DOI:10.16016/j.1000-5404.201506016

hns 基因对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响

冯 伟,夏培元,孙艺璇,孙凤军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科)

[**摘要**] **目的** 建立大肠埃希菌 Red 重组系统无痕敲除方法,探讨 *hns* 基因对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响。**方法** 以大肠埃希菌 MG1655 为研究对象,将 pKD46 质粒转化入 MG1655 感受态细胞。以质粒 pKD3 为模板扩增氯霉素抗性基因片段,并将其转化入 MG1655/pKD46,氯霉素抗性平板筛选阳性克隆。利用 pCP20 质粒删除氯霉素抗性基因,构建 MG1655 *hns* 基因缺失菌株。96 孔板结晶紫染色法分析 MG1655 *hns* 基因缺失株生物膜形成能力的变化。苯酚-硫酸法检测细菌胞外多糖含量。**结果** 氯霉素抗性基因消除后的 *hns* 基因缺失株 PCR 产物长度为 434 bp,测序鉴定正确,成功构建 MG1655 △*hns* 基因缺失株。MG1655 △*hns* 菌株生物膜形成能力和胞外多糖产生显著低于 MG1655($P<0.01$)。**结论** 利用 Red 重组技术成功构建出 MG1655 △*hns* 菌株,*hns* 基因对细菌生物膜的形成具有重要的调控作用。

[**关键词**] 大肠埃希菌;生物膜;胞外多糖;*hns* 基因;基因敲除
[**中图法分类号**] R394-33;R394.2;R378.2 [**文献标志码**] A

Effect of *hns* gene on biofilm formation of *Escherichia coli*

Feng Wei, Xia Peiyuan, Sun Yixuan, Sun Fengjun (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish the scarless knockout method in *Escherichia coli* (*E. coli*) based on the Red recombination system, and study the effect of *hns* gene on biofilm formation of *E. coli*. **Methods** *E. coli* MG1655 was used as the target strain and transformed with plasmid pKD46 by electroporation. The chloramphenicol resistance gene was amplified using template plasmid pKD3, and then introduced into *E. coli* MG1655/pKD46. The strains expressing chloramphenicol resistance gene were selected with chloramphenicol agar plate. The chloramphenicol resistance gene was deleted using plasmid pCP20, and then the MG1655 *hns* gene knockout (△*hns*) strain was constructed. The effect of *hns* gene on biofilm formation of *E. coli* △*hns* strain was analyzed with 96-well crystal violet staining. The content of extracellular polymeric substance (EPS) was determined by phenol-sulfuric acid testing. **Results** The 434 bp product was amplified from MG1655 △*hns* strain after the chloramphenicol resistance gene was deleted, and it was identified by sequencing, indicating that the MG1655 △*hns* strain was successfully constructed. The biofilm formation and EPS production of MG1655 △*hns* strain were significantly lower than that of MG1655 strain ($P<0.01$). **Conclusion** MG1655 △*hns* strain is successfully constructed by Red recombination technology. The *hns* gene plays an important regulatory role in the biofilm formation of *E. coli*.

[**Key words**] *Escherichia coli*; biofilm; extracellular polymeric substance; *hns* gene; gene knockout

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301397). Corresponding author: Sun Fengjun, Tel: 86-23-68765991, E-mail: fengj_sun@163.com

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是临床分离率最高的革兰阴性菌,在医院获得性及社区获得性感染中较为常见。形成生物膜的大肠埃希菌可以逃避抗菌药物和宿主免疫系统的攻击,具有高度的耐药性,并

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81301397)
[**通信作者**] 孙凤军,电话:(023)68765991,E-mail:fengj_sun@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.013.html(2015-11-27)

可在生物膜解离后导致新的感染,这一过程使感染趋于慢性化且难于控制[1-2]。H-NS 是一种小组蛋白相似蛋白,广泛存在于革兰阴性菌中[3]。H-NS 不仅参与基因组装配,而且在基因调控中也起关键作用[4-5]。H-NS 调控的许多基因参与细菌的调整来适应渗透性、pH 等环境变化产生的应激[6]。H-NS 可以抑制大肠埃希菌毒力基因或耐药性基因的转录,不同转录调控子通过减轻或抵消 H-NS 的作用来进行基因表达。有研究表明,H-NS 能够温度依赖性地调节大肠埃希菌生物膜形成相关基因[7]。*hns* 基因缺失能够促进胸膜炎肺炎放线杆菌生物膜形成[8],然而,H-NS 在大肠埃希菌生物膜形成中的作用目前尚少见报道。因此,本研究以大肠埃希菌 MG1655 为研究对象,构建大肠埃希菌 *hns* 基因敲除株,并分析其细菌生物膜形成能力的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌株 大肠埃希菌 BL21/pKD46 由北京军事医学院病原微生物室周冬生馈赠。质粒 pKD3 和 pCP20 由上海意泓生物技术有限公司提供。大肠埃希菌 MG1655 为西南医院国家药物临床试验机构保存菌株。

1.1.2 试剂 氨苄青霉素(ampicillin)、氯霉素(chloramphenicol)、DNA 胶回收纯化试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和 DNA marker 购自北京天根生化科技有限公司,L-(+)-阿拉伯糖、琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司,质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,PCR 引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成,2×Es *Taq* Master Mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司,结晶紫购自 Sigma 公司,冰醋酸购自重庆川东化工有限公司,苯酚购自北京鼎国生物公司,浓硫酸购自成都科龙化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* MG1655/pKD46 菌株的构建 将携带 pKD46 质粒的大肠埃希菌实验室标准株 BL21 接种于 5 mL LB 肉汤(Amp 终浓度为 100 μg/mL)中,30 ℃过夜培养。然后用质粒提取试剂盒提取 pKD46 质粒 DNA。取 6 μL pKD46 DNA 加入 90 μL MG1655 感受态细胞中,冰上预冷 10 min 后,加入到电击杯,于 25 μF,200 Ω,2.5 kV 的电击参数下电击。电击完后,立即加入 900 μL 的 LB 肉汤悬浮细胞,30 ℃培养 1 h。取 100 μL 涂氨苄抗性 LB 平板,30 ℃培养至可见清晰单克隆。挑取单克隆转涂于氨苄抗性 LB 平板,培养适当时间后,刮取少量细菌,洗脱至无菌水中,于 95 ℃变性 10 min,10 000×*g* 室温离心 2 min,取 5 μL 作为模板进行 PCR 鉴定。pKD46 质粒鉴定引物为:pKD46-正义链 5′-GTCTGCTATGTGGTGCTATCTG-3′;pKD46-反义链 5′-GCCAACTTACTTCTGACAACGA-3′。扩增阳性为重组克隆 *E. coli* MG1655/pKD46。

1.2.2 打靶片段的扩增 以 pKD3 质粒为模版进行打靶片段的扩增,扩增两侧含 FRT 位点的氯霉素抗性基因点(FLP 重组酶识别位点)。同源臂打靶序列引物:*hns*-正义链:5′-AAAAAATCCCGCCGCTGGCGGGATTTTAAGCAAGTGCAATCTACAAAAGACATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC-3′;*hns*-反义链:5′-ATTTAAGGCTCTATTATTACCTCAACAAACCACCCCAATATAAGTTTGAGATTACTACAGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA-3′。扩增条件:95 ℃ 5 min,(95 ℃ 30 s、65 ℃ 45 s、72 ℃ 60 s)×21 个循环,(95 ℃ 30 s、55 ℃ 45 s、72 ℃ 60 s)×15 个循环,72 ℃ 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切割目的条带进行胶回收纯化。

1.2.3 *hns* 突变株的构建 将 *E. coli* MG1655/pKD46 接种于 LB 肉汤(含 150 μg/mL Amp)中,30 ℃培养过夜。转接于 100 mL 的含氨苄抗性 LB 肉汤中,30 ℃培养至 *D*(600)为 0.6~0.8,并在培养终止前 2 h 加入 L-(+)-阿拉伯糖,终浓度为 1 mmol/L。4 ℃、4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。用预冷 10% 甘油离心洗涤 3 次,浓缩 100 倍成 1 mL 的感受态细胞,每管 90 μL,于 -70 ℃冻存备用。取 100 ng 纯化的打靶片段加入 MG1655/pKD46 感受态细胞中,轻微混匀,于冰上继续放置 15 min。然后转入电击杯,于 25 μF,200 Ω,2.5 kV 的电击参数下电击。电击完后立即加入 900 μL 的 LB[含 L-(+)-阿拉伯糖,终浓度 1 mmol/L]。于 37 ℃、160 r/min 培养 2 h。取 500 μL 涂布 LB 平板(含 34 μg/mL 氯霉素)。37 ℃培养至可见清晰单克隆。然后用 PCR 筛选鉴定重组克隆,敲除株鉴定引物为:*hns*-out-正义链 5′-CACCCTTGGCACGGAATTTAA-3′;*hns*-out-反义链 5′-CCGCGTCTTTTCTGGCTAATTTT-3′。

1.2.4 MG1655/Δ*hns*/Cm 菌株中氯霉素抗性基因的删除 DH5α/pCP20 接种于 5 mL 的 LB 肉汤(含 100 μg/mL Amp,34 μg/mL 氯霉素)中,30 ℃、220 r/min 培养过夜。然后用质粒提取试剂盒提取 pCP20 质粒。取 1 μL pCP20 质粒加入 90 μL MG1655/Δ*hns*::Cm 感受态细胞中,冰上预冷 10 min 后,加入到电击杯,于 25 μF,200 Ω,2.5 kV 的电击参数下电击。电击完后,立即加入 900 μL 的 LB 肉汤悬浮细胞,30 ℃、160 r/min 培养复苏 2 h。取 10 μL 涂 LB 平板(含 50 μg/mL Amp),30 ℃培养至单克隆形成,使质粒表达重组酶,删除氯霉素抗性基因。挑选生长良好的单个克隆划线接种 LB 平板(无抗性),42 ℃培养过夜,使质粒丢失。

随机选取 7 个克隆,用 *hns*-out-正义链和 *hns*-out-反义链这对引物再次进行 PCR 扩增及测序鉴定。大肠埃希菌 MG1655 *hns* 基因敲除流程见图 1。

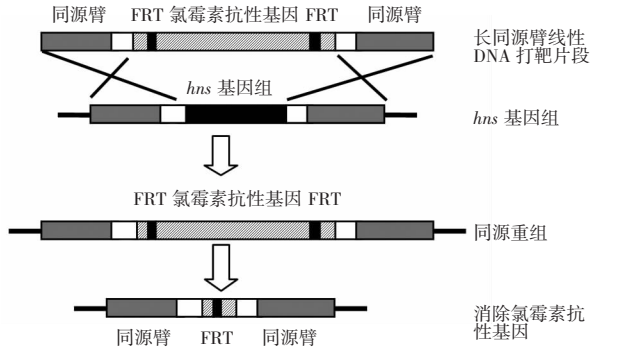


图 1　大肠埃希菌 MG1655 *hns* 基因敲除流程示意图

1.2.5　大肠埃希菌 *hns* 基因敲除株生物膜形成能力的变化　　生物膜形成能力检测采用 96 孔板结晶紫染色法。大肠埃希菌划线接种于 LB 平板培养过夜。挑单菌落于 10 mL LB 培养基中,37 ℃、150 r/min 培养约 18 h。将过夜培养物稀释至 0.5 麦氏单位,再用 LB 肉汤稀释 100 倍。每孔加 100 μL 菌液和 100 μL LB 肉汤,每株菌设置 3 个复孔,37 ℃孵育 24 h。小心去除培养基,用灭菌 PBS 液冲洗 3 次,风干后采用 1% 结晶紫染色 10 min,自来水冲洗至空白对照孔未见明显颜色。通风阴凉处倒置自然晾干,用 100 μL 30% 醋酸溶解,酶标仪 590 nm 处测定光密度值[*D*(590)]。

1.2.6　大肠埃希菌 *hns* 基因敲除株胞外多糖含量测定　　采用苯酚-硫酸法检测细菌胞外多糖[9]。按 1% 接种量将大肠埃希菌过夜培养物转接于 100 mL LB 肉汤中,在 37 ℃、150 r/min 条件下培养 8 h。然后将培养好的菌液倒入 50 mL 离心管,4 ℃、4 000 r/min 下离心 15 min,弃上清。蒸馏水重悬沉淀后加入 300 μL 37% 甲醛溶液,4 ℃保存 3 h。然后加入 20 mL 1 mol/L NaOH,4 ℃再保存 3 h。4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,留取沉淀待查。先用标准葡萄糖溶液为底物制作标准曲线,然后将上述沉淀稀释后按同样的方法进行显色,酶标仪 490 nm 处测定光密度值[*D*(490)],并根据标准曲线计算出相应的多糖含量。

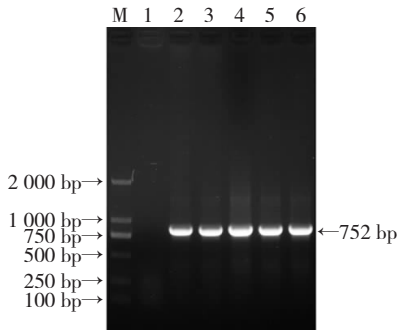
1.3　统计学分析

细菌生物膜形成和胞外多糖含量的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异性采用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$。

2　结果

2.1　MG1655/pKD46 菌株的构建

将 pKD46 质粒转化进入大肠埃希菌 MG1655,氨苄抗性平板筛选阳性克隆。重组克隆通过 PCR 扩增进行鉴定。鉴定结果如图 2 所示,挑取的重组克隆扩增结果均为阳性。

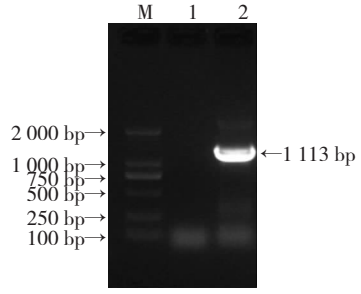


M:DNA 标准;1:阴性对照;2~6:MG1655/pKD46 重组克隆

图 2　*E. coli* MG1655/pKD46 重组克隆 PCR 扩增结果

2.2　打靶片段的扩增

以 pKD3 质粒为模板进行突变盒的扩增,获得氯霉素抗性基因片段,结果如图 3 所示。

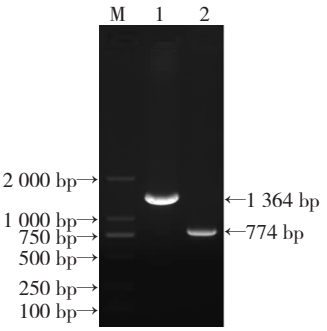


M:DNA 标准;1:阴性对照;2:*hns* 基因打靶片段

图 3　氯霉素抗性基因片段 PCR 扩增结果

2.3　*hns* 突变株的构建

将打靶基因片段转入 MG1655/pKD46,氯霉素抗性平板筛选出发生同源重组的克隆。*hns* 基因敲除前扩增产物长度为 774 bp,而 *hns* 被氯霉素基因替换后扩增长度变为 1 364 bp。重组克隆通过 PCR 扩增进行鉴定。鉴定结果如图 4 所示,挑取的克隆为正确发生重组的转化体。

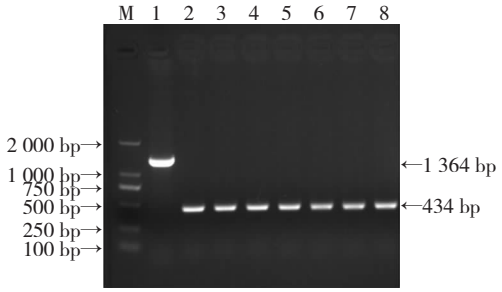


M:DNA 标准;1:重组克隆扩增结果;2:MG1655 原始菌株扩增结果

图 4　*E. coli* MG1655 *hns* 基因敲除 PCR 鉴定结果

2.4 MG1655/Δ*hns*/Cm 菌株中氯霉素抗性基因的消除

随机选取 7 个克隆,用 *hns*-out-正义链和 *hns*-out-反义链这对引物再次进行 PCR 扩增鉴定,氯霉素抗性基因消除的克隆产物长度缩短为 434 bp。结果如图 5 所示,7 个克隆全部为氯霉素抗性删除的阳性克隆,经测序验证序列正确。

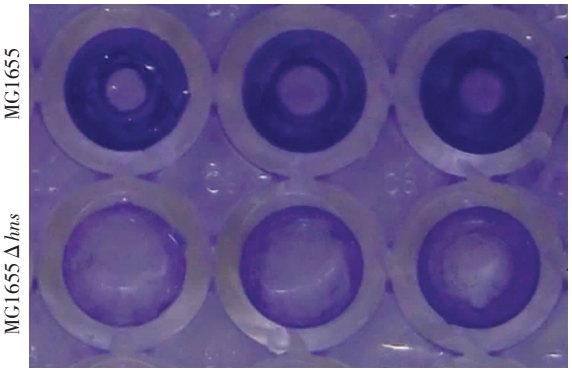


M:DNA 标准;1:阴性对照;2~8:氯霉素抗性基因消除克隆

图 5 *E. coli* MG1655/Δ*hns*/Cm 氯霉素抗性基因消除 PCR 鉴定结果

2.5 大肠埃希菌 *hns* 基因敲除株生物膜形成能力的变化

96 孔板结晶紫染色法观察大肠埃希菌 MG1655 和 *hns* 基因缺失株生物膜形成能力结果如图 6 所示。大肠埃希菌 MG1655 和 MG1655 △*hns* 菌株光密度值分别为(1.47 ± 0.11)和(0.94 ± 0.12)。MG1655 △*hns* 株生物膜形成能力显著低于 MG1655 菌株($P < 0.01$)。



1~3:3 个平行复孔

图 6 结晶紫染色法观察大肠埃希菌 MG1655 和 *hns* 基因缺失株生物膜形成能力

2.6 大肠埃希菌 *hns* 基因敲除株胞外多糖含量测定

大肠埃希菌 MG1655 和 *hns* 基因缺失株胞外多糖含量测定结果显示,大肠埃希菌 MG1655 和 MG1655 △*hns* 菌株胞外多糖含量分别为(363.98 ± 16.22)μg 和(283.07 ± 18.52)μg。*hns* 基因敲除后细菌产胞外多糖的能力显著减弱($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究 MG1655 *hns* 基因敲除株的构建采用 Red 重组系统,该系统利用 λ 噬菌体 3 个蛋白质 Exo、Bet 和 Gam,Gam 抑制大肠埃希菌的 RecBCD 核酸外切酶 V 活性,使外源线形 DNA 不至立即被降解,Exo 和 Bet 引导线性片段与同源区发生重组置换,比传统的同源重组方法效率高几十倍[10]。本研究用含同源臂的 PCR 片段,通过同源重组替换掉 *hns* 基因,构建了 *hns* 缺失的菌株,并用 pCP20 质粒重组酶删除氯霉素抗性基因,完成无痕敲除。该方法具有高效简便的特点,并且由于删除了抗性基因,对细菌的生物学性状的影响降到最小,有利于进一步研究的开展。

H-NS 是一个小类核相关蛋白和转录抑制物,在肠道细菌中表达量丰富[11]。H-NS 参与细菌拟核基因装配,H-NS 与双链 DNA 分子结合,在细胞中紧密缠绕成较致密的不规则小体[3]。在大肠埃希菌中,H-NS 是由 134 个氨基酸残基(大约 15.4×10^3)组成的小蛋白。它由 N-末端寡聚化结构域和 C-末端 DNA 结合结构域通过接头连接组成[12]。H-NS 在调节基因转录、沉默水平获得基因以及包装细菌类核中起关键作用[13-15]。在细菌进化的过程中,很多毒力基因或耐药性基因都是通过基因水平转移获得的,H-NS 能有选择地结合到这些“外源基因”启动子区富含 AT 的碱基序列上,从而对靶基因的转录起抑制作用[13]。这种负调控机制避免了外源基因的过表达,也为这些外源遗传物质整合到细菌基因组并稳定遗传提供了先决条件。H-NS 突变株缺乏寡聚化结构域不再能够抑制基因表达。*hns* 突变株可以显示出多向性的表型,如生长滞后、运动性的缺失、增强对酸应激和渗透压的耐受性和降低毒性[11,16],为研究 H-NS 对大肠埃希菌生物膜形成的影响,我们构建了大肠埃希菌 *hns* 基因缺失株。

本实验结果显示大肠埃希菌 MG1655 *hns* 缺失株生物膜形成能力显著低于野生株,与胸膜炎肺炎放线杆菌 *hns* 突变株生物膜形成能力增加结果相反[8],其原因可能是菌株的不同,调控的基因不同。研究发现大肠埃希菌的细胞外多糖减少,提示 *hns* 可能通过抑制胞外多糖合成基因 icaA 的表达而抑制大肠埃希菌生物膜形成。由于 H-NS 具有广泛的调节作用,所以我们推测 H-NS 可能还对调控生物膜形成的其他相关基因具有调节作用,而生物膜形成能力降低和胞外多糖的减少可能是 H-NS 调控生物膜相关基因整体的一

个综合的结果,目前相关的研究报道较少,构建敲除株后将为进一步研究其机制奠定基础。

参考文献:

[1] Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, *et al*. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria[J]. Science, 2011, 334(6058): 982 – 986. DOI:10.1126/science.1211037

[2] Kawarai T, Furukawa S, Narisawa N, *et al*. Biofilm formation by Escherichia coli in hypertonic sucrose media[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(6): 630 – 635. DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.01.018

[3] Tendeng C, Bertin P N. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(11): 511 – 518.

[4] Dorman C J. Horizontally acquired homologues of the nucleoid-associated protein H-NS: implications for gene regulation [J]. Mol Microbiol, 2010, 75(2): 264 – 267. DOI:10.1111/j.1365-2958.2009.06996.x

[5] Stoebel D M, Free A, Dorman C J. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 9): 2533 – 2545. DOI:10.1099/mic.0.2008/020693-0

[6] Hommais F, Krin E, Laurent-Winter C, *et al*. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS[J]. Mol Microbiol, 2001, 40(1): 20 – 36.

[7] White-Ziegler C A, Davis T R. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in Escherichia coli K-12[J]. J Bacteriol, 2009, 191(3): 1106 – 1110. DOI:10.1128/JB.00599-08

[8] Dalai B, Zhou R, Wan Y, *et al*. Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of Actinobacillus pleuropneumoniae[J]. Microb Pathog, 2009, 46(3): 128 – 134. DOI:10.1016/j.micpath.2008.11.005

[9] 陈盛, 余加林, 何念海, 等. 巯乙磺酸钠对大肠杆菌生物膜早期黏附及胞外聚合物的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(24): 2554 – 2557.

[10] Copeland N G, Jenkins N A, Court D L. Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 769 – 779. DOI:10.1038/35093556

[11] Atlung T, Ingmer H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression[J]. Mol Microbiol, 1997, 24(1): 7 – 17.

[12] Arold S T, Leonard P G, Parkinson G N, *et al*. H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(36): 15728 – 15732. DOI:10.1073/pnas.1006966107

[13] Fang F C, Rimsky S. New insights into transcriptional regulation by H-NS[J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(2): 113 – 120. DOI:10.1016/j.mib.2008.02.011

[14] Ali S S, Xia B, Liu J, *et al*. Silencing of foreign DNA in bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2012, 15(2): 175 – 181. DOI:10.1016/j.mib.2011.12.014

[15] Navarre W W, McClelland M, Libby S J, *et al*. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA [J]. Genes Dev, 2007, 21(12): 1456 – 1471. DOI:10.1101/gad.1543107

[16] Bertin P, Hommais F, Krin E, *et al*. H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism[J]. Biochimie, 2001, 83(2): 235 – 241.

(**收稿**:2015-06-04;**修回**:2015-07-20)

(编辑 张 维)