论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0258-04

# luxS基因敲除临床分离大肠杆菌株生物膜形成能力的变化

孙凤军,枉 前,史惠卿,夏培元 (400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科)

【摘要】 **目的** 探讨LuxS基因对临床分离大肠杆菌生物膜形成能力的影响。**方法** 以临床分离大肠杆菌S17为研究对象,PCR分别扩增S17 LuxS基因的上下游序列和质粒pEGFP-N1的卡那抗性基因,分别连入T载体pAT2,再通过酶切连接的方法分别将LuxS基因的上、下游序列连接入pAT2-kana质粒,构建同源重组质粒pAT2-△luxS,同源重组质粒转化大肠杆菌DH5α扩增后,提取质粒后双酶切获得同源重组片段,将同源重组片断电转入感受态S17,通过同源重组构建LuxS基因缺失的S17,96孔板结晶紫染色法分析LuxS基因缺失株生物膜形成能力的变化。**结果** LuxS基因缺失株基因组PCR扩增出1678的片断,测序鉴定正确,成功构建临床分离大肠杆菌S17 LuxS基因缺失株,S17与S17LuxS基因缺失株形成生物膜的微孔板法半定量OD值的结果分别为(1.51±0.09)和(0.43±0.13)。**结论** LuxS基因对细菌生物膜的形成具有重要调控作用。

【关键词】 大肠杆菌;LuxS基因;生物膜;基因敲除
【中图法分类号】 R378.21;R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

# Effect of luxS gene on biofilm formation in knocked-out clinically isolated *Escherichia coli*

Sun Fengjun, Wang Qian, Shi Huiqing, Xia Peiyuan (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 Objective To study the effect of luxS gene on biofilm formation in knocked-out *Escherichia coli* (*E. coli*). Methods Clinically isolated *E. coli* S17 was used as the target in this study. The upstream and downstream sequences of luxS, and kana-resistance gene of pEGFP-N1 were amplified by PCR, cloned into T plasmid pAT2 vector and pAT2-kana. Homologous recombinant plasmids pAT2-△luxS were then constructed. After the pAT2-△luxS were transformed into *E. coli* and amplified, fragments of homologous recombinant plasmids were obtained by restricted enzyme reaction and transformed to *E. coli* S17. Effect of luxS gene on biofilm formation in knocked-out *E. coli* in 96-well plates was analyzed with crystal violet staining. Results A total of 1678 luxS fragments were amplified by PCR with correct sequences. A *E. coli* S17 strain without luxS gene was established with an OD of 1.51±0.09 and 0.43±0.13, respectively. Conclusion The luxS gene plays an important role in regulation of biofilm formation in *E. coli*.

【**Key words**】 *Escherichia coli*; luxS gene; biofilm; gene knock-out

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30572366). Corresponding author: Xia Peiyuan, Tel: 86-23-68754438, E-mail: py_xia@yahoo.com.cn

大肠杆菌是临床分离率最高的革兰阴性菌,生物膜感染的常见病原菌,细菌感染形成生物膜后,可以发挥协同作用,形成复杂有序的立体结构,逃避免疫系统攻击,具有较高程度的耐药性,并可在生物膜解离后播散,导致其他系统的感染,生物膜感染的治疗已成为临床亟待解决的难题[1]。研究发现luxS-AI-2是关键的群体感应系统,广泛分布于革兰阳性菌和阴性菌中,可调节链球菌、李斯特菌等菌株生物膜的形成[2-4],而大肠杆菌luxS-AI-2系统对细菌生长和毒素释放等具有调节作用[5],为研究luxS-AI-2在大肠杆菌生物膜形成过程中的作用,本研究构建大肠杆菌luxS基因缺失株,并分析其细菌生物膜形成能力的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

携有kana抗性基因的pEGFP-N1质粒菌由西南医院全军烧伤研究所唐辉博士馈赠;临床分离大肠杆菌S17均为临床药理基地保存菌株。细菌基因组DNA抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒和PCR产物回收试剂盒购自北京

【基金项目】 国家自然科学基金(30572366)
【通信作者】 夏培元,电话:(023)68754438,E-mail:py_xia@yahoo.com.cn

天根公司；T 载体 pAT2，KOD plus DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶（*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ）和逆转录试剂盒购自日本 TOYOBO 公司，$T_4$ DNA 连接酶、限制性内切酶（*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Nde*Ⅰ、*Hind*Ⅲ和 *Xho*Ⅰ）购自大连 TaKaRa 公司；琼脂糖为西班牙进口分装；蛋白胨、酵母提取物购于英国 Oxoid 公司；引物设计和测序由上海生工生物有限公司完成。

### 1.2　方法

1.2.1　pAT2-kan 质粒的构建　根据 pEGFP-N1 质粒说明书设计引物扩增完整的卡那抗性基因，引物序列参见表 1，PCR 扩增卡那霉素抗性基因片段包括启动子共 1 293 bp。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳。纯化回收后加入相同体积的 PCR mix，72 ℃加 A 尾 20 min，回收后紫外分光度计测浓度，按照回收产物∶T 载体 pAT2的比例为 3∶1的比例混合，16 ℃连接后转化感受态大肠杆菌 DH5α，蓝白斑筛选，挑取单菌落增菌后提取质粒，*Eco*RⅠ酶切电泳鉴定，送上海生工生物有限公司测序。

**表 1　luxS 上、下游序列和 Kana 霉素抗性基因引物序列**

| | | |
|---|---|---|
| luxS 上游序列 | 正义链 P1 | 5′-GGATCCCGCTGTATCGTGAAGGCTGAA-3′ |
| | | 划线部分为 *Bam*HⅠ酶切位点 |
| | 反义链 P2 | 5′-CATATGTTAGCCACCTCCGGTAATTTTTTTAAA3-3′ |
| | | 划线部分为 *Nde*Ⅰ酶切位点 |
| Kana 抗性基因 | 正义链 P5 | 5′-GCGCGGAACCCCTATTTGTTT-3′ |
| | | 划线部分为 *Nde*Ⅰ酶切位点 |
| | 反义链 P6 | 5′-AAGCTTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAG-3′ |
| | | 划线部分为 *Hind*Ⅲ酶切位点 |
| luxS 下游序列 | 正义链 P3 | 5′-AAGCTTTCAGTAAACTATCTTCACAATTAATTGAA-AAAAG-3′　划线部分为 *Hind*Ⅲ酶切位点 |
| | 反义链 P4 | 5′-CTCGAGGACACTGCAAACTCTGCGCGG-3′ |
| | | 划线部分为 *Xho*Ⅰ酶切位点 |

1.2.2　同源重组质粒 pAT2-△luxS 的构建　根据 pAT2-kan 测序结果和酶切位点：参照大肠杆菌 MG1655 基因全序列（GenBank 号：NC_000913）的 luxS 上游及下游序列设计引物扩增 luxS 转录起始位点以前的上游序列（2812755－2814076，1 322 bp），扩增 luxS 终止密码子位点以后的下游序列（2811189－2812238，1 049 bp），引物序列及所加酶切位点如表 1 所示。提取大肠杆菌 S17 基因组 DNA，1% 琼脂糖凝胶（EB 浓度为 0.5 μg/ml）电泳确证，分别扩增 luxS 上游及下游序列，产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳后纯化回收。纯化后分别加入相同体积的 PCR mix，72 ℃加 A 尾 20 min，PCR 产物回收试剂盒回收，紫外分光度计测浓度后，回收产物：T 载体 pAT2的比例为 3∶1的比例混合，16 ℃连接过夜后转化感受态大肠杆菌 DH5α，蓝白斑筛选，挑取单菌落后提取质粒，EcoRⅠ酶切电泳鉴定，送测序。

测序后分别将 pAT2-luxS 上游序列 T 载体和 pAT2-kan 采用 *Bam*HⅠ和 *Nde*Ⅰ双酶切，产物 1% 的琼脂糖凝胶电泳，将 luxS 上游序列和 pAT2-kan 回收，以 luxS 上游片段∶pAT2-kan 载体为 5∶1混合，16 ℃连接后转化感受态大肠杆菌 DH5α，氨苄抗性筛选后挑单菌落提取质粒，双酶切验证。pAT2-luxS 下游序列 T 载体和 pAT2-luxS 上游序列-kan 载体分别采用 *Hind*Ⅲ和 *Xho*Ⅰ双酶切，产物电泳，将 luxS 下游序列和 pAT2-luxS 上游序列-kan 片段回收，luxS 下游片段∶pAT2- luxS 上游序列-kan 的比例为 5∶1的比例混合，16 ℃连接过夜后转化感受态大肠杆菌 DH5α，氨苄抗性筛选后，挑取单菌落提取质粒，双酶切验证连接顺序，分别采用 *Bam*HⅠ和 *Nde*Ⅰ、*Nde*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ，*Hind*Ⅲ和 *Xho*Ⅰ双酶切，分别得到 luxS 上游（1 322 bp）、kana 基因（1 293 bp）和 luxS 下游片段（1 049 bp）的条带和载体条带。

1.2.3　大肠杆菌 S17 luxS 基因敲除株的构建和鉴定　提取 pAT2-△luxS 质粒，1% 的琼脂糖凝胶电泳确定产物，确定质粒的浓度后，采用 *Bam*HⅠ（TOYOBO）和 *Xho*Ⅰ（TOYOBO）双酶切，电泳确定产物，回收同源重组片段，浓度为 31 μg/ml。取 2 管电转化感受态大肠杆菌 S17，其中 1 管感受态细胞添加 10 μl 同源重组片段，1 管作为空白对照，冰上培育约 5 min，转移同源重组片段/细胞混合物和空白对照至冷却后的 2 mm 电击杯中，对电击杯进行脉冲（200 Ω，25 μFd，2.5 kV），电击后立即添加 300 μl 的 LB 至电转杯中，转移至无菌 1.5 ml EP 管，37 ℃ 120 r/min 下培养细胞，转移细胞至卡那抗性的培养培养皿上培养 20 h，阴性对照无菌落生长，实验培养皿挑选阳性克隆筛选。

提取阳性克隆基因组 DNA。参考大肠杆菌 MG1655 基因全序列（NC_000913）分别设计 2 条引物扩增卡那霉素抗性基因和 luxS 基因，引物序列见表 2。基因敲除株扩增产物大小为 1 678 bp，未敲除株扩增产物大小为 924 bp，对于 LuxS 引物，基因敲除株扩增结果阴性，未敲除株扩增产物大小为 348 bp，扩增后测序鉴定，将鉴定菌株命名为 S17△luxS。

**表 2　S17 luxS 基因敲除鉴定引物**

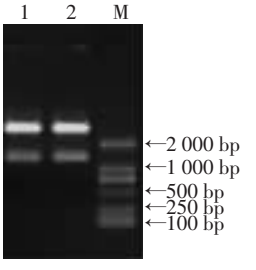
| 引物名称 | 引物序列 | 产物大小 |
|---|---|---|
| kan | 正义链 5′-CTTCGTTGCTGTTGATGCGTAC 3′<br>反义链 5′ TGCCGAACAAAGAAGTGATGC 3′ | 1 678 bp |
| luxS | 正义链 5′ GGGGCTGGTGTGGTTTGCTAA 3′<br>反义链 5′CGTGAAGAGCCGCTGGAAATT 3′ | 348 bp |

1.2.4　luxS 基因敲除大肠杆菌株生物膜形成能力的变化　采用 96 孔板结晶紫染色法：LB 培养皿转大肠杆菌过夜（18 h），分别挑单菌落于 10 ml LB 培养基摇菌约 18 h，0.5 麦氏单位比浊后取 2 μl 在 96 孔板中用 200 μl 的 LB 培养基稀释，每株菌取 3 个复孔，放在 37 ℃孵箱内孵育 24 h，取出后倒去培养基，用灭菌 PBS 液冲洗 3 次，风干后采用 0.1% 结晶紫染色 5 min，PBS 液冲洗 3 次风干后用 50μl 30% 乙酸溶解，在波长 590 nm 时测量光密度值[*D*(590)]，取 3 个复孔平均值为其 OD 值。

## 2　结果

### 2.1　同源重组质粒 pAT2-△luxS 的构建

卡那霉素抗性基因的 PCR 扩增产物预计为 1 293 bp，连接到 pAT2 质粒 *Eco*RⅠ酶切经 1% 琼脂糖 100 V、电泳 20 min 可见大小约 1 300 bp 的片段和 2 800 bp 大小的 pAT2 载体片段。见图 1。

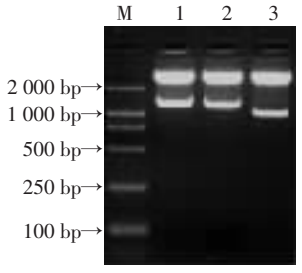



M：DNA 标准（DL 2000）；1，2：pAT2-kan 质粒被 *Eco*RⅠ酶切

**图 1　pAT2-kan 质粒 *Eco*RⅠ酶切电泳结果**

### 2.2 同源重组质粒 pAT2-△luxS 的构建

pAT2-△luxS 的鉴定采用 *Bam*H Ⅰ和 *Nde* Ⅰ、*Nde* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ,*Hind*Ⅲ和 *Xho* Ⅰ双酶切,质粒分别得到 luxS 上游、kana 基因和 luxS 下游片段大小的片段和载体。见图2。

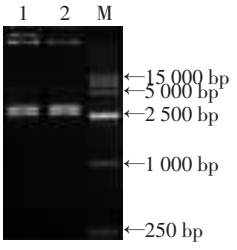



M:DNA 标准;1:pAT2-△luxS 质粒被 *Bam*H Ⅰ和 *Nde* Ⅰ双酶切;2:pAT2-△luxS 质粒被 *Nde* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切;3:pAT2-△luxS 质粒被 *Hind*Ⅲ和 *Xho* Ⅰ双酶切

**图2 pAT2-△luxS 质粒的酶切鉴定电泳结果**

### 2.3 大肠杆菌 S17 基因敲除株的构建和鉴定

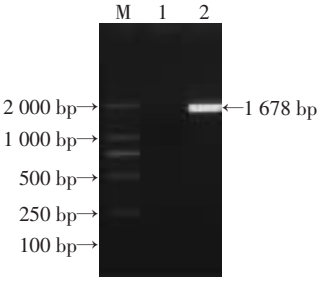
以质粒抽提试剂盒说明书提取 pAT2-△luxS 质粒,*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切后电泳图见图3,可见大小约 3 400 bp 的同源重组片段和大小约 2 800 bp 的 pAT2 载体,胶回收试剂盒回收目的片段。




M:DNA 标准;1,2:*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切

**图3 pAT2-△luxS 质粒的酶切电泳结果**

通过 PCR 扩增电泳图可以看到不能扩增出 luxS 基因,可以成功扩增出 kana 抗性基因,kana 抗性基因测序图如4所示,产物大小为 1 678 bp,经测序验证序列正确。




M:DNA 标准;1:luxS 基因 PCR 产物;2:Kana 抗性基因 PCR 产物

**图4 S17△luxS 的 PCR 鉴定结果**

### 2.4 luxS 基因敲除大肠杆菌株生物膜形成能力的研究

96孔板结晶紫染色法观察的大肠杆菌 S17 和 S17△luxS 细菌形成生物膜的能力的比较见图5,经紫外分光光度测量,大肠杆菌 S17 和 S17△luxS 微孔板法半定量光密度值分别为(1.51±0.09)和(0.43±0.13)。

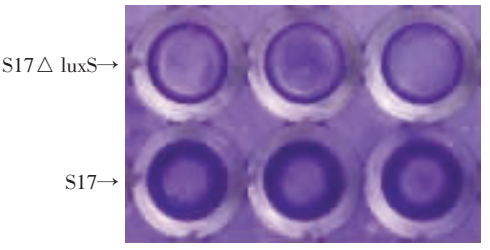



**图5 结晶紫染色法观察大肠杆菌 S17 和 S17△luxS 细菌形成生物膜的能力**

## 3 讨论

大肠杆菌生物膜感染可以出现在泌尿、消化和呼吸等多个系统[6],细菌形成生物膜后,可发挥协同作用,具有与高等细胞相类似的功能,生物膜内细菌之间依赖一种共同的信号转导通路进行交流[7-9]。密度感应(quorum sensing)是细菌彼此之间传递信号的一种重要机制,首先在深海发光弧菌中被发现,这种信号分子是一种自体诱导物(autoinducer,AI),细菌通过其浓度感应外周细菌的数量。当外周环境细菌密度增加,AI 浓度累积到一定阈值后,菌体将启动一系列相关基因以适应外环境的变化,细菌生物膜是其重要的调控机制之一。细菌产生 AI 信号非常普遍,由 LuxS 介导的群体感应系统被认为在许多种类细菌的重要生理功能和毒性调节中发挥重要作用[10],大肠杆菌 luxS-AI-2 系统是 LuxS 群体感应系统的典型代表,luxS 是大肠杆菌 AI-2 信号合成酶的编码基因[5]。

本研究通过同源重组的原理,将外源抗性基因替换大肠杆菌的 luxS 基因。由于染色体重组后形成的突变是不可逆的,外源基因在细菌内高度稳定。该方法是目前采用最多的定点突变技术。是研究细菌基因功能最常用方法,本实验采用酶切连接的方法构建同源重组质粒,在构建质粒的过程中利用了 T 载体 pAT2 酶切位点多的特点,直接将扩增的卡那抗性基因产物连接入 T 载体,再通过双酶切将大肠杆菌 S17luxS 基因的上下游序列连入 pAT2,简化了质粒构建的程序。该方法可普遍用于其他基因敲除中同源重组质粒的构建。

早期研究发现大肠杆菌的 luxS 可调节毒素因子的表达和细菌代谢,认为 luxS 基因是细菌代谢相关基因[5]。随着研究的深入,发现 luxS 具有多种功能,可调节数百个基因的表达,并可通过合成感知 AI-2 信号分子,确定细菌的密度,调节生物膜的形成,外源的 AI-2 信号分子可以增强生物膜的形成,其机制可能是通过促进鞭毛的表达、增加细菌的活力实现的[8,11-12]。而目前研究多局限于 K12 系菌株的研究,本研究以临床分离大肠杆菌为研究对象,发现 luxS 缺失的大肠杆菌细菌生物膜的形成能力减弱,提示 luxS

基因对大肠杆菌生物膜形成的促进作用是普遍存在的，而群体感应系统对细菌生物膜形成促进的普遍性，使其可能成为细菌生物膜治疗的新靶点。

## 参考文献：

[1] Ito A, Taniuchi A, May T, *et al*. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(12): 4093 - 4100.

[2] Ahmed N A, Petersen F C, Scheie A A. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by Streptococcus intermedius in the presence of antibiotics [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10): 4258 - 4263.

[3] Hardie K R, Heurlier K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(8): 635 - 643.

[4] Sela S, Frank S, Belausov E, *et al*. A Mutation in the luxS gene influences Listeria monocytogenes biofilm formation [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(8): 5653 - 5658.

[5] Walters M, Sperandio V. Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella [J]. Int J Med Microbiol, 2006, 296(2/3): 125 - 131.

[6] Berry R E, Klumpp D J, Schaeffer A J. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic Escherichia coli [J]. Infect Immun, 2009, 77(7): 2762 - 2772.

[7] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318 - 1322.

[8] Beloin C, Roux A, Ghigo J M. Escherichia coli biofilms [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322: 249 - 289.

[9] 孙小敏，余加林，林丽华，等. 氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜密度感应系统信号分子及相关基因的影响 [J]. 第三军医大学学报，2009，31(16)：1559 - 1562.

[10] Wang L, Li J, March J C, *et al*. luxS-dependent gene regulation in Escherichia coli K-12 revealed by genomic expression profiling [J]. J Bacteriol, 2005, 187(24): 8350 - 8360.

[11] Naves P, del-Prado G, Huelves L, *et al*. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by Escherichia coli strains [J]. Microb Pathog, 2008, 45(2): 86 - 91.

[12] Yamaguchi Y, Park J H, Inouye M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in Escherichia coli [J]. J Biol Chem, 2009, 284(42): 28746 - 28753.

（收稿：2010-09-19 修回：2010-10-13）
（编辑　王小寒）

文章编号：1000-5404(2011)03-0261-01

# 个案与短篇

## 肺奴卡菌病1例

冉　鸿[1]，胡文友[2]，孟　雄[1]，王　兮[1]　（400020 重庆，解放军第324医院：呼吸科[1]，放射科[2]）

【关键词】 肺；奴卡菌；诊断；治疗
【中图法分类号】 R519.1　【文献标志码】 B

肺奴卡菌病临床罕见，我院收治1例，现报告如下。

### 1　临床资料

患者，女性，41岁，农民，因“潮热、多汗、咳嗽1个月”入院。入院前1个月无明显诱因出现下午及夜间潮热及多汗，轻微咳嗽，无痰，无寒战，高热，无咯血、胸痛、胸闷。病后体质量无明显变化。患者病前一直务农，无石棉、粉尘接触史、无牧区生活史、无生食虾蟹史。查体：全身浅表淋巴结未扪及，气管居中，胸廓对称无畸形，双肺呼吸动度一致，触觉语颤对称，叩诊呈清音，左下肺呼吸音稍低，双肺未问及干湿性罗音。辅助检查：血常规正常，血沉8 mm/h，结核抗体阴性，PPD实验阴性，HIV抗体检测阴性，痰涂片抗酸染色阴性。胸部CT：骨性胸廓大致对称。纵隔、气管影无移位，纵隔内未见肿大的淋巴结影。双肺门影不大，双肺门区支气管影通畅。左肺下叶前内基底段见小结节影，左肺下叶后基底段见片块状影，大小6.0 cm×3.8 cm，其内密度不均匀，CT值12 Hu、7 Hu，边界不规则。心影不大。未见胸膜腔积液征象。CT定位下经皮肺穿2次，术中抽出黄红色脓性物质，涂片镜检：红细胞+/高倍，白细胞++/高倍，涂片抗酸染色阴性，G染色未见细菌，真菌检查阴性，两次经皮肺穿浓液培养均为星形肺奴卡菌，对复方新诺明敏感。予复方新诺明2 g、3次/d，治疗1周后症状好转，无潮热、多汗，稍有轻微咳嗽。出院后予复方新诺明2 g、3次/d，2～3周复查1次血常规，小便常规，肝功及肾功，治疗2个月，胸部CT检查提示病灶未部分吸收，继续原方案治疗，之后失访，半年后患者门诊复诊，坚持原治疗，但未复查血常规，小便常规，肝、肾功，未诉不适，复查CT，胸部病灶基本吸收，部分纤维化。

### 2　讨论

1891年Eppinger首次报道此菌，我国于1964年报道第1例。奴卡菌可分为星形奴卡菌、鼻疽奴卡菌、南非奴卡菌、短奴卡菌、疫苗奴卡菌等11个致病种，其中星形奴卡菌和鼻疽奴卡菌是最常见的致病菌。本菌广泛分布于土壤，家畜和水中，为条件致病菌；多经呼吸道或皮肤直接侵入，有报道奴卡菌感染73%发生于肺[1]。患者多有基础疾病，或长期服用抑制免疫药物病史，其中基础疾病多是艾滋病[2]。

奴卡菌病临床罕见，其临床表现及影像学检查无特征性表现，易与肺结核和肺部肿瘤等混淆。该患者临床主要表现为午

（下转265页）

【通信作者】 冉　鸿，E-mail：ranhong0424@yahoo.com.cn