

束玲玲, 徐柳柳, 祁克宗, 等. *pagP* 基因缺失对禽致病性大肠埃希菌外膜特性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(6): 8-14.
SHU Lingling, XU Liuliu, QI Kezong, et al. Effect of *pagP* gene deletion on outer membrane characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(6): 8-14.

pagP 基因缺失对禽致病性大肠埃希菌 外膜特性的影响

束玲玲, 徐柳柳, 祁克宗, 涂建, 宋祥军, 邵颖

(安徽农业大学 动物科技学院/兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】研究 *pagP* 基因缺失对禽致病性大肠埃希菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 外膜特性的影响。【方法】采用最低抑菌浓度 (MIC) 试验探索 *pagP* 基因缺失对菌株生物被膜通透性的影响; 通过菌体自聚合试验、外膜疏水性试验以及生物被膜形成条件, 分析 *pagP* 基因缺失对生物被膜形成能力的影响, 并在扫描电镜下观察细菌生物被膜形态。【结果】*pagP* 基因缺失后, 菌株 MIC 降低, 菌株的外膜通透性增强且菌体自聚合能力显著增强 ($P<0.01$), 其中红霉素和氨苄西林的 MIC 分别为 7 和 20 $\mu\text{g/mL}$, 菌株自聚合能力为 87.89%; *pagP* 基因缺失对菌株外膜疏水性无显著影响, 疏水性仅为 5.337%; 随着细菌在 LB 培养基中静置培养时间的延长, 生物被膜形成量增多; *pagP* 基因缺失株的生物被膜形成能力高于野生株。【结论】*pagP* 基因缺失可使 APEC 外膜特性发生改变, 生物被膜形成能力增强。

关键词: 禽致病性大肠埃希菌; *pagP* 基因; 生物被膜; 疏水性; 自聚合能力

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)06-0008-07

Effect of *pagP* gene deletion on outer membrane characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*

SHU Lingling, XU Liuliu, QI Kezong, TU Jian, SONG Xiangjun, SHAO Ying

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University/Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Objective】 To study the effect of *pagP* gene deletion on outer membrane characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC). 【Method】 The minimal inhibitory concentration (MIC) experiment was used to explore the effect of *pagP* deletion on the permeability of outer membrane of strain. Autoaggregation experiment, outer membrane hydrophobicity test, and analysis of biofilm-forming conditions of strain were performed to understand the influence of *pagP* deletion on biofilm-forming ability. The biofilm morphology was observed by scanning electron microscopy. 【Result】 The MIC of strain decreased after the deletion of *pagP* gene, the outer membrane permeability of strain increased, and the autoaggregation ability of strain increased significantly ($P<0.01$). The MICs of erythromycin and ampicillin were 7 and 20 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The autoaggregation ability of strain was 87.89%. The deletion of *pagP* gene had no significant effect on the hydrophobicity of outer membrane of strain, and the hydrophobicity was only 5.337%. The amount of biofilm increased with the increase of time when the strain was cultured in LB medium. The strain with *pagP* deletion

收稿日期: 2018-11-25 网络首发时间: 2019-10-28 09:20:19

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20191025.0844.012.html>

作者简介: 束玲玲 (1993—), 女, 硕士研究生, E-mail: shull1234@qq.com; 通信作者: 祁克宗 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: qkz@ahau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31772707)

had higher biofilm-forming ability than wild strain. 【Conclusion】 The deletion of *pagP* gene can change the characteristics of outer membrane of APEC and enhance the biofilm-forming ability.

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*; *pagP* gene; biofilm; hydrophobicity; autoaggregation ability

禽大肠埃希菌病是由禽致病性大肠埃希菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 引起的, 禽大肠埃希菌病的发病率和死亡率随着家禽养殖业的迅速发展也随之增加, 对养禽业的发展造成严重的经济损失。大肠埃希菌外膜的主要组成成分有脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS), 其亲水性糖链可以对疏水性物质进入细胞时产生屏障作用, 对维持细胞稳定性具有重要作用, 为细胞生存提供保护^[1]。细菌外膜通透性、外膜表面疏水性都与 LPS 的结构有关联, LPS 还在细胞黏附性和生物被膜形成过程中起到重要作用^[2]。经过加工修饰后的 LPS 会改变细菌的部分生物学功能。例如, 细菌对某些抗生素和阳离子抗菌肽的敏感性会因为细菌 LPS 次级脂肪酸链的缺失而增强^[3-5]。细菌 LPS 的类脂 A 通过棕榈酰转移酶的作用使其脂肪酸链的数目增加^[6], Lau 等^[7] 研究发现细胞外膜的流动性变化与 LPS 脂肪酸链数目的改变有关系, 细胞外膜的流动性变化可以对大肠埃希菌细胞外膜通透性产生影响, Carty 等^[8] 发现细菌外膜通透性增加会使细菌外排大分子的数量增加, 进而提高细菌生物被膜的形成量。

细菌在遭受到各种环境胁迫, 如抗生素、低 pH、高渗透压时, 为了抵抗不利的生存环境而形成生物被膜^[4]。细胞表面与疏水性化学分子的结合能力称为细胞表面疏水性, 不同的菌株在不同的生长条件下细菌外膜表面疏水性对生物被膜形成能力的影响是不同的^[9]。PhoP/PhoQ 二元调控系统是这种特定机制中细菌调控基因转录表达的关键途径之一, 可通过调控毒力基因的表达来适应外界环境的变化, 有研究表明, 与 LPS 合成有关的脂质 A 的表达受 PhoP/PhoQ 的调控^[10]。细菌外膜 LPS 的类脂 A 结构可以通过 *pagP* 基因编码的棕榈酰转移酶进行棕榈酰化^[11]。*pagP* 是在沙门菌中发现的, 与类脂 A 脂肪酸链修饰有关的蛋白酶, 它是一种外膜棕榈酰转移酶^[11-13]。而在大肠埃希菌和相关的革兰阴性致病菌中, *pagP* 可以通过抵抗抗菌肽^[14-16] 的作用帮助致病菌逃避宿主免疫防御, 并通过 TLR4 / MD2 途径调节触发的炎症反应^[17-19]。*pagP* 基因的转录受 PhoP/PhoQ 调节子控制, 其控制在感染宿主过程中诱导的细菌脂质 A 修饰酶的表达^[20-21]。

Hittle 等^[22] 报道称百日咳博德特氏菌 *Bordetella parapertussis pagP* 基因通过参与介导对脂质 A 的修饰来调控细菌外膜功能, 这是细菌在感染宿主期间与其相互作用的一种修饰方式。本研究以 APEC 的 *pagP* 基因缺失株为研究对象, 研究 *pagP* 基因缺失对细菌外膜特性的影响, 为进一步研究 *pagP* 基因在禽致病性大肠埃希菌中的致病作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

禽致病性大肠埃希菌 AE17 野生株、*pagP* 基因缺失株 ($\Delta pagP$) 与回复株 (*CpagP*) 由安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存^[23-24]; LB 液体培养基、琼脂粉、葡萄糖均购自上海生工; 二甲苯、MH 培养基、戊二醛、丙酮、结晶紫、红霉素、氨苄西林、乙酸、M9 基本培养基购自源叶生物。

1.2 细菌外膜通透性检测

采用微量肉汤稀释法^[25-26] 测定禽致病性大肠埃希菌 $\Delta pagP$ 、AE17 以及 *CpagP* 对红霉素、氨苄西林的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)。配制 1.28 mg/mL 的红霉素、氨苄西林贮存液, 收集生长至对数期的细菌菌体, 在使用分光光度计测 $D_{600\text{ nm}}$ 时利用 LB 液体培养基稀释菌液, 调整细菌数为 10^8 CFU/mL, 经无菌 MH 肉汤按 1:100 的体积比稀释为 10^6 CFU/mL, 以无菌培养基作为对照组, 37 °C 条件下过夜培养后观察结果。

1.3 菌株自聚合特性研究

1.3.1 菌株自聚合能力测定 禽致病性大肠埃希菌 AE17、 $\Delta pagP$ 以及 *CpagP* 菌液接种至灭菌的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 条件下培养至细菌对数生长期, 收集菌液, 6 000 r/min 离心 5 min 获得菌体后, 用无菌 PBS 缓冲液洗涤重悬, 用分光光度计测定 600 nm 下的初始吸光度 ($D_{600\text{ nm}}$)。然后快速取重悬液 5 mL 置于试管中, 在 37 °C 静置, 12 h 后取各菌株上层液体 1 mL, 再次在 600 nm 下测定吸光度 ($D'_{600\text{ nm}}$)。每个样品设 3 个平行样。自聚合能力计算公式:

自聚合能力 = $(1 - D'_{600\text{ nm}}/D_{600\text{ nm}}) \times 100\%$ 。

1.3.2 环境温度及菌液浓度对菌株自聚合能力的影响 用“1.3.1”的方法处理生长至对数期的 AE17、 $\Delta pagP$ 以及 $CpagP$ 菌液, 调整初始 $D_{600\text{ nm}}=1.2$ 并分装于试管中, 分别置于 4、22 和 37 °C 条件下, 静置培养 12 h 后用分光光度计测 $D_{600\text{ nm}}$, 分别计算菌株在 4、22 和 37 °C 环境温度时的自聚合能力, 分析温度对菌株自聚合的影响。

相同方法处理生长至对数期的 AE17、 $\Delta pagP$ 以及 $CpagP$ 菌液, 并分别调整每株菌的初始 $D_{600\text{ nm}}$ 为 1、2 和 3, 分装于试管中, 37 °C 静置培养, 测不同时间段 $D_{600\text{ nm}}$ 的值, 计算自聚合能力, 分析不同初始菌液浓度对菌株自聚合能力的影响。

1.4 外膜疏水性研究

禽致病性大肠埃希菌 AE17、 $\Delta pagP$ 以及 $CpagP$ 菌液接种至灭菌的 LB 液体培养基中, 置于恒温震荡培养箱, 37 °C、200 r/min 条件下培养至细菌的对数生长期, 收集菌液, 6 000 r/min 离心 5 min, 获得菌体后, 用无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 无菌 PBS 缓冲液重悬浮, 用分光光度计在 600 nm 下测定吸光度 ($D_{600\text{ nm}}$)。然后, 吸取重悬液 5 mL 置于试管中, 加入 2 mL 二甲苯溶液漩涡震荡 2 min, 混匀后室温静置 30 min, 重新形成水相和有机相两相体系。轻轻吸取水相, 避免吸收到有机相, 再次在 600 nm 下测定吸光度 ($D'_{600\text{ nm}}$)。每个样品设 3 个平行样。外膜表面疏水性计算公式:

$$\text{疏水性} = (1 - D'_{600\text{ nm}}/D_{600\text{ nm}}) \times 100\%。$$

1.5 生物被膜形成条件分析

1.5.1 培养基对生物被膜形成的影响 取培养至对数中期的 AE17 菌液按初始 $D_{600\text{ nm}}=0.03$ 分别接种至含 2 mL LB、M9 和 M9+20 g/L 葡萄糖培养基的试管中。37 °C 静置培养 24 h, 吸出培养液, 用纯水清洗 3 次, 以 1 g/L 结晶紫溶液 2.5 mL 对管壁上的生物被膜进行染色, 室温静置 15 min, 用纯水清洗直至无紫色液体流出, 取 2 mL 体积分数为 30% 的乙酸溶液加入试管中, 超声处理 30 min 后, 以体积分数为 30% 的乙酸溶液作为对照, 用分光光度计测定 $D_{597\text{ nm}}$, 记为生物被膜形成率。以上试验重复 3 次。

1.5.2 溶氧与培养时间对生物被膜形成的影响 取培养至对数中期的 AE17 菌液按初始 $D_{600\text{ nm}}=0.03$ 接种至含 2 mL LB 液体培养基的试管中, 分别在转速为 0、100 和 200 r/min (以摇床转速来控制溶氧条件) 条件下培养 24 h, 并于 37 °C 静置培养 12、

24、36 和 48 h, 测定溶氧与培养时间不同情况下的生物被膜形成率。

1.6 $pagP$ 缺失对生物被膜形成的影响

1.6.1 生物被膜形成能力观察 取培养至对数期的 AE17、 $\Delta pagP$ 以及 $CpagP$ 菌液, 收集菌体。用 LB 液体培养基调整 $D_{600\text{ nm}}=0.03$, 按每孔 200 μL 加入 96 孔试验板中, 37 °C 静置培养 48 h。用 PBS 缓冲液洗 3 次, 加 1 g/L 结晶紫溶液 200 μL , 室温静置 15 min 进行染色, 用纯净水洗净 96 孔板, 观察生物被膜形成情况。

1.6.2 扫描电镜观察细菌生物被膜 在 6 孔细胞板中放入细胞爬片, 加入 2 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的菌液, 在 37 °C 培养箱中静置培养 36 h 后, 通过扫描电镜观察细菌被膜聚合状况。扫描电镜 (SEM) 观察前处理步骤:

1) 样本制备: 将培养的细胞爬片取出, PBS 缓冲液清洗 3 次, 晾干。

2) 固定: 用体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液固定 2 h, 用无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次, 尽快将样本放入体积分数为 3.0% 的戊二醛溶液中, 4 °C 条件下固定 6 h, 用无菌 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 20 min。

3) 梯度脱水: 4 °C 条件下, 使用体积分数分别为 30%、50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇溶液, 依次处理 20 min, 吸取溶液弃去, 再于 4 °C 条件下使用丙酮处理 20 min, 重复 2 次。

4) 干燥: 将处理好的样本浸泡在丙酮中送至安徽农业大学生物科技楼公共平台中心进行真空冷冻干燥。

5) 黏台: 用导电胶将干燥后的样品固定于样品台上。

6) 喷金: 在不导电的样品表面喷镀一层 10 nm 左右的贵金属。

7) 进样观察。

1.6.3 数据分析 应用 SPSS 20.0、GraphPad Prism 5 和 Excel 2007 进行数据分析和作图, 采用 Duncan's 法进行处理组间的多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 MIC 试验

本试验选取了红霉素和氨苄西林进行 MIC 测定, 研究 $pagP$ 缺失对菌株外膜通透性的影响。结果显示, 对于红霉素, AE17、 $CpagP$ 和 $\Delta pagP$ 的 MIC 分别为 40、20 和 7 $\mu\text{g/mL}$, $\Delta pagP$ 对红霉素的敏感性显著增加 ($P=0.044$)。对于氨苄西林, AE17、 $CpagP$ 和 $\Delta pagP$ 的 MIC 分别为 40、28 和 20 $\mu\text{g/mL}$,

$\Delta pagP$ 与 AE17 相比对氨苄西林的敏感性有所增加, 但是差异不显著 ($P=0.052$)。

2.2 菌株自聚合特性

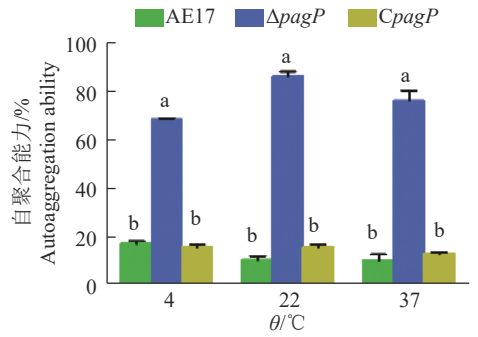
菌株自身凝集性反映了菌体之间的相互作用, 其对生物被膜的形成可能具有一定的影响。本试验结果显示, AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 的自聚合能力分别为 27.39%、87.89% 和 28.08%, 与 AE17 相比 $\Delta pagP$ 的自聚合能力显著增强 ($P=0.016$), 与 *CpagP* 相比 $\Delta pagP$ 的自聚合能力也显著增强 ($P=0.011$), 说明 *pagP* 基因缺失会增加细菌的自聚合能力。

2.3 温度对菌株自聚合特性的影响

如图 1 所示, 在不同培养温度条件下, $\Delta pagP$ 的自聚合能力显著高于 AE17 和 *CpagP*, $\Delta pagP$ 的自聚合能力达到 80% 左右, 而 AE17 和 *CpagP* 的自聚合能力只有 15% 左右; 但在不同培养温度条件下的同一种菌株的自聚合能力没有明显的差异, 说明环境温度与菌株的自聚合特性之间没有直接的相关性。

2.4 菌液浓度对菌株自聚合特性的影响

菌株自聚合与细胞间的互作有一定的关系。如图 2 所示, 在同一初始浓度条件下, AE17 和 *CpagP*



相同温度柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters on the bars of the same temperature indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's test)

图 1 不同培养温度下菌株自聚合能力

Fig. 1 Autoaggregation abilities of bacteria strains at different culture temperatures

的菌株自聚合能力低于 $\Delta pagP$, 且 AE17 与 *CpagP* 的自聚合能力几乎一致; 同一菌株在不同初始浓度条件下的自聚合能力不同, 调节初始菌液浓度的 $D_{600\text{ nm}}$ 为 2 和 3 时, 同一菌株的自聚合能力没有明显差异, 而且在 0~1 h 的自聚合能力降低较快, 但是当把菌液初始浓度的 $D_{600\text{ nm}}$ 调至为 1 时, 菌株的自聚合能力明显降低。

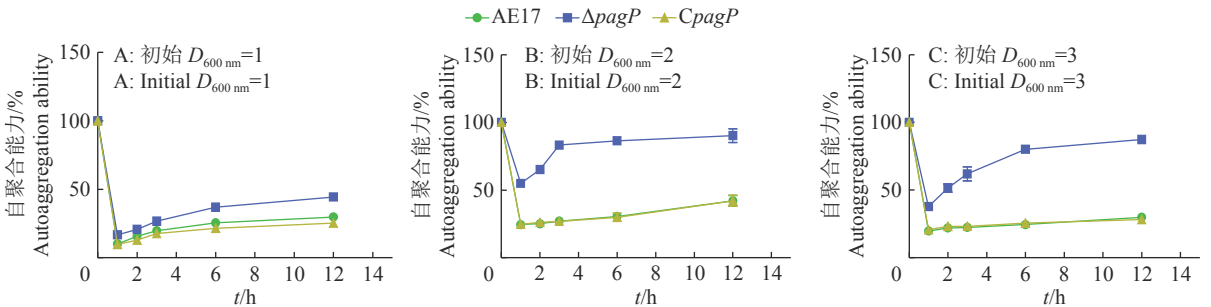


图 2 不同初始浓度对菌株自聚合能力的影响

Fig. 2 Effects of different initial concentrations on autoaggregation abilities of bacteria strains

2.5 外膜疏水性

细胞表面疏水性大小会影响菌体自凝集能力和生物被膜形成能力等, 因此本试验测定了 $\Delta pagP$ 、AE17 和 *CpagP* 的外膜疏水性。结果显示, AE17 的疏水性为 5.923%, $\Delta pagP$ 的疏水性为 5.337%, *CpagP* 的疏水性为 5.030%, AE17 与 $\Delta pagP$ 相比外膜疏水性无显著差异 ($P=0.705$), $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 相比外膜疏水性无显著差异 ($P=0.842$), 说明 *pagP* 基因的缺失与细菌的外膜疏水性无特定的关系。

2.6 培养条件对生物被膜形成的影响

细菌生物被膜是细菌抵御外界环境胁迫而形成的, 细菌生物被膜的形成能力与外界环境条件的

差异有关系, 因此我们研究了细菌培养时间、培养基中含氧量和培养基种类不同对细菌生物被膜形成的影响。

以 AE17 为分析对象, 分析在不同培养条件下的生物被膜形成能力。在 LB 培养基中 $D_{597\text{ nm}}=0.542$, M9 基本培养基中 $D_{597\text{ nm}}=0.485$, M9+w 为 0.2% 的葡萄糖培养基中 $D_{597\text{ nm}}=0.535$ 。结果显示, 细菌在 3 种培养基中生物被膜形成能力差异不显著 ($P=0.155$)。以摇床不同转速来调节细菌培养时环境的含氧情况, 结果显示在静置状态 (摇床转速为 0) 时 $D_{597\text{ nm}}=0.508$, 摇床转速为 100 r/min 时 $D_{597\text{ nm}}=0.215$, 摇床转速为 200 r/min 时 $D_{597\text{ nm}}=0.125$ 。静置状态与转速 100 r/min 相比差异显著

($P=0.029$), 与转速 200 r/min 相比差异也显著 ($P=0.009$), 说明静置状态明显更利于生物被膜形成。AE17 的生物被膜形成量随着时间的延长逐渐增加, 0 h 时 $D_{597\text{ nm}}=0.369$, 24 h 后 $D_{597\text{ nm}}=0.432$, 36 h 后 $D_{597\text{ nm}}=0.706$, 48 h 后 $D_{597\text{ nm}}=0.820$ 。结合以上结果, 选取 LB 培养基在静置状态下培养 48 h 来检测 *pagP* 缺失对细菌生物被膜形成的影响。

2.7 生物被膜形成能力观察

AE17、 $\Delta pagP$ 以及 *CpagP* 菌株在 96 孔板, LB 培养基中培养 48 h, 结晶紫染色观察细菌生物被膜, 结果如图 3 所示, 培养 48 h 的 $\Delta pagP$ 的生物被膜脱落, AE17 和 *CpagP* 回复株的生物被膜完好。

2.8 扫描电镜观察细菌被膜

在六孔板中放入爬片, 细菌在六孔板中培养, 经过处理进行扫描电镜观察, 结果如图 4 所示,



图 3 结晶紫染色观察细菌生物被膜

Fig. 3 Crystal violet staining for bacterial biofilm observation

pagP 基因缺失株连接紧密, 而 AE17 和 *CpagP* 的分布相对松散。说明 *pagP* 缺失株的聚合能力强。

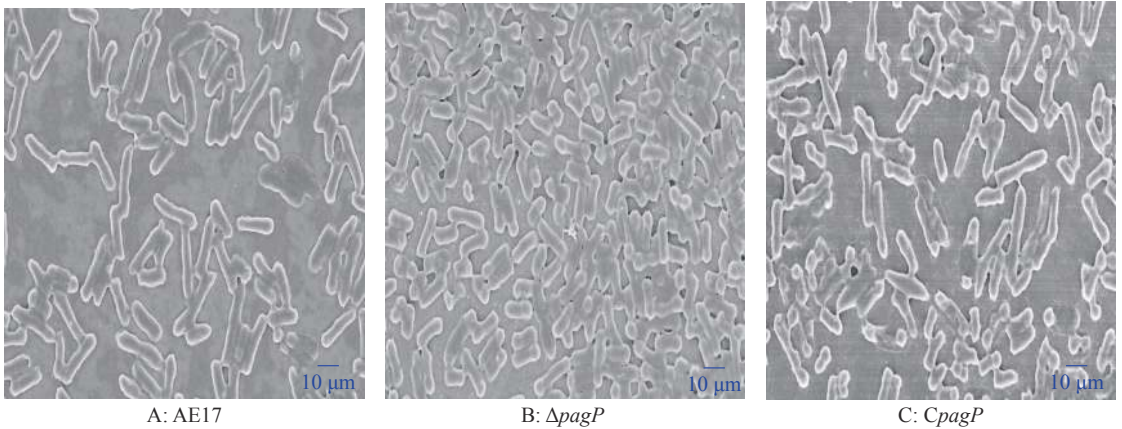


图 4 扫描电镜观察不同菌株生物被膜

Fig. 4 Scanning electron microscope observation of biofilms of different strains

3 讨论与结论

3.1 *pagP* 基因缺失对细菌抗生素敏感性的影响

研究表明, 敲除 LPS 合成过程中的某些重要基因, 会使得对应的突变株对抗生素的敏感性增强^[27]。Vuorio 等^[28-29] 对大肠埃希菌影响 LPS 结构的一些基因缺失的研究发现, 基因缺失后 LPS 含量显著降低, 使得细胞外膜这个天然屏障对抗生素的抵抗能力严重减弱, 从而细菌对抗生素的敏感性升高。细菌对某些抗生素和阳离子抗菌肽的敏感性会因为细菌 LPS 次级脂肪酸链的缺失而增强^[3, 9]。这一结论与本试验结果一致, 说明可能是由于 *pagP* 缺失, 使 *pagP* 介导的 LPS 中类脂 A 的脂肪酸链修饰功能不能发生, 脂肪酸链的数目发生变化, 从而影响大肠埃希菌的外膜通透性。

3.2 *pagP* 基因缺失对细菌疏水与自聚合能力的影响

不同的菌株在不同的生长条件下细菌外膜表

面疏水性对于生物被膜形成能力的影响是不同的^[9]。细菌的生理状态易受到外界环境温度的影响, 温度的高低会影响细胞代谢活动的强弱。因此, 为了研究细菌生理状态是否对菌株自聚合能力产生影响, 试验对不同培养温度条件下的菌株自聚合能力进行测定。试验结果表明 *pagP* 基因缺失对菌株的外膜疏水性无显著影响, 但却明显增强了其自聚合能力, 可能 *pagP* 基因缺失后菌株通过另外的途径来增强细菌之间的相互作用, 加速细菌的凝集。

3.3 *pagP* 基因缺失对细菌生物被膜形成的影响

细菌生物被膜是细菌的自我保护机制, 是细菌抵御外界环境胁迫而形成的, 细菌生物被膜的形成能力与外界环境条件的差异有关系。LPS 的结构与细菌生物被膜形成能力的强弱密切相关^[2, 7]。LPS 在细菌生物被膜形成过程中的作用在大肠埃希菌中已有报道^[30-31]。马鹏^[32] 的研究发现, 在 LPS 上不

同位点的磷酸基团的改变和脂肪酸链多糖链的改变会不同程度地影响大肠埃希菌的生物被膜形成能力,因此 LPS 结构与生物被膜的形成具有紧密的联系。宋祥军等^[24]通过结晶紫法检测发现 *pagP* 基因缺失 APEC 导致生物被膜形成能力增强,与本试验结果一致。生物被膜形成能力测定以及扫描电镜观察显示, *pagP* 缺失后的 APEC 生物被膜形成能力显著高于 AE17,与 MIC 试验以及菌株自聚合试验相联系, *pagP* 缺失细菌外膜通透性增加,自聚合能力增强,生物被膜形成能力增加,这与 Carty 等^[8]的研究类似,即细菌外膜通透性的增加会提高生物被膜的形成量。本试验对 *pagP* 缺失后细菌其他性能所受的影响还有待进一步研究。

细菌的鞭毛、菌毛和 LPS 等结构与细菌生物被膜的形成有关,包括 LPS 在内的多种细胞大分子影响了细胞外膜的疏水性和菌株自身凝集特性,细胞外膜的疏水性和菌株自身凝集特性与细菌生物被膜形成能力的强弱有关联。本研究发现 *pagP* 缺失使 APEC 的细菌外膜通透性增加,自聚合能力增强,生物被膜形成能力增加,从而使细菌的自我保护能力增强。我们研究了 *pagP* 基因缺失对细菌外膜特性的影响,为进一步研究 *pagP* 基因在禽致病性大肠埃希菌中的致病作用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] NIKAIIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(4): 593-656.
- [2] HUANG T P, SOMERS E B, WONG A C. Differential biofilm formation and motility associated with lipopoly saccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(8): 3116-3120.
- [3] 洪水根,汪德耀.膜分子生物学[M]. 基隆:水产出版社, 1997: 60-73.
- [4] COSTERTON J W, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL D E, et al. Microbial biofilms[J]. *Ann Rev Microbiol*, 1995, 49: 711-745.
- [5] BRABETZ W, MULLER-LOENNIES S, HOLST O, et al. Deletion of the heptosyltransferase genes *rfaC* and *rfaF* in *Escherichia coli* K-12 results in an Re-type lipopolysaccharide with a high degree of 2-aminoethanol phosphate substitution[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 247(2): 716-724.
- [6] KAROW M, GEORGOPOULOS C. Isolation and characterization of the *Escherichia coli msbB* gene, a multicopy suppressor of null mutations in the high-temperature requirement gene *htrB*[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(3): 702-710.
- [7] LAU P C Y, LINDHOUT T, BEVERIDGE T J, et al. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(21): 6618-6631.
- [8] CARTY S M, SREEKUMAR K R, RAETZ C R H. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12°C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(14): 9677-9685.
- [9] BROOKE J S, ALBERT V, WATTS P, et al. Mutation of a lipopolysaccharide synthesis gene results in increased biofilm of *Stenotrophomonas maltophilia*, on plastic and glass surfaces[J]. *Ann Microbiol*, 2008, 58(1): 35-40.
- [10] BERTRAND N, HOULE S, LEBIHAN G, et al. Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(12): 5324-5331.
- [11] BISHOP R E. The lipid A palmitoyltransferase *pagP*: Molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis[J]. *Mol Microbiol*, 2005, 57(4): 900-912.
- [12] BISHOP R E, GIBBONS H S, GUINA T, et al. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria[J]. *Embo Journal*, 2000, 19: 5071-5080.
- [13] RAETZ C R H, REYNOLDS C M, TRENT M S, et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 295-329.
- [14] PRESTON A, MAXIM E, TOLAND E, et al. *Bordetella bronchiseptica pagP* is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(3): 725-736.
- [15] GUO L, LIM K B, PODUJE C M, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides[J]. *Cell*, 1998, 95: 189-198.
- [16] PILIONE M R, PISHKO E J, PRESTON A, et al. *pagP* is required for resistance to antibody-mediated complement lysis during *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection[J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 2837-2842.
- [17] MUROI M, OHNISHI T, TANAMOTO K. MD-2, a novel accessory molecule is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A[J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 3546-3550.
- [18] TANAMOTO K, AZUMI S. *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells[J]. *J Immunol*, 2000, 164: 3149-3156.
- [19] KAWASAKI K, ERNST R K, MILLER S I. 3-O-Deacyl-

- ation of lipid A by *PagL*, a *PhoP/PhoQ*-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through toll-like receptor 4[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20044-20048.
- [20] BADER M W, SANOWAR S, DALEY M E, et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase[J]. *Cell*, 2005, 122: 461-472.
- [21] MURATA T, TSENG W, GUINA T, et al. *PhoP/Q*-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189: 7213-7222.
- [22] HITTLE L E, JONES J W, HAJJAR A M, et al. *Bordetella parapertussis pagP* mediates the addition of two palmitates to the lipopolysaccharide lipid A[J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(3): 572-580.
- [23] 邵颖, 涂健, 汪雪雁, 等. APEC 强毒力岛核心基因 *irp2*、*fyu A* 敲除对其致病性影响的研究[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(4): 564-570.
- [24] 宋祥军, 李春晓, 祁克宗, 等. *pagP* 基因对禽致病性大肠杆菌抗菌肽抗性和致病性的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 2888-2895.
- [25] 刘玉庆, 李璐璐, 骆延波, 等. EUCAST 欧盟药敏试验标准[M]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [26] 张箐, 赵俊杰, 李运喜, 等. 微量肉汤稀释法药敏试验的误差分析[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(11): 858-864.
- [27] VAARA M. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(11): 2255-2260.
- [28] VUORIO R, VAARA M. The lipid A biosynthesis mutation *lpx A2* of *Escherichia coli* results in drastic antibiotic supersusceptibility[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(4): 826-829.
- [29] VUORIO R, VAARA M. Mutants carrying conditionally lethal mutations in outer membrane genes *omsA* and *firA* (*ssc*) are phenotypically similar, and *omsA* is allelic to *firA*[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(22): 7090-7097.
- [30] AMINI S, GOODARZI H, TAVAZOIE S. Genetic dissection of an exogenously induced biofilm in laboratory and clinical isolates of *E. coli*[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(5): e1000432.
- [31] GENEVAUX P, BAUDA P, DUBOW M S, et al. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion[J]. *Arch Microbiol*, 1999, 172(1): 1-8.
- [32] 马鹏. 埃希氏大肠杆菌脂多糖与其细胞外膜特性关系的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.

【责任编辑 庄 延】