论著

文章编号:1000-5404(2006)03-0220-03

弗氏枸橼酸杆菌脂多糖突变株发生鞭毛合成异常

丛延广[1],徐启旺[2] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,[2]医学检验系生物医学研究室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨弗氏枸橼酸杆菌群集运动的分子机制。**方法** 用Mini-Tn5 Km转座子诱导获得弗氏枸橼酸杆菌群集运动突变株;通过反向PCR扩增突变基因并测序,从而确定发生突变的基因;观察突变株的运动和形态等特征。**结果** 研究表明有7株突变株涉及3个与脂多糖合成有关的基因突变,分别为wzxB、waaW、waaL,导致弗氏枸橼酸杆菌群集运动能力显著下降。同时,这些突变株的鞭毛合成也出现异常,即培养的细菌中仅有小部分呈现正常的鞭毛合成,而大多数菌体聚集在一起,且鞭毛合成呈抑制状态,电镜观察发现多数聚集的菌体没有鞭毛或只有很少的鞭毛。与之相对应的是,野生株没有这个现象。**结论** 脂多糖结构的缺失影响弗氏枸橼酸杆菌鞭毛的生成,进而影响其群集运动能力。

关键词: 弗氏枸橼酸杆菌;脂多糖;鞭毛合成;群集运动

中图法分类号: Q934.3; Q939.121 **文献标识码:** A

Abnormal flagellar production in O-antigen mutants of *Citrobacter freundii*

CONG Yan-guang[1], XU Qi-wang[2] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, [2]Department of Biomedicine, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of swarming motility in *Citrobacter freundii*. **Methods** Mini-Tn5 transposon was used to induce swarming mutants in *Citrobacter freundii*. The mutant genes were amplified by inverse-PCR and were then sequenced. Mutants were observed under light microscope and electron microscope to determine the characters of motility and bacterial shape. **Results** Seven swarming mutants were found to be three gene mutants (wzxB, waaW, waaL) involving LPS synthesis. Moreover, flagellar production of these mutants was abnormal, that is, only small portion of bacterial cells produced flagella normally. The majority of cells tended to aggregate and produced little flagella observed under electron microscope. **Conclusion** Absence of O-antigen affects the production of flagella and swarming motility of *Citrobacter freundii*.

Key words: *Citrobacter freundii*; lipopolysaccharide; flagellar production; swarming motility

群集运动(swarming motility)是指运动细菌以群体方式在培养基表面由接种点向周围进行的依赖鞭毛的迁移运动。肠杆科细菌是引起尿道感染的主要病原菌,对变形杆菌的研究表明,其群集运动和分化的能力与其致病性有关。

在之前的研究中,我们选用弗氏枸橼酸杆菌代表株ATCC8090,用转座子诱导的办法获得大量随机单突变的突变株,进而通过平板运动模型广泛筛选群集运动突变株[1],期望通过对突变基因的定位分析来了解弗氏枸橼酸杆菌群集运动分子机制。我们对突变株的进一步分析发现,涉及脂多糖合成有关的基因对枸橼酸杆菌群集运动有显著的影响,同时还发现一个新现象:即脂多糖突变株存在鞭毛合成异常,这一现象可能为脂多糖功能的认识增加一个新的证据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*) ATCC8090,携带转座子质粒pUT/mini-Tn5 Km的大肠杆菌S17-1(λpir),分别由Tomofusa Tsuchiya, Caroline S. Harwood教授赠送。弗氏枸橼酸杆菌群集运动单突变株,为本实验室通过转座子诱导并筛选获得[1]。

SW培养基(swarming medium):1%胰胨、1%氯化钠、0.5%葡萄糖、0.5%琼脂。

1.2 光镜观察

对液体培养的细菌进行观察时,取一滴培养液加于载玻片上,于倒置显微镜下直接观察,或盖上盖玻片,于油镜下观察。

作者简介:丛延广(1973-),男,辽宁省盘锦市人,博士,讲师,主要从事微生物致病机制与防治方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752239,E-mail:cyg913@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-04-06;修回日期:2005-09-05

对平板培养细菌也于倒置显微镜下直接观察。观察同时开启加热装置，保持观察环境在 30 ℃以上，采用摄录像装置进行同步录像。

1.3　电镜观察

直接取细菌培养液或从平板上洗下的菌液 1 滴，将包被有聚乙烯醇缩甲醛膜的铜网放于菌液中 5 min，使细菌附着于铜网上。取出用磷钨酸负染 10 min，晾干。在 PHILIPS TECNAI10 透射电子显微镜下观察。

1.4　反向 PCR 扩增突变基因的部分序列[2]

1.4.1　以 CTAB 法提取弗氏枸橼酸杆菌转座突变株的基因组 DNA，*Taq* Ⅰ完全酶切，酚/氯仿/异戊醇抽提，乙醇沉淀，重悬于 50 μl TE 中。

1.4.2　T4 连接酶连接　　为了选择某一比较有利于形成单体环的稀释度，每一样品分两个浓度管，分别取 0.2、5 μl 的上述酶切产物，组成 50 μl 连接体系。连接产物进行酚抽提，乙醇沉淀 DNA，并以 10 μl TE 重悬 DNA。

1.4.3　PCR 反应　　分别取上述两种浓度连接产物 4 μl 作为模板进行 PCR 反应。

引物：P904：5′-GGAGAGGCTATTCGGCTATG-3′，P194c：5′-GTAAGGTGATCCGGTGGATG-3′，30 个循环（94 ℃ 40 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min）；72 ℃ 15 min。

1.4.4　取 2 μl 反应产物，于 2% 琼脂糖凝胶上电泳，估计产物分子量。取 PCR 产物 30 μl 送上海基康公司做直接测序，将引物 P194c 作为测序引物。

1.5　对获得的序列进行相似性检索以确定突变基因

于 NCBI 网站上进行相似性比较，获得突变基因信息。采用核酸序列比对核酸序列（Nucleotide-nucleotide BLAST，blastn），以及核酸序列比对蛋白质序列（Protein query *vs.* translated database，tblastn）两种查询方式。

2　结果

2.1　转座诱变及测序分析

转座子序列以简单插入的方式整合到细菌基因组中，导致插入位点的基因发生突变，功能失活。mini-Tn5 转座子的插入是随机的，且在设计上保证导致单一突变，由于方法简便，可以在短时间内获得大量位置随机的单一突变的突变株，进而通过适当的筛选获得感兴趣的突变株。

在本研究中，通过转座子插入诱变和筛选，从 4 000 余株突变株中，共筛选获得 85 株群集运动单突变株，通过对突变基因的测序和检索分析，发现其中涉及脂多糖合成的突变株有 7 株，占所有突变株的比例为 8.2%。这 7 株突变株共涉及 3 个脂多糖合成基因，分别为 wzxB（编码 O-抗原低聚糖重复单位迁移酶）、waaW（编码半乳糖基转移酶，参与核心多糖的合成）、waaL（编码将 O-抗原连接到脂质 A-核心多糖上的连接酶）。其中只有 2 株是完全相同的，即 YG414 和 YG408 均为 wzxB 基因单突变，且插入位点一致。其余突变株即使突变基因一样，转座片段插入位点也是不相同，详细情况请见 TABLE1。上述 3 个基因发生突变均会导致细菌脂多糖中的 O-抗原结构无法形成，并且 waaW 突变株还将导致核心多糖链的缩短[3-5]。

从序列的相似性检索结果来看，与枸橼酸杆菌的 3 个基因相似性最高的基因所属菌种各不相同，分别为 *Escherichia coli* F2513（waaW 基因），*Photorhabdus luminescens* subsp. laumondii TTO1（wzxB 基因），*Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCRI1043（waaL 基因）。仅大肠埃希菌与其同属肠杆菌科。由于枸橼酸杆菌基因组还没有完整测序，因此，在描述转座片段在突变基因的插入位点时，就分别以其相似性最高的菌种序列为准，见表 1。

表 1　与脂多糖合成有关的突变株测序定位结果

突变株	基因	产物	插入位点[a]	相似基因所属菌种
YG605	waaW	半乳糖基转移酶	120/1026	*E. coli* F2513
YG719	waaW	半乳糖基转移酶	167/1026	*E. coli* F2513
YG414	wzxB	O-抗原低聚糖重复单位迁移酶	19/1203	P. luminescens TTO1
YG408	wzxB	O-抗原低聚糖重复单位迁移酶	19/1203	P. luminescens TTO1
YG202	wzxB	O-抗原低聚糖重复单位迁移酶	142/1203	P. luminescens TTO1
YG412	wzxB	O-抗原低聚糖重复单位迁移酶	209/1203	P. luminescens TTO1
YG603	waaL	连接酶	130/1281	Er. carotovora SCRI1043

a：斜线前为插入位点，斜线后为基因长度

2.2　对脂多糖突变株运动行为的观察

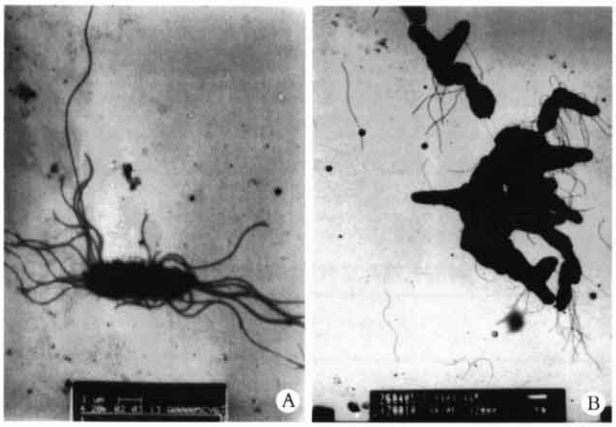
在形态和运动方面，7 株突变株的表现完全一致。在平板表面生长 12 h 后，野生株菌落能占满整个平板，脂多糖突变株则只能形成非常局限的菌落，表明表面扩散能力显著下降，见图 1。



A：野生株；B：wzxB 突变株

图 1　弗氏枸橼酸杆菌在 SW 平板上生长扩散形成的菌落（37 ℃ 培养 12 h）

在显微镜下观察所有脂多糖突变株群集运动的动态过程，发现它们有一个共同的特征：在 SW 平板表面，多数细菌是不运动的，且聚集成团，形成看起来比较干燥的菌团，在其周围有少量运动的菌体。取标本涂片染色光镜观察或负染电镜观察，可看到菌体大多聚集在一起。为证实这一现象，进一步观察了这些突变株在液体培养基中的运动特征，结果与平板上情况类似：只有少量菌体能够运动，多数是不运动的。电镜观察发现，突变株菌体较粗大，聚集的多数菌体基本上没有鞭毛或只有很少的几根，但可观察到，少量在其周围散在的菌体能够产生正常量的鞭毛，对应的应该是那些在动态观察时活跃运动的菌体（图 2）。这与野生株形成鲜明的对比，野生株无论在 SW 平板表面还是在液体培养基中生长，菌体都呈现均一的活跃运动状态，所有菌体均能正常产生鞭毛，鞭毛的产生在菌体之间也没有显著差异。



A：野生株；B：wzxB 突变株

图2 细菌形态特征的电镜照片 （×2 500）

由于这些脂多糖突变株发生的均为单一突变，结合其运动及形态观察结果，我们可以得出这样一个结论：与脂多糖结构形成有关基因的突变，会直接影响鞭毛的合成，使多数菌体不产生或只产生很少的鞭毛，导致运动力的显著下降。脂多糖结构的不完整会导致鞭毛合成的障碍是一个新现象，之前还少见类似报道。

3 讨论

弗氏枸橼酸杆菌具周鞭毛，在固体培养基上培养时菌体会合成大量鞭毛，以促进其形成群集运动，以快速在表面运动，是一种典型的分化现象。本研究表明，脂多糖成分的不完整（主要是O-抗原的缺失）会导致细菌鞭毛合成发生障碍，大多数菌体不能正常产生鞭毛，由此导致群集运动能力下降。这一现象是首次报道，其他细菌是否具有同样特征目前还不能确定。但至少对弗氏枸橼酸杆菌来说，其鞭毛的生物合成有赖于正常的脂多糖结构。

脂多糖是革兰阴性细菌的内毒素，由3个成分组成，由内向外分别为脂质A、核心多糖和O-抗原（又称特异多糖）。脂质A对细菌生存非常重要，绝大多数细菌缺失脂质A后无法生存[4,6]，因此本次实验并没有分离出其相应的突变株。而影响其他两个成分的突变株则均有分离。

有1篇对鼠伤寒沙门菌的研究表明群集运动与脂多糖有密切的关系（该研究中35株能泳动却不能群集运动的突变株中有29株发生了脂多糖合成的缺陷，比例高达82.9 %）。在群集运动培养基中添加表面活性剂能使突变株群集运动恢复正常，研究者由此得出结论认为脂多糖在群集运动中的作用是增加菌体表面润滑度，和表面活性剂的作用是一致的。但无法解释为什么在培养基中直接加入脂多糖不能使突变株的群集运动恢复正常[7]。结合本研究结果分析，本研究没有显示脂多糖成分不完整对鞭毛合成本身有直接影响。这多半是因为在测定突变株运动能力时，其他研究者均采用泳动培养基平板培养来进行宏观测定，而不是直接在显微镜下进行动态观察（他们对突变株的泳动只进行“是或否”的判断）。其实从文献罗列的结果来看，研究者甚至可以发现脂多糖突变株的鞭毛表达量比野生株少，但由于取样以及观察角度的问题，他们没有发现同一突变株菌体间的显著差异。

理论上推测脂多糖结构对鞭毛产生的影响可能跟二者在结构上的联系有关。鞭毛结构中的基础小体位于鞭毛根部，埋在细胞壁和细胞膜中，由一根轴棒和两对同心环组成，其中的1对P环和L环分别连接在细胞壁的肽聚糖和脂多糖上，类似于一个轴承，起到支持的作用。从鞭毛的整个结构分析，相对致密的肽聚糖层和脂多糖层作为P环和L环的附着位置，对鞭毛正常结构的形成起到重要作用。因此当脂多糖的外层结构O-抗原、核心多糖缺损时，可能导致L环难以正常连接到脂多糖上，从而影响鞭毛结构的正常组装。同时由于脂多糖并没有完全缺失，故可能在小概率的情况下，L环能连接到脂多糖余下结构的糖链上，所以有少部分菌体能够产生一些鞭毛。

O-抗原并非细菌的关键结构，在正常传代过程中也可能缺失。因此，本研究显示的现象就具有重要的生态意义。O-抗原缺失后，细菌在表面环境有聚集的趋势，可能有利于在局部的定植。本研究显示的现象是否具有普遍性，还需要在其他细菌中进行证明，其影响鞭毛合成的机制也需要进一步研究来阐释。

参考文献：

[1] 从延广，徐启旺. 利用Mini-Tn5转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌插入突变的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(13)：1145－1147.

[2] 哈伍德A J. DNA及RNA基本实验技术[M]. 盛小禹 译. 北京：科学出版社，2002：216－222.

[3] FELDMAN M F, MAROLDA C L, MONTEIRO M A. *et al*. The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in Escherichia coli O antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat[J]. J Biol Chem, 1999, 274(49): 35129－35138.

[4] WHITFIELD C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens[J]. Trends Microbiol, 1995, 3(5): 178－185.

[5] FRIRDICH E, LINDNER B, HOLST O, *et al*. Overexpression of the waaZ gene leads to modification of the structure of the inner core region of Escherichia coli lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface[J]. J Bacteriol, 2003, 185(5): 1659－1671.

[6] RAETZ C R. Biochemistry of endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 1990, 59: 129－170.

[7] TOGUCHI A, SIANO M, BURKART M, *et al*. Genetics of swarming motility in Salmonella enterica serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide[J]. J Bacteriol, 2000, 182(22): 6308－6321.

（编辑 周 芳）