

假结核耶尔森氏菌 *flhDC* 基因影响细菌 运动性和生物膜形成

王 瑶^① 丁莉莎^{①②} 胡杨波^{①②} 张 勇^{①②} 杨宝玉^① 陈士云^{①*}

(① 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071; ② 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 假结核耶尔森氏菌 YPIII 鞭毛系统的一级主调控基因 *flhDC* 缺失突变, 所得突变株在细菌泳动实验中丧失了泳动能力; 对 *fliA* 启动子融合报告菌株的检测发现, 与大肠杆菌一样, 在假结核耶尔森氏菌中二级调控基因 *fliA* 的表达也受到 *flhDC* 的调控; 对野生型和突变株在非生物活性表面和生物活性表面生物膜形成的观察和统计表明, *flhDC* 突变株在不同表面上生物膜的形成明显减少, 并降低了对线虫表面侵染的严重度. 以上结果表明, *flhDC* 的突变不仅直接使 YPIII 的运动性丧失, 而且影响了细菌在不同表面上生物膜的形成, 这一新功能的鉴定为细菌生物膜形成机制的研究提供了新的视点.

关键词 假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*) *flhDC* 运动性 生物膜

鞭毛的生成以及细菌的运动需要超过 50 个基因的参与, 这些基因通常分布在 10 多个操纵子上, 组成一个大的调节子, 通过 3 个等级进行调控, 下级基因的表达必须通过上一级基因的激活. 由 *flhD* 和 *flhC* 基因单独组成的 *flhDC* 操纵子编码调控细菌鞭毛基因表达的主调控因子 FlhDC, 位于鞭毛运动调节子三级调控系统的最高等级, 其编码产物 FlhD 和 FlhC 共同组成 FlhD₄-FlhC₂ 异六聚体结构转录激活蛋白, 激活第二等级基因的转录^[1]; 第二等级由编码调控蛋白 FliA(σ^{28}) 以及编码鞭毛基体和钩状体等成分的基因组成; 第三等级基因编码鞭毛体蛋白、趋化蛋白等^[2]. 这一调控系统在 *Escherichia coli* 和 *Salmonella* spp 中已得到了比较深入的研究^[1,2], 通过基因组序列分析在耶尔森氏菌 *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 和 *Y. pestis* 中也找到了对应的直向同源基因, 虽然目前尚无充足的实验证据, 但通常认为耶尔森氏菌中也存在同样的三级调控系统^[3].

近年来的研究表明, FlhDC 除参与细菌鞭毛运动相关基因的调控外, 还具有其他多种功能, 如在 *E. coli* 中参与调控厌氧呼吸以及脱氧酮糖酸途径 (Entner-Doudoroff 途径)^[4,5]; 在 *Y. enterocolitica* 中参与调节嘌呤和嘧啶生物合成途径的一系列代谢基因包括 *hut*, *carAB*, *pyrBI* 的表达, 也参与 Yop 致病基因的表达调控^[6]. 此外, FlhDC 还调节 *Y. enterocolitica*^[7] 和 *Serratia liquefaciens*^[8] 中磷脂酶的表达和分泌, 也是 *Xenorhabdus nematophilus*^[9] 中脂解和溶血相关基因表达所必需. FlhDC 所参与的众多功能表明其不仅仅作为调控细菌鞭毛基因表达的主调控因子, 而且有可能是一个具有广泛调节功能的调控蛋白.

本研究通过对假结核耶尔森氏菌中 *flhDC* 基因的敲除和遗传互补分析, 不仅证实了 FlhDC 对细菌运动性和第二等级调控基因的调控, 更首次发现在假结核耶尔森氏菌中, FlhDC 具有调控细菌生物膜形成的功能, 该发现一方面有助于深入研究 *flhDC* 基因

作为全局性调控因子的调控机制, 另一方面也为细菌生物膜形成机制的研究提供了新的视点.

1 材料和方法

1.1 材料

假结核耶尔森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*, YPIII)、接合转移用大肠杆菌 S17-1 λ (*pir*)、AHL 信号分子报告菌株 pSB1142/JM109 和 CV026、线虫(*Caenorhabditis elegans*)以及饲喂用大肠杆菌 OP50, 质粒 pGEM-T, 自杀载体 pDM4 和带四环素抗性基因的质粒 pBlue-tet 均在本实验室培育、传代. 线虫在铺有 OP50 的 NGM 平板上于 25℃ 培养. NGM 培养基配方: 0.3% NaCl, 0.25% peptone, 1.7% 琼脂. 翻译融合报告质粒 pDM4-*fliA*::*lux* 和带 GFP 标记的报告质粒 pXylp-*gfp* 由英国 Nottingham 大学 Paul Williams 教授馈赠.

YPIII 及突变株在含有萘啶酸的 YLB 中 30℃ 培养. 报告菌株 pSB1142/JM109 用 LB 在 37℃ 培养, 报告菌株 CV026 用 LB 在 30℃ 培养. 线虫在铺有 OP50 的 NGM 平板上 25℃ 培养. NGM 培养基灭菌后冷却至 55℃ 时依次加入无菌的 0.1%(*V/V*)胆固醇(5 mg/mL 溶于乙醇, 无需灭菌), 0.1%(*V/V*) 1 mol/L CaCl₂, 0.1%(*V/V*) 1 mol/L MgSO₄ 和 2.5%(*V/V*) 1 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.0). 检测泳动(*swimming motility*)的半固体培养基配方: 1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.3% Difco Bacto Agar. 所用抗生素按以下终浓度添加: 萘啶酸 15 μ g/mL, 氯霉素 30 μ g/mL, 四环素 10 μ g/mL, 氨基青霉素 50 μ g/mL.

1.2 *flhDC* 突变株的构建

为敲除 *flhDC* 基因, 用四环素抗性基因置换其内部序列, 并将该失活基因克隆到含有 *sacB* 反选择标记的自杀载体 pDM4 上, 通过两次同源交换筛选突变株. 具体如下: 引物 PF-*flhD* 和 PR-*flhD* 用于扩增 *flhD* 基因上游距翻译起始位点 428 bp 处到距翻译起始位点下游 193 bp 处的共 621 bp 的上游片段. 引物 PF-*flhC* 和 PR-*flhC* 用于扩增 *flhC* 基因终止密码子位点上游 213 bp 处到终止密码子下游 316 bp 处的共 529 bp 处的下游片段(图 1). PF-*flhD* 序列为 5'-CACACT-AGTTGTGCTAACG-3', PR-*flhD* 序列为 5'-GGTCTC-GAGCAGCTAATT-3', PF-*flhC* 序列为 5'-GCGCTCG-AGCTTTACCTCG-3', PR-*flhC* 序列为 5'-CCTAGAT-CTACGAGATAAC-3'. 下画线处分别为引入的 *Spe*I,

*Bgl*II 和 *Xho*I 位点.

将上下游 2 个 PCR 产物先分别克隆到 pGEMT, 然后通过位点连接生成部分缺失的 *flhDC* 基因, 得到 pGEM-DC. 用 *Xho*I 从 pBlue-tet 上切下四环素抗性基因, 并插入 *Xho*I 酶切的 pGEM-DC, 得到 pGEM-DTC. 用 *Spe*I 和 *Bgl*II 从 pGEM-DTC 上切取用四环素抗性基因置换内部序列的失活 *flhDC* 基因片段, 连接至相应酶切处理的自杀载体 pDM4, 得到敲除质粒 pDM4-DTC 并通过测序证实.

参照文献 [10] 方法, 将敲除质粒 pDM4-DTC 转入大肠杆菌 S17-1 λ (*pir*), 与野生型 YPIII 接合转移, 在含氯霉素和萘啶酸的 YPIII 特异平板上筛选发生了第一次交换的抗性克隆, 并通过 PCR 检测证实; 接着将自杀载体整合到染色体上的克隆在含 15% 蔗糖的 YPIII 特异平板上划线筛选, 由于 pDM4 载体上的 *sacB* 基因编码蛋白可将蔗糖转化为对格兰氏阴性细菌有毒的产物, 因此仅有发生第二次同源交换从细菌染色体上丢失自杀质粒序列的克隆才能在该平板上成活, 进一步筛选其中不能在氯霉素上生长, 但能在四环素平板上生长的克隆即为成功突变的克隆(图 1 (b)), 筛选所得突变株命名为 YPIII Δ *flhDC*, PCR 产物并序列测定进行证实.

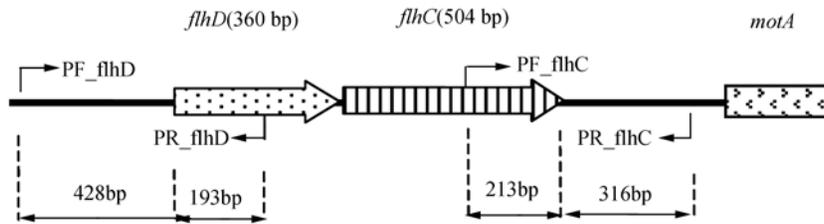
flhDC 功能互补株的构建以 PF-*flhD* 和 PR-*flhC* 作为引物, 扩增得到的产物连接至 pGEMT 得到互补质粒 pGEMT-DC, 将 pGEMT-DC 转入突变体 YPIII Δ *flhDC*, 得到 YPIII Δ *flhDC* 的功能互补株 pGEMT-DC/YPIII Δ *flhDC*.

1.3 泳动能力测定

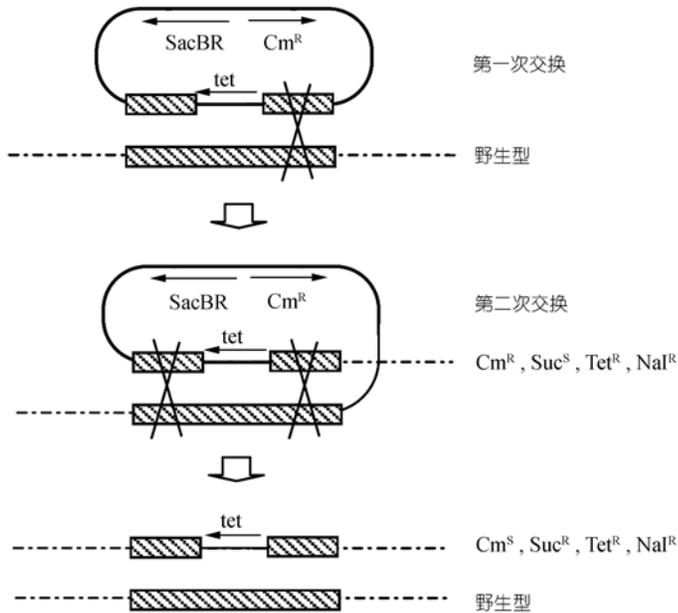
取 2 μ L 过夜培养菌液点入泳动培养基内部, 22℃ 静置培养 2~3 天后观察照相.

1.4 *fliA*::*lux* 融合报告菌株的构建

翻译融合报告质粒 pDM4-*fliA*::*lux* 由英国诺丁汉大学 Paul Williams 教授馈赠, 通过将 *fliA* 基因启动子区与报告基因 *lux* 融合并克隆到自杀质粒 pDM4 上构建而成. 将 pDM4-*fliA*::*lux* 转入 S17-1 λ (*pir*), 分别与野生型 YPIII 和 YPIII Δ *flhDC* 接合转移, 通过 *fliA* 启动子区作为同源序列与基因组上的 *fliA* 启动子区同源重组, 在含氯霉素和萘啶酸的 YPIII 特异平板上筛选发生了第一次交换, 将自杀质粒整合到细菌染色体上的抗性克隆, 并通过 PCR 检测证实. 所得报告



(a)



(b)

图 1 突变体构建示意图

(a) *flhDC* 突变示意图; (b) 2 次同源重组构建突变体示意图. 自杀载体上同源臂与野生型染色体发生第一次交换后, 形成单交换体, 第二次同源重组后或者将原染色体上同源区段替换为突变片段, 或者回复为野生型

菌株命名为 pDM4-*fliAp::lux/YPIII* 和 pDM4-*fliAp::lux/YPIIIΔflhDC*. 将过夜培养的单菌落 1:50 转接后继续培养 2~3 h, 调整 A_{600} 至 0.01, 每孔加 200 μ L 菌液, 每样品 3 个重复, 在 28 $^{\circ}$ C 405 nm 下每隔 30 min 连续 24 h 测发光, 通过发光强度检测报告基因的表达, 所用仪器为自动测发光/分光光度仪(Anthos Lucy I).

1.5 信号分子 AHLs 的提取和 TLC 薄层层析 (TLC) 检测

单菌落过夜振荡培养, 调整起始浓度一致接种于含 50 mmol/L MOPs(pH 6.8)的 20 mL YLB, 22 $^{\circ}$ C 振荡培养 20 h 后取样, 参照文献 [11] 方法提取各菌株的

AHLs, 以报告菌株 CV026 和 pSB1142/JM109 分别作为短链和长链信号分子的指示菌, TLC 检测 AHLs 的含量 [12] sychen@wh.iov.cn.

1.6 非生物活性表面生物膜的观察

将过夜培养的菌液调至 0.1×10^6 CFU/mL, 取 50 μ L 加入有 2 mL YLB 培养基的 24 孔板中, 同时每孔加入灭菌的一次性输液管膜片(0.5 cm \times 0.5 cm), 置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 每 48 h 更换一次培养基, 培养 5~7 天后在相差显微镜下观察形成的生物膜. 在生物膜形成研究中, 将带 GFP 基因的报告质粒 pXylp::gfp 分别转入 YPIII 和 YPIII Δ *flhDC* 中, 使菌体在荧光激

发下发绿光, 以利于生物膜形成的检测。

1.7 生物活性表面(线虫)生物膜的统计和观察

参考文献 [13] 进行, 取过夜培养的 GFP 标记菌株 1 mL 铺于 NGM 平板, 吹干表面后置 30°C 培养过夜, 次日挑取培养好的线虫约 50 头/皿转至该平板, 25°C 饲养 1~2 天后, 用 10 mL 缓冲液 (0.01 mol/L KH_2PO_4 , 0.15 mol/L NaCl, pH 7.3) 重悬培养皿中的线虫并移至离心管, 100×g 离心 1 min, 再用 1 mL 缓冲液洗 2 次, 去掉线虫体表的游离细菌, 在 Olympus 荧光显微镜下观察并统计。

2 结果

2.1 *YPIIIΔflhDC* 的构建和鉴定

为了敲除 *flhDC* 基因, 我们通过 PCR 扩增得到长度分别为 621 和 529 bp 的 *flhDC* 基因上游片段和下游片段, 并在其中插入 1.4 kb 的四环素抗性基因后, 得到总长度为 2.5 kb 的插入失活 *flhDC* 基因, 并将该失活基因克隆到含有 *sacB* 反选择标记的自杀载体 pDM4 上, 得到敲除质粒 pDM4-DTC. 将含 pDM4-DTC 敲除质粒的大肠杆菌 S17-1λ(*pir*) 与野生型 YPIII 接合转移, 通过不同筛选标记筛选发生两次同源重组的突变株, 并进一步通过 PCR 检测证实。理论上, 在野生型 YPIII 中能检测到长度为 1 kb 左右的 *flhDC* 基因扩增产物, 发生单交换的质粒则能扩增到 1 kb 和 2.5 kb 的两条带, 只有 *flhDC* 突变成功的菌株中才能扩增到 2.5 kb 的条带 (图 1(a), (b)). PCR 检测发现大部分经过多重筛选的克隆中能检测到长度为 2.5 kb 的扩增产物, 表明这些克隆中已经成功敲除了 *flhDC* 基因 (图 2). 该 2.5 kb 扩增产物进一步通过测序证明为所构建的失活基因。

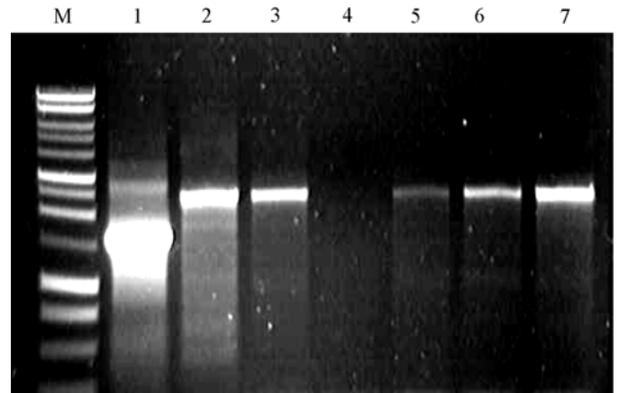


图 2 突变体的 PCR 检测

M, 1 kb ladder; 1, 野生型 YPIII 的 PCR 产物; 2, pDM4-DTC 的 PCR 阳性对照; 3~7, 待测菌株的 PCR 检测

2.2 *flhDC* 突变株泳动能力的检测

flhDC 位于鞭毛运动调控元三级调控系统的最高等级, 是调控其他所有基因表达所必需的主调控基因, 为证实 YPIII 中 *flhDC* 基因的功能, 我们首先检测了突变株的泳动能力 (swimming motility), 为避免由极性效应或其他原因引起的表型改变, 我们同时测定了功能互补株的泳动能力。结果如图 3 所示, 突变株和功能互补株的对照 pGEMT-ck/YPIIIΔ*flhDC* 均不能泳动, 培养基完全透明 (图 3(b), (d)), 而功能互补株 pGEMT-DC/YPIIIΔ*flhDC* 可完全恢复泳动能力, 与野生型中一样, 细菌以样品点为中心向周围游动, 使培养基呈半透明状 (图 3(a), (c)), 这些表型与理论分析一致, 说明 *flhDC* 基因突变使 YPIII 泳动能力丧失, 而功能互补株则能回复泳动能力。

2.3 *flhDC* 与 *fliA* 的调控关系

在 *E. coli* 和 *Salmonella* 中细菌鞭毛的第一等级基

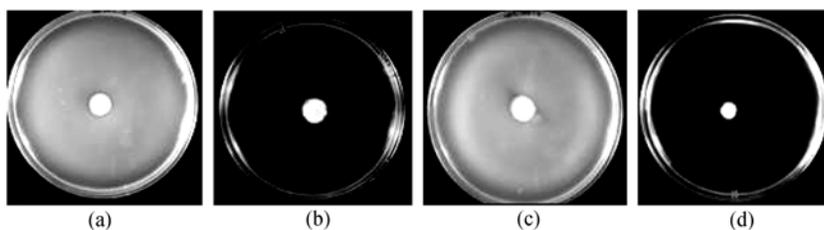


图 3 突变株泳动能力的检测

(a) YPIII, (b) YPIIIΔ*flhDC*, (c) pGEMT-DC/YPIIIΔ*flhDC*, (d) pGEMT-ck/YPIIIΔ*flhDC*

因 *flhDC* 调控第二等级基因 *fliA* 的表达, 为研究 YPIII 中第一、二等级基因之间的调控关系, 将翻译融合报告质粒 pDM4-*fliAp::lux* 通过同源单交换整合到 YPIII 和 YPIII Δ *flhDC* 基因组上, 生成报告菌株 pDM4-*fliAp::lux*/YPIII 和 pDM4-*fliAp::lux*/YPIII Δ *flhDC*, 28°C 405 nm 下每隔 30 min 连续测发光 24 h 得到的曲线如图 4 所示. 在野生型 YPIII 的遗传背景下细菌能正常发光, 随测定时间的延长细菌数量的增多发光增强, 而在 *flhDC* 突变体 YPIII Δ *flhDC* 的遗传背景下, 24 h 内则一直测不到发光, 处于本底水平. 说明 *flhDC* 的突变使 *fliA* 启动子不能启动 *lux* 的表达, 进而表明与 *E.Coli* 和 *Salmonella* 一样, 在 YPIII 中 *flhDC* 调控着二级基因 *fliA* 的表达.

2.4 *flhDC* 突变对信号分子 AHLs 合成的影响

群体感应系统 QS 受 AHLs 信号分子浓度的控制, 进而调控细菌一些特有性状, 在 *Y. pseudotuberculosis*

中, 已有研究认为 QS 调控细菌运动性 [4], 为了研究 *flhDC* 这个多功能基因是否可以同样调控 AHLs 信号分子的生成, 我们分别提取野生型 YPIII, YPIII Δ -*flhDC* 和互补株 pGEMT-DC/YPIII Δ *flhDC* 的 AHLs, 用报告菌株 CV026 和 pSB1142/JM109 分别作为短链和长链信号分子的指示菌, 通过 TLC 检测不同菌株中 AHLs 的含量, 发现短链和长链 AHLs 的种类和含量都没有变化 (图 5). 该结果表明尽管在 *Y. pseudotuberculosis* 中 QS 可调控细菌的运动性, 但是运动主控基因 *flhDC* 不能反向调控 QS 系统信号分子的生成.

2.5 非生物活性表面上生物膜的观察

为研究运动性与生物膜形成的关系, 我们选取灭菌的一次性输液管膜片作为非生物活性表面, 将不同菌株培养 5~7 天后观察形成的生物膜, 如图 6 所示. 野生型 YPIII 的菌体聚集成团, 在膜片上均匀形成片状生物膜, 分布密集 (图 6(a)), 而突变株在膜片

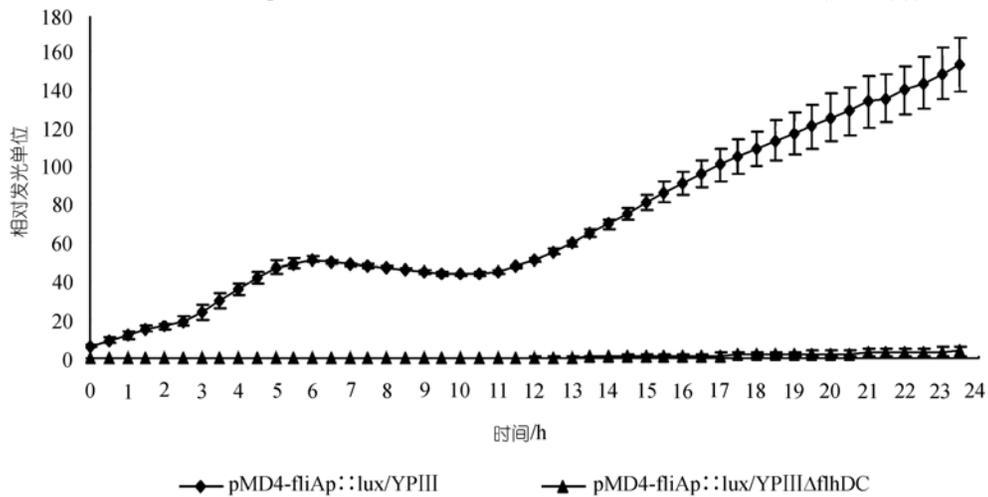


图 4 *fliA* 启动子融合报告菌株的 LUCY 检测结果

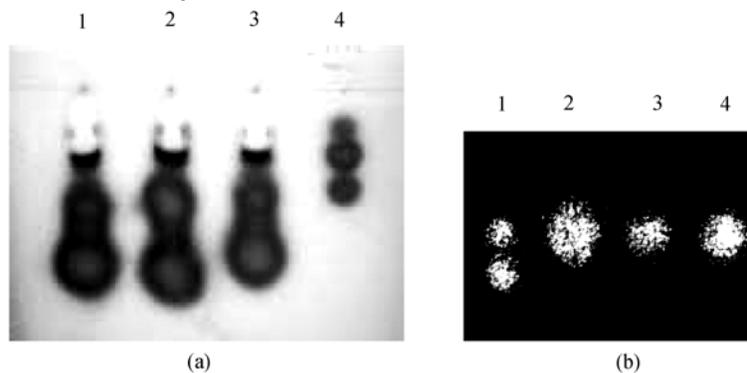


图 5 不同菌株 AHLs 信号分子的薄层层析(TLC)检测

(a) 短链 AHLs 的 TLC 结果. 1, C₆ HSL, C₇ HSL, C₈ HSL 标准品; 2, YPIII; 3, YPIII Δ *flhDC*; 4, 互补株. (b) 长链 AHLs 的 TLC 结果. 1, 3-oxo-C₁₀ HSL, 3-oxo-C₁₂ HSL 标准品; 2, YPIII; 3, YPIII Δ *flhDC*; 4, 互补株

上形成的生物膜相对稀疏(图 6(b)), 说明在非生物活性表面上, *flhDC* 的突变影响了细菌生物膜的形成, *flhDC* 基因具有调控 YPIII 在非生物活性表面上形成生物膜的功能。

2.6 生物活性表面上生物膜形成的观察和统计

线虫能被多种重要的人体病原细菌感染, 是研究细菌在生物活性表面(biotic surface)形成生物膜的理想模型 [15]。为清楚观察生物活性表面形成生物膜的情况, 排除其他细菌感染的可能性, 我们对 YPIII 和 YPIII Δ *flhDC* 分别用 GFP 报告质粒标记, 在细菌感染线虫 1~2 天后观察表面生物膜的形成情况, 并对感染的严重度进行了统计。在铺有大肠杆菌 OP50 的线虫培养基上线虫生长正常, 移动迅速, 在体表不形成

生物膜(图 7(a)), 虫体经过之处留下大而弯曲的波浪状轨迹(图 7(b))。野生型的 YPIII 侵染后, 绝大部分线虫被严重感染, 虫体的头部(图 7(c))和尾部被大的生物膜所包围, 或者沿虫体在体表大面积形成生物膜(图 7(d)), 线虫移动困难缓慢, 有的只能在周围小范围内蠕动, 运动轨迹也与正常不同, 轨迹变得更紧密(图 7(d))。在铺有 YPIII Δ *flhDC* 菌体的培养基上, 线虫受感染程度减轻, 仅在头部(图 7(e))和尾部(图 7(f))小面积形成生物膜, 虽然线虫体表形成生物膜的程度大大减轻, 但其运动轨迹却依然畸形(图 7(f)), 移动相对缓慢。

为进一步分析 *flhDC* 基因的突变对在线虫上形成生物膜的整体变化情况, 我们将线虫体表形成生物膜的程度分为 4 个级别: 0, 未侵染, 无生物膜形成;

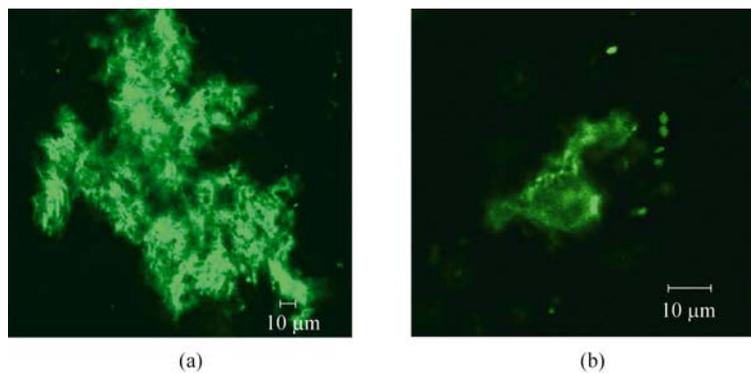


图 6 野生型(a)和 *flhDC* 突变株(b)在非生物活性表面形成生物膜的比较

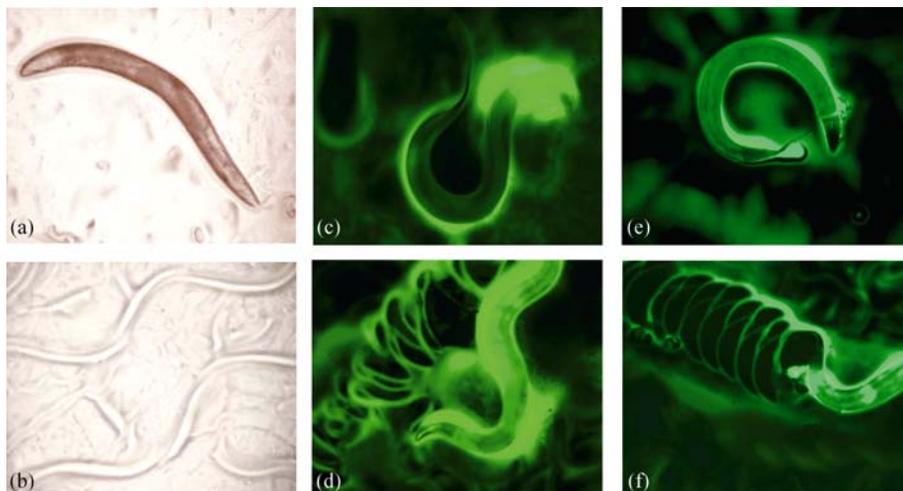


图 7 线虫表面形成生物膜和运动轨迹的观察

(a)和(b) 大肠杆菌 OP50 饲喂的线虫(a)及其运动轨迹(b); (c)和(d) 野生型 YPIII 在线虫头部形成大的生物膜(c), 运动轨迹畸变(d); (e)和(f) YPIII Δ *flhDC* 仅在体表形成很小面积生物膜(e), 但运动轨迹依然畸形(f)

1, 轻微侵染; 2, 中度侵染, 端部和身体周围有 < 1/2 体表面积的生物膜; 3, 严重侵染, 端部和体表大部分被聚集的生物膜包围, 并分别对感染的严重度进行了统计, 每样品至少统计 80 头, 如图 8 所示. 对于野生型 YPIII, 在所统计的线虫中, 未侵染形成生物膜的线虫仅占总数的 2%, 轻微侵染的占总数的 14%, 大部分则为 2~3 级的严重侵染(图 7(c)), 占总数的 84%. 而在铺 YPIII Δ *flhDC* 的线虫饲喂平板上, 0~1 级的轻微或无侵染则占所统计虫量的大部分(图 7(e)), 为 84%, 2, 3 级被严重侵染的虫量百分比分别为 9% 和 7%. 说明 *flhDC* 基因对于细菌在活性表面上生物膜的形成也产生了影响.

3 讨论

本研究使 YPIII 鞭毛系统的主调控基因 *flhDC* 发生突变, 对非生物活性表面和生物活性表面上生物膜形成的观察和统计表明, *flhDC* 的突变影响了细菌生物膜的形成. 现已知道, *flhDC* 除了调控细菌鞭毛运动外, 还具有调节厌氧呼吸和多条代谢途径, 以及致病因子的表达和分泌等多种功能, 但关于 *flhDC* 调控细菌生物膜形成的功能尚属首次报道.

由于细菌生物膜的形成在临床治疗以及生态环境保护等领域具有严重危害性, 因此揭示生物膜形成的调控机制并最终发现适合的药物作用靶点, 已

成为病原细菌研究的热点 [16~18]. 目前发现影响细菌生物膜形成的基因涉及细菌的群体感应系统、代谢调控、细胞壁生成、细菌黏附性、运动性以及应激反应等多个方面 [19], 我们推测 *flhDC* 调控细菌生物膜形成的功能可能与细菌的运动性相关. 虽然运动性在生物膜形成过程中的具体作用机制还不明朗, 但至少 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* 等细菌中, 细菌的运动性是生物膜形成所必需的 [20~23]. 例如, 在 *P. aeruginosa* 中, 丧失运动性的鞭毛形成相关基因 *fliK* 的突变株不能形成完整的生物膜 [21]; 而影响 *E. coli* 鞭毛形成和运动性的 *fli*, *mot* 和 *che* 基因的突变体均不能形成正常的生物膜 [20]. 据推测鞭毛运动可能在生物膜形成早期在表面黏附过程中克服固-液表面的排斥时起作用, 同时与细菌在固体表面的运动可能也有关系 [24]. 因此 *flhDC* 可能通过调节细菌的运动性而影响生物膜的形成, 但不排除 *flhDC* 调控的其他功能如代谢水平也参与影响生物膜的形成.

群体感应(quorum sensing, QS)系统可以调控细菌生物膜的形成 [25,26], 也可以调控多种细菌的运动性 [27,28], 同时细菌的运动性又是生物膜形成所必需的, 因此这三者之间很可能存在密切的联系, 但是由于这些结论分别来自不同细菌中的分散研究, 因此目前尚不能将这三个领域有机联系起来. 在假结核

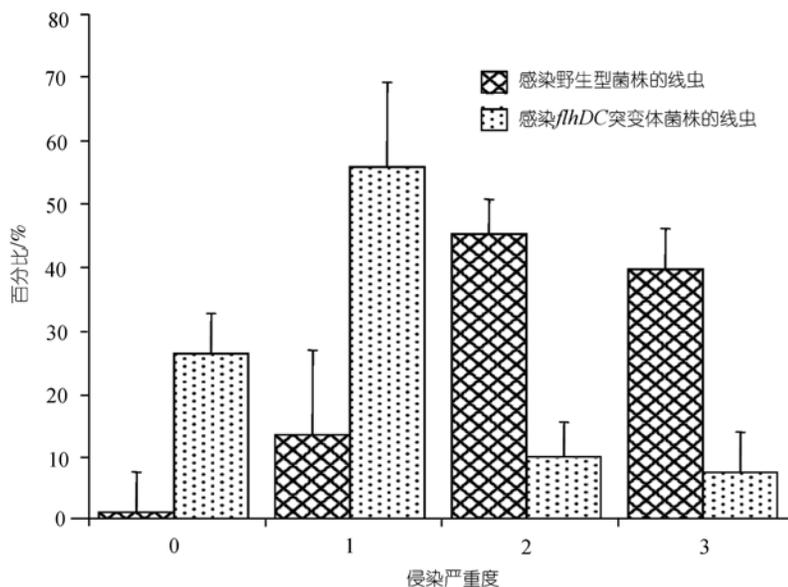


图 8 线虫表面侵染严重度统计
野生型和突变体各统计 50 头线虫

耶尔森氏菌中, 目前已经发现群体感应系统调控细菌的运动性^[14]和生物膜形成(数据尚未发表), 在本研究中我们又进一步发现鞭毛运动系统主调控基因 *flhDC* 调控细菌的运动性和生物膜形成, 通过在该菌中三者关系的深入研究, 将有利于揭示细菌生物膜形成的机制和信号调控方式。

致谢 感谢英国诺丁汉大学 Paul Williams 教授和 Steve Atkinson 博士对本研究的指导与帮助。

参 考 文 献

- 1 Wang S, Fleming R T, Westbrook E M, et al. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol*, 2006, 355: 798—808[DOI]
- 2 Macnab R M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet*, 1992, 26: 131—158[DOI]
- 3 Atkinson S, Chang C Y, Sockett R E, et al. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol*, 2006, 188: 1451—1461[DOI]
- 4 Pruß B M, Liu X, Hendrickson W, et al. *FlhD/FlhC*-regulated promoters analyzed by gene array and *lacZ* gene fusions. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 197: 91—97
- 5 Pruß B M, Campbell J W, Van Dyk T K, et al. *FlhD/FlhC* is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer. *J Bacteriol*, 2003, 185: 534—543[DOI]
- 6 Bleves S, Marenne M N, Detry G, et al. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* Yop regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3214—3223[DOI]
- 7 Schmiel D H, Young G M, Miller V L. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol*, 2000, 182: 2314—2320[DOI]
- 8 Givskov M, Eberl L, Christiansen M, et al. Induction of phospholipase and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon FlhD. *Mol Microbiol*, 1995, 15: 445—454[DOI]
- 9 Givaudan A, Lanois A. *FlhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: Requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J Bacteriol*, 2000, 182: 107—115
- 10 Garbom S, Forsberg A K, Wolf-Watz H, et al. Identification of novel virulence-associated genes via genome analysis of hypothetical genes. *Infect Immun*, 2004, 72: 1333—1340. [DOI]
- 11 McClean K H, Winson M K, Fish L, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol*, 1997, 143(12): 3703—3711
- 12 王 瑶, 戴 岳, 张 勇, 等. 群体感应信号分子降解基因对铜绿假单胞菌毒力和生物膜形成的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37(2): 234—240
- 13 Tan L, Darby C. A movable surface: Formation of *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 5087—5092[DOI]
- 14 Atkinson S, Throup J P, Stewart G S, et al. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol*, 1999, 33: 1267—1277[DOI]
- 15 Joshua G W P, Karlyshev A V, Smith M P, et al. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology*, 2003, 149: 3221—3229[DOI]
- 16 Clutterbuck A L, Woods E J, Knottenbelt D C, et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 2007, 121: 1—17[DOI]
- 17 Simmons W L, Bolland J R, Daubenspeck J M, et al. A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis*. *Bacteriol*, 2007, 189: 1905—1913[DOI]
- 18 Spoering A L, Gilmore M S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9: 133—137[DOI]
- 19 Jefferson K K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 236: 163—173
- 20 Pratt L A, Kotler R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, 1998, 30: 285—293[DOI]
- 21 O'Toole G A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998, 30: 295—304[DOI]
- 22 Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T L, et al. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J Bacteriol*, 2006, 188: 4312—4320[DOI]
- 23 Lauriano C M, Ghosh C, Correa N E, et al. The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 4864—4874
- 24 Klausen M, Heydorn A, Lambertsen L, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*, 2003, 48: 1511—1524[DOI]
- 25 Huber B, Riedel K, Hentzer M, et al. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol*, 2001, 147: 2517—2528
- 26 Suntharalingam P, Cvitkovitch D G. Quorum sensing in *Streptococcal* biofilm formation. *Trends Microbiol*, 2005, 13: 3—6[DOI]
- 27 Harris S J, Shih Y L, Bentley S D, et al. The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol Microbiol*, 1998, 28: 705—717[DOI]
- 28 Sperandio V, Torres A G, Kaper J B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol*, 2002, 43: 809—821[DOI]