



研究报告

铜绿假单胞菌 PAO1 *ku* 基因缺失菌株的构建及其对生物被膜耐药性的影响

张玲莉^{*1} 王建峰² 魏华¹ 于纪棉¹ 费红军¹ 岑叶平¹

1 宁波卫生职业技术学院 浙江 宁波 315100

2 宁波检验检疫科学技术研究院 浙江 宁波 315012

摘要:【背景】铜绿假单胞菌是常见的条件致病菌,易形成生物被膜,具有基因突变率高、耐药性强的特点。非同源末端连接是 DNA 双链断裂的主要修复途径之一,修复过程会导致 DNA 突变产生。

【目的】研究非同源末端连接对生物被膜中的铜绿假单胞菌基因突变率和耐药性的影响。【方法】通过基因无痕敲除的方法构建 PAO1 菌株的 *ku* 基因缺失突变株 Δku 并构建其回补株。对比研究突变株和野生菌株生物被膜形成能力、生物被膜状态下各菌的基因突变率以及对抗生素的耐受性。通过荧光定量 PCR 检测生物被膜中 PAO1 菌株 *ku* 基因的表达水平。【结果】各突变株生物被膜形成能力无显著差异;与野生菌株相比,突变株 Δku 在生物被膜中的基因突变率以及对环丙沙星和庆大霉素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)下降。荧光定量 PCR 结果表明, *ku* 基因在生物被膜形成早期转录水平有明显上调。【结论】非同源末端连接修复途径对生物被膜中的铜绿假单胞菌基因突变率以及耐药性的提高有一定的作用。本研究将为后续进一步阐释铜绿假单胞菌耐药产生机制提供一定的理论依据。

关键词: 铜绿假单胞菌, 耐药性, 基因突变, *ku* 基因, 非同源末端连接, 生物被膜

Construction of *Pseudomonas aeruginosa ku* gene deletion mutant and its effects on antibiotic resistance of biofilm

ZHANG Ling-Li^{*1} WANG Jian-Feng² WEI Hua¹ YU Ji-Mian¹ FEI Hong-Jun¹
CEN Ye-Ping¹

1 Ningbo College of Health Sciences, Ningbo, Zhejiang 315100, China

2 Ningbo Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Ningbo, Zhejiang 315012, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas aeruginosa* is a common opportunistic pathogen, most of them can form biofilms which show the characteristics of high mutation rate and strong antibiotic resistance.

Foundation items: Ningbo Natural Science Foundation (2018A610400, 2019A610233); Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (Y201738586); Scientific Research Project of Ningbo College of Health Sciences (2017Z01)

***Corresponding author:** E-mail: zllningbo@163.com

Received: 12-01-2020; **Accepted:** 22-06-2020; **Published online:** 31-08-2020

基金项目: 宁波市自然科学基金(2018A610400, 2019A610233); 浙江省教育厅科研项目(Y201738586); 宁波卫生职业技术学院科研计划(2017Z01)

***通信作者:** E-mail: zllningbo@163.com

收稿日期: 2020-01-12; **接受日期:** 2020-06-22; **网络首发日期:** 2020-08-31

Non-homologous end joining (NHEJ) is one of the major DNA double-strand break repair pathway which leads to DNA mutations. **[Objective]** To study the effects of NHEJ on biofilm-forming ability, mutation rate and drug resistance within biofilm in *P. aeruginosa*. **[Methods]** The *ku* gene deletion mutant strain Δku was constructed by in-frame deletion and its complementary strain was also obtained. We studied the biofilm-forming ability of each strain as well as the mutation rate and drug resistance within their biofilms. The transcription level of *ku* gene in *P. aeruginosa* biofilm was determined by qPCR. **[Results]** Compared with the wild-type strain, the *ku* gene deletion strain did not show significant difference in biofilm-forming ability but displayed a slight reduction in mutation rate and minimum inhibitory concentration (MIC) to ciprofloxacin and gentamicin within biofilms. The qPCR results showed that the transcription level of the *ku* gene was increased when biofilms were formed. **[Conclusion]** NHEJ affects the mutation rate and antibiotic resistance of *P. aeruginosa* biofilm. This study will provide a basis for exploiting the mechanisms of antibiotic resistance in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Gene mutation, *ku* gene, Non-homologous end joining (NHEJ), Biofilm

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种临床上重要的条件致病菌,常引起严重的医院获得性感染,导致呼吸道感染、菌血症、肺炎、烧伤感染、泌尿系统感染和囊性纤维化继发感染等多种疾病。PA易形成生物被膜,这是细菌附着于惰性或活性实体表面,为了适应生存环境,繁殖、分化并分泌多糖基质包裹菌体群落而形成的细菌聚集体膜状物。成熟的生物被膜形成后,生物被膜深层的细菌被多糖蛋白复合物包围,与外界沟通机会少,处于低营养物质、低氧分压的微环境^[1]。这些环境因素导致细菌生长速率减慢,产生综合广泛性的应激反应以及使多药物外排泵基因表达上调,致使生物被膜具有极强的适应性与耐药性^[2-3]。

非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径是DNA双链损伤修复(double-strand break, DSB)的主要途径之一,修复DSB过程中无需同源模板,直接将断裂缺口连接,因此常引起基因突变。Ku蛋白作为NHEJ途径的关键组分之一,在NHEJ修复途径中,可识别并稳定DSB双链末端,保护末端不被核酸酶降解,并招募LigD连接酶进行断裂末端的修复^[4-5]。NHEJ途径广泛存在于真核细胞中,但仅在包括PA在内的部分细菌种类中发现^[6-10]。研究结果显示PA生物被膜内部细菌具有极高的基因突变率,而PA生物被膜耐药性

的提高或获得往往与某些相关基因的突变密切相关,如外排泵MexAB-OprM及MexCD-OprJ的表达上调可分别由它们各自的调控基因*mexR*及*nfxB*突变引起^[11-13],药物靶基因*gyrA*、*gyrB*的突变可引起对喹诺酮类药物耐药性增强^[14-15]等。究竟是何种机制导致PA生物被膜基因突变率增强和耐药性提高呢?本课题通过构建*ku*基因的缺失突变菌株及其回补株,针对Ku对PA生物被膜耐药性的作用展开研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养条件

研究涉及的菌株与质粒见表1。大肠杆菌、铜绿假单胞菌及其突变菌株在37℃的LB培养基中培养, MIC测定使用MH培养基。

1.1.2 主要试剂和仪器

实验所用培养基及抗生素均购自北京索莱宝科技有限公司; 2,6-二氨基庚二酸(DAP)、D-Glucose和L-阿拉伯糖, Sigma-Aldrich公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase和限制性内切酶EcoRI、NheI、SpeI及T4 DNA ligase, TaKaRa公司; PCR产物纯化试剂盒、细菌基因组提纯试剂盒、细菌总RNA提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 无缝克隆试剂盒ClonExpress II, 南京诺唯赞生物科技有限公司; EasyScript First-Strand

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

材料 Materials	基因型及相关特征 Genotype and relevant characteristics	来源 Source
菌株 Strains		
<i>E. coli</i> DH5a λ pir	F- ϕ 80 lac Δ M15 Δ (lacZYA-arg F) LAMPir U169 endA1 recA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ - thi -1	This Lab
β 2163 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F ⁻ , RP4-2-Tc::Mu Δ dapA::(erm-pir)	[16]
PAO1 <i>Aku</i> <i>Aku::ku</i>	Wild type PAO1, knockout of <i>ku</i> gene PAO1 <i>Aku::ku</i>	This Lab This study This study
质粒 Plasmids		
pLP12	<i>ori</i> T _{RP4} <i>ori</i> V _{R6K} <i>vmi</i> 480 P _{BAD} , Cm ^r	[17]
pLP12- <i>ku</i>	pLP12 derivative containing homologous arms of <i>ku</i> gene of PAO1	This study
pBAD33	pACYC184 <i>ori</i> , <i>araC</i> ParaBAD, Cm ^r	[18]
pBAD33-- <i>ku</i>	pBAD33 derivative containing <i>ku</i> gene	This study

cDNA Synthesis SuperMix 和 SYBR Green Select Master Mix, 北京全式金生物技术有限公司。96 孔全自动梯度 PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; MultiskanTM FC 酶标仪, Thermo Scientific 公司; 引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌 *ku* 缺失突变株的构建

铜绿假单胞菌 *ku* 缺失突变株的构建方法参照 Luo 等^[17]方法, 所用引物见表 2。根据细菌基因组提纯试剂盒使用说明提取铜绿假单胞菌 PAO1 基因组 DNA 作为模板, 使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase, 以 *ku*-*EcoR* I-MF1 和 *ku*-MR1 为引物扩增 *ku* 基因上游同源臂 A 片段(531 bp), 以 *ku*-MF2 和 *ku*-*Nhe* I-MR2 为引物扩增 *ku* 基因下游同源臂 B 片段(705 bp)。PCR 反应体系(50 μ L): DNA 模板(150 mg/L) 1 μ L, 引物 F/R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times PrimeSTAR Max Premix 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 1.5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C (A 片段)/60 $^{\circ}$ C (B 片段) 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。以经 PCR 产物纯化后的 A、B 片段为模板, 以 *ku*-*EcoR* I-MF3 和

ku-*Spe* I-MR3 为引物, 通过交叠 PCR 扩增获得包含 A、B 片段 DNA 序列以及 *EcoR* I、*Spe* I 酶切位点的融合片段。PCR 反应体系(50 μ L): DNA 模板 A 片段(100 mg/L) 0.5 μ L, B 片段(100 mg/L) 0.5 μ L, 引物 F/R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 \times PrimeSTAR Max Premix 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 1 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 7 个循环; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。融合片段纯化后通过 *EcoR* I/*Spe* I 双酶切, 得到的片段与经过双酶切的自杀载体 pLP12 连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5a λ pir 感受态细胞, 通过 LB 培养基中添加 12 mg/L 盐酸四环素和 0.3% D-葡萄糖双重抗性以及 PCR 扩增筛选获得重组质粒 pLP12-*ku*。

重组质粒 pLP12-*ku* 电转化至大肠杆菌 β 2163 感受态细胞, β 2163 因营养缺陷需在含有 DAP 的培养基上才能生长, 通过 12 mg/L 盐酸四环素和 0.3 mmol/L DAP 筛选获得 β 2163/pLP12-*ku* 菌株。 β 2163/pLP12-*ku* 菌株作为供体菌, 铜绿假单胞菌 PAO1 作为受体菌, 分别在 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养过夜, 各取培养物 100 μ L 混合后于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养 6 h, 进行接合实验。先

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	来源出处 Source
ku- <i>EcoR</i> I-MF1	TGACGATGAATTCCACCATTCTCAAGGCAGGTCGGG	This study
ku-MR1	ATTTACCCAGCGGCTCGCCTCACGGTATATGCACCAGGCCGAAGCT	This study
ku-MF2	AGCTTCGGCCTGGTGCATATAACCGTGAGGCGAGCCGCTGGGTAAAT	This study
ku- <i>Nhe</i> I-MR2	TGTCAGAGCTAGCGGCCGACCAGACGCAACAGTTC	This study
ku- <i>EcoR</i> I-MF3	TGACGATGAATTCCAGGTCGGGAAAGCCGGGTCA	This study
ku- <i>Spe</i> I-MR3	TAGTCGTACTAGTATGCTTGGCACGCAATTCGCG	This study
ku-RF	TGGGCTAGCGAATTCGAGCTAGGAGGAATTCACCATGGCGCGTGCATC	This study
ku-RR	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGTCAGGCCCTTGCGCCG	This study
pBAD-ZF	CTAGAGTCGACCTGCAGGCA	[19]
pBAD-ZR	AGCTCGAATTCGCTAGCCCA	[19]
pBAD-mcf-TF	CCATAAGATTAGCGGATCCTACCT	[19]
pBAD-mcf-TR	CTTCTCTCATCCGCAAAAACAG	[19]
ku-F	GGCTACAAGCGGGTGAACAA	This study
ku-R	GGCTATCGACGAAAGCGAAGA	This study
16s-F	GCGCAACCTTGTCTTAGTT	[20]
16s-R	TGTCACCGGCAGTCTCTTAGT	[20]

注：下划线序列：限制性内切酶识别序列。

Note: Underlined sequences: Restriction endonuclease recognition sequences.

用含盐酸四环素(30 mg/L)和 0.3% D-葡萄糖的 LB 培养基进行初筛，待菌落长成，提取细菌基因组 DNA，以 ku-*EcoR* I-MF3/ku-*Spe* I-MR3 为引物对扩增鉴定；然后复筛：挑取鉴定正确的单克隆菌落于含 0.3% D-葡萄糖的 LB 液体培养基中 37 °C 培养过夜，取培养液涂布于含 0.4% L-阿拉伯糖的 LB 平板中 37 °C 培养过夜，挑取平板菌落，以 ku-*EcoR* I-MF1/ku-*Nhe* I-MR2 为引物对进行 PCR 扩增检测，获得缺失突变克隆，PCR 产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。突变株用终浓度为 20%的甘油于-80 °C 保存，命名为 *Δku*。

1.2.2 铜绿假单胞菌 *ku* 基因敲除回补株的构建

以铜绿假单胞菌 PAO1 基因组为模板，ku-RF/ku-RR 为引物对扩增获得 *ku* 基因表达片段(936 bp)，PCR 反应体系(50 μL)：DNA 模板(150 mg/L) 1 μL，引物 F/R (10 μmol/L)各 1 μL，2×PrimeSTAR Max Premix 25 μL，ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件：98 °C 3 min；98 °C 10 s，58 °C 20 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 7 min。以 pBAD33 为模板，pBAD-ZF/pBAD-ZR 为引物对扩

增获得 pBAD33 载体片段(5 529 bp)。PCR 反应体系(50 μL)：DNA 模板(200 mg/L) 1 μL，引物 F/R (10 μmol/L)各 1 μL，2×PrimeSTAR Max Premix 25 μL，ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件：98 °C 3 min；98 °C 10 s，60 °C 20 s，72 °C 3 min，30 个循环；72 °C 7 min。用 ClonExpress II 将纯化的 *ku* 基因表达片段与 pBAD33 载体片段进行无缝克隆连接，构建重组质粒 pBAD33-*ku*；将 pBAD33-*ku* 转化于大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，转化产物涂布于含 10 μg/mL 氯霉素的 LB 固体培养基，37 °C 培养过夜，并筛选重组克隆以 pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 为引物进行 PCR 鉴定(1 040 bp)；提取重组阳性克隆质粒转化至大肠杆菌 β2163 感受态细胞，转化产物涂布于含 10 μg/mL 氯霉素和 0.3 mmol/L DAP 的 LB 固体培养基，以筛选获得 β2163/pBAD33-*ku* 菌株。以 β2163/pBAD33-*ku* 菌株作为供体菌，与缺失株 PAO1 Δku 进行接合培养，培养物涂布于含有 10 μg/mL 氯霉素的 LB 抗性平板筛选克隆，以 pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 为引物对进行 PCR 检测(1 040 bp)，并将 PCR 产物纯化后送至

生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。回补株命名为 $\Delta ku::ku$ 。

1.2.3 生物被膜的培养

向 24 孔细胞培养板每个反应孔内置入 1 片灭菌细菌片(直径 14 mm), 并加入 2 mL LB 液体培养基和 100 μ L 稀释细菌悬液(终浓度为 10^5 CFU/mL)混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养。每块培养板设置一个阴性对照孔(不加入菌悬液)。每 24 h 更换一次培养液(吸去 1 mL 菌悬液, 加入 1 mL LB 液体培养基)。PAO1、 Δku 以及 $\Delta ku::ku$ 菌株在 24 孔细胞培养板上按上述方法进行生物被膜培养。取出细菌爬片, 在无菌生理盐水中轻轻漂洗, 收集漂洗后的生理盐水为浮游菌液。用细胞刮刀刮取细菌爬片上的细菌溶于生理盐水中, 制得生物被膜菌液。

1.2.4 生物被膜形成能力的检测

过夜培养 PAO1、 Δku 以及 $\Delta ku::ku$ 菌株, 将各菌液稀释至终浓度为 10^5 CFU/mL, 取 200 μ L 加入于 96 孔板, 每个菌株 3 个平行, 等量 LB 液体培养基为阴性对照, 于 37 $^{\circ}$ C 培养, 每 24 h 更换一次培养液。分别对培养 3 d 和 6 d 的 96 孔板用蒸馏水冲洗 3 次, 洗去浮游菌, 用甲醛固定 5 min, 结晶紫染色 30 min, 再用蒸馏水冲洗 3 次, 放置于干燥后用 400 μ L 95%乙醇脱色, 所得有色溶液用分光光度计测 590 nm 处吸光值。

1.2.5 生物被膜基因突变率的检测

取 100 μ L 培养 1、3、6、9 d 的各菌株生物被膜菌液及 PAO1 浮游菌液稀释后, 分别涂布于 LB 固体培养基和含 100 mg/L 利福平的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后进行平板菌落计数, 按照 Rosche 等^[21]方法计算基因突变率。

1.2.6 生物被膜菌耐药性的检测

按照上述方法培养 PAO1、 Δku 及 $\Delta ku::ku$ 菌株的生物被膜, 分别取培养 2、6、12 d 的生物被膜溶于 MH 培养基中制得生物被膜菌液。采用微量稀释法测定环丙沙星、头孢他啶和庆大霉素的 MIC。于 96 孔微量滴定板各孔中加入 100 μ L MH 培养基, 配制抗生素溶液, 第一孔内加入浓度为

128 mg/L 的抗生素溶液 100 μ L, 逐孔 2 倍稀释至浓度为 0.5 mg/L, 于每孔中加入稀释至 0.5 麦氏单位的生物被膜菌液, MH 液体培养基为阴性对照, 不加抗生素溶液的菌液为阳性对照, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后观察结果, 测得 MIC。

1.2.7 基因转录水平检测

分别取培养 1、2、4、6 d 的 PAO1 生物被膜菌液和浮游菌液, 根据天根 RNA 抽提试剂盒说明书, 分别抽提总 RNA, 取 300 ng 总 RNA, 通过 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 反转录合成 cDNA, 反转录体系为 20 μ L。使用 SYBR Green Select Master Mix, 以 cDNA 为模板, *ku*-F/*ku*-R 为特异性引物对, 采用 qPCR 检测 *ku* 基因在浮游状态和生物被膜状态的转录水平。以 16S rRNA 基因为内参基因, 所用引物见表 2。qPCR 的反应体系(10 μ L): cDNA 1 μ L (cDNA 使用前进行稀释: 检测 *ku* 基因稀释 10 倍, 检测 16S rRNA 基因稀释 100 倍), 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, SYBR Green Select Master Mix 5 μ L, 超纯水 3 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak)法分析数据, 计算不同培养时间生物被膜菌中 *ku* 基因的转录水平。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌 *ku* 缺失突变菌株的构建

根据引物的设计, 以 PAO1 基因组 DNA 为模板, 扩增 *ku* 基因(PA2150)上游片段(A)和下游片段(B), 通过交叠 PCR 的方法将 A 片段和 B 片段融合为 AB 片段, 并构建至载体 pLP12 中, 获得重组自杀质粒(pLP12-*ku*)。将 pLP12-*ku* 电转化至大肠杆菌 β 2163 中, 获得供体菌 β 2163/pLP12-*ku*。供体菌与受体菌 PAO1 混合培养后, 通过盐酸四环素和 D-葡萄糖进行初筛, 获得重组自杀质粒插入受体菌基因组的单交换同源重组克隆。单交换同源重组克隆经过 L-阿拉伯糖诱导, *vmi480* 致死基因反向筛选获得双交换同源重组克隆。以 *ku*-EcoR

I-MF1/*ku-Nhe* I-MR2 为引物对, 通过 PCR 扩增检测双交换克隆, 获得 *ku* 缺失突变菌株。其中, 回复突变克隆扩增片段为 2 060 bp, *ku* 缺失突变克隆扩增片段为 1 236 bp (图 1A)。最后通过 PCR 产物测序验证证实 *ku* 缺失突变菌株 Δku 构建成功。

2.2 铜绿假单胞菌 *ku* 缺失回补株的构建

根据引物设计, 分别扩增获得 *ku* 基因及 pBAD33 载体片段, 两者通过无缝克隆连接构建重组表达质粒 pBAD33-*ku*, 将重组质粒电转化至大

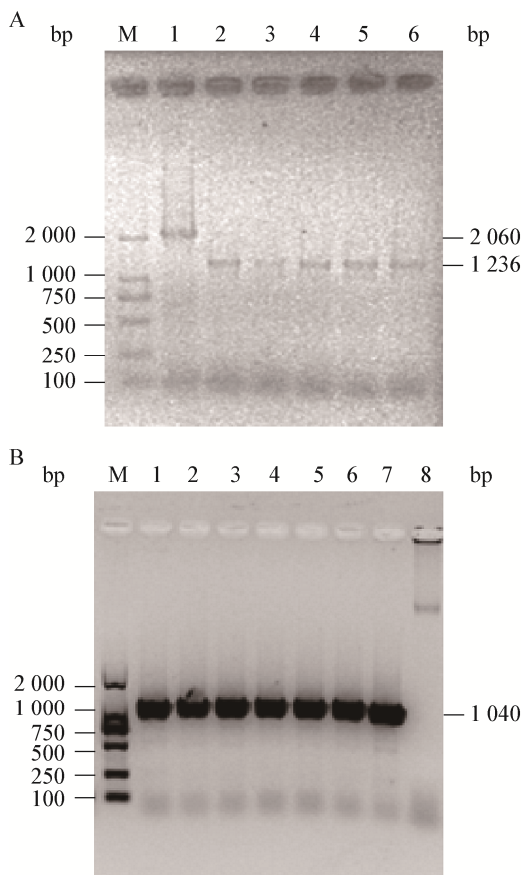


图 1 *ku* 基因缺失株及其回补株的 PCR 验证

Figure 1 PCR verification of *ku* gene deletion mutant strains and its complementary strains

注: M: DL2000 DNA Marker; A: 1 为野生菌株 PAO1, 2-6 为 *ku* 缺失突变克隆 Δku ; B: 1-6 为回补株, 7 为阳性对照 $\beta 2163/pBAD33-ku$, 8 为阴性对照 Δku 。

Note: M: DL2000 DNA Marker; A: Wild-type PAO1 in lane 1, *ku* gene deletion clones Δku in lanes 2-6; B: Complementary strains in lanes 1-6, positive control $\beta 2163/pBAD33-ku$ in lane 7, negative control Δku in lane 8.

肠杆菌 $\beta 2163$ 中, 获得供体菌 $\beta 2163/pBAD33-ku$ 。供体菌与受体菌 Δku 接合培养获得回补株 $\Delta ku::ku$ 。以突变株为阴性对照, $\beta 2163/pBAD33-ku$ 为阳性对照, pBAD-mcf-TF/pBAD-mcf-TR 为引物对进行 PCR 检测, 阳性克隆 PCR 条带大小为 1 040 bp (图 1B)。

2.3 *ku* 缺失对铜绿假单胞菌生物被膜形成能力的影响

比较 PAO1、 Δku 以及 $\Delta ku::ku$ 菌株生物被膜的形成能力, 结果显示, 培养 3 d 和 6 d 时, 突变菌株与野生菌株形成的生物被膜厚度无显著差异 (图 2)。

2.4 *ku* 缺失对生物被膜中铜绿假单胞菌基因突变率的影响

以 PAO1 浮游菌液为对照, 比较 PAO1、 Δku 及 $\Delta ku::ku$ 这 3 种菌株在培养 1、3、6、9 d 时生物被膜中细菌的基因突变率。PAO1 浮游菌的基因突变率在培养 1 d 时为 0.6×10^{-11} , 培养 9 d 时上升至 1.06×10^{-11} , 而生物被膜中的 PAO1 基因突变率显著高于浮游菌 (图 3), 这与 Driffield 等^[22]的研究结果相符。另外, 生物被膜状态下, PAO1 基因突变率随着培养时间的不同发生着变化, 在第 6 天时, 基因突变率达到最高值, 而 Δku 的基因突变率在不同培养时间几乎没有变化, 此时两者基因突变率差

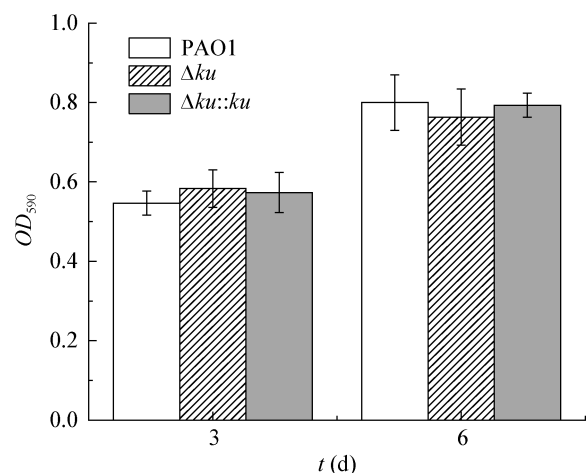


图 2 *ku* 基因对生物被膜菌形成能力的影响

Figure 2 Effect of *ku* gene on biofilm-forming ability of PAO1 at different cultivation times

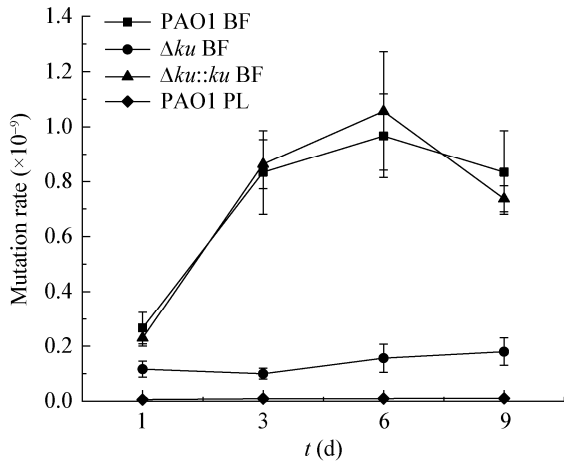


图3 *ku* 基因对生物被膜中的 PAO1 基因突变率的影响
Figure 3 Effect of *ku* gene on mutation rate of PAO1 within biofilms grown at different cultivation times

注: PL: 浮游菌; BF: 生物被膜。

Note: PL: Planktonic bacteria; BF: Biofilm.

异达到最高, Δku 基因突变率降低至 PAO1 约 1/5 处($P < 0.01$)。回补株 $\Delta ku::ku$ 与野生菌株无显著差异($P > 0.05$)。

2.5 *ku* 缺失对铜绿假单胞菌生物被膜抗菌药物耐药性的影响

比较 PAO1、 Δku 以及 $\Delta ku::ku$ 生物被膜菌对环丙沙星、头孢他啶和庆大霉素的耐药性, 发现两者的耐药性随着生物被膜培养时间的延长皆有所增强。生物被膜培养 6 d 和 12 d 时, Δku 对环丙沙星以及庆大霉素的耐药性比 PAO1 下降了 50%, 而两种菌株对头孢他啶的耐药性并无明显差别。回补株生物被膜对各抗菌药物耐药性与野生菌株无差异(表 3)。

2.6 铜绿假单胞菌生物被膜菌 *ku* 基因的表达水平

通过 qPCR 比较 PAO1 浮游菌与 PAO1 生物被膜细菌在不同培养时间 *ku* 基因的转录水平, 结果表明, 培养 2 d 后, PAO1 生物被膜 *ku* 基因转录水平比 PAO1 浮游菌增强了 2 倍, 这样的差异并未随着生物被膜培养时间的延长而有所改变(图 4)。

表 3 抗生素对 PAO1、 Δku 及 $\Delta ku::ku$ 不同培养时间的生物被膜的 MIC

Table 3 MIC of antibiotics to PAO1, Δku and $\Delta ku::ku$ biofilms grown at different cultivation times (mg/L)

Antibiotics	Time (d)	Strains		
		PAO1	Δku	$\Delta ku::ku$
环丙沙星	2	0.5	0.5	0.5
Ciprofloxacin	6	2.0	1.0	2.0
	12	8.0	4.0	8.0
庆大霉素	2	1.0	1.0	1.0
Gentamicin	6	4.0	2.0	4.0
	12	8.0	4.0	8.0
头孢他啶	2	0.5	0.5	0.5
Ceftazidime	6	2.0	2.0	2.0
	12	4.0	4.0	4.0

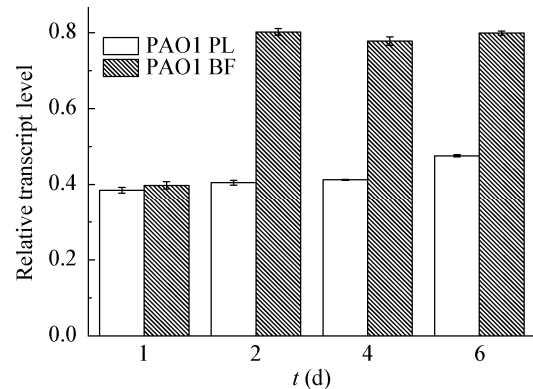


图 4 不同培养时间下 *ku* 基因转录水平

Figure 4 Transcription level of *ku* gene in PAO1 biofilms grown at different cultivation times compared to PAO1 planktonic bacteria

注: PL: 浮游菌; BF: 生物被膜。

Note: PL: Planktonic bacteria; BF: Biofilm.

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌是临床常见条件致病菌, 生物被膜的形成极大地增强了其耐药性。生物被膜的耐药机制由多种因素引起, 包括外排泵机制上调、免疫逃逸、物理屏障以及低营养微环境等^[23]。另外, 表型变异在生物被膜特殊的环境因素中产生, 也使得细菌对多种抗菌药物耐药^[24-25]。研究显示, DNA 错配修复途径(DNA mismatch repair)的失活可引起基因突变频率增加, 从而引起 PA 生物

被膜对抗菌药物耐药水平的提高^[26-28], 这表明基因突变与生物被膜耐药性密切相关。实际上, 即使在非人工诱导的情况下, 野生型 PA 生物被膜的基因突变率可达浮游菌的 100 倍^[22]。究竟是何种机制导致 PA 生物被膜基因突变率增加以及 PA 生物被膜的耐药作用增强目前仍不清楚。

NHEJ 是 DSB 的主要修复机制之一, 修复过程无需同源模板, 直接将断裂缺口连接, 常导致 DNA 发生序列改变。研究表明恶臭假单菌 NHEJ 与稳定生长期的细菌变异相关^[29], 铜绿假单胞菌 NHEJ 途径可促进染色体片段缺失^[30]。细菌的 NHEJ 修复途径主要由 Ku 蛋白和 LigD 连接酶参与, Shen 等的研究显示 Δku 突变体与 $\Delta ku\Delta ligD$ 双缺失突变体丢失染色体片段的概率下降, 而 Δku 突变体的 *ku* 基因回补提高了染色体片段缺失的概率^[30], 这些数据表明了 Ku 蛋白在 NHEJ 修复途径中的关键性。因此, 我们认为 *ku* 基因缺失可导致 NHEJ 途径的失活。

NHEJ 可以作用于细胞周期的任何时期, 但在细菌中 NHEJ 的作用主要体现在生长稳定期、饥饿状态或孢子等营养低、生长慢的环境中^[31-32], 这与生物被膜特殊的微环境状况非常相似。据谢轶等^[33]的研究表明, PA 细菌悬液培养 1 d 后未形成生物被膜, 培养 3 d 后开始形成生物被膜, 培养 6 d 可形成很厚的生物被膜。本研究显示, *ku* 基因表达水平在 PA 生物被膜培养 2 d 后有所提高, 说明 NHEJ 的作用在生物被膜形成早期得到了一定程度的激活, 但是生物被膜形成能力检测结果表明 *ku* 基因并不影响生物被膜的形成。我们由此推测在 PA 中, 生物被膜的形成不受 NHEJ 调节, 但其是 NHEJ 作用的主要环境。

本研究中, 通过筛选利福平耐药突变体检测生物被膜中 PA 野生菌株及 *ku* 缺失菌株的基因突变率, 结果显示, 随着生物被膜的形成和成熟, PA 基因突变率不断提高, 在培养 6 d 时达到最大值, 但 *ku* 缺失突变株并未显示基因突变率的变化, 这一结果表明 NHEJ 对生物被膜中 PA 基因突变率的

提高有一定的促进作用。文献报道利福平耐药主要是因为 *rpoB* 基因发生突变引起, 包括点突变、短的插入和缺失突变^[34-35], 而 NHEJ 修复 DSB 引起的突变以短的插入和缺失为主^[36]。我们由此推测 *ku* 缺失导致 NHEJ 途径被抑制, 致使 *rpoB* 基因发生突变的频率降低, PA 基因突变率下降。为验证这一推测, 我们下一步的工作将对 PA 利福平耐药突变体进行 *rpoB* 基因测序, 分析其突变类型, 进一步明确 *ku* 介导的突变与生物被膜中 PA 基因突变率上升的联系。

PA 对抗菌药物的耐药性可由多种耐药机制介导, 而研究发现耐药机制可由基因突变激活或调节, 如外排泵 MexAB-OprM 因 *mexR*、*nalB*、*nalC* 或 *nalD* 基因突变而上调, 增强了对 β -内酰胺类和喹诺酮类药物的耐受力^[37]; 喹诺酮类药物靶基因 *gyrA*、*gyrB* 或 *parC*、*parE* 以及氨基糖苷类药物靶基因 *rplY* 的突变降低了 PA 对该药物的敏感性^[37-38]; *ampC* 基因突变可增强 β -内酰胺酶表达量, 大大增强 PA 对头孢菌素的耐药性^[39]。本研究发现 *ku* 基因对生物被膜状态中的 PA 环丙沙星和庆大霉素的耐药性有一定的正调控作用, 这极有可能源于 NHEJ 途径在修复 DNA 的过程中产生的突变涉及了 PA 耐药机制的相关基因而影响了其活性, 但 NHEJ 产生的突变影响了何种耐药机制以及其如何引起耐药机制活性变化, 这一系列问题还有待进一步的研究。

综上所述, 我们通过本研究发现 PA 在生物被膜环境下 NHEJ 途径活性增强, 引起基因突变率升高, 对某些抗菌药物耐药性增强。我们将在未来的工作中进一步探讨 NHEJ 引起基因突变率和耐药性增强的机制。

REFERENCES

- [1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [2] Häussler S. Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(8): 544-548

- [3] Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013, 3(4): a010306
- [4] Della M, Palmos PL, Tseng HM, et al. Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine[J]. Science, 2004, 306(5696): 683-685
- [5] de Ory A, Zafra O, de Vega M. Efficient processing of abasic sites by bacterial nonhomologous end-joining Ku proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(21): 13082-13095
- [6] Aravind L, Koonin EV. Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system[J]. Genome Research, 2001, 11(8): 1365-1374
- [7] Weller GR, Kysela B, Roy R, et al. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria[J]. Science, 2002, 297(5587): 1686-1689
- [8] Bowater R, Doherty AJ. Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining[J]. PLoS Genetics, 2006, 2(2): e8
- [9] Pitcher RS, Brissett NC, Doherty AJ. Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 259-282
- [10] Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(11): 852-861
- [11] Poole K, Tetro K, Zhao Q, et al. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(9): 2021-2028
- [12] Jeannot K, Elsen S, Köhler T, et al. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(7): 2455-2462
- [13] Wang SC, Yang ZM, Cai XY, et al. Expression of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY-OprM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and their relationship with drug resistance phenotypes in a Third Class A Hospital in Hainan[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2020, 23(3): 247-252 (in Chinese)
王生成, 杨祚明, 蔡潇阳, 等. 海南某三甲医院多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM 表达及与耐药表型的关系研究[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(3): 247-252
- [14] Lee JK, Lee YS, Park YK, et al. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 25(4): 290-295
- [15] Zhang GD, Zeng ZR, Wang Y, et al. Mechanisms of *gyrA*, *gyrB* and efflux system jointly mediating quinolone resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(3): 224-228 (in Chinese)
张国栋, 曾章锐, 王莹, 等. *gyrA*、*gyrB* 和外排系统共同介导铜绿假单胞菌对喹诺酮类耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(3): 224-228
- [16] Demarre G, Guérout AM, Matsumoto-Mashimo C, et al. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPα) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(2): 245-255
- [17] Luo P, He XY, Liu QT, et al. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, *vmi480*[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144465
- [18] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(14): 4121-4130
- [19] Wang WJ, Xu J, Gao HX, et al. Construction of *baeSR* gene knock-out in *Salmonella typhimurium* and analysis of its sensitivity to antibiotics[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 3013-3021 (in Chinese)
王文静, 徐军, 高海侠, 等. 鼠伤寒沙门菌 *baeSR* 基因缺失株的构建及其对抗生素敏感性分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 3013-3021
- [20] Zhao JM, Jiang HD, Cheng W, et al. The role of quorum sensing system in antimicrobial induced *ampC* expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(5): 671-678
- [21] Rosche WA, Foster PL. Determining mutation rates in bacterial populations[J]. Methods, 2000, 20(1): 4-17
- [22] Driffield K, Miller K, Bostock JM, et al. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 61(5): 1053-1056
- [23] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(7): 1034-1043
- [24] Giraud A, Radman M, Matic I, et al. The rise and fall of mutator bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(5): 582-585
- [25] Macià MD, Pérez JL, Molin S, et al. Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a

- pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(11): 5230-5237
- [26] Smania AM, Segura I, Pezza RJ, et al. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1327-1338
- [27] Plasencia V, Borrell N, Maciá MD, et al. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of *in vitro* and *in vivo* resistance development to single or combined antipseudomonal agents[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(7): 2574-2581
- [28] Luján AM, Maciá MD, Yang L, et al. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27842
- [29] Paris Ü, Mikkel K, Tavita K, et al. NHEJ enzymes LigD and Ku participate in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*[J]. *DNA Repair*, 2015, 31: 11-18
- [30] Shen MY, Zhang HD, Shen W, et al. *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(9): 4505-4514
- [31] Pitcher RS, Green AJ, Brzostek A, et al. NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation[J]. *DNA Repair*, 2007, 6(9): 1271-1276
- [32] Moeller R, Reitz G, Li ZF, et al. Multifactorial resistance of *Bacillus subtilis* spores to high-energy proton radiation: role of spore structural components and the homologous recombination and non-homologous end joining DNA repair pathways[J]. *Astrobiology*, 2012, 12(11): 1069-1077
- [33] Xie Y, Yang WQ, Jia WX, et al. Change of intrinsic drug resistance in the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2005, 25(4): 314-318 (in Chinese)
- 谢轶, 杨维青, 贾文祥, 等. 铜绿假单胞菌耐药性在生物被膜形成过程中的变化[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(4): 314-318
- [34] Farhat MR, Sultana R, Iartchouk O, et al. Genetic determinants of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and their diagnostic value[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2016, 194(5): 621-630
- [35] Jatsenko T, Tover A, Tegova R, et al. Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2010, 618(1/2): 106-114
- [36] Bertrand C, Thibessard A, Bruand C, et al. Bacterial NHEJ: a never ending story[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(5): 1139-1151
- [37] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(1): 177-192
- [38] El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, et al. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(3): 1016-1021
- [39] Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguene VY, et al. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10): 6248-6255