

· 基础论著 ·

肺炎克雷伯菌 cAMP 受体蛋白基因缺失株的构建及其在生物膜形成中的作用

雷旭 谭华炳

【摘要】目的 构建肺炎克雷伯菌 cAMP 受体蛋白基因 (crp 基因) 缺失突变株与回补株, 了解 crp 基因在肺炎克雷伯菌生物膜形成中的作用。 **方法** 设计位于 crp 基因 (566 bp) 上游 698 bp 片段及下游 576 bp 片段的两对引物, 分别扩增出相应片段并通过融合 PCR 构建一个 1 274 bp 片段的突变盒, 利用双酶切克隆的方法将突变盒克隆至温度敏感性自杀载体 pKO3-Km 的 Not I 位点间, 电转化至肺炎克雷伯菌中构建肺炎克雷伯菌 crp 基因无痕缺失突变株 (Δ crp)。扩增包含 crp 基因编码、启动子结合区及转录终止区的 2 063 bp 基因片段并克隆至 pGEM-T-easy 质粒上, 将此质粒电转至 crp 基因缺失突变株中构建 crp 基因回补株 (C-crps)。采用 RT-PCR 方法检测 crp 基因在基因缺失株与回补株的表达情况, 确定 crp 基因缺失突变株与回补株构建成功。利用结晶紫染色法检测 crp 基因对肺炎克雷伯菌生物膜形成的影响, 并通过酵母凝集试验检测 crp 基因对肺炎克雷伯菌的菌毛形成影响。 **结果** 成功构建了肺炎克雷伯菌 crp 基因缺失突变株与回补株, RT-PCR 结果显示, crp 基因在缺失突变株中无表达, 在回补株重新表达。体外试管静止培养 48 h 后, crp 基因缺失株无明显生物膜形成, 而在野生株及回补株的液体培养基表面形成宽厚生物膜。结晶紫染色定量发现, crp 缺失突变株的生物膜相对形成量显著低于野生株 (0.063 ± 0.011 vs 1.020 ± 0.056 , $P < 0.001$)。酵母凝集试验发现在 crp 基因缺失突变株中细菌菌毛生成能力下降, 提示 crp 基因影响肺炎克雷伯菌菌毛的生成。 **结论** 肺炎克雷伯菌 crp 基因可能通过调控肺炎克雷伯菌菌毛生成而正调控细菌生物膜的形成。

【关键词】肺炎克雷伯菌; cAMP 受体蛋白基因 (crp 基因); 生物膜形成; 菌毛

Construction the cAMP receptor protein gene deletion mutant and its role in the biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* LEI Xu*, TAN Huabing. *Department of Infectious Diseases and Lab of Liver Diseases, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; *Clinical College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Corresponding author: TAN Huabing, Email: renmthb@163.com

【Abstract】Objective To construct the cAMP receptor protein (crp) gene deletion mutant strain and the crp gene complemented strain and study the role of crp gene in the biofilm formation of *K. pneumoniae*. **Methods** The two DNA fragments (698 bp and 576 bp in length, respectively) flanking the 566 bp deletion region (crp gene) were amplified by PCR, purified, and used as the templates to create a 1 274 bp deletion construct that was subsequently inserted between the Not I sites of pKO3-Km. The resulting plasmid was then electroporated into WT strain to construct the deletion mutant of *K. pneumoniae*. Then a PCR-generated 2 063 bp DNA fragment containing the crp coding region together with its upstream region and downstream region were cloned into the Km-pGEM-T-easy vector to construct the complement strain. The RT-PCR experiments were performed to detected the crp mRNA in WT, Δ crp, and C-crps strains. The effect of crp gene in the biofilm formation was evaluated by crystal violet stain and the presence and activity of fimbriae at the bacterial cell surface was assessed using yeast cell agglutination test. **Results** The crp mutant as well

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.001

基金项目: 湖北省教育厅青年人才项目 (No. Q20132101); 湖北医药学院优秀中青年科技创新团队 (No. 2011 CXX01)

作者单位: 442000 十堰市, 湖北医药学院附属人民医院感染性疾病科、肝病研究室 (雷旭、谭华炳); 湖北中医药大学临床学院 (雷旭)

通讯作者: 谭华炳, Email: renmthb@163.com

as the complemented mutant was constructed from the *K. pneumoniae* causing the primary pyogenic liver abscess. The *crp* transcript was lacking in Δcrp strain but detectable in both WT and C-*crp* strains by RT-PCR. A mass of biofilms of WT and C-*crp* attached to the liquid-solid interface and could be steadily stained by crystal violet; in contrast, the Δcrp strain stained only a little crystal violet. The WT and C-*crp* strains induced a considerable agglutination of yeast cells, and in contrast almost no agglutination was observed for the Δcrp strain. **Conclusion** CRP is important to control the biofilm formation and fimbria production in *K. pneumoniae*.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; cAMP receptor protein; Biofilm formation; Fimbria

肺炎克雷伯菌是近年来引起社区获得性感染和医院内感染的重要病原菌^[1], 生物膜的形成是细菌致病性与产生耐药性的原因之一^[2]。对于肺炎克雷伯菌, 很多临床分离株在体外和体内都能够形成生物膜, 肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性与细菌在聚苯乙烯及呼吸道上皮细胞上的黏附力相关^[3]。细菌生物膜形成的过程受到多个调控因子的调控作用。cAMP 受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)基因为一整体调控因子, 与多种细菌的毒力相关^[4-8]。大肠埃希菌生物膜形成过程中, *crp* 基因合成的 CRP 蛋白通过调控相关基因的表达而影响生物膜的形成^[8]。本研究通过构建肺炎克雷伯菌 *crp* 基因缺失突变株与回补株分析 *crp* 基因在肺炎克雷伯菌生物膜形成过程中的调控作用, 并对其调控机制进行初步分析, 为进一步了解肺炎克雷伯菌的致病机制打下基础, 报道如下。

材料与方法

一、主要实验材料和试剂

肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 为能够引起人类肝脓肿的肺炎克雷伯菌, 本研究菌株来自于军事医学科学院微生物流行病研究所。大肠埃希菌 DH5 α 及自杀质粒 pKO3-Km, pGEM-T easy 质粒为本室

保存。Ex Taq 酶、Pfu 酶、细菌 RNA 提取试剂盒及限制性核酸内切酶 Not I 为 Promega 公司产品; DNA 提取试剂盒、切胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒为 Qiagen 公司产品。T4 DNA 连接酶、DNA marker 为大连宝生物工程有限公司产品。氨苄青霉素与卡拉霉素购自晶美生物工程有限公司。结晶紫为 Sigma 公司产品, 本研究所用的引物见表 1。

二、方法

1. *crp* 基因缺失突变株的构建: 利用融合 PCR 方法获得肺炎克雷伯菌 *crp* 基因上下侧翼序列的 1 个 1 274 bp 的基因片段。片段通过 Not I 酶切后克隆至温度敏感性自杀载体 pKO3-Km 上, 转化大肠埃希菌 DH5 α 获得重组 pKO3-Km-*crp* 突变盒质粒, 将此质粒电转化至肺炎克雷伯菌感受态细胞中, 转化混合物全部涂布在 LB 平板(Kn^R, 50 μ g/ml), 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。采用 PCR 方法鉴定已有质粒转入的阳性克隆, 挑选 3 ~ 5 个鉴定正确的阳性单菌落, 涂 LB(Kn^R, 50 μ g/ml) 平板上, 43 $^{\circ}$ C 培养至平板上长出单菌落。采用 PCR 筛选出 PCR 产物明显小于阳性对照(肺炎克雷伯菌野生株 DNA 为模板)的单菌落, 再将此菌落接种于含 5% 的蔗糖(1% 蛋白胨、0.5% 酵母粉、5% 蔗糖和 1.5% 琼脂)的平板上, 挑取生长菌落以 *crp* RT-PCR 引物鉴定为阴性的克隆即为肺炎克雷伯菌 *crp* 基因的无痕缺失突变株。

表1 本研究用于扩增相关基因的引物

目标基因	引物序列 (5'→3')	目的
构建 <i>crp</i> 基因的缺失突变株		
<i>crp</i>	GTATGCGGCCGCACTTCATAGGAGTGGGTGATG/ GGTTCTGATCTTCCAGCATTGCGCGTTATCCTCTGTTA	扩增位于 <i>crp</i> 基因上游的 698 bp 片段
<i>crp</i>	TAACAGAGGATAACCGCGCAATGCTGGAAGATCAGAACC/ GTATGCGGCCGCAACCAGAACCAGTTAAACACG	扩增位于 <i>crp</i> 基因下游的 576 bp 片段
<i>crp</i>	GTATGCGGCCGCACTTCATAGGAGTGGGTGATG/ GTATGCGGCCGCAACCAGAACCAGTTAAACACG	通过融合 PCR 将上述两个片段构建 1 274 bp 的突变盒
构建 <i>crp</i> 基因的回补株		
<i>crp</i>	GAGTCCATGGGCAGGGCTCGTTTATCTCG/ GAGTGTCGACACTCCCGTAGCGGCTGTTCG	扩增包含 <i>crp</i> 基因编码区、启动子结合区及转录终止区的 2 063 bp 片段
RT-PCR 引物		
<i>crp</i>	TCAACCAGGGCGATTTCATC/AGCCATTTGCGAAGAGAGAC	扩增 <i>crp</i> 基因内部 173 bp 片段
16 S rRNA gene	ATGACCAGCCACACTGGAAC/CTTCTCCCGCTGAAAGTG	扩增 16 S rRNA 基因 151 bp 片段

2. *crp* 基因回补株的构建: 将扩增包含 *crp* 基因编码区、启动子结合区及转录终止区的 2 063 bp 片段通过酶切方法克隆至 pGEM-T-easy 载体上电转化肺炎克雷伯菌 *crp* 缺失突变株感受态中获得肺炎克雷伯菌 *crp* 基因回补株。

3. *crp* 基因缺失株与回补株的 RT-PCR 鉴定: 通过细菌 RNA 提取试剂盒提取肺炎克雷伯菌野生株、*crp* 基因缺失突变株及回补株 RNA, 首先反转录为 cDNAs, 再以 cDNA 为模板, 以 16 S RNA 扩增产物为内参, 利用 *crp* RT-PCR 鉴定引物进行 PCR 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

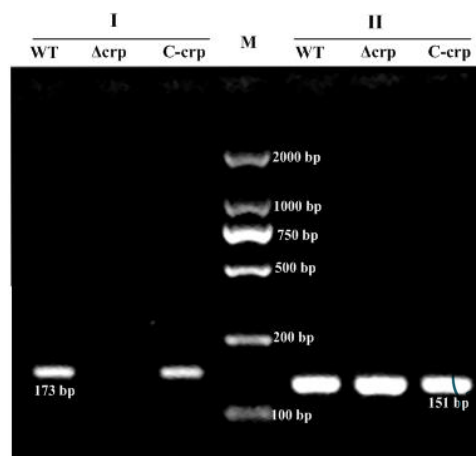
4. *crp* 基因在细菌生物膜形成中作用的检测: 将过夜培养的肺炎克雷伯菌野生株、*crp* 基因缺失株、回补株分别以 1 : 100 的比例转接至含 2 ml 新鲜液体 LB 培养基的小试管中, 室温静置培养 48 h, 观测不同菌株在液体培养基表面生物膜形成的情况。然后将试管中的菌液转移至另一支干净的小试管中, 吹打混匀, 测定不同菌株的 A_{600} 。而带有生物膜的原试管用 3 ml 的去离子水洗去游离细菌后, 加入 3 ml 的 0.1% 结晶紫溶液, 染色 30 min。弃去结晶紫染液, 用去离子水润洗 5 次, 从而充分洗去游离的结晶紫。最后每孔加入 2 ml 乙醇, 间隔摇晃 30 min 溶解试管壁上结晶紫染液后检测溶解液的 A_{570} 值, 每个样品重复 3 次, 计算每个菌株生物膜相对形成量的均值与标准差, 采用 *t* 检验进行数据统计分析。

5. *crp* 基因对细菌菌毛形成影响的检测: 通过酵母凝集试验检测 *crp* 基因对肺炎克雷伯菌菌毛形成的影响。首先将酿酒酵母菌悬浮于 PBS 溶液中, 然后分别将等量的肺炎克雷伯菌野生株、*crp* 基因缺失突变株及回补株与酿酒酵母混悬于玻片上, 轻轻混匀 10 min 后观察玻片上细菌凝集现象的产生。

结 果

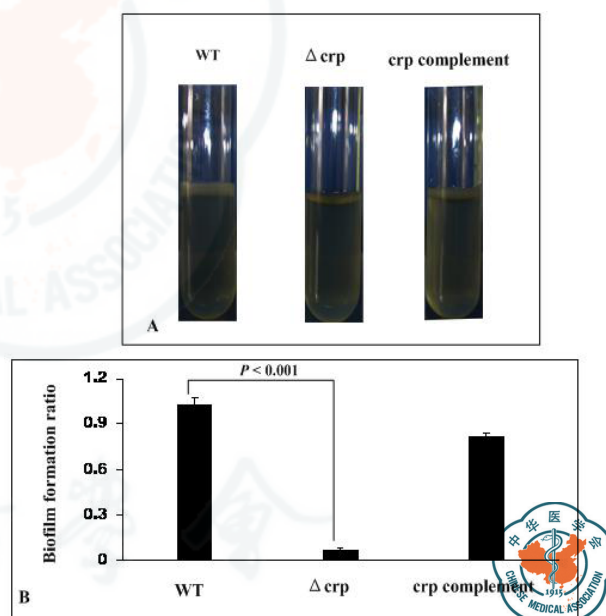
一、肺炎克雷伯菌 *crp* 基因缺失株与回补株的构建

通过同源重组及 pKO3-Km 所携带的 SacB 反筛基因成功的获得了肺炎克雷伯菌 *crp* 基因的无痕缺失突变株。如图 1 所示, RT-PCR 在野生株中能够检测到 *crp* 基因的表达, 而突变株中无 *crp* 基因表达, 提示突变株中 *crp* 基因被成功敲除。将 *crp* 基因克隆至 pGEM-T-easy 质粒后转化 *crp* 基因缺失肺炎克雷伯菌后 RT-PCR 发现能够产生与野生株同样亮度的 *crp* 基因条带, 提示 *crp* 基因不仅仅回补



注: I: *crp* 基因在肺炎克雷伯菌野生株 (WT)、*crp* 基因缺失株 (Δcrp) 及回补株 (C-*crp*) RT-PCR 结果; M: 低分子量 marker (100、200、500、750、1000、2000 bp); II: 16 S RNA 内参在不同菌株中 RT-PCR 结果

图1 RT-PCR检测*crp*基因在不同肺炎克雷伯菌株中的表达情况



注: A: 肉眼直接观察不同肺炎克雷伯菌生物膜形成; B: 结晶紫染色检测不同肺炎克雷伯菌生物膜形成

图2 *crp* 基因对肺炎克雷伯菌生物膜形成的影响

至缺失突变株中, 而且能够表达出相应的产物。

二、肺炎克雷伯菌 *crp* 基因在细菌生物膜形成中作用的检测

将肺炎克雷伯菌野生株、*crp* 突变株及回补株静置培养 48 h 后发现在野生株与回补株液体培养基表面能够形成明显的生物膜, 而 *crp* 缺失突变株无明显生物膜形成 (见图 2A)。结晶紫染色定量发现 *crp* 缺失突变株的生物膜相对形成量显著低于野生

株 (0.063 ± 0.011 vs 1.02 ± 0.056 , $P = 0.00015$), 提示 *crp* 基因能够影响肺炎克雷伯菌生物膜的形成。

三、*crp* 基因对肺炎克雷伯菌菌毛形成的影响

酵母凝集试验检测发现肺炎克雷伯菌野生株与回补株能够和酿酒酵母形成明显的凝集颗粒, 而 *crp* 缺失突变株与酿酒酵母形成的凝集颗粒并不十分明显, 提示 *crp* 基因能够调控肺炎克雷伯菌菌毛的形成。

讨 论

肺炎克雷伯菌是一类广泛分布于自然界, 能够引起手术部位、泌尿系统、呼吸系统感染与败血症的条件致病菌。近年来, 一种新型能够引起人类肝脓肿的肺炎克雷伯菌在台湾乃至整个亚洲较为流行, NTUH-K2044 就是属于此类型的肺炎克雷伯菌^[9], 其毒力较强(对 BALB/c 小鼠腹腔注射 LD50 < 100 cfu)^[10]。目前发现的肺炎克雷伯菌的主要毒力相关因子主要包括荚膜多糖、离子摄入、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、菌毛以及生物膜形成等^[11-13]。

生物膜是指细菌不可逆的黏附在物体表面及其本身细胞之间的相互黏附, 并被其自身所分泌的细胞外黏质所包裹形成的结构。其是细菌适应环境而采取的一种策略, 是抵抗机体防御和限制抗菌药物接近细菌的天然屏障。由于能够形成生物膜, 肺炎克雷伯菌的感染呈现静止期与急性发作期交替、易复发、难根治等特点。肺炎克雷伯菌生物膜的形成是一个非常复杂的过程, 细菌菌毛、荚膜及糖转运系统可能参与肺炎克雷伯菌生物膜的形成^[14-16]。菌毛位于细菌表面, 在肺炎克雷伯菌生物膜形成早期的附着及细菌间相互黏连中起作用。荚膜多糖可能是细菌胞间间质的主要成份, 糖转运系统可能参与基质多糖的向胞外转运。此过程中有多种调控因子参与, 但具体机制目前尚未明确。

CRP 作为整体调控蛋白在大肠埃希菌生物膜形成过程中起作用^[6]。通过生物信息学的比对发现肺炎克雷伯菌的 *crp* 基因与大肠埃希菌 *crp* 基因的同源性达 87%, 提示在肺炎克雷伯菌生物膜形成过程中 *crp* 基因可能也同样发挥调控作用。本研究通过构建肺炎克雷伯菌 *crp* 基因缺失突变株与回补株发现, *crp* 能够正调控肺炎克雷伯菌生物膜的形成。对肺炎克雷伯菌菌毛检测发现 *crp* 基因敲除后细菌 I、III 型菌毛的形成能力明显下降, 而菌毛在肺炎克雷伯菌生物膜形成的早期及细菌间的黏连发挥着

重要的作用^[16]。提示 *crp* 可能通过调控菌毛的形成而影响生物膜的形成, 但目前通过信息学分析在肺炎克雷伯菌 I、III 型菌毛的启动区并未发现 *crp* 基因的结合基序, 提示 *crp* 可能是通过间接途径调控肺炎克雷伯菌菌毛的形成, 其具体机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(5):385-389.
- 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.
- Heather FL, Jennifer RJ, Steven C. Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Infect Immun, 2004, 72(8):4888-4890.
- Petersen S, Young GM. Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence[J]. Infect Immun, 2002, 70(7):3665-3672.
- Zhan L, Han Y, Yang L, et al. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in *Yersinia pestis* biovar microtus[J]. Infect Immun, 2008, 76(11):5028-5037.
- Rickman L, Scott C, Hunt DM, et al. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(5):1274-1286.
- Oh MH, Lee SM, Lee DH, et al. Regulation of the *Vibrio vulnificus* *hupA* gene by temperature alteration and cyclic AMP receptor protein and evaluation of its role in virulence[J]. Infect Immun, 2009, 77(3):1208-1215.
- Eisenstein BI, Beachey EH, Solomon SS, et al. Divergent effects of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate on formation of type 1 fimbriae in different K-12 strains of *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 1981, 145(1):620-623.
- Wu KM, Li LH, Yan JJ, et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis[J]. J Bacteriol, 2009, 191(14):4492-4501.
- Rahimian J, Wilson T, Oram V, et al. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(11):1654-1659.
- 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.
- Lin YC, Lu MC, Tang HL, 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, 11:50-58.
- Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, 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.

- 14 Struve C, Bojer M, Krogfelt KA, et al. 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.
- 15 Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 9):2397-2405.
- 16 Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation[J]. BMC Microbiol, 2010, 10:179-189.
- (收稿日期: 2013-06-08)
(本文编辑: 孙荣华)

雷旭, 谭华炳. 肺炎克雷伯菌cAMP受体蛋白基因缺失株的构建及其在生物膜形成中的作用 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (2): 153-157.

