



糖基转移酶 WekM 参与禽致病性大肠杆菌脂多糖合成和环境适应

曹启予¹, 高宇杰¹, 张晓荟¹, 陈歆丹¹, 罗平¹, 翟瑞东¹, 韩先干², 宋厚辉¹, 程昌勇¹, 于纪棉^{3*}, 韩月^{1*}

- 1 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心 浙江省动物医学与健康国际科技合作基地 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300
- 2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 201199
- 3 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波 315100

曹启予, 高宇杰, 张晓荟, 陈歆丹, 罗平, 翟瑞东, 韩先干, 宋厚辉, 程昌勇, 于纪棉, 韩月. 糖基转移酶 WekM 参与禽致病性大肠杆菌脂多糖合成和环境适应[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2702-2712.

CAO Qiyu, GAO Yujie, ZHANG Xiaohui, CHEN Xindan, LUO Ping, ZHAI Ruidong, HAN Xiangan, SONG Houhui, CHENG Changyong, YU Jimian, HAN Yue. The glycosyltransferase WekM is involved in the lipopolysaccharide biosynthesis and environmental adaptation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2702-2712.

摘要:【目的】研究 O₁ 血清型禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)的 O-抗原糖基转移酶 WekM 在脂多糖合成和环境适应中的作用。【方法】采用 Red 同源重组方法, 构建 APEC O₁ 菌株的 *wekM* 基因缺失株, 并构建 *wekM* 回补株。随后分析 *wekM* 基因对 APEC O₁ 菌株生长和运动能力的影响, 通过银染和 Western blotting 鉴定细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)图谱以及与兔抗 O₁ 血清的反应能力, 通过实时荧光定量 PCR 测定细菌鞭毛相关基因转录水平, 使用溴化乙锭测定细菌细胞膜通透性。最后, 通过药敏试验检测细菌对环丙沙星等抗生素敏感性。【结果】PCR 验证及 DNA 测序结果表明 $\Delta wekM$ 缺失株和回补株构建成功。银染鉴定 $\Delta wekM$ 缺失株较野生株 LPS 图谱不完整, 部分 O-抗原条带缺失; 同时, Western blotting 检测未见到 $\Delta wekM$ 与 O 因子血清的反应条带, 这说明 O-抗原糖基转移酶 *wekM* 基因缺失后影响 LPS 合成。生长运

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801000); 国家自然科学基金(31902280, 32102671); 浙江省自然科学基金(LQ24C010005)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801000), the National Natural Science Foundation of China (31902280, 32102671), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ24C010005).

*Corresponding authors. E-mail: YU Jimian, yujimian@163.com; HAN Yue, yuehan@zafu.edu.cn

Received: 2024-01-06; Accepted: 2024-04-03; Published online: 2024-04-15

动能力分析显示, $\Delta wekM$ 缺失株的运动能力较野生株显著减弱, 生长速率与野生株一致。实时荧光定量 PCR 检测发现, $\Delta wekM$ 缺失株的 *flgC* 等鞭毛相关基因转录水平降低, 表明 *wekM* 基因影响细菌鞭毛的合成。此外, $\Delta wekM$ 的细胞膜通透性较野生株显著增加 ($P < 0.01$), 药敏结果也显示, $\Delta wekM$ 缺失株较野生株对多黏菌素等 7 种抗生素敏感性增加, 这说明 *wekM* 缺失后细菌细胞膜理化性质改变, 适应环境的能力降低。【结论】本研究揭示了禽致病性大肠杆菌糖基转移酶 *wekM* 基因缺失导致细菌 LPS 完整性受损, 运动能力降低, 鞭毛合成受阻, 鞭毛形成基因转录水平下降, 细胞膜通透性增强, 对抗生素敏感性增加。这些结果为解析 *wekM* 基因的功能奠定了研究基础, 有助于深入了解禽致病性大肠杆菌 O₁ 的环境适应机制。

关键词: 禽致病性大肠杆菌 O₁; 脂多糖; O-抗原; 糖基转移酶; 环境适应

The glycosyltransferase WekM is involved in the lipopolysaccharide biosynthesis and environmental adaptation of avian pathogenic *Escherichia coli*

CAO Qiyu¹, GAO Yujie¹, ZHANG Xiaohui¹, CHEN Xindan¹, LUO Ping¹, ZHAI Ruidong¹, HAN Xiangan², SONG Houhui¹, CHENG Changyong¹, YU Jimian^{3*}, HAN Yue^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

² Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201199, China

³ Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of WekM, the O-antigen glycosyltransferase of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) O₁, in lipopolysaccharide biosynthesis and environmental adaptation. **[Methods]** The *wekM*-deleted strain $\Delta wekM$ of APEC O₁ was constructed by Red homologous recombination, and then the complementary strain $C\Delta wekM$ was constructed. The impacts of *wekM* on bacterial growth and motility were examined. The lipopolysaccharide (LPS) profile and reactivity with rabbit anti-O₁ serum of each strain were identified by silver staining and Western blotting. Real-time fluorescence quantitative PCR was conducted to determine the transcriptional levels of flagellum-related genes, and ethidium bromide was used to measure the bacterial cell membrane permeability. Finally, the drug sensitivity test was carried out to identify the bacterial susceptibility to antibiotics such as ciprofloxacin. **[Results]** The constructed $\Delta wekM$ and $C\Delta wekM$ were verified by PCR amplification and DNA sequencing. Compared with the wild type, $\Delta wekM$ showed incomplete LPS profile and absence of some O-antigen bands. Western blotting results showed that $\Delta wekM$

did not react with the anti-O₁ serum, suggesting that the loss of WekM impaired the LPS production. The deletion of *wekM* reduced the swimming motility and did not impact the bacterial growth rate compared with the wild type. The transcription levels of flagellum-related genes such as *flgC* were down-regulated in Δ *wekM*. The results implied that the reduced motility of Δ *wekM* was caused by the decrease in flagellar production. In addition, Δ *wekM* demonstrated increased cell membrane permeability compared with the wild type ($P < 0.01$), and Δ *wekM* improved bacterial sensitivity to 7 antibiotics including polymyxin. This result suggested that the adaptability of Δ *wekM* to the environment was inhibited due to the increased cell membrane permeability. **[Conclusion]** The deletion of *wekM* in APEC results in diminished swimming motility, increased antibiotic resistance, improved cell membrane permeability, and damaged LPS integrity. The findings lay a foundation for mining the role of *wekM* and enrich our understanding of the stress resistance mechanism of APEC.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli* O₁; lipopolysaccharide; O-antigen; glycosyltransferase; environmental adaptation

禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)是导致家禽局部或全身性大肠杆菌感染的主要病因。大肠杆菌病是危害家禽健康最常见的细菌性疾病,严重威胁着家禽养殖业发展和公共卫生安全。O-抗原是 APEC 血清分型的主要依据,在细菌环境适应及致病过程中具有重要作用,APEC O₁是禽致病性大肠杆菌的优势血清型之一^[1-2]。因此,研究 APEC O₁ O-抗原在细菌环境适应过程中的作用,对于禽致病性大肠杆菌防控具有重要意义。

革兰阴性菌细胞外膜由不对称的脂质双分子层组成,其表面结构在细菌响应外界环境抵抗应激的过程中起重要作用,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是外膜的重要组成成分,可以在细菌表面形成强大的保护屏障,抵御包括抗生素在内的许多有害物质^[3-5]。同时,脂多糖位于细菌表面,是细菌主要的免疫原,脂多糖可以被宿主免疫系统识别并启动宿主免疫防御系统。细菌可以通过化学修饰脂多糖逃避宿主的免疫反应,其中脂多糖缺失或不完整还会改变细菌外膜的通透性、对抗生素的耐药性、对家禽的致病力以及逃逸宿主免

疫识别的方式^[6-9]。

脂多糖主要由类脂 A、核心多糖和 O-抗原三部分组成^[10],O-抗原位于 LPS 的最外侧,与细菌的黏附力、生物被膜的形成以及致病力相关^[11-14]。大肠杆菌 O-抗原多糖链结构由主干链和侧链组成,其合成基因通常成簇存在于基因组中^[7],本研究通过生物信息学分析发现,糖基转移酶 *wekM* 负责转移 O-抗原多糖主干链中的鼠李糖(β -L-Rha)至乙酰氨基葡萄糖(β -D-GlcNAc),O-抗原基因簇和多糖结构见图 1。然而,*wekM* 基因在 APEC O₁ 中的生物学功能尚未见报道^[15]。因此,本研究以 APEC O₁ 作为野生菌株构建了 *wekM* 基因缺失株及回补株,对 WekM 介导的部分生物学特性进行探究,为进一步研究 APEC O₁ O-抗原糖基转移酶 WekM 的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

APEC O₁ 野生株由本实验室鉴定分离并保存;pKD46、pKD3、pCP20 和 pSTV28 均由韩

先干研究员惠赠; LB 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Phanta Flash Master Mix、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 和蛋白酶 K, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Ligation high ver.2, TOYOBO 公司; 大肠杆菌 O₁ 血清型 O 因子诊断血清, 天津生物芯片技术有限责任公司; 羊抗兔 IgG-HRP, 武汉爱博泰克生物科技股份有限公司; TRIzol Reagent 试剂, ThermoFisher Scientific 公司。

1.2 引物设计

本研究以 NCBI 公布的 APEC O₁ 基因组(编号为 GCF_902880315.1)、pKD3 质粒和 pSTV28

质粒为模板设计引物。引物对 *wekM*-UF/*wekM*-UR 及 *wekM*-DF/*wekM*-DR 用于扩增 *wekM* 上、下游同源臂, 引物对 *wekM*-CF/*wekM*-CR 用于扩增 pKD3 的氯霉素抗性基因, 引物对 *wekM*-outF/*wekM*-outR 用于 *wekM* 基因缺失株的鉴定。引物对 PO₁-*Kpn* I-FN/*PwekM*-RN 用于扩增 *wekM* 启动子区域, 引物对 *wekM*-FN1/*wekM*-BamH I-R 用于扩增 *wekM* 基因的编码序列(coding sequence, CDS), 引物对 PO₁-*Kpn* I-FN/*wekM*-BamH I-R 用于 *wekM* 启动子片段和 CDS 序列的融合扩增, 引物对 *wekM*-inF/*wekM*-inR 用于鉴定回补株, 引物对 *wekM*-outF/*wekM*-outR 用于鉴定缺失株。以上引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成(表 1)。

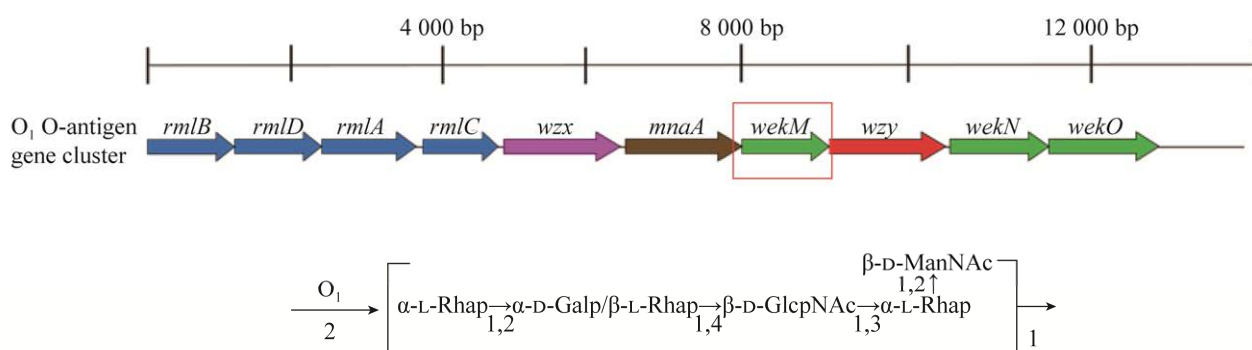


图 1 O₁ 型大肠杆菌 O-抗原基因簇和 O-抗原糖单元结构示意图

Figure 1 The O-antigen gene cluster and unit of *Escherichia coli* O₁.

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>wekM</i> -outF	GCTATGCGCAATTGAGTCAT
<i>wekM</i> -outR	CCGGTGCATCTTAATCCCAATG
<i>wekM</i> -inF	CTGGAACGACACCACACTCT
<i>wekM</i> -inR	GGTCAATAGTGCTCCCGA
<i>wekM</i> -UF	GACTGCAATTGCTATGCGCA
<i>wekM</i> -UR	CAGCCGTTAATCAATACATTACTACAGAGGAAATG
<i>wekM</i> -CF	AATGTATTGATTAACGGCTGACATGGGAAT
<i>wekM</i> -CR	AATAGTTCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>wekM</i> -DF	CAGCCTACACAGGAACTATTTGAGCGAACTAGATG
<i>wekM</i> -DR	CCGGTGCATCTTAATCCCAATG
PO ₁ - <i>Kpn</i> I-FN	CGGGGTACCTCGTTGTTATTCTGATTGTT
<i>PwekM</i> -RN	TTAATAACATTGAAAATCTGACCGGATGT
<i>wekM</i> -FN1	CATCCGGTCAGATTTTCAATGTTATTAATTATTGCTG
<i>wekM</i> -BamH I-R	CGCGGATCCTCAGCACAGTTGAGCAATAAG

1.3 *wekM* 基因缺失株和回补株的构建

采用 Red 同源重组的方法构建 *wekM* 基因缺失株^[16]。将 *wekM* 基因上、下游同源臂和氯霉素抗性基因通过 Overlap PCR 融合扩增,电转化至 APEC O₁ (pKD46)感受态细胞中,使用含有氯霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。电转化 pCP20 至阳性克隆,经 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定正确后,将缺失株命名为 Δ *wekM*。采用质粒回补法构建 *wekM* 基因回补株,使用 Overlap PCR 融合扩增 *wekM* 启动子和 CDS 序列,将融合片段与回补质粒 pSTV28 进行酶切连接得到 *wekM*-pSTV28,提取 *wekM*-pSTV28 质粒电转化至 Δ *wekM* 缺失株感受态细胞中,利用含有氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定和 DNA 测序正确后,将回补株命名为 $C\Delta$ *wekM*。

1.4 细菌 LPS 图谱分析及 Western blotting 鉴定 O₁ 血清反应特异性

参照文献[10]方法制备细菌 LPS 样品,使用硝酸银染色法鉴定各菌株的 LPS 图谱。采用 Western blotting 技术检测各菌株与大肠杆菌 O₁ 血清型 O 因子诊断血清的特异性反应。

1.5 细菌生长能力和运动能力的测定

分别将 APEC O₁、 Δ *wekM* 和 $C\Delta$ *wekM* 在 LB 中培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8),转接后继续培养,每间隔 1 h 测量菌液 OD_{600} 值,统计数据后使用 GraphPad Prism 8.0 绘制生长曲线。使用微量移液枪分别吸取 2 μ L OD_{600} 为 0.8 的 APEC O₁、 Δ *wekM*、 $C\Delta$ *wekM* 菌液加至半固体培养基中心,在培养 5 h 和 10 h 时,采用扫描仪记录细菌运动情况,同时测量运动圈直径。此外使用醋酸双氧铀对细菌进行染色,使用透射电镜观察细菌鞭毛形成情况。

1.6 细菌细胞膜通透性测定

参照文献[17]的方法检测各菌株的细胞膜通透性。将细菌接种至 LB 中,于 37°C 静置培养过夜,取 1 mL 菌液转接至 19 mL LB 中,37°C、200 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8),

从中取 10 mL 菌液收集菌体沉淀后将细菌浓度调整至 OD_{600} 为 0.4,取 2 mL OD_{600} 为 0.4 的菌液,放入 37°C 培养箱静置培养 1 h,随后加入终浓度为 6 μ mol/L 的溴化乙锭,同时设置一组细菌 PBS 混合液作为空白对照。使用荧光光谱仪测量激发波长和发射波长分别为 545 nm 和 600 nm 的荧光值,每 70 s 读取一次值,持续 30 min。

1.7 荧光定量检测分析

分别将 APEC O₁、 Δ *wekM* 和 $C\Delta$ *wekM* 在 LB 培养基中培养至对数生长期,使用 TRIzol 法提取细菌 RNA。使用焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理的水溶解 RNA 后检测 RNA 浓度和纯度,将所得 RNA 反转录为 cDNA 后置于-80°C 备用。

使用荧光定量 PCR 仪(Agilent 公司)检测鞭毛相关基因转录水平。所有引物均由杭州有康生物科技有限公司合成(表 2)。

表 2 qRT-PCR 所用引物

Table 2 The primer sequences for qRT-PCR

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>flgB</i> -RT-F	AACAAGAGGTGCTCAATC
<i>flgB</i> -RT-R	AGTTCTGCGGTAGGAGGC
<i>flgC</i> -RT-F	CGTAAAGGTTGCCGATGT
<i>flgC</i> -RT-R	GTATTGACCGAGCGTAAGG
<i>flgD</i> -RT-F	ACCACCGATCCGACAAATACCG
<i>flgD</i> -RT-R	CGCCACCAACAAAGTCAGAAA
<i>flgE</i> -RT-F	CTTTACCGATGGCAGCAGAC
<i>flgE</i> -RT-R	TATTCACCAGGTTACGATTT
<i>fimA</i> -RT-F	TGCTGTCGGTTTTAACATTC
<i>fimA</i> -RT-R	ACCAACGTTTGTTCGCTAC
<i>fliC</i> -RT-F	CCTGAACAACACCACTACCA
<i>fliC</i> -RT-R	TGCTGGATAATCTGCGCTTT
<i>fliF</i> -RT-F	GGTGGATCAGGGCGGACA
<i>fliF</i> -RT-R	CGTTACCAACAATAGGCGACAG
<i>fliM</i> -RT-F	CCTGAACCTTATCCATCTAAAACCG
<i>fliM</i> -RT-R	TCCATCGCCGCCAAACA
<i>fliY</i> -RT-F	AGCACCAAACCATTTTTTCGGA
<i>fliY</i> -RT-R	GCTGCGTAAAGGAAATGAAGACC
<i>flhC</i> -RT-F	GGCTGGTGAGCGTGGGTAATA
<i>flhC</i> -RT-R	AGTGCCCGCAAGCAGAAGAAG
<i>motA</i> -RT-F	GGCAATAATGGCAAAGCGAT
<i>motA</i> -RT-R	CAGCGAAAACATCCCCATCT
16S rRNA-F	TTTGAGTTCCCGGCC
16S rRNA-R	CGGCCGCAAGGTAA

1.8 细菌药敏试验

分别将 APEC O₁、 Δ *wekM* 和 C Δ *wekM* 在 LB 培养基中培养至对数生长期, 使用细菌比浊仪将各菌液浓度调至 0.5 个麦氏单位。将抗生素加入 96 孔板中并依次进行倍比稀释, 在稀释好的抗生素中加入菌液, 设置抗生素与培养基为阴性对照孔, 设置菌液与培养基为阳性对照孔, 放置于 37 °C 培养箱培养 16 h, 用酶标仪测量混合物的 OD₆₀₀ 值, 将测量孔与阴性孔内液体的 OD₆₀₀ 值大小进行比较, 数值小于或等于阴性对照孔则表明所加药物浓度可抑制微孔内细菌生长, 抑制细菌生长所使用的最低药物浓度为最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.9 统计分析

使用 Adobe Illustrator 2020 进行图片处理, 使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析, 所有结果均重复 3 次以上, 使用 *t*-test 检验分析各组差异, 结果采用平均值 \pm SD。其中 * 表示 0.01 < *P* < 0.05, ** 表示 *P* < 0.01, *** 表示 *P* < 0.001, ns 表示 *P* > 0.05。

2 结果与分析

2.1 Δ *wekM* 与 C Δ *wekM* 的 PCR 鉴定

使用引物对 *wekM*-outF/*wekM*-outR 鉴定 *wekM* 基因缺失株。PCR 扩增结果显示, 以野生株为模板可扩增出大小为 1 887 bp 的条带, 以缺失株为模板可扩增出大小为 1 125 bp 的条带, 缺失株较野生株长度减少 762 bp, 缺失株 Δ *wekM* 构建成功 (图 2A)。使用引物对 *wekM*-inF/*wekM*-inR 鉴定 *wekM* 基因回补株, PCR 扩增结果显示, *wekM* 基因以 APEC O₁ 和 *wekM* 基因回补株为模板均可扩增出大小为 399 bp 的 *wekM* 基因片段, 以 Δ *wekM* 为模板未扩增出条带, 回补株 C Δ *wekM* 构建成功 (图 2B)。

2.2 细菌 LPS 图谱分析及与 O₁ 因子血清反应特性鉴定

对 APEC O₁、 Δ *wekM* 和 C Δ *wekM* 菌株的 LPS 样品进行银染鉴定, 结果显示 *wekM* 缺失后 APEC O₁ 未能形成完整的 O-抗原梯状条带 (图 3A), O-抗原链消失。这表明 *wekM* 缺失导致

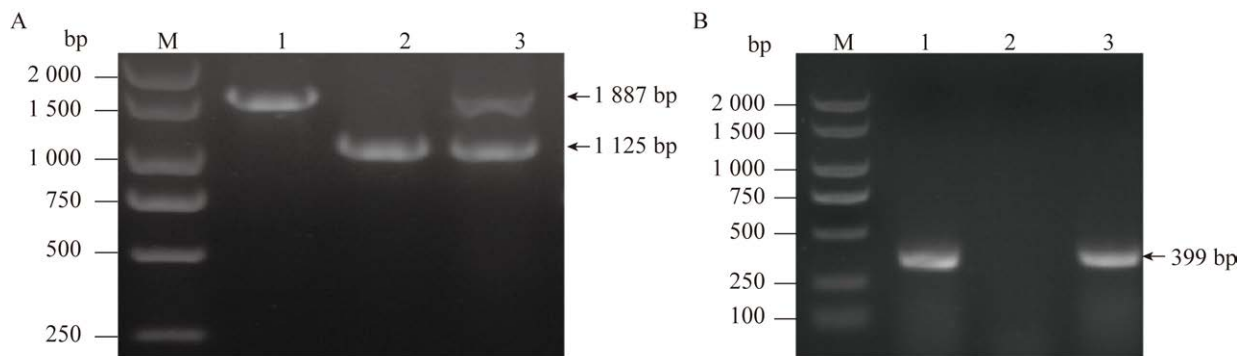


图 2 缺失株和回补株 PCR 鉴定结果 A: 使用外侧引物对 *wekM*-outF/*wekM*-outR 鉴定缺失株. B: 使用内侧引物对 *wekM*-inF/*wekM*-inR 鉴定缺失株和回补株. 泳道 M、1、2 和 3 分别为 DL2000 DNA Marker、APEC O₁、 Δ *wekM* 和 C Δ *wekM*

Figure 2 Identification of the mutant strain and complementation strain with PCR. A: Identification of Δ *wekM* mutant strain with *wekM*-outF/*wekM*-outR primer pair. B: Identification of Δ *wekM* and C Δ *wekM* strain with *wekM*-inF/*wekM*-inR primer pair. Lane M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: APEC O₁; Lane 2: Δ *wekM*; Lane 3: C Δ *wekM*.

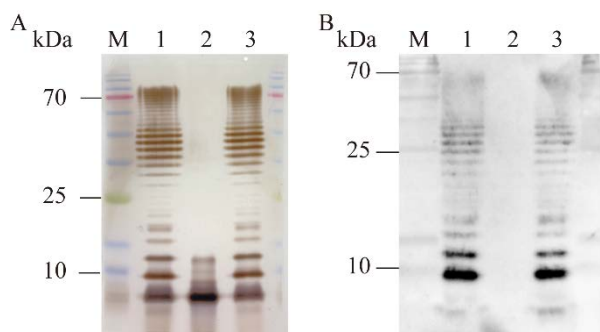


图 3 LPS 的银染(A)及 Western blotting (B)鉴定结果 泳道 M、1、2 和 3 分别为 180 kDa Protein Marker、APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$

Figure 3 Silver staining (A) and Western blotting (B) identification of LPS profiles. Lane M: 180 kDa Protein Marker; Lane 1: APEC O₁; Lane 2: $\Delta wekM$; Lane 3: $C\Delta wekM$.

APEC O₁ O-抗原合成受阻,使 APEC O₁ LPS 不完整。Western blotting 结果显示, APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$ 菌株的 LPS 与 O₁型大肠杆菌 O 因子血清的反应能力不同, APEC O₁ 的 LPS 样品与 O₁血清孵育产生梯状条带,而 $\Delta wekM$ 与

O₁血清孵育未产生条带(图 3B)。上述结果表明 $wekM$ 参与 O-抗原合成,在 APEC O₁ 与 O₁血清的反应中发挥重要作用。

2.3 细菌生长能力和运动能力测定

生长曲线结果显示: APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$ 之间生长能力均无显著差异($P>0.05$) (图 4A), 这表明 $wekM$ 不影响 APEC O₁ 的生长能力。测量细菌在半固体培养基中运动圈直径大小,结果显示 APEC O₁ 与 $\Delta wekM$ 运动圈直径大小差异极显著($P<0.001$) (图 4B、4C), 这表明 $wekM$ 缺失后细菌运动能力丧失。

2.4 鞭毛转录水平及表达情况检测

实时荧光定量 PCR 结果显示, $\Delta wekM$ 较野生株鞭毛相关基因($flgB$ 、 $flgC$ 、 $flgD$ 、 $flgE$ 、 $fimA$ 、 $fliC$ 、 $fliF$ 、 $fliM$ 、 $fliY$ 、 $flhC$ 和 $motA$)转录水平下调 32 倍以上(图 5A), 结果表明 $wekM$ 缺失会抑制组装合成鞭毛的相关基因转录。透射电镜结果显示, 野生株和回补株菌体周围均有鞭毛, 而 $\Delta wekM$ 的菌体周围未见鞭毛(图 5B), 表明 $\Delta wekM$ 较野生株的鞭毛形成受阻。

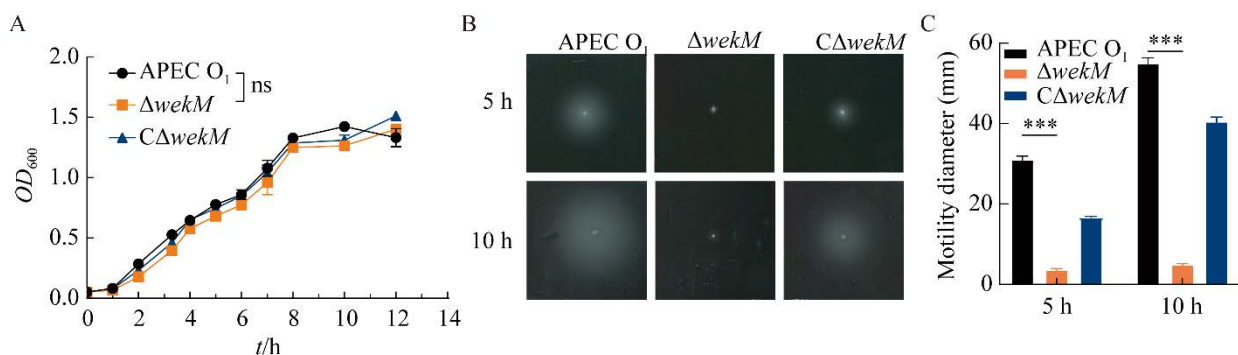


图 4 APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$ 菌株生长(A)和运动(B 和 C)能力检测 A: APEC 菌株在 LB 培养基中生长 12 h 的生长曲线. B: APEC 菌株在半固体琼脂培养基中的运动能力测定. C: 细菌运动圈直径大小差异分析. ***表示 $P<0.001$; ns 表示 $P>0.05$

Figure 4 Determination of bacterial growth curves (A) and swimming motility (B, C) of APEC O₁, $\Delta wekM$, and $C\Delta wekM$. A: Growth curve of APEC strains grown in LB medium for 12 h. B: Determination of swimming motility of APEC strains in semi-solid agar plate. C: Analysis of the difference in size of bacterial swimming motility circle diameter. ***: $P<0.001$; ns: $P>0.05$.

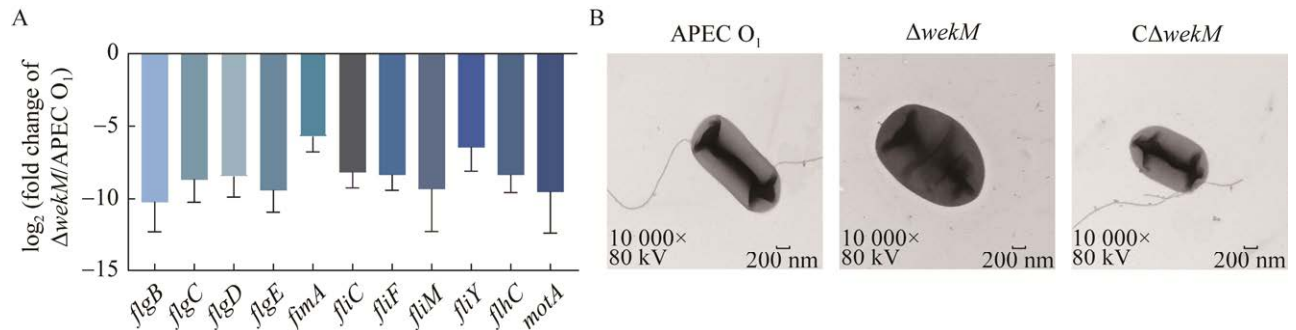


图 5 APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$ 菌株鞭毛相关基因转录水平检测(A)及鞭毛透射电镜图(B)

Figure 5 Transcription levels of flagella-related genes (A) and transmission electron micrographs of flagellum of APEC O₁, $\Delta wekM$, and $C\Delta wekM$ (B).

2.5 细菌细胞膜通透性测定

通过添加溴化乙锭进一步检测乙锭-核酸复合物的荧光值,从而测定细菌细胞膜通透性,结果显示 $\Delta wekM$ 细胞膜通透性显著高于野生株 ($P < 0.01$),表明 *wekM* 缺失后细菌细胞膜通透性增加(图 6)。

2.6 细菌药敏试验

MIC 结果显示, $\Delta wekM$ 对孢噻肟和头孢西

丁的 MIC 值为 256.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与野生株相同(表 3); 但是 $\Delta wekM$ 对环丙沙星、克林霉素、多黏菌素、磷霉素、万古霉素、多西环素和阿莫西林的 MIC 值分别为 0.06、(6.67 \pm 2.31)、(0.02 \pm 0.01)、4.00、4.00、(5.33 \pm 2.31)和 8.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 较野生株的 MIC 值显著降低($P < 0.01$) (表 3),表明 *wekM* 缺失后 APEC O₁ 对环丙沙星、克林霉素、多黏菌素、磷霉素、万古霉素、多西环素和阿莫西林

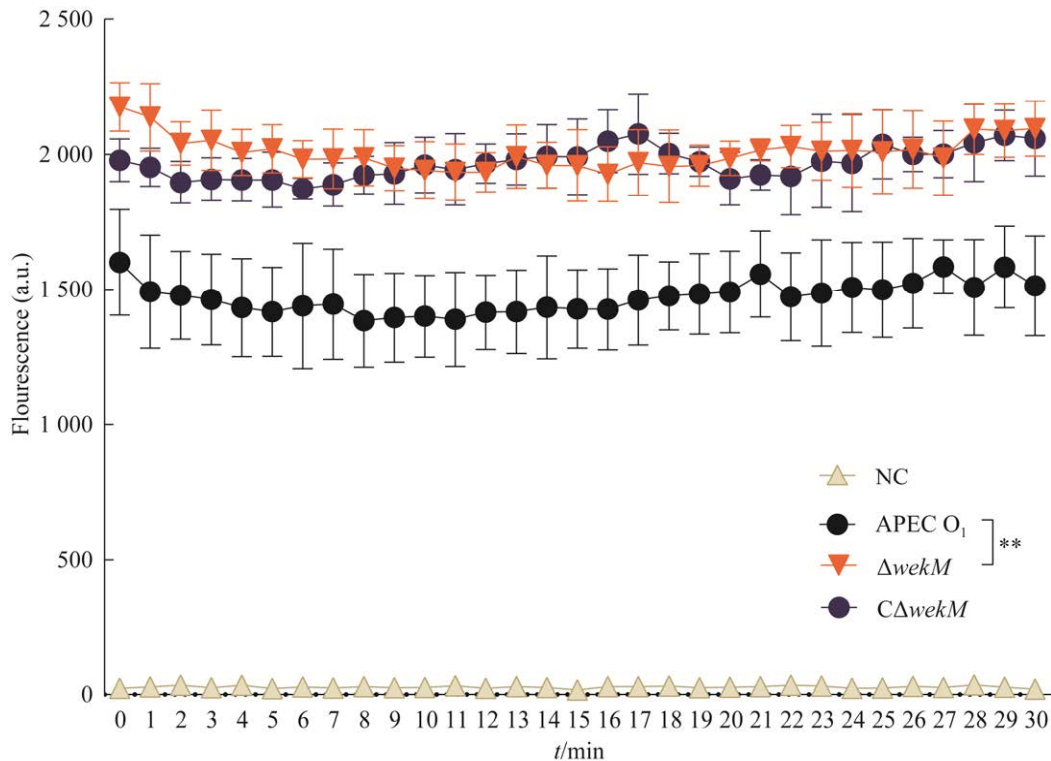


图 6 APEC O₁、 $\Delta wekM$ 和 $C\Delta wekM$ 菌株细胞膜通透性检测

Figure 6 Cell membrane permeability detection for APEC O₁, $\Delta wekM$, and $C\Delta wekM$. **: $P < 0.01$.

表 3 *wekM* 基因对抗生素耐药性的影响Table 3 Effect of *wekM* gene on antibiotic resistance

Agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	APEC O ₁	$\Delta wekM$	C $\Delta wekM$
Ciprofloxacin	0.21 \pm 0.07	0.06 \pm 0.00**	0.21 \pm 0.07
Clindamycin	26.67 \pm 9.24	6.67 \pm 2.31**	18.67 \pm 12.22
Polymyxin	0.06 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01**	0.03 \pm 0.00
Fosfomycin	16.00 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00**	16.00 \pm 0.00
Vancomycin	16.00 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00**	16.00 \pm 0.00
Doxycycline	10.67 \pm 4.62	5.33 \pm 2.31**	8.00 \pm 6.93
Amoxicillin	53.33 \pm 18.48	8.00 \pm 0.00	32.00 \pm 0.00
Cefotaxime	256.00 \pm 0.00	256.00 \pm 0.00	256.00 \pm 0.00
Cefoxitin	256.00 \pm 0.00	256.00 \pm 0.00	256.00 \pm 0.00

与 APEC O₁ 比较, **表示 $P < 0.01$

Comparison with APEC O₁, ** indicates $P < 0.01$.

药物的敏感性显著增加, 提示 *wekM* 缺失后改变了细菌对抗生素的敏感性。

3 讨论与结论

近年来, 对禽致病性大肠杆菌 LPS 结构、组成和编码基因簇方面的研究, 为进一步探索该菌的环境适应、耐药传递机制、药物作用靶点以及防控技术开发提供了研究基础^[7]。LPS 作为外膜小叶中的主要糖脂, 能够形成二价阳离子层, 为细菌提供渗透性屏障, 维持细菌胞膜稳定性, 并抵抗抗生素等有害物质^[18]。研究表明 LPS 结构的微小变化会显著影响细胞膜的理化性质, 包括细胞膜通透性和表面电荷发生改变, 从而影响细菌抵抗宿主体内外胁迫环境^[6,19-21]。O-抗原合成相关基因缺失会影响 LPS 的正常表达, 从而影响胞膜结构完整性和细菌毒力^[22-27]。糖基转移酶负责单糖之间的连接, 在 O-抗原合成中发挥重要作用, 目前关于糖基转移酶基因对 LPS 和 O-抗原完整性和结构的影响鲜有报道。本研究通过敲除 O-抗原糖基转移酶 *wekM*, 并分析其对于 APEC O₁ 的生长运动、细胞膜通透性、抗生素敏感性以及鞭毛形成的影响, 以揭示 *wekM* 在细菌

结构和环境适应中的功能。

本研究首先通过银染法鉴定了 *wekM* 参与 APEC O₁ LPS 的合成, *wekM* 缺失后 APEC O₁ 的 LPS 多糖链合成受损。Western blotting 进一步分析发现, *wekM* 缺失后 APEC O₁ 丧失了与 O₁ 型血清的反应能力, 这表明 *wekM* 缺失后会影 O-抗原完整性和血清反应性, 可能在细菌血清分型和进化的过程中发挥重要作用, 这也提示该基因有可能是细菌血清分型的重要分子靶点。

本研究结果显示 *wekM* 对细菌运动能力起关键性作用, 这与黄色粘球菌和鼠伤寒沙门菌的相关报道一致, 即 O-抗原多糖侧链及 LPS 突变会使细菌出现运动缺陷^[28-29]。本研究进一步通过透射电镜观察细菌鞭毛形成情况, 结果表明 *wekM* 基因缺失会使 APEC O₁ 无法形成鞭毛。实时荧光定量 PCR 结果进一步显示 *wekM* 基因缺失后鞭毛相关基因转录水平下降。因此, 认为糖基转移酶 *wekM* 缺失导致鞭毛合成基因转录水平下调, 从而阻碍鞭毛合成和组装的过程, 最终使细菌鞭毛无法正常形成。O-抗原合成受阻为什么会引起鞭毛变化, 其具体机制还有待研究。

此外, *wekM* 基因缺失后 APEC O₁ 的细胞膜通透性增加, 提示 O-抗原结构的改变会导致细菌内环境稳态和细胞膜磷脂双分子层发生改变^[30]。细胞膜磷脂双分子层是阻止抗生素进入胞内的物理屏障, 也是多种抗生素识别细菌、发挥杀伤作用的生化结构, 其中 LPS 就是多黏菌素等抗生素的作用靶点^[31]。那么, *wekM* 缺失导致细胞膜通透性增强后是否会影响细菌的抗生素敏感性呢? 本研究中 MIC 检测结果表明, *wekM* 缺失提高了细菌对环丙沙星、多黏菌素等 7 种抗生素的敏感性, 推测是由于 *wekM* 缺失导致 LPS 结构缺损引起细胞膜通透性等理化性质发生改变而使抗生素更易进入细菌, 最终导致细菌抗生素的敏感性增高。

综上所述, 本研究首次探究了 O-抗原多糖主干链糖基转移酶 *wekM* 基因在脂多糖合成和维持细菌细胞膜通透性的作用, 为进一步研究 O-抗原在鞭毛蛋白的正常表达以及对抗生素等胁迫环境中的具体作用奠定了研究基础。

参考文献

- [1] KATHAYAT D, LOKESH D, RANJIT S, RAJASHEKARA G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies[J]. *Pathogens*, 2021, 10(4): 467.
 - [2] PAUDEL S, FINK D, ABDELHAMID MK, ZÖGgeler A, LIEBHART D, HESS M, HESS C. Aerosol is the optimal route of respiratory tract infection to induce pathological lesions of colibacillosis by a *lux*-tagged avian pathogenic *Escherichia coli* in chickens[J]. *Avian Pathology*, 2021, 50(5): 417-426.
 - [3] LI XZ, PLÉSIAT P, NIKAIIDO H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(2): 337-418.
 - [4] MÜHLRADT PF, GOLECKI JR. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 51(2): 343-352.
 - [5] PUTKER F, BOS MP, TOMMASSEN J. Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(6): 985-1002.
 - [6] DOMÍNGUEZ-MEDINA CC, PÉREZ-TOLEDO M, SCHAGER AE, MARSHALL JL, COOK CN, BOBAT S, HWANG H, CHUN BJ, LOGAN E, BRYANT JA, CHANNELL WM, MORRIS FC, JOSSI SE, ALSHAYEA A, ROSSITER AE, BARROW PA, HORSNELL WG, MACLENNAN CA, HENDERSON IR, LAKEY JH, et al. Outer membrane protein size and LPS O-antigen define protective antibody targeting to the *Salmonella* surface[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 851.
 - [7] WHITFIELD C, TRENT MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2014, 83: 99-128.
 - [8] MURRAY GL, ATTRIDGE SR, MORONA R. Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(7): 2735-2739.
 - [9] MOFFATT JH, HARPER M, HARRISON P, HALE JDF, VINOGRADOV E, SEEMANN T, HENRY R, CRANE B, ST MICHAEL F, COX AD, ADLER B, NATION RL, LI J, BOYCE JD. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(12): 4971-4977.
 - [10] HITCHCOCK PJ, BROWN TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(1): 269-277.
 - [11] SIMPSON BW, TRENT MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 403-416.
 - [12] MARTORANA AM, MOTTA S, Di SILVESTRE D, FALCHI F, DEHÒ G, MAURI P, SPERANDEO P, POLISSI A. Dissecting *Escherichia coli* outer membrane biogenesis using differential proteomics[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100941.
 - [13] SPERANDEO P, MARTORANA AM, POLISSI A. Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of Gram-negative bacteria[J]. *Bacterial Cell Walls and Membranes*, 2019, 92: 9-37.
 - [14] VALVANO MA. Export of O-specific lipopolysaccharide[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2003, 8: s452-s471.
 - [15] HAN Y, LUO P, ZENG H, WANG P, XU JL, CHEN PJ, CHEN XD, CHEN YJ, CAO QY, ZHAI RD, XIA J, DENG SM, CHENG AC, CHENG CY, SONG HH. The effect of O-antigen length determinant wzz on the immunogenicity of *Salmonella* Typhimurium for *Escherichia coli* O₂ O-polysaccharides delivery[J]. *Veterinary Research*, 2023, 54(1): 15.
 - [16] 连丽燕, 宋祥军, 蒋胡艳, 陈兆国, 蒋蔚, 韩先干, 祁克宗. VI型分泌系统分泌蛋白 ClpV 对禽致病性大肠杆菌生物学特性的影响[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(8): 848-853.
- LIAN LY, SONG XJ, JIANG HY, CHEN ZG, JIANG W, HAN XG, QI KZ. Effects of type VI secretion system secreted protein ClpV on biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(8): 848-853 (in Chinese).

- [17] MURATA T, TSENG W, GUINA TN, MILLER SI, NIKAIIDO H. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(20): 7213-7222.
- [18] NILSSON C, SKOGLUND A, MORAN AP, ANNUK H, ENGSTRAND L, NORMARK S. Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3811.
- [19] LIMA S, GUO MS, CHABA R, GROSS CA, SAUER RT. Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress[J]. *Science*, 2013, 340(6134): 837-841.
- [20] NIKAIIDO H, VAARA M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1985, 49(1): 1-32.
- [21] MALDONADO RF, SÁ-CORREIA I, VALVANO MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(4): 480-493.
- [22] WISEMAN B, NITHARWAL RG, WIDMALM G, HÖGBOM M. Structure of a full-length bacterial polysaccharide co-polymerase[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 369.
- [23] WOODWARD R, YI W, LI L, ZHAO GH, EGUCHI H, SRIDHAR PR, GUO HJ, SONG JK, MOTARI E, CAI L, KELLEHER P, LIU XW, HAN WQ, ZHANG WP, DING Y, LI M, WANG PG. *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6: 418-423.
- [24] ISLAM ST, LAM JS. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, 60(11): 697-716.
- [25] TRENT MS, PABICH W, RAETZ CR, MILLER SI. A PhoP/PhoQ-induced lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 9083-9092.
- [26] VALVANO MA, MESSNER P, KOSMA P. Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-manno-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides[J]. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 7): 1979-1989.
- [27] SWEENEY RP, LOWARY TL. New insights into lipopolysaccharide assembly and export[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 53: 37-43.
- [28] FINK JM, ZISSLER JF. Defects in motility and development of *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide mutants[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(4): 2042-2048.
- [29] TOGUCHI A, SIANO M, BURKART M, HARSHEY RM. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(22): 6308-6321.
- [30] 马鹏, 胡晓清, 陈久洲, 王小元. 大肠杆菌细胞外膜渗透性与脂多糖结构的关系[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1307-1315.
- MA P, HU XQ, CHEN JZ, WANG XY. The effect of the structure of lipopolysaccharide on the permeability of *Escherichia coli* cell membranes[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(8): 1307-1315 (in Chinese).
- [31] CHEN QW, QUAN H, YU YF, LIU DH, LI CY, CHU YF, GONG XW. EptA of *Riemerella anatipestifer* mediates phenotypes involved in colistin resistance and virulence[J]. *Faseb Journal*, 2023, 37(5): e22928.