

· 医药生物技术 ·

fliL 基因显著影响艰难拟梭菌运动功能及产孢能力

鲍江舰^{1,2}, 杨君仪², 邵瑞瑞², 张婷², 廖健⁴, 程玉梅⁵, 官志忠^{2,6},
齐晓岚^{2,3}, 陈峥宏¹, 洪伟^{2,3*}, 崔古贞^{1*}

- 1 贵州医科大学基础医学院 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550004
- 2 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550001
- 3 省部共建地方病及民族区域性疾病防控协同创新中心, 贵州 贵阳 550001
- 4 贵州医科大学口腔医学院 附属口腔医院, 贵州 贵阳 550001
- 5 贵州医科大学附属医院综合 ICU, 贵州 贵阳 550001
- 6 贵州医科大学病理科 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550001

鲍江舰, 杨君仪, 邵瑞瑞, 张婷, 廖健, 程玉梅, 官志忠, 齐晓岚, 陈峥宏, 洪伟, 崔古贞. *fliL* 基因显著影响艰难拟梭菌运动功能及产孢能力[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1578-1595.

BAO Jiangjian, YANG Junyi, SHAO Ruirui, ZHANG Ting, LIAO Jian, CHENG Yumei, GUAN Zhizhong, QI Xiaolan, CHEN Zhenghong, HONG Wei, CUI Guzhen. The *fliL* gene significantly affects the motility and sporulation abilities of *Clostridioides difficile*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1578-1595.

摘要: 鞭毛基底体相关 FliL 家族蛋白(flagellar basal body-associated FliL family protein, *fliL*)基因编码 FliL 蛋白, FliL 是一种与鞭毛基体相结合的单跨膜蛋白。为研究艰难拟梭菌 *fliL* 基因功能, 使用非等长同源臂偶联等位交换(allele-coupled exchange, ACE)方法成功构建了 *fliL* 基因缺失($\Delta fliL$)和回补(*::fliL*)突变株, 研究突变菌株与野生型菌株(CD630)生长曲线、抗生素敏感性、pH 耐受性、运动能力及产孢能力等表型的差异。结果显示, 菌株 $\Delta fliL$ 生长速率及最大生物量均小于菌株 CD630, *::fliL* 回补菌株生长情况回复至野生型。与 CD630 菌株相比, $\Delta fliL$ 对阿莫西林、氨苄青霉素、诺氟沙星的敏感性提高, 对卡那霉素、四环素敏感性降低, *::fliL* 抗生素敏感性部分回复至野生型水平。与 CD630 菌株相比, $\Delta fliL$ 游泳运动能力显著降低, *::fliL* 运动能力超越野生型菌株 CD630。相比菌株 CD630, 菌株 $\Delta fliL$ 在 pH 值为 5 时耐受能力显著提高, 在 pH 值为 9 时, 耐受能力显著降低。除此之外, $\Delta fliL$ 产孢能力较 CD630 显著降低, *::fliL* 产孢能力部分恢复。以上结果表明, 艰难拟梭菌 *fliL* 基因与其运动能力、抗生素敏感性、环境耐受能力和产孢能力密切相关, 可能进一步影响艰难拟梭菌菌株的致病力。

资助项目: 国家自然科学基金(32170134, 32160015, U1812403); 贵州省自然科学基金([2020]1Z067, [2019]1441); 贵州医科大学优秀青年人才计划([2022]101)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170134, 32160015, U1812403), the Guizhou Provincial Natural Science Foundation ([2020]1Z067, [2019]1441), and the Excellent Young Talents Plan of Guizhou Medical University ([2022]101).

*Corresponding authors. E-mail: CUI Guzhen, cuigz@gmc.edu.cn; HONG Wei, hongwei@gmc.edu.cn

Received: 2022-09-24; Accepted: 2022-12-06; Published online: 2022-12-09

关键词：艰难拟梭菌；非等长同源臂偶联等位交换；鞭毛；*fliL*；突变株表型

The *fliL* gene significantly affects the motility and sporulation abilities of *Clostridioides difficile*

BAO Jiangjian^{1,2}, YANG Junyi², SHAO Ruirui², ZHANG Ting², LIAO Jian⁴, CHENG Yumei⁵, GUAN Zhizhong^{2,6}, QI Xiaolan^{2,3}, CHEN Zhenghong¹, HONG Wei^{2,3*}, CUI Guzhen^{1*}

1 Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China

3 Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Endemic and Ethnic Regional Diseases Co-Constructed by the Province and Ministry, Guiyang 550001, Guizhou, China

4 Affiliated Stomatological Hospital, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China

5 Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China

6 The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China

Abstract: Flagella are the main motility structure of *Clostridioides difficile* that affects the adhesion, colonization, and virulence of *C. difficile* in the human gastrointestinal tract. The FliL protein is a single transmembrane protein bound to the flagellar matrix. This study aimed to investigate the effect of the FliL encoding gene flagellar basal body-associated FliL family protein (*fliL*) on the phenotype of *C. difficile*. The *fliL* gene deletion mutant ($\Delta fliL$) and its corresponding complementary strains ($::fliL$) were constructed using allele-coupled exchange (ACE) and the standard molecular clone method. The differences in physiological properties such as growth profile, antibiotic sensitivity, pH resistance, motility, and spore production ability between the mutant and wild-type strains (CD630) were investigated. The $\Delta fliL$ mutant and the $::fliL$ complementary strain were successfully constructed. After comparing the phenotypes of strains CD630, $\Delta fliL$, and $::fliL$, the results showed that the growth rate and maximum biomass of $\Delta fliL$ mutant decreased than that of CD630. The $\Delta fliL$ mutant showed increased sensitivity to amoxicillin, ampicillin, and norfloxacin. Its sensitivity to kanamycin and tetracycline antibiotics decreased, and the antibiotic sensitivity partially returned to the level of CD630 strain in the $::fliL$ strain. Moreover, the motility was significantly reduced in the $\Delta fliL$ mutant. Interestingly, the motility of the $::fliL$ strain significantly increased even when compared to that of the CD630 strain. Furthermore, the pH tolerance of the $\Delta fliL$ mutant significantly increased or decreased at pH 5 or 9, respectively. Finally, the sporulation ability of $\Delta fliL$ mutant reduced considerably compared to the CD630 strain and recovered in the $::fliL$ strain. We conclude that the deletion of the *fliL* gene significantly reduced the swimming motility of *C. difficile*, suggesting that the *fliL* gene is essential for the motility of *C. difficile*. The *fliL* gene deletion significantly reduced spore production, cell growth rate, tolerance to

different antibiotics, acidity, and alkalinity environments of *C. difficile*. These physiological characteristics are closely related to the survival advantage in the host intestine, which is correlated with its pathogenicity. Thus, we suggested that the function of the *fliL* gene is closely related to its motility, colonization, environmental tolerance, and spore production ability, which consequently affects the pathogenicity of *C. difficile*.

Keywords: *Clostridioides difficile*; allele-coupled exchange (ACE); flagellum; *fliL*; phenotypes of mutants

艰难拟梭菌是一种严格厌氧、革兰氏阳性产芽孢杆菌^[1]。人类肠道正常菌群可以有效地抑制艰难拟梭菌的定殖,但抗菌药物及免疫抑制剂的使用会引起肠道菌群紊乱,导致艰难拟梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)。CDI可引起腹泻、肠出血、肠穿孔及中毒性巨结肠等症状。近20年以来,随着高毒力 NAP1/BI/027 菌株的出现和传播,医院获得性 CDI (hospital acquired CDI, HA-CDI)的病人成倍增长。2000年至2017年北美国家 HA-CDI 导致病人死亡比例由小于1.5%增长至4.5%–5.7%,在流行期间甚至达到16.7%。在我国,CDI的发病率及复发率亦逐年提升^[1-4]。艰难拟梭菌引起的腹泻已逐渐成为抗生素相关性腹泻的主要类型。

鞭毛作为艰难拟梭菌主要的运动结构,其介导的运动能力影响着艰难拟梭菌在人体胃肠道的粘附、定殖及其毒力。鞭毛由鞭毛基体、鞭毛钩及鞭毛丝组成,鞭毛基体中包含多个定子单元及一个转子以实现细菌的运动功能。鞭毛基体的转子是由作为中央驱动轴的杆部及各类环状功能结构组成,定子则是作为“能量转换器”将离子通道的跨膜运输能量转换为力矩促进细菌运动^[5]。*fliL* 基因编码的 FliL 蛋白是一种与鞭毛基体相结合的单跨膜蛋白^[6]。有研究通过断层分析表明在伯氏疏螺旋体中 FliL 蛋白位于转子及定子附近^[7]。大量研究成果表明 FliL 蛋白在不同的菌株中发挥的作用并不完全相同,FliL 蛋白对于新月柄

杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 和类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的运动是必需的^[8-9]。Attmannspacher 等报道大肠杆菌和沙门氏菌 *fliL* 基因突变株在游泳运动能力上略有降低^[10]。Chawla 等在后续的研究中甚至得出了相反的结论即 *fliL* 基因并不是大肠杆菌运动所必需的结构^[11]。可见,FliL 蛋白的缺失在不同菌株中导致的表型变化并不一致。艰难拟梭菌 *fliL* 基因对其表型及致病力的影响目前尚不明确,仍需进一步研究。

目前各种不同的基因编辑技术被应用于艰难拟梭菌的遗传改造^[12-14]。接合转化在质粒转化时具有避开胞外核酸酶的显著优势,目前接合转化已大量用于艰难拟梭菌的基因编辑,其主要通过性菌毛将遗传物质从供体菌转移给受体菌。DNA 转移至艰难拟梭菌并在菌株内进行稳定复制一直是限制艰难拟梭菌相关研究的难题。2002年 Purdy 等在艰难拟梭菌 CD630 中首次发现 PCD6 质粒,并将促进了该质粒复制的主要功能元件(*orfA*)成功分离。以 *orfA* 为基础构建的 pMTL9301 质粒成功地通过接合转化从大肠杆菌 CA434 菌株转移至艰难拟梭菌中并进行稳定复制^[15],至此完善了穿梭质粒接合转化至艰难拟梭菌的技术。众多编辑技术中基于尿嘧啶缺陷菌株 $\Delta pyrE$ 的非等长同源臂偶联等位交换 (allele-coupled exchange, ACE) 编辑方法由 Heap 等建立,并成功应用于艰难拟梭菌中揭示了细胞壁结合半胱氨酸蛋

白酶(cell wall-binding cysteine protease, Cwp84)的功能^[16-17]。其原理在于乳清酸磷酸核糖基转移酶(orotate phosphoribosyl transferase, *pyrE*)基因缺失时艰难拟梭菌无法从头合成尿嘧啶导致细胞死亡,相反在该基因存在时细菌可以将5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)转化成具有毒性的5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)导致菌体死亡^[18](图1)。另一方面ACE技术通过非等长同源臂等位交换原理可控制同源重组发生顺序,实现对目标基因的可控敲除^[19]。

本研究中,我们建立了尿嘧啶从头合成过程中

的必需基因(orotidine-5'-phosphate decarboxylase, *pyrF*)的缺陷菌株 $\Delta pyrF$ (图1),以该菌株作为底盘细胞,使用非等长同源臂偶联等位交换(allele-coupled exchange, ACE)方法构建鞭毛基底相关 FliL 家族蛋白(flagellar basal body-associated FliL family protein, *fliL*)基因缺失菌株和回补菌株^[16]。通过对比野生型菌株、 $\Delta fliL$ 及其回补突变株在生长曲线、运动能力、抗生素敏感性、产孢能力等表型变化,研究艰难拟梭菌 FliL 蛋白生理、生化功能及其对艰难拟梭菌致病力的影响。

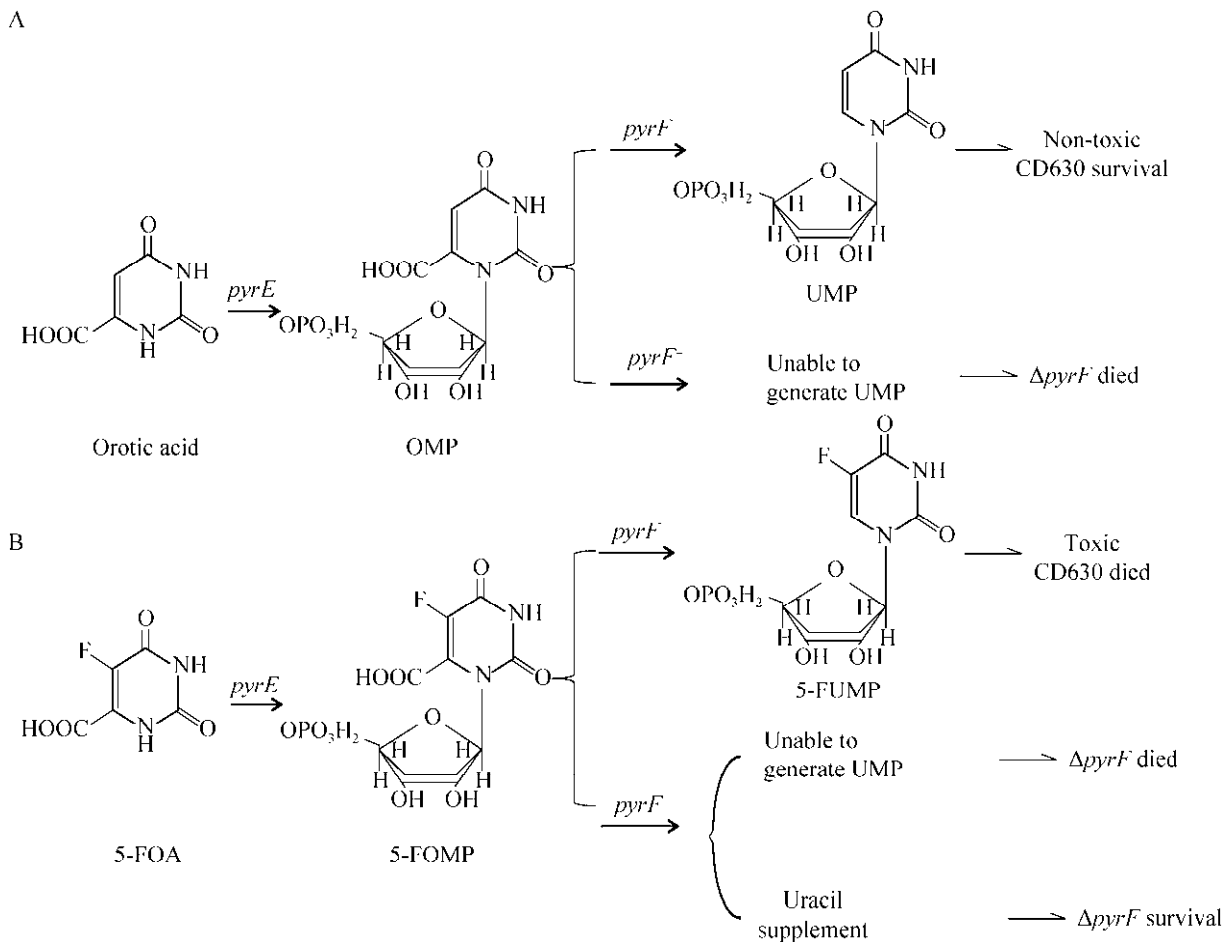


图1 尿嘧啶从头合成途径

Figure 1 Partial steps of the pyrimidine *de novo* biosynthesis pathway. A: Orotic acid was converted to non-toxic UMP by orotate phosphoribosyl transferase (*pyrE*) and orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*pyrF*). B: 5-fluoroorotic acid (5-FOA) was converted to toxic 5-fluorouracil (5-FUMP) by *pyrE* and *pyrF*.

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和培养条件

本研究中使用的菌株及质粒信息均列于表 1。选用大肠杆菌(*Escherichia coli*) (NEB Express Competent)作为宿主,通过化学转化的方式完成质粒 DNA 构建。以大肠杆菌 CA434 作为宿主,通过接合转化将大肠杆菌 CA434 的质粒 DNA 转移至艰难拟梭菌菌株 CD630^[19]。大肠杆菌菌株 NEB Express Competent 及大肠杆菌菌株 CA434 在添加氯霉素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 Luria-Bertani (LB)培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。LB 培养基配方:1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠。艰难拟梭菌 CD630 生长在脑心浸出液补充(brain heart infusion supplemented, BHIS)培养基中培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 厌氧环境),BHIS 培养基配方为:37.5% BHI 培养基,0.5%半胱氨酸盐酸盐,1%酵母提取物。培养基中加入

甲砒霉素(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢西丁(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、D 环丝氨酸(125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选艰难拟梭菌转化子。5-FOA 和尿嘧啶购买自北京索莱宝科技有限公司,5-FOA (100 mg/mL)被溶解在二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,尿嘧啶(20 mg/mL)被溶解在双蒸水中。筛选 ΔpyrF 菌株及 $\Delta\text{pyrF}\Delta\text{fliL}$ 时 5-FOA 及尿嘧啶被加入到 BHIS 培养基或艰难拟梭菌基本培养基(*Clostridioides difficile* minimal medium, CDMM)培养基中^[19]。琼脂粉(1.5%)加入 LB 培养基、BHIS 培养基和 CDMM 培养基中制备固体培养基。

1.2 质粒构建

本研究所使用的引物信息列于表 2。DNA 限制性内切酶购自 NEB 公司,DNA 聚合酶(2 \times Phanta Flash Master Mix 和 2 \times Rapid Taq Master Mix)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmid	Features	Resources
NEB express competent <i>E. coli</i> (high efficiency)	General cloning host for plasmid manipulation	NEB
CA434	Donor strain for conjugation between <i>E. coli</i> and <i>Streptomyces</i>	Lab stock
CD630	Wild-type <i>Clostridioides difficile</i> 630 strain (CD630)	American Type Culture Collection, ATCC
ΔpyrF	<i>pyrF</i> gene disruption mutant, derived from CD630	This work
$\Delta\text{pyrF}\Delta\text{fliL}$	<i>pyrF</i> gene and <i>fliL</i> gene disruption mutant, derived from ΔpyrF	This work
ΔfliL	<i>pyrF</i> gene complemented strain, derived from $\Delta\text{pyrF}\Delta\text{fliL}$	This work
:: <i>fliL</i>	<i>pyrF</i> and <i>fliL</i> complemented strain, derived from $\Delta\text{pyrF}\Delta\text{fliL}$	This work
pMTL82151	pBP1 ori, CmR, ColE1 ori, <i>traJ</i> , <i>lacZ</i> α fragment	[a]
pMTL-BY	For deletion of the <i>pyrF</i> gene, containing upstream and downstream homologous arms of <i>pyrF</i> , derived from pMTL82151	This work
pMTL-BJJ	Derived from pMTL82151, for deletion of the <i>fliL</i> gene, containing upstream and downstream homologous arms of <i>fliL</i>	This work
pMTL-BJ1	Derived from pMTL-BJJ, containing <i>pyrF</i> gene and promoter from <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	This work
pMTL-BJ2	Derived from pMTL82151, for complement for <i>pyrF</i> gene, containing CD630 <i>pyrF</i> gene and promoter	This work
pMTL-BJ3	Derived from pMTL-BJ2, for complement for <i>fliL</i> gene, containing <i>fliL</i> gene and promoter	This work

[a]: Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of Microbiological Methods* 78: 79–85.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in the study

Primer	Primer sequence (5'→3')	Usages
HW731	GCCTGCAGACATGCAAGCATGCAAACAGTGCAAAAAAT	Amplification of CD630_ <i>pyrF</i> deletion fragment
HW732	GTTATAGGTCTTCCAACAACAGCTTTATCAAATTCGTCAGT	
HW733	ACTGACGAATTTGATAAAGCTGTTGTTGGAAGACCTATAACAA	
HW734	ACGACGGCCAGTGCCAAGCCCTGGGCCATTAGATAATAAG	
HW735	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTATTGGTCCTGACCCTAATAC	Detection of CD630_ <i>pyrF</i>
HW736	AGACTGGGAAAGATATCTCAT	
HW681	ATCAGGAAACAGCTATGACCG	Detection of pMTL82151 multiple cloning sites
HW682	GTTTTCCCAGTCACGACGTT	
HW601	TTTTTTGTACCCTAAGTTTTTAAAACTAGACACTAATGATTGC	Amplify 8052_ <i>pyrF</i>
HW602	AGATTATCAAAAAGGAGTTTTTATATGTTCTTCACTGCTTCT	
HW605	ATCGTAGAAATACGGTGTTT	Detection of <i>pyrF</i> in pMTL-BJJ
HW606	ACGTTAAGGGATTTTGGTCA	
HW639	CGAGGCCTGCAGACATGCAATATTTAGTACGGGTTCAAGT	Amplification of the <i>fliL</i> deletion fragment
HW640	GTATCATGTCTTACCATCCTAAACCTCTTCCTCCTAGTCA	
HW641	TGACTAGGAGGAAGAGGTTTAGGATGGTAAGACATGATAC	
HW642	CGACGGCCAGTGCCAAGCTAGTATGTAACATCCAGCTTC	
HW797	TAAAAACATAGCAGATGCGT	Detection of <i>fliL</i>
HW798	GTGTTCCAAAGAATGCTACTA	
HW821	GTCACGCGTCCATGGAGATCAACATAGCAGATGCGTTAAA	Amplify <i>fliL</i> complement fragment
HW822	GCTTGCATGTCTGCAGGCCGTATCATGTCTTACCATCCT	
HW554	GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	Amplify <i>rrs</i> gene for RT-qPCR
HW555	GTGCCTCAGCGTCAGTTACAGT	
HW875	TGCAGGTTTGTATTCCAACAGG	Amplify <i>fliL</i> gene for RT-qPCR
HW876	CACCTTCATCAGCTAGCTTTAATACCA	

1.2.1 *pyrF* 敲除质粒构建

本研究中采用引物 HW731/HW732 以 CD630 基因组为模板扩增 CD630_ *pyrF* 基因上游同源臂(798 bp), 采用引物 HW733/HW734 以 CD630 基因组为模板扩增 CD630_ *pyrF* 基因下游同源臂(798 bp)。CD630_ *pyrF* 基因上下游片段产物为模板, 采用 HW731/HW734 引物扩增缺失 CD630_ *pyrF* 基因片段。使用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 同源重组试剂, 将上述缺失 CD630_ *pyrF* 基因的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物与 pMTL82151 质粒(通过 *Hind* III 线性化)连接, 构建 *pyrF* 敲除质粒 pMTL-BY。采用 HW681/HW682 验证质粒是否构建成功。

1.2.2 *fliL* 基因缺失质粒构建

以 CD630 基因组为模板, 采用 HW639/HW640 及 HW641/HW642 引物, 扩增 *fliL* 基因缺失片段(1 846 bp)。pMTL- BJJ 质粒通过同源重组连接 *fliL* 基因缺失片段及 pMTL-82151 质粒(通过 *Hind* III 线性化)构建。引物 HW681/HW682 验证 pMTL-BJJ 质粒(1 983 bp)是否构建成功。采用引物 HW601/HW602 以拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*) NCIMB 8052 菌株基因组为模板扩增其的 *pyrF* 基因及其启动子片段(2 875 bp), ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 同源重组试剂将扩增的菌株 8052 的 *pyrF* 基因片段及 *Pme* I 线性化 pMTL- BJJ 质粒连接。采用引物 HW606/HW605 验证构建完成

的质粒 pMTL-BJ1。

1.2.3 *pyrF* 回补质粒构建

构建 *pyrF* 回补质粒 pMTL-BJ2 时, 采用引物 HW731/HW734 以 CD630 基因组为模板扩增完整 CD630_ *pyrF* 基因及启动子片段, 通过同源重组方法将扩增的 CD630_ *pyrF* 基因及启动子片段及 *Hind* III 线性化 pMTL82151 质粒连接。采用 HW681/HW682 对构建完成的质粒进行验证。

1.2.4 *fliL* 基因回补质粒构建

以 CD630 基因组为模板, 采用 HW821/HW822 引物, 扩增 *fliL* 基因及其启动子片段 (1 070 bp)。通过同源重组方法将 *fliL* 基因及其启动子片段及 pMTL-BJ2 (*Xho* I 线性化) 质粒连接构建 pMTL-BJ3。

1.3 突变菌株构建

1.3.1 接合转化及 *pyrF* 基因敲除

按照 1.2 中所述的方法构建 pMTL-BY 质粒。将质粒偶联到艰难梭菌中, 以大肠杆菌

CA434 菌株作为质粒供体质粒偶联到艰难梭菌中, 得到携带 pMTL-BY 质粒抗耐氯霉素的转化子。接合转化方法参考文献[20]。将上述转化子在添加了 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FOA 的 BHIS 平板上培养 48 h。待平板上发现菌落, 采用 HW735/HW736 引物鉴定 *pyrF* 基因是否敲除(图 2)。

1.3.2 *fliL* 基因敲除

$\Delta\text{pyrF}\Delta\text{fliL}$ 基因敲除突变株的构建过程, 分为单交换菌株和双交换突变株的筛选(图 3)。首先将构建 pMTL-BJ1 质粒接合转化 ΔpyrF 菌株, 在 CDMM 甲磺霉素(thiamphenicol, Tm) 抗性平板(CDMM-Tm)培养基上选择耐 Tm 的转化子以获得单交换菌株。菌落是否为纯单交换采用两对不同的引物进行 PCR 验证。第一对引物结合位点为 pMTL-BJ1 质粒 LHA 外侧(HW681)和 CD630 基因组 RHA 外侧(HW798), 用于检测是否发生单交换; 第二对引物结合位点为 CD630 基因组 LHA 外侧(HW797)和 RHA 外侧(HW798), 用于检测是

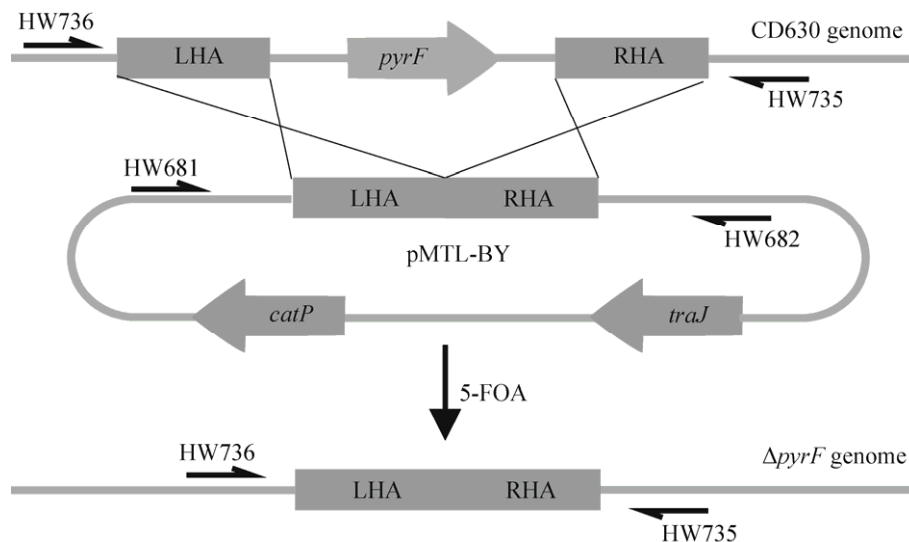


图 2 同源重组方法构建 ΔpyrF 突变株

Figure 2 Construction of ΔpyrF mutants by recombination method. Schematic diagram of the construction of ΔpyrF mutants. The RHA (right-side homology arm) and LHA (left-side homology arm) and on pMTL-BY plasmid recombinant with CD630 genome under 5-FOA stress. The colonies resistant to 5-FOA are screened by primer set HW736/HW735.

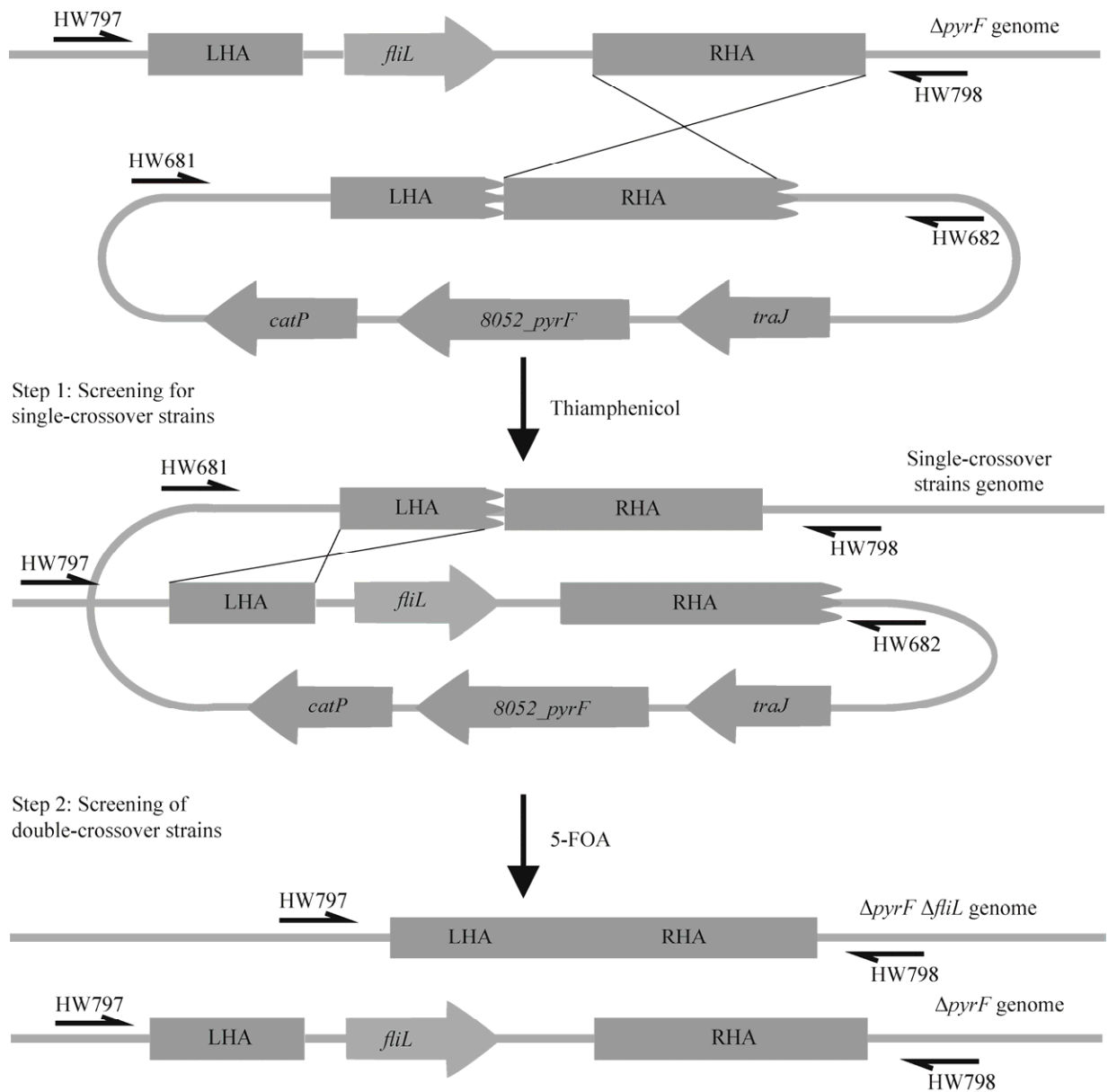


图3 基于ACE方法构建突变株 $\Delta pyrF \Delta fliL$

Figure 3 Construction of the $\Delta pyrF \Delta fliL$ mutant strain by the ACE method. Schematic diagram of the construction of single-crossover and double-crossover mutants. The longer RHA (right-side homology arm) on the pMTL-BJJ plasmid has a higher recombination rate and tends to exchange with the $\Delta pyrF$ genome at the RHA site to generate single-crossover mutants. The obtained single-crossover mutants were spread on the 5-FOA-containing BHIS medium to screen 5-FOA-resistant colonies. The LHA (left-side homology arm) of single-crossover mutants recombined with the LHA on the genome to generate double-crossover mutants ($\Delta pyrF \Delta fliL$). The primers pair HW797/HW798 was used to screen double-crossover mutants.

否存在野生型。如果第一对引物扩增产生特异性条带，且第二对引物不能扩增出条带，该菌落即为纯合单交换菌株。接下来，将获得的纯

合单交换菌株涂布在含有 2 mg/mL 5-FOA 和 20 $\mu\text{mol/mL}$ 尿嘧啶的 CDMM 培养基上，以筛选 $\Delta pyrF \Delta fliL$ 突变菌株，引物 HW797/HW798

用于检测 *fliL* 基因是否敲除(图 3)。

1.3.3 *pyrF* 及 *fliL* 回补菌株构建

根据 1.2 中描述的方法构建回补载体 pMTL-BJ2 和 pMTL-BJ3。回补载体 pMTL-BJ2 和 pMTL-BJ3 接合转化菌株 $\Delta pyrF \Delta fliL$, 于 BHIS 甲砒霉素、D-环丝氨酸及头孢西丁抗性平板(BHIS-TDC)筛选后得到菌株 $\Delta fliL$ 和 $::fliL$ 。

1.4 定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)验证 *fliL* 基因表达

使用细菌总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]分别提取 CD630、 $\Delta fliL$ 、 $::fliL$ 菌株总 RNA。采用 FasKing gDNA Dispelling RT SuperMix [天根生化科技(北京)有限公司]一步法去除基因组 DNA 并将总 RNA 逆转录成 cDNA。以 16S rRNA 基因为内参基因对 *fliL* 基因表达量进行分析。使用 Prism 6.0 软件(GraphPad Software, Inc)绘制柱状图。

1.5 突变菌株生长速率测定

将 1% (体积分数)的艰难拟梭菌菌株(WT、 $\Delta fliL$ 、 $::fliL$)接种到 5 mL BHIS 培养基中。将上述接种菌株置于 37 °C 厌氧培养。每隔 2 h 通过细胞密度计(Ultrospec 10, Amersham Biosciences, GE)测量 OD_{600} 值, 持续 28 h。使用 Prism 6.0 软件(GraphPad Software, Inc)绘制生长曲线。

1.6 运动能力测定

野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 在 0.3%低浓度琼脂的半固体培养基上测定运动能力, 方法参考文献[21]。观察菌株向培养基四周游动的距离。菌株向培养基四周扩散距离越远, 表示该菌的运动越强, 反之则表示该菌的运动能力越弱。

1.7 抗生素敏感性

为了测定 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 菌株对于不同抗生素的敏感性。采用连续稀释法于 96 孔板中设置不同的抗生素浓度梯度以测定 CD630、

$\Delta fliL$ 、 $::fliL$ 菌株对于氨苄青霉素(ampicillin)、四环素(tetracycline)、阿莫西林(amoxicillin)、诺氟沙星(norfloxacin)、链霉素(streptomycin)、D 环丝氨酸(D-cycloserine)、万古霉素(vancomycin)、克林霉素(clindamycin)、卡那霉素(kanamycin)等抗生素的耐药性。测定培养物 OD_{600} 值并使用 Prism 6.0 软件(GraphPad Software, Inc)绘制柱状图。

1.8 pH 耐受性测定

将野生型 CD630 菌株、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 培养至 $OD_{600}=0.6$, 细菌培养物分别取 10 μ L 加入 96 孔板的 BHIS 培养基中, BHIS 培养基已调整 pH 值为: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12。菌株在厌氧工作站中培养 24 h, 观察各个 pH 值条件下不同菌株的生长情况。测定培养物 OD_{600} 值并使用 Prism 6.0 软件(GraphPad Software, Inc)绘制柱状图。

1.9 产孢能力

收集野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 菌株的孢子, 方法参考文献[22]。收集的孢子通过 PBS 洗涤 2 次后置于 60 °C 水浴 30 min 使菌株失活。孢子收集后分别取各个孢子 20 μ L 接种于 BHIS 固体培养基并置于 37 °C 厌氧培养 5 d。孢子萌发后对平板上的菌落进行计数。

1.10 统计学方法

本研究采用 Prism 8 软件及 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计学分析。每个实验采取 3 个平行重复, 采用 *t* 检验分析组间差异, 检测水平为 $P=0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, n 表示 $P>0.05$, 当 $P<0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 $\Delta pyrF$ 菌株构建及抗性分析

我们成功构建了 pMTL-BY 质粒用于 *pyrF* 基因的敲除。pMTL-BY 质粒构建的方法见方法

1.2。根据上文所提及的方式成功地在含 5-FOA 的 BHIS 培养基上获得抗性艰难拟梭菌单菌落。通过引物 HW735/HW736 随机对培养基上生长的 20 个菌落进行 PCR 验证, 20 个菌落均为 $\Delta pyrF$ 突变基因型(图 4A)。通过不断地对抗性菌株在无抗培养基中进行传代, $\Delta pyrF$ 突变株中质粒成功丢失。将野生型菌株及构建的 $\Delta pyrF$ 同时接种于含 5-FOA (2 mg/mL) 的 BHIS 培养基培养 48 h 后, $\Delta pyrF$ 菌株均可生长, 而野生型的菌株生长均受到抑制, 而接种在 CDMM 限制性培养基上的情况则相反。以上结果表明 $\Delta pyrF$ 突变株构建成功。

2.2 $\Delta pyrF\Delta fliL$ 突变株的构建

以 $\Delta pyrF$ 菌株为底盘细胞, 对目的基因 *fliL* 进行敲除。将 pMTL-BJ1 接合转化至 $\Delta pyrF$ 菌株, 并通过菌落 PCR 对 CDMM-Tm 平板上的转化子进行验证。采用两对不同的引物进行 PCR 验证(方法 1.3.2), 筛选纯合的单交换菌株(图 4B)。因为双交换菌株从头合成尿嘧啶的代谢通路缺失($\Delta pyrF$), 可以在 BHIS (5-FOA 2 mg/mL) 固体培养基上生存。故而将单交换菌株涂布于 BHIS (5-FOA 2 mg/mL) 固体培养基上筛选双交换菌株。采用引物 HW797/HW798 对 5-FOA 抗性菌落的 *fliL* 基因进行筛选与测序验证, 最终获得 $\Delta pyrF\Delta fliL$ 双突变菌株(图 3, 图 4C-D)。

2.3 回补菌株构建

为了进一步验证 *fliL* 基因功能, 我们分别构建了回补载体 pMTL-BJ2 和 pMTL-BJ3 (表 1-2)。pMTL-BJ2 具有 *pyrF* 基因及其启动子, 在此基础上将 *fliL* 基因及其启动子重组至 pMTL-BJ2 母载体, 获得 pMTL-BJ3。从而将 *pyrF* 基因及 *fliL* 基因在质粒上进行表达。回补质粒 pMTL-BJ2 和 pMTL-BJ3 转化至 $\Delta pyrF\Delta fliL$ 后获得 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 菌株。

2.4 *fliL* 基因表达量变化

通过 RT-qPCR 测定了野生型菌株 CD630、菌株 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 中 *fliL* 基因的表达情况。与 CD630 菌株相比较, $\Delta fliL$ 菌株中 *fliL* 基因表达量显著降低; $::fliL$ 菌株中 *fliL* 基因表达量显著提高(图 5)。

2.5 生长曲线变化

我们测定了野生型菌株和 $\Delta fliL$ 菌株的生长速率。与野生型 CD630 菌株相比较, $\Delta fliL$ 菌株在前 6 h 生长速率无明显区别, 在 6 h 后 $\Delta fliL$ 菌株生长速率低于 CD630。CD630 及 $\Delta fliL$ 菌株生长至平台期的时间也不相同, $\Delta fliL$ 在生长 13 h 后进入平稳期, 比 11 h 达到平稳期的 CD630 生长缓慢(图 6)。以上结果表明 *fliL* 突变株生长速率及其最大生物量(8-13 h)显著低于野生型菌株; *fliL* 基因回补后, 可见菌株的生长速率及最大生物量(8-13 h)恢复至野生型水平。

2.6 运动能力变化

我们观察了菌株 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 在 0.3% 浓度琼脂的半固体培养基上运动半径的变化。结果表明 $\Delta fliL$ 在 0.3% 浓度琼脂的半固体培养基上运动的范围显著小于野生型菌株 CD630 ($P < 0.000 1$)。有趣的是 $::fliL$ 回补菌株的运动范围显著增大 ($P < 0.000 1$) (图 7)。结果表明 *fliL* 基因是艰难拟梭菌实现游泳运动的关键基因。

2.7 抗生素敏感性变化

将菌株 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 在含有不同种类及不同浓度的抗生素培养基中厌氧培养 24 h 后, 测定 OD_{600} 值后进行统计分析, 与野生型 CD630 及回补菌株 $::fliL$ 相比, $\Delta fliL$ 突变株对 D 环丝氨酸(D-cycloserine) (图 8A)、克林霉素(clindamycin) (图 8E)、链霉素(streptomycin) (图 8F)、万古霉素(vancomycin) (图 8I) 等抗

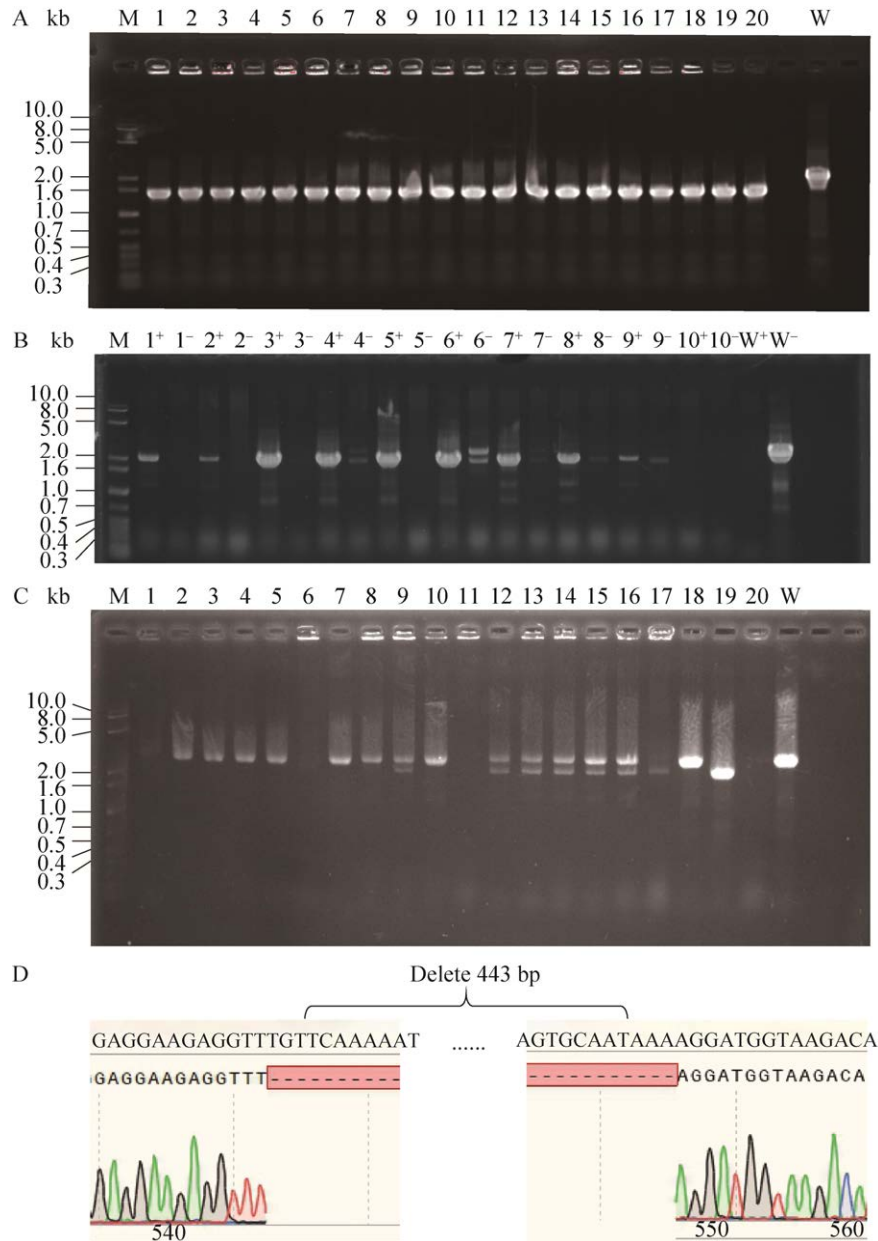


图4 突变菌株筛选及打靶位点测序验证

Figure 4 Mutants screening by PCR and verification by sequencing. A: All detected colonies (20) contained the $\Delta pyrF$ gene mutation (wild-type CD630 vs. $\Delta fliL=2\ 014$ bp vs. $1\ 598$ bp). M: 1 kb plus DNA marker; W: Wild-type CD630 strain. The gene targeting efficiency was 100%. B: Ten randomly selected colonies were detected by primer sets HW681/HW798 (+) and HW797/HW798 (-). Pure single-crossover mutants would produce a 2 046 bp band in the '+' lane and no band at the '-' lane. M: 1 kb plus DNA marker; W represents the wild-type CD630 strain that was used as the template. C: Twenty colonies were randomly selected and screened using the primer set HW797/HW798. M: 1 kb plus DNA marker. Two of the twenty strains showed $\Delta fliL$ bands compared to the wild-type control (wild-type CD630 vs. $\Delta fliL=2\ 405$ bp vs. $1\ 982$ bp) (W). D: Gene sequencing results showed that the *fliL* was deleted from the $\Delta pyrF\Delta fliL$ mutants.

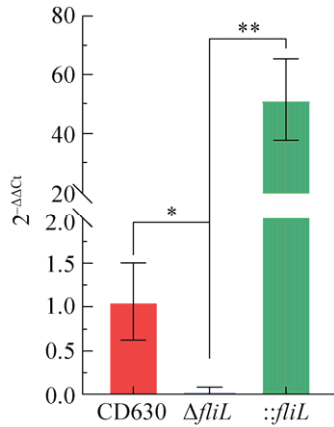


图 5 野生型菌株 CD630、 $\Delta fliL$ 与 $::fliL$ 的 *fliL* 基因表达量比较

Figure 5 Compare gene expression levels of the wild-type strain CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ strains. The red bar represents the expression level of the *fliL* gene in the WT CD630 strain, the blue bar represents the gene expression level of *fliL* in the $\Delta fliL$, the green bar represents the gene expression level of *fliL* in the strain $::fliL$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

生素的敏感性无明显变化; $\Delta fliL$ 对卡那霉素 (kanamycin) (图 8D) 和四环素 (tetracycline)

(图 8H) 的敏感性降低; $\Delta fliL$ 突变菌株对阿莫西林 (amoxicillin) (图 8B)、氨苄青霉素 (ampicillin) (图 8C)、诺氟沙星 (norfloxacin) (图 8G) 的敏感性提高。

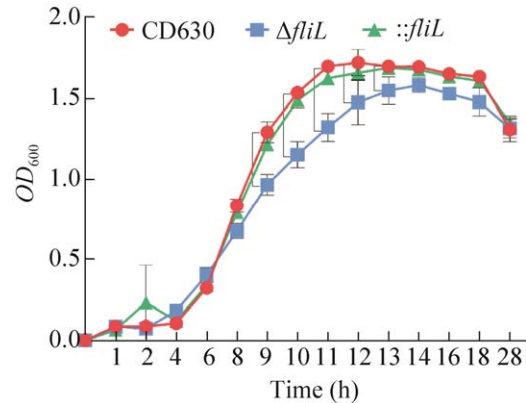


图 6 野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 与 $::fliL$ 生长曲线比较

Figure 6 Comparison of growth profiles of strains CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$. The growth profiles of CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ mutants. The red circle represents the growth profile of strain CD630, The blue square represents the growth profile of strain $\Delta fliL$, the green triangle represents the growth profile of strain $::fliL$.

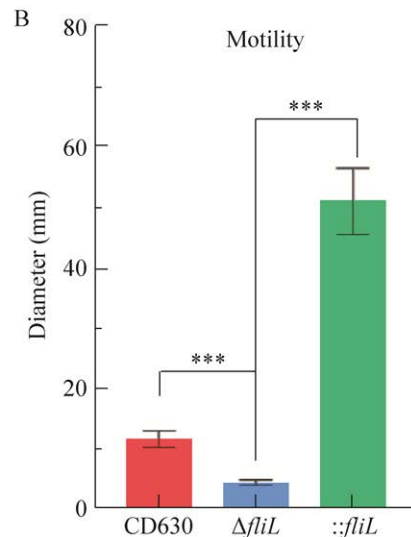
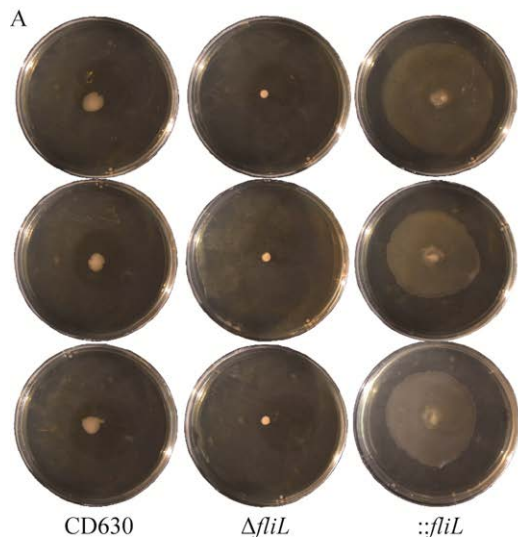


图 7 野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 与 $::fliL$ 的运动能力测定

Figure 7 Motility of wild-type CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ strains. A: The motility of strains CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ on 0.3% agar BHIS medium. B: The statistical analysis of figure 6A. The swimming radius of $\Delta fliL$ was significantly smaller than that of CD630 and $::fliL$. ***: $P < 0.001$.

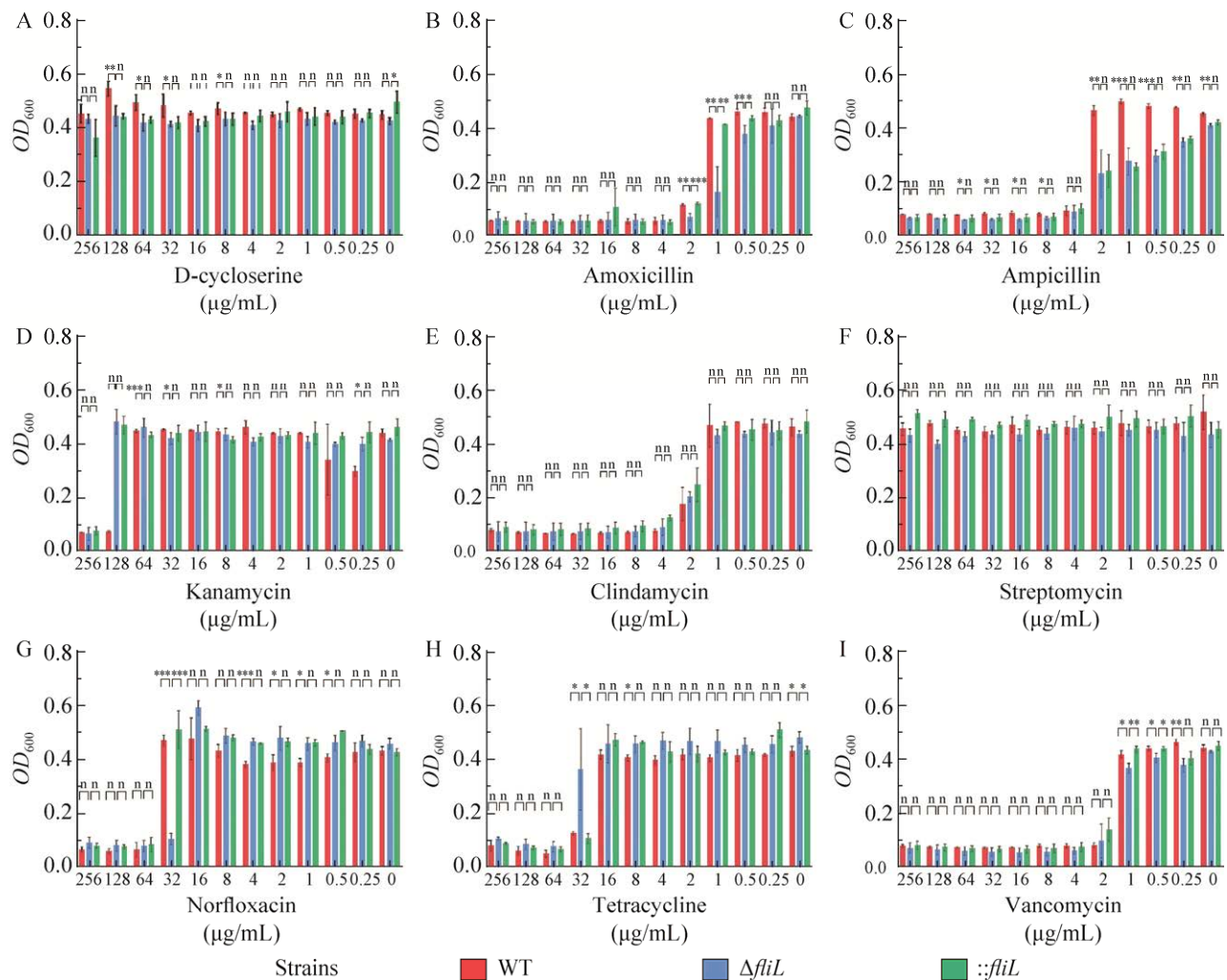


图 8 野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 与 $::fliL$ 的抗生素敏感性测定

Figure 8 Sensitivity of wild-type CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ strains to antibiotics. A to I are antibiotics sensitivity profiles and statistical analyses of the CD630, $\Delta fliL$, and $::fliL$ to different commonly used antibiotics. A: Sensitivity of strains to D-cycloserine. B: Sensitivity of strains to amoxicillin. C: Sensitivity of strains to ampicillin. D: Sensitivity of strains to kanamycin. E: Sensitivity of strains to clindamycin. F: Sensitivity of strains to streptomycin. G: Sensitivity of strains to norfloxacin. H: Sensitivity of strains to tetracycline. I: Sensitivity of strains to vancomycin. The $\Delta fliL$ mutant is more sensitive than the CD630 strain to amoxicillin, ampicillin, and norfloxacin, but it is more resistant than the CD630 to kanamycin and tetracycline. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n: $P > 0.05$.

2.8 pH 耐受性变化

我们将野生型 CD630 菌株、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 分别接种于 pH 值为: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 BHIS 培养基中, 并在厌氧工作站中培养 24 h 后。测定 OD_{600} 值后进行统计分析发现, 在 pH 1-4、pH 7-8 和 10-12 之间, 野生型 CD630 菌株、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 菌株

pH 耐受性无明显区别; 在 pH 5-6 之间, $\Delta fliL$ 菌株 OD_{600} 值显著高于 CD630 菌株, $::fliL$ 菌株 OD_{600} 值回复至野生型水平; 在 pH 9 时, $\Delta fliL$ 菌株 OD_{600} 值显著低于 CD630 菌株, $::fliL$ 菌株 OD_{600} 值回复至野生型水平。以上结果提示, $\Delta fliL$ 菌株对弱酸环境耐受性增强; 对弱碱性条件耐受性降低(图 9)。

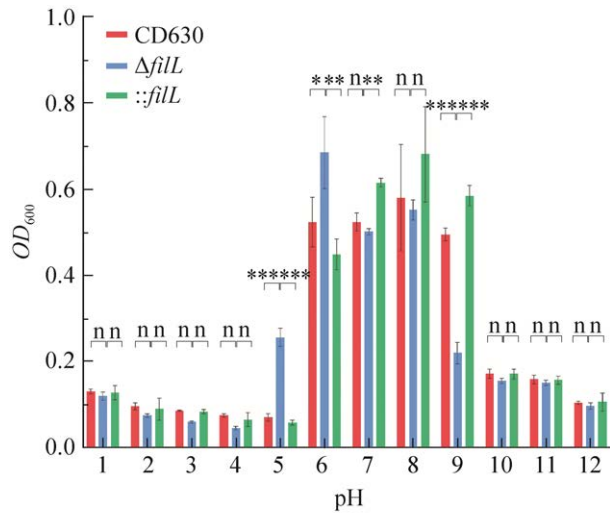


图 9 野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 与 $::fliL$ 菌株 pH 耐受性
 Figure 9 pH tolerance of CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ strains. The pH resistance and statistical analyses of strains CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$. The red column represents the growth profile of CD630, the blue column represents the growth profile of $fliL$, the green column represents the growth profile of $::fliL$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n: $P > 0.05$.

2.9 产孢能力变化

将野生型 CD630 菌株、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 置于 60 °C 30 min 条件下灭活营养细胞。灭活后的培养物收集后取 20 μ L 分别接种于 BHIS 培养基并置于 37 °C 厌氧培养 5 d。孢子萌发后对平板上的菌落进行计数， $\Delta fliL$ 菌株产生的孢子数量显著低于野生型 CD630 菌株(图 10)， $::fliL$ 菌株部分恢复了野生型表型。结果表明 *fliL* 基因在艰难拟梭菌产孢过程中具有重要的作用。

3 讨论

艰难拟梭菌为革兰阳性，产芽孢的机会致病性肠道微生物，是抗生素相关性腹泻和伪膜性肠炎的主要致病菌。艰难拟梭菌在人体肠道内进行运动及定殖等都在依赖鞭毛介导的游泳运动。有报道称，艰难拟梭菌的鞭毛突变体在仓鼠感染模型的体外和体内试验中显示出更高

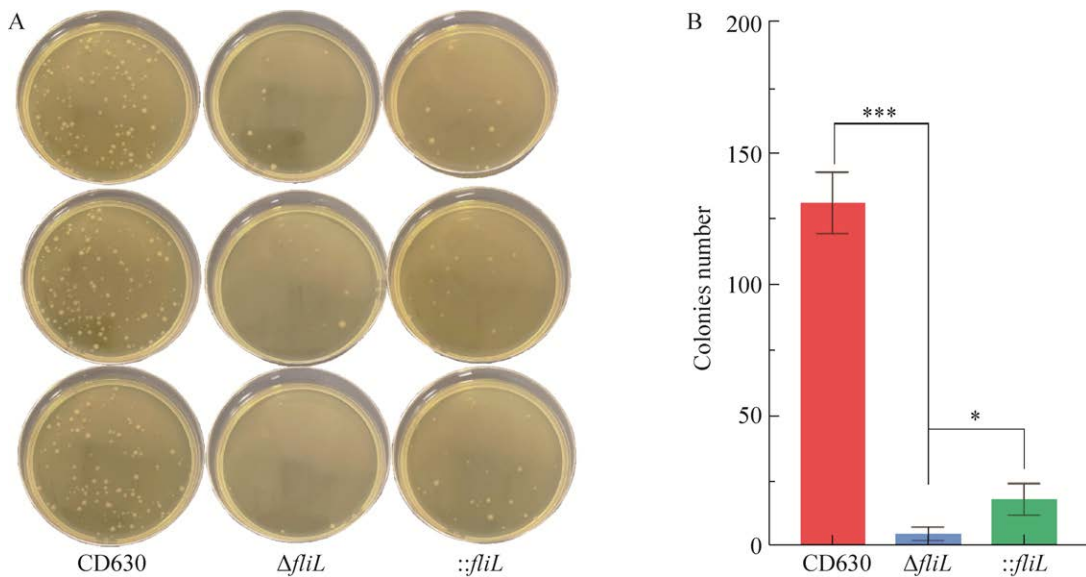


图 10 野生型 CD630、 $\Delta fliL$ 及 $::fliL$ 产孢能力

Figure 10 The sporulation abilities of wild-type CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ strains. A: The colony forming units (CFU) of heat-shocked spore solution of strains CD630, $\Delta fliL$ and $::fliL$ on BHIS medium. B: The red column represents the CFU of CD630; the blue column represents the CFU of strain $fliL$; the green column represents the CFU of strain $::fliL$. The sporulation ability of strains $\Delta fliL$ was significantly decreased than that of the WT and $::fliL$ strains. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

的毒性^[23]，由此可见鞭毛的功能可能对艰难拟梭菌致病性产生影响。FliL 蛋白是影响鞭毛功能的单跨膜蛋白。弧菌属(*Vibrio*)中 FliL 蛋白与鞭毛基体相结合，影响鞭毛基体中的定子及转子的运动^[6]。本研究中使用 ACE 技术对艰难拟梭菌的 FliL 蛋白编码基因 *fliL* 进行敲除，成功构建了突变菌株 $\Delta fliL$ 及回补菌株 $::fliL$ 。通过实验验证突变菌株 $\Delta fliL$ 与菌株 CD630 表型的差异，加深对艰难拟梭菌 *fliL* 基因功能的认识。我们测定了菌株 CD630、 $\Delta fliL$ 及回补菌株 $::fliL$ 的生长曲线，结果证实 *fliL* 基因缺失后会严重影响艰难拟梭菌的最大生物量，除此之外 $\Delta fliL$ 突变株对于部分抗生素的敏感性也发生了变化。以上结果表明，艰难拟梭菌 *fliL* 基因可能在 CDI 的发生发展中发挥重要作用。

突变菌株 $\Delta fliL$ 对于不同作用机制的抗生素的耐受性出现不同程度的改变。其中，突变菌株 $\Delta fliL$ 对同为 β -内酰胺类抗生素的阿莫西林及氨苄青霉素敏感性增高。Toth 等研究发现艰难拟梭菌编码 D 类 β 内酰胺酶(CDD 酶)，其研究中 *cddI* 基因在艰难拟梭菌自身启动子的作用下表达量不佳，相反将 *cddI* 基因在匙形梭状杆菌(*Clostridium cochlearium*)的启动子作用下有效表达后，赋予了匙形梭状杆菌广谱的 β -内酰胺类抗生素的耐受性^[24]。研究表明临床上艰难拟梭菌对于喹诺酮类抗生素的耐受性主要由于喹诺酮耐药决定区(quinolone-resistance-determining region, QRDR)中内 DNA 旋转酶基因的突变从而导致艰难拟梭菌的蛋白发生变化^[25]，由此我们推测本研究中突变菌株 $\Delta fliL$ 对阿莫西林(图 8B)、氨苄青霉素(图 8C)及诺氟沙星(图 8G)敏感性提高，是由于 *fliL* 基因缺失影响了上述基因在艰难拟梭菌中的表达。另一方面，目前研究表明艰难拟梭菌中主要是 *tetM* 基因影响四环素的耐受性^[26]，*fliL* 可能促进核

糖体保护蛋白(TetM)的形成从而增强艰难拟梭菌对四环素的耐受性。卡那霉素所属的氨基糖苷类抗生素的耐受性改变可能的原因有：(1) 通过外排泵降低细菌细胞内抗生素的浓度；(2) 抗生素的分子靶标改变；(3) 氨基糖苷的酶失活^[27]。由于 $\Delta fliL$ 对于卡那霉素敏感性降低，我们推测主要是由于 *fliL* 缺失后外排泵的作用增强而导致。

艰难拟梭菌的酸碱耐受性受到多种因素的影响，Wetzel 等对环境 pH 值引起艰难拟梭菌生长繁殖、芽孢产生和萌发及艰难拟梭菌毒素量等生理变化进行了具体研究。人体肠道不同部位具有不同的酸碱度，艰难拟梭菌的定殖也与之息息相关。研究结果表明，环境 pH 值对于艰难拟梭菌毒素产生具有菌株依赖性差异，其中菌株 630 Δerm 在 pH 值为 6.5 时产生的毒素最多，在 pH 值为 5.5 或 pH 为 8.5 时其生长及毒素产生显著减少^[28]。本研究中，我们发现 *fliL* 基因缺失后 $\Delta fliL$ 菌株在 pH 为 5-6 之间 OD_{600} 值显著高于 CD630 菌株，相反在 pH 为 9 时， $\Delta fliL$ 菌株 OD_{600} 值显著低于 CD630 菌株。*fliL* 基因缺失后在偏酸及偏碱性的环境中都表现出了 pH 耐受性变化，提示 *fliL* 基因可影响艰难拟梭菌的酸碱耐受性，从而影响其在肠道环境中的竞争优势。

通过实验我们发现 $\Delta fliL$ 菌株相较于野生型，在 0.3% 半固体培养基上的迁移距离及迁移速度上均有显著下降。研究中将 *fliL* 基因回补至突变菌株后，可见回补菌株 $::fliL$ 在 0.3% 半固体培养基上的迁移距离及迁移速度，均有显著的上升。回补菌株 $::fliL$ 迁移距离甚至极显著地超过野生型，RT-qPCR 发现 *fliL* 基因在艰难拟梭菌中表达量急剧升高。因此，我们推测 $::fliL$ 迁移距离极显著提高的原因与 *fliL* 基因在质粒上具有较高的拷贝数和表达剂量有关。艰难拟

梭菌的鞭毛是游泳运动所必需的, 鞭毛的运动可以帮助艰难拟梭菌向利于自身生存繁殖的环境进行迁移, 除此之外有研究表明鞭毛有助于艰难拟梭菌在动物模型中粘附肠上皮细胞, 并在定殖及其毒力上发挥作用^[29-30]。鞭毛相关基因 *fliC* 及 *fliD* 突变株在仓鼠模型中的致病能力显著改变也验证了这一观点^[30]。*fliL* 基因位于鞭毛基体周围, 具有维持艰难拟梭菌的运动能力。目前的研究证实 *fliL* 基因突变的变形杆菌运动能力大幅度降低, 同时在小鼠模型中致病力大大降低^[31]。本研究发现 *fliL* 基因的缺失极显著地降低了艰难拟梭菌的运动功能, 由此可见 *fliL* 基因可能通过影响鞭毛基体转子及定子的运动影响其游泳能力。

细菌的运动性及芽孢都是影响细菌致病性的重要因素, 两者之间可能存在一定的联系。Hashiguchi 等^[32]通过构建密苏里游动放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)的 FliA 家族基因突变体验证了鞭毛相关的 FliA 家族基因在 *Actinoplanes missouriensis* 生成芽孢过程中的作用。结果显示 $\Delta fliA1\Delta fliA2$ 突变体在孢子囊形成、孢子休眠方面存在缺陷, 同时其产生的孢子量也较野生型有所下降, 在 $\Delta fliA2$ 中甚至观察到游动孢子的游动速度降低, 且突变菌株基因表达数据证实大量的鞭毛相关基因及转录调控因子表达量变化, 其中 *fliL* 基因在 $\Delta fliA2$ 突变株中下调了 5.2 倍。以上结果推测在 *Actinoplanes missouriensis* 中 *fliL* 基因的敲除会影响其产孢基因的表达变化, 从而影响其芽孢的生成过程。我们的研究结果证实了艰难拟梭菌 *fliL* 基因缺陷菌株 $\Delta fliL$ 在产孢能力上具有相似的缺陷, 但其机制有待进一步的研究。

艰难拟梭菌的芽孢是细菌的休眠状态, 艰难拟梭菌可以通过芽孢在恶劣的环境中保证自身的存活。在 CDI 期间, 艰难拟梭菌启动孢子

形成途径。休眠孢子产生后被人体摄入并在小肠中转变为代谢活跃状态, 人体摄入艰难拟梭菌孢子后在小肠中转变为代谢活跃状态, 在肠道代谢产物如胆汁酸的影响下转变为营养细胞。导致 CDI 在住院患者体内持续和传播^[33]。一旦环境遭受其污染, 很难通过消毒对其杀灭, 孢子萌发后导致 CDI 复发^[34]。除此之外, 目前的研究表示芽孢形成与艰难拟梭菌的毒素产生是相关的, SigH 及 Spo0A 因子已被证实参与了艰难拟梭菌生孢、孢子萌发过程^[35-36]。我们在实验中发现菌株 $\Delta fliL$ 相较于 CD630, 其芽孢的产生及萌发出明显地降低。上述结果提示 FliL 蛋白可能成为抑制艰难拟梭菌定殖及产孢能力的潜在靶点。

综上所述, *fliL* 基因对于艰难拟梭菌的运动能力而言是必不可少的, 并且显著影响了艰难拟梭菌芽孢的产生。除此之外 *fliL* 基因还影响了艰难拟梭菌的生长, 对于酸碱环境的适应能力。上述突变株的生理变化都可能在 CDI 发展及复发中导致严重的后果, 因此 *fliL* 基因如何引起艰难拟梭菌表型的改变还需进一步在转录组水平、动物模型及分子程度上研究其相关信号通路的调控及引起组织的病理变化进行研究为后续研究临床 CDI 治疗药物提供理论基础。虽然本研究中对 *fliL* 基因缺失菌株的菌群进行了运动能力的探究, 但是对于单个细菌鞭毛旋转的力量及其方向的研究尚存在空缺^[37]。同时进一步研究 *fliL* 基因在鞭毛中的作用, 从而揭示鞭毛蛋白对细菌运动能力的贡献, 可为制备以鞭毛结构为基础的纳米机器等新兴领域提供有益参考。

REFERENCES

- [1] 吴媛, 李文革, 贾筱溪, 王媛媛, 张文竹. 我国艰难梭菌流行特征和研究进展[J]. 疾病监测, 2021, 36(4): 319-323.

- WU Y, LI WG, JIA XX, WANG YY, ZHANG WZ. Epidemiological characteristics and research progress of *Clostridioides difficile* in China[J]. Disease Surveillance, 2021, 36(4): 319-323 (in Chinese).
- [2] HE M, MIYAJIMA F, ROBERTS P, ELLISON L, PICKARD DJ, MARTIN MJ, CONNOR TR, HARRIS SR, FAIRLEY D, BAMFORD KB, D'ARC S, BRAZIER J, BROWN D, COIA JE, DOUCE G, GERDING D, KIM HJ, KOH TH, KATO H, SENOH M, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*[J]. Nature Genetics, 2013, 45(1): 109-113.
- [3] CZEPIEL J, DRÓZDŹ M, PITUCH H, KUIJPER EJ, PERUCKI W, MIELIMONKA A, GOLDMAN S, WULTAŃSKA D, GARLICKI A, BIESIADA G. *Clostridium difficile* infection: review[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2019, 38(7): 1211-1221.
- [4] OFORI E, RAMAI D, DHAWAN M, MUSTAFA F, GASPERINO J, REDDY M. Community-acquired *Clostridium difficile*: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies[J]. Journal of Hospital Infection, 2018, 99(4): 436-442.
- [5] SANTIVERI M, ROA-EGUIARA A, KÜHNE C, WADHWA N, HU H, BERG HC, ERHARDT M, TAYLOR NMI. Structure and function of *Stator* units of the bacterial flagellar motor[J]. Cell, 2020, 183(1): 244-257.e16.
- [6] TAKEKAWA N, ISUMI M, TERASHIMA H, ZHU SW, NISHINO Y, SAKUMA M, KOJIMA S, HOMMA M, IMADA K. Structure of *Vibrio* FliL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function[J]. mBio, 2019, 10(2): e00292-e00219.
- [7] MOTALEB MA, PITZER JE, SULTAN SZ, LIU J. A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* *fliL* mutant[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3324-3331.
- [8] JENAL U, WHITE J, SHAPIRO L. *Caulobacter* flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 243(2): 227-244.
- [9] SUASTE-OLMOS F, DOMENZAIN C, MIRELES-RODRÍGUEZ JC, POGGIO S, OSORIO A, DREYFUS G, CAMARENA L. The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(23): 6230-6239.
- [10] ATTMANNSPACHER U, SCHARF BE, HARSHEY RM. FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(2): 328-341.
- [11] CHAWLA R, FORD KM, LELE PP. Torque, but not FliL, regulates mechanosensitive flagellar motor-function[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 5565.
- [12] MINTON NP, EHSAAN M, HUMPHREYS CM, LITTLE GT, BAKER J, HENSTRA AM, LIEW F, KELLY ML, SHENG L, SCHWARZ K, ZHANG Y. A roadmap for gene system development in *Clostridium*[J]. Anaerobe, 2016, 41: 104-112.
- [13] MCALLISTER KN, BOUILLAUT L, KAHN JN, SELF WT, SORG JA. Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 14672.
- [14] ZHOU QS, RAO FQ, CHEN ZH, CHENG YM, ZHANG QF, ZHANG J, GUAN ZZ, HE Y, YU WF, CUI GZ, QI XL, HONG W. The *cwp66* gene affects cell adhesion, stress tolerance, and antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(2): e0270421.
- [15] PURDY D, O'KEEFE TAT, ELMORE M, HERBERT M, McLEOD A, BOKORI-BROWN M, OSTROWSKI A, MINTON NP. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(2): 439-452.
- [16] HEAP JT, EHSAAN M, COOKSLEY CM, NG YK, CARTMAN ST, WINZER K, MINTON NP. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(8): e59.
- [17] NG YK, EHSAAN M, PHILIP S, COLLERY MM, JANOIR C, COLLIGNON A, CARTMAN ST, MINTON NP. Expanding the repertoire of gene tools for precise manipulation of the *Clostridium difficile* genome: allelic exchange using *pyrE* alleles[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56051.
- [18] YANG YY, SUN QQ, LIU Y, YIN HZ, YANG WP, WANG Y, LIU Y, LI YX, PANG S, LIU WX, ZHANG Q, YUAN F, QIU SW, LI J, WANG XF, FAN KQ, WANG WS, LI ZL, YIN SL. Development of a *pyrF*-based counterselectable system for targeted gene deletion in *Streptomyces rimosus*[J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2021, 22(5): 383-396.
- [19] EHSAAN M, KUEHNE SA, MINTON NP. *Clostridium difficile* genome editing using *pyrE* alleles[A]//Methods in Molecular Biology[M]. New York, NY: Springer New York,

- 2016: 35-52.
- [20] 饶凤琴, 程玉梅, 吴昌学, 王义, 崔古贞, 齐晓岚, 洪伟. 敲除 PaLoc 毒力岛的无毒性艰难梭菌菌株的构建[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(10): 1128-1133.
- RAO FQ, CHENG YM, WU CX, WANG Y, CUI GZ, QI XL, HONG W. Knockout of PaLoc toxicity loci to construct non-toxic *C. difficile* strain[J]. Journal of Guizhou Medical University, 2019, 44(10): 1128-1133 (in Chinese).
- [21] LEE YY, BELAS R. Loss of FliL alters *Proteus mirabilis* surface sensing and temperature-dependent swarming[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(1): 159-173.
- [22] FLETCHER JR, PIKE CM, PARSONS RJ, RIVERA AJ, FOLEY MH, McLAREN MR, MONTGOMERY SA, THERIOT CM. *Clostridioides difficile* exploits toxin-mediated inflammation to alter the host nutritional landscape and exclude competitors from the gut microbiota[J]. Nature Communications, 2021, 12: 462.
- [23] AUBRY A, HUSSACK G, CHEN WX, KUOLEE R, TWINE SM, FULTON KM, FOOTE S, CARRILLO CD, TANHA J, LOGAN SM. Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(10): 3521-3532.
- [24] TOTTH M, STEWART NK, SMITH C, VAKULENKO SB. Intrinsic class D β -lactamases of *Clostridium difficile*[J]. mBio, 2018, 9(6): e01803-e01818.
- [25] OH H, EDLUND C. Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2003, 9(6): 512-517.
- [26] 高琼, 黄海辉. 艰难梭菌耐药性及耐药机制研究进展[J]. 遗传, 2015, 37(5): 458-464.
- GAO Q, HUANG HH. Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*[J]. Hereditas, 2015, 37(5): 458-464 (in Chinese).
- [27] JANA S, DEB JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 140-150.
- [28] WETZEL D, McBRIDE SM. The impact of pH on *Clostridioides difficile* sporulation and physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(4): e02706-e02719.
- [29] BABAN ST, KUEHNE SA, BARKETI-KLAI A, CARTMAN ST, KELLY ML, HARDIE KR, KANSAU I, COLLIGNON A, MINTON NP. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73026.
- [30] TRZILOVA D, WARREN MAH, GADDA NC, WILLIAMS CL, TAMAYO R. Flagellum and toxin phase variation impacts intestinal colonization and disease development in a mouse model of *Clostridioides difficile* infection[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2038854.
- [31] 李林俐, 朱来旭, 张雪, 费荣梅. 扬子鳄源普通变形杆菌 FliL 基因缺失株的构建及其特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(4): 729-735.
- LI LL, ZHU LX, ZHANG X, FEI RM. Construction and characterization of *Proteus vulgaris* FliL gene deletion strain from *Alligator sinensis*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2022, 45(4): 729-735 (in Chinese).
- [32] HASHIGUCHI Y, TEZUKA T, OHNISHI Y. Involvement of three FliA-family sigma factors in the sporangium formation, spore dormancy and sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(6): 1170-1188.
- [33] CHIU CW, TSAI PJ, LEE CC, KO WC, HUNG YP. Inhibition of spores to prevent the recurrence of *Clostridioides difficile* infection—a possibility or an improbability?[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2021, 54(6): 1011-1017.
- [34] ALI S, MOORE G, WILSON APR. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants[J]. The Journal of Hospital Infection, 2011, 79(1): 97-98.
- [35] PETTIT LJ, BROWNE HP, YU L, SMITS WK, FAGAN RP, BARQUIST L, MARTIN MJ, GOULDING D, DUNCAN SH, FLINT HJ, DOUGAN G, CHOUDHARY JS, LAWLEY TD. Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 160.
- [36] SAUJET L, MONOT M, DUPUY B, SOUTOURINA O, MARTIN-VERSTRAETE I. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3186-3196.
- [37] PARTRIDGE JD, NIETO V, HARSHEY RM. A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias[J]. mBio, 2015, 6(2): e02367.

(本文责编 陈宏宇)