

研究报告



VirAB 在单核细胞增生李斯特菌耐药性及生物被膜形成中的作用

耿忆敏¹ 任思雨¹ 于涛² 姜晓冰^{*1}¹ 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007² 新乡学院生命科学技术学院 河南 新乡 453000

摘要:【背景】单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)对一些临床常用抗生素、乳酸链球菌素(Nisin)等抗菌药物的敏感性下降,然而其背后的机制仍未完全阐明。【目的】调查转运蛋白VirAB在Lm对抗菌药物的耐药性及生物被膜形成中的作用。【方法】利用同源重组技术构建Lm基因缺失突变株,比较野生株和缺失株对抗菌药物的耐药性;利用微孔板法观测突变株生物被膜形成能力的变化;利用平板泳动法研究菌株的泳动能力。【结果】与野生株相比, *virAB* 缺失突变株对头孢类抗生素、Nisin和溴化乙锭的敏感性增加;当培养基中分别添加亚致死浓度的苯扎氯铵、卡那霉素和四环素时,突变株均表现出不同程度的生长缺陷。缺失 *virAB* 后菌株形成生物被膜的能力下降。【结论】VirAB在Lm对头孢类等抗菌药物的耐药及生物被膜形成方面具有重要作用。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌, VirAB, 耐药性, 生物被膜

Role of VirAB in antimicrobial resistance and biofilm formation of *Listeria monocytogene*

GENG Yimin¹ REN Siyu¹ YU Tao² JIANG Xiaobing^{*1}¹ College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian, Henan 453007, China² School of Life Sciences and Technology, Xinxian University, Xinxian, Henan 453000, China

Abstract: [Background] Reduced susceptibility has been found in *Listeria monocytogenes* to antimicrobial agents such as several clinical commonly used antibiotics and nisin. However, mechanisms behind this are still unclear. [Objective] To study the role of VirAB transporter in resistance to antimicrobial agents and biofilm formation of *L. monocytogenes*. [Methods] Gene deletion mutants were constructed by homologous recombination, and resistance to antimicrobial agents was determined in the wild-type and mutant strains. The ability of biofilm formation was measured using the microplate method. Swimming motility of these strains was investigated by plate migration method. [Results] The mutant

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31601568); Youth Talent Left Project of Henan Province (2020HYTP049); Cultivation Fund of the National Scientific Research Project of Henan Normal University (20200148)

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

Received: 20-02-2020; **Accepted:** 29-03-2020; **Published online:** 30-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31601568); 河南省青年人才托举项目(2020HYTP049); 河南师范大学国家级科研项目培育基金(20200148)

***通信作者:** Tel: 0373-3326340; E-mail: jxb841001@163.com

收稿日期: 2020-02-20; **接受日期:** 2020-03-29; **网络首发日期:** 2020-07-30

strain $\Delta virAB$ showed increased sensitivity to cephalosporin, nisin and ethidium bromide compared to the wild-type strain; the mutant strain exhibited varying degrees of growth defects in the presence of sub-lethal concentrations of benzalkonium chloride, kanamycin and tetracyclines. Decreased ability of biofilm formation was observed in $\Delta virAB$. **[Conclusion]** VirAB plays an important role in resistance to antimicrobial agents and biofilm formation of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, VirAB, resistance, biofilm

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一种革兰氏阳性短杆菌,易对肉、蛋、奶制品等食品造成污染,被认为是一种重要的食源性致病菌^[1]。摄入被 Lm 污染的食品可能会引起李斯特菌病(Listeriosis),该病具有较高的致死率^[2]。Lm 对不利环境的适应能力很强,能在低温、酸、高盐以及长时间干燥等条件下生存和繁殖,增加食品在加工和保藏环节中被其污染的风险^[3]。

细菌转运蛋白(Transport Proteins)属于膜蛋白,主要参与营养物质的摄入、代谢产物的释放以及信号转导等生理活动^[4]。其中,ABC 转运蛋白家族是一大类膜转运蛋白,在细菌中广泛存在,通常由通透酶和 ATP 结合蛋白组成,能够利用 ATP 水解产生的能量将与其结合的底物转运出质膜。ABC 转运蛋白家族中的一些成员可以把抗生素、消毒剂等抗菌药物排出胞外,从而介导细菌多重耐药^[5]。

经转运蛋白数据库(<http://www.membranetransport.org/>)检索可知,Lm 标准菌株 EGD-e 中存在 172 个可能的 ABC 转运蛋白,其中仅有少数几个的生理功能已知^[6-8]。早期的研究显示,在 Lm 菌株 LM-49 中一个可能的 ABC 转运蛋白与生物膜的形成有关^[9]。经序列比对可知,该蛋白的氨基酸序列与 EGD-e 的 Lmo1746 和 Lmo1747 同源。如图 1 所示, *lmo1746* 编码的 ABC 转运蛋白通透酶 VirB 由 659 个氨基酸组成,包含 10 个跨膜结构域; *lmo1747* 编码 ATP 结合蛋白 VirA。除了可能参与 Lm 生物膜的形成, VirAB 的其他功能仍然未知。因此,本实验在前人研究的基础上探究 ABC 转运蛋白 VirAB 在 Lm 标准菌株 EGD-e 对抗菌药物耐药、生物膜的形成及运动性中的作用。

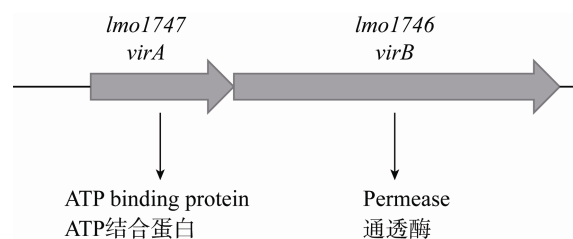


图 1 *virA/virB* 基因结构图

Figure 1 *virA/virB* gene structure diagram

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒信息

Lm 标准菌株 EGD-e 由华中师范大学罗勤教授惠赠;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自新乡市普金生物技术有限公司;大肠杆菌 HB101 和质粒 pPL2 由芬兰赫尔辛基大学 Hannu Kokeala 教授惠赠;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(Benzalkonium Chloride, BC), 国药集团化学试剂有限公司; 溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)、DL2000 DNA Marker, 北京索莱宝科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, RealMaster Mix (SYBR Green)试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 高保真 PCR 酶和 dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司; 细菌 RNA 提取试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶、胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶, 赛默飞世尔科技公司; 引物由河南尚亚生物技术有限公司合成。

基因扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 电热恒温培养箱, 北京科伟永兴仪器有限公司; 离心机, Sigma 公司; 凝胶成像分析系统、电转仪、酶标仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, ABI

公司; 微生物全自动生长曲线分析仪, Oy Growth Curves Ab 有限公司; 倒置显微镜, Leica 公司。

1.3 培养基

脑心浸液培养基(Brain Heart Infusion, BHI), 广东环凯微生物科技有限公司; LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Tryptic Soy Broth, TSB), 北京索莱宝科技有限公司; ALOA 培养基, 北京缔一生物科技有限公司; BHI+BC 培养基: BHI 液体培养基中添加 BC 至终浓度为 2 µg/mL。

1.4 方法

1.4.1 基因缺失突变株的构建

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 Lm 野

生株 EGD-e 的基因组, 以 EGD-e 基因组 DNA 为模板分别扩增 *virA*、*virB* 和 *virAB* 的上游和下游同源臂, 引物序列见表 1。利用重叠延伸 PCR (Splicing by Overlap Extension PCR, SOE-PCR)^[10]技术分别融合 3 个基因的上、下游同源臂, 融合得到的长片段依次经切胶回收、双酶切及纯化后, 与穿梭质粒 pMAD^[11]进行连接反应。利用热激法将构建完成的重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性转化株并送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

使用青霉素 G 法制备 EGD-e 感受态细胞^[12]。将测序完全正确的重组质粒电转至 EGD-e 感受态细胞, 利用红霉素抗性筛选缺失突变株。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物长度 Sizes (bp)	备注 Remark
1746-1	<i>CGGGATCCTATGCTCCATTACATTTGCTT (BamH I)</i>	49	705	<i>virB</i> 上游同源臂
1746-2	GGGCTTTATTCATTACTTGGTGGGCTTTATTCATTACTTGGT			<i>virB</i> upstream homology arm
1746-3	GATTTCTTTTTCAGTAACCCCAAGTAATGAATAAAGCCC	49.7	549	<i>virB</i> 下游同源臂
1746-4	<i>CGGAATTCATTTTTGCGGATGAACCC (EcoR I)</i>			<i>virB</i> downstream homology arm
1746-5	NNNNNN <i>CTAGATT</i> ACTTTTTATTGGCCATCACAATT (<i>BamH I</i>)	54	2 184	<i>virB</i> 回复序列
1746-6	NNNNNNGGATCCAAAGGACTCTCTCAAGCAAAAG (<i>Xba I</i>)			<i>virB</i> palindrome sequence
1747-1	NNNNNNGGATCCACCAAGTAATGAATAAAGCCC (<i>BamH I</i>)	50	547	<i>virA</i> 上游同源臂
1747-2	AACGTAACGGGAGGAATACAATTTTTCGGGATGAACCC			<i>virA</i> upstream homology arm
1747-3	GGGTTCATCCGCAAAAATTGTATTCTCCCGTTACGTT	51	559	<i>virA</i> 下游同源臂
1747-4	NNNNNNACGCGTAGTTGTTTACTTTGGATGGC (<i>Mlu I</i>)			<i>virA</i> downstream homology arm
1747-5	NNNNNNGGTACCTTAAATAACATCGTTTTTCGCCACC (<i>Kpn I</i>)	55	927	<i>virA</i> 回复序列
1747-6	NNNNNNGGATCCCTTGAATGGAAATCTTTGTGGAAAA (<i>BamH I</i>)			<i>virA</i> palindrome sequence
1746/1747-1	NNNNNNGGATCCCTCACGACTTACAATGCTACCT (<i>BamH I</i>)	50	589	<i>virAB</i> 上游同源臂
1746/1747-2	AACGTAACGGGAGGAATACATTGGCTTTTGTGGTTATTC			<i>virAB</i> upstream homology arm
1746/1747-3	GAAATAACCACAAAAGCCAATGTATTCCTCCCGTTACGTT	50	559	<i>virAB</i> 下游同源臂
1746/1747-4	NNNNNNACGCGTAGTTGTTTACTTTGGATGGC (<i>Mlu I</i>)			<i>virAB</i> downstream homology arm
1746/1747-5	NNNNNNGGTACCTTACTTTTTATTGGCCATCACAATT (<i>Kpn I</i>)	54	2 896	<i>virAB</i> 回复序列
1746/1747-6	NNNNNNGGATCCCTTGAATGGAAATCTTTGTGGAAAA (<i>BamH I</i>)			<i>virAB</i> palindrome sequence

注: 斜体部分序列表示保护碱基; 下划线部分表示酶切位点

Note: Italic partial sequence indicates protective bases; Underlined part indicates enzyme digestion site

1.4.2 回复突变株的构建

利用回复引物 1746-5/1746-6、1747-5/1747-6 和 1746/1747-5、1746/1747-6 进行 PCR^[13]扩增基因全长及启动子区域,扩增产物经双酶切后与 pPL2 质粒连接,重组质粒转化至大肠杆菌 DH101 中。以阳性转化子为供体菌,缺失突变株为受体菌进行接合转移,在含有氯霉素(7.5 $\mu\text{g/mL}$)的 ALOA 平板上筛选接合子,经 PCR 验证后最终获得回复突变株。同时将质粒 pPL2 按照上述办法转化至缺失突变株作为对照菌株。

1.4.3 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)推荐的琼脂稀释法检测实验菌株对抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)值^[14]。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 检测基因转录水平

将 EGD-e 菌液平均分为 2 组,一组不加任何药物作为对照,另一组加入头孢噻肟(2 $\mu\text{g/mL}$), 37 °C、120 r/min 继续培养 30 min。按照细菌 RNA 提取试剂盒的使用说明提取细菌总 RNA,利用微量分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度后-80 °C 保存备用。将提取的细菌总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 作为模板,使用 RealMaster Mix (SYBR Green)试剂盒进行实时荧光定量 PCR^[15]。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行基因转录水平的分析。

1.4.5 生长曲线分析

从冻存管中挑取实验菌株在 BHI 固体平板上划线,待长出明显的菌落后,分别挑取 3 个不同的单克隆接种至 BHI 液体培养基中 37 °C、120 r/min 培养过夜。吸取菌液按 1:100 的比例分别转接至 BHI 和 BHI+BC (2 $\mu\text{g/mL}$)液体培养基中,然后再转移至 100 孔蜂窝板中。利用微生物全自动生长曲线仪测定菌液的 OD_{600} 值。利用 DMFit 软件(英国食品研究所研制)^[16]拟合出生长曲线,并计算菌株生长的迟滞期(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)。

1.4.6 点板法测定菌株对卡那霉素和四环素的药物敏感性

具体方法参照徐雅梦等^[4]的报道进行:将野生株 EGD-e 和突变株的培养物分别做 10 倍比梯度稀释,选取若干个连续稀释度的菌液分别点接至不含抗生素的 BHI 平板和含有不同浓度抗生素的 BHI 平板上,37 °C 培养 24 h。

1.4.7 微孔板法检测菌体的生长和生物被膜的形成

具体方法参照 Djordjevic 等^[17]的报道进行:将菌株培养至对数早期(OD_{600} 值约为 0.4),100 倍稀释后取 200 μL 加入到 96 孔微孔板中,37 °C 分别培养 24、48、72 h 后,首先用酶标仪测定菌液 OD_{600} 值,然后小心弃去孔中的培养基,经草酸铵结晶紫溶液染色、95%的乙醇溶液脱色后,用酶标仪检测其 OD_{570} 值,同时置于倒置显微镜下观察拍照。

1.4.8 菌株泳动性检测

将野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 接种至 3 mL BHI 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养过夜。将配制好的半固体胰酪大豆胨液体培养基(TSB)平板倒置,待其水分晾干。将菌液稀释 100 倍后,吸取 1 μL 稀释液点在 TSB 平板上,25 °C 静置培养 48 h,观察菌落的形成情况。

1.4.9 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 基因缺失株的构建与分子鉴定

由图 2 可见,利用 lmo1746/1747-1/4 引物对,以疑似 $\Delta virAB$ 突变株的基因组为模板扩增得到 1 148 bp 的短片段;利用 lmo1746-1/4 引物对,以疑似 $\Delta virB$ 突变株的基因组为模板扩增得到 1 253 bp 的短片段;利用 lmo1747-1/4 引物对,以疑似 $\Delta virA$ 突变株的基因组为模板扩增得到 1 106 bp 的短片段。测序结果表明这些疑似突变株均为敲除成功的基因缺失株。

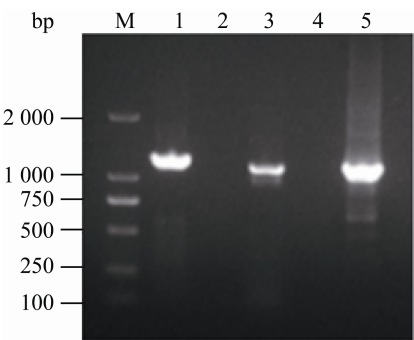


图 2 PCR 检测基因缺失突变株
Figure 2 Determination of the deletion mutant strains by PCR
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: $\Delta virB$; 2、4: 阴性对照;
3: $\Delta virA$; 5: $\Delta virAB$
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: $\Delta virB$; 2, 4: Negative control;
3: $\Delta virA$; 5: $\Delta virAB$

2.2 药物敏感性试验

与野生株 EGD-e 相比, 3 株缺失株对头孢噻肟、头孢噻吩、头孢吡肟、乳酸链球菌素(Nisin)和 EB 的 MIC 值均下降 1/2, 对头孢他啶的 MIC 值下降 1/4 (表 2), 表明 VirAB 参与 Lm 对头孢类抗生素、Nisin 和 EB 的耐药。

2.3 回复突变株的构建与分子鉴定

构建的 $\Delta virAB$ 、 $\Delta virB$ 、 $\Delta virA$ 回复突变株分别命名为 $C\Delta virAB$ 、 $C\Delta virB$ 、 $C\Delta virA$ 。这 3 株回复突变株对头孢噻肟、头孢噻吩、头孢他啶、头孢吡肟、Nisin 和 EB 的 MIC 值恢复至野生株的水平(表 3), 表明本研究中构建的基因缺失株为非极性突变, 排除极性效应的影响。

2.4 实时荧光定量 PCR 数据

在头孢噻肟的作用下, $virAB$ 在野生株 EGD-e

表 2 野生株 EGD-e 和突变株对抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC 值, $\mu\text{g/mL}$)

Table 2 MICs of antimicrobial agents against the wild-type EGD-e and the gene deletion mutant strains ($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物 Antimicrobial agent	菌株 Strain			
	EGD-e	$\Delta virAB$	$\Delta virB$	$\Delta virA$
抗生素 Antibiotic				
氨苄西林 Ampicillin	1	1	1	1
头孢噻肟 Cefotaxime	8	4	4	4
头孢噻吩 Cephalothin	8	4	4	4
头孢他啶 Ceftazidime	16	4	4	4
头孢吡肟 Cefepime	4	2	2	2
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.5	0.5	0.5	0.5
卡那霉素 Kanamycin	2	2	2	2
四环素 Tetracycline	0.5	0.5	0.5	0.5
氯霉素 Chloramphenicol	4	4	4	4
抗菌肽 Antimicrobial peptide				
乳酸链球菌素 Nisin	12.5	6.25	6.25	6.25
染料 Dye				
溴化已锭 Ethidium bromide	20	10	10	10
消毒液 Disinfectant				
苯扎氯铵 Benzalkonium chloride	6	6	6	6

中的相对转录水平显著提高 8.58 倍($P<0.05$), 表明 $virAB$ 的转录受到头孢噻肟的诱导。

2.5 生长曲线分析

为了进一步调查 $virAB$ 在 Lm 对 BC 耐药中的作用, 对 EGD-e 和 $\Delta virAB$ 在 BC 胁迫下的生长曲线进行分析。结果显示, 无 BC 时 2 种菌株的生长情况一致(图 3A); BC 胁迫不仅使 $\Delta virAB$ 的 LPD 明显变长, 为 EGD-e 的 1.71 倍, 还使 $\Delta virAB$ 的 MMGR 和 MMOD 则分别降低为 EGD-e 的 44%和 41%(图 3B, 表 4)。

表 3 菌株对头孢类抗生素、乳酸链球菌素、溴化乙锭的 MIC 值

Table 3 MICs of cephalosprins, nisin and EB against strains ($\mu\text{g/mL}$)

菌株 Strain	头孢噻肟 Cefotaxime	头孢噻吩 Cephalothin	头孢他啶 Ceftazidime	头孢吡肟 Cefepime	乳酸链球菌素 Nisin	溴化已锭 EB
EGD-e	8	8	16	4	12.5	20
$C\Delta virAB$	8	8	16	4	12.5	20
$C\Delta virB$	8	8	16	4	12.5	20
$C\Delta virA$	8	8	16	4	12.5	20
$\Delta virAB$ pERL3	4	4	4	2	6.25	10
$\Delta virB$ pERL3	4	4	4	2	6.25	10
$\Delta virA$ pERL3	4	4	4	2	6.25	10

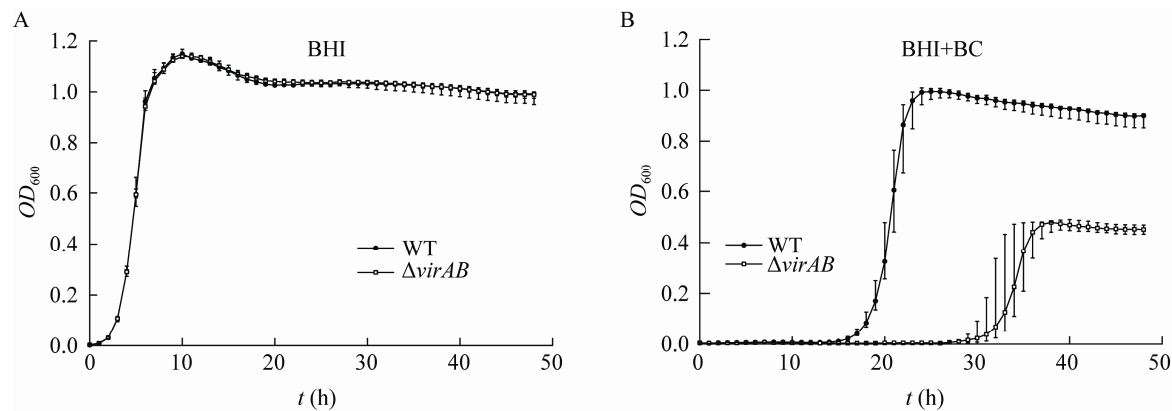


图 3 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 的生长曲线
Figure 3 Growth curves for the wild-type EGD-e and the mutant $\Delta virAB$

注：A：野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 在 BHI 中的生长曲线；B：野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 在 BHI+BC 中的生长曲线
Note: A: Growth curves for the wild-type EGD-e and the mutant $\Delta virAB$ in BHI; B: Growth curves for the wild-type EGD-e and the mutant $\Delta virAB$ in BHI+BC

表 4 生长曲线分析
Table 4 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	3.27±0.192	18.63±0.063	0.349±0.034	0.255±0.016	1.15±0.013	1.14±0.011
$\Delta virAB$	3.22±0.197	31.87±0.093*	0.336±0.032	0.112±0.004*	1.10±0.093	0.47±0.021*

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

2.6 点板法检测结果

经平板计数可知野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 初始菌液的菌落总数分别为 2.25×10^{11} CFU/mL 和 1.79×10^{11} CFU/mL，两者数值相近。由图 4 可知，在 BHI 固体平板上，EGD-e 和 $\Delta virAB$ 均能正常生长；在含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的平板上，EGD-e 和 $\Delta virAB$ 的生长显现出差异(稀释倍数大于 10^4 时肉眼无法观察到 $\Delta virAB$ 的生长)；在含有 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 四环素的平板上， $\Delta virAB$ 的生长明显弱于 EGD-e (在所有稀释倍数下均无法观察到 $\Delta virAB$ 的生长)。

2.7 微孔板法检测菌体的生长和生物被膜的形成

如图 5A 所示，在 1、2、3 d 的培养过程中，野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 在各时间段的生长

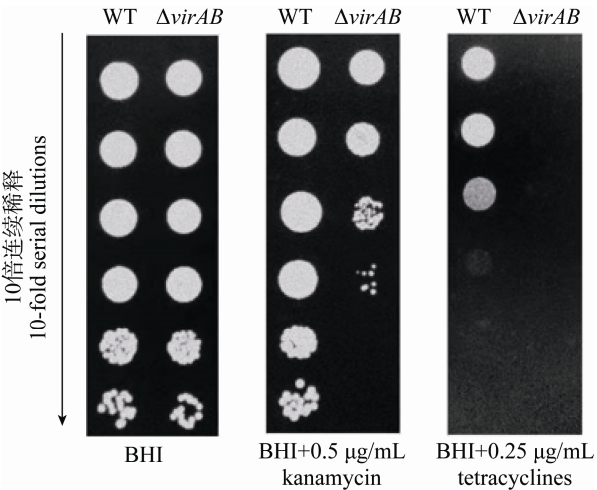


图 4 平板法检测野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 对卡那霉素和四环素的敏感性
Figure 4 Determination of kanamycin and tetracyclines susceptibility of the wild-type strain EGD-e and the mutant strain $\Delta virAB$ using the plate-based assay

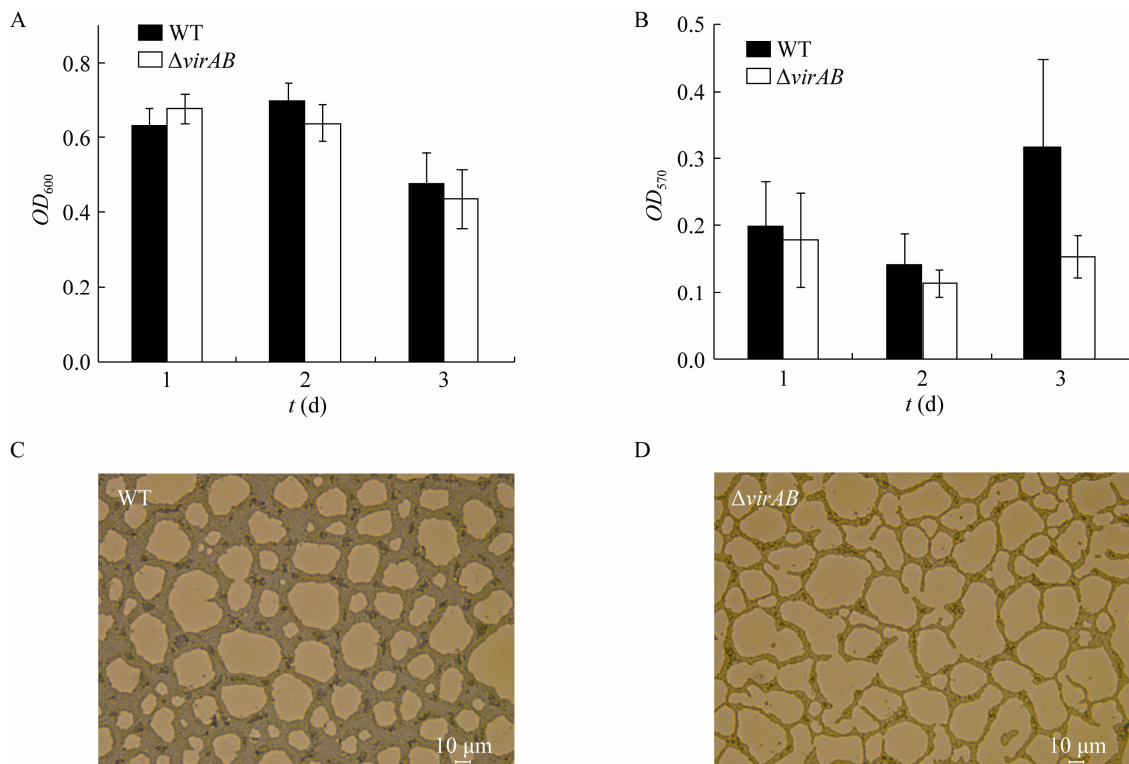


图 5 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 生物被膜的形成

Figure 5 Biofilm formation of the wild-type strain EGD-e and the mutant $\Delta virAB$

注: A: 野生株 EGD-e 与突变株 $\Delta virAB$ 的 OD_{600} 值; B: 野生株 EGD-e 与突变株 $\Delta virAB$ 的 OD_{570} 值; C: 野生株 EGD-e 生物被膜图; D: 突变株 $\Delta virAB$ 生物被膜图

Note: A: Wild-type strain EGD-e and the mutant $\Delta virAB$ OD_{600} values; B: Wild-type strain EGD-e and the mutant $\Delta virAB$ OD_{570} values; C: Biofilm formation of the wild-type strain EGD-e; D: Biofilm formation of the mutant $\Delta virAB$

量无明显差异; 与 EGD-e 相比, $\Delta virAB$ 形成的生物被膜量明显降低, 在 1、2、3 d 分别下降了 5%、10% 和 60% (图 5B)。显微镜下 2 株菌形成的生物被膜结构如图 5C、D 所示: EGD-e 形成的链网状生物被膜, 结构致密, 孔隙很小; 而 $\Delta virAB$ 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。该结果与微孔板定量检测结果一致, 表明 *virAB* 缺失使 Lm 形成生物被膜的能力降低。

2.8 菌株泳动性

在 37 °C 培养条件下, 由于鞭毛蛋白的合成受到抑制, 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 均未表现出泳动性, 形成较小的紧凑型菌落; 在 25 °C 条件下, EGD-e 和 $\Delta virAB$ 均能形成边缘整齐的同心环状菌落, 表现出良好的泳动性, 两者的泳动扩散直

径分别为 0.6 cm 和 0.64 cm, 无明显差异(图 6)。这表明 *virAB* 的缺失并不影响菌株的泳动性。

3 讨论与结论

ABC 转运蛋白家族在细菌中广泛存在, 主要参与营养物质的摄入、代谢产物的排出等生理活动^[5]。Lm 已测序菌株 EGD-e 的基因组中存在上百个编码 ABC 转运蛋白的基因, 只有少数基因的功能得到部分解析。Collins 等^[18]报道, 由 *lmo2114/lmo2115* 编码的 ABC 转运蛋白 AnrAB 介导 EGD-e 对包括头孢噻肟、头孢呋辛、氨苄西林和盘尼西林在内的 β -内酰胺类抗生素、Nisin 和杆菌肽的耐药。AnrAB 属于肽 7 外排转运子(Peptide 7 Exporter, Pep7E)家族, 其通透酶 AnrB 由 10 个跨膜结构域组成, 其中跨膜域 7 和 8 之间存在一个大的胞外结

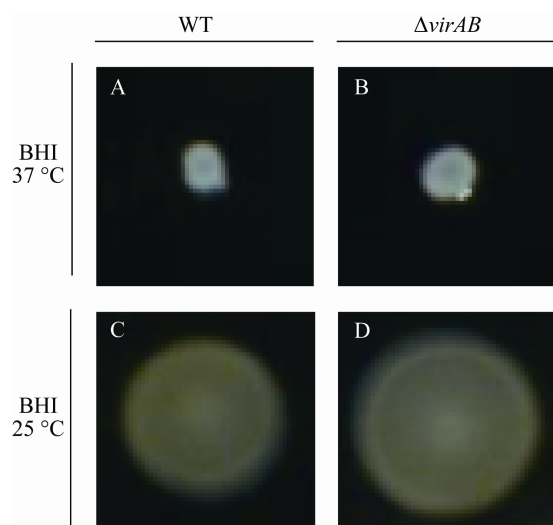


图6 野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 的泳动性

Figure 6 Motility of the wild-type strain EGD-e and the mutant $\Delta virAB$

注: A: 37 °C 情况下野生株 EGD-e 的泳动性; B: 37 °C 情况下突变株 $\Delta virAB$ 的泳动性; C: 25 °C 情况下野生株 EGD-e 的泳动性; D: 25 °C 情况下突变株 $\Delta virAB$ 的泳动性

Note: A: Motility of the wild-type strain EGD-e at 37 °C; B: Motility of the mutant $\Delta virAB$ at 37 °C; C: Motility of the wild-type strain EGD-e at 25 °C; D: Motility of the mutant $\Delta virAB$ at 25 °C

构域, 该结构域可能直接参与底物的结合^[18]。本研究通过软件对 VirB 的跨膜结构进行了预测, 结果发现 VirB 与 AnrB 的结构十分相似, 也含有 10 个跨膜域, 而且跨膜域 7 和 8 之间存在一个大的胞外结构域, 据此我们推测 VirAB 可能也与 EGD-e 对抗菌药物的耐药有关。为了证实这一推测, 本研究构建了菌株 EGD-e 的基因缺失突变株 $\Delta virAB$, 与野生株相比, 该突变株对 4 种头孢类抗生素、Nisin 和 EB 的 MIC 值下降, 表明 VirAB 介导 EGD-e 对这几种抗菌药物的耐药性。尽管 $virAB$ 的缺失没有影响菌株对 BC、卡那霉素和四环素的 MIC 值, 但是当培养基中分别添加亚致死浓度的 BC、卡那霉素和四环素时, 突变株均表现出不同程度的生长缺陷, 这表明 VirAB 与 EGD-e 对 BC、卡那霉素和四环素的耐药也有关。本研究还分别构建了 $virB$ 和 $virA$ 2 个单基因缺失突变体, 经检测发现这 2 株突变体对受试的 4 种头孢类抗生素、

Nisin 和 EB 的 MIC 值与 $\Delta virAB$ 相同, 表明 $virB$ 和 $virA$ 在介导 EGD-e 对这些抗菌药物的耐药中均起作用, 两者缺一不可。

Zhu 等^[9]将转座子 Tn917 插入至 Lm 菌株 4b G 的 *lm.G_1771*, 得到插入失活突变株 LM-49, 进一步检测发现 LM-49 形成生物被膜的能力高于野生株; 序列比对结果显示 *lm.G_1771* 编码的蛋白与 EGD-e 的 VirB 同源, 而 *lm.G_1772* 编码的蛋白与 VirA 同源, 因此 Lm.G_1771/Lm.G_1772 这个 ABC 转运蛋白负调控菌株 4b G 生物被膜的形成。本研究的结果显示, 缺失 $virAB$ 后菌株形成生物被膜的能力下降, 表明 VirAB 可能参与正调控 EGD-e 生物被膜的形成, 这与 Zhu 等^[9]的研究结果不同。导致本研究与前人研究结果不同的原因可能有两点: (1) 研究中所用的 Lm 菌株不同, Zhu 等^[9]以 4b G 为研究对象, 该菌株为 4b 血清型且尚未进行全基因组测序, 本研究使用已测序的 Lm 菌株 EGD-e; (2) 构建突变体的方法不同, Zhu 等^[9]利用转座子 Tn917 将 *lm.G_1771* 基因插入失活, 而本研究则通过缺失 $virAB$ 构建敲除突变体。

Lm 形成生物被膜的能力受多种因素的影响, 其中泳动性有助于菌体在介质表面的运动, 进而影响生物被膜的形成。因此, 我们又对野生株 EGD-e 和突变株 $\Delta virAB$ 的泳动能力进行检测, 结果显示两者泳动能力无明显区别, 表明 VirAB 与 EGD-e 的泳动能力无关。

本研究证实 ABC 转运蛋白 VirAB 介导 EGD-e 对头孢类抗生素、Nisin 和 EB 耐药, 同时该转运蛋白还部分参与 EGD-e 对 BC、卡那霉素和四环素的耐药。此外, VirAB 可能参与正调控 EGD-e 生物被膜的形成。

REFERENCES

- [1] Jiang XB, Yu T, Liang Y, Ji SD, Guo XW, Ma JM, Zhou LJ. Efflux pump-mediated benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from retail food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 141-145
- [2] Filipello V, Gallina S, Amato E, Losio MN, Pontello M,

- Decastelli L, Lomonaco S. Diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* within the Gorgonzola PDO production chain and comparison with clinical isolates from the same area[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 245: 73-78
- [3] Arslan F, Meynet E, Sunbul M, Sipahi OR, Kurtaran B, Kaya S, Inkaya AC, Pagliano P, Sengoz G, Batirel A, 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
- [4] Xu YM, Jiang XB, Yu T, Wang HL, Shi L. Role of efflux pump MdrL in tolerance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1273-1282 (in Chinese)
徐雅梦, 姜晓冰, 于涛, 王海磊, 石磊. 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[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1273-1282
- [5] Zhu XN, Liu WB, Lametsch R, Aarestrup F, Shi CL, She QX, Shi XM, Knöchel S. Phenotypic, proteomic, and genomic characterization of a putative ABC-transporter permease involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(4): 495-501
- [6] Liu YH, Ceruso M, Gunther IV NW, Pepe T, Cortesi LM, Fratafico P. Construction of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in putative ATP-Binding Cassette (ABC) transporters and analysis of their growth under stress conditions[J]. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 2012, 4(7): 141-146
- [7] Ceruso M, Fratafico P, Chirillo C, Taglialatela R, Cortesi ML, Pepe T. The capacity of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in putative ATP-binding cassette transporters to form biofilms and comparison with the wild type[J]. Italian Journal of Food Safety, 2014, 3(1): 1657
- [8] Grubaugh D, Regeimbal JM, Ghosh P, Zhou Y, Lauer P, Dubensky Jr TW, Higgins DE. The VirAB ABC transporter is required for VirR regulation of *Listeria monocytogenes* virulence and resistance to nisin[J]. Infection and Immunity, 2017, 86(3): e00901-17
- [9] Zhu XN, Long F, Chen YH, Knöchel S, She QX, Shi XM. A putative ABC transporter is involved in negative regulation of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7675-7683
- [10] Zhao C, Zhao JQ, Wang WY, Fan YN, Ma CP, Zhang DH, Lv Y. Expression of MLAA34-HSP70 fusion gene constructed by SOE-PCR[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30(3): 1125-1127
- [11] 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
- [12] Guo L, Chen GW, Xie MM, Liu WK, Ding CC, Wang SJ, Luo Q, Liu Q. 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, 刘武康, 丁承超, 王淑娟, 罗勤, 刘箐. 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
- [13] Xu YM. MdrL efflux pump mediates the resistance mechanism of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2018
徐雅梦. MdrL 外排泵介导 *Listeria monocytogenes* 对苯扎氯铵的耐受机制[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2018
- [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement[R]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011
- [15] Yu T, Jiang XB, Zhang YG, Ji SD, Gao WJ, Shi L. Effect of benzalkonium chloride adaptation on sensitivity to antimicrobial agents and tolerance to environmental stresses in *Listeria monocytogenes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2906
- [16] Zhang PP, Liu Y, Fang C, Yu Y, Chen JS, Fang WH. 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, 俞盈, 陈健舜, 方维焕. 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
- [17] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2950-2958
- [18] Collins B, Curtis N, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various β -lactam antibiotics[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(10): 4416-4423