

E. coli Nissle 1917 (EcN) curli 菌毛和鞭毛对其生物被膜形成的影响

龚冰雪, 周贤轩* (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 *E. coli* Nissle 1917 是被广泛认可的益生菌, 可以通过形成生物被膜定殖在肠道中抑制沙门氏菌等病原菌的生长。通过 λ -Red 同源重组系统构建 curli 菌毛合成基因 (*csfA*) 和鞭毛调控基因 (*hnsA*) 突变菌株, 探究 curli 菌毛和鞭毛对 EcN 生物被膜形成的影响。结果表明, curli 菌毛对 EcN 运动能力以及生物膜形成没有影响; EcN Δ *hnsA* 菌株的运动能力下降, 生物被膜含量升高, 说明鞭毛通过促进 EcN 运动, 抑制细菌的附着, 从而抑制生物膜的形成。

关键词 *E. coli* Nissle 1917 (EcN); curli 菌毛; 鞭毛; 生物被膜; 形成; 影响

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)10-0008-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.10.003



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Curli and Histone-like Nucleoid Structuring Protein on Biofilm Formation of *E. coli* Nissle 1917 (EcN)

GONG Bing-xue, ZHOU Xian-xuan (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract *E. coli* Nissle 1917 is a widely recognized probiotics, which can inhibit the growth of *Salmonella* and other pathogenic bacteria in the intestinal tract by forming biofilm colonization. The mutants of curli fimbriae synthesis gene (*csfA*) and flagellum regulatory gene (*hnsA*) were constructed by λ -Red homologous recombination system, and the effects of curli fimbriae and flagellum on the biofilm formation of EcN were investigated. The results showed that curli fimbriae had no effect on the ability of motility and biofilm formation of EcN. While the ability of motility of EcN Δ *hnsA* strain decreased and biofilm formation increased, indicating that flagellum inhibited the formation of biofilm by promoting the motility ability and inhibiting the attachment of EcN.

Key words *E. coli* Nissle 1917 (EcN); Curli fimbriae; Flagellum; Biofilm; Formation; Effect

生物被膜是嵌入在生物或非生物表面上的自生三维结构基质中的微生物细胞集合^[1], 其生长发育一般由初始黏附、固定、成熟和分散 4 个阶段组成^[2]。细菌生物被膜的形成在病原微生物持续性感染中起着非常重要的作用, 是许多临床疾病慢性反复感染的根源^[3]。

大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 是被普遍认为的肠道益生菌, 可以通过形成生物膜在肠道中定殖, 与病原菌竞争肠道附着空间, 以此来抑制肠道致病菌繁殖^[4-5]。因此 EcN 通常被用于预防与治疗传染性腹泻和炎性肠疾病等。

curli 菌毛是由革兰氏阴性菌产生、位于细胞表面的蛋白质聚集体。在大肠杆菌和肠道沙门氏菌的生物被膜中, curli 是细胞外基质的主要蛋白质组分。在生物膜内, curli 纤维形成一个相互交织的网状结构, 支持细胞外基质并包裹住单个细胞。研究表明, curli 菌毛通过促进细菌黏附来促进生物被膜的形成^[6-7]。类组蛋白类核结构蛋白 (H-NS) 是大肠杆菌中高度保守的蛋白^[8]。研究表明, H-NS 通过结合在鞭毛主操纵子 *flhDC* 启动子上影响其表达, *hns* 突变会导致编码鞭毛蛋白的结构基因 *fliC* 和编码鞭毛 *sigma* 因子基因 *flaA* 的表达水平降低, 导致细菌运动能力丧失^[9-10], 从而影响其生物被膜的形成^[11]。然而, curli 菌毛和鞭毛对 EcN 生物被膜形成的影响尚不清楚。笔者通过 λ -Red 同源重组系统构建 curli 菌毛合成基因 (*csfA*) 和鞭毛调控基因 (*hnsA*) 突变菌株, 探究 curli 菌毛和鞭毛对 EcN 生物被膜形成的影响。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 大肠杆菌菌株 Nissle 1917, BW25142, 质粒

作者简介 龚冰雪(1994—), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢与调控。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物与酶工程研究。

收稿日期 2019-05-13

pKD3、pKD46、pCP20, 均由合肥工业大学微生物与酶工程实验室保存。Primer Star DNA 聚合酶、DNA 分子量标准、乙酸、结晶紫, 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成; 大肠杆菌培养所用的培养基为 LB 和 M9C (6.8 g/L Na₂HPO₄、3.0 g/L KH₂PO₄、0.5 g/L NaCl、1.0 g/L NH₄Cl、0.4% 葡萄糖、0.4% 酪蛋白氨基酸、2 mmol/L MgSO₄、0.1 mmol/L CaCl₂); 培养所需的抗生素为氨苄青霉素 (Ap, 100 μ g/mL) 和氯霉素 (Cm, 15 μ g/mL)。

1.2 试验方法

1.2.1 EcN 中的基因敲除。采用 λ -Red 同源重组系统对 EcN 进行基因敲除^[12]。首先以质粒 pKD3 为模板, 用两端带有目的基因上下游的 39 bp 同源臂的引物对 PCR 扩增 FRT-Cm-FRT 片段, 将得到的 PCR 产物进行纯化, 电击转化入 EcN/pKD46 电击感受态细胞中, 涂于 Cm 抗性平板, 37 $^{\circ}$ C 培养。挑选隔夜生长的单克隆菌落作为模板, 加入相应检验引物进行菌落 PCR 检测。

1.2.2 抗性的去除。菌落 PCR 鉴定结果为阳性的菌株可利用辅助质粒 pCP20 将抗性片段去除, pCP20 电转至阳性菌落, 涂布于 Ap 抗性平板, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单克隆于 LB 培养基 (Ap, 100 μ g/mL), 30 $^{\circ}$ C 培养。蘸取菌液划线于 LB 平板, 42 $^{\circ}$ C 培养使温敏性质粒 pCP20 丢失。将单菌落分别依次划线于 Ap 抗性平板、Cm 抗性平板、LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养。对 Ap 平板和 Cm 平板上都不生长、LB 平板上生长的菌落进行 PCR 检验。

1.2.3 生长曲线的测定。用 M9C 培养基将隔夜培养的菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.03, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 每隔 1 h 取样测 OD₆₀₀, 直至细菌生长至稳定期。

1.2.4 生物被膜的形成。用 M9C 培养基将隔夜培养的菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.05, 加入聚苯乙烯 96 微孔板, 每孔 200 μ L,

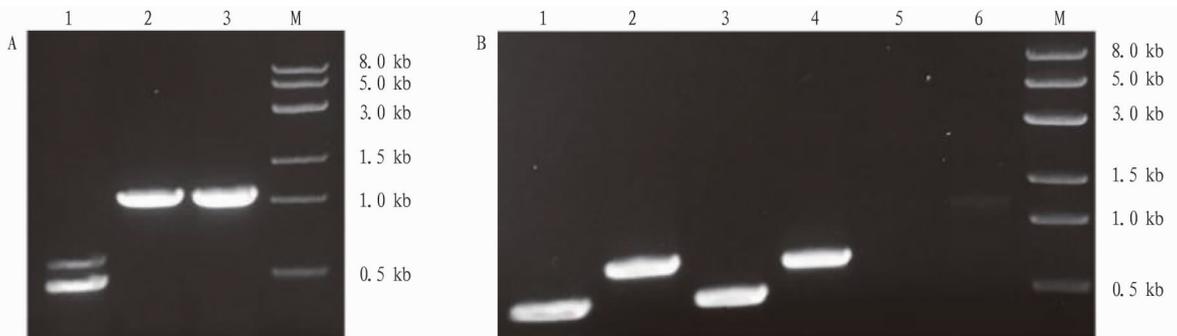
于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 24 h, 吸出菌液, 置于 50 °C 培养箱中烘干 20 min。每孔加入 250 μ L 0.1% 结晶紫染色液染色 15 min。吸去染色液, 去离子水洗涤 3 次以去除未结合的结晶紫, 置于 50 °C 培养箱中烘干 20 min。每孔加入 200 μ L 30% 乙酸溶液, 洗净孔壁及孔底, 吸出脱色液, 测 OD₅₇₀。

1.2.5 泳动试验。用 M9C 培养基将隔夜培养的菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.1, 取 2 μ L 滴于 0.3% 琼脂糖半固体培养基上, 37 °C 恒温培养 24 h, 保持空气湿润。拍照记录并测量泳动圈的直径。

2 结果与分析

2.1 EcN 中 *csgA* 及 *hnsA* 的敲除 以 pKD3 为模板扩增 FRT-Cm-FRT 片段, 电泳结果如图 1 所示, 泳道 1、2 是带有 *csgA* 基因同源臂的 FRT-Cm-FRT 片段, 泳道 3、4 是带有 *hnsA* 基因同源臂的 FRT-Cm-FRT 片段。条带大小约为 1 kb, 符合预期大小。将纯化后的 DNA 片段电转至 EcN/pKD46 中, 在 pKD46 表达的 λ 噬菌体重组酶的作用下其同源臂序列可与基因组上的同源序列发生同源重组。将转化的菌液涂在相对应的抗性平板上, 隔夜培养后挑取单克隆进行菌落 PCR 检测。

hnsA 的敲除结果如图 2A, 选取 2 个单克隆和阴性对照



注: M 为 DNA Marker

图 2 EcN Δ *hnsA* :: Cm(A) 和 EcN Δ *csgA* :: Cm(B) 菌落 PCR

Fig.2 EcN Δ *hnsA* :: Cm(A) and EcN Δ *csgA* :: Cm(B) colony PCR

2.2 抗性的去除 将 EcN Δ *csgA* :: Cm/pCP20 和 EcN Δ *hnsA* :: Cm/pCP20 划线于 LB 板 42 °C 培养过夜。挑取单克隆, 依次划线 LB 板、Cm (15 μ g/mL) 板和 Ap (100 μ g/mL) 板, 在 37 °C 培养, 结果如图 3 所示, 所有的单克隆均在 LB 平板上能够生长, 抗性平板上不能生长, 说明菌株的氯霉素抗性片段去除成功, 且质粒 pCP20 也已丢失。

为保证细菌的抗性去除成功, 通过菌落 PCR 的方法再次检验, 各随机挑取 2 个单克隆作为模板, 加入相应引物进行菌落 PCR 检测。成功去除抗性的菌株条带大小分别为 0.75 kb (*csgA*), 0.87 kb (*hnsA*)。如图 4, 条带与预期相符, 说明菌株的抗性片段被成功去除。

2.3 EcN 野生型及突变株生长曲线 基因敲除成功后, 对突变株 EcN Δ *csgA*, EcN Δ *hnsA* 与野生型 EcN 的生长情况进行测定, 进而评估该基因是否影响细菌的生长。该研究选用 M9C 培养基来测定生长曲线, 如图 5A 所示, *csgA* 的敲除导致细菌在前 4 h 内生长较野生型慢, 4 h 后的生长情况则基

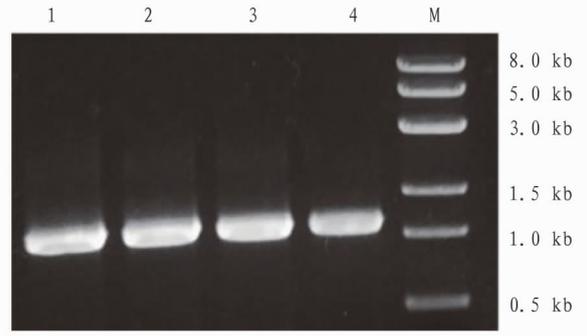


图 1 FRT-Cm-FRT 片段的扩增

Fig.1 Amplification of FRT-Cm-FRT fragment

EcN/pKD46, 同一个模板分别加入 2 对检验引物, 泳道 1、2 为①号菌, 泳道 3、4 为②号菌, 泳道 5、6 为阴性对照 EcN/pKD46, 阳性克隆的预期条带大小为 0.49 和 0.71 kb, ①号菌与②号菌均为阳性克隆 EcN Δ *hnsA* :: Cm。

csgA 的敲除结果如图 2B, 泳道 1、2 为随机挑选的 2 个单克隆, 加入 4 条检验引物进行菌落 PCR 鉴定, 泳道 3 为阴性对照 EcN/pKD46, 阳性克隆目的片段大小应为 0.47 和 0.61 kb, 由图可知泳道 1 电泳结果符合预期, 该单克隆为阳性克隆 EcN Δ *csgA* :: Cm。

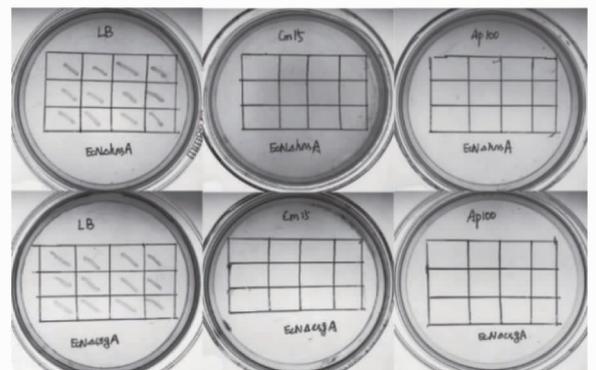


图 3 抗性去除平板划线

Fig.3 Resistance removal result by plate streaking

本一致, 但 *hnsA* 的敲除导致细菌生长明显缓慢, 且 24 h 后细菌浓度较低。根据生长曲线, 计算各菌株的倍增时间, 结果如图 5B, 野生型、EcN Δ *csgA*、EcN Δ *hnsA* 的倍增时间分别为 36、57、115 min。以上结果说明 *csgA* 对细菌的生长略有影响,

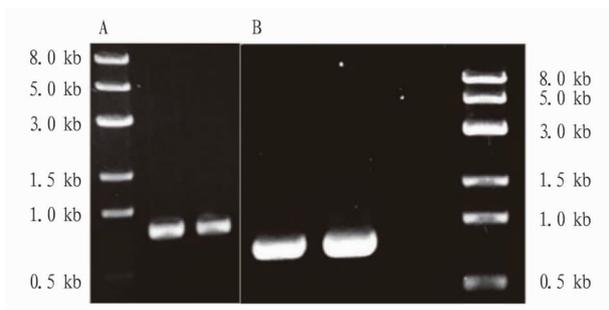


图4 EcN Δ *hnsA* (A)和 EcN Δ *csgA* (B)抗性去除菌落 PCR 结果
Fig.4 EcN Δ *hnsA* (A) and EcN Δ *csgA* (B) resistance removal colony PCR results

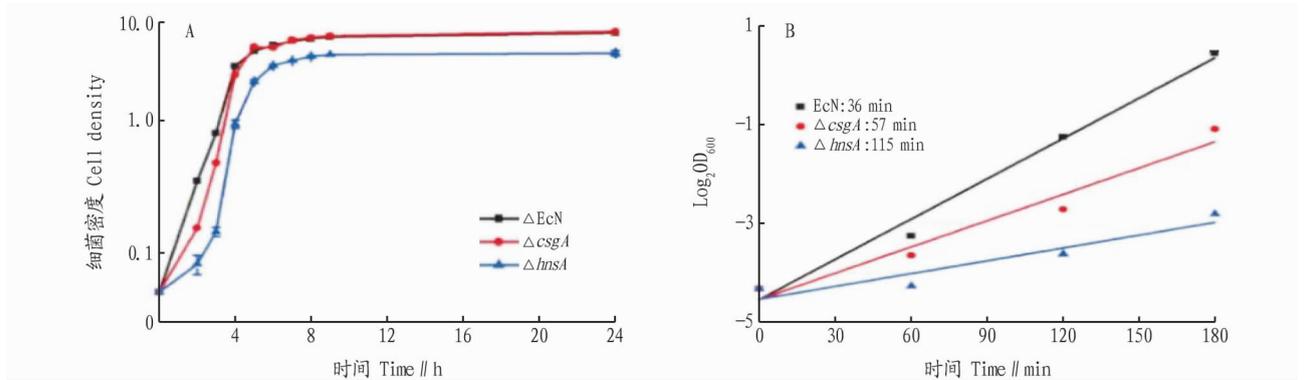


图5 EcN 及其突变株的生长曲线(A)和倍增时间(B)

Fig.5 Growth curve(A) and doubling time(B) of EcN and its mutants

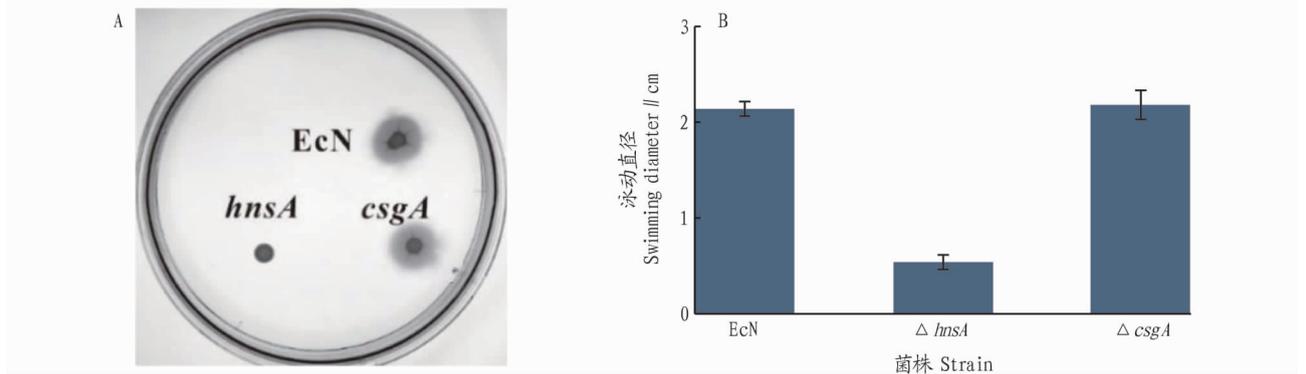


图6 EcN 及突变株泳动平板(A)和泳动直径(B)

Fig.6 The swimming plate(A) and swimming diameter(B) of EcN and mutant strains

在96孔板中用M9C培养基培养24h,生物被膜的形成情况如图7所示。从图7可以看出, EcN野生型菌株与 EcN Δ *csgA*菌株形成的生物被膜的量基本一致,而 EcN Δ *hnsA*菌株的生物被膜的形成量明显高于野生型,说明 curli 对 EcN 生物被膜形成没有明显影响,而 H-NS 蛋白对 EcN 生物被膜的形成有抑制作用。

3 讨论与结论

EcN 是广泛认可的益生菌,可通过形成生物膜在肠道中定殖,抑制肠道致病菌繁殖。因此,研究影响 EcN 生物被膜的形成将有助于研究宿主对病原体的抵抗力,是减缓生物被膜形成的治疗学发展的重要理论基础,为生物被膜预防和制定控制新策略提供思路。

该研究探究了 curli 菌毛和鞭毛对 EcN 生物被膜形成的

hnsA 基因的缺失严重影响了 EcN 的生长, H-NS 蛋白对 EcN 的生长起着较重要的作用。

2.4 EcN 及其突变株的运动能力检测 细菌在半固体培养基上生长形成的泳动圈可用于反映细菌的运动能力, EcN 及其突变株的泳动圈如图6, *csgA* 突变株与 EcN 的泳动圈大小基本一致,直径约为2cm;而 *hnsA* 突变株的泳动圈明显小于 EcN 和 EcN Δ *csgA*,直径只有0.5cm左右。表明 *csgA* 的缺失并未影响细菌的运动能力,而 *hnsA* 的缺失会导致细菌的运动能力受到极大限制。

2.5 EcN 及其突变株生物被膜定量分析 结晶紫染色法被广泛应用于细菌生物被膜的半定量测定。EcN 及其突变株

影响。通过 λ -Red 同源重组系统构建 curli 菌毛合成基因 (*csgA*) 和鞭毛调控基因 (*hnsA*) 突变菌株,并对野生型、 EcN Δ *hnsA*、 EcN Δ *csgA* 的生长情况进行了监测,结果显示, *csgA* 的敲除导致细菌的生长速度较野生型略慢, *hnsA* 的敲除则严重影响了 EcN 的生长,这可能是由于 *hnsA* 编码的类组蛋白类核结构蛋白(H-NS)是全局调控因子,与 DNA 结合调控转录许多基因的表达,因而影响了细菌的生长能力。

细菌运动能力的降低会导致其黏附能力的增强,有利于生物被膜的初始黏附,由此可促进生物被膜的形成。泳动试验结果显示, *csgA* 突变株与 EcN 运动能力基本相同,说明 curli 菌毛不影响细菌的运动能力。 *csgA* 突变株与 EcN 和生物被膜的形成量基本一致,说明 *csgA* 的缺失对细菌生物被膜的形成没有影响,可能是由于 EcN 除 curli 外具有的另外2

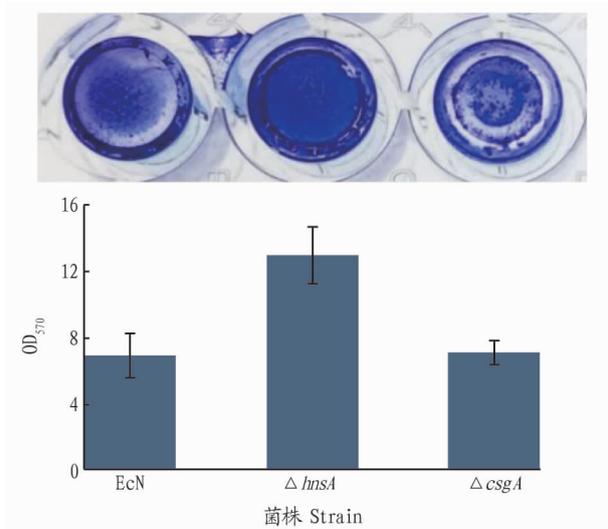


图7 EcN 及其突变株在 96 孔板中的生物被膜形成

Fig.7 Biofilm formation of EcN and its mutants in 96-well plates

种菌毛 (type1 和 F1C 菌毛) 弥补了 curli 菌毛缺失对生物被膜的影响。

研究表明, H-NS 可调控细菌鞭毛基因的表达。hnsA 突变株的运动能力明显弱于野生型, 说明 H-NS 对鞭毛是正调控作用, hnsA 的缺失抑制了鞭毛的合成, 使 EcN 的运动能力降低。且 96 孔板试验显示, hnsA 的缺失导致细菌生物被膜形成明显增多, 说明 hnsA 突变株的运动能力降低, 导致其黏附能力的增强, 以此促进了生物被膜的形成。

参考文献

[1] SUN F J, QU F, LING Y, et al. Biofilm-associated infections: Antibiotic resistance and novel therapeutic strategies [J]. *Future microbiology*, 2013, 8 (7): 877-886.

- [2] VOGELEER P, TREMBLAY Y D N, MAFU A A, et al. Life on the outside: Role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* [J]. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 1-12.
- [3] STEWART P S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1996, 40 (11): 2517-2522.
- [4] YAN H H, BAO F F, ZHAO L P, et al. Cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex regulates heparosan production in *Escherichia coli* strain nissle 1917 [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2015, 81 (22): 7687-7696.
- [5] DERIU E, LIU J Z, PEZESHKI M, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing for iron [J]. *Cell host & microbe*, 2013, 14 (1): 26-37.
- [6] SHARMA V K, BEARSON B L. Hha controls *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation by differential regulation of global transcriptional regulators FlhDC and CsgD [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2013, 79 (7): 2384-2396.
- [7] SALDAÑA Z, XICOHTENCATL-CORTES J, AVELINO F, et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli [J]. *Environmental microbiology*, 2009, 11 (4): 992-1006.
- [8] SINGH K, MILSTEIN J N, NAVARRE W W. Xenogeneic silencing and its impact on bacterial genomes [J]. *Annual review of microbiology*, 2016, 70 (1): 199-213.
- [9] SOUTOURINA O, KOLB A, KRIN E, et al. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon [J]. *Journal of bacteriology*, 1999, 181 (24): 7500-7508.
- [10] BERTIN P, TERAPO E, LEE E H, et al. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli* [J]. *Journal of bacteriology*, 1994, 176 (17): 5537-5540.
- [11] ZHANG L, WENG Y, WU Y, et al. H-NS is an activator of exopolysaccharide biosynthesis genes transcription in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbial pathogenesis*, 2018, 116: 164-167.
- [12] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12): 6640-6645.