



CD630_27900 基因缺失显著降低艰难拟梭菌自溶速率、毒力及对酸和抗生素的耐受性

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

- 1 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
- 2 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
- 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

杨君仪, 鲍江舰, 邵瑞瑞, 张婷, 廖健, 程玉梅, 官志忠, 齐晓岚, 陈峥宏, 崔古贞, 洪伟. CD630_27900 基因缺失显著降低艰难拟梭菌自溶速率、毒力、及对酸和抗生素的耐受性[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2440-2455.

YANG Junyi, BAO Jiangjian, SHAO Ruirui, ZHANG Ting, LIAO Jian, CHENG Yumei, GUAN Zhizhong, QI Xiaolan, CHEN Zhenghong, CUI Guzhen, HONG Wei. CD630_27900 gene deletion significantly reduces autolysis rate and virulence of *Clostridioides difficile* and the tolerance to acids and antibiotics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2440-2455.

摘要: 艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*) CD630_27900 基因位于 *slpA-cwp66* 基因座上, CD630_27900 基因属于假定的 Lmbe 家族的酶, 但基因功能尚未明确。【目的】本研究通过构建艰难拟梭菌 CD630_27900 基因敲除菌株, 比较野生型菌株(CD630)与突变株表型差异, 探讨 CD630_27900 基因对艰难拟梭菌感染的影响。【方法】用非等长同源臂偶联等位交换 (allele-coupled exchange, ACE) 构建 CD630_27900 基因缺失菌株与回补菌株。比较它们在生长曲线、自溶素(*cwp19, Acd*)基因表达、细胞毒力、主要毒素基因表达、抗生素及 pH 敏感性差异, 以研究 CD630_27900 基因的功能。【结果】成功构建 Δ CD630_27900 突变菌株和 ::CD630_27900 回补菌株。菌株 Δ CD630_27900 在衰亡期自溶速率显著低于菌株

资助项目: 国家自然科学基金(32170134, 32160015, U1812403); 贵州省省级科技计划([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 Science and Technology Projects ([2020]1Z067, [2019]1441), and the Excellent Young Talents Plan of Guizhou Medical University ((2022)101).

*Corresponding authors. HONG Wei, Tel/Fax: +86-851-86752814, E-mail: hongwei@gmc.edu.cn;

CUI Guzhen, E-mail: cuigz@gmc.edu.cn

Received: 2022-09-26; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-02-13

CD630, ::CD630_27900 自溶速率恢复。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)结果显示, 缺失 CD630_27900 基因, 自溶素 *cwp19*、*Acd* 基因表达量降低, ::CD630_27900 自溶素基因表达增强。相较于 CD630, Δ CD630_27900 菌株细胞毒力、毒素基因 *tcdA*、*tcdB* 表达量降低。相较于 CD630, Δ CD630_27900 对氨苄青霉素、甲硝唑、阿莫西林、万古霉素、诺氟沙星、头孢西丁、卡那霉素更加敏感, ::CD630_27900 对以上抗生素敏感性恢复。此外, Δ CD630_27900 对酸比 CD630 敏感, 对碱敏感性未发生变化。::CD630_27900 对酸敏感性恢复至野生型水平。【结论】敲除 CD630_27900 基因, 艰难拟梭菌自溶速率变慢、自溶素 *cwp19*、*Acd* 基因表达量降低、细胞毒力、毒素基因 *tcdA* 和 *tcdB* 降低, 说明 CD630_27900 基因影响菌株自溶以及毒力释放。菌株 Δ CD630_27900 对临床上常见的抗生素及酸性环境更加敏感, 且这些变化均可通过基因回补恢复。提示该基因可作为联合抗生素治疗艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)的潜在靶点。

关键词: 艰难拟梭菌; CD630_27900 基因; 肽聚糖脱乙酰化; 非等长同源臂偶联等位交换; 突变表型

CD630_27900 gene deletion significantly reduces autolysis rate and virulence of *Clostridioides difficile* and the tolerance to acids and antibiotics

YANG Junyi¹, BAO Jiangjian^{1,2}, SHAO Ruirui¹, ZHANG Ting¹, LIAO Jian⁴, CHENG Yumei⁵, GUAN Zhizhong¹, QI Xiaolan^{1,3}, CHEN Zhenghong², CUI Guzhen^{2*}, HONG Wei^{1,3*}

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

2 Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, 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 College of Stomatology/Stomatological Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China

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

Abstract: The function of CD630_27900 gene at the *slpA-cwp66* locus of *Clostridioides difficile* is still unclear. The encoded enzyme is putatively regarded as a member of Lmbe family.

[Objective] To construct CD630_27900 gene-deleted mutant, compare the phenotypes of the wild-type strain (CD630) and the mutant, and discuss the effect of CD630_27900 gene on the infection of *C. difficile*. **[Methods]** The CD630_27900-deleted mutant and the complementary strain were constructed by allele-coupled exchange (ACE). The growth curves, expression of autolysin genes (*cwp19*, *Acd*), cytotoxicity, expression of major toxin genes, and sensitivity to antibiotics and pH were compared among the three strains. **[Results]** The mutant strain Δ CD630_27900 and the complementary strain ::CD630_27900 were successfully constructed. At the decline phase, the autolysis rate of Δ CD630_27900 was significantly lower than that of

CD630, and the autolysis rate of Δ CD630_27900 was restored. The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) results showed that the expression of *cwp19* and *Acd* was decreased in Δ CD630_27900 and increased in Δ CD630_27900 compared with that in the wild type. The cytotoxicity assay showed that the cytotoxicity of Δ CD630_27900 was significantly reduced compared with that of CD630 and the complementary strain, which is consistent with reduced expression levels of the toxin genes *tcdA* and *tcdB*. Furthermore, Δ CD630_27900 showed significantly stronger sensitivity to ampicillin, metronidazole, amoxicillin, vancomycin, norfloxacin, cefoxitin, and kanamycin than CD630 and Δ CD630_27900. Strain Δ CD630_27900 was more sensitive to acid than strain CD630 and Δ CD630_27900. However, the sensitivity of Δ CD630_27900 to the alkaline environment was comparable to that of CD630. **[Conclusion]** Upon the deletion of CD630_27900 gene, *C. difficile* demonstrated slow autolysis, low expression of autolysis genes *cwp19* and *Acd*, low cytotoxicity, and low expression of toxin genes *tcdA* and *tcdB*. Thus, CD630_27900 may influence the autolysis and virulence of *C. difficile*. Δ CD630_27900 was more sensitive to the antibiotics commonly used in clinical settings than the wild type. These changes were reversed after the complementation of the gene. Thus, CD630_27900 can be a potential target in the treatment of *C. difficile* infection (CDI) with antibiotics.

Keywords: *Clostridioes difficile*; CD630_27900 gene; peptidoglycan deacetylation; allele-coupled exchange (ACE); phenotypes of mutants

艰难拟梭菌(*Clostridioes difficile*)是一种专性厌氧、产芽孢的革兰氏阳性杆菌。它广泛分布于人和动物的肠道内,通过粪-口途径传播,属于条件致病菌^[1]。大量使用抗生素引起的肠道菌群失调是艰难拟梭菌感染(*C. difficile* infection, CDI)发生的主要原因。临床上 CDI 可分为从轻度腹泻到严重危及生命的并发症,比如伪膜性结肠炎、肠道穿孔以及中毒性巨结肠等^[2-3]。艰难拟梭菌的致病能力依赖于外毒素 A (toxin A, TcdA)和外毒素 B (toxin B, TcdB),它们分别为肠毒素和细胞毒素。艰难拟梭菌在肠道定殖后,向胞外释放的 TcdA 和 TcdB 会透过细胞壁作用于肠上皮细胞,造成肠细胞骨架的缺失与肠上皮屏障的破坏,进而引发相关症状^[4]。艰难拟梭菌因具有耐药性的特点,给 CDI 的治疗带来了巨大挑战^[5]。早在 2011 年, CDI 就已困扰着美国医疗系统^[6],近年来,由于抗菌药物的大量使用,导致多重耐药艰难拟梭菌的出现,国内 CDI 发

病率呈不断上升趋势^[7-8]。艰难拟梭菌 S 层构成细菌的最外层,影响着艰难拟梭菌在肠道中的黏附、定殖以及毒素释放,对艰难拟梭菌致病能力有重要贡献^[9-10]。

艰难拟梭菌 S 层由细胞壁蛋白 SlpA 的大小亚基以及其他 30 多种细胞壁蛋白组成,覆盖在细菌的表面,帮助细菌抵御外部不利的生存环境^[11-12]。在 S 层中存在一个高度可变的 *slpA-cwp66* 基因座^[13],包含 *slpA*、*secA2*、*cwp2*、CD630_27900 和 *cwp66* 共 5 个基因,其中 *slpA*、*secA2*、*cwp2* 和 *cwp66* 负责编码 S 层主要结构、转位酶以及黏附因子^[14-15]。Calabi 等^[16]认为 *slpA-cwp66* 基因座上每个非细胞壁蛋白(*cwp*)基因都可能参与细胞壁的合成。在 Bradshaw 等^[17]的报道中,CD630_27900 基因属于假定的 LmbE 家族的酶,该酶的特征是能水解 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, N-GlcNAc)中的乙酰基团。N-GlcNAc 是组成细胞壁肽聚糖结构的基本

单位之一,许多 LmbE 样蛋白已证明具有细胞壁相关功能,且 LmbE 家族的酶是开发治疗各种细菌药物的靶标^[18-19]。CD630_27900 基因在艰难拟梭菌中的功能目前尚未阐明,因此,本研究拟通过基因编辑方法敲除艰难拟梭菌的 CD630_27900 基因,比较野生型菌株与突变株表型差异,研究该基因在艰难拟梭菌中的功能,为治疗 CDI 寻找潜在靶点。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株及培养条件

脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基:脑心浸出粉 38.5 g/L、酵母提取物(yeast extract) 5 g/L。LB (Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胍(tryptone) 10 g/L、氯化钠(NaCl) 10 g/L、酵母提取物 5 g/L。甲硝唑(metronidazole)、万古霉素(vancomycin)、阿莫西林(amoxicillin)、卡那霉素(kanamycin)、头孢西丁(cefepime)、诺氟沙星(norfloxacin)、氯霉素(chloramphenicol)、氨苄青霉素(ampicillin)、D-环丝氨酸(D-cycloserine)、甲砜霉素(thiamphenicol)等购自北京索莱宝科技有限公司(Solarbio);限制性内切酶 *Xho* I (R0146V)、*Not* I-HF (R3189S)、*Hind* III (R0104V)购于 New England BioLabs; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、ClonExpressMultis One Step Cloning 试剂盒购自于诺维赞生物科技有限公司,所有引物合成以及测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。艰难拟梭菌 CD630 购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),大肠杆菌(*Escherichia coli*) CA434 菌株由本实验室保存,大肠杆菌 NEBExpress 购自 NEB 公司。艰难拟梭菌 CD630 在 BHI 培养基、厌氧环境下,37 °C 培养。大肠杆菌在 LB 培养基中,37 °C 培养。

1.2 质粒构建

本研究所用质粒及引物见表 1^[20]。

1.2.1 CD630_27900 基因敲除质粒的构建

为了获得 CD630_27900 基因缺陷菌株,首先需构建打靶质粒。该质粒构建要在 pMTL82151 载体上插入 2 个目的片段。第一个片段为带有启动子的 *pyrF* 同源基因,第二个目的片段是 CD630_27900 基因的同源臂。其中含启动子的 *pyrF* 同源基因片段插入 pMTL82151,获得重组质粒 pMTL-BY 的工作由课题组前期完成^[21]。因此,只需在 pMTL-BY 质粒中插入 CD630_27900 基因同源臂即可获得 CD630_27900 基因打靶质粒,构建过程如下:以 CD630 基因组为模板,分别 PCR 扩增 CD630_27900 基因的上下游同源臂,通过重叠 PCR 获得完整同源臂 CD630_27900-arm 片段,琼脂糖凝胶电泳后进行片段回收,用 ClonExpressMultis One Step Cloning 组装试剂盒将 CD630_27900-arm 片段与 *Not* I-HF 线性化的 pMTL-BY 载体连接,获得重组体系后转化 NEBExpress 感受态细胞,待筛选平板有菌落形成,在含 10 μg/mL 氯霉素的 LB 固体平板上进行菌落 PCR 筛选转化子,把鉴定为阳性的转化子转接至 10 μg/mL 的 LB 液体培养基内增菌,最后使用质粒提取试剂盒提取质粒,获得 CD630_27900 基因敲除质粒 pYJY1。

1.2.2 *pyrF*及 CD630_27900 基因回补质粒的构建

用引物对 primer1/primer4、HW818/HW819 从艰难拟梭菌 CD630 上分别扩增 *pyrF*、CD630_27900 基因。*Hind* III 线性化 pMTL82151 载体后与 *pyrF* 基因连接,转化感受态细胞,经筛选得到重组子 pYJY2-S,用限制性内切酶 *Xho*I 酶切 pYJY2-S 载体,CD630_27900 基因与其相连接,转化后筛选获得 *pyrF*、CD630_27900 双回补载体 pYJY2。

表 1 质粒与引物

Table 1 Plasmids and primers

Name	Sequences (5'→3') and features	Source
pMTL82151	pBP1 ori, ColE1 ori, CmR, TraJ, <i>lacZα</i> fragment	Literature ^[20]
pYJY1	Deletion of CD630_27900 gene, including upstream and downstream homologous arms of CD630_27900, derived from pMTL82151	This work
pYJY2-S	Derived from pMTL82151, for complement for CD630_27900 <i>pyrF</i> gene, containing <i>pyrF</i> gene and a promoter	This work
pYJY2	Derived from pYJY2-S, for complement for CD630_27900 gene, containing CD630_27900 gene and a promoter	This work
HW681	ATCAGGAAACAGCTATGACCG	This work
HW682	GTTTTCCAGTCACGACGTT	This work
HW709	AAACAGCTATGACCGCGCCAAAAGAGATTGGTATAGTTGGTG	This work
HW710	TCGTAATATTACTACATCCTCCTACTTTATAAAATGT	This work
HW711	GGATGTAGTAAATATTACGAAAGAATTAGGAGGTAAGGTCATATGGATA	This work
HW712	CAGCGCCTGTATACTTCCTTTATTAACATAATGATTCATT	This work
HW738	GAGTTAATAATATTGGCGCATCT	This work
HW739	GCTATCAAATTGATGGATGG	This work
Primer1	GCCTGCAGACATGCAAGCATGCAAACAGTGCAAAAAAT	This work
Primer4	ACGACGGCCAGTGCCAAGCCCTGGGCCATTAGATAATAAG	This work
HW781	AGCTTGCATGTCTGCAGG	This work
HW818	GTCACGCGTCCATGGAGATCCAGAGCTTACTGTAGAGAGTAC	This work
HW819	TGCTTGCATGTCTGCAGGCCGTCATAGTTAACAAAGACACTATC	This work

1.3 突变菌株的构建

1.3.1 打靶质粒接合转化艰难拟梭菌 $\Delta pyrF$

艰难拟梭菌 $\Delta pyrF$ 底盘菌株构建工作由课题组前期完成^[21]。打靶质粒接合转化艰难拟梭菌的方法参考文献[22]。把 CD630_27900 基因打靶质粒 pYJY1 转化大肠杆菌 CA434, 获得转化子后转至 LB 液体培养基中进行培养, 待菌株生长后与艰难拟梭菌液混合点至 BHIS 固体平板上, 18 h 以后将菌体刮下, 涂布于含头孢西丁、D-环丝氨酸、甲砒霉素的 BHIS 培养基上, 进行转化子筛选。回补质粒 pYJY2 转化艰难拟梭菌 $\Delta pyrF$ 方法同上。

1.3.2 艰难拟梭菌 CD630_27900 突变菌株的筛选

以艰难拟梭菌 $\Delta pyrF$ 作为底盘菌株获得新突变株通常需经过单交换菌株与双交换菌株筛选(图 1)。首先将携带 pYJY1 打靶质粒的 $\Delta pyrF$ 平板划线于含甲砒霉素(thiamphenicol, Tm)的艰

难拟梭菌基本培养基(*C. difficile* growth minimal medium, CDMM)上^[23], 筛选纯合单交换菌株。纯合单交换的筛选需同时使用引物对 HW681/HW739、HW738/HW739 进行菌落 PCR 验证。位于质粒左侧同源臂(left-side homology arm, LHA)外侧的 HW681 和位于 $\Delta pyrF$ 基因组右侧同源臂(right-side homology arm, RHA)外侧的 HW739 引物对扩增出条带(2 681 bp), 而位于 $\Delta pyrF$ 基因组上的野生型(1 513 bp)扩增引物对 HW738/HW739 未扩增出条带时, 即可判断该菌落为纯合单交换菌株(图 1A)。再将获得的纯合单交换菌株置于 2 mg/mL 5-氟乳清酸(5-fluoroorotic, 5-FOA)压力下筛选同源臂双交换以获得突变菌株, 突变菌株的筛选采用引物对 HW738/HW739 (图 1B)。最后通过连续传代的方式丢失质粒。

1.4 菌株生长速率测定

将菌株 CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900

菌株分别划线于固体平板上,从平板上挑取单克隆分别接至 BHIS 液体培养基内。培养菌株达到对数生长期, OD_{600} 值为 0.5 时,以 1% 的接种量接种于新的培养基内,每组 3 个重复, 37 °C 厌氧培养。期间每隔 3 h 使用细胞密度测量仪 (Ultrospec) 测量 1 次 OD_{600} 值。以为时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.5 RT-qPCR 验证自溶素基因 *cwp19* 和 *Acd* 的表达

取生长对数期中的 CD630、 Δ CD630_27900、

::CD630_27900 菌株分别接至新鲜的 BHIS 培养基中, 培养 30 h。利用细菌总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 分别提取 CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 总 RNA。并采用 FasKinggDNA Dispelling RT SuperMix [天根生化科技(北京)有限公司] 试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA。以 16S 核糖体 RNA 基因 (*rrs*) 作为内参基因对各菌株的 *cwp19* 和 *Acd* 基因表达量进行分析。获得的数据使用 Prism 6.0 软件 (GraphPad Software, Inc) 进行统计分析。

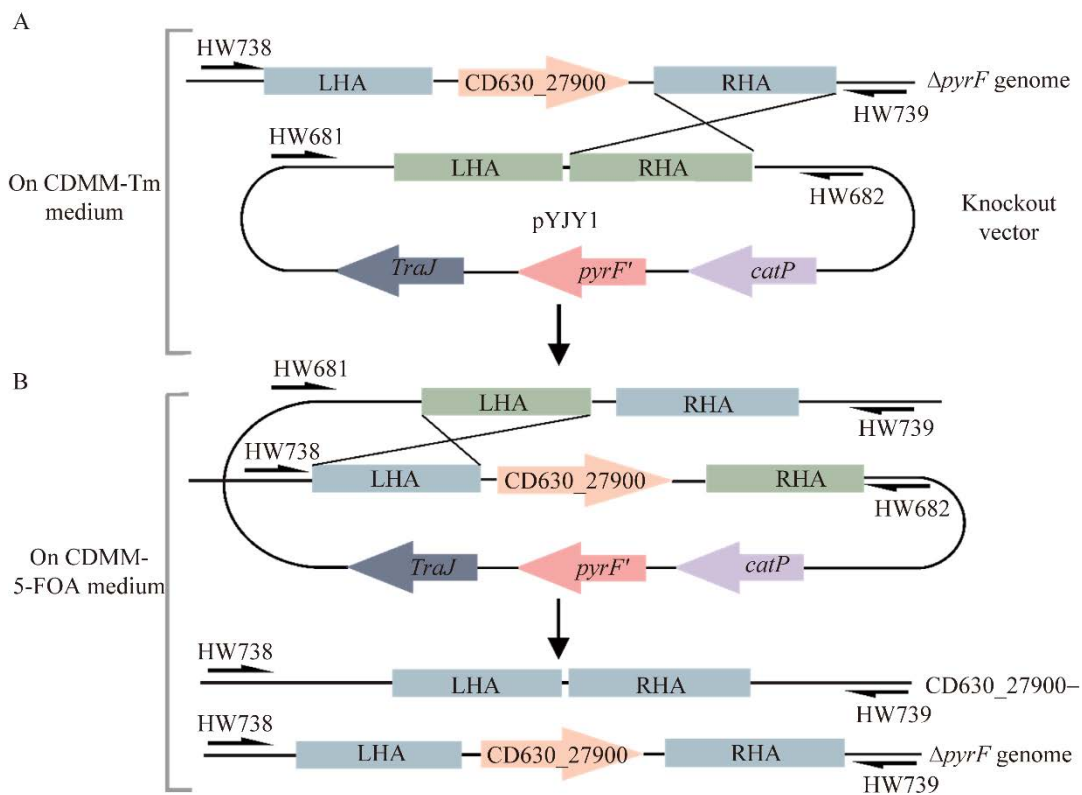


图 1 基于 ACE 法构建 Δ *pyrF* Δ CD630_27900 突变株

Figure 1 Construction of the Δ *pyrF* Δ CD630_27900 mutant strain by the ACE method. A: Schematic diagram of the construction of single-crossover mutant, the longer RHA on the pYJY1 plasmid has a higher recombination rate and tends to exchange with the Δ *pyrF* genome at the RHA site to generate single-crossover mutants. B: Schematic diagram of the construction of double-crossover mutant, the obtained single-crossover mutants are spread on the 5-FOA-containing BHIS medium to screen 5-FOA-resistant double-crossover colonies, the LHA of single-crossover mutants recombines with the LHA on the genome to generate double-crossover mutants (Δ CD630-27900 Δ *pyrF*). The primers pair HW738/HW739 is used to screen double-crossover mutants.

1.6 菌株的抗生素最低抑菌浓度(MIC)测定

参照临床实验室标准化委员会(Clinical Laboratory Standardization Committee, CSLI)推荐的《厌氧菌药物敏感性测试方法》(M11-A8)(2018),配制含上述中不同种类以及不同浓度的抗生素强化布氏琼脂平板,进行菌株 MIC 测试,具体流程如下:称取 44.5 g 的布鲁士琼脂粉加入 1 L 蒸馏水中,按照 1 000:1 的体积比加入 5 mg/mL 的氯化血红素与 1 mg/mL 的维生素 K1 溶液,121 °C 高压灭菌 5 min,待冷却至 55 °C 左右加入 6% 的脱纤维羊血。通过琼脂稀释法测定甲硝唑、万古霉素、阿莫西林、卡那霉素、头孢西丁、诺氟沙星、氨苄青霉素对艰难拟梭菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。取处于生长对数期的菌液稀释成约 1.5×10^7 个/mL 的菌液浓度,将每种菌株从低浓度到高浓度点至抗生素板上,同时设置未加任何抗生素的对照组,每株菌株 3 个重复。

1.7 菌株细胞毒力测试

为了验证 CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 的细胞毒力是否存在差异。选择非洲绿猴肾细胞(Vero)进行细胞毒力实验。用 DMEM 培养基[10%的胎牛血清与 1%双抗(链霉素 10 mg/mL,青霉素 10 000 U/mL)]培养 Vero 细胞。将 Vero 细胞接种于 24 孔板上,37 °C 培养直至细胞将孔板铺满。去除培养基,用无菌的 PBS 清洗 3 次。接下来,加入无双抗与无血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 在 BHIS 培养基中培养,待生长浓度 OD_{600} 值达到 1.0,野生型与突变菌株各取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 5 min。得到上清液后用 0.22 μ m 的滤膜进行过滤。将含有毒素的上清液稀释 0.5×10^1 – 0.5×10^7 倍,各吸取 200 μ L 毒素上清加入上述的 24 孔板中,37 °C 孵育过夜。用 200 倍的光学显微镜对细胞形态进行

观察。观察艰难拟梭菌毒素感染后 Vero 细胞的形态变化,获得能够使 Vero 细胞变圆的最大稀释倍数^[24]。

1.8 RT-qPCR 验证艰难拟梭菌主要毒素基因 *tcdA* 和 *tcdB* 的表达

将生长对数期中的 CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 菌株分别接到新鲜的 BHIS 培养基内,待菌株生长 OD_{600} 值至 0.8 时,采用细菌总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]分别提取 CD630、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 的总 RNA,并用 FasKinggDNA Dispelling RT SuperMix [天根生化科技(北京)有限公司]试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA。以 16S 核糖体 RNA 基因(*rrs*)作为内参基因对各菌株的 *tcdA*、*tcdB* 基因表达量进行分析。获得的数据使用 Prism 6.0 软件(GraphPad Software, Inc)进行统计分析。

1.9 菌株 pH 敏感实验

用盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)配制 pH 1–12 的 BHIS 液体培养基,将野生型 CD630、突变菌株 Δ CD630_27900、回补菌株::CD630_27900 的 OD_{600} 值培养至 0.5,每管菌株各取 1 mL 菌液 6 000 r/min 离心 3 min 去除上清液,再加入 500 μ L 不同 pH 的培养基,培养 3 h 后,取 1 μ L 点至 BHIS 固体平板上,培养 24–36 h 观察菌株生长结果。

1.10 统计学方法

本研究利用 Prism 8 软件与 IBM SPSS Statistics 26 软件对实验结果进行统计学分析。每组实验进行 3 个平行重复,采用 F 检验分析组间差异,检测水平为 $P=0.05$, n 表示 $P>0.05$,不具有统计学意义, $P<0.05$ 时有统计学意义,其中*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 质粒构建结果

以艰难拟梭菌 CD630 基因组为模板 PCR 扩增同源臂, 得到条带大小分别为 500 bp 与 1 300 bp 的上、下游同源臂。经重叠 PCR 后得到完整同源臂片段 1 800 bp。同源臂片段与 *Not* I-HF 线性化的 pMTL-BY 载体连接、转化感受态细胞, 在氯霉素抗性平板上进行菌落 PCR 筛选, 分子量大小为 1 973 bp 时, 表明质粒构建成功, 获得 CD630_27900 基因敲除质粒 pYJY1, 如图 2A 所示。引物对 Primer1/Primer4、HW818/HW819 从艰难拟梭菌 CD630 上分别扩增含启动子的 *pyrF*、CD630_27900 基因片段后, *pyrF* 与 *Hind* III 线性化 pMTL82151 载体连接, 通过菌落 PCR 筛选出重组质粒 pYJY2-S (图 2B), 成功连接 *pyrF* 片段后的分子检测大

小为 2 316 bp。CD630_27900 基因片段再与线性化的 pYJY2-S 质粒连接, 获得::CD630_27900 回补载体 pYJY2 (图 2C), 检测分子量大小为 1 997 bp。

2.2 突变菌株筛选结果

以 $\Delta pyrF$ 为底盘菌株, 对 CD630_27900 基因进行敲除。将携带 pYJY1 质粒的 $\Delta pyrF$ 菌株置于 CDMM-Tm 的培养基上, 利用 2 对不同的引物筛选出纯合的单交换, 上方中出现条带, 下方未扩增出条带, 表明菌落为纯合的单交换菌株 (图 3A)。筛选过程中发现混合有野生型的突变菌株 (图 3A 孔道 12、20)。把混合型菌落置于 CDMM-5-FOA 培养基上纯化, 随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR 验证, 结果显示 24 个菌落均为突变菌株 (图 3B)。经测序后进行比对, 结果表明成功删除 CD630_27900 基因 (708 bp), 获得 $\Delta CD630_27900 \Delta pyrF$ 双突变菌株 (图 3C)。

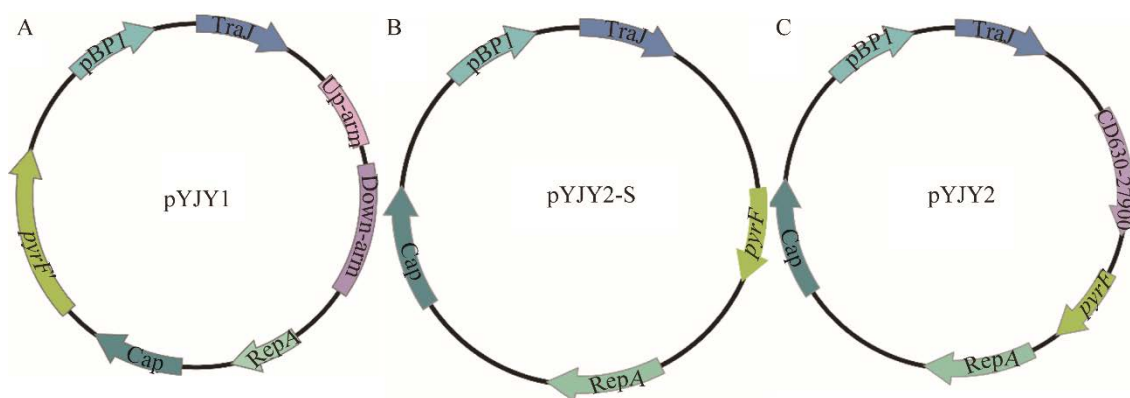


图 2 CD630_27900 基因打靶质粒与回补质粒的构建

Figure 2 Construction of CD630_27900 gene-targeting plasmids and complementing plasmid. A: CD630_27900 gene homologous arms (up-arm and down-arm) are ligated to pMTL-BY plasmid to obtain CD630_27900 gene-targeting plasmid pYJY1. B: The *pyrF* gene and its upstream promoter region are ligated to pMTL82151 plasmid to obtain *pyrF* complementary plasmid pYJY2-S. C: The CD630_27900 gene and its upstream promoter region are ligated to pYJY2-S plasmid to obtain *pyrF* and CD630_27900 genes complementary plasmid pYJY2; The *pyrF'* is a homologous gene derived from *Clostridium beijerinickii* NCIMB 8052.

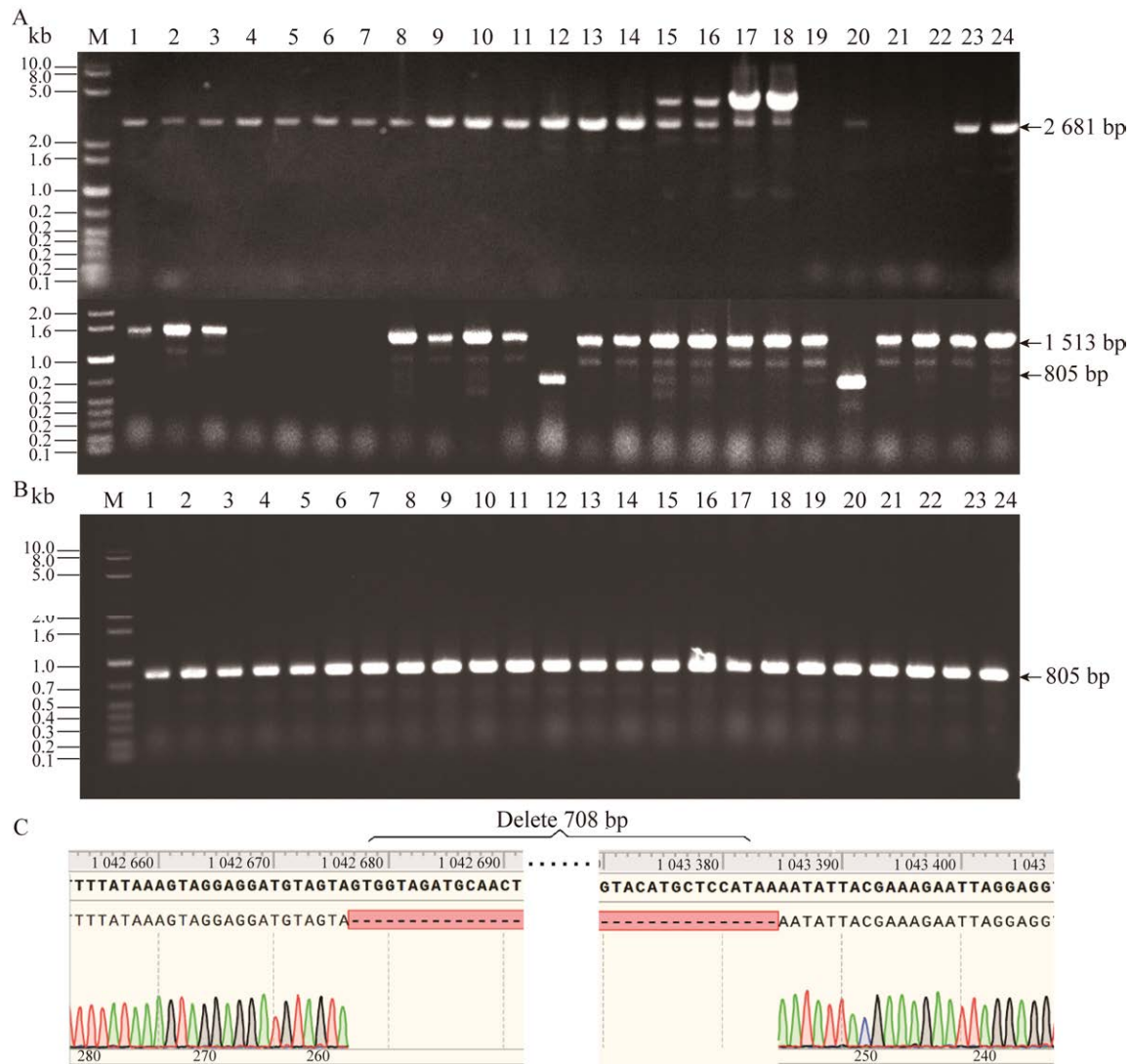


图3 Δ CD630_27900 突变菌株的筛选以及突变验证

Figure 3 Screening of the Δ CD630_27900 mutant strain and verification by sequencing. A: Screening for pure single-crossover strains. B: Purification of the mutant strain. C: Gene sequencing. WT: Wild-type strain; M: 1 kb plus maker.

2.3 回补菌株的构建

为进一步研究 CD630_27900 基因功能, 将 *pyrF* 基因回补质粒 pYJY2、*pyrF* 与 CD630_27900 基因的回补质粒 pYJY3 分别转化 Δ CD630_27900 Δ *pyrF* 双突变菌株, 获得单突变菌株 Δ CD630_27900 与回补菌株 ::CD630_27900。

2.4 菌株生长速率测定

WT、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 的生

长曲线如图 4 所示。对数期(0–12 h) WT、 Δ CD630_27900、::CD630_27900 菌株生长速率无明显差异。衰亡期(12–72 h) Δ CD630_27900 突变株自溶速率显著低于野生型 CD630 菌株 (24–60 h), 且这种差异具有统计学意义。::CD630_27900 回补菌株自溶速率相比 CD630 和 Δ CD630_27900 都显著增加。

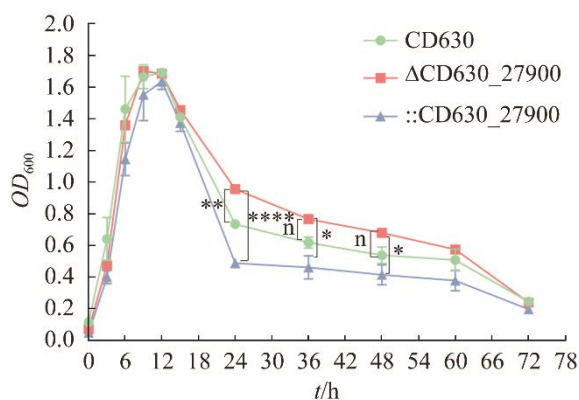


图4 菌株生长曲线

Figure 4 Growth curves of strains. The horizontal coordinate represents the time (hours), and the vertical coordinate represents optical density at 600 nm. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; n: $P > 0.05$.

2.5 RT-qPCR 检测自溶素 *cwp19* 和 *Acd* 基因表达

通过 RT-qPCR 检测 WT、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900 菌株在 30 h 时, *cwp19* 和 *Acd* 基因的表达量(图 5)。统计分析结果表明, 与野生

型相比, Δ CD630_27900 的 *cwp19* ($P < 0.01$) 和 *Acd* 基因表达量显著降低 ($P < 0.01$)。 $::$ CD630_27900 相较于野生型 *cwp19* 与 *Acd* 基因表达增强。

2.6 细胞毒性实验

CD630、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900 菌株上清毒素毒力检测结果如图 6 所示, 光学显微镜下观察未加上清毒素的对照组细胞形态为梭形(图 6A1、6B1、6C1)。未稀释的 CD630(图 6A2)、 Δ CD630_27900(图 6B2)、 $::$ CD630_27900(图 6C2)上清毒素均能引起 Vero 细胞形态变圆、悬浮。将上清毒素梯度稀释 $0.5 \times 10^1 - 0.5 \times 10^7$ 倍分别感染 Vero 细胞, CD630 引起 Vero 细胞形态改变的最大的稀释倍数为 0.5×10^5 倍(图 6A3), Δ CD630_27900 引起细胞形态改变的最大的稀释倍数为 0.5×10^4 倍(图 6B3), $::$ CD630_27900 引起细胞形态改变的最大的稀释倍数为 0.5×10^6 倍(图 6C3)。该结果表明与 CD630 相比, Δ CD630_27900 的细胞毒力降低, $::$ CD630_27900 的细胞毒力增高。

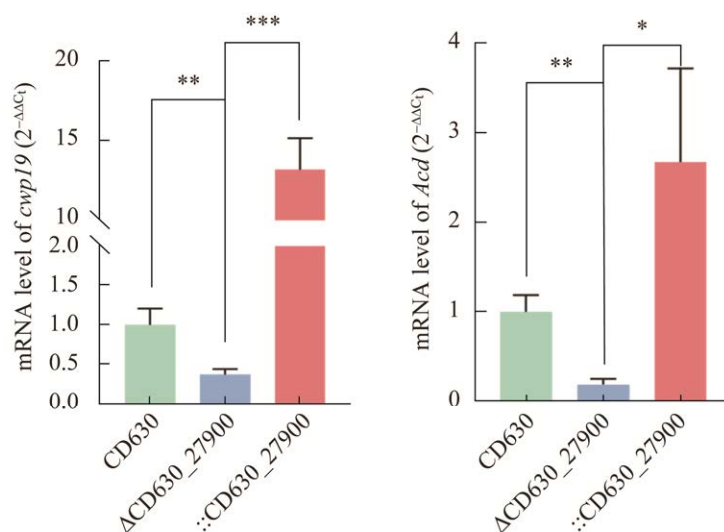


图5 测定 30 h 时 CD630、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900 菌株自溶素 *cwp19* 和 *Acd* 基因表达结果

Figure 5 Determination of autolysin *cwp19* and *Acd* gene expression results of CD630, Δ CD630_27900, $::$ CD630_27900 strains at 30 h. The green bar represents the expression level of the *cwp19* or *Acd* gene in the WT CD630 strain; The blue bar represents the gene expression level of the *cwp19* or *Acd* in the Δ CD630_27900; The red bar represents the gene expression level of the *cwp19* or *Acd* in the $::$ CD630_27900. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

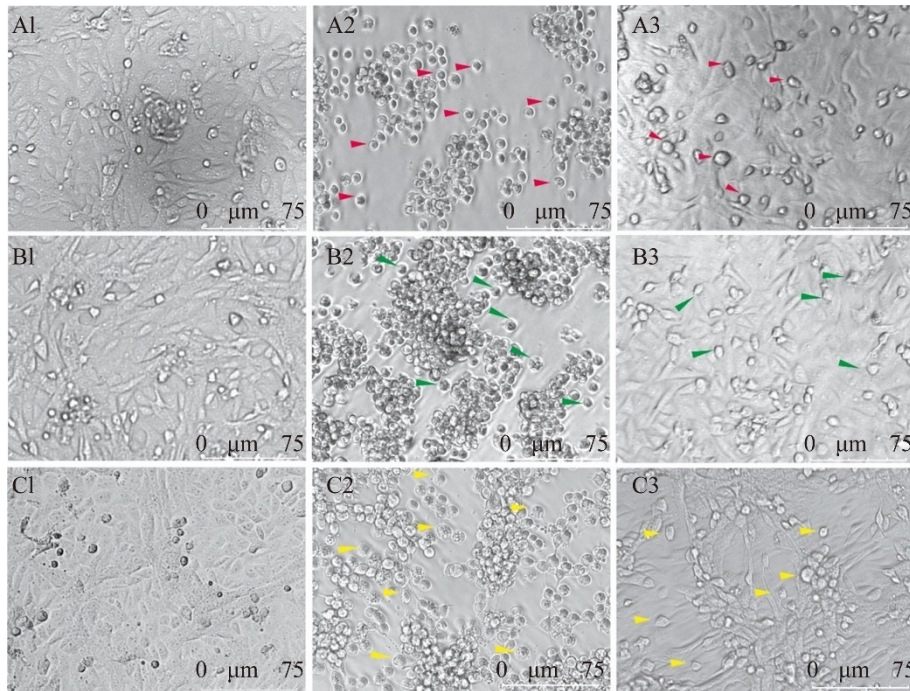


图 6 在 200 倍光学显微镜下观察 CD630、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900 上清毒素感染后 Vero 细胞的形态变化

Figure 6 Morphological changes of Vero cells after CD630, Δ CD630_27900, $::$ CD630_27900 supernatant toxin infection observed under 200 \times light microscope. A1, B1 and C1 are blank controls without added supernatant toxins, respectively, showed a shuttle shape. A2, B2 and C2 are the results of undiluted CD630, Δ CD630_27900, and $::$ CD630_27900 supernatant toxins infected Vero cells, respectively. Cells were rounded and suspended in the medium (red, green, and yellow arrows). A3: Vero cells infected with 0.5×10^5 fold diluted CD630 supernatant toxin. B3: Vero cells infected with 0.5×10^4 fold-diluted Δ CD630_27900 supernatant toxin. C3: Vero cells infected with 0.5×10^6 fold diluted $::$ CD630_27900 supernatant toxin.

2.7 RT-qPCR 验证艰难拟梭菌主要毒素基因 *tcdA* 和 *tcdB* 的表达

RT-qPCR 检测 WT、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900 菌株毒素基因 *tcdA* 和 *tcdB* 的基因表达水平(图 7)。结果表明相较于 WT, 敲除 CD630_27900 基因后 *tcdA*($P < 0.05$)、*tcdB*($P < 0.05$) 的基因表达水平降低, $::$ CD630_27900 的 *tcdA*($P < 0.05$)、*tcdB*($P < 0.01$) 基因表达量增高。

2.8 抗生素耐敏感实验

CD630、 Δ CD630_27900、 $::$ CD630_27900

菌株对常用抗生素的 MIC 检测结果如表 2、图 8 所示。与 CD630 相比, Δ CD630_27900 对氨苄青霉素、甲硝唑、阿莫西林、万古霉素、诺氟沙星、头孢西丁、卡那霉素的 MIC 降低, $::$ CD630_27900 耐药性恢复。根据 CSLI 提供的 MIC 解释标准, Δ CD630_27900 突变株对万古霉素、甲硝唑、诺氟沙星、阿莫西林的耐药性由中介耐药或耐药变成敏感。表明 CD630_27900 基因的缺失, 降低了艰难拟梭菌对以上抗生素的耐药性。

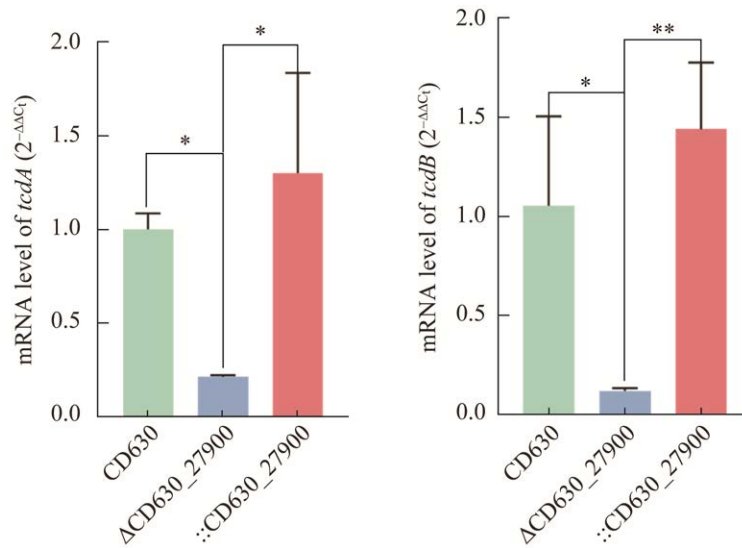


图 7 RT-qPCR 检测 CD630、ΔCD630_27900、::CD630_27900 菌株主要毒素基因 *tcdA* 和 *tcdB* 基因表达结果

Figure 7 Results of detecting the expression of *tcdA* and *tcdB* genes, the main toxin genes of strains CD630, ΔCD630_27900, ::CD630_27900. Green bars represent the *tcdA* or *tcdB* gene expression levels of strain CD630; Blue bars represent the *tcdA* or *tcdB* gene expression levels of strain ΔCD630_27900; Red bars represent the *tcdA* or *tcdB* gene expression levels of strain CD630; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

表 2 艰难拟梭菌最低抑菌浓度分析

Table 2 Analysis of the minimum inhibitory concentration of *Clostridioes difficile*

Antibiotics	Antibiotic breakpoint of the strains			Standard of results interpretation (μg/mL)		
	WT	ΔCD630_27900	::CD630_27900	S	I	R
Ampicillin	64	4	128	0.5 ≤	1	≥2
Metronidazole	128	2	128	8 ≤	16	≥32
Amoxicillin	128	2	256	4 ≤	8	≥16
Vancomycin	2	1	2	0.5 ≤	1	≥2
Norfloxacin	64	32	64	32 ≤	64	≥128
Cefoxitin	256	128	256	16 ≤	32	≥64
Kanamycin	-	256	-	16 ≤	32	≥64

S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistance.

2.9 pH 敏感实验

WT、ΔCD630_27900、::CD630_27900 菌株的 pH 敏感结果见图 9。用不同 pH 的培养基处理菌株 3 h 后，观察到 pH 12 时，所有菌株都不生长；pH 为 5-11 时，所有菌株能在 BHIS 固体

平板生长；pH 4 时，WT 能在平板上生成菌落。而 ΔCD630_27900 无法生长，对突变菌株进行回补后，::CD630_27900 菌株在 pH 4 时恢复生长能力。可见敲除 CD630_27900 基因会降低艰难拟梭菌对酸性环境的耐受性。

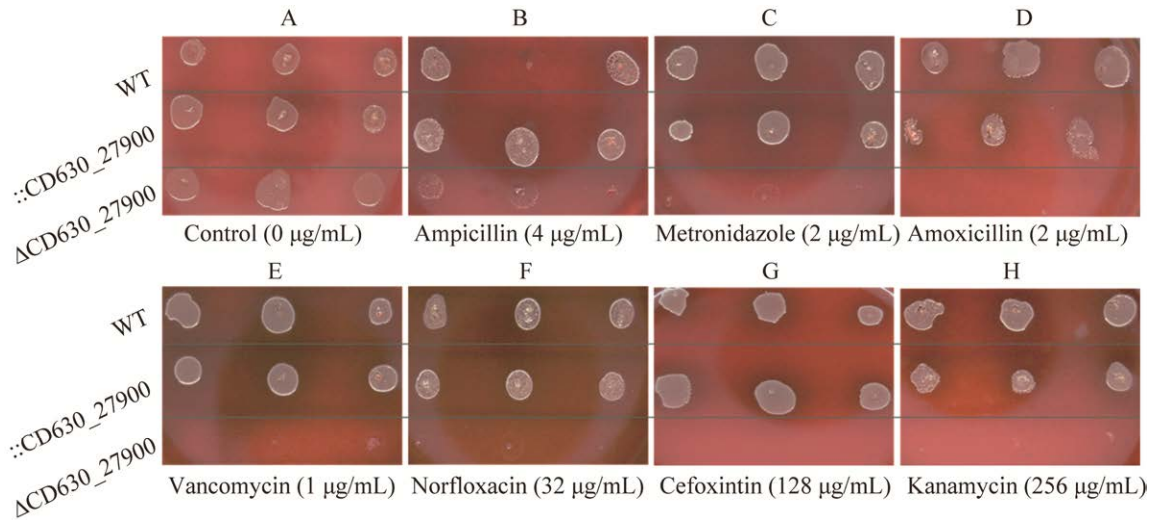


图 8 不同抗生素浓度下比较不同菌株的 MIC 结果

Figure 8 The MIC of different strains at different antibiotic concentrations. A: Blank control, colonies of CD630, *::CD630_27900*, and Δ CD630_27900 strains on BHIS medium. B: Colony formation on 4 μ g/mL ampicillin BHIS plate of different strains. C: 2 μ g/mL metronidazole BHIS plate of different strains. D: 2 μ g/mL amoxicillin BHIS plate of different strains. E: 2 μ g/mL vancomycin BHIS plate of different strains. F: 32 μ g/mL norfloxacin BHIS plate of different strains. G: 128 μ g/mL cefoxitin BHIS plate of different strains. H: 256 μ g/mL kanamycin BHIS plate of different strains. B–G: CD630 and *::CD630_27900* grew well, Δ CD630_27900 failed to form any colonies.

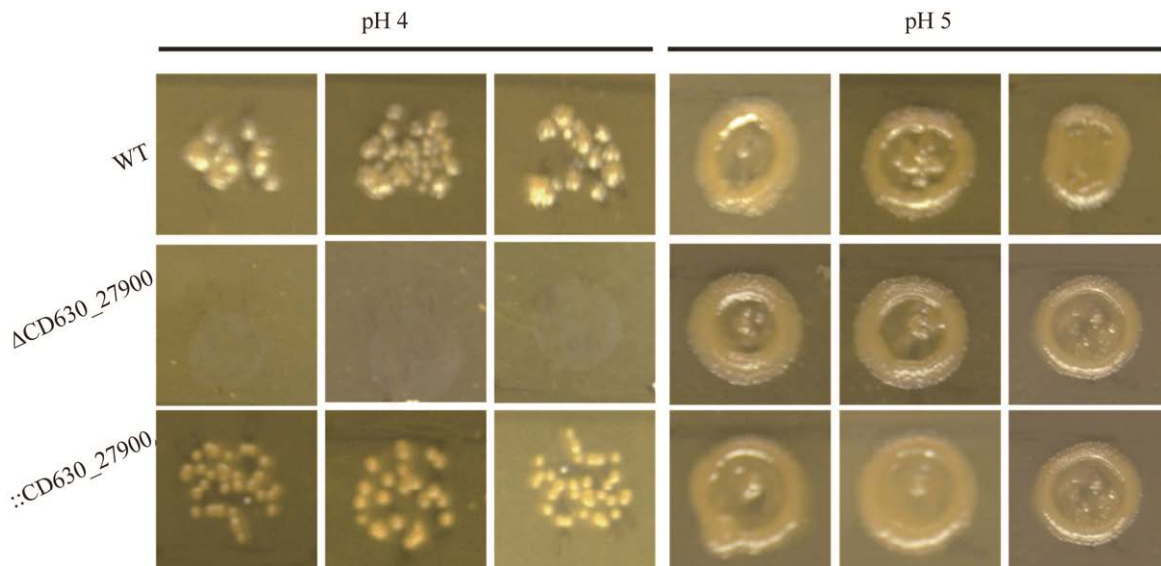


图 9 WT、 Δ CD630_27900 和 *::CD630_27900* 菌株对不同 pH 敏感结果

Figure 9 Results of different pH tolerance of WT, Δ CD630_27900 and *::CD630_27900* strains. The left column shows the growth of strains WT, Δ CD630_27900, and *::CD630_27900* after 3 h treatment at pH 4; The right column shows the growth of the strains after 3 h treatment at pH 5.

3 讨论与结论

在本研究中利用 ACE 的方法首次敲除了艰难拟梭菌 CD630_27900 基因, 并对 CD630_27900 基因进行回补, 发现野生型 CD630 与突变菌株 Δ CD630_27900 在生长曲线、自溶素(CWP19、ACD)表达量、细胞毒力、不同抗生素以及 pH 敏感性存在差异。构建 Δ CD630_27900 突变菌株时, 发现筛选纯单交换菌株过程中出现双交换与单交换混合的菌落, 将其置于 5-FOA 的压力下进行筛选, 即可获得纯的突变菌株。测定的生长曲线结果表明, 敲除 CD630_27900 基因, 菌株的生长速率无明显差异。但在衰亡期(30 h), Δ CD630_27900 与野生型相比较, 自溶速率变慢, $::$ CD630_27900 自溶速率加快。艰难拟梭菌自溶与其自身产生的作用于肽聚糖^[25-27]的自溶素 CWP19、ACD 等相关。qPCR 结果表明, 与野生型相比, Δ CD630_27900 自溶素基因表达水平降低, $::$ CD630_27900 自溶素基因表达增高。此结果与观察到生长曲线中 Δ CD630_27900 自溶速率变慢的结果一致。利用 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 CD630_27900 基因进行蛋白序列比对, 结果显示其为 PIG-L 家族脱乙酰酶(相似性 100%)。此类酶的特征是能水解 N-GlcNAc 中的乙酰基团^[18], 而高度脱乙酰化的 N-GlcNAc 是构成艰难拟梭菌肽聚糖的基本单位之一^[17]。研究表明许多 N-GlcNAc 脱乙酰化酶可以调节内源性的肽聚糖水解酶活性, 例如乳酸乳球菌中的自溶素 AcmA, 它会随着肽聚糖脱乙酰化程度的增高, 降低自身切割效率^[28], 而在敲除 CD630_27900 基因后观察到菌株的自溶速率降低, 可能与 CD630_27900 基因缺失, 引起的自溶素基因的表达量降低以及细胞壁肽聚糖乙酰化程度变化有关。

细胞毒力测定结果显示与野生型 CD630 菌

株相比, Δ CD630_27900 细胞毒力降低, $::$ CD630_27900 细胞毒力增强。RT-qPCR 检测艰难拟梭菌主要毒素基因表达, 结果表明与野生型相比, Δ CD630_27900 的 *tcdA*、*tcdB* 基因表达量降低, $::$ CD630_27900 毒素基因表达增强, 此结果与细胞毒力测定结果相符。抗生素敏感测定实验中, 与野生型相比较, Δ CD630_27900 对万古霉素、甲硝唑、诺氟沙星、阿莫西林的耐药性由中介耐药或耐药变成敏感, $::$ CD630_27900 对抗生素的敏感性恢复至野生型水平。以上结果说明 CD630_27900 基因是决定艰难拟梭菌抗生素耐药性的关键基因。研究发现细菌对抗生素敏感与细胞中的肽聚糖有关, 如属于 β -内酰胺类药物的氨苄青霉素、阿莫西林、头孢西丁等, 它们的抑菌机制是通过与转肽酶结合, 抑制肽桥形成, 使肽聚糖交联反应受阻, 导致肽聚糖无法合成, 从而达到抑菌效果^[29]。万古霉素同样作用于肽聚糖, 其机制是通过与 D-丙氨酰-D-丙氨酸结合, 抑制肽聚糖合酶和 P-磷脂载体, 阻止肽聚糖中 NAG 与 N-GlcNAc 聚合, 使细胞内容物外漏, 最终导致细菌死亡^[30]。抗生素渗透率是影响细菌抗生素耐药的因素之一, 部分抗生素的作用靶标位于细胞内, 抗生素需要到达胞内才能发挥作用^[31]。本研究中测试的甲硝唑、诺氟沙星、卡那霉素等药物则需要透过细胞壁才能作用于胞内的相关靶点。综上所述, CD630_27900 基因敲除可能破坏细胞壁肽聚糖乙酰化-脱乙酰化动态平衡。脱乙酰化酶的缺失, 导致细胞壁乙酰化水平增高, 从而削弱细胞壁生物屏障功能, 使得艰难拟梭菌抗生素耐受能力降低^[5]。因 CD630_27900 基因能够降低艰难拟梭菌的 MIC, 可作为联合抗生素治疗 CDI 的潜在靶点。

在 pH 敏感实验结果中, 用 pH 4 的培养基处理菌株 3 h, 野生型部分生长, Δ CD630_27900 不能生长, $::$ CD630_27900 恢复了野生型抗酸能

力。该结果说明 CD630_27900 基因的缺失降低了艰难拟梭菌抵抗外界酸性环境的能力。在工程乳酸乳球菌中,可观察到 XynD 脱乙酰化酶催化的肽聚糖去乙酰化,增强了该菌在酸性下的存活能力^[27]。另外,醋杆菌能生产乙酸并在低 pH 环境下存活,是因为其自身丰富的肽聚糖肽交联的特殊修饰^[32]。以上研究结果和文献报道提示,CD630_27900 基因敲除,可能破坏细胞壁肽聚糖乙酰化-脱乙酰化动态平衡。脱乙酰化酶的缺失,可能导致细胞壁乙酰化水平增高,降低了艰难拟梭菌对酸的耐受能力。

艰难拟梭菌引发 CDI 一直是很多研究者的重点关注对象,但由于艰难拟梭菌基因的敲除比较困难,人们对艰难拟梭菌及其引发的 CDI 了解依然十分有限,其基因功能的研究明显滞后于其他病原菌。在本研究中通过 ACE 的方法,可对艰难拟梭菌进行基因编辑,且打靶效率较高,该方法为研究艰难拟梭菌更多未知的基因功能提供必要基础。本研究中,敲除 CD630_27900 基因,与野生型相比,突变菌株的自溶素表达降低,自溶速率变慢,细胞毒力降低,在极端环境下(pH 4),丧失了生存能力,并且对某些抗生素变敏感,表明该基因有帮助艰难拟梭菌适应外界极端环境的作用。基于前人文献的报道以及测定表型改变的结果,我们推测 CD630_27900 基因可能编码肽聚糖 N-GlcNAc 脱乙酰化相关的酶,但未来需要有更多直接的证据去证明。此外,本研究还提示了该基因可作为艰难拟梭菌疫苗靶点进行深入研究,为治疗 CDI 提供新靶点与新思路。

参考文献

- [1] 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.
- [2] BARTLETT JG, GERDING DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2008, 46(suppl 1): S12-S18.
- [3] KNIGHT DR, ELLIOTT B, CHANG BJ, PERKINS TT, RILEY TV. Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 721-741.
- [4] di BELLA S, ASCENZI P, SIARAKAS S, PETROSILLO N, di MASI A. *Clostridium difficile* toxins A and B: insights into pathogenic properties and extraintestinal effects[J]. *Toxins*, 2016, 8(5): 134.
- [5] SPIGAGLIA P, MASTRANTONIO P, BARBANTI F. Antibiotic resistances of *Clostridium difficile*[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1050: 137-159.
- [6] LESSA FC, MU Y, BAMBERG WM, BELDAVS ZG, DUMYATI GK, DUNN JR, FARLEY MM, HOLZBAUER SM, MEEK JI, PHIPPS EC, WILSON LE, WINSTON LG, COHEN JA, LIMBAGO BM, FRIDKIN SK, GERDING DN, McDONALD LC. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2015, 372(9): 825-834.
- [7] LI H, LI WG, ZHANG WZ, YU SB, LIU ZJ, ZHANG X, WU Y, LU JX. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Clostridioides difficile* in China and its association with geographical regions and patient age[J]. *Anaerobe*, 2019, 60: 102094.
- [8] XU QM, CHEN YB, GU SL, LV T, ZHENG BW, SHEN P, QUAN JZ, FANG YH, LI LJ. Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection in Mainland China: a seven-year (2009–2016) retrospective study in a large university hospital[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 9645.
- [9] SÁRA M, SLEYTR UB. S-layer proteins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(4): 859-868.
- [10] KIRK JA, GEBHART D, BUCKLEY AM, LOK S, SCHOLL D, DOUCE GR, GOVONI GR, FAGAN RP. New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(406): eaah6813.
- [11] FAGAN RP, JANOIR C, COLLIGNON A, MASTRANTONIO P, POXTON IR, FAIRWEATHER NF. A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(Pt 8): 1225-1228.
- [12] FAGAN RP, ALBESA-JOVÉ D, QAZI O, SVERGUN DI, BROWN KA, FAIRWEATHER NF. Structural

- insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(5): 1308-1322.
- [13] DINGLE KE, DIDELOT X, ANSARI MA, EYRE DW, VAUGHAN A, GRIFFITHS D, IP CLC, BATTY EM, GOLUBCHIK T, BOWDEN R, JOLLEY KA, HOOD DW, FAWLEY WN, WALKER AS, PETO TE, WILCOX MH, CROOK DW. Recombinational switching of the *Clostridium difficile* S-layer and a novel glycosylation gene cluster revealed by large-scale whole-genome sequencing[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2013, 207(4): 675-686.
- [14] BRADSHAW WJ, KIRBY JM, ROBERTS AK, SHONE CC. Cwp2 from *Clostridium difficile* exhibits an extended three domain fold and cell adhesion *in vitro*[J]. *The FEBS Journal*, 2017, 284(17): 2886-2898.
- [15] 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.
- [16] CALABI E, WARD S, WREN B, PAXTON T, PANICO M, MORRIS H, DELL A, DOUGAN G, FAIRWEATHER N. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(5): 1187-1199.
- [17] BRADSHAW WJ, ROBERTS AK, SHONE CC. The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*[J]. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2018, 12(1): 319-331.
- [18] COULLON H, RIFFLET A, WHEELER R, JANOIR C, BONECA IG, CANDELA T. Peptidoglycan analysis reveals that synergistic deacetylase activity in vegetative *Clostridium difficile* impacts the host response[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(49): 16785-16796.
- [19] VIARS S, VALENTINE J, HERNICK M. Structure and function of the LmbE-like superfamily[J]. *Biomolecules*, 2014, 4(2): 527-545.
- [20] HEAP JT, PENNINGTON OJ, CARTMAN ST, MINTON NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 78(1): 79-85.
- [21] 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 JJ, YANG JY, SHAO RR, ZHANG T, LIAO J, CHENG YM, GUAN ZZ, QI XL, CHEN ZH, HONG W, CUI GZ. The *fliL* gene significantly affects the motility function and spore production ability of *Clostridium difficile*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(4): 1578-1595 (in Chinese).
- [22] HONG W, ZHANG J, CUI GZ, WANG LX, WANG Y. Multiplexed CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(6): 1588-1600.
- [23] EHSAAN M, KUEHNE SA, MINTON NP. *Clostridium difficile* genome editing using pyrE alleles[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016: 35-52.
- [24] HAMO Z, AZRAD M, FICHTMAN B, PERETZ A. The cytopathic effect of different toxin concentrations from different *Clostridioides difficile* sequence types strains in vero cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 763129.
- [25] 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.
- [26] WYDAU-DEMATTEIS S, EL MEUCHE I, COURTIN P, HAMIOT A, LAI-KUEN R, SAUBAMÉA B, FENAILLE F, BUTEL MJ, PONS JL, DUPUY B, CHAPOT-CHARTIER MP, PELTIER J. Cwp19 is a novel lytic transglycosylase involved in stationary-phase autolysis resulting in toxin release in *Clostridium difficile*[J]. *mBio*, 2018, 9(3): e00648-e00618.
- [27] DHALLUIN A, BOURGEOIS I, PESTEL-CARON M, CAMIADE E, RAUX G, COURTIN P, CHAPOT-CHARTIER MP, PONS JL. Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity[J]. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2343-2351.
- [28] CAO LJ, LIANG DM, HAO PL, SONG QQ, XUE ES, CAIYIN Q, CHENG ZH, QIAO JJ. The increase of O-acetylation and N-deacetylation in cell wall promotes acid resistance and nisin production through improving cell wall integrity in *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(9): 813-825.
- [29] LIMA L M, SILVA B N M DA, BARBOSA G, BARREIRO EJ. β -lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 208: 112829.
- [30] STOGIOS PJ, SAVCHENKO A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2020, 29(3): 654-669.
- [31] LIN J, NISHINO K, ROBERTS MC, TOLMASKY M, AMINOV RI, ZHANG LX. Mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 34.
- [32] ESPAILLAT A, FORSMO O, EL BIARI K, BJÖRK R, LEMAITRE B, TRYGG J, CAÑADA FJ, de PEDRO MA, CAVA F. Chemometric analysis of bacterial peptidoglycan reveals atypical modifications that empower the cell wall against predatory enzymes and fly innate immunity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(29): 9193-9204.