

pagP 基因对禽致病性大肠杆菌抗菌肽抗性和致病性的影响

宋祥军 李春晓 祁克宗* 涂健 薛媚 尹磊

(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 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)不仅严重影响全球的养禽业,对人类公共健康也造成巨大的潜在威胁。*pagP* 基因在细菌的抗菌肽抗性和致病性方面发挥重要作用,但关于 *pagP* 基因在 APEC 中的功能尚不清楚。本文构建禽致病性大肠杆菌 *pagP* 基因缺失株,对缺失株的抗菌肽抗性和致病性进行研究。【方法】利用 Red 重组系统构建 APEC 的 *pagP* 基因缺失株,然后利用回复质粒构建回复株。研究 *pagP* 基因对细胞黏附与入侵、生物被膜形成能力、外膜渗透性、抗菌肽敏感性、致病性等方面的影响。【结果】成功构建 *pagP* 基因缺失株和回复株,抗菌肽抗性试验发现 *pagP* 基因缺失株对多粘菌素 B、鸡β-防御素 2 (AVBD2)的敏感性显著增加($P<0.01$),致病性试验结果表明 *pagP* 基因缺失株的毒力显著降低($P<0.01$)。【结论】APEC 的 *pagP* 基因对 AVBD2 的敏感性和 APEC 的致病性密切相关,为深入研究 *pagP* 基因的功能及调控作用奠定了基础。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, *pagP* 基因, 抗菌肽, 致病性

Effects of *pagP* gene of avian pathogenic *Escherichia coli* on its antimicrobial peptide resistance and pathogenicity

SONG Xiang-Jun LI Chun-Xiao QI Ke-Zong* TU Jian XUE Mei YIN Lei

(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) leads to significant economic losses in poultry production, and affects public health. *pagP* gene plays key roles in pathogenicity and antimicrobial peptide resistance of bacteria. However, the function of *pagP* in APEC is still unknown. To determine the antibacterial peptide resistance and pathogenicity of *pagP* mutant strain, APEC *pagP* mutant strain was constructed. [Methods] We constructed APEC-*pagP* mutant strain with red recombination system, and the corresponding complementary strain was also constructed. We detected the effects of *PagP* in cell adhesion and invasion, biofilm-forming ability, outer membrane permeability, antibacterial peptide sensitivity and pathogenicity. [Results] *pagP* mutant

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31372402); Introduction and Stabilization of Talent Research Project of Anhui Agricultural University (No. yj2017-31)

*Corresponding author: Tel: 86-551-65785310; E-mail: qkz@ahau.edu.cn

Received: May 26, 2017; Accepted: October 09, 2017; Published online (www.cnki.net): October 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31372402); 安徽农业大学引进与稳定人才项目(No. yj2017-31)

*通讯作者: Tel: 86-551-65785310; E-mail: qkz@ahau.edu.cn

收稿日期: 2017-05-26; 接受日期: 2017-10-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-10-16

strain and complementary strain were successfully constructed. The antimicrobial peptide resistance tests showed that *pagP* mutant strain was more sensitive to Polymyxin B and AVBD2 ($P < 0.01$). The pathogenic test showed a significantly reduction of toxicity in *pagP* mutant strain ($P < 0.01$).

[Conclusion] *pagP* gene in APEC played important roles in resistance to AVBD2 and pathogenicity in APEC.

Keywords: APEC, *pagP* gene, Antimicrobial peptide, Pathogenicity

禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)是肠外致病性大肠杆菌, 可以导致禽类出现全身性感染, 严重影响全球的养禽业。基因水平研究发现, APEC 与人源肠外致病性大肠杆菌基因相似性较高, 并有一些共同的毒力基因^[1-2]。此外, APEC 可以通过食源性途径传播给人类, 是人源肠外致病性大肠杆菌毒力基因的潜在贮存宿主^[3]。加强对 APEC 研究, 不仅有助于养禽业的发展, 也具有较大的公共卫生学意义^[4]。

防御素作为最重要的一类抗菌肽, 分为 α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素, 其抗菌谱广, 不易产生耐药性^[5]。鸡 β -防御素 2 (Avian beta-defensins 2, AVBD2)是 β -防御素家族的重要一员, 是一类具有良好应用前景的抗生素替代品。*pagP* 基因广泛存在于各种细菌中, 参与调控细菌对抗菌肽的敏感性, Guo 等^[6]研究发现 *pagP* 基因缺失会导致革兰氏阴性菌对多粘菌素 B 的敏感性增加, Yang 等^[7]研究发现大肠杆菌 *pagP* 基因缺失株对抗菌肽 LL-37 的抵抗力下降。*pagP* 是棕榈酰转移酶基因, 可以对细菌外膜 LPS 的类脂 A 进行棕榈酰化^[8], 类脂 A 的这种棕榈酰化与细菌的致病性密切相关^[9-10]。AVBD2 对 APEC 有较强的抗菌活性^[11], 但 APEC 的 *pagP* 基因对 AVBD2 的敏感性以及细菌毒力的作用尚不清楚。本研究利用 Red 重组系统构建禽致病性大肠杆菌 *pagP* 基因缺失株, 研究 *pagP* 基因缺失后 APEC 对抗菌肽 AVBD2 的敏感性的变化, 以及细菌致病性的影响, 为进一步研究 *pagP* 基因在 APEC 与抗菌肽互作和致病中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株、细胞和试验动物

禽致病性大肠杆菌 AE17 菌株为安徽临床分离

株, O2 血清型^[12]。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、鸡胚成纤维细胞(DF-1)、pKD3、pKD46、pCP20、pSTV-28a、pZero-back 载体均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; 罗曼鸡购自安徽省安禽禽业有限公司。

1.2 主要药物、试剂、培养基和仪器

氯霉素、氨苄青霉素、多粘菌素 B、酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠、琼脂糖、质粒小量提取纯化试剂盒和双抗储存液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; AVBD2 通过本实验室建立的方法制备^[12]; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; SYBR Green PCR Master Mix、RNA 反转录试剂盒购于美国 Promega 公司; 2 \times PCR Mix、高保真 PCR Mix、DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司; DMEM 基本培养液购自 Life 公司; 胎牛血清购自 HyClone 公司。

磷酸盐缓冲液(PBS, g/L): NaCl 8.0, KCl 0.2, KH₂PO₄ 0.2, pH 7.2, 1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 15 min。LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, pH 7.4, 固体培养基加入终浓度为 1.5% (质量体积比)的琼脂, 1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 15 min。运动性培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 葡萄糖 8.0, 琼脂 3.0, 刚果红 0.05, 0.8 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min。

高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; PCR 扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, 北京新技术公司; 电转化仪, 美国 BTX 公司; 紫外分光光度计, 日本岛津公司; 核酸蛋白分析仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 荧光分光光度计, 日本 HITACHI 公司。

1.3 引物设计

根据 NCBI GenBank 公布的禽致病性大肠杆菌

pagP 基因序列, 利用 Premier 5.0 软件分别设计引物(表 1): *pagP* 基因上下游序列的 2 对引物 *pagP*-UF/*pagP*-UR 和 *pagP*-DF/*pagP*-DR; 扩增氯霉素抗性基因的引物 Cat-lap-*pagP*-F/Cat-lap-*pagP*-R; 构建 *pagP* 基因回复株的引物 *pagP*-C-BamH I-F/*pagP*-C-Hind III-R; 鉴定 *pagP* 基因缺失株和回复株引物 *pagP*-R/*pagP*-F、*pagP*-out-F/*pagP*-out-R、*pagP*-IF/*pagP*-IR、*pagP*-UF/Cat-lap-*pagP*-R。通过 M13-R/M13-F 鉴定含有 *pagP* 回复片段与 pSTV-28a 载体是否连接成功。其中 *pagP*-UR、*pagP*-DR、*pagP*-DF/*pagP*-DR 与 Cat-lap-*pagP*-F/Cat-lap-*pagP*-R 引物 5'端均带有用于进行重叠 PCR (Overlap-PCR) 的反向互补的 20 个碱基。

表 1 *pagP* 缺失株和回复株的引物序列
Table 1 Primers used in the gene deletion and complemented strains

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	大小 Sizes (bp)
<i>pagP</i> -UF	GCGAGCTACACCCACAAT	787
<i>pagP</i> -UR	AAGCAGCTCCAGCCTACAAA TGTTTCAGGCTGT	
Cat-lap- <i>pagP</i> -F	GGCAACAGCCTGAACATTTGT AGGCTGGAGCT	1 013
Cat-lap- <i>pagP</i> -R	GCATCCAGGCAAAGTACACA TATGAATATCCT	
<i>pagP</i> -DF	AGGATATTCATATGTGTACTT TGCTGGATGC	940
<i>pagP</i> -DR	CACCTCCTGTCAGAGTCGTA	
<i>pagP</i> -IF	GATTTATATATTCCTGCCATC ACCT	384
<i>pagP</i> -IR	CCCGGAATGTAGGTCATCTGA	
<i>pagP</i> -out-F	ACCAGAATAGTGATGATG	2 961
<i>pagP</i> -out-R	CATCAACGAGCCACAAATCT	
<i>pagP</i> -C-BamH I-F	CGCGGATCCCGATGAACGTG AGTAAATATG	1 249
<i>pagP</i> -C-Hind III-R	CCCAAGCTTGTGAGCCGCTCTT CCGGAGT	
<i>pagP</i> -UF	GCGAGCTACACCCACAAT	1 155
Cat-lap- <i>pagP</i> -R	GCGTGTACGGTGAAAACCT GGCCTAT	
<i>pagP</i> -F	ATGAACGTGAGTAAATA	547
<i>pagP</i> -R	GCATCCAGGCAAAGTACA	
M13-R	TTGTAACGACGGCCAG	918
M13-F	CAGGAAACAGCTATGACC	

1.4 缺失株的构建

扩增 *pagP* 基因上下游同源臂序列以及氯霉素抗性片段, 使用 Overlap-PCR 的方法扩增出含有氯霉素抗性基因的 *pagP* 同源重组片段。将同源重组片段电转化导入含有 pKD46 的 AE17 的感受态细胞^[13]。氯霉素阳性重组子进行 PCR 鉴定后, 电转导入 pCP20 质粒, 在含有双抗性 LB 平板上 28 °C 培养 48 h。将阳性转化子 42 °C、200 r/min 培养过夜后, PCR 鉴定氯霉素抗性是否消除并测序。鉴定成功的阳性重组子菌株命名为 $\Delta pagP$ 。

1.5 回复株的构建

以 AE17 菌株基因组为模板, 扩增出含有启动子的 *pagP* 基因回复片段, 进行 Hind III 和 BamH I 双酶切, 与 pSTV-28a 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , PCR 鉴定并测序。提取 pSTV-28a-*pagP* 质粒, 提取的质粒电转化导入 *pagP* 基因缺失株 $\Delta pagP$ 中, 鉴定成功的菌株命名为 *CpagP*。

1.6 生长曲线测定

平板上挑取 AE17 (野生株)、 $\Delta pagP$ (缺失株)和 *CpagP* (回复株)的单菌落接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养, 每间隔 1 h 取样测定 OD_{600} 数值, 根据 OD_{600} 数值绘制出细菌的生长曲线。上述试验重复 3 次。

1.7 运动性测定

从平板上挑取 AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 的单菌落接种到 LB 液体培养基中, 在对数期 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后 PBS 洗涤。分别将 AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 的菌液调到 OD_{600} 为 1.0, 取 10 μ L 滴于运动性培养基中央, 然后在 37 °C 培养箱中培养过夜, 次日记录菌圈大小。上述试验重复 3 次。

1.8 细胞的黏附和入侵试验

DF-1 细胞接种于 24 孔细胞培养板中, 将 AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 按 MOI 为 200 加入 24 孔细胞培养板中。500 r/min 离心 5 min, 细胞培养箱中 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 1.5 h, PBS 洗涤。黏附细胞试验组加入 0.5% Triton X-100 (200 μ L/孔), 室温作用 10 min, 采用平板计数法^[14]进行细菌计

数。入侵细胞试验组每孔加入 1 mL DMEM 完全培养液, 二氧化碳细胞培养箱中 37 °C 培养 1 h, PBS 洗涤, 加入 0.5% Triton X-100 裂解细胞(200 μ L/孔), 平板计数法进行细菌计数^[14]。以上试验重复 3 次。

1.9 生物被膜形成能力检测

将 AE17、 Δ *pagP* 和 *CpagP* 菌株培养至对数中期, 采用改良结晶紫半定量法^[15]。检测生物被膜形成能力: 将菌液稀释到 OD_{600} 为 0.1, 每孔加入 200 μ L 菌液, LB 培养基作为对照, 置于 37 °C 培养 30 h, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 自然风干; 每孔 100 μ L 0.1% 结晶紫, 室温染色 30 min, PBS 洗 3 次, 自然风干; 加入乙醇, 酶标仪测定 OD_{595} 。以上试验重复 3 次。

1.10 外膜渗透性的测定

细菌外膜渗透性的检测采用 NPN 探针法^[16], 将 37 °C、200 r/min 培养过夜的 AE17、 Δ *pagP* 和 *CpagP* 菌液转接至 LB 液体培养基(30 mL), 培养至 OD_{600} 为 1.2。3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 洗涤后重悬(OD_{600} 为 0.5)。分别取 AE17、 Δ *pagP* 和 *CpagP* 菌株 1.92 mL 的菌悬液、NPN 溶液(1 mmol/L) 80 μ L, 加入石英比色皿迅速混匀, 测量其荧光吸收值。以上试验重复 3 次。

1.11 抗菌肽的敏感性检测

从培养平板分别挑取 AE17、 Δ *pagP* 和 *CpagP* 菌株的单菌落, 37 °C、200 r/min 培养过夜后取 10 μ L 培养的菌液, 加入待凝固的 LB 固体培养基中, 混匀后倒平板。用 7 mm 打孔器打孔。孔内分别点接等体积的多粘菌素 B (2.5 μ g/mL)、AVBD2^[17] (32 μ g/mL), 对照组加入 PBS。置于 37 °C 培养 24 h, 记录抑菌圈的直径。试验重复 3 次。

1.12 半数致死量(LD₅₀)的测定

7 日龄罗曼鸡, 随机分为 6 组, 每组 8 只。将 AE17、 Δ *pagP* 和 *CpagP* 培养至对数期, PBS 洗涤后重悬。采用腿部肌肉注射进行攻毒 1 mL, 攻毒剂量分别为: 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 CFU/mL。攻毒后连续观察 7 d, 记录发病死亡情况, 采用改良寇氏法^[18]计算半数致死量(LD₅₀)。

1.13 统计分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 所得结果以“平均值 \pm 标准误”表示。 $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为差异显著, 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *pagP* 缺失株和回复株的鉴定

采用 Red 同源重组的方法构建 *pagP* 基因缺失株, 通过特异性引物进行 PCR 鉴定。以 *pagP*-R/*pagP*-F 为引物, AE17 野生菌株扩增出 547 bp 的 *pagP* 基因片段, *pagP* 基因缺失株(Δ *pagP*)扩增不出目的片段(图 1A)。以 *pagP*-out-R/*pagP*-out-F 为引物, AE17、 Δ *pagP* 菌株分别扩增出 2 961 bp 和 2 570 bp 的目的片段(图 1A), 测序表明 *pagP* 基因缺失株 Δ *pagP* 成

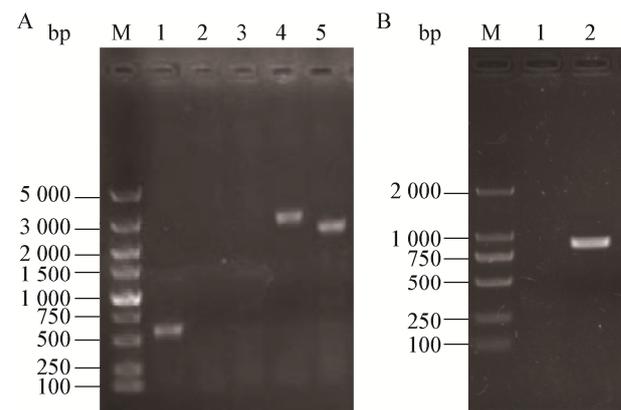


图 1 PCR 鉴定缺失株 Δ *pagP* (A) 和回复株 *CpagP* (B)
Figure 1 PCR analysis of mutant strain Δ *pagP* (A) and complementary strain *CpagP* (B)

注: A: M: DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1: AE17 菌株 *pagP*-R/*pagP*-F 引物鉴定; 2: 缺失株 *pagP*-R/*pagP*-F 引物鉴定; 3: *pagP*-out-R/*pagP*-out-F 引物阴性对照; 4: AE17 菌株 *pagP*-out-R/*pagP*-out-F 引物鉴定; 5: Δ *pagP* 缺失株 *pagP*-out-R/*pagP*-out-F 引物鉴定。B: M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1: M13-R/M13-F 为引物阴性对照; 2: *CpagP* 菌株 M13-R/M13-F 引物鉴定。

Note: A: M: DNA marker DL5000; 1: Identification of AE17 using *pagP*-R/*pagP*-F primers; 2: Identification of mutant strain using *pagP*-R/*pagP*-F primers; 3: Negative control of *pagP*-R/*pagP*-F primers; 4: Identification of AE17 using *pagP*-out-R/*pagP*-out-F primers; 5: Identification of Δ *pagP* mutant strain using *pagP*-out-R/*pagP*-out-F primers. B: M: DNA marker DL2000; 1: Negative control of M13-R/M13-F primers; 2: Identification of *CpagP* using M13-R/M13-F primers.

功构建。将 *pagP* 基因回复片段连接到 pSTV-28a 载体, 电转入 *pagP* 缺失株, 以 M13-R/M13-F 对电转后 *CpagP* 进行 PCR 鉴定(图 1B), 扩增出 918 bp 的目的条带, PCR 产物测序结果显示成功构建 *CpagP* 基因回复株。

2.2 生长曲线及运动性检测

用 LB 培养基培养 AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP*, 进行生长曲线测定, 结果如图 2A 所示, 3 株菌都是经历 0–2 h 的延滞期后, 在第 2 h 进入对数生长期, 12 h 进入稳定期。与野生株(或回复株)相比, 缺失株 $\Delta pagP$ 的在 3–14 h 生长速度显著降低 ($P < 0.01$), 野生株(AE17)和回复株(*CpagP*)的生长速度上无明显变化 ($P > 0.05$), 结果表明 *pagP* 基因缺失降低 APEC 的生长速度。运动能力检测(图 2B)发现 $\Delta pagP$ 的运动性能力较 AE17 均没有变化 ($P > 0.05$)。

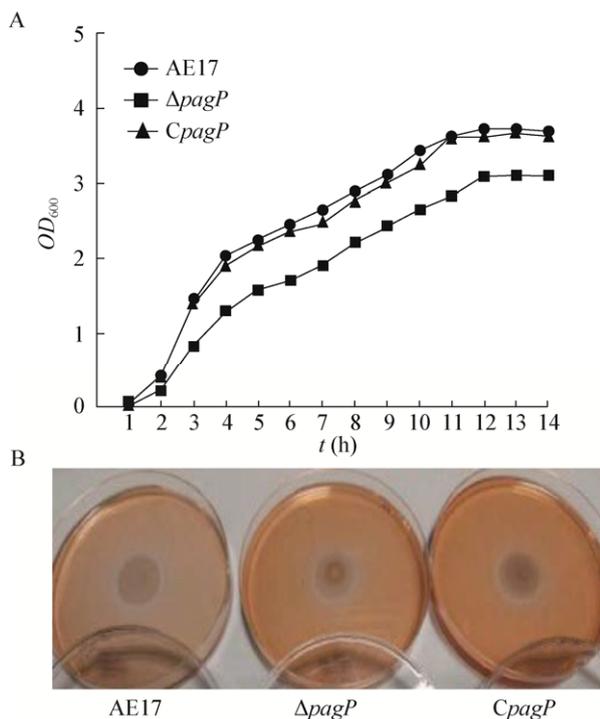


图 2 生长曲线、运动性能力的测定

Figure 2 Analysis of growth curve and bacterial motility assay

注: A: 生长曲线; B: 运动性能力的测定。

Note: A: Growth curves; B: Motility assay.

2.3 细菌粘附和入侵试验

使用 DF-1 细胞检测 3 株菌对 DF-1 细胞的粘附和入侵能力, 结果如图 3 所示, 缺失株($\Delta pagP$)与野生株(或回复株)相比, 粘附能力和入侵能力均无明显变化 ($P > 0.05$), 表明 *pagP* 基因不影响 APEC 对鸡胚成纤维细胞的粘附和入侵能力。

2.4 生物被膜形成能力检测

用改良结晶紫半定量法检测 AE17、 $\Delta pagP$ 和 *CpagP* 生物被膜形成能力, 图 4 结果发现缺失株 $\Delta pagP$ 生物被膜形成能力显著高于野生株 ($P < 0.01$), 也显著高于回复株 ($P < 0.01$), 表明 *pagP* 基因缺失株生物被膜形成能力增强。

2.5 多粘菌素 B 和 AVBD2 抑菌试验

利用多粘菌素 B 和 AVBD2 检测 *pagP* 基因对抗菌肽抑菌效果的作用, 如图 5A 所示, 多粘菌素

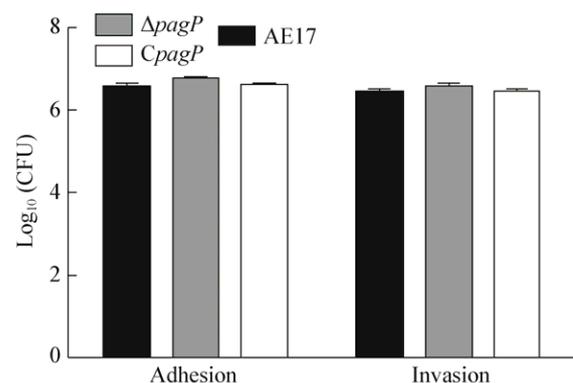


图 3 *pagP* 缺失株粘附和入侵 DF-1 细胞能力的比较

Figure 3 The comparison of *pagP* mutation strains adhesion and invasion of DF-1 cells

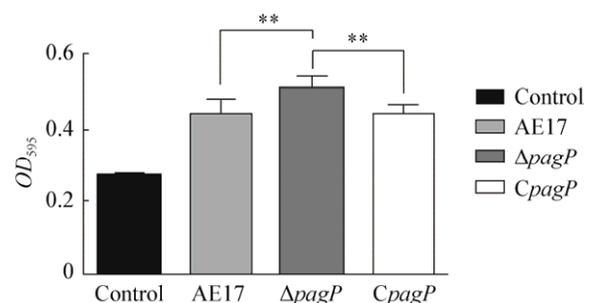


图 4 缺失株与野生株生物被膜形成

Figure 4 Biofilm formation of mutants and wild strains

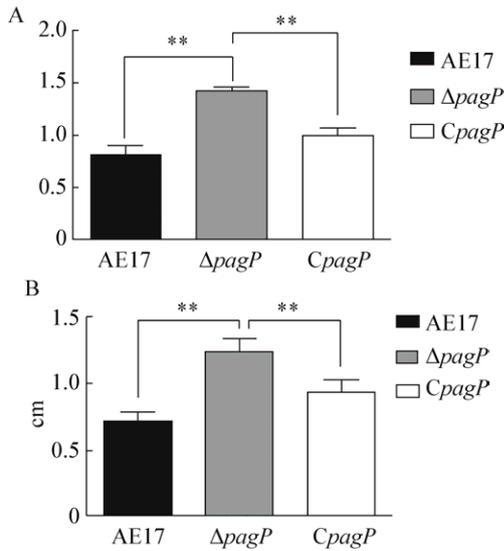


图 5 抑菌试验

Figure 5 Antibacterial test

注: A: 多粘菌素 B 抑菌试验; B: AVBD2 抑菌试验。

Note: A: Antibacterial test using Polymyxin B; B: Antibacterial test using AVBD2.

B 试验组的 *pagP* 缺失株抑菌圈直径是野生株的 1.73 倍($P < 0.01$), *pagP* 缺失株抑菌圈直径是回复株的 1.52 倍($P < 0.01$); 如图 5B 所示, AVBD2 试验组的 *pagP* 缺失株抑菌圈直径是野生株的 1.75 倍($P < 0.01$), *pagP* 缺失株抑菌圈直径是回复株的 1.33 倍($P < 0.01$)。结果表明 *pagP* 缺失株对抗菌肽多粘菌素 B 和 AVBD2 的敏感性增加。

2.6 外膜渗透性的测定

NPN 是一种敏感度较高的荧光探针分子,被广泛应用于革兰氏阴性菌细胞外膜渗透性的测定^[19]。为了筛选 NPN 的添加量,分别加入终浓度为 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 NPN,检测结果(图 6A)表明,30 $\mu\text{mol/L}$ 为 NPN 最适添加终浓度。使用 30 $\mu\text{mol/L}$ 终浓度的 NPN 检测 AE17、 ΔpagP 和 *CpagP*

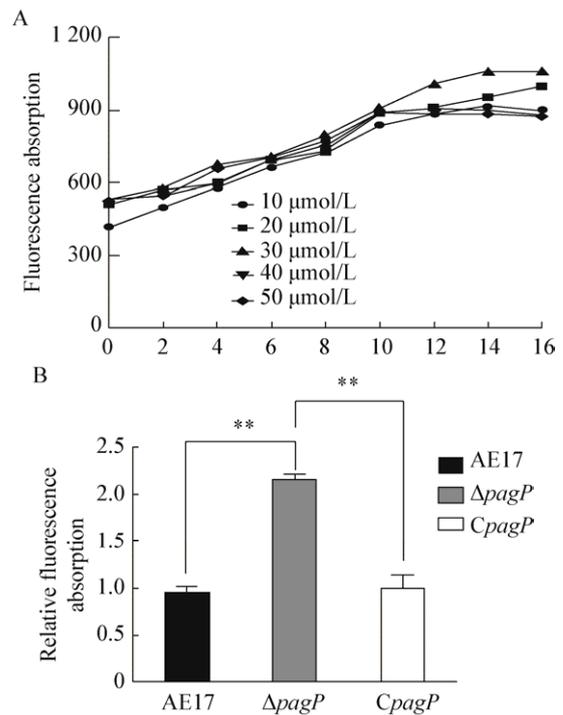


图 6 不同菌株的荧光吸收值

Figure 6 Fluorescence absorption of *E. coli* strains

注: A: NPN 浓度筛选; B: 荧光吸收值检测。

Note: A: Screening concentration of NPN; B: Fluorescence absorption assay.

相对荧光吸收值(图 6B), *pagP* 缺失株的荧光吸收值是野生株的 2.26 倍($P < 0.01$), *pagP* 缺失株的荧光吸收值是回复株的 2.15 倍($P < 0.01$)。表明 *pagP* 基因缺失株外膜通透性增加。

2.7 致病性检测

通过半数致死量检测 *pagP* 基因对 APEC 致病性的影响,结果如表 2 所示,AE17、 ΔpagP 和 *CpagP* 对罗曼蛋雏鸡的半数致死量分别为 3.164×10^4 、 1.000×10^6 、 5.624×10^4 CFU/mL。表明 ΔpagP 缺失株的致病性减弱, *CpagP* 回复株的毒力恢复。

表 2 野生株和缺失株对 7 日龄雏鸡致病性(LD₅₀)的影响
Table 2 The LD₅₀ of wild strain and mutant strain on 7 days old chick

菌株 Strains	稀释度 Dilutability (CFU/mL)					生理盐水 Normal saline	半数致死量 LD ₅₀ (CFU/mL)
	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3		
AE17	8/8	8/8	5/8	3/8	0/8	0/8	3.164×10^4
ΔpagP	8/8	8/8	4/8	0/8	0/8	0/8	1.000×10^6
<i>CpagP</i>	8/8	8/8	4/8	2/8	0/8	0/8	5.624×10^4

3 讨论

研究表明 *pagP* 基因影响细菌的抗菌肽抗性和致病性, 但 *pagP* 在禽致病性大肠杆菌中的作用尚不清楚, 为研究 *pagP* 基因在 APEC 中的作用, 本研究通过 Red 同源重组的方法构建 *pagP* 基因缺失株, 并构建 *pagP* 基因回复株。生物学特性检测发现缺失株的运动性、DF-1 细胞的粘附和入侵能力未发生改变, 这是由于 PagP 是棕榈酰转移酶, 对 LPS 的类脂 A 进行修饰发挥作用, 不影响细菌的粘附和入侵能力。此外, 鞭毛是大肠杆菌的运动器官^[20], *pagP* 基因缺失并不影响鞭毛的结构和运动特性, 因此缺失株运动性未发生变化。*pagP* 缺失株的生长速度降低, 这可能是由于大肠杆菌 *pagP* 可以对外膜成分 LPS 的类脂 A 进行棕榈酰化^[21], *pagP* 基因缺失后会影响 APEC 外膜结构成分的合成, 降低了 APEC 的生长速度。

大肠杆菌细胞壁中 LPS 为细菌提供了一个保护性的屏障, 对菌体起到保护作用。LPS 主要由类脂 A、核心多糖和 O 抗原组成, 其中类脂 A 是 LPS 的疏水基团, 可以将亲水性的核心多糖和 O 抗原粘附在细菌的外表面构成完整的细胞壁^[21]。类脂 A 的修饰在细菌体内受到严格的调控, PagP 通过棕榈酰化, 将一条十六碳脂肪酸链转移到类脂 A 上, 增加类脂 A 分子脂肪酸链的数目^[4]。研究发现 LPS 脂肪酸链数目的改变会增强细胞外膜的流动性, 影响大肠杆菌的细胞外膜通透性^[22], 因此禽致病大肠杆菌 *pagP* 基因缺失引起 LPS 脂肪酸链数目的改变, 导致细胞外膜的流动性增加, APEC 外膜通透性增加。外膜通透性增加会提高细菌往细胞外分泌大分子的量, 进一步提高生物被膜的形成量^[23], 这与本实验中结晶紫法检测发现 *pagP* 基因缺失 APEC 导致生物被膜形成能力增强的结果是一致的。

PagP 对类脂 A 棕榈酰化可以增加外膜的疏水性和范德华力, 干扰阳离子抗菌肽的插入, 对细菌具有保护作用^[8]。因此, *pagP* 基因缺失将影响类脂 A 棕榈酰化, 增加带正电的抗菌肽与带负电荷的类

脂 A 相结合活性。本研究利用阳离子抗菌肽(多粘菌素 B 和 AVBD2)进行试验, 发现 *pagP* 缺失株对多粘菌素 B 和鸡 β -防御素(AVBD2)敏感性均增加, 说明 *pagP* 与 APEC 抗菌肽抗性密切相关。半数致死量的测定发现 *pagP* 缺失株的致病性减弱, 一方面是由于 *pagP* 基因缺失后影响内毒素 LPS 的合成, 引起 APEC 的毒力减弱; 另一方面是由于 *pagP* 基因缺失后对鸡体内产生的 β -防御素的抵抗力降低。但 *pagP* 影响抗菌肽抗性和致病性的具体分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3228-3236
- [2] Mora A, López C, Dabhi G, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 132
- [3] Ewers C, Antão EM, Diehl I, et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 184-192
- [4] Johnson TJ, Wannemuehler Y, Kariyawasam S, et al. Prevalence of avian-pathogenic *Escherichia coli* strain O1 genomic islands among extraintestinal and commensal *E. coli* isolates[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(11): 2846-2853
- [5] Wu X, Zhang SQ. Molecular mechanisms of antibacterial peptides against bacterium[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, 32(12): 1109-1113 (in Chinese)
吴希, 张双全. 抗菌肽对细菌杀伤作用的分子机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(12): 1109-1113
- [6] Guo L, Lim KB, Poduje CM, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides[J]. *Cell*, 1998, 95(2): 189-198
- [7] Yang H, Fu JY, Zhao YY, et al. *Escherichia coli* PagP enzyme-based *de novo* design and *in vitro* activity of antibacterial peptide LL-37[J]. *Medical Science Monitor*, 2017, 23: 2558-2564
- [8] Bishop RE. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(4): 900-912
- [9] Iyer BR, Mahalakshmi R. Distinct structural elements govern the folding, stability, and catalysis in the outer membrane enzyme PagP[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(35): 4960-4970
- [10] 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]. *Molecular Microbiology* 2003, 48(3): 725-736
- [11] Wei HT, Qi KZ, Wang EQ, et al. Constitutive expression of chicken β -defensin 2 in *Pichia pastoris* and optimization of its fermentation conditions[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(7): 693-699 (in Chinese)
魏海婷, 祁克宗, 王尔群, 等. 鸡 β 防御素 2 在毕赤酵母中的组成型表达及其发酵条件的优化[J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(7): 693-699
- [12] Shao Y, Tu J, Wang XY, et al. The relationship between the core gene *irp2*, *fyuA* deletion of the high pathogenicity island and the pathogenicity of APEC[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(4): 564-570 (in Chinese)
邵颖, 涂健, 汪雪雁, 等. APEC 强毒力岛核心基因 *irp2*, *fyuA* 敲除对其致病性影响的研究[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(4): 564-570
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [14] Han XA, Bai H, Liu L, et al. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55: 21-27
- [15] Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 316(1): 36-43
- [16] Je JY, Kim SK. Antimicrobial action of novel chitin derivative[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2006, 1760(1): 104-109
- [17] Shi SQ, Wei HT, Qi KZ, et al. Tandem expression of chicken β -defensin 2 and analysis of its antimicrobial activity[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(4): 516-523 (in Chinese)
石水琴, 魏海婷, 祁克宗, 等. 鸡 β -防御素 2 在大肠杆菌中的串联表达及抗菌活性分析[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(4): 516-523
- [18] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493-497
- [19] Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(2): 213-219
- [20] Li RF, He QG, Zhou R, et al. The research advances on the bacterial flagella[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(6): 124-127 (in Chinese)
李任峰, 何启盖, 周锐, 等. 细菌鞭毛研究概况及进展[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 124-127
- [21] Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, et al. Lipid a modification systems in gram-negative bacteria[J]. *Annual Review of Biochemistry*. 2007, 76: 295-329
- [22] Lau PCY, Lindhout T, Beveridge TJ, et al. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6618-6631
- [23] Carty SM, Sreekumar KR, Raetz CRH. 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9677-9685