

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :156 - 163; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140230

鸡白痢沙门氏菌生物被膜形成相关基因 *rpoE* 的鉴定

黄骏[#], 陈素娟[#], 黄凯, 杨林, 吴白, 彭大新^{*}

扬州大学兽医学院, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】通过鸡白痢沙门氏菌基因表达和缺失株生物特性的测定, 鉴定其生物被膜形成的相关 σ 因子。【方法】利用结晶紫染色定量法测定沙门氏菌生物被膜形成能力; 通过触酶试验测定 *rpoS* 活性, 确定 *rpoS* 基因依赖性和非依赖性生物被膜形成株; 利用建立的荧光定量 PCR 方法比较 *rpoS* 基因非依赖株在指数期和生物被膜形成期 6 个 σ 因子的基因表达差异; 运用 Red 同源重组系统构建所鉴定 σ 因子基因缺失株, 并测定野生株和基因缺失株对于环境应激的抵抗力差异。【结果】鸡白痢沙门氏菌 S6702 能够形成生物被膜, 触酶试验阴性, 确定 S6702 为 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株; 荧光定量 PCR 检测显示, 培养 4 - 24 h 后 S6702 中 *rpoE* 基因表达量最高; 与野生株相比, $\Delta rpoS$ 缺失株保留了生物被膜形成能力, 而 $\Delta rpoE$ 缺失株不能形成生物被膜。 *rpoS* 和 *rpoE* 基因缺失株对于环境应激的抵抗力均显著降低。【结论】在 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株中, *rpoE* 基因为参与生物被膜形成调控的 σ 因子之一, 这一发现可用于进一步研究沙门氏菌生物被膜形成的调控机制。

关键词: 沙门氏菌, 生物被膜形成, *rpoS* 基因, *rpoE* 基因, 突变株

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0156-08

沙门氏菌是一种能够引起人和动物感染的重要致病菌, 感染动物后临床上常表现为败血症、胃肠炎及其它组织局部炎症^[1]。鸡白痢沙门氏菌能引起各年龄鸡发病, 既可水平传播, 也可垂直传播, 严重影响种蛋孵化率、育雏率、成活率, 给养殖业带来严重的经济损失^[2]。沙门氏菌在畜禽体内极难清除, 甚至可以使动物终生带菌, 造成持续感染。

自然界中大多数的细菌是以生物被膜状态存在的, 而沙门氏菌可以形成生物被膜^[3]。细菌处于生物被膜状态可增强细菌对外界不利条件如干燥、极端的温度、抗菌素和消毒剂的抵抗力^[4]。这不仅使得沙门氏菌在饲养环境和家禽体内长期存活不易被

消灭, 导致家禽的感染和家禽产品的污染, 而且在肉食品加工过程中这些细菌不能被正常的清洗程序所去除^[5]。沙门氏菌生物被膜形成涉及多个成分, 如卷曲菌毛^[6]、纤维素^[7]、荚膜多糖^[8]、脂多糖^[6]、分泌蛋白 BapA^[9] 和 III 型分泌系统 SpiA 蛋白^[10], 其中最重要的是卷曲菌毛和纤维素。

在肠杆菌科的细菌中已发现存在多种 σ 因子^[11], 其中 RpoS 蛋白是目前研究最多的 σ 因子, 它在稳定生长期及指数生长期受到环境应激 (饥饿、渗透压、pH、温度和氧分压等) 时控制着基因表达。缺少 *rpoS* 基因可导致沙门氏菌对环境应激的抵抗力下降, 生物被膜形成能力下降, 还可导致沙门氏菌

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (20130312); 江苏高校优势学科建设工程; 江苏省家禽疫病防控工程技术研究中心 (BM2013450)

^{*} 通信作者。Tel: +86-514-87979386; E-mail: daxinpeng@yahoo.com

作者简介: [#]共同第一作者。黄骏 (1990 -), 男, 江苏张家港人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: hj5121428@126.com; 陈素娟 (1976 -), 女, 江苏靖江人, 博士, 副教授, 研究方向为动物病原微生物的致病机理和免疫机理研究及新型疫苗研制。

收稿日期: 2014-05-04; **修回日期:** 2014-10-27

的毒力显著下降。但是除 *rpoS* 外,沙门氏菌中也存在不依赖 *rpoS* 基因的其他 σ 因子调控着生物被膜形成。本实验室前期研究发现,鸡白痢沙门氏菌的 *rpoS* 缺失株仍可形成生物被膜,说明存在 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成途径,推测可能是其他 σ 因子参与生物被膜的形成^[12-13]。本研究通过结晶紫染色法测定鸡白痢沙门氏菌生物被膜的形成能力,通过触酶试验确定其 *rpoS* 活性,通过荧光定量 PCR (Q-PCR) 方法检测鸡白痢沙门氏菌生物被膜形成期中不同 σ 因子基因表达差异;运用 Red 同源重组法构建所鉴定出的 σ 因子基因缺失株,最终确定新的生物被膜形成相关因子 *rpoE* 基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒:鸡白痢沙门氏菌生物被膜形成株 S6702^[13] 和大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存;质粒 pKD46、pKD3 和 pCP20 为 Murphy 教授(马萨诸塞大学医学院,美国)惠赠;pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

1.1.2 仪器和试剂:所用仪器为 Roche 公司 LightCycler[®] Nano 实时荧光 PCR 仪。结晶紫、刚果红和考马斯亮蓝购自上海生工生物工程有限公司;TSB 购自 Sigma 公司;连接酶、DNA 限制性内切酶、*Taq* 酶、dNTP 等购自 Promega 公司;反转录试剂盒 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser, 荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 均购自 TaKaRa 生物工程公司(大连);质粒抽提试剂盒 QIAprep

Spin Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自 AxyGen 公司,RNAPure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒购自 Biomed 公司。

1.2 沙门氏菌生物被膜的结晶紫染色测定

生物被膜结晶紫染色定量法按 Pratt 等方法进行^[14]。每次重复 2 孔,测定 OD_{550} 值,重复 3 次取平均值。

1.3 生物被膜成分的检测

1.3.1 刚果红和考马斯亮蓝平板法:挑细菌单菌落经 TSB 过夜培养,取 6 μ L 接种于刚果红和考马斯亮蓝平板(胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸出物 5 g/L, Congo red 40 mg/L, Brilliant blue 20 mg/L, 琼脂粉 15 g/L), 28 $^{\circ}$ C 静置培养 4 d, 比较菌落形态^[15]。

1.3.2 纤维素的检测:挑细菌单菌落经 TSB 过夜培养,取 6 μ L 接种于含 200 mg/L calcofluor 荧光增强剂的无盐 LB 平板,28 $^{\circ}$ C 静置培养 4 d,紫外线下观察菌落的荧光强度^[15]。

1.4 触酶试验

用接种环挑取一个菌落置于载玻片中央,加 1 滴新配的 3% H_2O_2 于菌落上,立即观察有无气泡出现^[16]。

1.5 Q-PCR 检测沙门氏菌中生物被膜形成时期不同 σ 因子的表达

1.5.1 引物的设计和合成:根据已找到的 σ^{24} (*rpoE*)、 σ^{28} (*fliA*)、 σ^{32} (*rpoH*)、 σ^{38} (*rpoS*)、 σ^{54} (*rpoN*)、 σ^{70} (*rpoD*) 序列,设计普通 PCR 扩增引物和 Q-PCR 扩增引物,由 TaKaRa 生物工程公司(大连)合成(表 1)。

表 1. PCR 及 Q-PCR 扩增引物序列

Table 1. Primers used for amplification of PCR and real-time qPCR

Genes	Sizes of each gene/bp	PCR Prime sequences (5'→3')	Q-PCR Prime sequences (5'→3')
RpoE	576	TCAACGCCTGATAAGCGGTTGAAC	GATGGCAGATAGCGGGAAA
		ATGAGCGAGCAGTTAACGGACCAGG	AACGGGTCAGAAAGGGAGA
		CTATAACTTACCCAGTTTGGTGCCT	CAGCAGTTGATGTAACGGGTTTT
FliA	720	GTGAATCACTGTATACCGCTGAAG	TACGATGAGTGGCGGGAAG
		TTACGCTTCGATCGCAGCGCGAAGC	CCACCATTTCAACCTCATCCT
RpoH	855	ATGACCAAAGAAATGCCAAAATTTAG	CTCGCTAACTGGCGTATCGT
RpoS	993	ATGAGTCAGAATACGCTGAAAATTC	CGTCAGCCGTATGCTTCG
		TTACTCGCGGAACAGCGCTTCGATA	CGCTGTTTGGCGTTCAGTT
RpoN	1434	ATGAAGCAAGGTTTGAACCTCAGGC	CGACAGTATTTCCCGTTTACAGA
		TCAAACCAAGCTGTTTGGCTTGGTTT	TTATCAGCCATTTTCGATCCT
RpoD	1983	ATGCCGCATATCGATCGGGA	CTCGTTTGTCCGATCTTATCACC
		TTAATCGTCGAGGAAGCTGC	GCCGCTCTTCTCATCTTCGCTCT

1.5.2 沙门氏菌重组质粒标准品的制备:以细菌 DNA 为模板,应用所设计 PCR 引物进行扩增,电泳

后经 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收。回收产物分别与 pEASY-T3 载体连接、转化,均按分子克隆实验

指南进行^[17]。挑选阳性克隆菌用 QIAprep Spin Miniprep Kit 试剂盒进行质粒抽提,所提的质粒用 *EcoR* I 酶切后,1% 琼脂糖电泳进行鉴定。阳性质粒送南京金斯瑞科技有限公司进行测序。

1.5.3 Q-PCR 检测方法的建立:①Q-PCR 体系:按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 说明书要求进行 Q-PCR 的绝对定量,Q-PCR 体系配置 (20 μL) 如下:SYBR® Premix Ex Taq™ (2 ×) 10 μL、10 μmol/L 的 Q-PCR 引物各 0.4 μL、DNA 模板 2.0 μL、dH₂O (灭菌蒸馏水) 7.2 μL。反应条件:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 20 s,共 40 个循环;融解曲线阶段:60℃ 15 s,95℃ 1 s。反应结束后,对获得的扩增曲线、Ct 值进行处理。

②重组质粒标准品标准曲线的绘制:利用公式

(1) 计算出每微升质粒中的基因拷贝数。

$$N = \frac{C}{M \times 324.5} \times 6.02 \times 10^{23} \quad \text{公式(1)}$$

C:质粒浓度 (ng/μL);*M*:质粒大小 (bp)。按 10 倍梯度稀释的方法分别将构建的质粒稀释成 10² - 10¹⁰ copies/μL 共 8 个浓度梯度,用 LightCycler®

Nano 实时荧光 PCR 仪进行扩增,反应结束后得到各个浓度的质粒所对应的扩增曲线、Ct 值,通过软件分析得到相应的标准曲线。

1.5.4 沙门氏菌中生物被膜形成时期不同 σ 因子表达量的检测:S6702 接种 TSB 后,静置培养 4、8 和 24 h,使用 RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒提取样品菌株的 mRNA,按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书要求,进行 DNA 去除和反转录反应。以反转录完成的 cDNA 作为模板,用表 1 中合成的各对引物,按照 1.5.3 的方法进行荧光定量 PCR 扩增。

1.6 σ 因子基因缺失株的构建

细菌的缺失株构建方法按照 Murphy 等方法进行^[18],引物序列见表 2。

最后测试辅助质粒 pCP20 和 *cat* 基因的丢失情况,获得无抗性的突变株,分别命名为 Δ*rpoE* 和 Δ*rpoS*。基因突变株的鉴定:煮沸裂解法提取含 *cat* 基因转化子和无抗性的突变株的 DNA,用表 1 中引物 *rpoE*-F/ *rpoE*-R 和 *rpoS*-F/ *rpoS*-R 分别进行 PCR 扩增鉴定,预期的片段大小见表 3。

表 2. 扩增靶基因及打靶片段的引物序列

Table 2. Primers used for amplification of target genes and fragments

Primers	PCR Prime sequences (5'→3')
RpoE-D1	CGCCGCCGCTTTCAAAGTTTTCTGCTTCAATCGCGTCTACATCACTGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RpoE-D2	AGTGCGCTACCAGCATAAAGTGGCGAGTCTGTTTCCCGCTATGTGCCACATATGAATATCTCTCCTTAG
RpoS-D1	ATGAAGACGCGGAATTTGATGAGAACGGAGTAGAGGCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RpoS-D2	TGCGTCTGCAGAATTTCCGCGCAGACGGCGCAGGCCTTACATATGAATATCTCTCCTTAG
RpoE-HF	CGGGATCCTCAACAGCCTGATAAGCGGTTGAACT
RpoE-HR	CCGCTCGAGATGAGCGAGCAGTTAACGGACCAGG
RpoS-HF	CGGGATCCATGAGTCAGAATACGCTGAAAAGTTC
RpoS-HR	CCGCTCGAGTTACTCGCGGAACAGCGCTTCGATA

表 3. PCR 扩增片段大小 (bp)

Table 3. The size of amplified genes by PCR (bp)

Genes	Wild type strain	Mutants with <i>cat</i> gene	Mutants without <i>cat</i> gene
<i>rpoS</i>	993	1260	330
<i>rpoE</i>	576	1368	438

1.7 回复试验

以细菌基因组 DNA 为模板,分别用表 2 中引物 *rpoE*-HF/*rpoE*-HR 和 *rpoS*-HF/*rpoS*-HR 扩增 *rpoE* 和 *rpoS* 基因,扩增后的基因片段分别通过 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切后连接到 pGEX-6P-1,酶切鉴定、测序后,分别将其导入 Δ*rpoE* 和 Δ*rpoS* 中,测定其生物被膜形成能力,进行表型鉴定。

1.8 对环境应激抵抗力的测定

将细菌接种 LB 培养基中后 37℃ 静置培养过

夜,4000 r/min 离心 10 min,用等量的 PBS 重悬细菌,将 OD₆₀₀ 值调至 0.4。热应激条件下,取 100 μL 重悬菌液,在 54℃ 热激条件下加热 3 min;氧化应激条件下,100 μL H₂O₂ (10 μmol/L) 加入等量的细菌重悬液,37℃ 振摇培养 30 min;酸性应激条件下,将 100 μL 的重悬菌液加入 900 μL LB 培养基(醋酸调至 pH = 5.0),37℃ 振摇培养 20 min;碱性应激条件下,100 μL 的重悬菌液中加入 800 μL 1.0 mol/L Tris-HCl (pH = 10.0) 和 100 μL 的蒸馏水,37℃ 振摇

培养 30 min。将所得菌液按 10 倍梯度稀释, 接种麦康凯平板培养后计算 CFU^[19]。

2 结果

2.1 沙门氏菌 *rpoS* 基因非依赖型生物被膜形成株筛选

触酶试验不产生气泡, 确定 S6702 为 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株。

2.2 6 个 σ 因子重组质粒标准品的标准曲线的绘制

采用建立的 Q-PCR 检测体系进行扩增, 溶解曲线均能显示出很明显的单峰, 说明特异性较好; 扩增曲线显示重组质粒浓度在 $10^3 - 10^{10}$ 可形成较为理想的扩增曲线和标准曲线。

2.3 Q-PCR 检测生物被膜形成时期不同 σ 因子的表达差异

Q-PCR 检测结果显示, 鸡白痢沙门氏菌 S6702 从指数期至生物被膜形成期, 6 个 σ 因子的表达量均呈下降趋势; *rpoS* 基因在 4 - 24 h 生物被膜形成时的表达量不高, 进一步证明了该株沙门氏菌的生物被膜形成是 *rpoS* 基因非依赖性的。运用 SPSS 19.0 数据分析软件, 方差分析各组间差异, 结果显示在 24 h 生物被膜形成时期 *rpoE* 基因的表达量显著高于其他 5 个 σ 因子 ($P < 0.05$)。说明 *rpoE* 基因可能为参与生物被膜形成的 σ 因子 (图 1)。

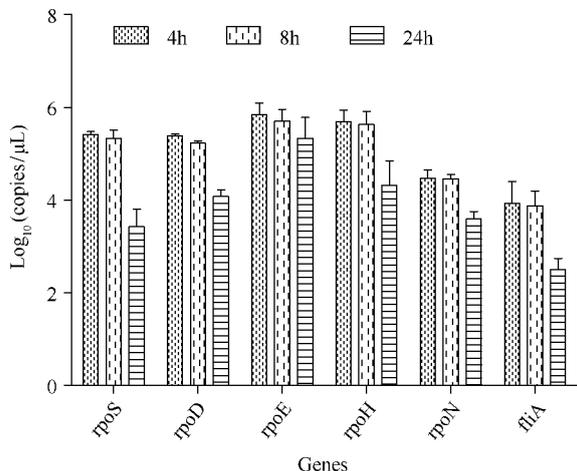


图 1. 荧光定量 PCR 检测 S6702 生物被膜形成期 6 个 σ 因子表达量

Figure 1. Expression of six different Sigma factors in S6702 during the period of biofilm formation detected by real-time qPCR.

2.4 基因缺失株的鉴定

运用 Red 同源重组法构建 S6702 $\Delta rpoS$ 、S6702

$\Delta rpoE$ 基因缺失突变株。PCR 鉴定, 含 *cat* 基因的突变株扩增条带大小为 1260 bp 和 1368 bp, 抗性基因敲除后的突变株扩增条带为 330 bp 和 438 bp, 所有突变株均扩增出预期大小的条带 (图 2)。

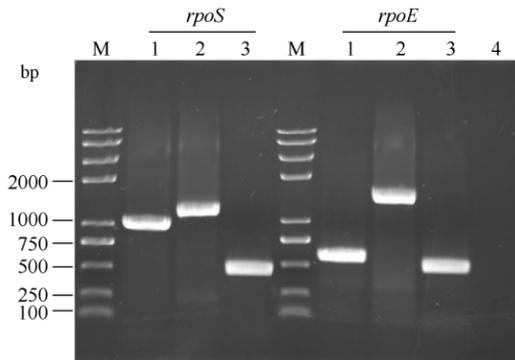


图 2. *rpoS* 和 *rpoE* 基因缺失株的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of *rpoS* and *rpoE* mutants by PCR. M: 2kb Maker; lane 1: The amplified fragments of wild-type strains S6702; lane 2: The amplified fragments of mutants with *cat* gene; lane 3: The amplified fragments of mutants with *cat* gene deletion; lane 4: Blank.

2.5 沙门氏菌野生株、缺失株及回复株生物被膜形成能力及生物被膜成分的测定

结晶紫染色定量法测定, 野生株 S6702 的 OD_{550} 值为 0.543 ± 0.038 , 空白对照值为 0.105 ± 0.017 。与野生株 S6702 相比, $\Delta rpoE$ 缺失株的 OD_{550} 值为 0.112 ± 0.012 , 说明其完全不能形成生物被膜 ($P < 0.01$); 而 $\Delta rpoS$ 缺失株的 OD_{550} 值为 0.512 ± 0.039 , 说明其形成生物被膜的能力无明显变化。

生物被膜成分测定结果显示, 在刚果红和考马斯亮蓝平板上野生株 S6702 呈现棕色干燥粗糙型菌落, 紫外线下荧光板的荧光弱; 而 $\Delta rpoE$ 缺失株呈现粉色干燥粗糙型菌落, 紫外线荧光板荧光增强; $\Delta rpoS$ 缺失株与野生株形成的菌落及荧光强弱无明显差异。

回复试验结果显示, *rpoS* 回复株 ($\Delta rpoSR$) 的 OD_{550} 值为 0.532 ± 0.018 , 与 $\Delta rpoS$ 缺失株和野生株的生物被膜形成能力类似。 *rpoE* 回复株 ($\Delta rpoER$) 的 OD_{550} 值为 0.539 ± 0.014 ; 在刚果红和考马斯亮蓝平板上均呈现棕色干燥粗糙型菌落, 荧光板荧光强度与野生株相似, 说明 *rpoE* 互补株恢复了生物被膜形成能力 (图 3)。

2.6 对环境应激抵抗力的检测

与野生株 S6702 相比, $\Delta rpoS$ 和 $\Delta rpoE$ 基因缺失株在热应激 (图 4-A)、氧化应激 (图 4-B)、酸性应激 (图 4-C) 和碱性应激 (图 4-D) 条件下对外界环境

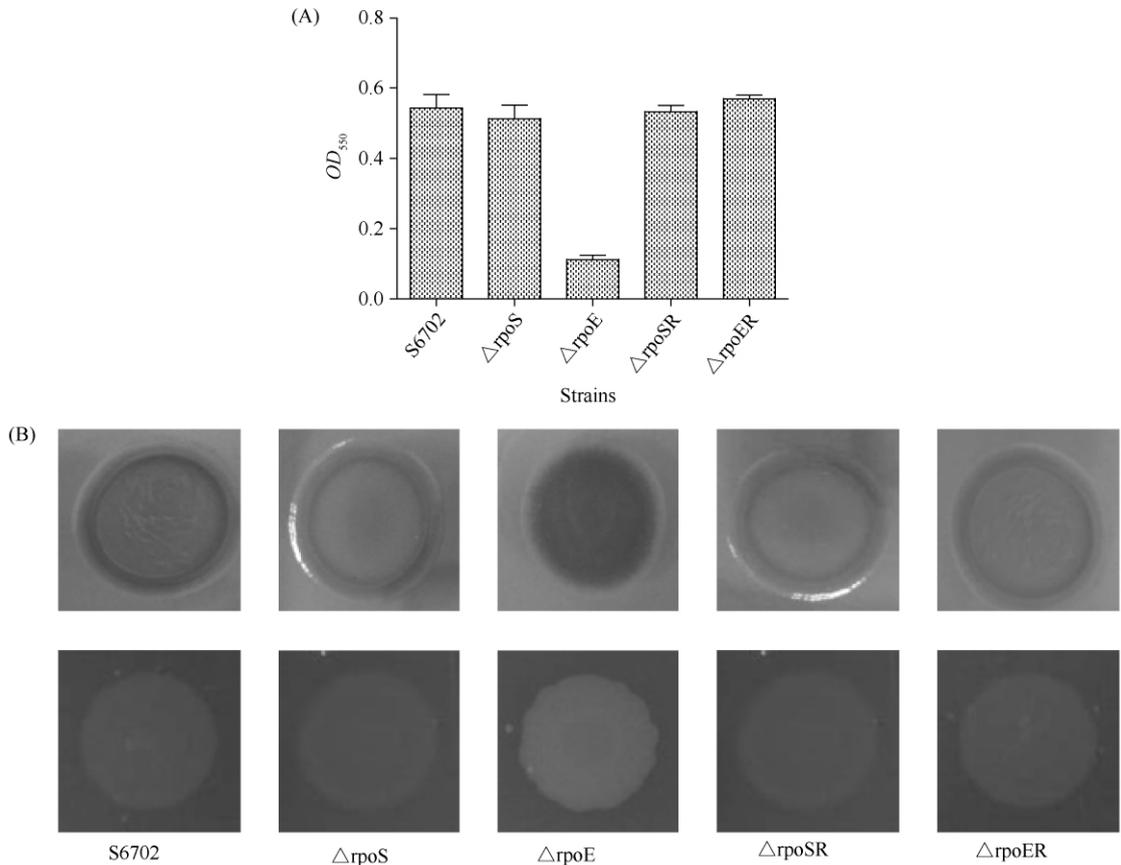


图 3. S6702 野生株、缺失株及回复株的生物被膜形成能力的测定 (A) 和生物被膜表型及纤维素的表达测定 (B)

Figure 3. Determination of biofilm of strains (A), and morphotypes and expressions of cellulose (B) by S6702, its *rpoS* and *rpoE* mutants, and revertants.

应激的抵抗力均显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

沙门氏菌可形成生物被膜,而处于生物被膜状态的细菌对外界不利的生长环境、机体和免疫力或各种杀菌作用具有更强的抵抗力^[20]。同时,生物被膜的形成可导致细菌的持续感染。鉴于沙门氏菌对食品卫生的重要影响力,食品生产和加工企业会投入巨大的资源来防止沙门氏菌的污染和传播^[21]。*rpoS* 基因已被证实是参与生物被膜被形成密切相关的基因^[22],通过直接激活或通过 *mlrA* 基因间接激活 *csgD* 基因^[23],而 *csgD* 基因通过激活 *csgBAC* 操纵子合成卷曲菌毛,通过激活 *adrA* 基因调控纤维素的生成,最终影响生物被膜的形成^[24]。Romling 等测定鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌生物被膜形成能力时发现,在鼠伤寒沙门氏菌中卷曲菌毛和纤维素的合成是依赖 *rpoS* 基因的,而在肠炎沙门氏菌中生物被膜的形成却是不依赖 *rpoS* 基因的^[25]。我们在

构建鸡白痢沙门氏菌 *rpoS* 基因缺失株时发现,鸡白痢沙门氏菌卷曲菌毛和纤维素的合成及生物被膜形成均不受影响,说明鸡白痢沙门氏菌中也存在 *rpoS* 基因不依赖性生物被膜调控途径。因此这种不依赖 *rpoS* 基因生物被膜形成途径中可能是由其他 σ 因子参与调控完成的。

沙门氏菌生物被膜的主要成分为卷曲菌毛和纤维素,在刚果红和考马斯亮蓝平板上能够形成四种形态的菌落^[26], (1) 红色干燥粗糙型 (RDAR), 表示该细菌可产生菌毛和纤维素; (2) 棕色干燥粗糙型 (BDAR), 表示该细菌只产生菌毛; (3) 粉色干燥粗糙型 (PDAR), 表示该细菌只产生纤维素; (4) 白色光滑型 (SAW), 表示该细菌不产生菌毛和纤维素。有研究表明,菌种、营养或粘附表面的不同会导致生物被膜组成成分的不同。Solano 等指出纤维素是肠炎沙门氏菌生物被膜的重要组成部分^[27],但是 Prouty 等证实纤维素并不是鼠伤寒沙门氏菌在胆结石表面形成生物被膜的主要成分^[28]。本实验室前期研究证实,鸡白痢沙门氏菌 *ompR* 基因缺失株卷

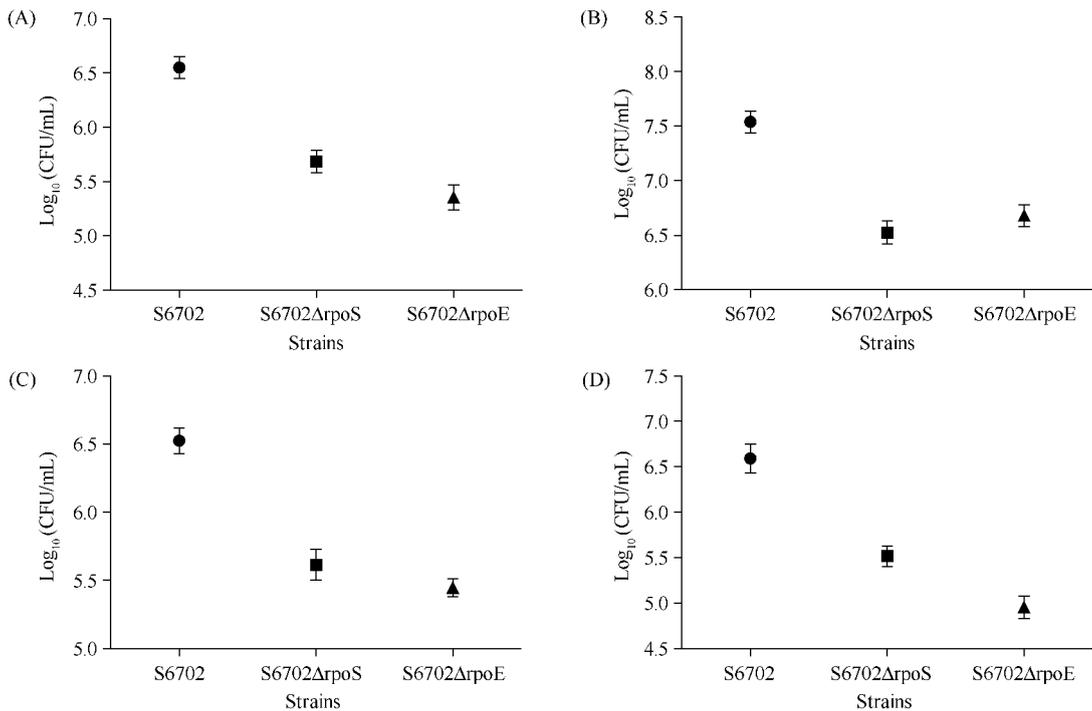


图 4. S6702 野生株和缺失株对于环境应激抵抗力的测定

Figure 4. Determination of resistance to environmental stress for S6702 and mutants. A: Heat shock; B: Oxidative stress; C: Acid endurance; D: Alkali endurance.

曲菌毛蛋白显著下降,纤维素表达量没有变化,其生物被膜形成能力降低;而另一 *rfaG* 基因缺失株卷曲菌毛蛋白无变化,纤维素表达量显著增加,但生物被膜形成能力无明显增加。因此,卷曲菌毛在鸡白痢沙门氏菌生物被膜中起主要作用^[12]。我们构建的 *rpoS* 基因缺失株与野生株 S6702 在该平板上均呈棕色干燥粗糙型菌落,荧光板荧光弱,说明只产生卷曲菌毛,证明 S6702 确为 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株;而 *rpoE* 基因缺失株呈粉色干燥粗糙型,且荧光板的荧光强,说明产生纤维素,但不产生卷曲菌毛。因此 *rpoE* 基因的缺失是通过影响卷曲菌毛的形成而导致其不能形成生物被膜。

当肠杆菌科细菌处于逆境条件下 *rpoS* 基因能够启动复杂的调控网,从而改变细菌对不同环境压力的应答以及某些特性^[29]。野生株 S6702 虽然为 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株,*rpoS* 基因缺失后仍能够形成生物被膜,但由于 *rpoS* 基因是细菌稳定和逆境下生存所必需的调控因子,故 *rpoS* 基因缺失后细菌对于环境应激的抵抗力显著下降。*rpoE* 基因是另一种普遍存在于细菌中的调节基因,在细菌遭受非致死性环境胁迫的过程中起着重要调节作用^[16]。在大肠杆菌中,细菌受到外膜压力和热应激

作用,*rpoE* 被活化释放到细胞质中,作为 σ 因子能够激活 80 余种基因的表达,包括热休克蛋白、*greA*、其他分子伴侣,并能指导外膜应激受损蛋白的重新正确装配^[30]。因此,S6702 缺失 *rpoE* 基因后不但使缺失株不能形成生物被膜,而且对于外界环境应激的抵抗力也显著降低。最新的一个对鼠伤寒沙门氏菌中纤细凝集性菌毛形成表达的研究显示,*rpoE* 基因参与了 *csg* 基因的表达调控,说明 *rpoE* 基因可以通过经典的途径调控卷曲菌毛的表达,但其具体的调控通路仍然是复杂的^[31]。本研究鉴定出了在 *rpoS* 基因非依赖性生物被膜形成株中,*rpoE* 基因因为参与生物被膜形成的 σ 因子,这为进一步研究其调控的下游基因,从而阐明沙门氏菌生物被膜的调控机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Volf J, Stepanova H, Matiasovic J, Kyrova K, Sisak F, Havlickova H, Leva L, Faldyna M, Rychlik I. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signalling in palatine tonsils. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156 (1-2): 127-135.
- [2] Liu GR, Rahn A, Liu WQ, Sanderson KE, Johnston

- RN, Liu SL. The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (10) : 2626-2633.
- [3] Römling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschäpe H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 293 (4) : 273-285.
- [4] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 1995, 49 (1) : 711-745.
- [5] Joseph B, Otta SK, Karunasagar I. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64 (3) : 367-372.
- [6] Romling U, Sierralta WD, Eriksson K. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 1998, 28 (2) : 249-264.
- [7] Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 2001, 39 (6) : 1452-1463.
- [8] de Rezende CE, Anriany Y, Carr LE, Joseph SW, Weiner RM. Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71 (11) : 7345-7351.
- [9] Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penades JR, Lasa I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 2005, 58 (5) : 1322-1339.
- [10] Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology*, 2011, 157 (Pt 6) : 1798-1805.
- [11] Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 499-518.
- [12] Lu Y, Chen S, Dong H, Sun H, Peng D, Liu X. Identification of genes responsible for biofilm formation or virulence in *Salmonella enterica* serovar pullorum. *Avian Diseases*, 2012, 56 (1) : 134-143.
- [13] Lu Y, Dong H, Chen S, Chen Y, Peng D, Liu X. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Pullorum strains. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (17) : 2428-2437.
- [14] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 1998, 30 (2) : 285-293.
- [15] Anriany Y, Sahu SN, Wessels KR, McCann LM, Joseph SW. Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 72 (7) : 5002-5012.
- [16] Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69 (4) : 527-543.
- [17] Joseph S, David W, 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] Murphy KC. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (8) : 2063-2071.
- [19] Chi F, Wang Y, Gallaher TK, Wu CH, Jong A, Huang SH. Identification of IbeR as a stationary-phase regulator in meningitic *Escherichia coli* K1 that carries a loss-of-function mutation in *rpoS*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 2009: 520283.
- [20] Marin C, Hernandez A, Lainez M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 2009, 88 (2) : 424-431.
- [21] Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 2009, 5: 20.
- [22] Santander J, Wanda SY, Nickerson CA, Curtiss R. Role of RpoS in fine-tuning the synthesis of Vi capsular polysaccharide in *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (3) : 1382-1392.
- [23] Brown PK, Dozois CM, Nickerson CA, Zuppardo A, Terlonge J, Curtiss R, 3rd. MlrA, a novel regulator of curli (*AgF*) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (2) : 349-363.
- [24] Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Romling U. Bistable expression of *CsgD* in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Journal of Bacteriology, 2010, 192 (2) : 456-466.

- [25] Romling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschape H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 293 (4) : 273-285.
- [26] Jain S, Chen J. Antibiotic resistance profiles and cell surface components of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*, 2006, 69 (5) : 1017-1023.
- [27] Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (3) : 793-808.
- [28] Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (12) : 7154-7158.
- [29] Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 1993, 72 (2) : 165-168.
- [30] Arsene F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55 (1-3) : 3-9.
- [31] Yoo AY, Yu JE, Yoo H, Lee TH, Lee WH, Oh JI, Kang HY. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella Agf* expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 430 (1) : 131-136.
- [28] Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella*

Identification of *rpoE* gene associated with biofilm formation of *Salmonella pullorum*

Jun Huang^{1#}, Sujuan Chen[#], Kai Huang, Lin Yang, Bai Wu, Daxin Peng^{*}

College of Veterinary Medicine, Yangzhou University; Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses; Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] In order to identify Sigma factor associated with biofilm formation of *Salmonella pullorum*, we determined the gene expression in the wild type strain and biological characteristics of deletion mutants. [Methods] Biofilm forming ability of *S. pullorum* strain was detected by crystal violet assay. The *rpoS* gene-dependent or -independent strain for biofilm formation was determined by catalase test. Real-time PCR was established to compare the expression of six different Sigma factors during biofilm formation. Deletion mutants were constructed using the Red recombination system, and their resistance to environmental stress was determined. [Results] *S. pullorum* strain S6702 had strong ability of biofilm formation. The result of catalase test was negative, indicating that S6702 was an *rpoS*-independent strain for biofilm formation. The expression of *rpoE* gene was the highest during 4 h and 24 h post-incubation. Compared to wild-type strains, $\Delta rpoS$ kept the biofilm-forming ability, whereas $\Delta rpoE$ mutant could not produce biofilm. Both mutants with deletion of the *rpoS* and *rpoE* genes had reduced resistance to environmental stress. [Conclusion] The *rpoE* gene was identified as one of biofilm formation associated genes in a *S. pullorum rpoS*-independent strain. The finding may help to elucidate the regulatory mechanism of *Salmonella* biofilm formation.

Keywords: *Salmonella Pullorum*, Biofilm formation, *rpoS* gene, *rpoE* gene, mutants

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (20100312) by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions and by the Jiangsu Research Centre of Engineering and Technology for Prevention and Control of Poultry Disease (BM2013450)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*} Corresponding author. Tel: +86-514-87979386; E-mail: daxinpeng@yahoo.com

Received: 4 May 2014 / Revised: 27 October 2014