

研究报告

鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因缺失株的构建及其对抗生素敏感性分析

王文静 徐军 高海侠 李锐 王瑞 张瑞良 李琳*

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】沙门菌的多重耐药现象日渐严重,对其耐药机理的研究尤为迫切,双组分系统与细菌耐药性密切相关。【目的】构建鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因缺失株及回补株,探究双组分系统 BaeSR 对鼠伤寒沙门菌耐药性的影响。【方法】以鼠伤寒沙门菌体外诱导耐药株 CR 为研究对象,通过自杀质粒 pLP12 介导的同源重组方法,以氯霉素抗性标记和阿拉伯糖诱导的致死基因 *vmt* 进行正、反向双重筛选,获得基因缺失株 CR Δ *baeSR*,并将重组表达质粒 pBAD-*baeSR* 转化于 CR Δ *baeSR* 构建回补株 CR C Δ *baeSR*。采用微量肉汤稀释法测定 11 种常见代表药物对野生株、缺失株及回补株的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC),并测定 3 株菌的生长曲线、运动性及生物膜形成能力。【结果】与野生株相比,环丙沙星(CIP)、恩诺沙星(ENR)、沙拉沙星(SAR)、头孢噻唑(CEF)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、安普霉素(APR)对缺失株的 MIC 值有所下降;缺失株的生长速率稍显缓慢,且最终浓度也相对较低,但并无统计学上的显著差异($P>0.05$);缺失株的运动性($P<0.05$)及生物膜形成能力($P<0.01$)均显著下降。【结论】鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因缺失后,可通过影响其运动性及生物膜形成能力而对抗生素的敏感性产生影响。

关键词:鼠伤寒沙门菌,双组分系统 BaeSR,基因敲除,耐药性

Construction of *baeSR* gene knock-out in *Salmonella typhimurium* and analysis of its sensitivity to antibioticsWANG Wen-Jing XU Jun GAO Hai-Xia LI Rui WANG Rui ZHANG Rui-Liang
LI Lin*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] The multi-drug resistance of *Salmonella* is becoming more and more serious. It is particularly urgent to study the mechanism of antibiotic resistance in *Salmonella*. The two-component system (TCS) is closely related to bacterial antibiotic resistance. [Objective] The *baeSR* gene deletion and complementary strains of *Salmonella typhimurium* were carried out to study the effect of BaeSR on antibiotic resistance in *S. typhimurium*. [Methods] *S. typhimurium* selected *in vitro* to obtain ciprofloxacin-resistant

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772802); Anhui University Natural Science Key Research Project (KJ2017A132)

*Corresponding author: E-mail: lilinah@126.com

Received: 28-12-2018; Accepted: 15-03-2019; Published online: 28-03-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31772802); 安徽高校自然科学基金重点研究项目(KJ2017A132)

*通信作者: E-mail: lilinah@126.com

收稿日期: 2018-12-28; 接受日期: 2019-03-15; 网络首发日期: 2019-03-28

strain CR, and take it as the study object, deleted mutants CR Δ *baeSR* were obtained by homologous recombination mediated by suicide plasmid pLP12. And we used chloramphenicol and arabinose-induced *vmt* toxicity gene for selecting. In addition, the complementary strains of CR C Δ *baeSR* were generated through transformation of a recombinant expression plasmid of pBAD-*baeSR* into CR Δ *baeSR*. And minimum inhibitory concentration (MIC) of 11 antibiotics against CR, CR Δ *baeSR* and CR C Δ *baeSR* strains was determined by broth microdilution method. Growth curve, migration ability and biofilm formation ability of three strains were also measured. **[Results]** The results showed that the MICs of CIP, ENR, SAR, CEF, GEN, AMK, APR were lower than those of wild strains; The growth rate of CR Δ *baeSR* was slightly slower than CR, and the final concentration was relatively low, but there was no significant difference ($P>0.05$). The migration ability ($P<0.05$) and biofilm formation ability ($P<0.01$) of CR Δ *baeSR* decreased significantly. **[Conclusion]** The deletion of *baeSR* gene in *S. typhimurium* can affect the ability of migration and biofilm-forming to affect the sensitivity to antibiotics.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Two-component system BaeSR, Gene knock-out, Antibiotic resistance

沙门菌(*Salmonella*)是重要的人畜共患病病原菌,在自然界广泛存在。由于抗生素的不合理使用及复杂的耐药机制^[1],其多重耐药(Multidrug resistanc, MDR)现象日趋严重。新近有研究表明,双组分信号转导系统(Two-component system, TCS)与细菌的致病性、耐药性密切相关,被认为是具有应用潜力、可降低耐药性和毒力的抗菌作用新靶点^[2]。在沙门菌中,调控耐药性的 TCS 有 CpxAR、PhoPQ 和 BaeSR^[3-4],而 BaeSR 在鼠伤寒沙门菌中研究较少。BaeSR 由定位在细胞膜上的组氨酸蛋白激酶(Histidine kinase, HK) BaeS 和胞浆中与 DNA 结合的反应调节因子(Response regulator, RR) BaeR 组成^[5],在膜压力作用下,活化的 BaeS 导致 BaeR 磷酸化,从而激活相关基因转录^[6]。

研究表明, BaeSR 能够调节外排系统 AcrD 和 MdtABC 的过表达而增加沙门菌的 MDR,在 *mdt-bae* 操纵子和 *acrD* 下游发现与 *baeR* 盒相似的序列, *baeR* 蛋白可以与该序列结合,表明 *baeR* 直接调节 *mdt-bae* 操纵子及 *acrD* 的表达^[7]。此外, *baeR* 能激活多功能通道蛋白基因 *tolC* 的表达,但在 *tolC* 基因下游区域没有发现类似 *baeR* 的共有序列,表明 *baeR* 可能间接激活 *tolC* 的表达^[8]。除此之外, BaeSR 通过对外排泵基因 *adeA* 和 *adeB* 的正调节影响鲍曼不动杆菌对替加环素的敏感性^[9]。在 AcrAB 缺失的情况下, BaeSR 激活 YegMNOB (MdtABCD)

转运蛋白基因簇在大肠杆菌中的转录并增加其对新霉素和脱氧胆酸(Deoxycholate)的抗性^[10]。但在鼠伤寒沙门菌中, BaeSR 具体对哪些耐药基因具有调控作用及其调控机制均有待阐明,在单一药物诱导耐药株中对 BaeSR 的研究尚未见报道。

因此,为探究双组分系统 BaeSR 对鼠伤寒沙门菌的耐药调控机制,本研究采用自杀质粒介导的同源重组技术^[11],对体外诱导 CIP 耐药株(CR)的 *baeSR* 基因进行敲除,并构建回补重组质粒,接合到缺失株中构建回补株 CR C Δ *baeSR*。初步分析 *baeSR* 缺失前后鼠伤寒沙门菌对抗菌药物的敏感性变化、生长特性、运动性和生物膜形成能力,为进一步研究 BaeSR 对沙门菌耐药性的调控机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

自杀质粒 pLP12、回补表达质粒 pBAD、*E. coli* DH5 α λ pir、*E. coli* β 2163 感受态细胞均购自广州诺晶生物科技有限公司;鼠伤寒沙门菌 CIP 耐药株(CR)、*E. coli* ATCC 25922 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;2,6-二氨基庚二酸(DAP)、D-Glucose、L-阿拉伯糖购自 Sigma-Aldrich

公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司; 11 种抗菌药物均购自中国兽医药品监察所。PCR 仪购自 Bio-Rad 公司; 稳压稳流定时电泳仪购自北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; 超微量紫外/可见分光光度计购自 Quawell 公司。LB 液体培养基购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中公布的鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因序列, 分别设计 *baeSR* 的上、下游同源臂引物 *baeSR*-MF1/MR1 和 *baeSR*-MF2/MR2 (*baeSR*-MF1 5'端携带自杀质粒 pLp12 基因序列; *baeSR*-MR2 5'端携带自杀质粒 pLp12 基因的反向互补序列; *baeSR*-MR1 和 *baeSR*-MF2 反向互补), 同时设计质粒引物 pLP-UF/UR 用于构建重组质粒检测, 根据 *baeSR* 上、下游基因设计 *baeSR*-TF/TR 用于缺

失检测; 构建及检测回补株的引物 RP4-F2/R2、*baeSR*-RF/RR、pBAD-ZF/ZR 及 pBAD-mcf-TF/TR, 引物序列见表 1。

1.2.2 *baeSR* 上、下游同源臂的扩增

以鼠伤寒沙门菌 CR 的菌液为模板, 用引物 *baeSR*-MF1/MR1 和 *baeSR*-MF2/MR2 分别进行 PCR 扩增, 获得 *baeSR* 上游和下游同源臂片段。PCR 反应体系(50 μ L): PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μ L, 引物 F/R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 1 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖进行凝胶电泳后回收纯化。以上、下游同源臂片段为模板, *baeSR*-MF1/MR2 为引物进行 Overlap PCR 扩增(模板 50–100 ng), Overlap PCR 反应体系(50 μ L): PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μ L, 引物 F/R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 上游同源臂 A 0.5 μ L (50–100 ng), 下游同源臂 B 0.5 μ L

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 The primers sequence used in this study

引物 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
<i>baeSR</i> -MF1	GGAATCTAGACCTTGAGTCGGAATGAAGCGGATTGTGGTGC (suicide plasmid pLp12 gene sequence)	527
<i>baeSR</i> -MR1	GCGTATAAATGACTGTTCGGCATCGATCGCCAGAAACAGCTTGCC	
<i>baeSR</i> -MF2	GGCAAGCTGTTTCTGGCGATCGATGCCGAACAGTCATTTATACGC	527
<i>baeSR</i> -MR2	<u>ACAGCTAGCGACGATATGTCAGCGCACAGGATAAACATGAGGA</u> (reverse sequence of suicide plasmid pLp12 gene)	
pLP-UF	GACACAGTTGTAACGGTCCA	1 304/250 ^a
pLP-UR	CAGGAACACTTAACGGCTGAC	
<i>baeSR</i> -TF	AGCGGTATGCTGCCGTTTATGA	1 241/3 238 ^b
<i>baeSR</i> -TR	GTCATCGCCACCCAGCTTT	
RP4-F2	CGAATTGGGTACCAGCGCTT	273
RP4-R2	TACCGTCGACGCCGCCAGC	
<i>baeSR</i> -RF	TGGGCTAGCGAATTCGAGCTAGGAGGAATTCACCATGAACAAAACC	2 177
<i>baeSR</i> -RR	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGTTAGAAGTAATAAGTTGTGCC	
pBAD-ZF	CTAGAGTCGACCTGCAGGCA	5 529
pBAD-ZR	AGCTCGAATTCGCTAGCCCA	
PBAD-mcf-TF	CCATAAGATTAGCGGATCCTACCT	2 281
PBAD-mcf-TR	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAG	

注: ^a: 重组质粒检测, 阳性克隆 1 304 bp, 空载 250 bp; ^b: 缺失检测, 缺失突变株为 1 241 bp, 野生株为 3 238 bp。

Note: ^a: Primer pLP-UF/UR used to test recombination plasmid, positive clones 1 304 bp and the no-load plasmid 250 bp; Primer *baeSR*-TF/TR used to test deletion mutants (1 241 bp) and wild type (3 238 bp).

(50–100 ng), ddH₂O 22 μL。反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 68 °C 20 s, 72 °C 30 s, 7 个循环; 98 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收纯化, 获得融合片段 AB。

1.2.3 pLP12-*baeSR* 重组质粒的构建及鉴定

用重组酶 ExnaseTM II (ClonExpress II, Vazyme) 将 AB 纯化片段与自杀质粒 pLP12 进行无缝克隆连接, 37 °C 恒温水浴 30 min。待反应完成后, 立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min, -20 °C 储存待转化。

采用化学转化法将重组产物转化至 *E. coli* DH5α λpir 感受态细胞, 涂布于含有 20 μg/mL 氯霉素和 0.3% D-Glucose 的 LB 固体平板, 37 °C 培养过夜。随机挑取转化子, 于 5 mL LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜, 以菌液为模板, 以 pLP-UF/pLP-UR 为引物进行 PCR 扩增, 筛选 AB 插入的重组克隆 pLP12-*baeSR*-DH5α λpir。PCR 反应体系(25 μL): 2×PCR mix 12.5 μL, 引物 F/R (10 μmol/L)各 1 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min 30 s; 94 °C 30 s, 54 °C 25 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖进行凝胶电泳(后续所有克隆检测均以该体系及条件进行), 将鉴定正确的阳性克隆纯化后扩大培养, 并提取质粒 pLP12-*baeSR*, -20 °C 保存。

1.2.4 pLP12-*baeSR*-β2163 的制备

将 pLP12-*baeSR* 转化到 *E. coli* β2163 感受态细胞, 转化产物涂布于含 20 μg/mL 氯霉素、0.3 mmol/L DAP 和 0.3% D-Glucose 的 LB 固体培养基, 挑取阳性克隆, 划线纯化培养, 命名为 pLP12-*baeSR*-β2163。

1.2.5 缺失突变株的构建及鉴定

挑大肠杆菌 pLP12-*baeSR*-β2163 与鼠伤寒沙门氏菌 CR 单菌落, 分别于 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜, 进行接合试验。各取 100 μL 菌液混合, 10 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体沉淀以等量 LB 重悬, 再离心, 去掉上清, 加入 10 μL LB

重悬, 涂布于含 0.3 mmol/L DAP 和 0.3% D-Glucose 的 LB 固体培养基, 37 °C 培养 6 h, 挑取平板上的单菌落于同等条件 5 mL LB 液体培养基中扩大培养, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体沉淀, 以 1 mL LB 重悬。取 100 μL 涂布于含 20 μg/mL 氯霉素和 0.3% D-Glucose 的 LB 固体培养基上。挑取纯化后的单克隆扩大培养, 以野生株为对照, 以 *baeSR*-MF1/*baeSR*-MR2 为引物, 对克隆进行 PCR 检测(插入突变 1 054 bp, 野生株 3 051 bp), 将阳性插入突变株命名为 pLP12-*baeSR*-CR。

将 pLP12-*baeSR*-CR 接种于含 0.3% D-Glucose 的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 划线于含 0.4% L-阿拉伯糖的 LB 固体培养基, 37 °C 培养过夜, 挑取平板上的克隆扩大培养后按照天然细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 以野生株为对照, 用引物 *baeSR*-TF/*baeSR*-TR 进行 PCR 检测, 并将 PCR 产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.6 回补株的构建及鉴定

参照 1.2.5, 将缺失株与含有回补质粒 pBAD 的 *E. coli* β2163 进行接合, 以 RP4-F2/RP4-R2 为引物对克隆进行检测, 确定回补表达质粒 pBAD (273 bp) 可于缺失株基因组中复制; 以鼠伤寒沙门菌 CR 的基因组为模板, 以 *baeSR*-RF/*baeSR*-RR 为引物扩增 *baeSR* 基因表达片段(2 177 bp); 以 pBAD 质粒为模板, 以引物 pBAD-ZF/pBAD-ZR 进行扩增获得 pBAD 载体片段(5 529 bp); 将纯化的 *baeSR* 基因扩增片段与 pBAD 载体扩增片段进行无缝克隆连接, 构建重组质粒 pBAD-*baeSR*; 将其转化于 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 转化产物涂布含 20 μg/mL 氯霉素的 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 以引物 pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 筛选重组克隆进行 PCR 鉴定(2 281 bp); 提取质粒转化到 *E. coli* β2163 中, 转化产物涂布含 20 μg/mL 氯霉素和 0.3 mmol/L DAP 的 LB 固体培养基, 与缺失株 CRΔ*baeSR* 进行接合, 以含有 20 μg/mL 氯霉素的 LB 抗性平板筛选克隆, 以 pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 为引物进行 PCR 检测(2 281 bp), 并

将 PCR 产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.7 最小抑菌浓度试验

CIP 等抗菌药物 MIC 值的测定参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗菌药物敏感性试验操作标准^[12],微量肉汤稀释法测定 11 种抗菌药物的 MIC 值, *E. coli* ATCC 25922 为质控菌, 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.8 生长曲线的测定

挑取野生株、缺失株及回补株的单菌落, 于 2 mL LB 培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养 12–14 h, 以此作为母液。将母液调整至相同的 OD_{600} 值, 分别取 100 μ L 接种于 5 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 用微量紫外/可见分光光度计分别测定培养 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 时间点菌液的 OD_{600} 值。根据 OD_{600} 值绘制出 3 株菌的生长曲线, 比较生长曲线的差异。

1.2.9 运动性的测定

使用 LB 半固体培养基进行运动性的测定试验。挑取野生株、缺失株及回补株的单菌落, 于 5 mL LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜至菌液 OD_{600} 为 1.0, 蘸取菌液扎在 LB 半固体培养基(0.3% 琼脂)中心, 正置于培养箱中 37 °C 恒温培养 16 h, 测量菌圈直径, 比较差异。试验平行 3 次, 用 SPSS 软件对数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 即有统计学意义。

1.2.10 生物膜形成能力的测定

参照文献^[13], 在无菌 96 孔细胞培养板加入 OD_{600} 值为 0.2 的野生株、缺失株及回补株菌液各 200 μ L, 每株菌 3 个平行, 用等量的 LB 液体培养基作为对照, 置于湿盒 37 °C 培养 36 h。弃去菌液和培养液, 甲醇固定 15 min, 无菌 PBS 洗 3 次, 自然风干; 每孔加 200 μ L 0.5% 结晶紫染色 30 min, PBS 洗 3 次, 自然风干, 每孔加 200 μ L 乙酸溶解 30 min, 用酶标仪测定 OD_{570} 值。试验平行 3 次, 用 SPSS 软件对数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 即有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *baeSR* 基因上、下游同源臂及融合片段的扩增

以鼠伤寒沙门菌 CR 的 DNA 为模板, 用引物 *baeSR*-MF1/MR1 和 *baeSR*-MF2/MR2 分别进行 PCR 扩增, 获得 *baeSR* 基因上游(片段 A, 527 bp)和下游(片段 B, 527 bp)同源性 DNA 片段, 割胶纯化 PCR 产物后经 Overlap PCR 扩增, 获得融合片段 AB (1 054 bp), 见图 1。

2.2 重组自杀质粒的构建及鉴定

pLP-UF/pLP-UR 筛选 AB 插入的重组克隆, 阳性克隆为 1 304 bp, 空载 250 bp, 见图 2。

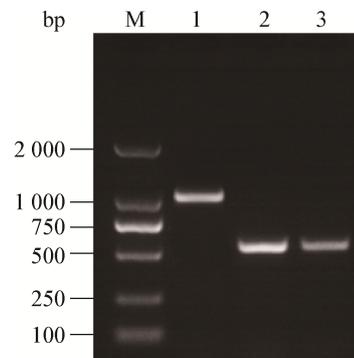


图 1 上、下游同源臂 Overlap PCR 扩增结果

Figure 1 Gene knock-out target fragment synthesized by fusion PCR

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 上下游融合片段 AB; 2: 上游同源臂 A; 3: 下游同源臂 B.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Homologous arm AB; 2: Upstream homologous arm A; 3: Downstream homologous arm B.

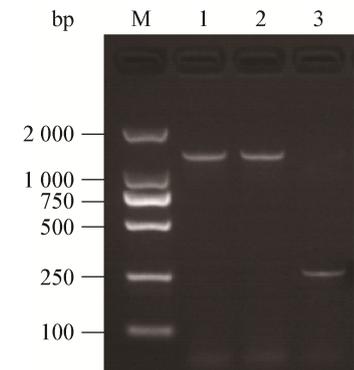


图 2 pLP12-*baeSR* 重组质粒构建检测结果

Figure 2 PCR using primers pLP-UF/UR to test the recombination plasmid pLP12-*baeSR*

注: M: DL2000 DNA marker; 1、2: 阳性重组克隆; 3: 空载质粒.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1, 2: pLP12-*baeSR*; 3: pLP12.

2.3 缺失株的构建及鉴定

挑取纯化后单克隆液体培养, 提取基因组, 以引物 *baeSR*-TF/*baeSR*-TR 进行检测, 以野生株为对照, 正确的缺失突变克隆扩增产物片段大小为 1 241 bp, 野生株扩增片段大小为 3 238 bp, 见图 3。

2.4 回补株的构建及鉴定

将 *baeSR* 基因扩增后克隆于载体 pBAD 中, 构建重组表达质粒 pBAD-*baeSR*, 将其转化于 CR Δ *baeSR* 后获得回补菌株 CR C Δ *baeSR*。以缺失株为对照,

以 pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 为引物进行 PCR 检测, 阳性克隆大小为 2 281 bp, 见图 4。

2.5 最小抑菌浓度试验结果

以 *E. coli* ATCC 25922 为质控菌进行药物敏感性试验。结果显示, 在所测定的 11 种药物中, 缺失株 CR Δ *baeSR* 与野生株 CR 相比, 环丙沙星(CIP)、恩诺沙星(ENR)、沙拉沙星(SAR)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、安普霉素(APR)的 MIC 值分别降低为野生株的 1/2, 头孢噻呋(CEF)的 MIC 值降低为野生株的 1/4, 其他药物的 MIC 值未出现变化(表 2)。

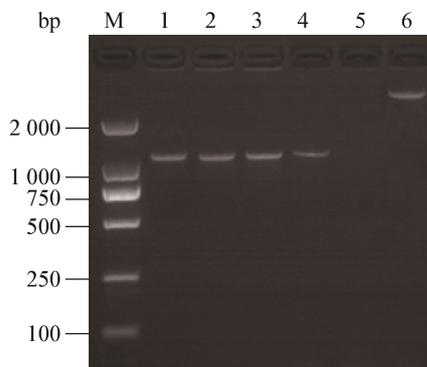


图 3 *baeSR* 缺失突变株检测结果

Figure 3 PCR using primers *baeSR*-TF/*baeSR*-TR to test deletion mutants and wild type

注: M: DL2000 DNA marker; 1-4: 缺失突变株; 5: pLP12-*baeSR*- β 2163; 6: 野生株.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-4: Deletion mutants; 5: pLP12-*baeSR*- β 2163; 6: Wild type.

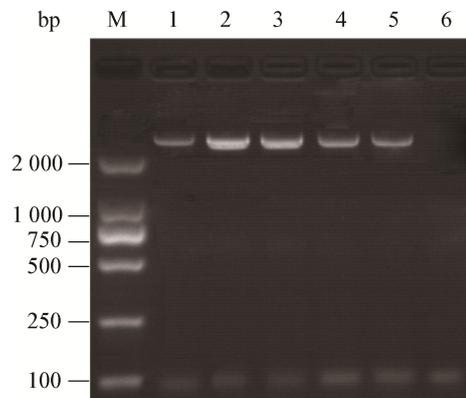


图 4 *baeSR* 回补株检测结果

Figure 4 PCR using primers pBAD-mcf-TF/TR to test complementary strains

注: M: DL2000 DNA marker; 1-5: 回补株; 6: 缺失株.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-5: Complementary strains; 6: Deletion strain.

表 2 *baeSR* 基因缺失株对 11 种临床常用代表药物敏感性检测

Table 2 The susceptibilities of *baeSR* deleted strain to 11 antibiotics (MIC, μ g/mL)

菌株 Strains	CIP	ENR	SAR	CEF	CRO	AMP	AMX	GEN	AMK	APR	FFC
ATCC 25922	0.01	0.01	0.01	0.25	0.10	2.00	1.00	0.25	0.50	2.00	2.00
CR	32.00	32.00	16.00	4.00	<0.25	4.00	2.00	4.00	1.00	4.00	2.00
CR Δ <i>baeSR</i>	16.00	16.00	8.00	1.00	<0.25	4.00	2.00	2.00	0.50	2.00	2.00
CR C Δ <i>baeSR</i>	32.00	32.00	16.00	4.00	<0.25	2.00	2.00	4.00	1.00	4.00	2.00

注: CIP: 环丙沙星; ENR: 恩诺沙星; SAR: 沙拉沙星; CEF: 头孢噻呋; CRO: 头孢曲松; AMP: 氨苄西林; AMX: 阿莫西林; GEN: 庆大霉素; AMK: 阿米卡星; APR: 安普霉素; FFC: 氟苯尼考.

Note: CIP: Ciprofloxacin; ENR: Enrofloxacin; SAR: Sarafloxacin; CEF: Ceftiofur; CRO: Ceftriaxone sodium; AMP: Ampicillin; AMX: Amoxicillin; GEN: Gentamicin; AMK: Amikacin; APR: Apramycin sulfate; FFC: Florfenicol.

2.6 生长曲线测定结果

在相同条件下培养细菌,测得的野生株、缺失株及回补株的生长曲线如图 5 所示,结果显示缺失株较野生株的生长速率稍显缓慢,最终浓度也相对较低,但并无统计学上的显著差异($P>0.05$)。

2.7 运动性测定结果

对野生株、缺失株及回补株的运动性进行测定,对其运动直径进行测量。图 6 结果显示,缺失株的运动性与野生株和回补株相比均显著下降($P<0.05$);回补株运动能力较缺失株有所回升,但与野生株相比无显著差异($P>0.05$)。

2.8 生物膜形成能力测定结果

对野生株、缺失株及回补株的生物膜形成能力进行测定,图 7 结果显示,缺失株的生物膜形成能力与野生株和回补株相比均显著下降($P<0.01$);回补株生物膜形成能力较缺失株有所回升,但与野生株相比无显著差异($P>0.05$)。

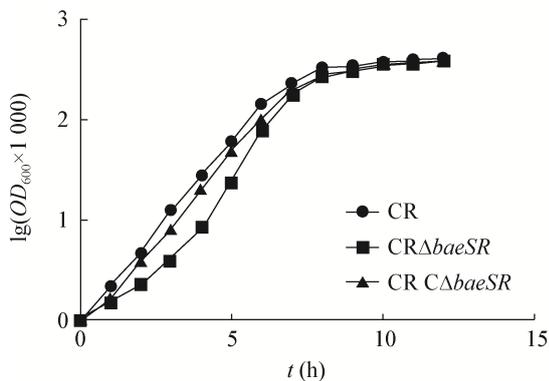


图 5 野生株、缺失株及回补株的生长曲线测定结果
Figure 5 The growth curve of CR, CRΔbaeSR and CR CΔbaeSR

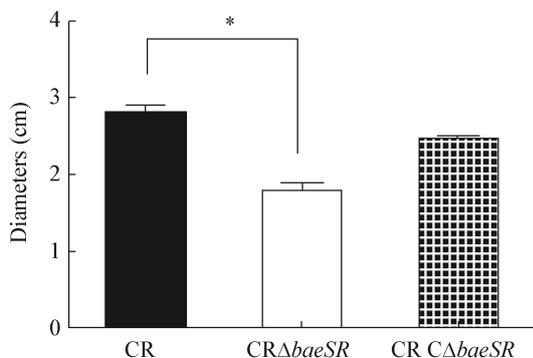


图 6 野生株、缺失株及回补株的运动性测定结果
Figure 6 The migration assay of CR, CRΔbaeSR and CR CΔbaeSR

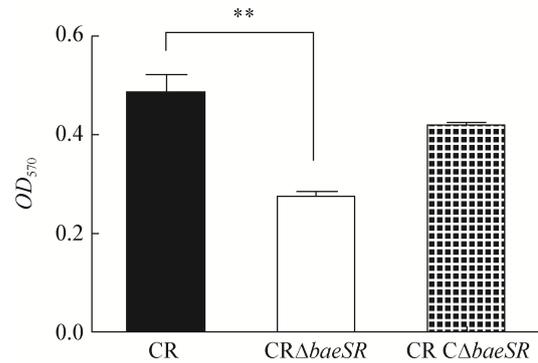


图 7 野生株、缺失株及回补株的生物膜形成能力测定结果

Figure 7 The biofilm forming ability of CR, CRΔbaeSR and CR CΔbaeSR

3 讨论与结论

基因敲除是从基因水平研究基因功能常用的方法, Red 同源重组系统、CRISPR-Cas9 及自杀质粒介导的同源重组是最常见的基因敲除手段。其中, Red 同源重组方法操作简单, 但需要 3 种质粒协同提供外源 Red 重组所需要的 3 个蛋白, 且某些敲除菌株对外源 DNA 吸收量不足, 电转化也会导致细胞大量死亡。CRISPR-Cas9 具有制作简单、成本低、作用高效等特点, 但由于大多数原核细胞缺乏非同源末端连接修复系统, 且人工进行同源重组时常有质粒残留, 因此限制了该技术在原核生物中的广泛应用^[14-15]。利用自杀质粒进行同源重组不仅可快速敲除目的基因, 而且可不引入任何外源片段, 避免了外源基因对缺失株的影响。

本研究所选的 pLP12 自杀质粒可利用细菌自身广泛存在的 RecBCD 系统对外源 DNA 进行同源重组, 仅需一段同源区即可定位, 实现目标基因的等位替换, 使重组载体的构建过程更为简单、方便。以往用于基因敲除过程中反向筛选的 *sacB* 基因在同源重组中常发生突变失活导致重组效率低, 而 pLP12 携带的毒性基因 *vmt* 具有较大的细胞毒性, 在 L-阿拉伯糖诱导下进行表达, 使得重组失败的菌体死亡, 大大减少了第二次重组后缺失突变克隆的筛选工作^[11]。此外, *E. coli* β2163 具有高效的供体

菌接合系统,适用范围广泛^[16],本研究采用细菌接合试验代替电转化的方法将重组质粒导入目的菌株,接合转移率高,避免了传统的电转化导致细胞大量死亡的问题。本研究试验结果表明自杀质粒 pLP12 和 *E. coli* β 2163 可协同高效介导鼠伤寒沙门菌的基因敲除,为后续研究该菌的基因功能提供了试验基础。

在沙门菌中,双组分系统 BaeSR 通过调节 SodA 的启动子区域调节其对 CIP 的耐药性^[17],当 *baeR* 过表达时,对 CIP 的耐药值上升;Nishino 等^[7]研究表明,*baeR* 的过表达会增强沙门菌对 β -内酰胺类的抗性;Hu 等^[18]在耐药沙门菌 *baeSR* 基因缺失株中观察到,CEF、CRO 的 MIC 值分别下降为野生株的 1/32 和 1/1 024。在本研究中,*baeSR* 基因缺失后,对氟喹诺酮类 CIP、ENR、SAR 的耐药值均下降为野生株的 1/2,对 β -内酰胺类 CEF 的耐药值下降为野生株的 1/4,但是对同类 CRO 的耐药值无明显变化,这可能与野生株的耐药背景有关。除此之外,缺失株对所选氨基糖苷类药物的耐药值均下降为野生株的 1/2。在 *baeSR* 基因回补后,这些抗菌药物的 MIC 值基本回到对野生株的水平,但 AMP 的 MIC 值未回到原始水平,这可能是由于在构建回补株时采用 pBAD 回补质粒,而 *baeSR* 基因的表达与回补质粒的表达有关。

细菌生物膜(Bacterial biofilm, BF)是由细菌自身分泌的具有粘连作用的大分子组成,可将菌体与外部不利环境隔绝,使细菌耐药性增强^[19]。本研究中,*baeSR* 基因缺失后生物膜形成能力显著下降,可能是导致其抗生素耐受能力降低的重要原因。此外,有研究报道鞭毛在生物膜的形成中具有复杂的作用机制,鞭毛的运动性对生物膜的形成具有促进或抑制的双重作用^[20-21]。本研究结果显示,*baeSR* 基因缺失后鼠伤寒沙门菌运动能力显著降低,说明 *baeSR* 可调控生物膜形成能力及运动能力来影响其耐药性。

在沙门菌的 9 个功能性药物外排泵中,*acrB* 是 MDR 形成最重要的外排泵,有研究报道 *acrB* 的存

在会掩盖其他外排泵的作用^[22]。在本试验中,*baeSR* 对多重耐药的调控可能因 *acrB* 的存在而未完全表达。因此,在后续试验中我们将对 *acrB* 进行敲除,进一步研究双组分系统 BaeSR 对耐药性的影响。

本研究中鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因缺失后,氟喹诺酮类 CIP、ENR、SAR, β -内酰胺类 CEF,以及氨基糖苷类 GEN、AMK、APR 的 MIC 值降低;运动性和生物膜形成能力均显著下降。*baeSR* 基因回补后,所选抗菌药物的 MIC 值、运动性及生物膜形成能力均有所上升,表明 *baeSR* 可通过影响鼠伤寒沙门菌的运动性及生物膜形成能力而影响其耐药性,这为深入研究双组分系统 BaeSR 对沙门菌耐药性提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(4): 901-937
- [2] Li M, Li GH, Yuan L. Advances in the study of two-component systems in common nosocomial pathogens and their role in drug resistance[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2016, 11(8): 760-764,10002 (in Chinese)
李猛,李冠华,苑琳. 医院常见病原菌双组分系统在耐药机理方面的研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(8): 760-764,10002
- [3] Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, et al. Evolution of two-component signal transduction[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(12): 1956-1970
- [4] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 183-215
- [5] Raffa RG, Raivio TL. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(6): 1599-1611
- [6] Leblanc SKD, Oates CW, Raivio TL. Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(13): 3367-3375
- [7] Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(24): 9066-9075
- [8] Rosner JL, Martin RG. Reduction of cellular stress by TolC-dependent efflux pumps in *Escherichia coli* indicated by BaeSR and CpxARP activation of *spy* in efflux mutants[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(5): 1042-1050
- [9] Lin MF, Lin YY, Yeh HW, et al. Role of the BaeSR

- two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 119
- [10] Baranova N, Nikaido H. The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (15): 4168-4176
- [11] Min J, Wang KY, Liu T, et al. Construction and identification of *invF* gene deleted *Yersinia ruckeri* and its biological characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1858-1866 (in Chinese)
闵洁, 汪开毓, 刘韬, 等. 鲁氏耶尔森菌 *invF* 基因无痕缺失突变株的构建及生物学特性[J]. *水产学报*, 2017, 41(12): 1858-1866
- [12] CLSI. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-third informational supplement[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013
- [13] Kim Y, Oh S, Park S, et al. *Lactobacillus acidophilus* reduces expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors by inhibiting autoinducer-2-like activity[J]. *Food Control*, 2008, 19(11): 1042-1050
- [14] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [15] Yu SY, Zhao JR, Zheng LH, et al. The application of CRISPR/Cas 9 technology for *aroA* gene knockout in *Escherichia coli*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(4): 762-770 (in Chinese)
- 余深翼, 赵金荣, 郑玲红, 等. 利用 CRISPR/Cas 9 技术构建大肠杆菌 *aroA* 基因的敲除系统及其初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(4): 762-770
- [16] Luo P, He XY, Liu QT, et al. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, *vmi480*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144465
- [17] Guerrero P, Collao B, Álvarez R, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BaeSR two-component system positively regulates *sodA* in response to ciprofloxacin[J]. *Microbiology*, 2013, 159: 2049-2057
- [18] Hu WS, Chen HW, Zhang RY, et al. The expression levels of outer membrane proteins STM1530 and OmpD, which are influenced by the CpxAR and BaeSR two-component systems, play important roles in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(8): 3829-3837
- [19] Mah TF, Pitts B, Pellock B, et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance[J]. *Nature*, 2003, 426(6964): 306-310
- [20] Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, et al. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(2): 361-367
- [21] Kim TJ, Young BM, Young GM. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5466-5474
- [22] Eaves DJ, Ricci V, Piddock LJ. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: role in multiple antibiotic resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(4): 1145-1150