文章编号: 1673-1689(2011)03-0458-07

空肠弯曲菌 *flh*A 突变株的构建及其功能研究

惠星星, 李烨*, 王小元
(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘 要: *flh*A 是空肠弯曲菌鞭毛输出装置的关键基因, 通过构建 *Campylobacter jejuni flh*A 突变株 HXW001, 进行毒力相关表型研究和分析。结果显示 HXW001 生长性能稳定, 但其鞭毛和运动能力丧失, 生物膜形成和自身凝集现象明显下降。RT-PCR 实验证明 *flh*A 对鞭毛丝主要结构蛋白基因 *fla*A 的表达有一定的调控功能。研究表明 *flh*A 是空肠弯曲菌鞭毛生成和运动能力重要的分子基础, 与空肠弯曲菌致病性密切有关。

关键词: 空肠弯曲菌, 鞭毛, *flh*A, 生物膜, 自身凝集性
中图分类号: Q 812 文献标识码: A

Construction and Characterization of *Campylobacter jejuni flh*A Mutant Strain

HUI Xing-xing, LI Ye*, WANG Xiao-yuan
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: flhA, encoded by the gene *flh*A, is an important component of the flagellar export apparatus of *Campylobacter jejuni*. Here we constructed an *flh*A mutant strain HXW001. Compared with that of the wild type, the *flh*A mutant cell could grow well but lack flagella, the motility of the mutant cells was lost, and the ability of the mutant cells for the formation of biofilm and autoagglutination also decreased. In addition, it was found that the expression of the flagellin gene *fla*A was affected by *flh*A. These findings indicated that *flh*A was the molecular basis of flagellar synthesis and motility of *Campylobacter jejuni* and that *flh*A was closely related to pathogenicity of *Campylobacter jejuni*.

Key words: *Campylobacter jejuni*, flagellar, *flh*A, biofilm, autoagglutination

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是威胁人类健康常见的食源性病原菌之一, 人类感染主要引起散发性急性胃肠炎, 并可导致败血症、关节炎、格林巴利综合症(Guillain-Barre syndrome; GBS)等并发症。流行病学调查显示, 近年来人群中 *C. jejuni* 感染率呈逐年上升的趋势, 有时甚至超过沙门氏菌和志贺氏菌感染居首位[1-2]。研究和阐明其致病分子机制有助于对空肠弯曲菌感染的预防和控制。

端生的鞭毛是空肠弯曲菌细胞表面重要的附属结构, 大量研究已经表明, 鞭毛不仅是空肠弯曲菌运动器官, 而且在免疫、趋化、定植、侵入、毒力蛋

收稿日期: 2010-05-16
基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题项目(SKLF-TS-200807), 江苏省创新学者攀登计划项目(BK2009003)。
* 通信作者: 李烨(1964-), 女, 江苏淮安人, 副教授, 主要从事食源性病原微生物研究。Email: liye386@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

白分泌等许多方面表现出致病相关性[3-6]。鞭毛的结构及其介导的运动是鞭毛致病相关性表现的基础, *C. jejuni* 完整的鞭毛由鞭毛丝、鞭毛钩、基体及其基部的鞭毛输出系统组成, *C. jejuni* 鞭毛的合成、装配和表面修饰是一个有序而级联的过程, 相关基因以鞭毛装配的顺序依次表达, 鞭毛输出系统相关基因是该过程早期表达的基因, 有研究显示对鞭毛基因有序表达有调控功能[7], 但具体的分子机制仍不是很清楚。分析已公布的基因组信息, *C. jejuni* 基因组中缺乏大肠杆菌、耶尔森氏菌等具有的鞭毛主调控基因 *flh*DC, 且缺乏编码专门的 III分泌系统(TTSS) 的基因, 大部分研究认为细菌 III型毒力蛋白分泌系统与鞭毛输出系统在进化上是同源的, 且有研究表明 *C. jejuni* 能通过鞭毛输出 III型毒力蛋白[8]。基于对以上研究的分析, 我们认为鞭毛输出系统可能是 *C. jejuni* 鞭毛致病相关性重要的分子基础。

本文主要运用分子生物学手段, 通过构建相关基因突变株并进行毒力相关表型研究和分析, 揭示 *C. jejuni* 鞭毛输出系统关键基因 *flh*A 的功能。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株和质粒　*C. jejuni* ATCC33291 购买于美国标准生物品收藏中心(ATCC), 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和质粒 PET28a 均由本实验室保藏, 质粒 PMD-19T 购买于 TakaRa 公司。

1.1.2　培养基

1) *E. coli*: LB 液体、固体培养基; 2) *C. jejuni*: MH(BD) 液体、固体培养基。

1.2　方法

1.2.1　引物设计和片段扩增　根据 NCBI 上已公布的 *C. jejuni* NCTC11168 菌株的序列设计 *flh*A 的引物, 通过 PCR 扩增反应, 从 *C. jejuni* ATCC33291 上扩增出 *flh*A, 其全长为 2 175bp。引物分别为 *F*1: forward primer, 5′-CGATT-TAGTTTTTCCTTTCTTGG-3′, *R*1: reverse primer, 5′-GTTCTATCCTAATAATACCCTCG-3′; PCR 反应体系为 50 μL, 使用的是 EX Tag 酶, 扩增产物末端自动加上 A。PCR 扩增条件为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2.5 min, 35 个循环, 72 ℃再延伸 10 min, 10 ℃保存。

从 PET28a 质粒上扩增 kan^r 抗性基因盒, 引物分别为 *F*2: forward primer, 5′-CATG CCATGG CTTT-GATCTTTTCTACGGGGTC-3′; *R*2: reverse primer, 5′-CATG CCATGG TCAGGTGGCACTTTTCGGGG-3′; 其中下划线表示 NcoⅠ酶切位点。PCR 反应体系为 50 μL, 扩增条件为: 94℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1.5 min, 35 个循环, 72 ℃再延伸 10 min, 10 ℃保存。

1.2.2　重组敲除质粒的构建和测序　将从 *C. jejuni* ATCC33291 基因组上克隆到的 *flh*A 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接到 PMD-19T 载体上。将连接混合物用 $CaCl_2$ 法转入 *E. coli* JM109 中, 筛选阳性克隆并进行酶切验证。将重组质粒和 kan^r 抗性基因盒分别用 *Nco*Ⅰ消化, 消化产物酶连后转化入 *E. coli* JM109 中, 挑取阳性克隆菌株提取重组敲除质粒, 进行酶切验证, 并委托上海生物工程公司测定插入片段的核苷酸序列(见图 1)。*Nco*Ⅰ是 *flh*A 内部的一个单切点, 两侧同源臂分别为 700 bp 和 1 400 bp 左右, PMD-19T 和 kan^r 内部无此酶切位点。

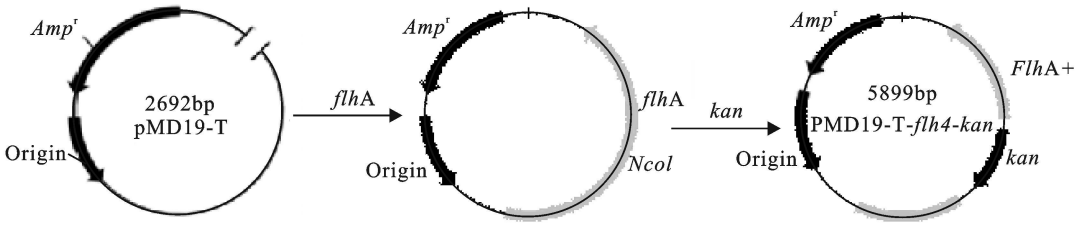


图 1　重组质粒 PMD-19T-*flh*A-kan^r 的构建

Fig. 1　Construction of the recombinant plasmid PMD-19T-*flh*A-kan^r

1.2.3　*flh*A 突变株的构建　采用电击法将构建好的敲除载体转化入 *C. jejuni* ATCC33291 中, 主要参考 Miller 等[9]的方法稍作修改: 收集平板上过夜培养的菌株, 用 EPB(272 mmol/L 蔗糖、15% 甘油、2.43 mmol/L K_2HPO_4、0.57 mmol/L KH_2PO_4, pH 7.4) 悬浮, 吹打混匀, DNA 与菌液混合置

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

于冰上 10 min(菌液 100 μL, DNA600 ng), 电击 6 kV/cm, 5 ms, 置于冰上 10 min, 将菌液涂布于 MH 平板上 37 ℃恢复, 收集菌体, 涂布于含 *kan* 的 MH 平板上筛选, 挑取转化子, PCR 验证双交换同源重组产物。

1.4 测定生长曲线 通过分别测定 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 的生长曲线, 观察菌株突变前后在液体培养基中生长规律的变化。将过夜培养的 *C. jejuni* ATCC33291 及 HXW001 转接到 50 mL MH 培养液中, 使初始 OD_{600} 为 0.02, 于 37 ℃, 200 r/min 摇床培养。从转接开始, 每隔 2 h 测定 OD_{600} 直至生长稳定期, 空白对照用 MH 培养液, 并保证测定 OD_{600} 在 0.2~0.8 内。根据实际 OD_{600}= 测定 OD_{600}值×稀释倍数×2 (比色杯光程为 0.5 cm), 计算实际菌浓, 绘制细菌生长曲线图。

1.5 透射电镜观察 使用透射电镜观察 *C. jejuni* ATCC33291 及 HXW001 的菌体形态, 菌体划线过夜培养, 体积分数 2.5% 的戊二醛固定, 1 g/dL 磷钨酸染色, 透射电镜(Hitachi H-7000, Japan) 观察。

1.6 运动能力实验 参考 Kalmokoff 等[10]的方法稍加修改: 各吸取 1 μL 活化后菌液(OD_{600} 为 0.5) 穿刺接种到 0.4 g/dL 的琼脂平板中, 置于烛缸中 37 ℃培养 2 d 后, 观察 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 从接种点向四周运动扩散的生长情况。

1.7 生物膜形成能力 根据 Reeser 等[11]的方法稍作修改, 分别测定 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 的生物膜形成能力。将 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 在 MH 液体培养基中培养至对数期, 以初始 OD_{600} 为 0.025 接种到含有 1 mL MH 液体培养基 96 孔板(聚苯乙烯) 中, 每样 3 个平行, 盖上封膜, 置于玻璃干燥器中, 37 ℃培养, 分别测定其在 24、48、72h, 形成生物膜膜的能力。待培养到指定时间, 吸走培养基, 将 96 孔板置于 55 ℃干燥 30 min, 加入 1 mL 0.1% 的结晶紫室温下染色 5 min, 将未吸附的结晶紫吸走, 用 ddH_2O 洗两遍, 将 96 孔板置于 55 ℃干燥 15 min, 用体积分数 80% 乙醇-20% 丙酮洗脱吸附的结晶紫, 吸取 100 μL 洗脱液置于 96 孔板中, 使用酶标仪测量其在 570 nm 下的吸光度, 比较 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 生物膜形成能力的差异。

1.8 自身凝集性(autoagglutination, AAG) 研究主要根据 Lieke B. van Alphen 等[12]方法稍加修改, 将 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 在 MH 液体培养基中培养至对数期, 收集到灭菌的 PBS (pH 为 7.5) 缓冲液中, OD_{600}调整到 1.0, 吸取 4 mL 菌液置于灭菌的试管中, 室温静置, 每隔 1 h 拍照, 从上清液的上部吸取 1 mL 菌液, 混匀, 测定其在 600 nm 下的吸光度, 每样做 3 个平行。自身凝集性强的菌株将不会保留在上清液的上部, 从而导致上部的 OD 值降低, 根据不同时间测定的 OD 值绘图, 观察野生型和突变株形成 AAG 能力的差异。

1.9 RT-PCR 的方法研究 *flh*A 的调节功能 本实验主要利用 RT-PCR 技术研究 *flh*A 对鞭毛丝主结构蛋白合成基因 *fla*A 和调节因子合成基因 *fli*A(σ^{28})、*rpo*N(σ^{54}) 在转录水平上的调节作用。选择 16*sr*DNA 为内参基因, 相关基因的扩增引物如表 1 所示。用 RNA 提取试剂盒提取 WT 和 HXW001 的总 RNA, 定量, 保持两者一致; 使用 RNase-Free DNase 试剂盒去除 RNA 中的 DNA, 排除 DNA 污染; 按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 操作步骤合成 cDNA, 使用设计的各基因的 RT-PCR 引物进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 20 s, 20 个循环, 72 ℃再延伸 10 min, 10 ℃保存。1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 本研究中所使用的 RT-PCR 引物

Tab. 1 RT-PCR Primers used in this study

引物	寡核苷酸序列
*fla*A RTF	5′-ATGGGATTTCGTATTAACACCAATG-3′
*fla*A RTR	5′-CATTACCATTAGATATAGCTTGACC-3′
*fli*A RTF	5′-ATGAATTCAAAGAAAGACGAAG-3′
*fli*A RTR	5′-ATCATTTCTTCAACGCCTATG-3′
*rpo*N RTF	5′-GGAGTTAGATGAAGATATTGATG-3′
*rpo*N RTR	5′-GGATTGAAATTTCAGGATAATAATC-3′
16*sr*DNA RTF	5′-GTCGAACGATGAAGCTTCTAG-3′
16*sr*DNA RTR	5′-CTATATAGTCTCATCCTACACCG-3′

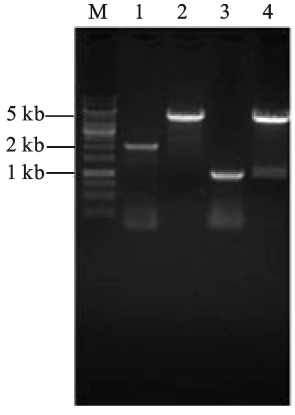
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结　果

.1　成功构建 *C. jejuni* ATCC33 91 *flh*A 突变株

分别以 *C. jejuni* ATCC33291 基因组和 PET28a 质粒为模板, 分别用引物 *F*1/*R*1, *F*2/*R*2 扩增出 *flh*A(2 175 bp)和 *kan*^{r}(1 032 bp), 经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 泳道 1 中在 2 000 和 2 500 bp 之间有一条明显的亮带即为目的条带, 泳道 3 中在 1 000 和 1 500 之间有目的条带。将从 *E. coli* JM 109 中提取出来的重组质粒 PMD-19T-*flh*A 和 PMD-19T-*flh*A-*kan r* 用 NcoⅠ酶切验证, 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 泳道 2 在 3 000 和 3 500 bp 之间有单一条带, 单酶切大小正确, 说明 *flh*A 基因顺利连接到 PMD-19T 载体上; 泳道 4 中在 1 000 bp 左右和 3 000 到 3 500 bp 之间各有一条条带, 单酶双切大小正确, 说明 *kan*^{r} 抗性基因顺利插入到 PMD-19T-*flh*A 基因中间, 重组质粒构建成功。如图(2-1) 所示, 同时, 重组质粒测序结果显示正确。

分别提取 *C. jejuni* ATCC33291 和 *flh*A 敲除转化子的基因组, 以其为模板, 使用引物 *F*1/*R*1 进行 PCR 扩增验证 *flh*A 是否已被 *kan*^{r} 定点插入, 从图 2-2 中可以看出泳道 1 作为对照在 2 000 至 2 500之间有一条带, 泳道 2 在 3 000 至 3 500 之间有一条带, 即为 *flh*A-*kan*^{r} 的大小, 大小完全正确, 证明 *flh*A 突变株构建成功, 并命名为 HXW001。



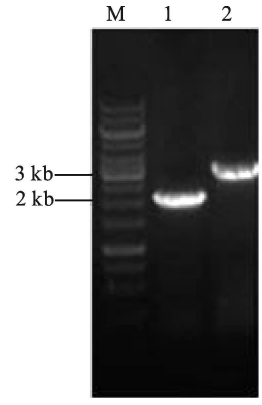
M: Marker 1: PCR 扩增 *flh*A; 2: *Nco*Ⅰ 酶切 PMD-19T-*flh*A; 3: PCR 扩增 *kan*^{r}; 4: *Nco*Ⅰ 酶切 PMD-19T-*flh*A-*kan*^{r}

图 -1　重组质粒的构建

Fig. -1　Construction of the recombinant plasmid

.　HXW001 在液体环境中生长稳定

通过测定生长曲线, 比较 *C. jejuni* ATCC33291 与 HXW001 液体环境中生长情况的差异, 结果如图 3 所示, *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 在各个时期的生长状况几乎完全相同。



M: Marker; 1: 野生型对照; 2: 以突变株基因组为模板 PCR 扩增 *flh*A

图 -　*flh*A 突变株构建

Fig. -　Construction of *flh*A mutant

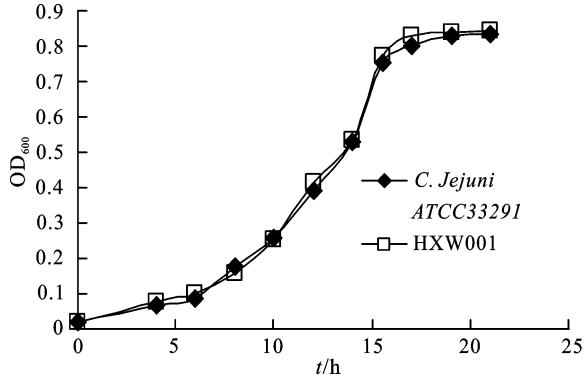


图 3　*C jejuni* ATCC33 91 WT 和 HXW001 生长曲线的测定

Fig. 3　Growth curve of *C jejuni* ATCC33 91 and HXW001

.3　HXW001 丧失运动能力

在 0.4 g/dL 的半固体琼脂平板上测定 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 的运动能力, 如图 4 所示, 在培养 2 d 后, *C. jejuni* ATCC33291 形成明显的扩散生长环, 而 HXW001 只在接种处生长, 丧失了运动能力。

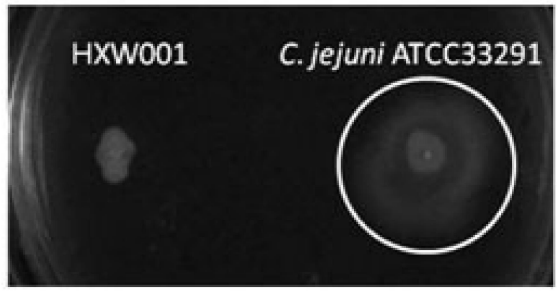


图 4　在 0.4 g/dL 半固体琼脂平板上测运动能力

Fig. 4　Motility test on 0.4 g/dL semi-solid agar plate

.4　电镜观察 HXW001 失去鞭毛

比较透射电镜的观察结果(见图 5), HXW001 虽形态仍为螺旋, 但丧失了鞭毛结构, 这与上述运

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

动性实验结果相一致。

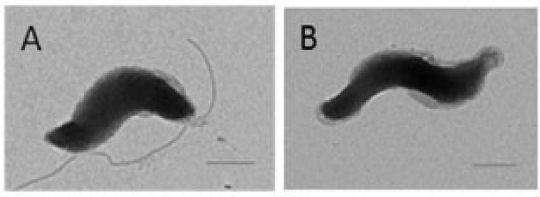


图 5 透射电镜观察鞭毛结构

Fig. 5 Transmission electron micrographs of negatively stained *C j ejuni* ATCC33 91(A) and HXW001 (B). Bars present 1μm

.5 HXW001 生物膜形成能力下降

由前期实验可知 *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 有同样的生长速度和终浓度, 图 6 中可以看出 24 h 和 48 h 时, *C. jejuni* ATCC33291 和 HXW001 形成的生物膜菌很少, HXW001 略低于 *C. jejuni* ATCC33291, 72 h 时, *C. jejuni* ATCC 33291 形成的生物膜大量增加, 而 HXW001 却只有很少量的增加。

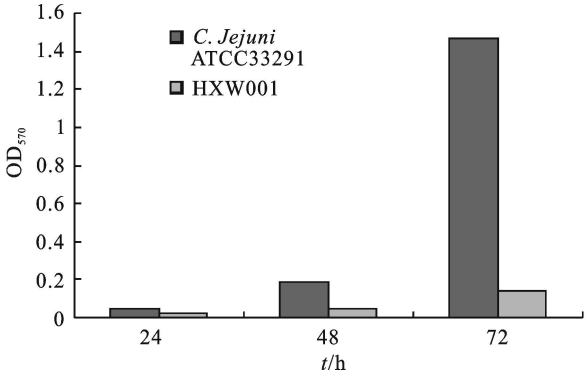
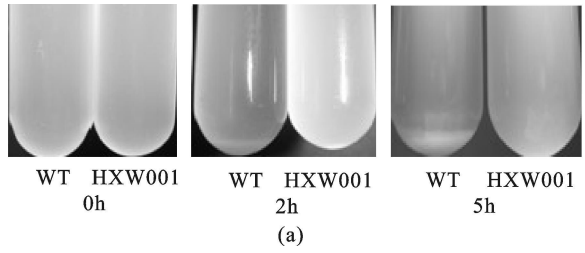


图 6 生物膜形成情况分析

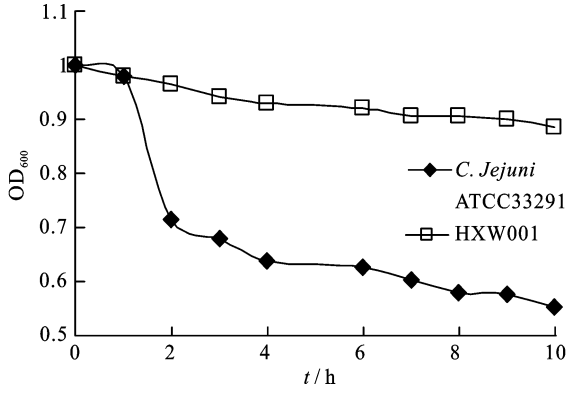
Fig. 6 Biofilm formation assays

.6 HXW001 自身凝集现象减弱

对 AAG 进行了定性观察和定量分析。如图 7 (a) 所示, 在 2 h 时 *C. jejuni* ATCC33291 产生了很明显的自身凝集现象, 试管底部形成了明显的沉淀; 反之, HXW001 仍然是处于悬浮状态, 无明显沉淀; 5 h 时 *C. jejuni* ATCC33291 沉淀进一步增多, 自身凝集现象更加明显, HXW001 仍基本处于悬浮状态, 自身凝集现象不明显。同时, 通过测量在不同时间试管上部的细菌悬液的在 600 nm 下的吸光度, 制作曲线, 从图 7(b) 中可以看出, 在前 2 h 里, 野生型菌株发生了快速的自身凝集现象, 随后的几个小时中速度缓慢, 在 10 h 后基本不再发生自身凝集现象; HXW001 在此期间仅有很微弱的自身凝集现象。



(a)



(b)

图 7 自身凝集性分析(a) 野生型和突变株在 0, , 5h 时形成自凝集沉淀的差异(b) 野生型和突变株自凝集形成的动力学曲线

Fig. 7 Autoagglutination assays (A) Autoagglutination at 0, and 5 h of incubation is depicted to illustrate the difference in kinetics of pellet formation between the wild-type and the mutant strain (B) Kinetics of the autoagglutinationas measured by the drop in OD_{600}

.7 *flh*A 对 *fla*A 有一定的调控功能

主要利用 RT-PCR 技术研究 *flh*A 对 *fla*A、*fli*A 和 *rpo*N 在转录水平上的调节作用, 从电泳图 (8) 中可以看出 HXW001 的鞭毛丝蛋白基因 *fla*A 较 *C. jejuni* ATCC33291 表达量明显下降, 只有很微弱的表达; 而 *fli*A 和 *rpo*N 的表达量与 *C. jejuni* ATCC33291 并无太大差别。

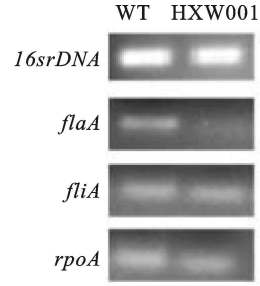


图 8 RT-PCR 分析 *flh*A 的调节功能

Fig. 8 RT-PCR analysis of regulating function of *flh*A

3 讨 论

尽管不少学者一直致力于在不同的研究方向

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上探索空肠弯曲菌的致病机制, 但迄今尚不完全清楚。生物信息学分析表明, 较其它几种常见的肠道致病菌, *C. jejuni* 鞭毛输出系统可能与鞭毛有更为紧密的致病相关性。革兰氏阴性肠道病原菌鞭毛输出系统主要由 *flh*A、*Flh*B、*Fli*O、*Fli*P、*Fli*Q、*Fli*R、*Fli*I、*Fli*F、*Fli*H 9 种蛋白构成, 其中 *flh*A 是鞭毛输出装置中的关键组分[13]。

基于基因同源重组的原理, 运用分子生物学技术, 本研究成功构建了 *C. jejuni flh*A 插入失活突变株 HXW001。生长曲线测定显示, HXW001 和 WT 的生长状况几乎完全相同, 电镜观察可见其基本形态没有变化, 说明 *flh*A 并不是 *C. jejuni* 菌株生长所必须的基因, 这也为后期进行的一系列实验排除了由于生长状况而造成的差异。电镜观察和运动性分析表明, HXW001 丧失了鞭毛以及运动能力, 可见 *flh*A 是鞭毛生成所必需, 与 *C. jejuni* 的运动性具有密切的关系。运动能力是空肠弯曲菌一个非常重要的毒力因素, 在感染的起始阶段赋予菌体趋化能力, 并可促进细菌对宿主细胞的黏附和侵入, 运动能力的丧失将严重影响空肠弯曲菌在肠道的定植, 导致致病性下降。

空肠弯曲菌个体对环境要求非常苛刻, 对氧气浓度非常敏感, 其之所以能够在食品上及污水中生存从而造成人类疾病, 主要是因为能够形成抵抗外界不利的环境的生物膜。生物膜研究创始人之一的 Costerton[14] 在 1995 年将生物膜定义为由细菌分泌的胞外基质包裹着菌体在有生命的或无生命的物体表面形成的高度组织化的多细胞结构。当细菌受到各种压力, 如低 pH 值, 高渗透压, 抗菌剂和抗生素等, 为了抵抗不利的环境, 细菌便以同样的方式生长形成生物膜, 这是细菌具有的一种非常重要的环境适应机制。在 *C. jejuni* 其它菌株的研究中已经显示, 鞭毛结构对生物膜初期、成熟有重要作用[15]。本实验研究发现 *C. jejuni flh*A 缺失导致了生物膜形成能力严重下降, 推测主要可能是因为鞭毛的缺失的影响。鞭毛介导的运动性能促进菌体对物体表面的附着, 在生物膜的形成过程中, 可能需要鞭毛作为菌体间的识别因子, 另推测可能由于在形成生物膜的过程中需要鞭毛输出装置输出生物膜形成过程中所必须的因子, 而 *flh*A 作为鞭毛输出装置中的关键基因, 其丧失必然会影响到生物膜的形成。

自身凝集性(AAG)是许多 G^- 病原菌的毒力标志, 在 *Yersinia enterocolitica*、*enteropathogenic Escherichia coli* 和 *Vibrio cholera* 致病机制中起着重要的作用[16-18]。目前, 已有研究表明 *C. jejuni* 不同菌种形成 AAG 的能力差异很大, 主要分为 3 种类型: (i) AAG 形成能力非常强; (ii) 形成 AAG 能力弱, 水洗后, 形成能力增强, (iii) 形成 AAG 能力非常弱, 水洗没有任何影响[19]。通过本次研究, 我们发现 *C. jejuni* ATCC33291 属于第一类, 具有非常强的自身凝集现象, AAG 的形成对空肠弯曲菌侵入宿主细胞起着非常重要的作用, 而 *flh*A 的缺失, 使得 AAG 形成能力严重减弱, 导致空肠弯曲菌致病性严重下降。*flh*A 的缺失, 影响了鞭毛蛋白的合成和装配, 而鞭毛丝上的糖基化蛋白很可能是自体凝集的重要因子。

C. jejuni 鞭毛的合成、装配和表面修饰是一个有序而级联的过程, 存在三级调控系统, 分别受 σ^{70}、σ^{54}、σ^{28} 调节。σ^{28} (*fli*A) 主要调节鞭毛丝(*fla*A) 蛋白、帽蛋白、鞭毛蛋白翻译后修饰蛋白以及毒力蛋白的合成, σ^{54} (*rpo*N) 主要调节鞭毛钩、基体、鞭毛丝 (*fla*B) 及其他相关功能未知蛋白的合成, *flh*A 受 σ^{70} 调节, 是三级调控系统中早期表达的基因, 对鞭毛后期基因的有序表达有调控功能[7], 但具体的分子机制仍不是很清楚。本文通过 RT-PCR 技术研究初步显示, *flh*A 对于鞭毛丝主结构蛋白合成基因 *fla*A 有重要的调控作用, *flh*A 丧失, 使得 *fla*A 在转录水平上的合成大大减少, 从而影响鞭毛丝蛋白的合成, 这可能是菌体本身的自我调节作用, *flh*A 为鞭毛输出装置的关键基因, 其影响合成鞭毛丝蛋白的输出, 菌体为了节省能量, 在 *flh*A 丧失时, 直接降低鞭毛丝蛋白在转录水平上的表达。但是 *flh*A 功能缺失的信号通过何种分子传导途径影响 *fla*A 的表达, 是值得深入探索的研究课题, 本文研究结果初步显示 *flh*A 功能缺失, 在降低 *fla*A 转录的同时并没有明显影响 *fla*A 的直接调节因子 σ^{28} 的表达, 也没有明显影响 σ^{28} 上级调节因子 σ^{54} 的表达, 是否 *C. jejuni flh*A 是通过强化 σ^{28} 抗性因子 FlgM 途径调控 *fla*A 的表达, 还是通过其他途径等, 是令人感兴趣的问题, 也是本课题拟进一步深入研究的内容之一。

4　结　语

本文的研究结果表明, *C. jejuni* 鞭毛输出系统的关键基因 *flh*A 对鞭毛的合成和装配起重要作用, 是鞭毛结构和功能的分子基础。本研究构建的 *flh*A 插入失活突变株 HXW001 生长性能稳定, 运动能力丧失, 生物膜形成能力和自身凝集现象明显下降, 表明该变异株毒力明显减弱, 有望成为减毒

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

活菌疫苗的候选菌株。

参考文献(References):

[1] Altekruse S F, Stern N J, Fields P I, et al. Campylobacter jejuni an emerging food borne pathologen[J]. **Emerg Infect Dis,** 1999, 5: 28-35.

[2] Ryan M M. Guillain-Barre syndrome in childhood[J]. **J Paediater Child Health,** 20-05, 41: 237-24.

[3] Wassenaar T M, Bleumink-Pluym N M, van der Zeijst B A. Inactivation of *Campylobacter jejuni flagellin* genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not flaB is required for invasion[J]. **EMBO J,** 1991, 10: 2055-2061.

[4] Grant C C, Konkel M E, Cieplak Jr W, et al. Role of flagellar in adherence, internalization and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures[J]. **Infect. Immun,** 1993, 61: 1764-1771.

[5] Yao R, Burr D H, Doig P, Trust T J, et al. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells[J]. **Mol. Microbiol,** 1994, 14: 883-893.

[6] Lee A, O'Rourke J L, Barrington P J, et al. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model[J]. **Infect. Immun,** 1986, 51: 536-546.

[7] Catherine D Carrillo, Eduardo Taboada, John H E Nash, et al. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA[J]. **The Journal Of Biological Chemistry,** 20-04, 279: 20327-20338.

[8] Konkel M E, Klena J D, Rivera-Amill V, et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus[J]. **J Bacteriol,** 2004, 186: 3296-3303.

[9] Jeff F Miller, William J Dower, Lucy S Tompkins. High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA[J]. **Proc Nati Acad Sci USA,** 1988, 85: 856-860.

[10] Martin Kalmokoff, Patricia Lanthier, Tammy-Lynn Tremblay, et al. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm Formation[J]. **J Bacteriol,** 2006, 188: 4312-4320.

[11] Ryan J Resser, Robert T Medler, Stephen J Billington, et al. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions[J]. **Applied and environmental microbiology,** 2007, 73: 1908-1913.

[12] Lieke B van Alphen, Manfred Wuhrer, Nancy MC Bleumink-Pluym, et al. A functional *Campylobacter jejuni* maf4 gene results in novel glycoforms on flagellin and altered autoagglutination behavior[J]. **Microbiology,** 2008, 154: 3385-3397.

[13] Robert M Macnab. TypeⅢflagellar protein export and flagellar assembly[J]. **Biochimica et Biophysica Acta,** 2004, 1694: 207-217.

[14] Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms[J]. **Annu Rev Microbio,** 1995, l49: 711-745.

[15] O'Toole G. A and R Kolter. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. **Mol. Microbiol,** 1998, 30: 295-304.

[16] Chiang S L, Taylor R K, Koomey M, et al. Single amino acid substitutions in the N-terminus of Vibrio cholerae TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance[J]. **Mol. Microbiol,** 1995, 17: 1131-1142.

[17] Knutton S, Shaw R K, Anantha R P, et al. The typeⅣbundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal[J]. **Mol. Microbiol,** 1999, 31:499-509.

[18] Roggenkamp A, Neuberger H R, Flugel A, et al. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Mol[J]. **Microbiol,** 1995, 16: 1207-1219.

[19] Misawa N, Blaser M J. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*[J]. **Infect. Immun,** 2000, 68: 6168-6175.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net