

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(9):1168–1176; 4 September 2011  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 大肠杆菌 44277 ( O2:K1 ) 中 *rmlB* 基因功能

丁卫平,罗元明,艾国民,金城\*

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:**【目的】确定 *rmlB* 基因在大肠杆菌(O2:K1)L-型鼠李糖合成中的作用。【方法】将基因 *rmlB* 进行原核表达并测定酶活;用同源重组的方法将 *rmlB* 基因敲除,分析表型变化,并运用质谱,以及核磁共振等手段分析脂多糖 O 侧链的结构,以确定 *rmlB* 在 O 抗原合成中的作用。【结果】成功对 *rmlB* 基因进行了表达并测定了重组蛋白的酶活,确定蛋白 RmlB 具有 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 活性。成功构建了 *rmlB* 基因缺失突变株,对突变株进行表型分析发现突变株的表型与野生株相比无变化。对突变株分析发现突变株中的 O 抗原仍含有 L-型鼠李糖,说明在该菌株中可能存在 RmlB 的同功能酶或者存在其它的 L-型鼠李糖合成途径。【结论】*rmlB* 基因编码的蛋白具有 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 活性但此基因对于 L-型鼠李糖的合成不是必需的。

**关键词:** 大肠杆菌, L-鼠李糖, 合成

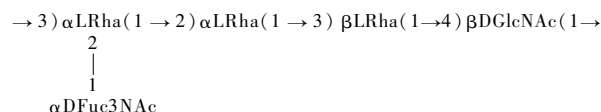
中图分类号: Q935      文献标识码: A      文章编号: 0001-6209 (2011) 09-1168-09

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是引起尿道感染、败血症以及新生儿脑膜炎的主要致病菌之一,据估计仅大肠杆菌 K1 在世界范围内每年引起的脑膜炎就导致 50000 人的死亡<sup>[1]</sup>。其毒力因子主要包括外膜蛋白、荚膜以及脂多糖,这些毒力因子具有使大肠杆菌逃避宿主攻击系统以及促进感染的作用;其中荚膜及脂多糖的作用被认为是提供血清抗性<sup>[2-7]</sup>。

脂多糖是革兰氏阴性菌外膜的主要组成成分之一。作为细菌与外环境的生理屏障,当细菌受到去污剂、自由脂肪酸、疏水性的抗生素、补体以及噬菌体作用时,脂多糖起到保护作用<sup>[8-9]</sup>。脂多糖由3部分构成:脂质A(脂多糖中的毒性部分),核心多糖以及O糖链或者叫O抗原。O抗原由各种糖残基组成一个糖链,并且O抗原的结构决定大肠杆菌的血清型。在大肠杆菌超过160种的O抗原中,只

有一小部分与疾病相关<sup>[10]</sup>。其中,血清型 01,02,04,06,07,018 以及 075 主要从尿道感染部位分离得到的<sup>[11]</sup>。

大肠杆菌 K1 部分菌株的脂多糖 O 抗原为 O2 血清型,含有 L-型鼠李糖。由于鼠李糖及其合成途径不存在于人类中,因而其 L-型鼠李糖合成途径可作为潜在的抗菌药物研发的靶点<sup>[12]</sup>。大肠杆菌 O2 抗原的糖链是由五糖结构单元组成的重复结构,其中下图结构式中的 D-Fuc3NAc 为 3-乙酰氨基-3,6-双脱氧-D-半乳糖<sup>[13-14]</sup>。



在细菌中 dTDP-L-鼠李糖的合成需要 4 种酶。第一个酶 RmlA (glucose-1-phosphate thymidyltrans-

基金项目:国家“863 计划”(2006CB504400)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807425; Fax: +86-10-64807429; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

作者简介:丁卫平(1983-),男,山东人,硕士研究生。E-mail: ding236@yahoo.com.cn

收稿日期:2011-03-17;修回日期:2011-04-18

ferase)催化 dTDP 核苷酸转移至葡萄糖-1-磷酸;第二个酶 RmlB (dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase)催化碳四位羟基的氧化以及随后的脱水反应;第三个酶 RmlC (dTDP-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose 3,5-epimerase)催化碳三以及碳五位置上不常见的差向异构反应;第四个酶 RmlD (dTDP-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose reductase)将 C4 位置上的酮基还原以得到最终的产物 dTDP-L-鼠李糖<sup>[15-16]</sup>。在霍乱弧菌中敲除 *rmlB* 或者 *rmlD* 基因会导致突变株的定植发生缺陷<sup>[17]</sup>。变异链球菌的 4 个 *rml* 基因中任何一个被敲除都将抑制细胞壁多糖的合成,突变株需要在添加蔗糖的培养基上生存并且需要另外两种糖加工酶基因 *gtfB* 与 *gtfC* 的融合;突变株的毒性发生改变,不能引发或者维持感染<sup>[18]</sup>。在尿路致病性的大肠杆菌 O75:K5 中,缺乏有功能的 RmlD 会导致血清抗性的丧失<sup>[19]</sup>。在老鼠模型中,粪肠球菌中 L-型鼠李糖合成途径的破坏会减弱其感染力<sup>[20]</sup>。

为研究大肠杆菌 44277(O2:K1)中 L-鼠李糖的合成,我们对大肠杆菌 K1 44277 菌株中的 *rmlB* 基因进行了克隆表达,从生化水平上证明该基因具有 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 活性;进一步通过同源重组的方法获得了该基因的敲除株,并对突变株 O 抗原结构及表型进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株,质粒,培养基及培养条件:**大肠杆菌野生株(2:1:4)44277(CMCC 编号 44277;中国医学微生物菌种保藏管理中心)在 Luria-Bertani 培养基中 37℃ 培养。pBluescript II sk(+), pET30a, pKD3, pKD46 和 pCP20 等质粒由本实验室保存。根据实验需要在培养基中添加氨苄青霉素(100 μg/mL),卡那霉素(50 μg/mL)或者/和氯霉素(25 μg/mL)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。蛋白质的表达在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株中进行。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**限制性内切酶购自 Fermentas 公司;pyrobest DNA polymerase, Ex Taq DNA polymerase, 细菌基因组提取试剂盒(Takara code DV810A)购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;蛋白酶抑制剂 PMSF、溶菌酶、

dTDP-葡萄糖、NAD<sup>+</sup>、氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、cetavlon、蛋白酶 K 及 β-巯基乙醇均购于 Sigma aldrich 公司;地高辛标记杂交试剂盒(Cat. No 1093657)购自 Roche Applied science;葡聚糖 T10 购自 GE Healthcare;胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。主要仪器有 PCR 仪(东胜创新科技有限公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)、NanoDrop ND-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计(Thermo Fisher 公司)、电子荧光显微镜(Carl Zeiss 公司)、超速离心机 XL-90(Beckman 公司)、离心干燥仪(美国 Jouan 公司)、冷冻干燥仪(Stone Ridge 公司)、气质联用仪(Thermo Fisher 公司)、核磁共振仪(BRUKER 公司)、MALDI-TOF 质谱仪(ABI 公司)、高压液相系统(Agilent 公司)、DU800 分光光度计(Beckman 公司)、G3000PW<sub>XL</sub>(TOSOH 公司)。

### 1.2 PCR 扩增

根据 NCBI 中已经注释的大肠杆菌编码 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 基因的保守序列,设计扩增 *rmlB* 基因的引物为 *rmlb-s* (5'-ATGAGAA-AGATTCTGATAACAG-3') 和 *rmlb-as* (5'-TTAGCC-TTTCAGACCTAA-3');PCR 扩增为 30 个循环条件(94℃, 10 min; 94℃, 1 min, 53℃, 1 min, 72℃, 1 min),反应结束后于 72℃ 反应 10 min。

### 1.3 大肠杆菌中 *rmlB* 基因的表达

用于表达 *rmlB* 基因的引物为:*rmlb-30a-s*, 5'-GGAATTCCATATGAGAAAGATTCTGATAACAG-3' (*Nde* I); *rmlb-30a-as*, 5'-CCGCTCGAGGCCCTTTC-AGACCTAAACG-3' (*Xho* I)。蛋白表达所用载体为 pET30a,所用菌株为 BL21(DE3)pLysS,蛋白纯化方式为镍柱纯化。

### 1.4 酶活测定

RmlB (dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase) 酶活测定方法按 Okazaki 等的方法进行<sup>[21]</sup>。反应混合液(300 μL)包含 50 mmol/L 的 Tris-Cl (pH 7.6)、4 mmol/L dTDP-D-glucose 以及适量的酶,被置于 37℃ 孵育。当用纯化的酶测酶活时,加入适量的 NAD<sup>+</sup> 作为催化剂。每隔 20 min 取出 50 μL 的反应混合液并与 750 μL 的氢氧化钠(0.1 mol/L)进行混合,混合液于 37℃ 孵育 20 min 后测定 OD<sub>320</sub>。

### 1.5 Δ*rmlB* 突变株以及回复株的构建

**1.5.1 Δ*rmlB* 突变株的构建:**突变株的构建按文献报道的方法进行<sup>[22]</sup>。以氯霉素抗性基因作为筛选

标记, 扩增氯霉素抗性基因的引物为 L1 (5'-ATGAGAAAGATTCTGATAACAGGTGGTGGCGGT-TTATTGGCTCGGCGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') 和 L2 (5'-TTAGCCTTTCAGACCTAAACGCTCGCCCTGATAGCTGCCGCTCTGCACCTCATATGAAT-ATCCTCCTTAGT-3'), DNA 聚合酶为 *pyrobest*, 模板为 pKD3。突变株的 PCR 验证按照文献所述。突变株进一步用 Southern blot 来验证, 用引物 S1 (5'-AGCTGACCTACGCCGAAA-3') 和 S2 (5'-CCACTTTCA-AAGGTTTCCTGCG-3') 扩增的 *rmlB* 片段为探针, 探针用地高辛标记 (1093657; Roche Applied Science)。

**1.5.2  $\Delta rmlB$  回复株的构建:** 扩增 *rmlB* 的条件如下, 引物为 Sk-rfbB2-s: 5'-CCGCTCGAGATG-AGAAAGATTCTGATAACAG-3' (*Xho* I) 和 Sk-rfbB2-as: 5'-CCGGAATTCTTAGCCTTTCAGACC-TAA-3' (*Eco*R I), DNA 聚合酶为 *pyrobest*, 模板为基因组 DNA。扩增的片段与质粒 pbluscript II sk (+) 连接得到重组质粒 SK-RMLB。将重组质粒电转化入突变株, 利用质粒的氨苄青霉素抗性来挑选阳性转化子。

## 1.6 脂多糖的分离与凝胶电泳

脂多糖的分离与凝胶电泳按照 Møller AK 与 Leatham MP 的方法来完成<sup>[23]</sup>。3 mL LB 培养基中培养的菌液经离心收集后, 重悬于 1 mL 的 PBS 缓冲液中, 剧烈震荡 1 min 后于 60℃ 孵育 30 min。悬浮液于  $11750 \times g$  离心 30 min, 100  $\mu$ L 上清液中加入 100  $\mu$ L 含 2%  $\beta$ -巯基乙醇的 Tricine 上样缓冲液 (Bio-Rad laboratories), 混合液于 100℃ 煮沸 10 min。50  $\mu$ L 煮沸的样品加入 10  $\mu$ L 蛋白酶 K (2.5 mg/mL) 溶液, 混合液于 60℃ 孵育 60 min 后于  $16000 \times g$  离心 30 min。上清液中的脂多糖用 18% 的 Tricine SDS-PAGE 进行分离<sup>[24]</sup> 后银染显色<sup>[25]</sup>。

## 1.7 免疫方法

O 抗原血清型测试委托中国兽医药品监察所完成。方法如下所述, 生长于麦康凯琼脂培养基上的大肠杆菌被转接至一琼脂斜面小管并于 37℃ 孵育 24 h。用酚缓冲液将细胞洗下并于 120℃ 加热 2 h。经上述处理得到的抗原与血清进行反应。

## 1.8 脂多糖 O 糖链的制备以及鉴定

**1.8.1 脂多糖与 O 糖链的制备与纯化:** 纯脂多糖用经典的热酚-水法制备<sup>[26]</sup>。纯脂多糖于 1% 乙酸中煮沸 1.5 h<sup>[27-28]</sup>,  $1500 \times g$  离心 20 min, 得到的沉

淀为脂质 A, O 糖链存在于上清液中。上清液用蒸馏水透析两天除去乙酸以及小分子。透析过的上清液用高效凝胶过滤色谱法来进行分离, 使用的色谱柱为 G3000PW<sub>XL</sub> (TSK-GEL)。

**1.8.2 O 糖链的质谱分析:** O 糖链分子量的测定用 MALDI-TOF-MS/MS 来完成。化学分析采用气质联用完成, 单糖鉴定通过 O-甲基化的糖乙酰化衍生物来完成的。经过甲醇解 (2 mol/L HCL/MeOH, 85℃, 24 h) 以及乙酰化 (acetic anhydride in pyridine, 85℃, 30 min) 处理后, 得到的样品用气质联用仪进行分析<sup>[29]</sup>。

**1.8.3 核磁共振分析:** O 糖链的核磁共振分析由中国医学科学院药物研究所完成。测定方法与 Jansson PE 的方法<sup>[13]</sup> 相同。核磁共振分析在 2% 的重水溶液中于 500 兆测定, 氢谱以 TSP 作为内标, 碳谱以 1,4-dioxane 作为内标。二维核磁共振采用标准的 COSY 以及 NOESY 方法。光谱数据分析综合各种核磁共振技术得到的数据而成。

## 1.9 $\Delta rmlB$ 突变株中的酶活测定

突变株中的酶活测定采用上述相同的方法。将过夜培养的菌液以 1% 的比例接种于新鲜的培养基中, 待培养液  $OD_{600}$  达到 0.6–0.7 时, 收集菌体。在细胞破碎时采用了超声破碎与溶菌酶处理两种方法, 并分别进行了测定。对照为加入煮沸 10 min 的蛋白提取液, 其它与正常测定相同。当比较野生株, 突变株以及回复株之间 dTDP-4-keto-6-deoxyglucose 的酶活时, 取处于对数生长期的菌液离心收集, 酶活差异基于相同的总蛋白浓度进行测定, 蛋白浓度测定采用 Bradford 法<sup>[30]</sup>。

## 1.10 *gmd* 基因的扩增以及 $\Delta gmd/rmlB$ 双敲突变株的构建

根据 NCBI 中已经注释的大肠杆菌 *gmd* (编码 GDP-mannose 4,6-dehydratase) 基因的保守序列, 我们设计引物 *gmd*-s (5'-ATGTCAAAAGTCGCTC-TCATC-3') 以及 *gmd*-as (5'-TTATGACTCCAGCG-CGATC-3') 扩增 *gmd* 基因。双敲突变株的构建是在  $\Delta rmlB$  突变株的基础上进行的。构建方法与  $\Delta rmlB$  突变株的构建原理相同。双敲突变株的 PCR 验证及 Southern Blot 验证同  $\Delta rmlB$  突变株。

# 2 结果

## 2.1 *rmlB* 基因的表达以及性质

*rmlB* 基因长 1068 bp, 编码 355 个氨基酸。

RmlB 包含非常保守的催化基团 Tyr (160) XXXLys (164) 以及 N-端保守的 GlyXGlyXXGly 结构域, 这些结构是短链脱氢酶/还原酶的特征<sup>[31-32]</sup>。重组 RmlB (rRmlB) 的分子量为 41 kDa (图 1)。在摸索条件保证底物充足的情况下, 纯化后的酶比粗酶活性提高 30 倍左右。此酶最适 pH 值为 7.5, 最适温度为 40℃ (图 2)。对其酶动力学测定显示, rRmlB 的  $K_m$  值为 244  $\mu\text{mol/L}$ , 与伤寒沙门氏菌 RmlB 的  $K_m$  值相似<sup>[33]</sup>。

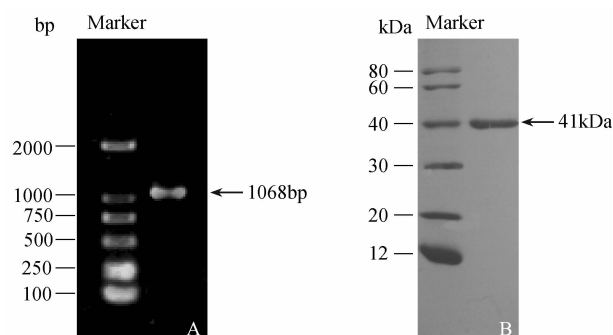


图 1 *rmlB* 基因的扩增以及 rRmlB 的纯化

Fig.1 PCR amplification of *rmlB* and purification of rRmlB. (A) PCR amplification of the *rmlB* gene with primers *rmlb-s* and *rmlb-as*. (B) protein purification of rRmlB. Gel, 12%, was used to separate the protein by SDS-PAGE.

## 2.2 大肠杆菌中 *rmlB* 基因的敲除与表型分析

为确定 *rmlB* 基因在大肠杆菌 O 抗原合成中的作用, 我们利用氯霉素抗性基因作为筛选标记, 采用同源重组的方法敲除 *rmlB*, 然后以 pCP20 为辅助质粒将抗性基因从突变株的基因组中去除。突变株经 PCR 及 Southern blot 验证为所需突变株 (图 3)。

野生株, 突变株以及回复株在透射电镜与扫描电镜下没有大的区别。免疫学方法证明突变株的血清型未发生改变。用 SDS-PAGE 分析突变菌的脂多糖构象, 结果显示突变株脂多糖构象与野生株及回复株一致。

这些结果说明, 敲除 *rmlB* 基因并未影响大肠杆菌的生长和脂多糖的结构。

## 2.3 突变株 O 糖链的分析

突变株的 O 糖链经 TSK 的凝胶过滤柱分离后, 用 MALDI-TOF-MS/MS 进行分析, 发现 O 糖链的分子量约为 11000 Da。在 MALDI-TOF 质谱的过程中, 我们还发现了五糖重复结构单元的脱落, 其分子量为 828 Da。图 4 中用箭头表示出的质谱峰中相对

低分子量的邻近峰之差为精确的 828 Da, 在分子量

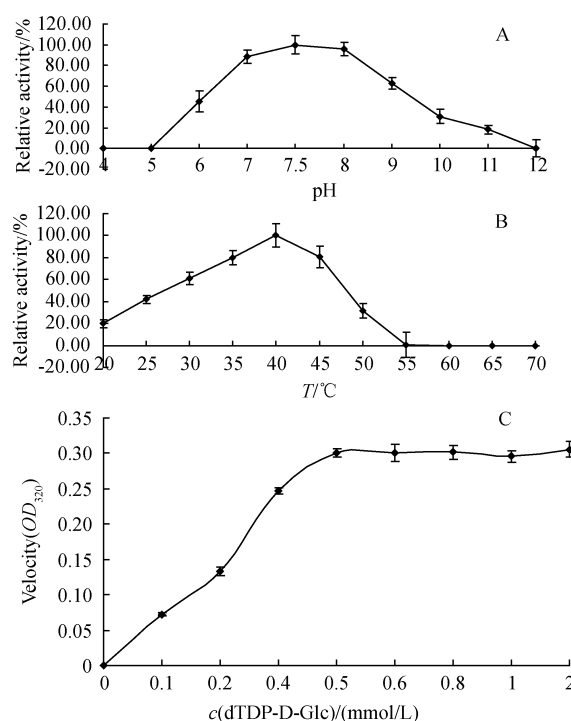


图 2 rRmlB 酶活检测

Fig.2 Enzyme activity of the recombinant protein rRmlB. A: Relative activity versus pH. Relative activity is expressed as a percentage of the maximum activity at pH 7.5. B: Relative activity versus temperature. Relative activity is expressed as a percentage of the activity at 40℃. C: Relative activity versus concentration of dTDP-D-Glc.

大时, 由于质谱测定分子量的误差, 相邻峰分子量之差与 828 Da 有 1 Da 左右的误差。质谱结果表明突变株、野生株以及回复株 O 糖链的分子量是一致的。O 糖链经气质联用分析表明突变株、野生株以及回复株中均含有鼠李糖、N-乙酰葡萄糖胺及 N-乙酰岩藻糖胺 3 种组成 O 糖链的糖 (图 5)。在气质联用分析中, 当鼠李糖 O-糖基化乙酰化衍生物经四级杆质谱打碎后与标准数据库相比较, 可以发现作为此物质标志的分子量为 115, 157 以及 184 Da 的碎片峰, 与 2,3,4-乙酰化-1-甲基化-L-鼠李糖匹配。

为进一步准确确定突变株中 O 糖链的化学结构以及空间结构, 我们采用了核磁共振技术来进行研究, 结果显示突变株、野生株以及回复株的 O 糖链没有区别。

这些结果进一步表明, 敲除 *rmlB* 基因并未影响大肠杆菌脂多糖的合成。

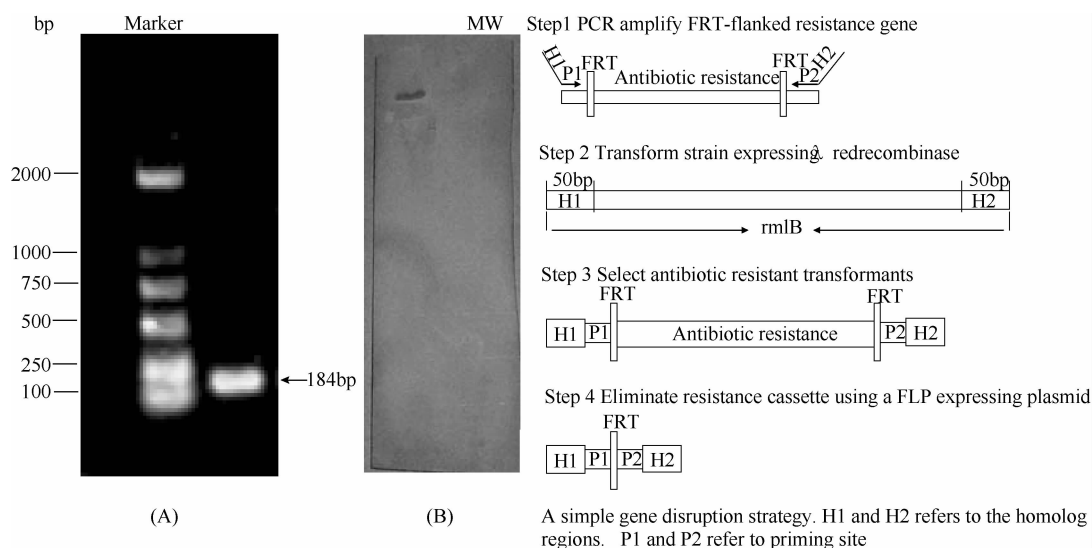


图3  $\Delta rmlB$  突变株的 PCR 扩增 (A) 与 southern 杂交鉴定 (B)

Fig. 3 confirmation of  $\Delta rmlB$  mutant by PCR (A) and southern blot (B). (A) PCR amplification of the  $\Delta rmlB$  mutant with primers *rmlb-s* and *rmlb-as*; the amplified band contains the starting 50bp and ending 50bp of *rmlB*, primers P1, P2 and a FRT fragment. W, wild type; M,  $\Delta rmlB$  mutant. (B) Genomic DNA hybridized with the probe described above.

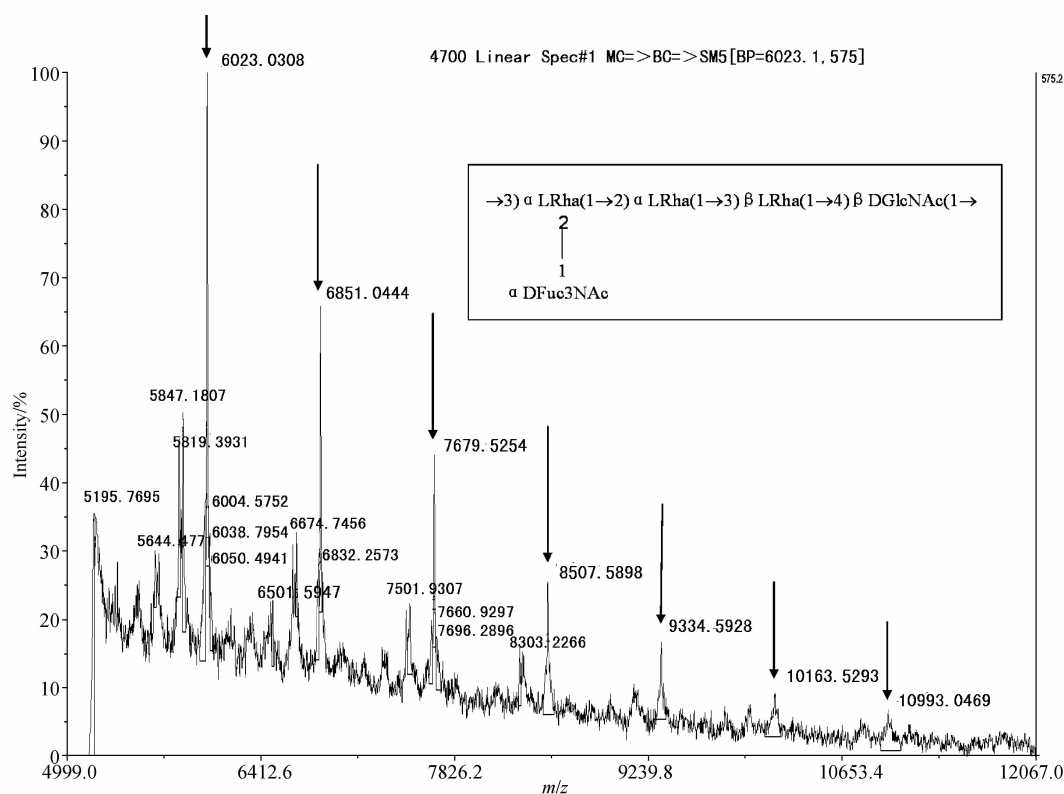


图4 大肠杆菌 O 糖链的 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定

Fig. 4 MALDI-TOF-MS/MS of the O antigen.

## 2.4 $\Delta rmlB$ 突变株酶活测定以及 $\Delta gmd/rmlB$ 双敲突变株的构建

$\Delta rmlB$  突变株经超声破碎或者溶菌酶溶解

放胞内蛋白。对突变株细胞抽提液的酶活测定表明,无论是增加蛋白浓度还是延长反应时间,都未能检测到 dTDP-4-keto-6-deoxyglucose 的生成。由于在

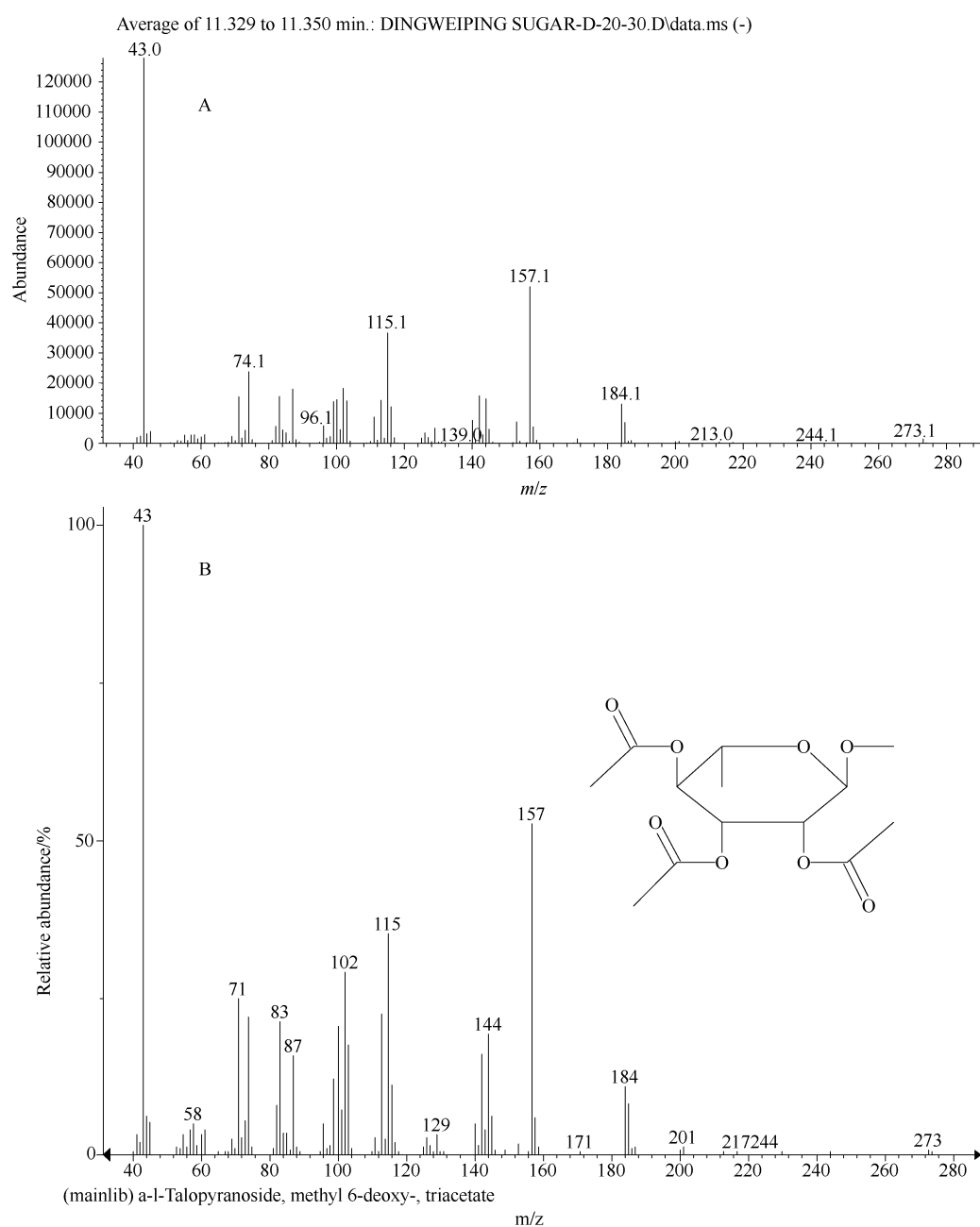


图5 鼠李糖 O-甲基化乙酰化衍生物的气质联用鉴定

Fig. 5 GC-MS of the acetylated O-methyl rhamnose derivative. A: MS of the eluted peak; B: standard map of acetylated O-methyl rhamnose derivative.

测定酶活时菌株正处于对数生长期状态,细菌繁殖需要合成脂多糖,细菌中 *RmlB* 同功酶如果存在应该是充分表达的,因此排除了此时间内同功酶没有表达的可能性,但这有可能是同功酶催化方式与 *RmlB* 不同以致无法测出所致。我们同时测定了野生株与回复株的酶活,发现回复株可以达到野生株酶活的 81%。为了在底物过量的情况下测定反应速度,比较上述两者之间的酶活时反应时间限定为

2 min。具体结果见表 1。

表 1 突变株,野生株及回复株之间的酶活比较

Table 1 comparison of enzyme activity between the mutant, wild strain, and the complemented strain.

|    | Activity( $OD_{320}$ ) | Relative activity/% |
|----|------------------------|---------------------|
| M  | -                      | -                   |
| W  | $0.2847 \pm 0.0088$    | 100                 |
| CT | $0.2313 \pm 0.0032$    | 81                  |

W, wild type; M,  $\Delta rmlB$  mutant; CT, complemented strain.

为了找出可能的与 RmlB 催化方式不同的同功酶,我们研究了 *gmd* 基因在  $\Delta rmlB$  突变株中的作用。*gmd* 编码的 GmD 结构及催化方式与 RmlB 相似<sup>[34]</sup>,GmD 催化 GDP-mannose 转变为 GDP-4-keto-6-deoxymannose 的反应。在  $\Delta rmlB$  突变株中,我们将 *gmd* 基因通过同源重组的方法敲除,得到双敲突变株  $\Delta gmd/rmlB$  (图 6)。对双敲突变株同样进行了表型分析,脂多糖 O 糖链鉴定,结果发现双敲突变株 O 糖链结构未发生改变。

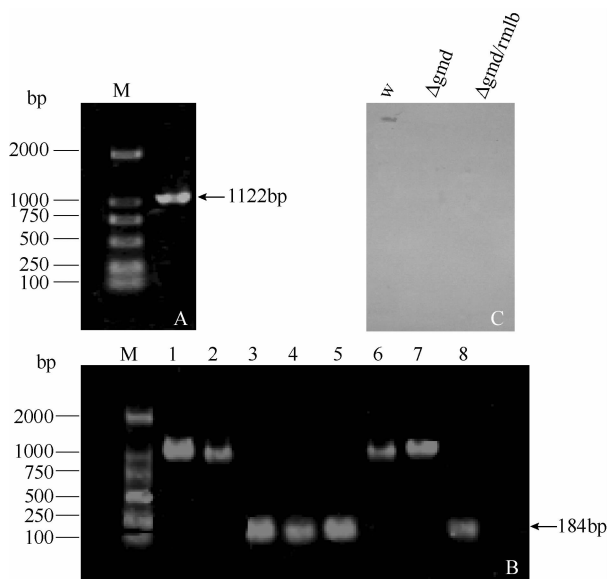


图 6 *gmd* 基因的扩增 (A) 以及  $\Delta gmd/rmlB$  突变株的验证 (B, C)

Fig. 6 PCR amplification of *gmd* (A) and verification of  $\Delta gmd/rmlB$  mutant (B, C). A: PCR amplification of *gmd* gene with primers *gmd-s* and *gmd-as*. B: PCR verification of  $\Delta gmd/rmlB$  mutant. Lanes 1 and 2 stand for wild type strain; Lanes 3 and 4 stand for  $\Delta gmd/rmlB$  mutant; Lanes 5 and 6 stand for  $\Delta gmd$  mutant; Lanes 7 and 8 stand for  $\Delta rmlB$  mutant. C: Genomic DNA hybridized with the probe amplified by primers *gS-1* (5'-CCTGGCAGAGTTTCTGCTG-3') and *gS-2* (5'-AGTGTTTTTT-CGCCGCTTCG-3').

### 3 讨论

以前的研究发现,大肠 L-型鼠李糖的合成需要 4 种酶的参与,分别为 4 个不同的基因所编码。在此项研究中,我们试图克隆此合成途径所需的所有基因,但是我们只克隆到 *rmlB* 基因。当扩增其它基因时,我们根据 NCBI 中已经注释基因的保守序列设计了普通引物以及简并引物进行梯度扩增,但均

无法克隆得到。

*rmlB* 编码的蛋白 RmlB 含有高度保守的 Tyr (160) XXXLys (164) 催化结构域以及 GlyXGlyXXGly N 端结构域,而这些结构是短链脱氢酶/还原酶的结构特征,因此,我们初步推测 RmlB 为短链脱氢酶或者还原酶;酶活测定证实该蛋白可催化 dTDP-葡萄糖转化为 dTDP-4-酮基-6-脱氧葡萄糖。

当我们将 *rmlB* 基因敲除掉以后,将得到的突变株与野生株进行了比较,发现表型没有明显的变化。突变株 O 抗原血清型的免疫学测试证明 O 抗原的血清型与野生株相比没发生变化。脂多糖的 Tricine SDS-PAGE 分析也证明突变株脂多糖的电泳构型与野生株或回复株相同。

基于上述现象,我们推测突变株中的脂多糖 O 糖链的结构可能没有变化或者发生变化但通过上述手段无法检测出。因此,我们继续采用 MALDI-TOF-MS/MS、气质联用以及核磁共振来研究突变株 O 糖链的化学组成以及结构,结果证明突变株 O 糖链的化学组成及结构均没发生变化。

根据 O 糖链结构测定结果,我们推测大肠杆菌中可能存在着 RmlB 的同功酶,但我们用突变株细胞抽提液来检测 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 活性时,并未检测到此种酶的活性,这有两种可能,一是突变株中确实不存在 RmlB 同功酶,二是存在 RmlB 的同功酶但酶活测定方法与 RmlB 有所不同。为此我们研究了 GmD 在突变株中的作用。我们构建了 *gmd* 与 *rmlB* 的双敲除突变株,但在双敲除突变株中仍然能检测到 L-型鼠李糖的存在。这说明,在  $\Delta rmlB$  突变株中,L-鼠李糖的合成不依赖于或者不完全依赖于 GmD。

根据目前的实验结果,我们认为突变株中 L-鼠李糖的存在有两种可能性,一种可能性为突变株中含有 RmlB 的同功酶但无法用当前的酶活测定方法测出,另一种可能性是存在其它的途径合成 dTDP-L-鼠李糖。总之,我们的研究表明,大肠杆菌 44277 L-型鼠李糖的合成不完全依赖于或者不依赖于 RmlB,可能有其它新途径或者新酶存在。

**致谢** 对中国科学院会议生物研究所的刘广超,李剑,林洁,李勇猛,周慧的帮助深表谢意。刘广超在构建基因敲除突变株时给予了技术指导;李剑与林洁帮助完成核磁共振图谱的解析;李勇猛帮助完成了气质联用技术所需的化学反应;周慧在实验设计以及实验思路方面给予了指导。

### 参考文献

- [1] Khan NA, Goldsworthy GJ. Novel Model To Study Virulence Determinants of *Escherichia coli* K1. *Infection*

- and Immunity*, 2007, 75:5735-9.
- [2] Cross AS, Kim KS, Wright DC, Sadoff JC, Gemski P. Role of lipopolysaccharide and capsule in the serum resistance of bacteremic strains of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 154:497-503.
- [3] Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annual Review of Microbiology*, 1988, 42: 201-230.
- [4] Joiner KA, Hammer CH, Brown EJ, Cole RJ, Frank MM. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and released from *Salmonella minnesota* S218 without causing bacterial death. *Journal of Experimental Medicine*, 1982, 155:797-804.
- [5] Pluschke G, Mayden J, Achtman M, Levine RP. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement killing. *Infection and Immunity*, 1983, 42:907-913.
- [6] Taylor PW, Messner P, Parton R. Effect of the growth environment on cell envelope components of *Escherichia coli* in relation to sensitivity to human serum. *Journal of Medical Microbiology*, 1981, 14:9-19.
- [7] Timmis KN, Boulnois GJ, Bitter-Suermann D, Cabello FC. Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1985, 118:197-218.
- [8] Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 1985, 49:1-32.
- [9] Valvano MA. Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38:711-719.
- [10] Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*, 1977, 41:667-710.
- [11] Orskov I, Orskov F. *Escherichia coli* and extra-intestinal infections. *Journal Of Hygiene*, 1985, 95:551-575.
- [12] Giraud MF, Naismith JH. The rhamnose pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 6:687-96.
- [13] Jansson PE, Lennholm H, Lindberg B, Lindquist U, Svenson SB. Structural studies of the O-specific side-chains of the *Escherichia coli* O2 lipopolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 1987, 2:273-279.
- [14] Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 3:382-403.
- [15] Glaser L, Kornfeld S. The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugars. II. Thymidine diphosphate L-rhamnose. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236: 1795-1799.
- [16] Jiang XM, Neal B, Santiago F, Lee SJ, Romana LK, Reeves PR. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). *Molecular Microbiology*, 1991, 5:695-713.
- [17] Chiang SL, Mekalanos JJ. *Rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. *Infection and Immunity*, 1999, 67:976-980.
- [18] Yamashita Y, Tomihisa K, Nakano Y, Shimazaki Y, Oho T, Koga T. Recombination between *gtfB* and *gtfC* is required for survival of a dTDP-rhamnose synthesis-deficient mutant of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Infection and Immunity*, 1999, 67:3693-3697.
- [19] Burns SM, Hull SI. Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infection and Immunity*, 1998, 66:4244-4253.
- [20] Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE, Weinstock GM. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infection and Immunity*, 2000, 68:815-823.
- [21] Okazaki R, Okazaki T, Strominger JL, Michelson AM. Thymidine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-glucose, an intermediate in thymidine diphosphate L-rhamnose synthesis in *Escherichia coli* strains. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237:3014-3026.
- [22] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 12:6640-6645.
- [23] Møller AK, Leatham MP, Conway T, Nuijten PJ, de Haan LA, Krogfelt KA, Cohen PS. An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. *Infection and Immunity*, 2003, 4:2142-2152.
- [24] Pradel E, Schnaitman CA. Effect of the *rfaH*(*sfrB*) and temperature on the expression of the *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173:6428-6431.
- [25] Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1982, 119:115-119.
- [26] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, 5: 83-91.
- [27] Schmidt G, Jann B, Jann K. Immunochemistry of R lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Different core regions in the lipopolysaccharides of O group 8. *European Journal of Biochemistry*, 1969, 3:501-510.



- [28] Müller-Seitz E, Jann B, Jann K. Degradation studies on the lipopolysaccharide from *E. coli* 071: K?; H12. Separation and investigation of O-specific and core polysaccharides. *FEBS Letters*, 1968, 1:311-314.
- [29] Ieranò T, Silipo A, Cescutti P, Leone MR, Rizzo R, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A. Structural Study and Conformational Behavior of the Two Different Lipopolysaccharide O-Antigens Produced by the Cystic Fibrosis Pathogen *Burkholderia multivorans*. *Chemistry*, 2009, 29:7156-7166.
- [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-54.
- [31] Allard ST, Giraud MF, Whitfield C, Graninger M, Messner P, Naismith JH. The crystal structure of dTDP-D-Glucose 4, 6-dehydratase (RmlB) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the second enzyme in the dTDP-l-rhamnose pathway. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 1:283-295.
- [32] Allard ST, Beis K, Giraud MF, Hegeman AD, Gross JW, Wilmouth RC, Whitfield C, Graninger M, Messner P, Allen AG, Maskell DJ, Naismith JH. Toward a structural understanding of the dehydratase mechanism. *Structure*, 2002, 1:81-92.
- [33] Romana LK, Santiago FS, Reeves PR. High level expression and purification of dthymidine diphospho-D-glucose 4,6-dehydratase (*rfbB*) from *Salmonella* serovar typhimurium LT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 2:846-52.
- [34] Somoza JR, Menon S, Schmidt H, Joseph-McCarthy D, Dessen A, Stahl ML, Somers WS, Sullivan FX. Structural and kinetic analysis of *Escherichia coli* GDP-mannose 4, 6 dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose. *Structure*, 2000, 8:123-135.

## Function of *rmlB* in the pathogenic *Escherichia coli* 44277 (O2:k1)

Weiping Ding, Yuanming Luo, Guomin Ai, Cheng Jin \*

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] To identify the role of *rmlB* in synthesizing L-rhamnose in the pathogenic *Escherichia coli* 44277 (O2:K1:H4). [Methods] The *rmlB* gene was expressed and the activity of the recombinant protein was assayed by measuring the quantity of reaction product. The *rmlB* gene was deleted by homologous recombination, then phenotypic changes of the  $\Delta rmlB$  mutant was analyzed by Electron Microscope, Tricine SDS-PAGE and immunological methods. Further, various methods including MALDI-TOF-MS/MS, GC-MS and NMR was used to investigate the O antigen structure of the  $\Delta rmlB$  mutant. [Results] RmlB was confirmed to be a protein harboring the activity of dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase through enzyme assay. The  $\Delta rmlB$  mutant was successfully constructed and no phenotypic change was observed after compared with the wild type strain. L-rhamnose still existed in the  $\Delta rmlB$  mutant, indicating that there may be isoenzyme of RmlB presenting in the mutant or there was a novel way synthesizing L-rhamnose in the mutant. [Conclusion] RmlB has the activity of dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase but it is not essential for the synthesis of L-rhamnose.

**Keywords:** *Escherichia coli*, L- rhamnose, synthesis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006CB504400)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-64807425; Fax: +86-10-64807429; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

Received: 17 March 2011 / Revised: 18 April 2011