

研究报告

MdrL 外排泵在单核细胞增生李斯特菌对苯扎氯铵耐受中的作用

徐雅梦¹ 姜晓冰^{1*} 于涛² 王海磊¹ 石磊³

(1. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 新乡学院生命科学技术学院 河南 新乡 453000)

(3. 暨南大学食品安全与营养研究院 广东 广州 510632)

摘要:【背景】季铵盐类消毒剂特别是苯扎氯铵(Benzalkonium chloride, BC)在食品工业中的广泛应用导致单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)对 BC 的敏感性下降。外排泵是介导 Lm 对 BC 耐受的主要机制。【目的】调查 MdrL 外排泵在 Lm 对 BC 耐受中的作用。

【方法】利用同源重组技术构建 *mdrL* 基因缺失株。比较野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 在对 BC 的耐受性、亚致死浓度 BC (2 $\mu\text{g/mL}$)胁迫下的生长情况以及致死浓度 BC (16 $\mu\text{g/mL}$)下的存活率等方面的差异。【结果】构建 *mdrL* 基因缺失株 $\Delta mdrL$ 及回复突变株 $C\Delta mdrL$ 。*mdrL* 的缺失不影响菌株对 BC 的最小抑菌浓度。生长曲线测定结果显示,与野生株相比,突变株在亚致死浓度 BC 作用下的生长迟滞期延长、平均最大生长率和平均最大光密度值均降低。当 BC 浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 时,梯度稀释后的野生株和突变株在平板上的生长显现出明显的差异。与野生株相比,突变株在致死浓度 BC 作用下的存活率降低 2 个 log 值。透射电镜的观察结果显示,加入 BC 后,突变株的细胞明显变细长。此外,野生株和突变株对溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)的积累和外排无明显差异。【结论】MdrL 外排泵介导 Lm 对 BC 的耐受,但是与 Lm 对 EB 的外排无关。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌, 苯扎氯铵, 外排泵, 溴化乙锭

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31601568); Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (16A180011); Doctoral Scientific Research Start-up Foundation of Henan Normal University (01046500152)

*Corresponding author: Tel: 86-373-3326340; E-mail: jxb841001@163.com

Received: September 02, 2017; **Accepted:** December 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 09, 2018

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31601568); 河南省高等学校重点科研项目(16A180011); 河南师范大学博士科研启动基金(01046500152)

*通信作者: Tel: 86-373-3326340; E-mail: jxb841001@163.com

收稿日期: 2017-09-02; **接受日期:** 2017-12-28; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-09

Role of efflux pump MdrL in tolerance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes*

XU Ya-Meng¹ JIANG Xiao-Bing^{1*} YU Tao² WANG Hai-Lei¹ SHI Lei³

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. College of Life Sciences and Technology, Xinxiang University, Xinxiang, Henan 453000, China)

(3. Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Background] Quaternary ammonium compounds, especially benzalkonium chloride (BC), are widely used in food industry, leading to decreased sensitivity to BC in *Listeria monocytogenes*. Efflux pumps are recognized as an important mechanism for BC tolerance. [Objective] To investigate the role of efflux pump MdrL in tolerance to BC in *Listeria monocytogenes*. [Methods] The mutant strain $\Delta mdrL$ was constructed from the wild-type strain EGD-e by homologous recombination. The differences in BC tolerance, growth in sub-lethal concentration of BC (2 $\mu\text{g/mL}$), and survival in lethal concentration of BC (16 $\mu\text{g/mL}$) between the mutant strain $\Delta mdrL$ and the wild-type strain EGD-e were investigated. [Results] The mutant strain $\Delta mdrL$ and its complemented strain were constructed in this study. The mutant and wild-type strains showed the same minimum inhibitory concentrations to BC. The results show that compared with the wild-type strain EGD-e, the lag-phase duration of the mutant strain $\Delta mdrL$ was prolonged and the mean maximum growth rate and the mean maximum optical density were decrease in the presence of sub-lethal concentration of BC. Significantly difference was observed in the serial diluted culture between the mutant strain $\Delta mdrL$ and the wild-type strain EGD-e on the plates in the presence of BC (4 $\mu\text{g/mL}$). Compared with the wild-type strain EGD-e, two log decrease were observed in the mutant strain $\Delta mdrL$ in the presence of the lethal concentration of BC. The results of electron microscopy showed that the mutant strain $\Delta mdrL$ became longer when exposed to BC. Besides, no differences were observed in the accumulation and efflux to ethidium bromide (EB) between the mutant strain $\Delta mdrL$ and the wild-type strain EGD-e. [Conclusion] Efflux pump MdrL plays an important role in tolerance to BC in *Listeria monocytogenes*, however, this efflux pump is not associated with efflux of EB.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Benzalkonium chloride, Efflux pump, Ethidium bromide

季铵盐类化合物(Quaternary ammonium compounds, QACs)消毒剂,特别是苯扎氯铵(Benzalkonium chloride, BC)被广泛应用于食品工业领域^[1]。QACs 是一类阳离子表面活性剂,可吸附于微生物表面形成微团,并逐步渗入细胞膜的类脂层,从而改变细胞的通透性,使细胞内容物外渗,进而导致微生物死亡^[2]。由于 QACs 遇水易起泡,因此此类消毒剂在使用后一般不进行专门清洗;加之 QACs 的降解速度较慢,可能会造成其在环境中的残留,从而增加 QACs 耐受菌株出现的可能性^[2-3]。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一种重要的食源性致病菌。Lm 能在低温、高盐、长时间干燥以及酸等多种不利环境条件下生存

和繁殖,导致食品在加工和保藏过程中易受其污染。通过摄入污染的食品可引起李斯特菌病(Listeriosis)的散发和暴发流行^[4]。由于 Lm 能在食品加工环境中存活数月乃至数年之久, QACs 在食品工业的广泛使用可能会促进 Lm 耐受菌株的出现。许多文献已经报道了从食品及食品相关环境中分离的 Lm 菌株对 BC 的敏感性下降^[1,5-7]。

外排泵在细菌中广泛存在,属于膜转运蛋白。研究表明,一些外排泵可以将消毒剂、抗生素、重金属等作为底物排出体外,使菌体内的药物浓度始终维持在较低水平,从而导致细菌产生耐药性^[5,8]。目前,研究者普遍认为外排泵是介导 Lm 对 BC 产生耐受的主要机制^[9]。Tamburro 等^[10]的研究发现,

在 BC 刺激下, *mdrL* 基因的表达量明显升高, 推测 MdrL 外排泵可能与 Lm 对 BC 的耐受有关。

本研究以 Lm 标准菌株 EGD-e 为研究对象, 利用同源重组技术构建 *mdrL* 基因缺失突变株, 通过检测野生株和突变株在 BC 胁迫下的生理行为和细胞表面形态等, 调查 MdrL 外排泵在 Lm 对 BC 耐受中的作用, 为阐明 Lm 对 BC 的耐受机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Lm 标准菌株 EGD-e 和质粒 pERL3 由华中师范大学罗勤教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 、DH10B 购自北京博迈德基因技术有限公司; 穿梭质粒 pMAD 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

苯扎氯铵, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 利血平和溴化乙锭(Ethidium bromide, EB), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒小提试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶, Thermo Fisher Scientific 公司; *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

电热恒温培养箱, 北京科伟永兴仪器有限公司; 气浴恒温振荡器, 金坛天竟实验仪器厂; 基因扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 电泳仪, 北京市六一仪器厂; 离心机, 上海安亭科学仪器厂;

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	长度 Sizes (bp)
mdrL-A	<i>CGGGATCCGTCCTTGGTTCTGGCAT</i>	48	500
mdrL-B	AATACAACACTACTTCCCTTTCCGGAAAGGGAAGTGTAAGTTGTATT	48	
mdrL-C	GGAAAGGGAAGTGTAAGTTGTATTCCAGCACATTTTACCTTACAAC	48	735
mdrL-D	<i>CGGAATTC</i> TCCAATCATAAAAGTTTCGTCAG	48	
mdrLJC1	TGTAAAGCAGCAGGAGTG	50	2 617/1 471
mdrLJC2	AAACGACGCTAATAACCAT	50	
MP7-2	<i>CCCTCGAGTATCATACAATAGCACCTCTG</i>	50	1 389
MP8-2	<i>CCGTCGACCCAGGTTACTCAGTCTCTTG</i>	50	

注: 斜体部分序列表示保护碱基; 下划线部分序列表示酶切位点。

Note: Italicized nucleotides are protective bases; Nucleotides underlined are restriction recognition sites.

凝胶成像分析系统、电转仪, 美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 瑞士 Roche 公司; 微生物全自动生长曲线分析仪, 芬兰 Oy Growth Curves Ab Ltd.; 透射电镜, 日本 HITACHI 公司。

1.3 培养基

脑心浸液培养基(Brain heart infusion, BHI), 北京陆桥生物技术有限公司; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

1.4 方法

1.4.1 *mdrL* 基因缺失菌株和回复突变株的构建与分子鉴定

以 EGD-e 基因组 DNA 为模板, 分别用 *mdrL*-A/*mdrL*-B 和 *mdrL*-C/*mdrL*-D 两对引物扩增 *mdrL* 基因的上、下游同源臂, 引物序列见表 1。利用重叠延伸 PCR (Splicing by overlap extension, SOE-PCR)技术^[11]融合上下游同源臂, 融合片段经切胶回收后与穿梭质粒 pMAD^[12]分别用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 同步双酶切。酶切产物经纯化后进行连接反应, 将构建好的重组质粒 pMAD- Δ *mdrL* 转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 将阳性转化株送至北京博迈德基因技术有限公司进行测序。

采用青霉素 G 法制备 EGD-e 感受态细胞^[13]。取 4 μ L 测序正确的重组质粒 pMAD- Δ *mdrL* 与 40 μ L 感受态细胞混匀、电击, 立刻加入 500 μ L BHI 培养基于 30 °C、150 r/min 培养 3 h。将菌液均匀涂布于含红霉素(5 μ g/mL)、IPTG 和 X-Gal 的 BHI 平

板上, 30 °C 培养 48 h。挑取蓝色单菌落于含红霉素(5 µg/mL)的 BHI 液体培养基, 39 °C、150 r/min 培养 24 h。稀释菌液选择合适梯度的稀释液涂布于含红霉素(5 µg/mL)、IPTG 和 X-Gal 的 BHI 平板上, 39 °C、150 r/min 培养 48 h。挑取蓝色单菌落于 BHI 液体培养基, 30 °C、150 r/min 培养 24 h。将菌液转接至新鲜的 BHI, 39 °C 培养。稀释涂布, 39 °C 培养 48 h。挑取白色单菌落用引物 *mdrLJC1*/*mdrLJC2* 进行 PCR 扩增检测缺失条带, 最终获得 Δ *mdrL* 突变株。

PCR 扩增含有启动子区域的 *mdrL* 基因, PCR 反应体系(50 µL): 5×PS buffer 10 µL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 µL, 10 µmol/L 上、下游引物各 3 µL, Prime STAR HS DNA polymerase 0.5 µL, DNA 1.5 µL, 超纯水补足 50 µL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 40 s, 48 °C 15 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物经 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切后与质粒 pERL3 连接, 转化至大肠杆菌 DH10B 中, 在含有红霉素(300 µg/mL)的 LB 平板上培养, 通过菌液 PCR 和质粒双酶切验证筛选出含有重组质粒 pERL3-*mdrL* 的阳性克隆, 将阳性转化株送至北京博迈德基因技术有限公司进行测序。将测序正确的重组质粒 pERL3-*mdrL* 电转至 Δ *mdrL* 感受态细胞中, 筛选得到回复突变株 C Δ *mdrL*。同时将质粒 pERL3 电转至 Δ *mdrL* 作为对照菌株(Δ *mdrL*-pERL3)。

1.4.2 药物敏感性试验

按照美国临床实验室标准协会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)推荐的琼脂稀释法测定菌株对 BC 的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)^[14]。每个样品重复 3 次。

1.4.3 生长曲线测定

利用微生物全自动生长曲线分析仪测定野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 在不同刺激下的生长曲线。每株菌分别挑取 5 个单克隆接种至 BHI 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养过夜。过夜培养物按 1:100 分别接种至新鲜的 BHI、BHI+BC (2 µg/mL)、BHI+利血平(20 µg/mL^[5])和 BHI+BC (2 µg/mL)+利血平(20 µg/mL)中, 然后取 300 µL 菌液转移至 100 孔

的检测板中, 37 °C 培养 48 h, 每隔 15 min 测定菌液的 OD_{600} 值。利用 DMFit 软件(英国食品研究所研发)拟合生长曲线^[15], 并计算细菌生长的迟滞期(Lag phase duration, LPD)、平均最大生长率(Mean maximum growth rate, MMGR)以及平均最大光密度值(Mean maximum optical density, MMOD)。

1.4.4 平板法检测菌株对 BC 的耐受性

挑取野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 接种于 BHI 液体培养基, 37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6。将菌液做 10 倍梯度稀释, 首先选取合适的稀释度用于菌落计数, 然后再选取 6 个连续的稀释度(10^{-2} – 10^{-7}), 从每个稀释度的菌液中吸取 1 µL 分别点接至含有不同浓度 BC (0、2、4 µg/mL)的 BHI 平板上, 37 °C 培养 24 h。

1.4.5 致死曲线测定

野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 在 37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6。分别取 3 mL 菌液 4 000×g 离心 5 min 弃上清后再加入 3 mL 含有 16 µg/mL BC 的 BHI 液体培养基, 重悬菌体。分别在加入 BC 后 0、10、20 和 30 min 时, 取 100 µL 菌液做梯度稀释, 取合适的稀释度涂布于 BHI 平板, 37 °C 培养 24 h。对 BHI 平板进行菌落计数并计算存活率。每个样品重复 3 次。

1.4.6 EB 积累和外排试验

野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 接种至 3 mL BHI 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养至对数中期, 离心(4 000×g, 5 min)收集细胞; PBS 洗涤 2 次; PBS 悬浮细胞至 OD_{600} 约为 0.3, 该菌悬液分别用于 EB 积累和外排试验。

EB 的积累: 向菌悬液中加入 EB (终浓度为 8 µg/mL), 置于实时荧光定量 PCR 仪, 选择激发波 533 nm, 发射波 572 nm, 37 °C 循环 60 次, 每个循环的第 51–60 s 采集信号^[16]。EB 的外排: 向菌悬液中加入 EB (8 µg/mL), 孵育 60 min。离心收集细胞, PBS 悬浮至 OD_{600} 约为 0.3。将菌液分为两组, 一组不做任何处理, 另一组的菌液中加入 1.8 mg/mL 的葡萄糖^[17]。每个样品重复 3 次。EB 外排试验的结

果以相对荧光值的方式表示,即每个时间点的荧光值与最大荧光值的比值。

1.4.7 细胞形态观察

将处于对数期的野生株和突变株用戊二醛(10%)进行固定,室温放置 2 h;离心收集细胞,用无菌水洗 2 次;加入 1 mL 无菌水悬浮细胞。取 5 μ L 菌液置于铜网上,孵育 2 min;然后滴加 5 μ L 磷钨酸染色 15 s,彻底晾干后上透射电镜观察。

1.4.8 数据分析

利用 Origin 8.5 软件对所得的实验数据进行双尾 t 检验分析。

2 结果与分析

2.1 外排抑制剂利血平对 EGD-e 生长的影响

在含有利血平的 BHI 培养基中,EGD-e 仍能生长(图 1A)。在含有 BC 的 BHI 培养基中,EGD-e 的 LPD 变长;而在此基础上加入利血平后,EGD-e 的生长完全受到抑制(图 1B)。结果表明,外排泵在 Lm 对 BC 耐受中起至关重要的作用。

2.2 *mdrL* 基因缺失株的构建与分子鉴定

通过 SOE-PCR 得到 1 235 bp 的上、下游同源臂融合片段,与预期结果一致(图 2A)。重组质粒 pMAD- Δ *mdrL* 经双酶切验证正确后电转至 EGD-e 感受态中(图 2B)。筛选得到的阳性菌株用检测引物只能扩增出 1 471 bp 的片段(图 2C)。测序结果表明已缺失 *mdrL* 基因获得 Δ *mdrL* 突变株。

2.3 *mdrL* 基因回复突变株的构建与分子鉴定

按照 1.4.1 的方法构建回复突变株,通过 PCR 扩增得到含启动子的 *mdrL* 基因,与预期结果一致(图 3A)。通过菌液 PCR 和质粒双酶切验证筛选出含有重组质粒 pERL3-*mdrL* 的阳性克隆(图 3B);测序结果显示,阳性克隆的序列与野生株 EGD-e 的完全一致,将重组质粒 pERL3-*mdrL* 电转至 Δ *mdrL* 感受态细胞中,筛选得到回复突变株 C Δ *mdrL*。同时将质粒 pERL3 电转至 Δ *mdrL* 作为对照菌株(Δ *mdrL*-pERL3)。

2.4 药物敏感性试验

野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 对 BC 的 MIC

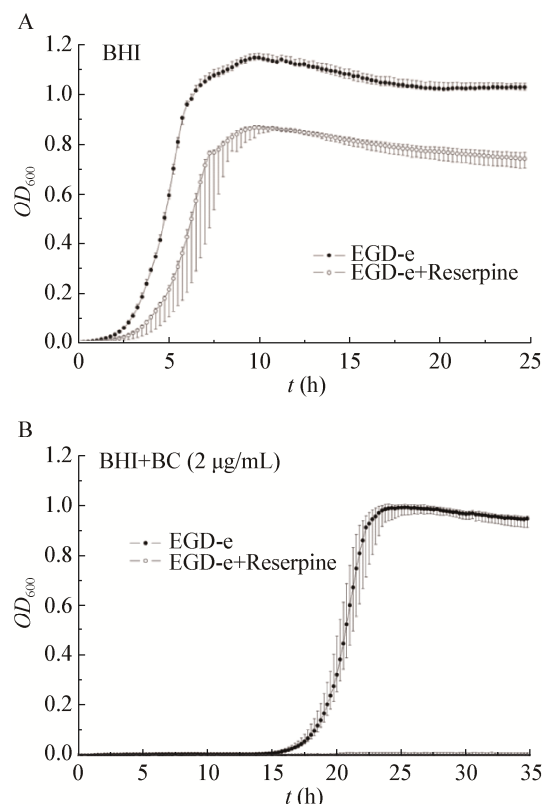


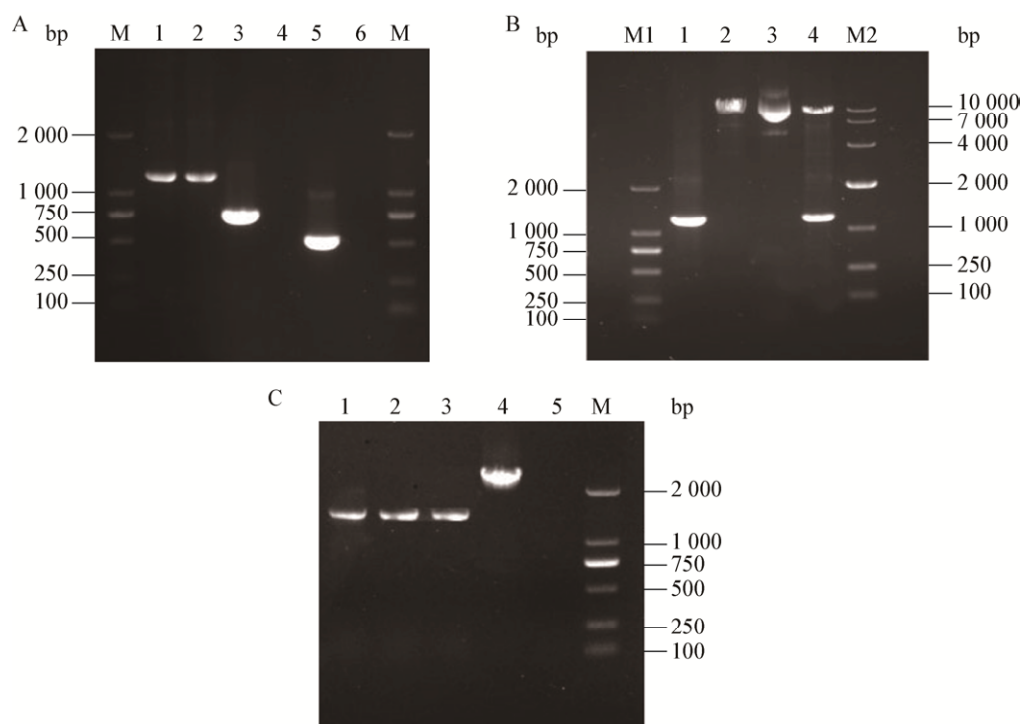
图 1 野生株 EGD-e 在利血平作用下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of wild-type strain EGD-e in the presence of reserpine

值均为 6 μ g/mL。*mdrL* 的缺失并不影响菌株对 BC 的 MIC 值,这与我们预期的结果不同,可能是由于琼脂稀释法的灵敏度低,不足以反映野生株和突变株在表型上的差异。

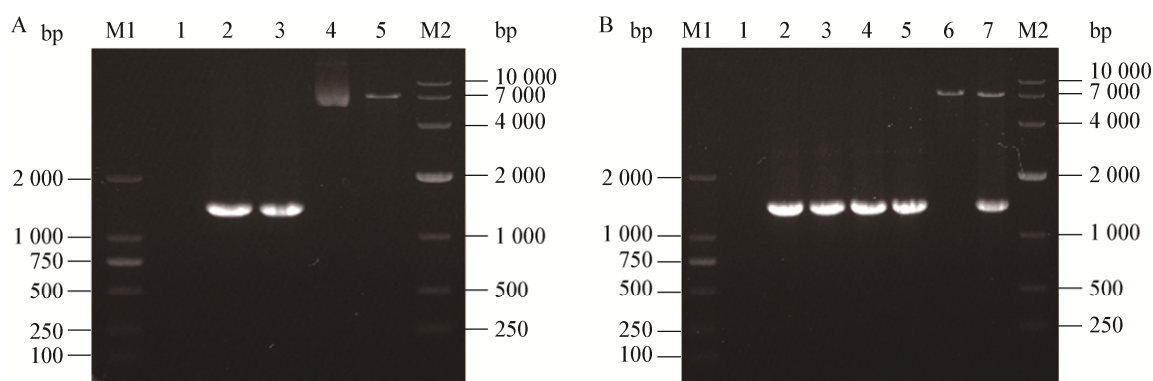
2.5 生长曲线分析

野生株 EGD-e 和突变株 Δ *mdrL* 在 BHI 培养基中的生长情况没有明显差异(图 4A)。然而加入 BC 后, Δ *mdrL* 的 LPD 明显变长,为 EGD-e 的 1.56 倍;而 Δ *mdrL* 的 MMGR 和 MMOD 则分别降低为 EGD-e 的 62% 和 80% (图 4B, 表 2)。以上结果表明 *mdrL* 基因与 Lm 在 BC 胁迫下的生长有关。将 *mdrL* 基因回补后,菌株在 BC 存在下的生长恢复至野生株的水平(图 4B);对照菌株 Δ *mdrL*-pERL3 的生长曲线与突变株相似(图 4)。这些结果表明突变株在 BC 胁迫下的生长缺陷只与 *mdrL* 基因的敲除有关,排除极性效应的影响。

图2 *mdrL* 基因缺失株的构建**Figure 2 Construction of the deletion mutant strain $\Delta mdrL$**

注: A: M: DL2000 marker; 1, 2: SOE-PCR 扩增产物; 3: *mdrL* 下游同源臂; 5: *mdrL* 上游同源臂; 4、6: 阴性对照. B: M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1: 融合片段; 2: pMAD 双酶切产物; 3: pMAD 质粒; 4: pMAD- $\Delta mdrL$ 双酶切产物. C: M: DL2000 marker; 1, 2: 阳性克隆; 3: $\Delta mdrL$ 阳性对照; 4: *mdrL* 阳性对照; 5: 阴性对照.

Note: A: M: DL2000 marker; 1, 2: Amplification of SOE-PCR; 3: Homologous arms down-stream of *mdrL*; 5: Homologous arms up-stream of *mdrL*; 4, 6: Negative control. B: M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1: Amplification of SOE-PCR; 2: Double digested pMAD; 3: pMAD plasmid; 4: Double digested pMAD- $\Delta mdrL$. C: M: DL2000 marker; 1, 2: Positive clone; 3: Positive control of $\Delta mdrL$; 4: Positive control of *mdrL*; 5: Negative control.

图3 *mdrL* 基因回复突变株的构建**Figure 3 Construction of the complemented strain $C\Delta mdrL$**

注: M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; A: 1: 阴性对照; 2、3: *mdrL* (含启动子); 4: pERL3 质粒; 5: pERL3 双酶切产物; B: 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3-5: 阳性克隆; 6: pERL3-*mdrL* 双酶切产物.

Note: M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; A: 1: Negative control; 2, 3: *mdrL* (containing promoter *mdrL* gene); 4: pERL3 plasmid; 5: Double digested pERL3; B: 1: Negative control; 2: Positive control; 3-5: Positive clone; 6: Double digested pERL3-*mdrL*.

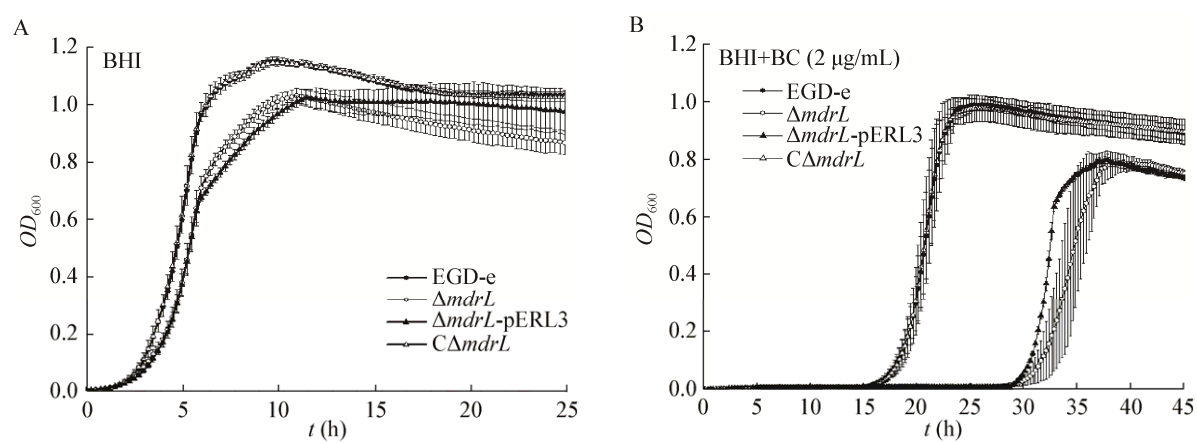


图 4 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 在 BC 作用下的生长曲线
Figure 4 Growth curves for wild-type strain EGD-e and mutant strain $\Delta mdrL$ in the presence of BC

表 2 生长曲线分析
Table 2 Analysis of growth curves

菌株 Strain	迟滞期 LPD (h)		平均最大生长率 MMGR (Units/h)		平均最大光密度值 MMOD (Units)	
	BHI	BC	BHI	BC	BHI	BC
EGD-e	3.240±0.096	18.740±0.063	0.342±0.015	0.259±0.007	1.150±0.010	0.990±0.018
$\Delta mdrL$	3.410±0.131	29.300±0.042**	0.242±0.011	0.161±0.004*	1.040±0.016	0.790±0.024****

注：*：与野生株 EGD-e 相比的差异显著性(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$).
Note: Significantly varied values compared to the corresponding value of the wild-type strain EGD-e are indicated by asterisks (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$).

2.6 平板法检测结果

经检测，野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 的初始菌液的菌落总数分别为 2.41×10^{11} CFU/mL 和 1.94×10^{11} CFU/mL，两者数值相近。由图 5 可知，在 BHI 平板上，野生株和突变株均能正常生长；BC 的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时，野生株和突变株的生长没有表现出明显差异；BC 的浓度提高至 4 $\mu\text{g/mL}$ 时，野生株和突变株的生长显现出明显的差异(稀释倍数大于 10^4 时肉眼无法观察到突变株的生长)。

2.7 致死曲线分析

致死浓度 BC (16 $\mu\text{g/mL}$) 作用下,野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 的存活率表现出明显差异(图 6)。BC 作用 30 min 后，野生株和突变株的平均存活率分别为 1.96% 和 0.006 5%。与野生株相比，突变株在 BC 刺激下的存活能力显著降低。

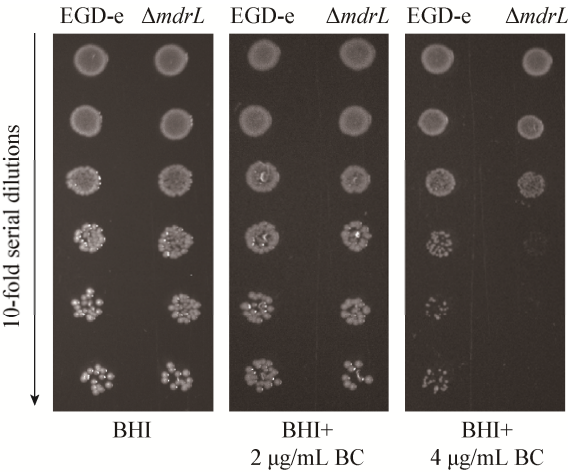


图 5 平板法检测野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 对 BC 的敏感性
Figure 5 Determination of BC susceptibility of wild-type strain EGD-e and mutant strain $\Delta mdrL$ using the plate-based assay

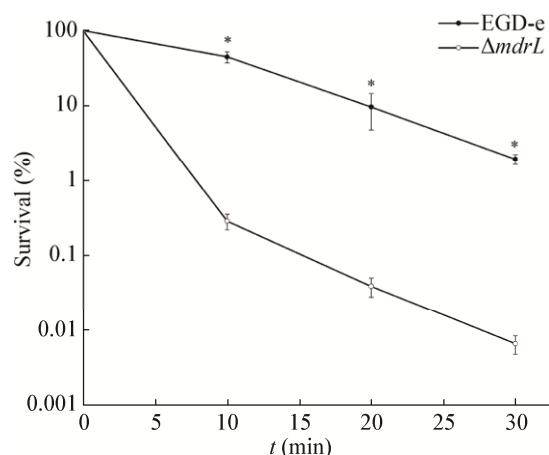


图6 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 在 BC (16 $\mu\text{g/mL}$) 作用下的致死曲线

Figure 6 Kill curves of wild-type strain EGD-e and mutant strain $\Delta mdrL$ exposed to 16 $\mu\text{g/mL}$ of BC

2.8 EB 的积累和外排

野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 对 EB 的积累无明显差异(图 7A)。不加葡萄糖时,野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 对 EB 的外排不明显;葡萄糖的加入提高了菌株对 EB 的外排能力,并且野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 对 EB 的外排能力几乎一致(图 7B)。结果表明, MdrL 外排泵与 EGD-e 对 EB 的积累和外排无关。

2.9 细胞形态观察

由图 8 可知,无 BC 刺激时,野生株 EGD-e 与突变株 $\Delta mdrL$ 的形态无明显差异(图 8A、B)。加入 BC 后,野生株 EGD-e 的细胞形态无明显变化(图 8C);而突变株 $\Delta mdrL$ 的细胞明显变细长(图 8D)。

3 讨论与结论

外排泵属于膜转运蛋白,在细菌中广泛存在。除了参与细胞的正常物质运输和代谢,外排泵还能够去除细菌细胞和胞膜中的有害物质,帮助细菌抵御外界不良环境的影响。研究表明,一些外排泵可以把抗生素、消毒剂、重金属等作为底物排出菌体外使细菌产生耐药性^[5,8]。目前,研究者普遍认为外排泵是介导 Lm 对 BC 耐受的主要机制^[9]。许多文献报道,加入外排抑制剂利血平(利血平是一种具有降血压活性的小分子生物碱,对革兰氏阳性菌的外

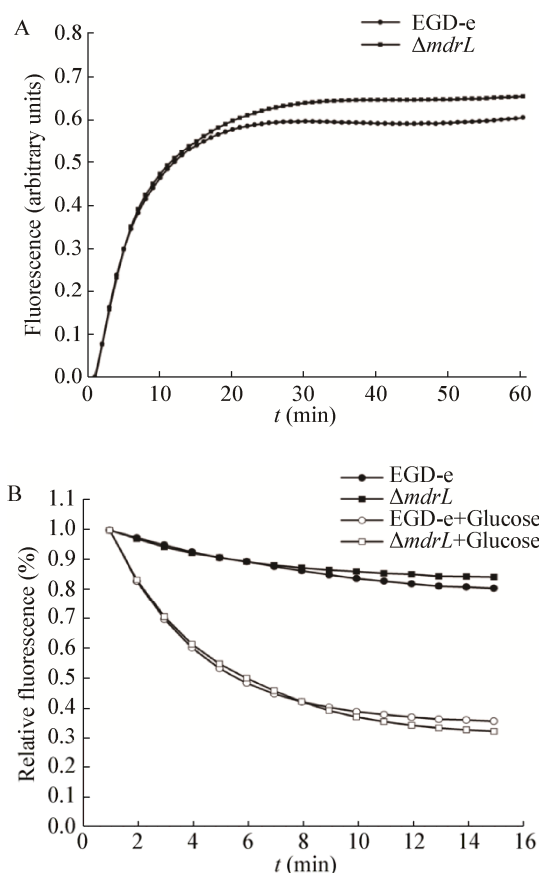


图7 EB 积累和外排

Figure 7 Accumulation and efflux of EB

排系统具有较好的抑制作用)后, Lm 对 BC 的 MIC 值会出现不同程度的下降^[5,18-19]。在本研究中,利血平的存在能够完全抑制 EGD-e 在亚致死浓度 BC 胁迫下的生长,表明外排泵在 Lm 对 BC 的耐受中起重要作用。

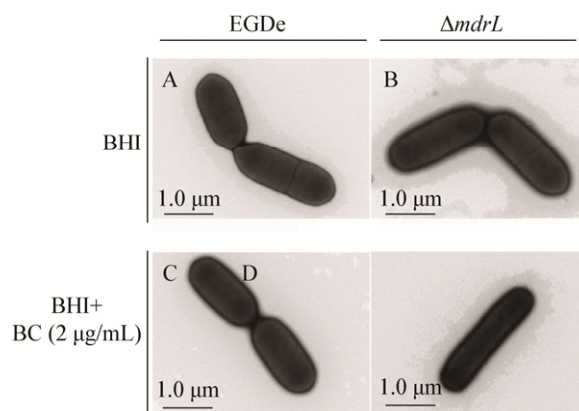


图8 细胞形态观察结果

Figure 8 Electron micrographs of the cell morphology

Tamburro 等^[10]研究发现, 在 BC 刺激下 *mdrL* 基因的表达量明显增高, 表明 MdrL 外排泵可能与 Lm 对 BC 的耐受有关。由 *mdrL* 基因编码的多重耐药外排泵 MdrL 属于细菌外排系统中常见的主要易化子超家族(Major facilitator superfamily, MFS), 是一种自足型多药外排转运蛋白^[20]。为了明确 MdrL 外排泵在 Lm 对 BC 耐受中的作用, 本研究利用同源重组技术构建 EGD-e 的 *mdrL* 基因缺失菌株 $\Delta mdrL$ 。药敏结果显示, *mdrL* 基因缺失前后菌株 EGD-e 对 BC 的 MIC 值没有变化。我们推测这可能是由于琼脂稀释法的灵敏度不足以反映野生株和突变株在表型上的差异。因此, 本研究又通过其它技术手段检测野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 在 BC 刺激下的生长情况。由生长曲线结果可知, 在亚致死浓度 BC (2 $\mu\text{g/mL}$) 作用下, 与野生株相比, 突变株的 LPD 明显变长, MMGR 和 MMOD 均降低, 表明 *mdrL* 基因与 Lm 在 BC 胁迫下的生长有关。回复突变株在 BC 存在下的生长恢复至野生株的水平, 表明本研究中构建的突变株为非极性突变, 即突变株在 BC 存在下的生长缺陷是由于 *mdrL* 基因的缺失所致, 与极性效应无关。平板法的结果显示, BC 的浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 时, 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 的生长显现出明显的差异。在致死浓度 BC 作用下, 与野生株相比, 突变株的存活率降低 2 个 log 值。此外, 本研究还利用透射电镜观察 BC 刺激前后野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 的细胞形态。加入 BC 后, 突变株 $\Delta mdrL$ 的细胞明显变细长。以上这些结果表明 MdrL 外排泵介导 Lm 对 BC 的耐受。值得注意的是, 敲除 *mdrL* 后, Lm 菌株在 BC 刺激下的生长并没有完全受到抑制, 这表明除了 MdrL 外排泵, 可能还有其他外排泵与 BC 的耐受有关。

Mata 等^[21]利用同源重组技术构建 LO28 的 *mdrL* 基因插入失活突变株, 并命名为 LOMT1。与野生株 LO28 相比, 突变株 LOMT1 对 EB 的积累量增加, 同时对 EB 的外排能力明显降低, 表明 EB 是 MdrL 外排泵的底物, *mdrL* 基因的缺失影响菌株

对 EB 的外排能力。而本研究的结果显示, 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta mdrL$ 对 EB 的积累和外排无明显差异, 表明 MdrL 与 EB 的外排无关, 这与先前的报道^[21]截然不同。本研究与 Mata 等^[21]的研究存在两个不同点: (1) 所用菌株不同。Mata 等^[21]以 LO28 为研究对象, 而本研究则使用 EGD-e; (2) 构建突变体的方法不同。Mata 等^[21]构建了 *mdrL* 基因插入失活突变体, 而本研究则通过缺失 *mdrL* 基因中一段序列来构建敲除突变体, 实现读码框内敲除(In-frame deletion)。这两点可能是导致本研究与前人研究结果不同的原因。

本研究以 Lm 标准菌株 EGD-e 为研究对象, 通过构建 *mdrL* 基因缺失突变株和回复突变株调查 MdrL 外排泵在 Lm 对 BC 耐受中的作用。生长曲线、平板法、致死曲线以及透射电镜的结果表明, MdrL 外排泵介导 Lm 对 BC 的耐受。EB 积累和外排试验结果表明, MdrL 与 Lm 对 EB 的外排无关。

REFERENCES

- [1] Sagrario O, Pilar L, Victoria L, et al. Antibiotic susceptibility in benzalkonium chloride-resistant and -susceptible *Listeria monocytogenes* strains[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 517-519
- [2] Gerba CP, Müller V. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 464-469
- [3] Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, et al. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health?[J]. Microbial Drug Resistance, 2010, 16(2): 91-104
- [4] Arslan F, Meynet E, Sunbul M, et al. The clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis of neuroinvasive listeriosis: a multinational study[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(6): 1213-1221
- [5] Xu DY, Li YL, Zahid MSH, et al. Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 190: 24-30
- [6] Martínez-Suárez JV, Ortiz S, López-Alonso V. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 638
- [7] Bisbiroulas P, Psylou M, Iliopoulou I, et al. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(3): 275-280

- [8] Guérin F, Galimand M, Tuambilangana F, et al. Overexpression of the novel MATE fluoroquinolone efflux pump FepA in *Listeria monocytogenes* is driven by inactivation of its local repressor FepR[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106340
- [9] Jiang XB, Yu T, Liang Y, et al. Efflux pump-mediated benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from retail food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 141-145
- [10] Tamburro M, Ripabelli G, Vitullo M, et al. Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2015, 40: 31-39
- [11] Zhao C, Zhao J, Wang W, et al. Expression of MLAA34-HSP70 fusion gene constructed by SOE-PCR[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30(3(Special)): 1125-1127
- [12] Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6887-6891
- [13] Guo L, Chen GW, Xie MM, et al. Construction and biological activity of a strain of *Listeria monocytogenes* deleted for positive regulatory factor a gene (prfA)[J]. Food Science, 2017, 38(10): 12-17 (in Chinese)
郭亮, 陈国薇, 谢曼曼, 等. 单增李斯特菌 prfA 基因缺失菌株的构建及其生物学特性鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 12-17
- [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[R]. CLSI Document M100-S21, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [15] Zhang PP, Liu Y, Fang C, et al. Comparison of growth models of *Listeria monocytogenes* in chilled pork[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1625-1631 (in Chinese)
张培培, 刘媛, 方春, 等. 单增李斯特菌在冷鲜猪肉中的生长预测模型比较[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1625-1631
- [16] Paixão L, Rodrigues L, Couto I, et al. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Engineering, 2009, 3: 18
- [17] Aase B, Sundheim G, Langsrud S, et al. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 62(1/2): 57-63
- [18] Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8231-8238
- [19] Rakic-Martinez M, Drevets DA, Dutta V, et al. *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8714-8721
- [20] Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(8): 629-636
- [21] Mata MT, Baquero F, Pérez-Díaz JC. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 187(2): 185-188