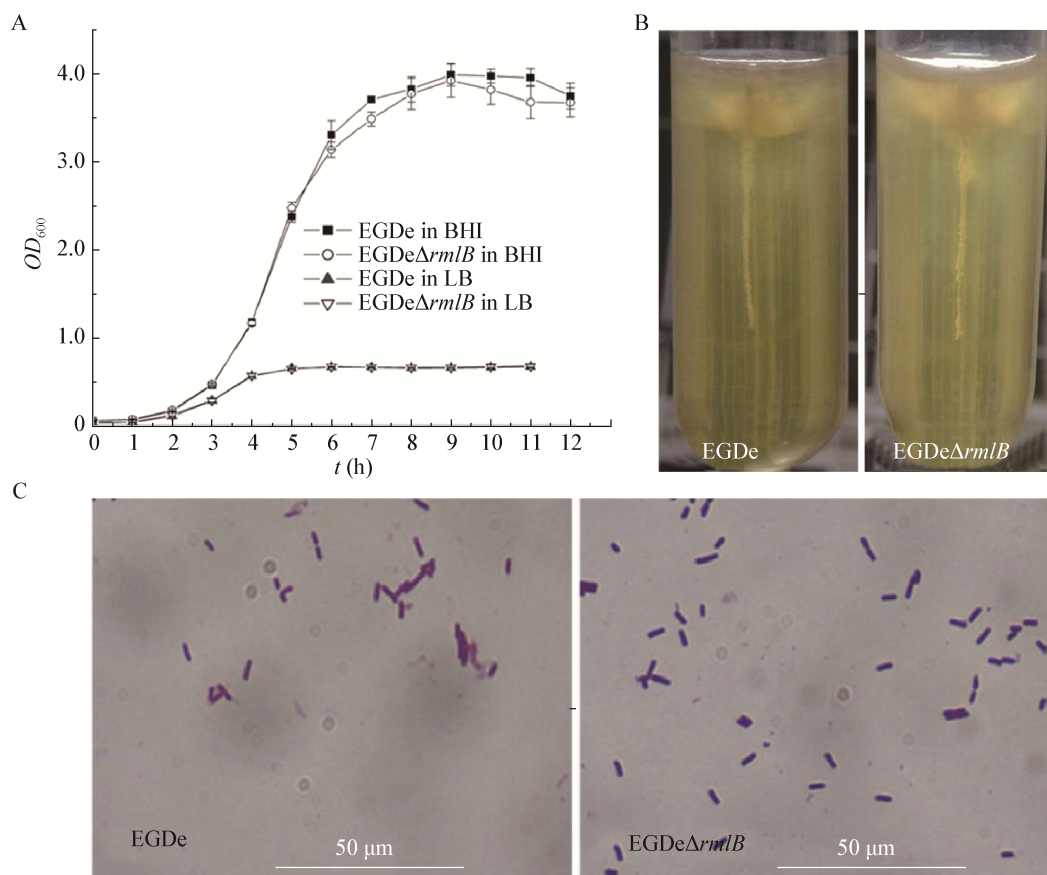


图2 EGDe 和 EGDe $\Delta$ rmlB 的生长、运动性及细菌形态的比较

Figure 2 Comparison of the growth, motility and bacterial morphology of EGDe and EGDe $\Delta$ rmlB

用位点在细胞壁和细胞膜的抗生素的敏感性。由于 EGDe $\Delta$ rmlB 对盘尼西林和氨苄西林的 MIC 与野生株 EGDe 相比没有差异,因此,我们以盘尼西林为例,进一步比较了 EGDe 与 EGDe $\Delta$ rmlB 对高浓度盘尼西林的耐受性。如图 4 所示:在含有致死浓度盘尼西林(32 mg/L)的 BHI 培养基中,与 EGDe 相比,EGDe $\Delta$ rmlB 在 3 h 后出现明显迟滞,活菌数快速下降,在 6 h 时活菌数降低最为显著;之后,EGDe 活菌数也快速下降,12 h 后两菌死亡速率逐渐趋同。以上结果表明,尽管 EGDe $\Delta$ rmlB 与野生株 EGDe 相对盘尼西林的 MIC 没有差异,但是缺失 *rmlB* 后,细菌对高浓度盘尼西林的耐受性显著降低。

**2.3.2 比较青霉素结合蛋白在 EGDe 和 EGDe $\Delta$ rmlB 中的转录表达差异:**青霉素结合蛋白(Penicillin-binding proteins, PBPs)是参与细菌细胞

壁肽聚糖生物合成的酶。它们的正常存在是细菌保持正常形态及功能的必需条件<sup>[17]</sup>。头孢菌素类和青霉素类等  $\beta$ -内酰胺类抗生素,主要通过作用于细菌表面的 PBPs 而产生抗菌活性。不同细菌 PBPs 的种类及含量各不相同。PBPs 结构与数量的改变是细菌产生耐药性的一个重要机制<sup>[18]</sup>。在 *Lm* 中, PBPs 及其类似物共有 7 种,其编码基因分别是 *lmo0441*、*lmo2229*、*lmo0540*、*lmo1438*、*lmo2754*、*lmo1892* 和 *lmo2039*。为了探究 *rmlB* 缺失后,细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感性增加的具体机制,我们比较了以上 7 种 PBPs 在 EGDe 和 EGDe $\Delta$ rmlB 中的转录表达差异。结果如图 5 所示,7 种 PBPs 里,只有 *lmo2229* 在 EGDe $\Delta$ rmlB 中的转录表达显著降低( $P \leq 0.01$ ),暗示 *lmo2229* 表达量的降低可能是 EGDe $\Delta$ rmlB 对  $\beta$ -内酰胺类抗生素以及杆菌肽敏感性增加的原因。



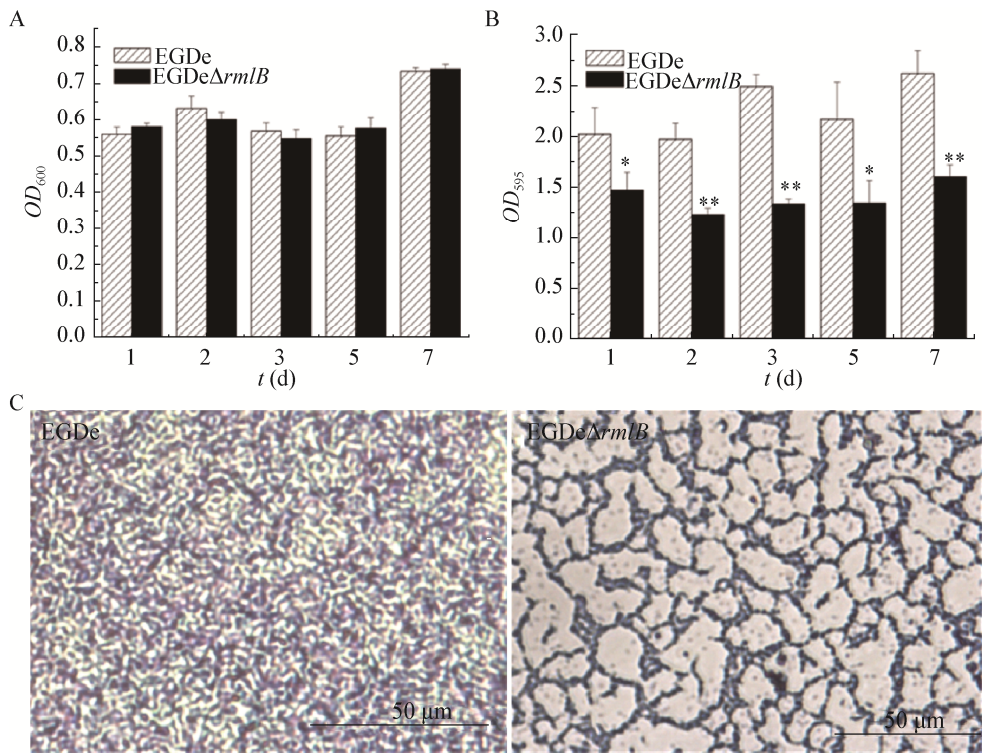


图3 EGDe 和 EGDe $\Delta rmlB$  生物被膜形成能力的比较

Figure 3 Biofilm formation by EGDe and EGDe $\Delta rmlB$  in BHI at 37 °C

注：A：两种菌株分别培养 1、2、3、5、7 d 后的生长量；B：两种菌株分别培养 1、2、3、5、7 d 后生物被膜的形成量；C：显微镜下，两种菌株形成的生物被膜结构(7 d，40 $\times$ )；\*\*：在同一培养时间段内，与野生型菌株 EGDe 相比，突变株 EGDe $\Delta rmlB$  的生物被膜形成量具有极显著性差异 ( $P\leq 0.01$ )。

Note: A: The biomass of the two strains after 1, 2, 3, 5, 7 d of cultivation; B: Biofilm quantities for the two strains measured by microtiter plate assay after 1, 2, 3, 5, 7 d of incubation; C: Biofilm formed in the seventh day by the two strains observed under a 40 $\times$  objective; \*\*: Significant differences of the biomass of biofilm between the mutant strain EGDe $\Delta rmlB$  and the wild type strain EGDe during the same culture time ( $P\leq 0.01$ ).

表 2 EGDe 和 EGDe $\Delta rmlB$ 对抗生素的敏感性				
Table 2 The difference between EGDe and EGDe $\Delta rmlB$ in the antibiotic resistance				
抗生素 Antibiotic	EGDe		EGDe $\Delta rmlB$	
	抑菌圈直径 Zone of inhibition (mm) $\pm s^a$	MIC (mg/L)	抑菌圈直径 Zone of inhibition (mm) $\pm s$	MIC (mg/L)
Ampicillin	28.39 $\pm$ 0.39	0.130 $\pm$ 0.050	28.35 $\pm$ 0.21	0.120 $\pm$ 0.070
Penicillin G	26.48 $\pm$ 0.09	0.224 $\pm$ 0.089	27.06 $\pm$ 0.34	0.224 $\pm$ 0.089
Erythromycin	28.57 $\pm$ 0.46	0.160	28.39 $\pm$ 0.21	0.160
Bacitracin	16.41 $\pm$ 0.20	88.000 $\pm$ 10.950	16.86 $\pm$ 0.03**	72.000 $\pm$ 8.360**
Cefuroxim	17.24 $\pm$ 0.49		20.54 $\pm$ 0.41**	
Cefotaxime	16.92 $\pm$ 0.14		19.39 $\pm$ 0.67**	
Cefepime	15.71 $\pm$ 0.45		19.19 $\pm$ 0.39**	
Rifampicin	28.05 $\pm$ 0.42		28.01 $\pm$ 0.31	

注：a：结果为 3 次实验的平均值；\*\*：野生菌株与缺失菌株之间有显著性差异( $P\leq 0.01$ )；s：标准偏差。

Note: a: Values are averages of triplicate experiments; \*: Significant differences between the mutant strain and the wild-type ( $P\leq 0.01$ ); s: Standard deviation.

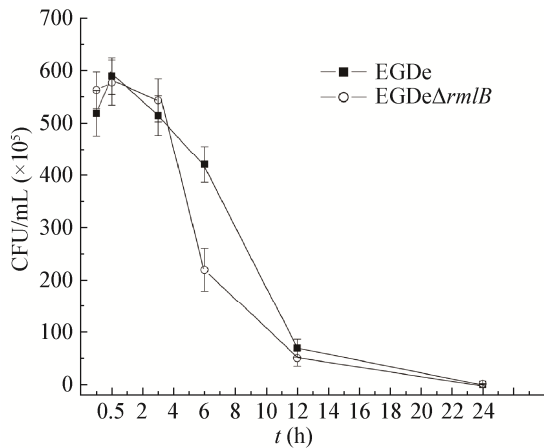


图4 EGDe 和 EGDeΔrmlB 在含有 32 mg/L penicillin G 的液体培养基中的存活曲线

Figure 4 Survival of EGDe and EGDeΔrmlB in broth supplemented with 32 mg/L penicillin G

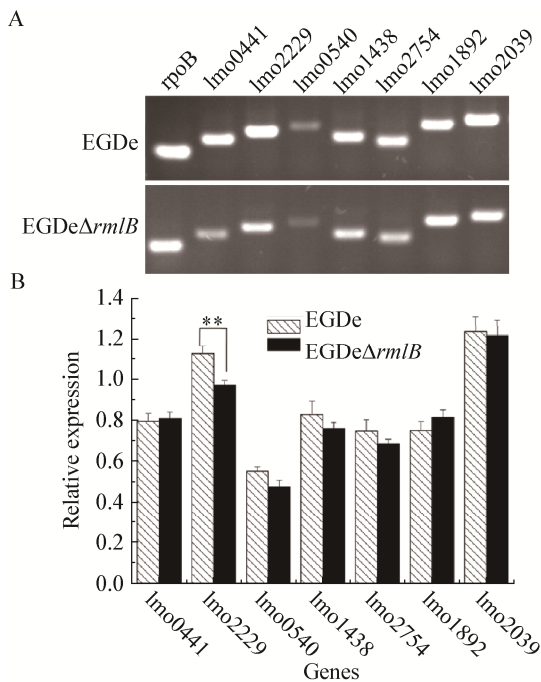


图5 青霉素结合蛋白在 EGDe 和 EGDeΔrmlB 中的转录表达

Figure 5 The relative expression of the PBPs in the EGDe and EGDeΔrmlB

注：A：青霉素结合蛋白在 EGDe 和 EGDeΔrmlB 中转录表达的典型 RT-PCR 电泳图；B：用 Quantity One 软件分析 3 次 RT-PCR 凝胶电泳图灰度值的结果(\*\*：P≤0.01)。

Note: A: The typical RT-PCR electrophoregram of PBPs in EGDe and EGDeΔrmlB; B: Quantification of the transcripts intensities performed by Quantity One software (\*\*: P≤0.01).

## 2.4 rmlB 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌毒力的影响

**2.4.1 比较主要毒力基因在 EGDe 和 EGDeΔrmlB 中的转录表达差异：**Lm 的致病机制主要与毒力岛 1 (LIPI-1) 中的基因表达相关<sup>[19]</sup>。该毒力岛由基因 *hly*、*plcA*、*plcB*、*mpl*、*actA* 及主要毒力基因调控蛋白编码基因 *prfA* 共同组成的一段 9 kb 长的基因簇组成。缺失该基因簇将导致 Lm 毒力完全丧失<sup>[19]</sup>。为探究 *rmlB* 基因的缺失对 Lm 毒力的影响，比较了 EGDe 和 EGDeΔrmlB 中主要毒力基因 *prfA*、*plcA*、*plcB*、*actA*、*mpl* 和 *hly* 的转录表达。结果如图 6 所示，*hly* 基因在 EGDeΔrmlB 中的转录表达显著下降。由 *hly* 基因编码的李斯特菌溶血素(Listeriolysin O, LLO) 能裂解宿主吞噬体的双层膜，帮助细菌从吞噬体逃逸到宿主细胞胞质，是细菌得以在宿主细胞内繁殖所必需的最重要的毒力因子<sup>[19]</sup>。*hly* 转录表达水平的下降暗示 EGDeΔrmlB 的致病性也可能随之降低。

**2.4.2 rmlB 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌溶血活性的影响：**如前所述，*rmlB* 基因缺失后导致主要毒力基因 *hly* 的转录表达显著降低。为确定 *hly* 基因编码蛋白 LLO 的活性是否也因此降低，进行了细菌溶血活性检验。结果如图 7 所示，随着细菌菌液含量的增加，细菌中 LLO 的浓度升高，溶血

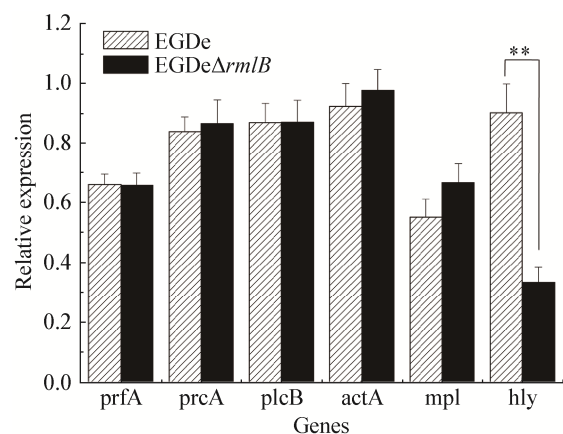


图6 主要毒力基因在 EGDe 和 EGDeΔrmlB 中的转录表达

Figure 6 The relative transcription expression of the major virulence genes in the EGDe and EGDeΔrmlB



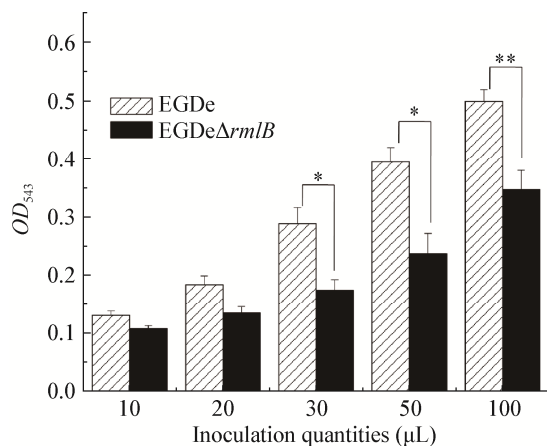


图7 EGDe 和 EGDeΔrmlB 的溶血活性  
Figure 7 Hemolytic activity of EGDe and EGDeΔrmlB

活性也随之上升。但与 EGDe 相比, EGDeΔrmlB 的溶血活性明显降低, 当细菌接菌量为 100 μL 时, 差异最为显著( $P \leq 0.01$ )。该结果与 *hly* 转录水平的检测结果相一致, 说明 *rmlB* 基因的缺失造成 Lm 主要毒力基因 *hly* 转录和翻译水平下降, 从而导致 Lm 毒力降低。

### 3 讨论

L-鼠李糖是广泛存在于许多病原菌的细胞壁及荚膜中的六碳糖。细胞壁和荚膜对于细菌的存活至关重要。在感染阶段, 细菌通过细胞壁和荚膜与宿主细胞相互作用。L-鼠李糖合成途径在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中都是普遍存在且高度保守的。迄今为止, 在人体内还没有发现 L-鼠李糖及其合成相关基因。因此, 以 dTDP-L-鼠李糖的合成途径作为潜在的药物靶点是近几年病原菌的研究热点<sup>[6]</sup>。然而, 研究发现, 敲除保守的 L-鼠李糖合成途径中的关键基因后, 不同细菌的表征并不完全相同。在结核分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中, 敲除 *rmlB* 和(或) *rmlC* 后, 细菌不再生长<sup>[20]</sup>; 在变异链球菌(*Streptococcus mutans*)中, 敲除操纵子中任何一个基因都将抑制细菌细胞壁多糖的合成, 导致细菌毒性的降低<sup>[21]</sup>; 但是在大肠杆菌(*Escherichia coli* O2:K1)中, 缺失 *rmlB* 基因后细菌的生长并不受任何影响, 突变菌株中的 O 抗原仍然含有 L-鼠李

糖, 作者认为该菌株中可能存在 RmlB 的同工酶或者 L-鼠李糖的其它合成途径<sup>[22]</sup>。

Lm 中也存在 L-鼠李糖合成途径 *rmlACBD* 操纵子的基因位点<sup>[23]</sup>。当该操纵子缺失后, 细菌壁磷壁酸(Wall teichoic acids)中就缺少 L-鼠李糖成分, 说明在 Lm 中 *rmlACBD* 操纵子对于 L-鼠李糖的合成是必不可少的<sup>[24]</sup>。但 Lm 的 13 个血清型里只有血清型 1/2a、1/2b、1/2c、3c 和 7 菌株中具有该基因位点, 而且在 3c 和 7 菌株中因 *rmlACBD* 操纵子具有碱基突变而不能合成 L-鼠李糖, 因此只有血清型 1/2a、1/2b、1/2c 菌株的壁磷壁酸的主要成分是 L-鼠李糖<sup>[23]</sup>。由此我们推测, 尽管壁磷壁酸是革兰氏阳性菌细胞壁的特殊组分, 在细菌形态、分裂和耐药性等方面起着重要作用<sup>[25]</sup>, 但是, L-鼠李糖合成并不是 Lm 形态和生长所必需的细胞功能途径。事实上, 当我们构建 *rmlB* 基因缺失菌株(EGDeΔrmlB)后, 发现 EGDeΔrmlB 的生长及表型都没有明显的变化, 该结果与预期高度一致。同时, 由于血清型 1/2a、1/2b 等菌株常在食品中检出, 是除血清型 4b 外导致李斯特菌病的主要血清型<sup>[26]</sup>, 因此, EGDeΔrmlB 生物被膜形成能力显著下降, 暗示鼠李糖的合成尽管对于细菌生长和形态没有重要意义, 但可能对细菌适应千变万化的食品以及食品加工运输和储藏环境具有重要作用。

Lm 对于单环 β-内酰胺类(monobactams)及 β-内酰胺类抗生素具有天然的抵抗力。例如甲氧西林及广谱头孢菌素类(包括头孢噻肟和头孢他啶)。而李斯特菌的这一特性具有重要的临床意义, 因为医院在治疗不明病原菌所引起的发热时首先会选用头孢菌素类抗生素进行治疗<sup>[27]</sup>, 因此研究李斯特菌耐药性产生的分子机制具有重要意义。我们的实验证明, 当缺失合成鼠李糖的关键基因 *rmlB* 后, 细菌对作用于细胞壁和细胞膜的抗生素(如杆菌肽和头孢菌素等)的耐药性显著降低, 其可能机制与 *lmo2229* (Lm 青霉素结合蛋白 PBP4 的编码基因)表达量降低相关。研究表明, *lmo2229* 基因突变后可导致 Lm 对 β-内酰胺类抗生素敏感性增加<sup>[4]</sup>。同时,

在肺炎链球菌中, Smith 等<sup>[28]</sup>和 Zhao 等<sup>[29]</sup>已证明 *lmo2229* 同系物 PBP2A 编码基因序列的变异可降低与  $\beta$ -内酰胺类抗生素的亲性和, 从而极大地提高细菌的耐药性和致病力。以上研究说明, *lmo2229* 基因对于 Lm 抵抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有重要作用, 但其与鼠李糖合成关键酶的相互作用尚未见文献报道, 这将会是我们今后研究的重点。

最近, Carvalho 等<sup>[24]</sup>发现: 缺失 EGDe 的 *rmlACBD* 操纵子后, 细菌的毒力下降, 感染小鼠的肝脏及脾脏中细菌数降低。我们的实验也证明缺失 *rmlB* 后, Lm 主要毒力因子溶血素 LLO 的编码基因 *hly* 的转录表达及细菌溶血活性显著降低, 但是包括毒力基因转录调控蛋白 PrfA 在内的其它主要毒力因子的表达都没有受到明显影响。该结果一方面验证了 Lm 壁磷壁酸中的 L-鼠李糖对于细菌的致病性具有重要作用, 另一方面也暗示其致病机制与 *hly* 基因的转录表达相关, 因此, 阐明其作用途径和方式也成为了我们今后研究的方向。

综上所述, 我们的研究表明, *rmlB* 基因在 Lm 生物被膜形成和耐受作用位点在细胞壁和细胞膜的抗生素及细菌毒力方面具有重要作用。

## 参 考 文 献

- [1] Dussurget O, Bienne H, Cossart P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 50
- [2] Law JWF, Mutalib NSA, Chan KG, et al. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1227
- [3] Hof H. Listeriosis: therapeutic options[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35(3): 203-205
- [4] Guinane CM, Cotter PD, Ross RP, et al. Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(8): 2824-2828
- [5] Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(S1): S9
- [6] Giraud MF, Naismith JH. The rhamnose pathway[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(6): 687-696
- [7] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 849-852
- [8] Zhang Q, Feng YY, Deng LF, et al. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 238-243
- [9] Zhu XF. *Modern Experimental Technique of Microbiology*[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011: 44 (in Chinese)
- 朱旭芬. *现代微生物学实验技术*[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011: 44
- [10] Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, et al. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 94(2/3): 279-281
- [11] Yu XZ. The specification of the bacterial amount in K-B method susceptibility testing[J]. *Journal of Sichuan Continuing Education College of Medical Sciences*, 2002, 21(3): 177-178 (in Chinese)
- 余修中. K-B 法药敏试验中菌液量的规范[J]. *四川省卫生管理干部学院学报*, 2002, 21(3): 177-178
- [12] Krawczyk-Balska A, Korsak D, Popowska M. The surface protein Lmo1941 with LysM domain influences cell wall structure and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to cephalosporins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 357(2): 175-183
- [13] Begley M, Hill C, Ross RP. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2231-2234
- [14] Feng FF, Zhang Q, Wang L, et al. The virulence regulator PrfA plays a significant role in the *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(9): 1450-1457 (in Chinese)
- 冯飞飞, 张强, 王莉, 等. 毒力基因调控蛋白 PrfA 促进单核细胞增生李斯特菌生物被膜的形成[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1450-1457
- [15] Djordjevic D, Wiedmann M, Mcclandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2950-2958
- [16] Luo Q, Shang JL, Feng XQ, et al. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(3): 372-378
- [17] Xiong YL, Fan XJ. The research development of penicillin-binding protein[J]. *World Notes on Antibiotics*, 2004, 25(5): 193-197 (in Chinese)
- 熊亚莉, 范昕建. 青霉素结合蛋白研究进展[J]. *国外医药抗生素分册*, 2004, 25(5): 193-197
- [18] Li J, Yang H, Huan T, et al. Penicillin binding proteins of bacteria[J]. *Chemistry of Life*, 2013, 33(4): 418-426 (in Chinese)
- 李冀, 杨慧, 呼延霆, 等. 细菌青霉素结合蛋白[J]. *生命的化学*, 2013, 33(4): 418-426
- [19] Luo Q, Zhang XL, Li B, et al. Regulation of PrfA-dependent virulence genes expression in *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(2): 275-280 (in Chinese)
- 罗勤, 张晓莉, 李兵, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(2): 275-280
- [20] Li W, Xin Y, McNeil MR, et al. *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of mycobacteria[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(1): 170-178
- [21] Yamashita Y, Tomihisa K, Nakano Y, et al. Recombination between *gtfB* and *gtfC* is required for survival of a dTDP-rhamnose synthesis-deficient mutant of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(7): 3693-3697
- [22] Ding WP, Luo YM, Ai GM, et al. Function of *rmlB* in the pathogenic *Escherichia coli* 44277 (O2: K1)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1168-1176 (in Chinese)
- 丁卫平, 罗元明, 艾国民, 等. 大肠杆菌 44277(O2:K1)中 *rmlB* 基因功能[J]. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1168-1176
- [23] Doumith M, Cazalet C, Simoes N, et al. New aspects regarding

- evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 1072-1083
- [24] Carvalho F, Atilano ML, Pombinho R, et al. L-Rhamnosylation of *Listeria monocytogenes* wall teichoic acids promotes resistance to antimicrobial peptides by delaying interaction with the membrane[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004919
- [25] Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 313-336
- [26] Nightingale KK, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(16): 5537-5551
- [27] Krawczyk-Balska A, Markiewicz Z. The intrinsic cephalosporin resistance of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(2): 251-265
- [28] Smith AM, Feldman C, Massidda O, et al. Altered PBP 2A and its role in the development of penicillin, cefotaxime, and ceftriaxone resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(5): 2002-2007
- [29] Zhao GS, Meier TI, Hoskins J, et al. Identification and characterization of the penicillin-binding protein 2a of *Streptococcus pneumoniae* and its possible role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(6): 1745-1748

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学领域的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！