

## 转座子随机插入鉴定肠炎沙门氏菌生物膜形成相关基因

董洪燕, 张小荣, 潘志明, 彭大新\*, 刘秀梵

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

**摘要:**【目的】生物膜在沙门氏菌的致病性和引起沙门氏菌食物中毒等方面起着重要作用, 本研究为了鉴定影响沙门氏菌生物膜形成的基因。【方法】利用结晶紫染色定量法对 74 株鸡源的肠炎、鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌进行生物膜测定, 选择生物膜生长较好的肠炎沙门氏菌 C050041, 采用转座子随机插入法构建突变株库。【结果】84% 的鸡源沙门氏菌菌株可在塑料表面形成生物膜; 通过转座子插入获得 1924 个突变株, 筛选的生物膜降低突变株经生长曲线测定、测序和序列比对及 Southern blot 分析鉴定出 15 个插入基因, 它们分别为 *metE*、*ompR*、*rpoS*、*rfaG*、*rfaJ*、*rfaK*、*rfaP*、*rfaH*、*rhlE*、*spiA*、*steB*、*tpx*、*ybdN* 和 2 个未知功能的基因。【结论】我们鉴定出了多个影响生物膜形成的新基因, 这些基因的发现为进一步研究沙门氏菌生物膜形成的调控机制, 研制减毒沙门氏菌疫苗奠定了基础。

**关键词:** 沙门氏菌; 转座子; 生物膜; 突变株; 基因

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 07-0869-05

禽沙门氏菌病是指沙门氏菌属细菌引起的禽类急性或慢性疾病的总称, 临床上多表现为败血症和肠炎。我国的禽沙门氏菌病比较复杂, 鸡白痢、鸡伤寒和禽副伤寒 3 种疾病并存, 它不仅是养禽业各个时期的经济问题, 而且也是家禽及其产品进出口贸易的障碍。其中引起禽副伤寒的沙门氏菌在公共卫生上有重要意义, 虽然我国的沙门氏菌感染的统计数据不完全, 但美国的沙门氏菌感染估计每年可造成 140 万人发病和 400 人死亡, 生肉、家禽及产品仍然是食源性沙门氏菌的主要来源<sup>[1]</sup>。

沙门氏菌可形成生物膜<sup>[2]</sup>, 而细菌处于生物膜状态可增强细菌对不利条件如干燥、极端的温度、抗菌素和消毒剂的抵抗力<sup>[3]</sup>。这不仅使得沙门氏菌在家禽饲养环境和体内长期存活而不易被消灭, 导致家禽的感染和蛋、肉的污染, 而且以生物膜形式存在的细菌在肉食品加工过程中不能被正常的清洗程序所去除, 这也是造成人的食源性沙门氏菌病发生的重要原

因<sup>[4]</sup>。沙门氏菌生物膜主要是由卷曲的菌毛和纤维素组成, 启动生物膜形成的中心基因是 *csgD*, 而 *csgD* 本身又受环境因素的调节<sup>[5]</sup>。目前生物膜的研究主要集中在鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌, 其中调控菌毛和纤维素表达的部分基因已被鉴定。为了进一步鉴定沙门氏菌生物膜形成相关基因, 本文通过结晶紫染色法测定了鸡源沙门氏菌在聚苯乙烯塑料表面形成生物膜的能力, 并以转座子随机插入法鉴定了鸡肠炎沙门氏菌的生物膜形成相关基因。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及其生长条件:** 鸡肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 标准株 C050041、鸡白痢沙门氏菌 (*S. pullorum*) 标准株 C533、鸡伤寒沙门氏菌 (*S. gallinarum*) 标准株 Sg9 及鸡肠炎沙门氏菌和鸡白痢/鸡伤寒沙门氏菌分离株均由扬州大学农业部畜

基金项目: 高等学校博士学科点专项基金(20061117005)

\*通讯作者: Tel: +86-514-87991769; Fax: +86-514-87972591; E-mail: daxinpeng@yahoo.com

作者简介: 董洪燕(1983-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事细菌性病原微生物致病机理研究。E-mail: www1956@gmail.com

收稿日期: 2008-02-18; 修回日期: 2008-04-06

禽传染病学重点开放实验室收集并保存。菌株在 LB 琼脂平板上 37 °C 过夜培养；沙门氏菌突变株在含 25 µg/mL 的卡那霉素 LB 琼脂平板上 37 °C 过夜培养。

**1.1.2 主要试剂：**EZ-Tn5™ <KAN-2> Insertion Kit 购自 EPICENTR 公司 (Cat. Nos. EZI982K, EZI96K2)。Genomic DNA extract Kit 购自大连宝生物工程有限公司，PCR 产物纯化试剂盒购自 XYGEN 公司。

## 1.2 沙门氏菌生物膜的结晶紫染色测定

生物膜结晶紫染色定量法按 Pratt 等方法进行<sup>[6]</sup>。

## 1.3 生物膜生长条件的测定

将含稀释菌液的细胞培养板分别在 27 °C、37 °C 和 42 °C 培养 24 h 测定生物膜的生长情况；将含稀释菌液的细胞培养板于 27 °C 分别培养 8 h、24 h 和 48 h 后测定生物膜的生长情况。

## 1.4 无卡那霉素抗性的沙门氏菌菌株的筛选

将沙门氏菌生物膜形成较好的菌株在含卡那霉素的 LB 琼脂平板上划线，37 °C 培养 16 h，筛选出无卡那霉素抗性的沙门氏菌作为转座子插入突变的候选株。

## 1.5 生物膜突变株文库的构建

**1.5.1 感受态细胞的制备：**挑取单个菌落接种至 10 mL LB 液体培养基中，37 °C 摇瓶培养至  $OD_{600}$  约为 0.5~0.7；冰浴预冷后于 4 °C 2000 r/min 离心 10 min，去上清；然后分别用 10 mL、5 mL 和 2 mL 10% 甘油水洗涤 3 遍，每次 2000 r/min 离心 10 min，去上清；最终沉淀的细菌用 150 µL 10% 甘油水悬浮，40 µL/管分装于冰预冷的指形管。

**1.5.2 电转化：**将 1 µL 的 EZ-Tn5™ 转座子加入 40 µL 沙门氏菌感受态细胞中混匀，20 KV/cm 电转化 5 ms，加入 1 mL SOC 培养基，于 37 °C 200 r/min 培养 1 h。再将细菌悬浮液稀释涂布于含卡那霉素的 LB 琼脂平板，100 µL/板，37 °C 培养 16 h。

**1.5.3 生物膜突变株的筛选：**将含卡那霉素抗性的沙门氏菌单个菌落接种培养后以终浓度为 15% 的甘油保存于 -70 °C，复苏后用结晶紫染色法测生物膜的形成情况，每株细菌重复测定 3 次，筛选出生物膜形成降低的突变株。

## 1.6 生物膜突变株生长曲线的测定

挑取沙门氏菌生物膜突变株和野生株的单个菌落分别接种于 10 mL LB 中，37 °C 培养过夜；将细菌悬浮液用 LB 稀释为  $OD_{600}$  为 0.1，37 °C 200 r/min 摇瓶培养，每隔 1 h 取 200 µL 细菌悬浮液测  $OD_{600}$  值，连续测定 8 h。

## 1.7 生物膜形成相关基因的鉴定

**1.7.1 沙门氏菌基因组的提取：**按 Genomic DNA extract Kit 使用说明进行。

**1.7.2 沙门氏菌基因组 DNA 的预扩增：**根据转座子序列设计两条引物，RP：5'-TCACGCATCTTCCCG-ACAAC-3' 和 FP：5'-GCTTGATGGTCGGAAGAGG-C-3'，由上海生工生物技术有限公司合成。以基因组为模板分别进行单向 PCR 扩增，PCR 采用 50 µL 体系；扩增条件为：94 °C 5 min；94 °C 45 s，50 °C 45 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 10 min，12 °C 保存。

**1.7.3 序列测定和分析：**FP 和 RP 扩增的 PCR 产物用商品化的 PCR 纯化试剂盒纯化后，分别用转座子试剂盒中引物 FP-1 和 RP-1 进行测序，测序在 ABI 3130 全自动测序仪上进行。序列分析和同源序列的搜索使用 Lasergene 软件包分析。

## 1.8 Southern blot 分析

以 pUC4K 为模板，PCR 扩增 681bp 的卡那霉素抗性基因作为探针。引物为 P1：5'-GGTGCACAAT-CTATCGA-3'，P2：5'-CTCATCGAGCATCAAATG-3'。5 µg 染色体 DNA 以 EcoRV 酶切和 0.5 µg pUC4K 以 EcoR 酶切电泳后进行 DNA 杂交。探针的标记和 Southern 杂交按照地高辛标记与检测试剂盒 (Roche 公司) 的使用说明进行。

## 2 结果

### 2.1 生物膜形成条件的测定

将含稀释菌液的细胞培养板分别在 27 °C、37 °C 和 42 °C 培养 24 h 后用结晶紫染色法测定生物膜，肠炎、鸡白痢、鸡伤寒沙门氏菌 3 种温度下均可形成生物膜，其中 27 °C 培养下测定的  $OD_{550}$  值较高 (图 1)。将含稀释菌液的细胞培养板于 27 °C 分别培养 8 h、24 h 和

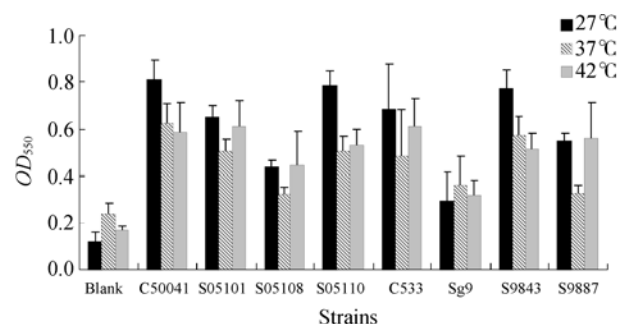


图 1 不同温度培养下沙门氏菌在聚苯乙烯细胞培养板上形成生物膜的测定

Fig. 1 Determination of Biofilm formation of *Salmonella* strains in polystyrene cell culture plates at different temperature.

48 h 后用结晶紫染色法测定生物膜, 8 h 已开始形成生物膜, 24 h 和 48 h 形成较好的生物膜。根据以上结果, 我们选择 27 培养 24 h 作为测定生物膜形成的条件(图 2)。

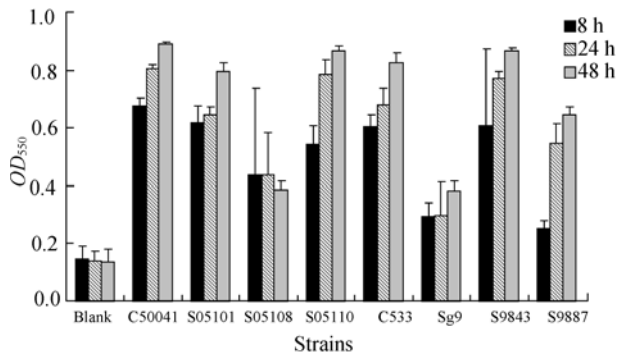


图 2 沙门氏菌在聚苯乙烯细胞培养板上培养不同时间后形成生物膜的测定

Fig. 2 Determination of Biofilm formation of *Salmonella* strains in polystyrene cell culture plates at different time.

## 2.2 沙门氏菌生物膜的测定

对 74 株沙门氏菌菌株进行结晶紫染色测定, 84% 的菌株可以形成生物膜。其中肠炎沙门氏菌生物膜形成比例为 65% (13/20,  $OD_{550}$  值:  $0.264 \pm 0.016 \sim 0.742 \pm 0.019$ ), 鸡白痢和伤寒沙门氏菌生物膜形成比例为 91% (49/54,  $OD_{550}$  值:  $0.294 \pm 0.017 \sim 0.772 \pm 0.021$ ), 其余菌株与空白对照无显著差异 ( $OD_{550}$  值:  $0.139 \pm 0.035$ )。

## 2.3 沙门氏菌菌株卡那霉素抗性的测定

选择形成生物膜好的肠炎沙门氏菌 C050041、

S05101、S05102、S05206、S05109、S05110、S05211、S05209, 鸡白痢/鸡伤寒沙门氏菌 C533、S9806、S9834、S9845、S9887、S98104、S368 ( $OD_{550}$  值  $> 0.45$ ) 共 15 株, 划线接种于含卡那霉素的 LB 平板, S05101、S05102、S05108、S05109、S05110 等菌株可以生长, 其余菌株均不能生长。

## 2.4 生物膜突变株的筛选与相关基因的鉴定

选择生物膜形成良好且无卡那霉素抗性的肠炎沙门氏菌 C050041, 以 Tn5 转座子随机插入法构建了 1924 个突变株, 获得了  $OD_{550}$  值显著下降的突变株 21 株(表 1)。将 21 株突变株测定其生长曲线, 结果表明除突变株 500 的生长速度显著慢于野生菌株 C050041 外, 其他突变株的生长速度与野生菌株一致(图 3)。对 21 株突变

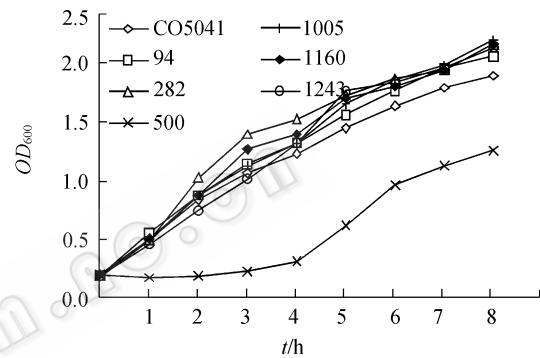


图 3 代表突变株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of selected mutants.

表 1 生物膜突变株的筛选和相关基因的鉴定

Table 1 Screening of biofilm formation mutants and identification of related genes

Strains	$OD_{550}$	Genes	Products description <sup>b</sup>	E value	Sizes/bp <sup>c</sup>	Inserted location/bp <sup>d</sup>
Blank	0.118±0.013	—	—	—	—	—
C050041	0.706±0.021	—	—	—	—	—
94	0.349±0.024	<i>rfak</i>	1,2-N-acetylglucosaminetransferase	0	1145	564
130	0.419±0.006	<i>rfaP</i>	Phosphorylation of core heptose	0	793	369
148	0.460±0.036	<i>NK<sup>a</sup></i>	<i>yqjB, E. coli</i>	2.4e-65	383	307
150	0.459±0.001	<i>rfaJ</i>	1,2-glucosyltransferase	0	1010	114
221	0.486±0.025	<i>NK</i>	putative beta-lactamase, <i>Pseudomonas maltophilia</i>	3.9e-30	884	578
272	0.548±0.030	<i>rfaG</i>	1,3-glucosyltransferase	0	1124	1048
282	0.216±0.010	<i>rfaG</i>	1,3-glucosyltransferase	0	1124	220
382	0.426±0.007	—	—	—	—	—
388	0.471±0.006	<i>rhlE</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase	0	2144	88
419	0.506±0.033	<i>tpx</i>	Putative thiol peroxidase	0	557	334
420	0.501±0.005	—	—	—	—	—
500	0.384±0.001	<i>NK</i>	Hypothetical protein, <i>Synechocystis</i> sp	2.8e-09	302	220
608	0.493±0.064	<i>steB</i>	Outer membrane usher protein	0	2699	9
680	0.490±0.010	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate homocysteine methyltransferase	0	1264	1062
1005	0.186±0.012	<i>ompR</i>	Transcriptional regulatory protein OmpR	0	719	217
1160	0.259±0.001	<i>rfbH</i>	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	0	1313	241
1233	0.398±0.005	<i>spiA</i>	Putative outer membrane secretory protein	0	1493	881
1243	0.156±0.002	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma subunit	0	992	523
1410	0.494±0.008	<i>ybdN</i>	Putative 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate sulfotransferase (PAPS reductase)/FAD synthetase	0	1197	902
1553	0.133±0.014	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma subunit	0	992	518
1776	0.133±0.016	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma subunit	0	992	312

a: not known. b: All products are homologues from *S. typhi* except as indicated. c: Expected sizes of identified genes. d: Inserted location from start code of identified genes.

株转座子插入位点进行序列测定, 共有 19 株突变株可获得的相应的序列。通过 BLAST 同源搜索, 鉴定出 16 种不同基因, 其中 272 和 282 突变株的插入基因均为 *rfaG*, 而 1243、1553、1776 突变株的插入基因均为 *rpoS*, 其余突变株的插入基因均为单一基因(表

1)。以卡那霉素抗性基因作探针对 15 个插入突变株的染色体 DNA 进行 Southern blot 分析, 探针与阳性质粒有很强的杂交条带, 同时与染色体 DNA 均只有一条杂交条带, 证明每个突变株中只有一个 EZ-TN 转座子插入(图 4)。

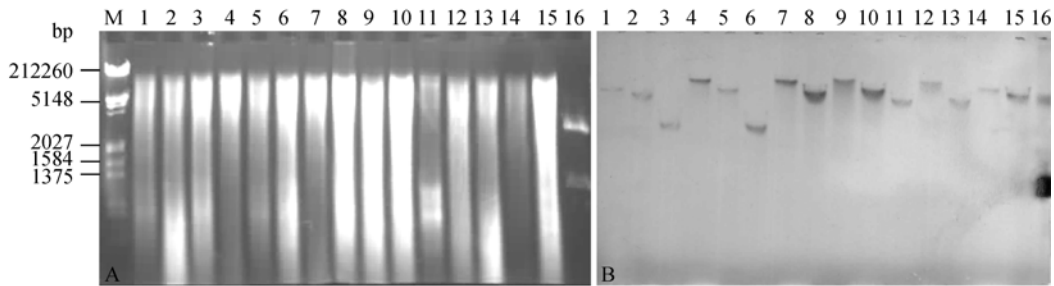


图 4 Southern blot 检测突变株染色体 DNA 中的卡那霉素抗性基因

Fig.4 Detection of kanamycin-resistant gene inserted in chromosomal DNA of mutants by Southern blot M: lambda DNA/EcoRI+ HindIII Markers; Lanes 1~15: EcoRV + chromosomal DNA extracted from mutants 94, 150, 388, 419, 1160, 130, 1233, 1005, 148, 282, 221, 1243, 608, 680, 1410, respectively; lane 16: EcoRI +pUC4K. Each digested sample was resolved on 0.7% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining (A). Southern blot was performed using Dig-labeled kanamycin-resistant gene probe (B).

### 3 讨论

为了抵抗外界不利生长的环境、机体的免疫力或各种杀菌作用, 细菌能自己分泌产生粘着于无生命或有生命表面的细胞外基质, 即生物膜。沙门氏菌可在多种表面粘附并形成生物膜, 既可在家禽肉、蛋及蔬菜表面形成生物膜<sup>[7,8]</sup>, 作为食源性沙门氏菌中毒的主要来源; 又可在食品加工过程中常接触的水泥、塑料、不锈钢、玻璃等表面形成生物膜<sup>[4,9]</sup>, 作为污染食品的持续来源; 还可在胆结石、喉癌 HEp-2 细胞和鸡肠上皮细胞上形成生物膜<sup>[10]</sup>, 可能成为体内持续感染和慢性感染的来源。目前有关生物膜的研究主要集中在鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌, 而对鸡源的肠炎、鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌的研究几乎没有。我们应用结晶紫染色法对 74 株鸡源沙门氏菌进行测定, 证实了鸡白痢/伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌株一样可以聚苯乙烯表面形成生物膜, 且比例高于后者。同时研究还表明, 鸡源沙门氏菌可在高至 42°C 的条件下形成生物膜, 这为沙门氏菌可能在鸡体内形成生物膜的研究提供了依据。

本研究以鸡肠炎沙门氏菌为模板, 运用 Tn5 转座子随机插入法和结晶紫定量法从 1924 个卡那霉素抗性突变株中筛选出 21 株生物膜形成降低突变株, 并通过测序和同源比对鉴定出 16 种影响生物膜形成的基因。在测序比对过程中, 有 2 个突变株未能鉴定出插入位点; 有 2 个基因 (*rfaG* 和 *rpoS*) 是分别插入

在同一基因的不同位点。通过突变株生长曲线的测定, 发现突变株 500 生长速度明显慢于野生菌株, 因此该基因可能是影响细菌的生长从而影响了生物膜的测定。通过 Southern blot 对其余 15 个生物膜形成降低突变株中转座子的拷贝数进行了测定, 结果表明每个突变株中仅有一个转座子插入, 证明所获得的生物膜形成降低表型是由插入位点基因功能缺失而引起的。因此转座子随机插入法结合结晶紫定量法筛选生物膜相关基因是一种快速、重复性好的方法。

所鉴定的 15 个生物膜形成相关基因可分为 3 类: 蛋白质基因如 *ompR*、*spiA*、*steB*; 酶类基因如 *metE*、*rfaG*、*rfaJ*、*rfaK*、*rfaP*、*rfaH*、*rhlE*、*rpoS*、*tpx*、*ybdN*; 以及未知功能的基因。在这些基因中, *ompR*、*rpoS* 是最早被证实与生物膜形成调控密切相关的基因, 可正调控 *csgD* 基因的转录, 从而使沙门氏菌合成卷曲的菌毛、纤维素和胞外蛋白形成生物膜<sup>[11]</sup>; 同时这两个基因与细菌毒力有关, 可调控沙门氏菌荚膜的合成<sup>[12]</sup>。体内研究表明, 鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 *ompR* 缺失株对小鼠的半数致死量下降了 10<sup>5</sup> 倍<sup>[13]</sup>。值得注意的是, 许多与生物膜形成相关的基因如 *rfaG*、*rfaJ*、*rfaK*、*rfaP*、*rfaH* 是与脂多糖合成有关的, 而其中对 *rfaG*、*rfaH* 基因的研究表明脂多糖的多糖链是否完整会影响沙门氏菌的菌毛和纤维素的合成, 从而影响生物膜的影响<sup>[14,15]</sup>。其他一些已知基因和未知功能的基因与生物膜形成的关系尚不清楚, 有待进一步研究。

总之,通过转座子随机插入法鉴定出鸡肠炎沙门氏菌生物膜形成相关的新基因,这些基因的发现为进一步研究沙门氏菌生物膜形成的调控机制,研制减毒沙门氏菌疫苗奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, *et al.* FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis*, 2004, 38: S127-134.
- [2] Romling U, Bokranz W, Rabsch W, *et al.* Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int J Med Microbiol*, 2003, 293: 273-285.
- [3] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, *et al.* Microbial biofilms. *Annual Review of microbiology*, 1995, 49: 711-745.
- [4] Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, *et al.* Biofilm formation by *salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International journal of food microbiology*, 2001, 64: 367-372.
- [5] Gerstel U, Romling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in microbiology*, 2003, 154: 659-667.
- [6] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 1998, 30: 285-293.
- [7] Barak JD, Jahn CE, Gibson DL, *et al.* The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20: 1083-1091.
- [8] Guard-Bouldin J, Gast RK, Humphrey TJ, *et al.* Subpopulation characteristics of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* as defined by the lipopolysaccharide O chain. *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70: 2756-2763.
- [9] Romling U, Sierralta WD, Eriksson K, *et al.* Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular microbiology*, 1998, 28: 249-264.
- [10] Ledebner NA, Jones BD. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *Journal of bacteriology*, 2005, 187: 3214-3226.
- [11] Latasa C, Solano C, Penades JR, *et al.* Biofilm-associated proteins. *Comptes rendus biologie*, 2006, 329: 849-857.
- [12] Santander J, Wanda SY, Nickerson CA, *et al.* Role of RpoS in fine-tuning the synthesis of Vi capsular polysaccharide in *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and immunity*, 2007, 75: 1382-1392.
- [13] Dorman CJ, Chatfield S, Higgins CF, *et al.* Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infection and immunity*, 1989, 57: 2136-2140.
- [14] Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and immunity*, 2003, 71: 7154-7158.
- [15] Anriany Y, Sahu SN, Wessels KR, *et al.* 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 environmental microbiology*, 2006, 72, 5002-5012.

## Identification of genes for biofilm formation in a *Salmonella enteritidis* strain by transposon mutagenesis

Hongyan Dong, Xiaorong Zhang, Zhiming Pan, Daxin Peng\*, Xiufan Liu

(Animal Infectious Disease Laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** [Objective] Biofilm plays an important role in pathogenicity of *Salmonella* and food poisoning caused by *Salmonella*. Our aim was to identify genes associated with *Salmonella* biofilm formation. [Methods] Seventy-four strains of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* (*S. enteritidis*), *S. pullorum* and *S. gallinarum* isolated from chickens were determined for biofilm using crystal violet staining, and the strain C050041 with well biofilm formation was chosen to construct a mutant library using transposon mutagenesis. [Results] Eighty-four percent of these *Salmonella* strains produced biofilm on the plastic surface. We screened 1924 mutants with transposon insertion, and 15 inserted genes were identified by growth curve determination of mutants, sequence analysis of the chromosomal DNA, and further confirmed by southern blot. These genes included *metE*, *ompR*, *rpoS*, *rfaG*, *rfaJ*, *rfaK*, *rfaP*, *rfaH*, *rhlE*, *spiA*, *steB*, *tpx*, *ybdN* and other two genes with unknown function. [Conclusion] We identified some new genes associated with *Salmonella* biofilm formation, these findings may help understand the regulation mechanism of biofilm formation and develop an attenuated *Salmonella* vaccine.

**Keywords:** *Salmonella*; transposon, biofilm; mutant; gene

Supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(20061117005)

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87991769; Fax: +86-514-87972591; E-mail:daxinpeng@yahoo.com

Received: 18 February 2008/ Revised: 7 April 2008