

甲型副伤寒杆菌抗噬菌体及生物膜形成
基因的筛选及鉴定*毛普加^{1, 3)**} 冯梦蝶^{1)**} 洪 愉^{2)**} 许泽仰¹⁾ 赵继华²⁾ 杨洪文²⁾宋武战²⁾ 黄 芬¹⁾ 井申荣¹⁾ 曾韦锐^{1, 3)***}⁽¹⁾ 昆明理工大学医学院, 昆明 650500; ⁽²⁾ 成都军区昆明总医院核医学科, 昆明 650032; ⁽³⁾ 昆明学院医学院, 昆明 650214)

摘要 细菌生物膜(bacterial biofilm, BF)与大部分的细菌感染相关, 有助于病原菌抵抗外部不利的环境, 包括抗生素和抗噬菌体等。为了研究生物膜和抗噬菌体的作用机制, 本文以 6 株抗噬菌体甲型副伤寒杆菌(副甲菌)突变菌作为研究对象, 在 Rif(利福平)(200 mg/L)平板中划线并滴加噬菌体验证能否抗噬菌体, 将 6 株突变菌接种于 96 孔板中, 每组 3 个重复, 观察其成膜能力以及生物膜的形态, 定点突变和互补实验验证突变菌的噬菌体抗性是否由突变基因所引起。结果显示: 划线平板中野生型副甲菌在滴加 1.2×10^6 个噬菌体处出现空缺, 而 6 株突变菌在滴加 2.4×10^9 个噬菌体后仍能生长, 表明 6 株突变菌具有抗噬菌体特性; 6 株突变菌中, σ -54 依赖的翻译调节器突变菌成膜能力($A_{595}=1.1 \pm 0.2$)较野生型副甲菌($A_{595}=0.5 \pm 0.1$)显著性增强, 且差异显著($P < 0.05$), 光学显微镜下菌体聚集成粗大的不规则团块; 同源重组敲除野生型副甲菌 σ -54 依赖的翻译调节器, 突变菌出现噬菌体抗性, 将表达 σ -54 依赖的翻译调节器的载体转化该突变菌, 突变菌又恢复了噬菌体敏感性。结果表明, σ -54 依赖的翻译调节器是抗噬菌体和生物膜形成相关的基因。

关键词 甲型副伤寒沙门菌, 转座, 抗噬菌体, 生物膜

学科分类号 R378.2+4

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0389

甲型副伤寒杆菌(副甲菌, *Salmonella paratyphi* A)是人兽共患病甲型副伤寒的病原菌, 能够入侵并生存在宿主肠道细胞, 导致急性肠道炎症、腹泻等^[1]。据报道, 全球伤寒肠热病临床病例估计有 2700 万, 死亡病例约为 20 万, 其中大部分是由副甲菌引起的^[2], 在中国特别是广西、浙江、江苏、贵州、云南等省份近十几年均有甲型副伤寒暴发或流行。

生物膜是细菌黏附于表面分泌的多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等并将其自身包绕其中而形成的含有大量细菌膜样复合体, 生物膜中的细菌能够耐受多种环境压力, 例如紫外线、抗生素和噬菌体等^[3]。由于生物膜在食品工业和公共健康等方面具有十分重要的作用, 自 1978 年被首次描述以来已经成为研究热点。细菌生物膜的形成包括最初的吸附、微菌落形成和群体扩张 3 个时期^[4], 细菌胞外信号分子参与调节特定的转录因子, 从而促进基因组的表达, 改变浮游的生活方式形成生物膜。据

临床统计表明, 大约 80% 的细菌感染与生物膜相关^[5], 生物膜是病原菌耐药性形成的重要机制之一, 极大地增加了治疗难度^[6]。

前期研究^[7]中, 作者以强毒株副甲菌 CMCC50973 为研究对象, 通过接合转座、不对称 PCR、NCBI 比对分析 6 株抗噬菌体突变菌, 获知转座插入位点分别是溶菌酶、甲基转移酶、硫代硫酸盐还原酶电子前体、假定传感器激酶蛋白、乙酰乳酸合酶同工酶 III 大亚基和 σ -54 依赖的翻译调节器。本研究中, 进一步对 6 株抗噬菌体突变菌生物膜的形成能力进行了分析, 并通过定点突变和互补实验, 证明了 σ -54 依赖的翻译调节器是抗噬菌体

* 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010Y398), 云南省应用基础研究面上项目(2010ZC055, 2012FB135), 国家自然科学基金资助项目(31160193)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0871-65920776, E-mail: zengweikun@gmail.com

收稿日期: 2014-12-15, 接受日期: 2015-05-22

和生物膜形成的相关基因,为深入研究副甲菌抗噬菌体和副甲菌成膜机制,以及治疗成膜病原菌提供了一个新的思路.

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

利福平抗性(Rif^r)副甲菌 CMCC50973:实验室保存,源自强致病株 CMCC50973,通过抗性诱导 Rif^r(200 mg/L)抗性,并验证;是本实验转座子受体菌,也是实验中野生型副甲菌(wild-type *S. paratyphi* A)^[7].

副甲噬菌体 LSPA1^[8]:实验室保存,从医院污水中分离.已进行全基因组测序,并提交 GenBank, GI:676402673.

SM10 λ pir/pSC189^[9]:带有转座质粒 pSC189 的 SM10 λ pir,是本实验转座子供体菌. pSC189 是一种自杀性质粒,只能在 SM10 λ pir 中复制.

6株抗噬菌体副甲菌突变菌:SM10 λ pir/pSC189 和 Rif^r副甲菌接合转座后,经噬菌体筛选抗噬菌体突变菌,并利用不对称 PCR 测序得知插入位点^[10].

实验中所用 DNA marker DL2000、DNA marker DL5000 购自大连宝生物工程(TaKaRa)公司;卡那霉素、利福平购自上海生工有限公司;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成. TranStart FastPfu Fly DNA 聚合酶及配套 PCR 试剂购自北京金式金生物技术有限公司.

1.2 野生型副甲菌及噬菌体 LSPA1 的培养

取-20℃保存的野生型副甲菌、噬菌体 LSPA1 和 SM10 λ pir/pSC189 接种于 5 ml LB 液体培养基中,37℃培养过夜;将噬菌体 LSPA1 10 000 g 离心 1 min,上清液用无菌 0.2 μ m 滤膜过滤,并测量噬菌体 LSPA1 滴度;将野生型副甲菌和 SM10 λ pir/pSC189 划线,挑取单菌落接种于 5 ml LB 液体培养基中 37℃培养 6 h 备用.

1.3 6株突变菌抗噬菌体验证

取-20℃保存的 6 株突变菌和野生型副甲菌,37℃摇床(转速 200 r/min)培养过夜,按 1%比例接种,37℃摇床(转速 200 r/min)培养 6 h 于含有 Rif^r的 LB 平板划线,并滴加 2 μ l 噬菌体(1.2×10^{12} PFU/ml),野生型副甲菌滴加 2 μ l 噬菌体(6×10^8 PFU/ml)为对照,观察是否具有抗噬菌体的特性.

1.4 成膜突变菌的筛选

将 6 株突变菌和野生型副甲菌于 5 ml 含有

Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基中 37℃培养过夜,按 1%比例接种至 5 ml 含有 Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基中 37℃培养 4 h 备用.

将 96 孔板进行无菌处理:用 75%乙醇浸泡 20 min,放入超净台中晾干,再用紫外线照射 20 min. 在 96 孔板中加入 300 μ l 含有 Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基,按 1%比例分别接种 6 株突变菌和 Rif^r副甲菌,每组 3 个重复,放置潮湿环境中培养 10 天,在第 5 天时去净上清液并加入新鲜的 300 μ l 含有 Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基^[11].

1.5 结晶紫染色观察成膜情况

去除 96 孔板中的培养基,再用无菌水震荡洗涤 5 次,清除未形成生物膜的松散细菌,放置 45 min 晾干;加入 300 μ l 1%结晶紫溶液静置 45 min,弃去染色液,用无菌水震荡洗涤 3 次,在 96 孔板可以清晰看见紫色状颗粒(此步可以用荧光显微镜观察生物膜的形态);加入 300 μ l 95%乙醇使 96 孔板褪色, A_{595} 定量分析 6 株突变菌和 Rif^r副甲菌成膜的能力^[4,12].

1.6 定点突变

根据副甲菌 ATCC9150(NC 006511)基因组序列,设计引物(6-1、6-2 和 6-3、6-4)扩增插入基因前端和末端各 500 bp 片段(需给出引物序列或给出相应参考文献),然后利用融合 PCR 将 2 个片段融合在一起构建重组同源臂;将融合的片段和 pYG4 用 *Bgl* II 进行酶切、回收,并将 pYG4 回收的载体去磷酸化再回收,将 pYG4 载体和融合片段在 T4 连接酶作用下连接,构建 pYG4-6 重组质粒,转化 SM10 λ pir 感受态细胞,提取重组质粒并用 *Bgl* II 进行酶切鉴定.

将鉴定成功的 SM10 λ pir/pYG4-6 和野生型副甲菌按 1%比例接种,37℃摇床(转速 200 r/min)培养 10 h,首先进行接合转座^[13-15]:各取 100 μ l 混合均匀后,涂布于无菌 0.2 μ m 滤膜上,正面朝上贴于不含抗性的 LB 固体平板中,37℃培养 3 h;用 1 ml LB 液体培养基冲洗下滤膜上的菌苔,取 100 μ l 涂布于含有 Rif^r(200 mg/L)和 K⁺(50 mg/L)的双抗 LB 平板,37℃培养过夜;然后,挑取单菌落于含有 Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基中,37℃摇床(转速 200 r/min)培养过夜,在含有 5%蔗糖不含抗性的 LB 平板中划线;挑取单菌落于含有 Rif^r(200 mg/L)的 LB 液体培养基中,37℃摇床(转速 200 r/min)培养过夜,用噬菌体鉴定是否具有抗噬菌体特性.

将具有抗噬菌体特性的定点突变菌株接种于 5 ml 含有 Rif^r (200 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37℃ 摇床(转速 200 r/min)培养过夜, 提取基因组: 将 5 ml 的 6 号突变菌 10 000 g 离心 1 min, 沉淀用 567 μl TE(pH 8.0)重悬, 加入 30 μl 10% SDS、3 μl 蛋白酶 K(20 g/L), 37℃ 温育 1 h; 加入 100 μl 5 mol/L NaCl, 混匀加入 80 μl CTAB/NaCl(0.1 g/ml), 混匀后 65℃ 温育 10 min; 加入等体积的氯仿 / 异戊醇, 震荡混匀, 10 000 g 离心 10 min, 收集上清液; 再加入等体积的酚 / 氯仿 / 异戊醇, 震荡混匀, 10 000 g 离心 10 min, 收集上清液, 然后加入 0.6 倍体积的异丙醇, 震荡混匀有白色沉淀, 12 000 g 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇、无水乙醇各洗 1 次、晾干, 沉淀用 100 μl TE(pH 8.0)重悬, 进行 PCR 验证。

1.7 互补实验

将鉴定正确的定点突变菌制备电转化感受态细胞。利用 6-1、6-4 引物扩增插入基因全序列, 并连接 pMD-18T 载体上, 构建 T-6 重组质粒; 将重组 T-6 质粒电转化至感受态细胞, 构建互补突变菌; 将互补突变菌 30℃ 摇床(转速 200 r/min)培养 8 h 于含有 Rif^r 的 LB 平板划线, 并滴加 2 μl 噬菌体(6×10^8 PFU/ml), 观察互补突变菌对噬菌体的敏感性^[16]。

2 实验结果

2.1 验证野生型副甲菌 Rif^r 抗噬菌体和突变菌抗噬菌体特性

验证野生型副甲菌的抗性, 将 SM10 λ pir/pSC189 和野生型副甲菌在含有 Rif^r (200 mg/L) 的 LB 平板上划线, 证明野生型副甲菌能正常生长而 SM10 λ pir/pSC189 不能生长(图 1)。

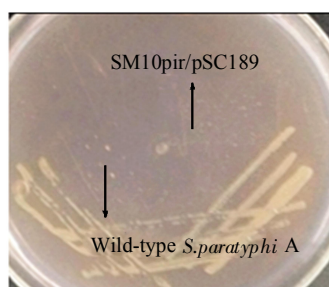


Fig. 1 Verification Rif^r resistance of the wild-type *S. paratyphi A* and SM10 λ pir/pSC189

将 6 株突变菌在含有 Rif^r (200 mg/L) 的 LB 平板划线, 然后滴加噬菌体(图 2)。野生型 Rif^r 副甲

菌在滴加 1.2×10^6 个噬菌体处出现缺失, 而 6 株突变菌在滴加 2.4×10^9 个噬菌体仍能正常生长, 证明了 6 株突变菌不能被噬菌体 LSPA1 感染, 具有抗噬菌体特性。

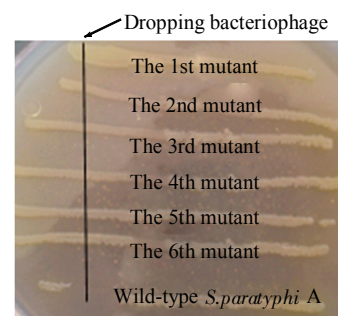


Fig. 2 Verification the anti-phage of mutants

2.2 突变菌成膜能力检测

将新鲜的 6 株突变菌接种于无菌的 96 孔板中, 37℃ 潮湿环境下培养 10 d, 测量 A_{595} (图 3), 结果表明 6 号突变菌成膜能力与野生型副甲菌相比有显著增加($P < 0.05$), 其他 5 株突变菌无显著性变化; 显微镜(10×40 倍)下观察 6 号菌及野生型副甲菌生物膜形态(图 4), 其中野生型副甲菌生物膜分布均

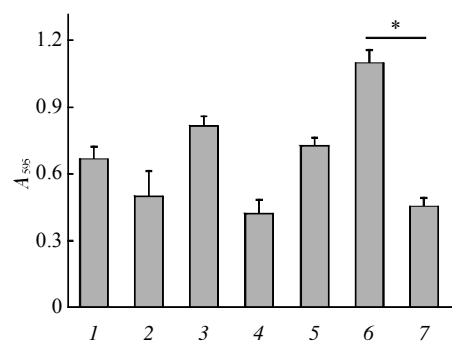


Fig. 3 Determination the BF forming ability of mutants and wild-type *S. paratyphi A*

* $P < 0.05$. 1: The 1st mutant; 2: The 2nd mutant; 3: The 3rd mutant; 4: The 4th mutant; 5: The 5th mutant; 6: The 6th mutant; 7: Wild-type *S. paratyphi A*.

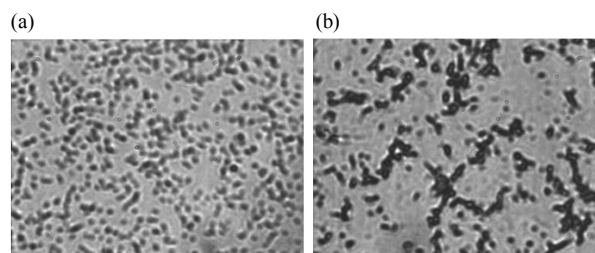


Fig. 4 The biofilms morphology of the 6th mutant and wild-type *S. paratyphi A*

(a) The wild-type *S. paratyphi A* biofilms morphology. (b) Biofilms morphology of the 6th mutant.

匀、大小相近且形状规则,而6号突变菌体积偏大且形态明显不规则;结果表明6号突变菌成膜能力显著增强且生物膜形态明显发生改变.因此,推断 σ -54依赖的翻译调节器可能参与调节与副甲菌的生长和群体效应相关机制,一旦发生突变,则副甲菌面临生存压力和群体效应失调,从而引起成膜能力增加和生物膜形态发生变化.

2.3 定点突变

由于6号突变株的转座插入位点是 σ -54依赖的翻译调节器,因此根据ATCC9150中 σ -54依赖的翻译调节器全基因序列,设计引物扩增整个基因前后各500 bp,并融合在一起构建同源臂(图5);将融合构建的同源臂和pYG4质粒(图6)连接构建

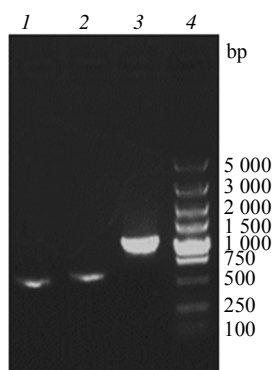


Fig. 5 Construction of homology arms

1: Amplification before the 6th inserted 500 bp fragment; 2: Amplification after the 6th inserted 500 bp fragment; 3: Fusion PCR of target fragment; 4: 5K Marker.

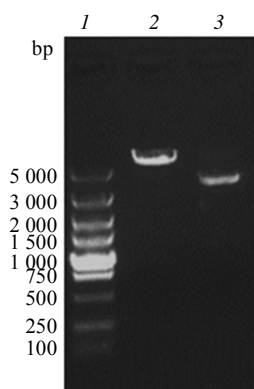


Fig. 6 pYG4 digested map

1: 5K Marker; 2: pYG4 *Bgl* II digested product; 3: pYG4 plasmid.

pYG4-6, 酶切鉴定(图7);将构建的pYG4-6电转化至SM10 λ pir感受态细胞中,利用接合转座筛选抗噬菌体同源重组单菌(图8),提取其基因组、PCR鉴定,野生型副甲菌目的片段约为3000 bp,

重组成功的为1300 bp(图9),证明了定点突变成功.上述结果表明,定点突变成功的突变菌具有抗噬菌体特性, σ -54依赖的翻译调节器参与了抗噬菌体过程.

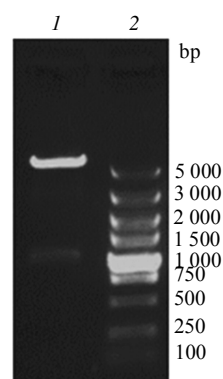


Fig. 7 Identification of the recombinant pYG4-6

1: Recombinant pYG4-6 *Bgl* II digested product; 2: 5K Marker.

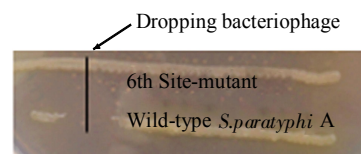


Fig. 8 Anti-phage verification of the 6th site-mutant

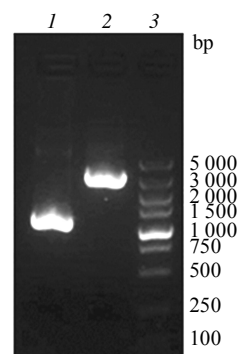


Fig. 9 Identification of site-mutant by PCR

1: Site-mutant PCR; 2: Wild-type *S.paratyphi A* PCR; 3: 5K Marker.

2.4 互补实验

将突变位点全基因构建到pMD-18T,并转化至6号突变菌中,30℃摇床(转速200 r/min)过夜培养,检验是否对噬菌体LSPA1敏感.结果如图10所示,在互补突变菌和野生型副甲菌单线中滴加 1.2×10^6 个噬菌体处均出现缺失,表明了互补表达 σ -54依赖的翻译调节器恢复6号突变菌噬菌体敏感性.

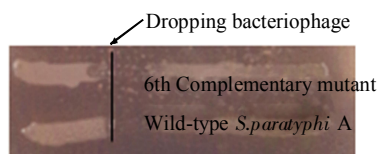


Fig. 10 Anti-phage verification of the 6th complementary mutant

3 讨 论

噬菌体是公认的环境生态参与者, 对微生物生态环境和宿主细菌进化具有重要的影响, 因此在大多数环境下, 噬菌体和宿主菌参与持续的协同进化, 在这种协同进化系统中噬菌体侵染和噬菌体抗性机制扮演调节的关键角色, 两者之间达到宿主-噬菌体的动态平衡. 在噬菌体侵染的压力下宿主菌会产生多种抗噬菌体的机制, 而促进生物膜的形成是其中的机制之一^[17].

利用 96 孔板研究生物膜是目前检测细菌生物膜形成机制的常用方法. 一般来说液体培养基于空气交界处是细菌最易黏附的场所, 但是本实验研究对象甲型副伤寒杆菌为兼性厌氧菌, 所以在 96 孔板底部形成生物膜相对较多, 结晶紫染色可见明显颗粒状存在, 从结晶紫颜色和测量的 A_{595} 值能够反映形成生物膜的能力.

为了研究抗噬菌体和成膜的相关基因, 我们对 6 株抗噬菌体突变菌进行了生物膜分析, 证明了 σ -54 依赖的翻译调节器突变菌抗噬菌体且成膜能力显著增强. 在互补实验中, 构建的 T-6 重组质粒在野生型副甲菌中因大量表达 σ -54 依赖的翻译调节器, 会严重影响宿主的生长, 导致细菌生长状态极差. 文献报道, 在 30℃ 下含有 ColE1 复制子的质粒拷贝数会明显下降^[18], 而 T-6 中的复制子正是 ColE1, 因此本研究中我们选择 30℃ 条件下进行互补实验, 此时细菌生长状态正常, 而获得 T-6 互补的突变菌又恢复了噬菌体敏感性.

生物信息学分析发现, σ -54 依赖的转录调节因子在多株伤寒杆菌中高度保守, 其编码的 σ -54 依赖的转录调节因子为 NorV、W 启动子的转录激活子 NorR, 调控 NO 还原酶合成, 进而降解 NO^[19]. NO 对微生物生长影响具有两面性: 一方面 NO 能够杀伤微生物^[20], 另一方面 NO 也可增强微生物耐药性以及致病能力^[21]. 研究表明 NO 能够增强细菌的群体效应, 而生物膜的形成是细菌群体效应的一

个重要结果^[22]. 虽然目前尚无 NO 与宿主抗噬菌体之间关系的报道, 但根据本文实验结果, 我们推测 σ -54 依赖的翻译调节器缺失, 造成 NO 还原酶合成障碍, 导致 NO 浓度增高, 进而通过群体效应增强了副甲菌形成生物膜的能力, 使突变菌表现出抗噬菌体抗性, 这其中的具体途径和过程有待进一步的研究证实. 此外, σ -54 依赖的翻译调节器的表达会明显抑制生物膜的形成, 因此可以通过增强该基因的表达, 来抑制病原菌生物膜的形成, 为抗生物膜治疗提供了一个新的思路.

参 考 文 献

- [1] Chessa D, Spiga L, De R N, *et al.* Lipopoly saccharides belonging to different salmonella serovars are differentially capable of activating toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 2014, **82** (11): 4553-4562
- [2] Zhou Z M, McCann A, Weill F X, *et al.* Transient Darwinian selection in *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi A* during 450 years of global spread of enteric fever. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(33): 12199-12204
- [3] Suo Y, Huang Y, Liu Y, *et al.* The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. *PLoS One*, 2012, **7**(10): 1-9
- [4] Zhu X N, Long F, Chen Y H, *et al.* A Putative ABC transporter is involved in negative regulation of biofilm formation by *listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(24): 7675-7683
- [5] Parsek M R, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 2003, **57**: 677-701
- [6] Liu Z, Que F, Liao L, *et al.* Study on the promotion of bacterial biofilm formation by a salmonella conjugative plasmid and the underlying mechanism. *PLoS One*, 2014, **9**(10): 1098-1107
- [7] 毛普加, 洪 愉, 冯 金, 等. 甲型副伤寒沙门菌噬菌体 PSPA1 感染宿主相关基因分析. *医学分子生物学杂志*, 2014, **11**(2): 38-42
- [8] 毛普加, 冯 金, 洪 愉, 等. 甲型副伤寒沙门菌噬菌体的分离及其生物学特性的分析. *中国生物制品学杂志*, 2014, **27** (4): 458-462
- [9] Mao P J, Hong Y, Feng J, *et al.* *J Medical Molecular Biology*, 2014, **11**(2): 38-42
- [10] Chiang S L, Rubin E J. Construction of a mariner-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene*, 2002, **296**(1-2): 179-185
- [11] Jacobs M A, Alwood A, Thaipisuttikul L, *et al.* Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(24): 14339-14344.
- [12] Ojha A K, Baughn A D, Sambandan D, *et al.* Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol*, 2008, **69**(1): 164-174

- [12] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, **40**(2): 175–179
- [13] Rakhuba D V, Kolomiets E I, Dey E S, *et al.* Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 2010, **59**(3): 145–155
- [14] Xiong K, Chen Z J, Xiang G M, *et al.* Deletion of *ycnD* gene in *Salmonella enterica* ssp *enterica* serovar Typhi leads to attenuation in mouse model. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, **328**(1): 70–77
- [15] Kumar A, Dalton C, Cortez C J, *et al.* Mini-Tn7 vectors as genetic tools for single copy gene cloning in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, **82**(3): 296–300
- [16] Hossain M J, Rahman K S, Terhune J S, *et al.* An outer membrane porin protein modulates phage susceptibility in *Edwardsiella ictaluri*. *Microbiology-Sgm*, 2012, **158**(1): 474–487
- [17] Rickard A H, Gilbert P, High N J, *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 2003, **11**(2): 94–100
- [18] Lin C S, Chen W T, Wong T T. High copy number of the pUC plasmid results from a *Rom/Rop*-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology*, 1992, **6**(22): 3385–3393
- [19] Gardner A M, Christopher R G, Gardner P R. Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(12): 10081–10086
- [20] Kamada N, Chen G Y, Inohara N, *et al.* Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 2013, **14**(7): 685–690
- [21] Green J, Rolfe M D, Smith L J. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. *Virulence*, 2014, **5**(8): 794–809
- [22] Bernadette M H, Higgins K E, Elizabeth M B. Discovery of a nitric oxide responsive quorum sensing circuit in *Vibrio harveyi*. *ACS Chemical Biology*, 2012, **7**(8): 1331–1336

Screening and Identification of Genes of *Salmonella paratyphi* A Related to Anti-phage and Biofilm Formation*

MAO Pu-Jia^{1,3**}, FENG Meng-Die^{1**}, HONG Yu^{2**}, XU Ze-Yang¹, ZHAO Ji-Hua², YANG Hong-Wen², SONG Wu-Zhan², HUANG Fen¹, JING Shen-Rong¹, ZENG Wei-Kun^{1,3***}

⁽¹⁾ Medical Faculty, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

⁽²⁾ Department of Nuclear Medicine, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China;

⁽³⁾ Medical Faculty, Kunming University, Kunming 650214, China)

Abstract Biofilm (bacterial biofilm, BF) are associated with most bacterial infections, which can help pathogens against adverse environment, such as antibiotic and phages. In order to exploit the mechanism involved with BF formation and anti-phage, six *Salmonella paratyphi* A (*S. paratyphi* A) mutants resistant to phage were analyzed in this study. Phages were dropped on bacteria line on LB plate containing Rif^r (200 mg/L) to confirm phage resistance. Six mutants were cultured in 96 well plate with three replications to monitor biofilm formation and morphology. Site-directed mutagenesis and complementation test were used to confirm whether phage resistance was caused by gene mutant. Results of this study showed that all six mutants were resistant to phage, because those could growth with dropped 2.4×10^9 phages and wild bacteria could not with dropped 1.2×10^6 phages. Among six mutants, BF formation of mutant of σ -54-dependent translation regulator was significantly enhanced contrast with wild bacteria ($P < 0.05$, 1.1 ± 0.2 vs 0.5 ± 0.1). Bacteria aggregated to large irregular mass. Site-directed mutation of σ -54-dependent translation regulator with homologous recombination led to be resistant to phages. This resistance could be recovered by supplemented with plasmid expressed σ -54-dependent translation regulator. All those showed that σ -54-dependent translation of the regulator was associated with anti-phage and BF formation.

Key words *Salmonella paratyphi* A, transposition, anti-phage, biofilm

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0389

*This work was supported by grants from Foundation of Yunnan Educational Committee (2010Y398), Natural Science Foundation of Yunnan Province of China (2010ZC055, 2012FB135), The National Natural Science Foundation of China (31160193).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-871-65920776, E-mail: zengweikun@gmail.com

Received: December 15, 2014 Accepted: May 22, 2015