



## wzzE不影响禽致病性大肠杆菌雏鸭分离株LPS的表型

左佳坤<sup>1</sup>, 韩月<sup>1</sup>, 张宇曦<sup>1,2</sup>, 杨立军<sup>1,3</sup>, 徐达<sup>1,3</sup>, 王少辉<sup>1</sup>, 祁克宗<sup>2</sup>, 韩先干<sup>1\*</sup>,  
于圣青<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

<sup>2</sup> 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

<sup>3</sup> 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

**摘要:** 【目的】wzz参与很多革兰氏阴性菌O抗原的合成, 并对细菌的致病性具有调控作用。在禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)中, 存在Wzz蛋白超家族基因wzzE, 目前尚未开展该基因对APEC脂多糖(LPS)的合成及致病作用研究, 因此本研究开展了wzzE对APEC LPS合成以及生物学特性影响的研究。【方法】通过构建APEC DE17株的wzzE缺失株, 开展对野生型和缺失株的LD<sub>50</sub>、黏附与入侵DF-1细胞、脂多糖表型及内毒素毒价等相关生物学特性的影响研究。【结果】结果表明, 缺失wzzE的APEC, 不影响细菌的生长特性。野生型、缺失株及回复株的LPS表型无明显差异。DE17ΔwzzE与DE17的黏附与入侵结果无显著差异。血清型鉴定结果表明, 缺失wzzE, 不影响细菌的血清型。内毒素毒力检测结果DE17、DE17ΔwzzE及CΔwzzE内毒素的毒价一致, 为4×10<sup>5</sup> EU/mg。对7日龄樱桃谷鸭进行攻毒, 测定各菌株的LD<sub>50</sub>, 结果表明, 与野生型相比, DE17ΔwzzE缺失株毒力下降了10倍。【结论】wzzE缺失对LPS的表型无显著影响, 但wzzE参与APEC的致病过程, 然而wzzE对APEC毒力的调控机制仍有待进一步研究。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌, 脂多糖, wzzE

禽致病性大肠杆菌(Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC)为一类能引起禽类大肠杆菌病的革兰氏阴性菌, 是禽类最常见的传染病之一。APEC有多种血清型, 目前流行的优势血清型主要有O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>和O<sub>78</sub>等<sup>[1]</sup>。

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌外膜的重要组成部分, 对维持细菌的结构完整性具有重要作用。LPS包括3部分: 类脂A、核心多糖和O抗原<sup>[2]</sup>。在革兰氏阴性菌中, O抗原的化学组成和结构是决定细菌血清型的关键因素。

基金项目: 国家自然科学基金(31370045, 31372402, 31572523); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2015)第1-9号]

\*通信作者。韩先干, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com; 于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2015-10-12; 修回日期: 2016-01-19; 网络出版日期: 2016-02-02

O抗原具有保护细菌抵抗抗生素的杀菌和逃避宿主的防御等多种作用<sup>[3]</sup>。此外,研究表明O抗原在革兰氏阴性菌对宿主的致病过程中也发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。

在LPS合成过程中,有超过40种基因参与该过程的调控。O抗原合成是一个多酶参与的过程,包括用于O抗原侧链合成的聚合酶Wzy;将O抗原连接到类脂A的连接酶Waal以及O抗原翻转酶Wzx;O抗原的链长调节子Wzz等。此外,Wzz和Wzy可以协同调节O抗原侧链长度<sup>[7]</sup>。然而,wzz对APEC LPS合成的调控作用尚不清楚。此外,研究表明,wzz对细菌的致病性具有重要的调控作用,Gerald等发现沙门氏菌中存在2种功能性的wzz,对2种基因分别进行缺失,获得单基因缺失株,在小鼠感染模型试验中毒力下降不明显,而双缺失株毒力显著下降<sup>[8]</sup>。在APEC中,wzz是否具有相同的作用,目前未见相关研究。

本研究利用Red同源重组的方法构建了APEC DE17株的wzzE缺失株(WzzE属于Wzz超家族蛋白成员),对wzzE在APEC中脂多糖的合成过程的作用研究,并开展对野生株、wzzE突变株和回复株相关生物学特性研究,为研究wzzE在APEC中的作用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 DE17 $\Delta$ wzzE基因突变株、回复株的构建及PCR鉴定

菌株DE17为本实验室保存的1株APEC的临床分离株,来源于2008年安徽省的1只患病鸭<sup>[9]</sup>。依据Red同源重组原理并结合overlap PCR的方法,本实验室成功构建了DE17 $\Delta$ wzzE突变株<sup>[10]</sup>。

wzzE回复株构建方法如下:以野生型菌株DE17为模板,用Primer 5.0软件设计引物wzzE-CF/wzzE-CR,使用高保真Taq酶进行PCR扩增,扩

增的核酸片段包含wzzE的启动子,ORF及终止子序列,其中启动子的预测通过在线预测网站[http://fruitfly.org.9005/seq\\_tools/promoter.html](http://fruitfly.org.9005/seq_tools/promoter.html)。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收,酶切,同时对pSTV28质粒进行酶切,连接、转化后挑取疑似阳性克隆进行PCR鉴定并测序。将测序正确的回复质粒,电转化至DE17 $\Delta$ wzzE感受态中,构建wzzE突变株的回复株C $\Delta$ wzzE。

参照NCBI上公布的APEC O1 wzzE (CP000468.1)基因序列设计wzzE内侧鉴定引物wzzE-F1/wzzE-R1,对DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE进行PCR鉴定。

### 1.2 生长曲线的测定

DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE培养至对数中期后,调整 $OD_{600}=1.0$ ,按1:100的比例稀释接种于LB培养基中,37 °C振荡培养至平台期,期间每隔1 h取样测 $OD_{600}$ 值,记录并整理数据,绘制菌株DE17,DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE的生长曲线。

### 1.3 对DF-1细胞的黏附与入侵试验

参照文献[11]方法,DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE培养至对数中期后,以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100的剂量感染24孔培养板内的DF-1细胞,每组重复3孔。1000 $\times$ g低速离心10 min使细菌沉降,置于37 °C 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2 h。黏附组每孔加入0.5% Triton X-100 200  $\mu$ L,室温作用10 min裂解细胞,无菌PBS进行10倍稀释至合适梯度,平板计数法进行细菌计数。入侵组每孔加入1 mL 100  $\mu$ g/mL庆大霉素的DMEM,37 °C 5% CO<sub>2</sub>条件下作用1 h,同法用0.5% Triton X-100裂解细胞,进行细菌计数。

### 1.4 血清凝集反应

参照兔抗大肠杆菌O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>78</sub>免疫血清(Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark)说明书,用0.9% NaCl对O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>78</sub>标准血清进

表1. 本研究所用引物  
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp
wzzE-F1	GGTGGGCAATAGCAAAGC	543
wzzE-R1	CGCAAATAGCGATAGGTCTG	
wzzE-CF	CCGGAATTCCGCCATCCTGCCATACATC	1868
wzzE-CR	CGGGGTACCGCCCTTCCAGAATCCGAC	
wzzE-F	ATGACACAACCAATGCCTGGGAAAC	1047
wzzE-R	CTATTTTCGAGCAACGGCGGGTT	
wzzE-UF	ATGGCATTGATGGCTTGCTGGGCGG	962
wzzE-UR	GAACATTTCTCGCGTCGACCAAACCTTTATAGGCTTCGTC	
wzzE-DF	AAAGAGTTTGGTTCGACGCGAGAAATGTTCTGCTTGGG	805
wzzE-DR	TTTTGCCGGGAAGTTTCGGTTGGAG	
RT- <i>rfe</i> -F	GATAATCGCCATTCCGCTAA	238
RT- <i>rfe</i> -R	CAAAAAGAGCACCAGCATGA	
RT- <i>DnaE</i> -F	ATGTCGGAGGCGTAAGGCT	181
RT- <i>DnaE</i> -R	TCCAGGGCGTCAGTAAACAA	
RT- <i>rffE</i> -F	CAAACTTGCTGCGTGAAAA	176
RT- <i>rffE</i> -R	CCGGTCACCAGAATCATCTT	

行1: 8稀释, 取80  $\mu$ L O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>78</sub>标准血清与制备好的待检样本O抗原等量混合于微量反应板中反应, 以O抗原与0.9% NaCl混合物作为阴性对照。51 °C孵育过夜, 观察细菌凝集情况。

### 1.5 半数致死量(LD<sub>50</sub>)测定

将DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE培养至对数中期, 收集菌体, 以无菌PBS洗2次后重悬, 分光光度计测OD<sub>600</sub>值, 调整OD<sub>600</sub>至1.0, 采用10倍梯度稀释法, 分别将各菌液稀释成5 $\times$ 10<sup>7</sup>、5 $\times$ 10<sup>6</sup>、5 $\times$ 10<sup>5</sup>、5 $\times$ 10<sup>4</sup>、5 $\times$ 10<sup>3</sup> CFU/mL 5个稀释度, 腿部肌肉注射接种7日龄樱桃谷鸭, 每组8只, 每只0.2 mL。攻毒后观察记录1周内鸭子的发病死亡情况, 采用改良寇氏法计算DE17, DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE的LD<sub>50</sub>。

### 1.6 LPS 提取, 银染

LPS提取方法参照文献[12], 采用改进的热酚

水法对DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及 $\Delta$ wzzE进行脂多糖提取, 收集上述细菌培养物, 10000 $\times$ g离心5 min, PBS洗2次后, 以10 mL PBS将其重悬后, 并置于冰上超声10 min后, 加入蛋白酶K、DNase及RNase作用后。再加入等量预热的90%的苯酚到细胞悬液中, 65–70 °C振荡作用15 min后, 再冰浴10 min后, 8500 $\times$ g离心15 min萃取上清, 重复2–3次。以10倍体积的95%乙醇和终浓度为0.5 mol/L的醋酸钠与上清混合, –20 °C过夜沉淀LPS后。再2000 $\times$ g离心10 min后, 取沉淀, 用双蒸水重悬后使用透析袋透析至苯酚被完全除去, 最后将纯化的LPS冻干, 室温保存。

双蒸水溶解提取的DE17、DE17 $\Delta$ wzzE及C $\Delta$ wzzE脂多糖样品, 调整浓度为1 mg/mL, 100 °C煮沸10 min, 进行SDS-PAGE电泳, 上样量为20  $\mu$ g/泳道。分别对两块胶进行考染和银染, 分析提取的LPS的表型差异。

### 1.7 *wzzE* 缺失后对其上下游基因转录水平影响

对NCBI上公布的APEC O1基因组序列分析表明, *wzzE*上下游基因分别是*rfe*和*rffE*, 依据*rfe*和*rffE*序列, 分别设计荧光定量PCR引物RT-*rfe*-F/RT-*rfe*-R和RT-*rffE*-F/RT-*rffE*-R, 进行Real-time PCR, 选择*DnaE*作为内参基因, 荧光定量的具体操作方法参照文献[13-14], 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak)法, 研究*wzzE*缺失后, 对上下游基因转录水平的影响。

### 1.8 内毒素毒力的检测

运用凝胶法用鲎试剂检测DE17和DE17 $\Delta$ *wzzE*内毒素毒价, 试剂盒G2250-5购自科德角国际生物医学科技(北京)有限公司。参照说明书, 无菌称取DE17和DE17 $\Delta$ *wzzE*脂多糖1 mg, 并稀释到合适的梯度, 取100  $\mu$ L与等量鲎试剂加入反应管内, 37  $^{\circ}$ C反应(60 $\pm$ 2) min, 观察凝胶形成情况。同时设置大肠杆菌内毒素标准品作为阳性对照, 不含内毒素的水作为阴性对照。

## 2 结果和分析

### 2.1 *wzzE* 缺失株的鉴定及回复株的构建

运用引物*wzzE*-F1/*wzzE*-R1对DE17及其*wzzE*基因缺失株和互补株进行PCR鉴定, 结果(图1)表明, 野生型(泳道1)和回复株(泳道3)可以扩增到500 bp左右的条带, 与预期结果一致, 而缺失株(泳道2)不能扩增到相应条带, 表明DE17的*wzzE*缺失株和回复株构建成功。

### 2.2 缺失 *wzzE* 并不影响细菌的生长特性

对DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE*及C $\Delta$ *wzzE*生长曲线(图2)检测结果表明, 3株菌的生长趋势基本保持一致, 无明显差异, 表明缺失*wzzE*并不影响细菌的生长特性。

### 2.3 对 DF-1 细胞的黏附与入侵

实验结果(图3和图4)表明, DE17、

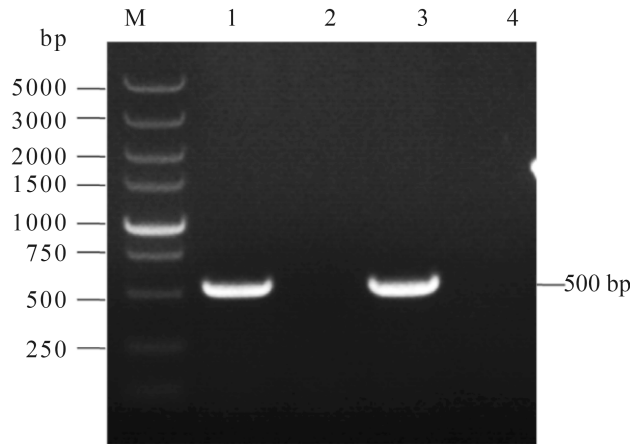


图1. DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE*和C $\Delta$ *wzzE*的PCR鉴定

Figure 1. Identification of the strains of DE17, DE17 $\Delta$ *wzzE* and C $\Delta$ *wzzE* by PCR. M: DL5000 DNA molecular; lane 1: the wild type DE17 strain; lane 2: the DE17 $\Delta$ *wzzE* strain without chloromycetin-resistant clones; lane 3: C $\Delta$ *wzzE* strain; lane 4: negative control.

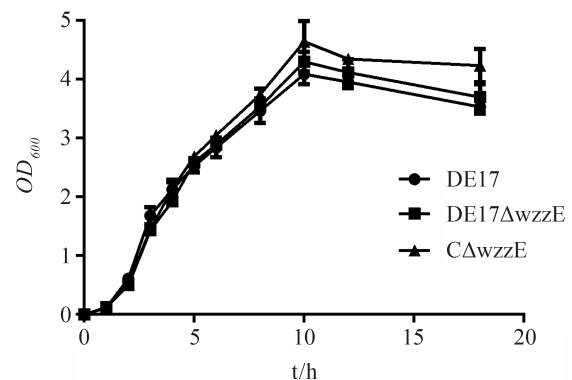


图2. DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE*和C $\Delta$ *wzzE*的生长曲线

Figure 2. The growth curve of the strains of DE17, DE17 $\Delta$ *wzzE* and C $\Delta$ *wzzE*.

DE17 $\Delta$ *wzzE*和C $\Delta$ *wzzE*对鸡胚成纤维细胞DF-1的黏附、入侵能力无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.4 血清凝集反应

对DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE*和C $\Delta$ *wzzE*血清凝集反应鉴定结果表明, *wzzE*缺失株与野生型菌株DE17的血清凝集结果一致, 与O<sub>2</sub>血清反应, 而不与O<sub>1</sub>、O<sub>78</sub>血清不反应, 为O<sub>2</sub>血清型。

### 2.5 LD<sub>50</sub>测定

对DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE*及C $\Delta$ *wzzE*的LD<sub>50</sub>检测

结果(表2)表明,  $LD_{50}$ 值分别为  $5.62 \times 10^4$ 、 $5.62 \times 10^5$ 和 $1.33 \times 10^5$  CFU, 与野生型相比, *wzzE*缺失株毒力下降了约10倍,  $C\Delta wzzE$ 毒力也部分回复。

### 2.6 LPS 鉴定

对提取的DE17、DE17 $\Delta wzzE$ 和 $C\Delta wzzE$ 的LPS进行SDS-PAGE后, 考染其中一块胶, 脱色无

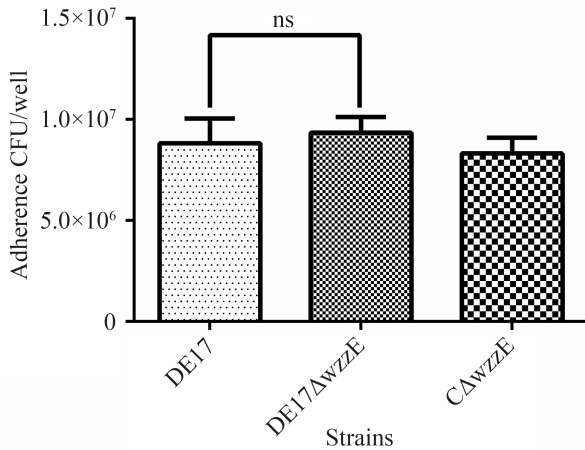


图 3. DE17、DE17 $\Delta wzzE$ 及 $C\Delta wzzE$ 对DF-1细胞的黏附结果

Figure 3. Results of the strains of DE17, DE17 $\Delta wzzE$  and  $C\Delta wzzE$  adherence to DF-1.  $P > 0.05$ .

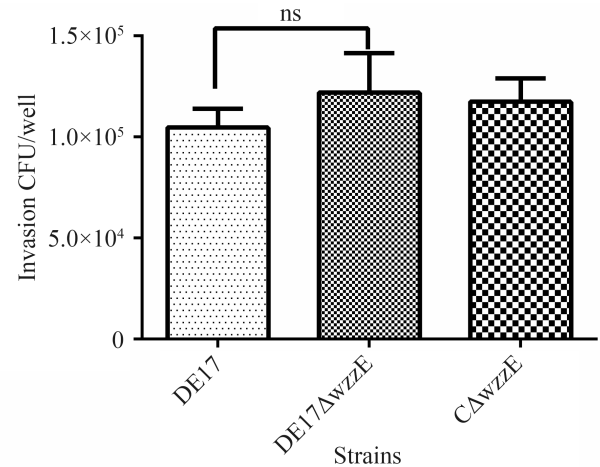


图 4. DE17、DE17 $\Delta wzzE$ 及 $C\Delta wzzE$ 对DF-1入侵的结果

Figure 4. The results of the strains of DE17, DE17 $\Delta wzzE$  and  $C\Delta wzzE$  invasion to DF-1.  $P > 0.05$ .

表2. DE17、DE17 $\Delta wzzE$ 和 $C\Delta wzzE$ 的 $LD_{50}$ 测定结果

Table 2. The  $LD_{50}$  of the strains of DE17, DE17 $\Delta wzzE$  and  $C\Delta wzzE$

APEC strains	Challenge dosage	No. of ducks	Mortality	Living No.	Mortality rate	$LD_{50}$ (CFU)
DE17	$10^7$	8	8	0	100.0	$5.62 \times 10^4$
	$10^6$	8	7	1	87.5	
	$10^5$	8	5	3	62.5	
	$10^4$	8	2	6	25.0	
	$10^3$	8	0	8	0	
DE17 $\Delta wzzE$	$10^7$	8	8	0	100.0	$5.62 \times 10^5$
	$10^6$	8	5	3	62.5	
	$10^5$	8	1	7	12.5	
	$10^4$	8	0	8	0	
	$10^3$	8	0	8	0	
$C\Delta wzzE$	$10^7$	8	8	0	100.0	$1.33 \times 10^5$
	$10^6$	8	7	1	87.5	
	$10^5$	8	3	5	37.5	
	$10^4$	8	1	7	12.5	
	$10^3$	8	0	8	0	

条带,说明提取的脂多糖没有蛋白的污染。对其中的一块胶进行银染,结果如图5所示,野生型、突变株及回复株的脂多糖表型基本一致,表明 *wzzE* 缺失对LPS的表型无显著影响。

### 2.7 *wzzE* 缺失后对其上下游基因转录水平的影响

运用荧光定量PCR技术,分别检测了野生型 DE17 和缺失株 DE17 $\Delta$ *wzzE* 的 *rfe* 和 *rffE* 的转录水平,结果表明,缺失 *wzzE* 对上游基因 *rfe* 的转录水平无显著影响 ( $P > 0.05$ ),但显著降低下游基因 *rffE* 转录 ( $P < 0.01$ ),其转录水平约为野生型的 53%(图6)。

### 2.8 内毒素毒力的计算

将浓度为 1 mg/mL 的 DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE* 及 C $\Delta$ *wzzE* 脂多糖稀释  $1.6 \times 10^6$  倍时,恰好为鲎试剂反应检测的  $\lambda$  值,  $\lambda = 0.25$  EU。 $\lambda$  值乘以稀释倍数为

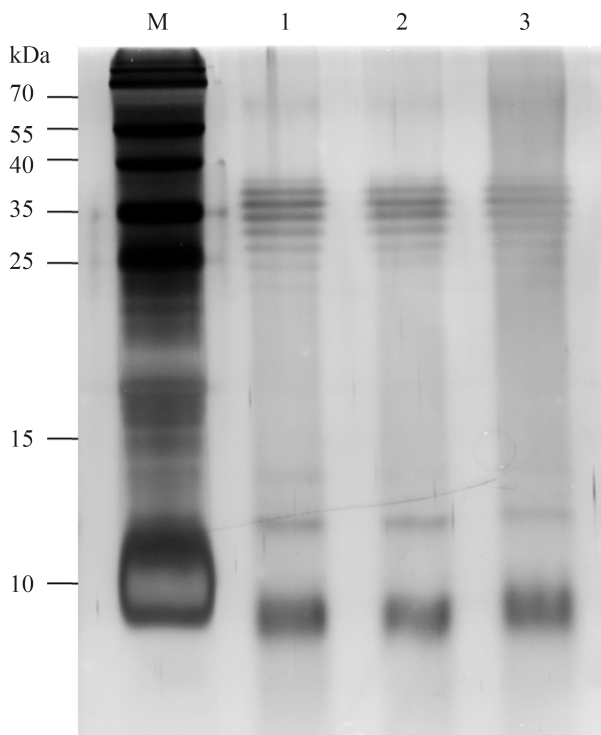


图 5. LPS 银染结果

Figure 5. Identification of LPS characteristics of DE17, DE17 $\Delta$ *wzzE* and C $\Delta$ *wzzE* by silver staining. lane 1: the wide type DE17 strain; lane 2: the DE17 $\Delta$ *wzzE* strain; lane 3: C $\Delta$ *wzzE* strain.

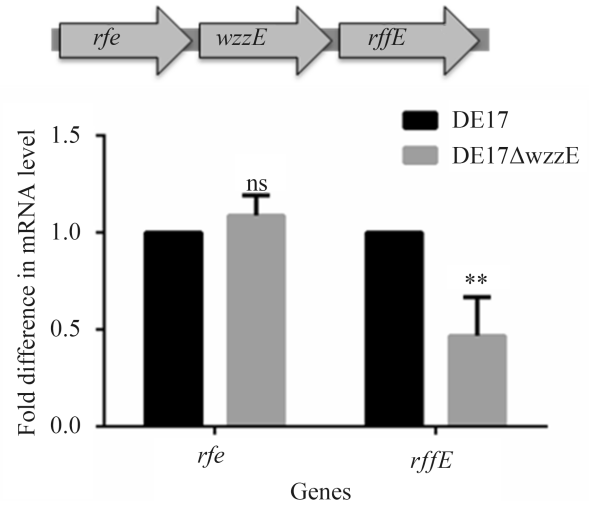


图 6. DE17 和 DE17 $\Delta$ *wzzE* 中 *wzzE* 上下游基因转录水平的比较

Figure 6. The changes of transcriptional level of *rfe* and *rffE* in DE17 and DE17 $\Delta$ *wzzE*. \*\* $P < 0.01$ .

内毒素的毒价,检测结果表明 DE17、DE17 $\Delta$ *wzzE* 及 C $\Delta$ *wzzE* 内毒素的毒价一致,为  $4 \times 10^5$  EU/mg。

## 3 讨论

在很多革兰氏阴性杆菌中,包括大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌及牙龈卟啉单胞菌等, *wzz* 都编码了 O 抗原链长调节子,调节 O 抗原链长的分布<sup>[8,15-16]</sup>。Wzz 调节 O 抗原链长分布的机制尚不完全清楚,目前猜测的 Wzz 调节模式有 2 种:一种模式是 Wzz 蛋白作为 Wzy 聚合酶的分子定时器,通过将 O 多糖转移给 WaaL 连接酶决定了 Wzz 聚合作用的开始或终止;另一种模式, Wzz 作用相当于一种分子伴侣,能够招募蛋白复合体,包含 Wzy 和 WaaL 等 O 抗原连接酶和初始的多聚糖链<sup>[15]</sup>。然而目前 Wzz 在禽致病性大肠杆菌中对 O 抗原合成的机制尚不清楚,需要进一步的研究。

Wzz 作为链长调节子, *wzz* 缺失后,能引起 LPS 表型发生变化,通过银染试验可以清晰看到规律的梯状分布<sup>[17]</sup>。例如在大肠杆菌 O157 中,

*wzz*缺失后, O抗原相较于野生型侧链缺失<sup>[7]</sup>。在鼠伤寒沙门氏菌中, 对*wzz<sub>fepe</sub>*进行了功能鉴定, 发现缺失株的LPS表型同样发生变化, *wzz<sub>fepe</sub>*调控了长侧链的合成<sup>[8]</sup>。本研究运用热酚水法提取LPS后, 对LPS的表型检测结果表明, *wzzE*缺失后, 突变株与野生型表型一致, 这与上述报道相反, 因此推测在DE17中, *wzzE*突变后, 可能不影响LPS的完整性, *wzzE*可能不参与LPS长侧链的合成, 这可能与菌株的特异性相关。此外, O抗原合成基因缺失, 有可能造成血清型的变化, 本实验室前期研究结果表明, DE17的脂多糖合成基因*waaL*缺失后, 血清型发生了改变, 本研究中DE17Δ*wzz*血清型与野生型一致, 这与在DE17中*wzzE*不影响脂多糖表型的推测是相符的。

细菌感染宿主的第一步就是粘附与入侵。O抗原的完整性往往能够影响到细菌对宿主的粘附与入侵能力, 本研究中, *wzzE*缺失后对DF-1细胞的黏附与入侵能力无显著影响( $P>0.05$ ), 进一步佐证了对LPS银染结果的推测, 即在DE17中*wzzE*缺失不影响LPS的表型。

O抗原因其为引起宿主免疫反应的主要抗原之一, 具有免疫保护性及交叉保护性, 日益引起人们的关注<sup>[18]</sup>。O抗原发生变异后, 有可能造成血清型变化, 引起交叉反应。本研究中血清凝集反应结果表明缺失株同野生株及回复株血清型一致, 说明*wzzE*的突变有可能不影响LPS的完整性。

革兰氏阴性菌内毒素主要与LPS的类脂A有关, 对野生株, *wzzE*缺失株及回复株内毒素毒力的检测结果表明, *wzzE*与LPS类脂A的合成并无直接或间接联系。

研究表明, 作为LPS主要成分之一, O抗原侧链的变化会影响LPS的表型, 进而影响细菌的致病性。本实验室前期研究结果表明, 由于*waaL*的缺失, 导致APEC的LPS表型发生变化, 毒力下降了42.2倍<sup>[6]</sup>。而本研究中, *wzzE*的缺失对APEC的

LPS表型并没有显著影响, 对LD<sub>50</sub>的检测结果表明, DE17Δ*wzzE*毒力下降了10倍, 因此从致病力角度推测, 由于*wzzE*的缺失并不能显著影响LPS的表型, 因此与缺失*waaL*相比, 其减毒能力降低, 但具体机制仍有待进一步研究。

在本研究中, 荧光定量PCR检测结果表明, *wzzE*缺失后上游基因*rfe*转录不受影响, 而下游基因*rffE*转录显著降低( $P<0.01$ )。 *rffE*编码尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺-2-异构酶(UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase), 在细菌中能够合成细胞表面的各种多糖。*rffE*的转录水平降低可能导致表面包括脂多糖在内的多糖合成受限。但在本研究中, 虽然*wzzE*缺失导致*rffE*转录水平降低, 但并不影响缺失株的LPS表型、生长特性、凝集反应性、对宿主细胞的黏附和入侵等特性, 因此, APEC毒力降低是否与*rffE*的转录水平降低有关, 仍需开展进一步的研究。

本研究表明*wzzE*在APEC中对LPS表型无明显影响, 但能降低APEC的致病性, 具体机制仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Ewers C, Janssen T, Wieler LH. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2003, 116(9/10): 381–395.
- [2] Paramonov N, Bailey D, Rangarajan M, Hashim A, Kelly G, Curtis MA, Hounsell EF. Structural analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* strain W50. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(17): 4698–4707.
- [3] Whitfield C, Valvano MA. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1993, 35: 135–246.
- [4] Youn M, Lee KM, Kim SH, Lim J, Yoon JW, Park S. *Escherichia coli* O157: H7 LPS O-side chains and pO157 are required for killing *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 436(3): 388–393.

- [ 5 ] Abeyrathne PD, Daniels C, Poon KKH, Mawish MJ, Lam JS. Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(9): 3002–3012.
- [ 6 ] Han Y, Han XG, Wang SH, Meng QM, Zhang YX, Ding C, Yu SQ. The *waaL* gene is involved in lipopolysaccharide synthesis and plays a role on the bacterial pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(3/4): 486–491.
- [ 7 ] Osawa K, Shigemura K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T. Modulation of O-antigen chain length by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influences its sensitivities to serum complement. *Microbiology and Immunology*, 2013, 57(9): 616–623.
- [ 8 ] Murray GL, Attridge SR, Morona R. Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(5): 1395–1406.
- [ 9 ] Chen WJ, Han XG, He L, Hu QH, Yu QS. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2010, 18(2): 34–40. (in Chinese)  
陈文静, 韩先干, 何亮, 胡青海, 于圣青. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(2): 34–40.
- [10] 韩月. 禽致病性大肠杆菌脂多糖突变株的构建及其生物学特性研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2014.
- [11] Wang SH, Niu CL, Shi ZY, Xia YJ, Yaqoob M, Dai JJ, Lu CP. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1): 279–287.
- [12] Rezaei S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, Masjedani F, Zarnani AH. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2011, 3(1): 3–9.
- [13] Han XG, Bai H, Liu L, Dong HL, Liu R, Song J, Ding C, Qi KZ, Liu HW, Yu SQ. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55: 21–27.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [15] Marolda CL, Haggerty ER, Lung M, Valvano MA. Functional analysis of predicted coiled-coil regions in the *Escherichia coli* K-12 O-antigen polysaccharide chain length determinant Wzz. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(6): 2128–2137.
- [16] Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-Opoku J, Abiko Y, Curtis MA, Nakayama K. Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology Open*, 2013, 2(3): 383–401.
- [17] Han DL, Ma ZR, Chen M. Regulation of the O-antigen polysaccharide chain length by Wzz-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(9): 971–976. (in Chinese)  
韩东雷, 马中瑞, 陈敏. Wzz酶对O抗原糖链聚合度的调控. *微生物学报*, 2014, 54(9): 971–976.
- [18] Yao YH. The research progress of avian colibacillosis. *Animal Science & Veterinary Medicine*, 2004, 21(4): 58–59. (in Chinese)  
姚永华. 禽大肠杆菌病的研究进展. *动物科学与动物医学*, 2004, 21(4): 58–59.



## **wzzE does not affect lipopolysaccharide phenotype of avian pathogenic *Escherichia coli* from clinical ducking**

Jiakun Zuo<sup>1</sup>, Yue Han<sup>1</sup>, Yuxi Zhang<sup>1,2</sup>, Lijun Yang<sup>1,3</sup>, Da Xu<sup>1,3</sup>, Shaohui Wang<sup>1</sup>, Kezong Qi<sup>2</sup>, Xiangan Han<sup>1\*</sup>, Shengqing Yu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China

<sup>2</sup> College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

<sup>3</sup> College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] *wzz* is involved in the synthesis of O antigen and plays a role in virulence in many gram-negative bacteria. However, the function of *wzzE* in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is unclear. The aim of this study is to elucidate the role of *wzzE* in the synthesis of LPS and virulence. [Methods] Mutant strain with *wzzE* deletion was constructed. Biological characteristics of the wild and mutant strains, such as  $LD_{50}$ , adherence and invasion to DF-1 cells, phenotype of LPS and endotoxin titer, were detected. [Results] There was no significant difference in growth, adherence and invasion to DF-1 cells, serotype and the endotoxin titer between the wild strain and the mutant. However, compared with the wild-type strain, the virulence of DE17 $\Delta$ *wzzE* had dropped by 10 times. [Conclusion] *wzzE* is not involved in the synthesis of LPS in DE17, but participates in the pathogenic process of APEC. However, the mechanism of *wzzE* in APEC virulence needs to be studied in the future.

**Keywords:** avian pathogenic *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, *wzzE*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370045, 31372402, 31572523) and by the Shanghai Key Project on Agricultural Development through Science and Technology (2015HNG1-9)

\*Corresponding author. Xiangan Han, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com; Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 12 October 2015; Revised: 19 January 2016; Published online: 2 February 2016