DOI:10.16016/j.1000-5404.201507101

肺炎克雷伯菌突变株 *Δrcs*B 的构建及其菌株超粘性与生物膜表型

周锡鹏,薛 健,杨弦弦,罗 美,徐 萱,卿 颖,李迎丽,邱景富 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生与管理学院,医学与社会发展研究中心,健康领域社会风险预测治理协同创新中心)

[**摘要**] **目的** 构建肺炎克雷伯菌 rcsB 基因缺失的无痕突变株和回补株,通过对突变株的超粘性和生物膜表型进行分析,探讨转录调控子 RcsB 对细菌超粘性和生物膜形成能力的影响。**方法** 首先构建突变株 *Δrcs*B,PCR 扩增 rcsB 基因上下游同源臂片段,克隆到质粒 pKO3-Km 上,将重组质粒导入肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 中,经同源重组后筛选得到无痕突变株。然后构建回补株,扩增 rcsB 基因片段,克隆到质粒 pBAD33 上,将重组质粒导入突变株 *Δrcs*B 中,得到回补株。测定野生株、突变株、回补株的超粘性和生物膜形成能力。**结果** 成功构建 rcsB 基因缺失的无痕突变株 *Δrcs*B 和回补株 C-*Δrcs*B。与野生株相比,突变株超粘性和生物膜形成能力均减弱,回补株介于野生株和突变株之间。**结论** 转录调控子 RcsB 对肺炎克雷伯菌超粘性和生物膜形成具有正向调控作用。

[**关键词**] 肺炎克雷伯菌;rcsB;超粘性;生物膜
[**中图法分类号**] R372;R378.996;R394.3 [**文献标志码**] A

Construction of *Klebsiella pneumoniae* mutant *Δrcs*B and its hypermucoviscosity and biofilm formation ability

Zhou Xipeng, Xue Jian, Yang Xianxian, Luo Mei, Xu Xuan, Qing Ying, Li Yingli, Qiu Jingfu (Research Center for Medicine and Social Development, Innovation Center for Social Risk Governance in Health, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of rcsB gene on hypermucoviscosity and biofilm formation ability of *Klebsiella pneumoniae* by constructing unmarked rcsB-deletion mutant and rcsB complementation strain. **Methods** First, unmarked rcsB-deletion mutant was constructed. The upstream and downstream flanking DNA fragments of rcsB gene were amplified by PCR and then cloned into plasmid pKO3-Km. The recombinant plasmid was transferred into *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. After homologous recombination, unmarked rcsB-deletion mutant was screened. Second, the complementation strain was constructed. The rcsB fragment was amplified and cloned into plasmid pBAD33, and then the recombinant plasmid was transferred into rcsB-deletion mutant to get the complementation strain. The hypermucoviscosity and biofilm formation ability were tested. **Results** The unmarked rcsB-deletion mutant and complementation strain were constructed successfully. The results showed that the hypermucoviscosity and biofilm formation ability of the mutant were decreased, while the hypermucoviscosity and biofilm formation of the complementation strain was between the wild strain and the mutant. **Conclusion** The transcription factor RcsB positively regulates the hypermucoviscosity and biofilm formation ability of *Klebsiella pneumonia*.

[**Key words**] *Klebsiella pneumonia*; rcsB; hypermucoviscosity; biofilm

Supported by the the National Natural Science Foundation of China (31200064, 31071093, 31170129). Corresponding author: Li Yingli, E-mail: liylyl@126.com

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)为革兰阴性杆菌,近年来常常引起社区获得性感染和院内感染,是一种重要的条件致病菌[1]。其毒力因子主要包括荚膜多糖[2]、脂多糖[3]、菌毛[4]、铁摄入因子[5-6]等。荚膜多糖是最基本的毒力因子,其在菌体的表面聚集成复合物(荚膜),使细菌具有粘性,在防御机制中可介导细菌逃避或抵抗宿主天然免疫的杀伤。而肺炎克雷伯菌因菌株表面含有丰富的多糖类物质,使细菌具

[**基金项目**] 国家自然科学基金(31200064,31071093, 31170129)
[**通信作者**] 李迎丽,E-mail:liylyl@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1355.040.html(2015-12-04)

有特有的超粘性表型[7]。荚膜多糖亦在生物膜形成中发挥重要作用[8],生物膜的形成是细菌致病性与产生耐药性的原因之一[9]。在大肠杆菌 k-12 中,转录调控子 RcsB 是参与荚膜多糖合成必不可少的条件之一[10],本研究通过构建肺炎克雷伯菌 rcsB 基因缺失的突变株与回补株,分析转录调控子 RcsB 对肺炎克雷伯菌超粘性和生物膜形成的调控作用,为进一步了解肺炎克雷伯菌的致病机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 肺炎克雷伯菌株 NTUH-K2044 和质粒 pKO3-Km(卡那霉素抗性)[11]均由国立台湾大学馈赠,大肠杆菌 DH5α 和质粒 pBAD33(氯霉素抗性)由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 dNTPs、*Ex Taq* DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、DNA 分子量标准物均购自宝生物工程大连有限公司;PCR 产物(胶)回收试剂盒为 Qiagen 公司产品;限制性内切酶 *Not* Ⅰ、T4 DNA 连接酶、*Kpn* Ⅰ内切酶、*Sal* Ⅰ内切酶为 New England Biolabs 公司产品;其他的生化试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 构建 rcsB 基因缺失的突变株 根据菌株 NTUH-K2044 的 rcsB 基因上下游序列,设计引物(表 1),扩增得到 rcsB 基因侧翼序列。然后用该产物作为模板,用引物对 KP_RcsB_A/D 进行 PCR,得到缺失 rcsB 基因的同源臂融合片段。回收纯化后的同源臂融合片段和质粒 pKO3-Km 分别用限制性内切酶 *Not* Ⅰ进行酶切,之后用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,取转化产物涂于 LB 平板(含 50 μg/mL km)上,30 ℃培养至长出单菌落。PCR 筛选重组质粒 pKO3-Km-rcsB,重组质粒 pKO3-Km-rcsB 转化入 NTUH-K2044 感受态细胞[12],经过同源重组,PCR 鉴定筛选出突变株 Δ*rcs*B。

1.2.2 构建回补株 C-Δ*rcs*B 根据肺炎克雷伯菌株 NTUH-K2044 的 rcsB 基因序列设计引物(表 1),PCR 扩增得到 rcsB 基因片段,利用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ对 rcsB 基因片段和质粒 pBAD33 分别进行双酶切。将酶切后的基因片段和质粒以适当比例混合,用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,涂布于 LB 平板(含 35 μg/mL Cm),37 ℃培养至长出单菌落。PCR 筛选含有重组质粒 pBAD33-rcsB 的转化子,再将重组质粒 pBAD33-rcsB 转入突变株 Δ*rcs*B 的感受态细胞,37 ℃培养至长出单菌落。PCR 筛选出含有重组质粒的菌株,即为回补株 C-Δ*rcs*B。

1.2.3 粘度实验 肺炎克雷伯菌菌株表面含有丰富的多糖类物质,它赋予了细菌具有超粘性表型,保护细菌免受宿主的免疫系统攻击。超粘性表型是肺炎克雷伯菌特有表型。根据超粘性的强弱可以初步推测菌株毒力强弱[13]。

1.2.3.1 沉淀离心实验 用接种环挑取单菌落接种在 LB 肉汤中(回补株菌体培养时加入 1.5% 阿拉伯糖诱导),37 ℃、200 r/min 振荡培养至 *OD*600 为 2.0 左右。收集菌体,5 200 r/min 离心 15 min 后观察上层液体的透明度,之后取上层液体测 *OD*600[2,7]。

1.2.3.2 超粘性实验 在 5% 绵羊血平板上划线,37 ℃培养 16 h,用接种环可以使血平板上单菌落拉丝长度 >5 mm,判定为超粘性阳性菌株。否则为超粘性阴性菌株[7,13]。

1.2.4 荚膜染色观察 荚膜是肺炎克雷伯菌新陈代谢所产生的细胞外物质,主要成分为多糖,荚膜多糖是使细菌具有超粘性的主要物质。因荚膜折射率低,对染料亲和力低,不易着色,常用 Anthony 荚膜染色法染色。培养的菌液制成涂片后在空气中干燥,用 1% 的结晶紫水溶液染色 1 min,以 20% 的硫酸铜水溶液冲洗,可以使背景及菌体呈色而荚膜无色[14]。

1.2.5 生物膜表型实验 将细菌接种于 5 mL LB 肉汤,37 ℃ 200 r/min 培养至 *OD*600 = 1.0 左右,将菌液 50 倍稀释至 LB 肉汤中,再分装至小试管中,每管 2 mL。按 37 ℃ 150 r/min 培养 12、24、36 h,每个时间点每株菌设置 3 个重复。

表 1 本文突变株和回补株构建鉴定引物

引物名称	序列(5′→3′)	扩增产物	长度(bp)
KP1_3872_RcsB_A	GTATGCGGCCGCTATCGTCCTGCTGGATGTG	上游同源臂	675
KP1_3872_RcsB_B	CAGCGAGACGGAAGAGAGGTAGTGACTTACGAATACCGAACAG		
KP1_3872_RcsB_C	CTGTTCGGTATTCGTAAGTCACTACCTCTCTTCCGTCTCGCTG	下游同源臂	652
KP1_3872_RcsB_D	GTATGCGGCCGCATGGTCATCTTCTGTCGCC		
KP1_3872_RcsB_RT_F	GCGGCTATGGCGATAAACG	基因内部序列	200
KP1_3872_RcsB_RT_R	GCGAGACGGAAGAGAGGTAG		
KP1-3552-rcsB-HB-KpnI-P-F	TCCGGTACCAGGAGGAATTCACCATGAACACTATGAACGTAATT	rcsB 基因序列	651
KP1-3552-rcsB-HB-SalI-P-R	ACGCGTCGACTTACTCTTTGTCCGTCG		

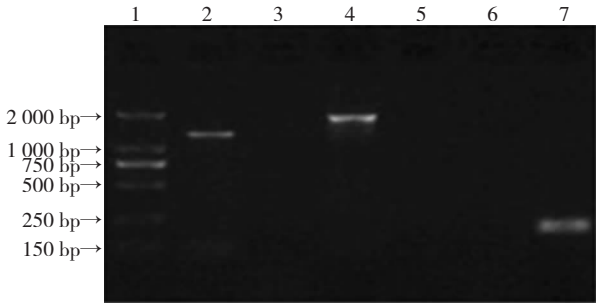
波浪线标记的碱基为限制性内切酶 *Not* Ⅰ的酶切位点,单下划线标记的碱基为限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ的酶切位点,双下划线标记的碱基为限制性内切酶 Sal Ⅰ的酶切位点

将菌液转移至 5 mL 试管中,吹打混匀,测定 *OD*600。试管用 2 mL 去离子水洗 3 次,洗去游离菌体,然后加入 3 mL 0.1% 结晶紫溶液,染色 30 min。弃去结晶紫,用 3 mL 去离子水洗试管 5 次。待试管干燥后,拍照染色后的生物膜。

2　结果

2.1　突变株的构建

PCR 筛选鉴定 rcsB 基因突变株。用 KP1_3872_RcsB_A/D 作为引物对,以突变株基因组 DNA 作为模板时,PCR 扩增得到 1 282 bp 片段(图 1,泳道 2),比以野生株为模板时的 PCR 片段 1 867 bp (泳道 4)缺少了长度为 585 bp 的 rcsB 基因片段。用 rcsB 基因片段上的引物对 KP1_3872_RcsB_RT_F/R 扩增时,突变株应无扩增引物(泳道 5),而以野生株为阳性对照可得到大小为 200 bp 的片段(泳道 7)。由图 1 可见,电泳结果与理论值相符合,表明突变株 Δ*rcs*B 构建成功。



1:DNA 标志物 DL 2000; 2:以突变株 Δ*rcs*B 为模板,以 KP1_3872_RcsB_A/D 为引物对的 PCR 产物; 4:以野生株为模板,以 KP1_3872_RcsB_A/D 为引物对的 PCR 产物; 5:以突变株 Δ*rcs*B 为模板,以 KP1_3872_RcsB_RT_F/R 为引物对的 PCR 产物; 7:以野生株为模板,以 KP1_3872_RcsB_RT_F/R 为引物对的 PCR 产物; 3、6:阴性对照

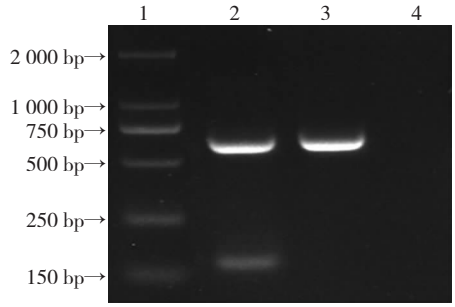
图 1　PCR 鉴定突变株 Δ*rcs*B 的电泳图

2.2　回补株的构建

PCR 鉴定回补株 C-Δ*rcs*B,用 KP1_3552_rcsB_HB_KpnI_P_F 和 KP1_3552_rcsB_HB_SalI_P_R 作为引物对,以回补株基因组 DNA 作为模板时,PCR 扩增得到 651 bp 片段(图 2,泳道 2),与以野生株为模板时的 PCR 片段 651 bp(泳道 3)一样。由图 2 可见,电泳结果与理论值相符合,表明回补株 C-Δ*rcs*B 构建成功。

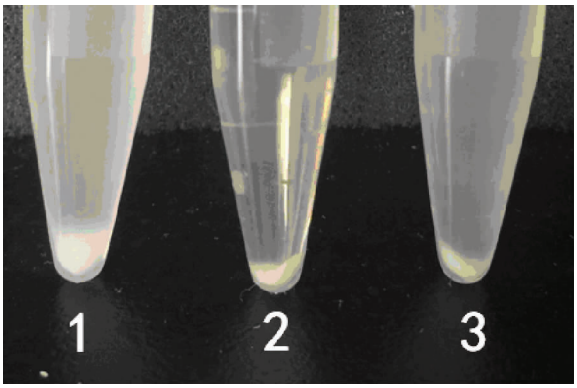
2.3　粘度测定

与野生株相比,突变株 Δ*rcs*B 菌体更容易离心沉淀下来,上层液体更清亮,回补株介于两者之间(图 3)。取上层液体测定 *D*(600),突变株 *D*(600) = 0.045,野生株 *D*(600) = 1.427,回补株 *D*(600) = 0.874,进一步表明突变株的粘度减弱,从而菌体更容易离心沉淀。回补株因携带了表达 rcsB 基因的质粒,其粘度表型得到了部分恢复。



1:DNA 标志物 DL 2000; 2:以回补株 C-Δ*rcs*B 为模板,以 KP1-3552-rcsB-HB-Kpn Ⅰ-P-F 和 KP1-3552-rcsB-HB-Sal Ⅰ-P-R 为引物对的 PCR 产物; 3:以野生株为模板,以 KP1-3552-rcsB-HB-Kpn Ⅰ-P-F 和 KP1-3552-rcsB-HB-Sal Ⅰ-P-R 为引物对的 PCR 产物; 4:阴性对照

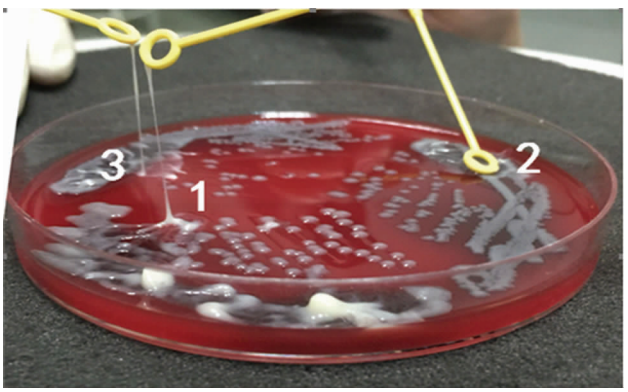
图 2　PCR 鉴定回补株 C-Δ*rcs*B 的电泳图



1:野生株; 2:突变株 Δ*rcs*B; 3:回补株 C-Δ*rcs*B

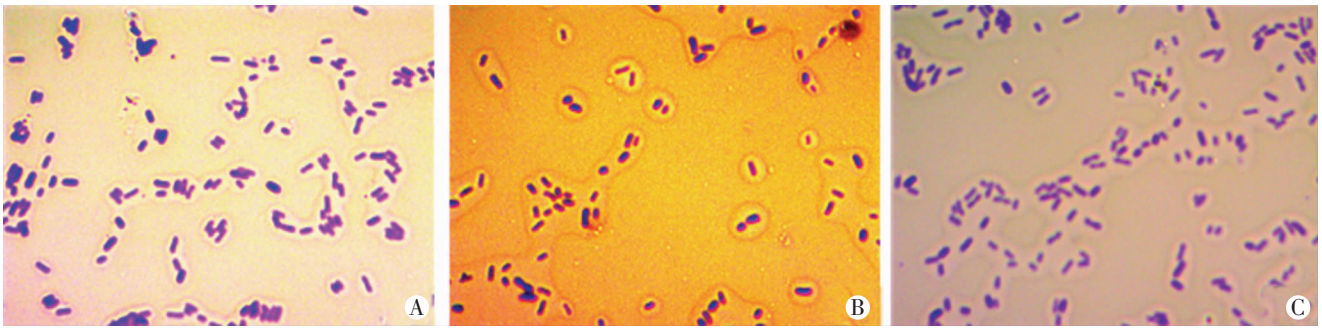
图 3　离心沉淀结果

取野生株、突变株和回补株的典型菌落,同时在 5% 绵羊血平板上划线,37 ℃培养 16 h 后,用接种环对血平板上的单菌落进行拉丝实验。结果如图 4 所示,可见野生株和回补株 C-Δ*rcs*B 拉丝长度均 >5 mm,突变株 Δ*rcs*B 拉丝长度 <5 mm,表明突变株 Δ*rcs*B 超粘性减弱。据此可以初步推测突变株毒力减弱。



1:野生株; 2:突变株 Δ*rcs*B; 3:回补株 C-Δ*rcs*B

图 4　超粘性实验结果



A:野生株; B:突变株 Δ*rcs*B; C:回补株 C-Δ*rcs*B

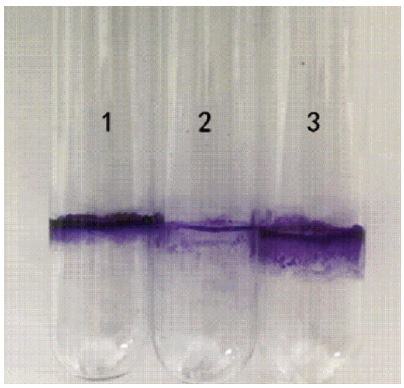
图 5 荚膜染色镜检

2.4 荚膜染色镜检

荚膜经 Anthony 荚膜染色法染色后在显微镜(100 倍油镜)下观察,结果如图 5,从图中可以看出野生株、突变株 Δ*rcs*B、回补株 C-Δ*rcs*B 荚膜在形态学上没有明显差异。

2.5 生物膜表型分析

用玻璃试管培养菌体,具有生物膜形成能力的菌株可在固体介质表面形成生物膜,通过结晶紫染色法可测定生物膜形成能力。以 12、24、36 h 为 3 个时间点,测定生物膜形成量,每株菌每个时间点 3 个重复。以野生株为对照,观察突变株和回补株的生物膜形成量,结果见图 6 从图中可以看出突变株的生物膜形成能力明显比野生株弱,回补株介于两者之间。



1:野生株; 2:突变株 Δ*rcs*B; 3:回补株 C-Δ*rcs*B

图 6 结晶紫染色法测定生物膜形成量

3 讨论

肺炎克雷伯菌是临床上引起医源性感染的重要条件致病菌之一,能引起肺炎、菌血症以及尿路感染等病症,严重时危及人的生命[15]。荚膜多糖是其最基本的毒力因子,它能够促进细菌与细胞表面或细菌之间的粘附,进而使细菌粘度增加,同时也促进生物膜的形成[16]。本文研究结果表明 rcsB 可能参与肺炎克雷伯菌荚膜多糖的调控。沉淀离心实验结果显示 rcsB 基因缺失株与野生株相比,粘度降低,使细菌更容易离心沉淀,说明在 rcsB 基因缺失的条件下荚膜多糖可能发生改变;rcsB 基因回补后,粘度加强,荚膜多糖合成能力得到恢复。超粘性实验中,突变株拉丝长度明显 <5 mm,基因回补后,拉丝长度 >5 mm,其超粘性得到恢复。而超粘性与菌株的毒力又是正相关的,据此我们也可以初步推测 rcsB 基因缺失株毒力可能减弱。进一步将荚膜染色后镜检发现野生株、突变株 Δ*rcs*B、回补株 C-Δ*rcs*B 荚膜在形态学上没有看到明显差异。推测突变株 Δ*rcs*B 粘性发生改变可能不是荚膜多糖数量上的改变,而是荚膜多糖的成分或结构发生了变化。在生物膜表型实验中,rcsB 基因缺失株生物膜形成能力明显减弱,基因回补后,生物膜形成能力也得到恢复,这说明 rcsB 可能参与生物膜形成能力的调控。

综上所述,rcsB 基因可能参与调控肺炎克雷伯菌荚膜多糖的合成和生物膜的形成从而影响其毒力。深入研究 rcsB 在肺炎克雷伯菌毒力和生物膜形成中的作用,对防治肺炎克雷伯菌感染具有重要的理论研究意义。

参考文献:

[1] Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of Klebsiella pneumoniae infections in the community[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(5): 385 - 389. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2007.06.019

[2] Chuang Y P, Fang C T, Lai S Y, *et al*. Genetic determinants of capsular serotype K1 of Klebsiella pneumoniae causing primary pyogenic liver abscess[J]. J Infect Dis, 2006, 193(5): 645 - 654. DOI:10.1086/499968

[3] Cortes G, Borrell N, de-Astorza B, *et al*. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia[J]. Infect Immun, 2002, 70(5): 2583 – 2590.

[4] Struve C, Bojer M, Krogfelt K A. Identification of a conserved chromosomal region encoding Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity[J]. Infect Immun, 2009, 77(11): 5016 – 5024. DOI:10.1128/IAI.00585 – 09

[5] Hsieh P F, Lin T L, Lee C Z, *et al*. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in Klebsiella pneumoniae causing primary pyogenic liver abscess [J]. J Infect Dis, 2008, 197(12): 1717 – 1727.

[6] Ma L C, Fang C T, Lee C Z, *et al*. Genomic heterogeneity in Klebsiella pneumoniae strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection[J]. J Infect Dis, 2005, 192(1): 117 – 128.

[7] Fang C T, Chuang Y P, Shun C T, *et al*. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications[J]. J Exp Med, 2004, 199(5): 697 – 705.

[8] Wu M C, Lin T L, Hsieh P F, *et al*. Isolation of genes involved in biofilm formation of a Klebsiella pneumoniae strain causing pyogenic liver abscess[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23500. DOI:10.1371/journal.pone.0023500

[9] Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(4): 589 – 603.

[10] Brill J A, Quinlan-Walshe C, Gottesman S. Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in Escherichia coli K-12[J]. J Bacteriol, 1988, 170(6): 2599 – 2611.

[11] Pan Y J, Fang H C, Yang H C, *et al*. Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(7): 2231 – 2240. DOI:10.1128/JCM.01716 – 07

[12] 郑艳, 刘喜朋,刘建华. 外源载体高效转化肺炎克雷伯菌的新途径[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 721 – 724.

[13] Lin Y C, Lu M C, Tang H L, *et al*. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental Klebsiella pneumoniae infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain[J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 50. DOI:10.1186/1471 – 2180 – 11 – 50

[14] 凌云, 肖智杰, 连宾. 胶质芽孢杆菌荚膜染色方法的比较与改进[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2007, 30(4): 84 – 88.

[15] Cheng H Y, Chen Y S, Wu C Y, *et al*. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in Klebsiella pneumoniae CG43[J]. J Bacteriol, 2010, 192(12): 3144 – 3158. DOI:10.1128/JB.00031 – 10

[16] Costerton J W, Cheng K J, Geesey G G, *et al*. Bacterial biofilms in nature and disease[J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 435 – 464.

(**收稿**:2015-07-17;**修回**:2015-10-11)

(编辑 邓强庭)