

# 利用转座子 Tn917 构建单核细胞增生李斯特菌菌膜形成突变株

陈永辉 史贤明\*

(上海交通大学农业与生物学院 食品安全研究中心 上海 201101)

**摘 要** 单核细胞增生李斯特菌菌膜形成相关基因和调控因子的分离和鉴定是阐明其菌膜形成分子机理的基础。利用原生质体转化这一方式,将带有转座子 Tn917 的质粒 pTV1-OK 成功地转进了单核细胞增生李斯特菌。通过诱导 Tn917 转座,得到单核细胞增生李斯特菌 Tn917 插入突变库,转座率为  $10^{-7}$ 。经 96 孔细胞培养板筛选发现,菌株 LM-49 形成菌膜能力明显大于野生型。该菌株在细胞培养板中培养 4d 后形成的紫色圆环的颜色明显深于野生型。用 Tn917 特异引物进行 PCR 扩增,结果显示只有以该突变株的 DNA 为模板才能得到相应大小的扩增产物,证实该菌株基因组中有 Tn917 插入。Tn917 的插入使菌株 LM-49 的菌膜形成能力增强。

**关键词** 单核细胞增生李斯特菌 菌膜 Tn917

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)06-0952-03

细菌在一定条件下可以吸附在特定表面并增殖形成膜状结构,这种吸附群体称为菌膜(Biofilm)<sup>[1]</sup>。菌膜是细菌对抗不利环境的一种自我保护机制,它可以是单层的细菌群体也可以是有精细三维结构的膜状物<sup>[2]</sup>。据 Costerton 等研究,在大多数自然环境、临床和工业生产环境中,细菌主要以菌膜状态存在,不同于实验室培养物中的单细胞游离状态<sup>[3]</sup>。由于两者所处的状态不同,以游离细胞为对象研究所获得成果难以指导解决生产实际中由菌膜引发的问题。

根据美国 CDC 的统计,临床上 65% 的人类细菌性感染都与菌膜有关。处于菌膜状态的细菌对抗生素、消毒剂以及免疫系统等比游离状态有更强的抵抗力。Fux 等<sup>[4]</sup>研究表明,由外到内,菌膜细菌对抗生素的敏感性逐渐降低。与此类似,食品生产中也存在着大量的菌膜,给彻底杀菌造成障碍,从而容易导致食品污染,甚至食品中毒。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是一种革兰氏阳性菌,能引起人类的脑膜炎、流产等疾病<sup>[5]</sup>。近年来,由单核细胞增生李斯特菌引起的食品安全事件越来越受到人们的重视。Mafu 等<sup>[6]</sup>的研究结果表明,此菌能在多数固体表面形成菌膜,常导致食品加工环境以及食品本身污染或再污染,甚至引起食物中毒<sup>[7,8]</sup>。同时,菌膜还有可能是其它致病菌及腐败微生物的藏身之所<sup>[9]</sup>。因此,研究菌膜的形成机制,对防止和控制食品腐败和食物中毒具有重要意义。

在细菌菌膜的形成过程中,基因的表达调控会发生变化,目前已确定了一些同菌膜形成相关的基因及调控因子<sup>[10-12]</sup>。基因产物主要有运动能力相关蛋白、胞外结构物质和胞外多糖等<sup>[13]</sup>。但是同单核细胞增生李斯特菌菌膜形成的相关基因还未见报道。基于单核细胞增生李斯特菌在食品安全中的重要性,有必要对其菌膜形成相关基因开展一些

分离和鉴定研究。

带有 Tn917 的 pTV1-OK 质粒在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中均可复制,且复制受温度控制(28~30℃时可复制,而在 37~42℃则不能复制),因此,可在转座子阻断法中加以使用。此方法是一种常用的新基因鉴定方法,从细菌到高等植物都有广泛应用<sup>[10]</sup>。本文的研究目标是利用转座子 Tn917 来筛选单核细胞增生李斯特菌菌膜形成突变子,为寻找和鉴定其菌膜形成相关基因奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)由本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) RR1(含载体 pTV1-OK)由美国 Florida 大学 Crowley 教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:***Eco*R I 及 *Kpn* I 内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶均购于 TaKaRa 公司;卡那霉素(Kan)、红霉素(Erm)购于上海华美生物公司;引物合成于上海生工生物工程技术有限公司;其他国产化学试剂均购于上海国药集团化学试剂公司。Beckman DU800 紫外分光光度计(Beckman 公司),PTC-200 PCR 仪(MJ 公司)。

### 1.2 培养基和培养条件

单核细胞增生李斯特菌的活化及菌膜培养均用 TSB (Tryptic Soy Broth)培养基,培养温度为 37℃,转化后的原生质体用 DM3<sup>[14]</sup>平板于 28℃静置培养 4d;*E. coli* RR1 的活化及培养使用 LB 培养基,培养温度为 28℃,转速为 180r/min。

### 1.3 质粒 pTV1-OK 的提取和鉴定

质粒的提取及纯化方法参考文献[15]。质粒上有单一的 *Eco*R I 酶切位点及两个 *Kpn* I 酶切位点(图略),质粒提取

基金项目:国家“十五”奶业重大专项课题“乳品质量安全监测关键技术研究与应用”(2002BA518A-06)

\* 通讯作者。Tel: 86-21-64783841; E-mail: xmsi@sjtu.edu.cn

作者简介:陈永辉(1977-),男,浙江人,硕士研究生,主要研究方向为食品安全。E-mail: cyh@sjtu.edu.cn

收稿日期:2005-04-26,修回日期:2005-05-26

纯化后分别经 *Eco*R I 及 *Kpn* I 酶切以证实为 pTV1-OK。

#### 1.4 单核细胞增生李斯特菌的转化<sup>[14]</sup>和转化子的转座诱变

参照文献 [14] 进行原生质体转化。从平板菌落中挑取几个转化子到新鲜的含有红霉素(5 $\mu$ g/mL)的 TSB 中,28℃ 培养 2 d,分别取 5 $\mu$ L、10 $\mu$ L、20 $\mu$ L、100 $\mu$ L 加入到新鲜的 5 mL TSB 中于 41℃ 水浴过夜,进行转座诱导,详见参考文献 [16]。

#### 1.5 单核细胞增生李斯特菌菌膜形成突变株筛选

活化 -72℃ 保存的所有转座子,转入新鲜的 TSB 培养基中培养,当培养物的 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.8 时,取菌液 0.5 mL 与 3 mL 的稀释 10 倍的 TSB 混合,然后取 250 $\mu$ L 的稀释菌液加入到 96 孔细胞培养板中,培养 4 d。菌膜形成量的测量方法参考 Djordjevic 等<sup>[17]</sup>的方法。选取菌膜形成量与野生型相差较大的菌株,与野生型一起在 96 孔培养板上培养 5 d,每天测定比较它们的 *OD*<sub>595</sub> 值,进一步确认。

#### 1.6 突变株 Tn917 插入的 PCR 验证

提取野生型及突变株的 DNA,针对 Tn917 设计引物,序列如下:ERML 5'-AACGACGAACTGGCTAA-3'; Tn917R 5'-AGATGGAGCTGTCGACTCAG-3',PCR 反应条件:95℃ 5min; 94℃ 30s,53℃ 30s,72℃ 2min,35 个循环,72℃ 8min。

## 2 结果

#### 2.1 单核细胞增生李斯特菌原生质体的转化

pTV1-OK 质粒带有红霉素及卡那霉素的抗性基因,因此能在含有 5 $\mu$ g/mL 红霉素和 50 $\mu$ g/mL 卡那霉素的 DM3 平板培养生长的即为阳性转化子。原生质体涂布培养 4 d 后,在 DM3 平板上长出有 20 个阳性菌落,其形态与野生型的菌落相同。

#### 2.2 转座诱变

各稀释度转座频率分别为  $0.17 \times 10^{-7}$  (5 $\mu$ L)、 $0.97 \times 10^{-7}$  (10 $\mu$ L)、 $0.23 \times 10^{-7}$  (20 $\mu$ L)、 $0.32 \times 10^{-7}$  (100 $\mu$ L),以 1:500 稀释度的转座效率为最高。将单抗平板上的菌落分别点种在 Erm 单抗平板和 Erm、Kan 双抗平板的对应位置。在诱变过程中完整的 pTV1-OK 质粒在 41℃ 下过夜时不能复制而丢失,所以在单抗中生长而在双抗平板中未长的菌株即为插入 Tn917 的菌株,而在双抗平板上长出的应当是整个质粒插入到单核细胞增生李斯特菌的染色体中的菌株。

#### 2.3 利用 96 孔培养板筛选菌膜形成突变株

利用 96 孔培养板对细菌进行培养,对培养 4 d 后的菌膜染色及脱色后,测各菌株的 *OD*<sub>595</sub> 值,筛选到一株(LM-49)菌膜的量大于野生型的菌株。图 1-A 即为菌株 LM-49 与野生型培养 5 d 当中菌膜形成量的测定值,从图 1-A 可以看出 LM-49 号形成菌膜的能力要大于野生型。而图 1-B 则是以相同的培养条件下野生型与 LM-49 菌株在培养 4 d 后形成的菌膜用结晶紫染色后的照片,从中可以明显的看出,左边的 LM-49 所形成的紫色菌膜颜色要明显深于野生型,说明所筛选到的这一株菌的菌膜形成能力要大于野生型。

#### 2.4 Tn917 插入突变的验证

图 2 所示,只有以质粒及 LM-49 DNA 为模板的 PCR 产物

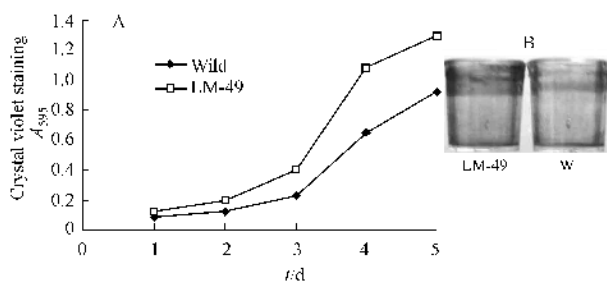


图 1 (A) LM-49 与野生型菌膜形成量 (B) 培养板上的紫色圆环  
Fig.1 (A) Biofilm formation of LM-49 and wild strain (B) Purple ring on the microtiter plate

才有条带,说明在 LM-49 的基因组中插入了 Tn917,证实了菌膜形成能力的提高是由于 Tn917 插入导致的。

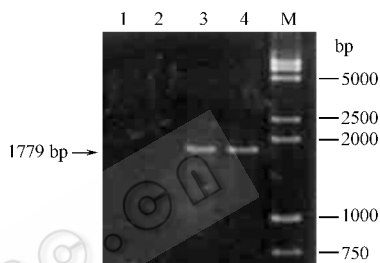


图 2 PCR 验证 Tn917 的插入

Fig.2 PCR confirmation of Tn917 insertion

1. Negative control; 2. PCR product from total DNA of the wild as template; 3. PCR product from total DNA of the LM-49 strain as template; 4. pTV1-OK as template; M. Wide Range DNA Ladder Marker.

## 3 讨论

利用细胞培养板来培养菌膜是目前各实验室开展细菌菌膜形成机制研究的常用方法。此法能方便简易直观地比较不同菌株形成菌膜的能力。细菌在培养板中生长时,位于液体培养基与空气交界的地方是细菌最易粘附的场所,所以当用结晶紫染色后在交界处往往可以看到一圈紫色的圆环,而紫色的深浅则直接反映了形成菌膜能力的差别。因此可以用这种观感评价方法来快速的筛选菌膜形成突变菌株。如图 1-B 所示,LM-49 的菌环颜色明显深于野生型中菌环的颜色,这表明 LM-49 菌株的菌膜形成量高于野生型。

在进行原生质体再生时,DM3 平板上只长出 20 个转化子,说明转化效率不高,可能是由于单核细胞增生李斯特菌是阳性菌,细胞壁较厚,溶菌酶难以充分作用,导致原生质体形成率偏低或者原生质体质量不高,进而影响后续的转化效率。另外,用于再生的培养基也是至关重要的。考虑到价格因素,本实验所使用的再生培养基与前人使用的 DM3 稍有不同,这也可能是转化效率不高的另一个原因。但对本实验研究而言,这个数量的转化子已足够。

转座子阻断法主要是利用转座子的插入使目的基因发生失活,而使表型发生相应的变化。再通过扩增转座子插入位置两端的基因组序列,便可在单核细胞增生李斯特菌的已

知基因组中找到目的基因。由于此方法具有较大的随机性, 因此不失为获取新基因的良好策略。在菌膜形成相关基因的研究中也被人们广为应用, 如 O'Toole、Monds 等<sup>[11, 48]</sup> 都成功的利用转座子阻断法来研究菌膜形成的相关的基因。

通过转座子插入突变筛选到的往往是菌膜形成能力缺陷菌株或形成菌膜能力降低的菌株<sup>[11, 48]</sup>, 这些被插入的基因可能是功能基因或正调节因子。本研究中筛选得到的是一株成膜能力高于野生型的突变株, 说明被插入的基因可能是菌膜形成的负控制因子。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Branda S S, Vik A, Friedman L, *et al.* Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 2005, **13** ( 1 ): 20 – 26.
- [ 2 ] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8** ( 9 ): 881 – 889.
- [ 3 ] Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E, *et al.* Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, **49**: 711 – 745.
- [ 4 ] Fux C A, Costerton J W, Stewart P S, *et al.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 2005, **13** ( 1 ): 34 – 40.
- [ 5 ] Low J C, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary Journal*, 1997, **153**: 9 – 29.
- [ 6 ] Mafu A A, Roy D, Goulet J, *et al.* Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, lass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot*, 1990, **53**: 742 – 746.
- [ 7 ] Jeong D K, Frank J F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *J Food Prot*, 1994, **57**: 415 – 424.
- [ 8 ] Mattila-Sandholm T, Wirtanen G. Biofilm formation in the

industry: a review. *Food Res Int*, 1992, **8**: 573 – 603.

- [ 9 ] Tompkin B R, Scott V N, Bernard D T, *et al.* Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food Environ Sanit*, 1999, **19**: 551 – 562.
- [ 10 ] Gutierrez J A, Crowley P J, Brown D P, *et al.* Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus* mutants by using transposon Tn917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *J Bacteriol*, 1996, **178** ( 14 ): 4166 – 4175.
- [ 11 ] Monds R D, Silby M W, Mahanty H K. Expression of the pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens*. *Molecular Microbiology*, 2001, **42** ( 2 ): 415 – 426.
- [ 12 ] Schembri M A, Kjargaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 2003, **48** ( 1 ): 253 – 267.
- [ 13 ] Davey M E, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**: 847 – 867.
- [ 14 ] Camilli A, Portnoy A, Youngman P. Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn917 derivative that allows direct cloning of DNA. *J Bacteriol*, 1990, **172** ( 7 ): 3738 – 3744.
- [ 15 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 16 ] Dennis G, Cvitkovitch, Gutierrez J A, *et al.* Tn917 transposon mutagenesis and marker rescue of interrupted genes of *Streptococcus* mutants. *Methods in Cell Science*, 1998, **20**: 1 – 12.
- [ 17 ] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 2950 – 2958.
- [ 18 ] O'Toole G A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 1998, **28** ( 3 ): 449 – 461.

## Mutagenesis on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by Tn917 transposon insertion

CHEN Yong-hui SHI Xian-ming\*

( School of Agriculture and Biology, Food Safety Center, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 201101, China )

**Abstract:** Surface-attached populations of bacteria comprising either single or multiple species were referred to as biofilm. The bacteria in the biofilm had more resistant ability against antibiotics and disinfectors, which could cause the constituent clinical affection or food contamination. In order to isolate and characterize the genes involved in biofilm formation of *Listeria monocytogenes*, the plasmid pTV1-OK containing the transposon Tn917 was transformed into the protoplasm of *Listeria monocytogenes*. After cultivating for 4 days, twenty positive transformants per microgram DNA were generated. Some transformants were selected for inducing transposition in water bath overnight at 42°C, and the transposition efficiency of Tn917 was  $10^{-7}$ . The LM-49 strain with higher ability on biofilm formation than the wild strain was obtained by microtiter plate assaying, and the purple ring formed by the LM-49 was thicker than that by the wild after a 4-day incubation. The PCR result using specific primers of Tn917 proved that Tn917 was inserted into the genome of *L. monocytogenes*. So the LM-49 strain can be regarded as the mutant of biofilm formation, and the higher ability of biofilm formation is caused by the insertion of Tn917.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, Biofilm, Tn917

Foundation item: The 10<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China ( 2002BA518A-06 )

\* Corresponding author. Tel 86-21-64783841; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

Received date: 04-26-05