

大肠杆菌外膜蛋白 *ompW* 基因敲除菌的构建及其对两种抗生素的敏感性

吴贤斌, 邹海杰, 田丽花, 潘建义*, 赵辅昆

浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018

摘要:探讨大肠杆菌 *ompW* 基因敲除后, 硫酸新霉素和氨苄青霉素对敲除菌最低抑菌浓度 (MIC) 和生存率的影响, 进而分析 OmpW 的功能。【方法】运用 Red 重组技术将大肠杆菌 K12 染色体上基因 *ompW* 敲除, 构建缺陷株 $\Delta ompW$ 。然后分别测定硫酸新霉素和氨苄青霉素对正常菌和 $\Delta ompW$ 菌的最小抑菌浓度 (MIC) 及次抑菌浓度 (1/2 MIC) 下 K12 和 $\Delta ompW$ 菌的生存率。【结果】经 PCR 鉴定和通过提取膜蛋白进行 western blot 分析表明, 成功获得 *ompW* 敲除菌。抗生素分析表明, K12 菌对硫酸新霉素的 MIC 为 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 生存率为 98.0%; $\Delta ompW$ 菌对新霉素的 MIC 为 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而其生存率仅为 39.0%。而 k12 对氨苄新霉素的 MIC 为 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\Delta ompW$ 为 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1/2 MIC 下 K12 生存率为 70.4%, 而 $\Delta ompW$ 为 30.3%。【结论】*ompW* 基因缺陷株对两抗生素的敏感性大大增强, 表明 *ompW* 在细菌抗性方面起着关键作用。

关键词: Red 同源重组, 外膜蛋白, OmpW, 最小抑菌浓度, 生存率

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-1021-06

外膜蛋白 OmpW 广泛存在于革兰氏阴性细菌中, 属于小膜蛋白家族, 为由 8 股反平行 β 折叠形成的 β -桶状疏水通道^[1]。OmpW 最早在副溶血弧菌的外膜蛋白中发现, 为免疫原性蛋白^[2-3]。许多基础和临床研究表明 OmpW 还与病原菌毒力及致病性相关, 如霍乱弧菌的外膜蛋白 OmpW 的表达量增加可增强其毒力^[4]。鼠伤寒沙门氏杆菌 OmpW 表达增加可导致反应性关节炎/未分化脊柱关节病 (ReA/uSpA)^[5]。粪拟杆菌的 OmpW 与炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 的发生相关^[6]。此外, 大量研究还表明 OmpW 表达量的变化与细菌适应各种不利环境中有关, 如对盐浓度的耐受性^[7]、对百草枯 (除草剂) 的抗药性等^[8]。最近研究

还发现 OmpW 是一个重力诱导相关蛋白, 在超重条件下它的表达量会下降^[9-10]。而 Lin 等^[11]对大肠杆菌耐药菌株的外膜蛋白进行了蛋白质组学分析, 发现 OmpW 的表达量增加与耐药性有关。本文则运用 Red 重组技术构建了大肠杆菌 *ompW* 基因敲除菌, 进一步探讨了 OmpW 在抗生素敏感性中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和试剂: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12 和 BW25113, 质粒 pKD46 (温度敏感型复

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y2090396); 浙江省公益性技术研究项目 (2011C23067)

* 通信作者。Tel: + 86-571-86843748; E-mail: panjy@zstu.edu

作者简介: 吴贤斌 (1986-), 女, 江苏常州人, 硕士, 主要从事微生物蛋白质组学研究。E-mail: wuxianbin_hi@126.com

收稿日期: 2012-03-05; 修回日期: 2012-03-30

制子,含有受 P_{araB} 启动子调控的 Red 重组酶基因,在 L-阿拉伯糖诱导下能表达重组酶), pKD13 (含卡那霉素抗性基因 *kan*) 以及 pCP20 (含 Flp 重组酶基因在 42℃ 诱导其表达,识别抗性基因上的 FRT 位点,用于抗性基因的去除) 均为本实验室保存。聚合酶购自大连宝生物工程公司, L-阿拉伯糖购自上海泽衡生物技术有限公司,酪蛋白酸水解物为 sigma 公司产品, DNA Marker 购自 Fementas 公司。本实验所用到的培养基为 LB、SOC 和 MH。实验中卡那霉素、氨苄霉素在培养基中的终浓度分别为 20 mg/L、

50 mg/L。

1.1.2 引物:从 NCBI 获得大肠杆菌 K12 外膜蛋白 *ompW* 的基因序列和质粒 pKD13 中 *kan* 的基因序列。上下游引物分别由扩增卡那霉素抗性基因两翼 20 个碱基加上 *ompW* 基因上下游 50 个碱基组成。由于引物序列较长,因而将其设计为两对较短的引物 pKD13-F、pKD13-R 和 *ompW*-F、*ompW*-R (表 1), 引物 *ompW*-F、*ompW*-R 同时也作为检测引物用于检测 *ompW* 是否被敲除。引物合成由上海英骏生物技术公司完成。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
pKD13-F	<u>TATAACCATAACGACGGAGCGGATATGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
pKD13-R	<u>GGAATTAATAAACGATATCCTGCTGAATTCGCGGGATCCGTCGACC</u>
<i>ompW</i> -F	TGTAGGTATATTCGTACGTTTTTATAACCATAACGACGGAGCGG
<i>ompW</i> -R	GTATATTACGGGCTGTTTTTGTGCGGAATTAATAAACGATATCC

The underlined sequence is homologous with the sequence of *kan* in plasmid pKD13; No underlined sequence is homologous with flanking sequences of *ompW*; The bold part of two pairs primers are overlapping sequences.

1.2 筛选标记片段的制备

以质粒 pKD13 为模板, pKD13-F 和 pKD13-R 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 98℃ 5 min; 98℃ 10 s, 54℃ 15 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 8 min。PCR 产物经回收纯化后, 作为模板, 以 *ompW*-F 和 *ompW*-R 为引物进行 PCR, 反应条件同上。纯化回收 PCR 产物, 从而获得带有 *kan* 筛选标的片段。

1.3 电转化

挑取预先已转化质粒 pKD46 的大肠杆菌 BW25113 的单菌落接种于 LB 培养基, 过夜培养作为种子液。按 1:100 转接入 LB 培养基, 培养至 OD_{600} 为 0.3-0.5; 加入终浓度为 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖, 继续培养至 OD_{600} 为 0.5-0.6, 然后参照 Smith 等^[12] 的方法进行电转感受态的制备。取 1.2.1 中获得的带有 *kan* 筛选标记的 PCR 产物与该感受态细胞混合, 电击后加入 800 μ L SOC 培养基, 30℃ 培养 1 h 后进行离心, 用 100 μ L LB 培养基重悬, 涂到含卡那霉素和氨苄霉素的平板上, 30℃ 培养, 筛选阳性转化子。

1.4 重组菌株的鉴定及 *kan* 基因的去除

对获得的转化子以 *ompW*-F 和 *ompW*-R 为引物进行菌落 PCR 检测, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。然后将 pCP20 质粒转入鉴定为阳性克隆制

成的感受态中, 30℃ 培养 8 h 后, 42℃ 过夜培养。挑选出转化子进行 PCR 检测, 检测没有条带, 即表示 *kan* 基因已经去除, 从而获得 *ompW* 基因敲除菌株 (命名为 $\Delta ompW$)。

1.5 膜蛋白的提取、SDS-PAGE 及 Western blot 分析

将 K12 和 $\Delta ompW$ 培养过夜作为种子液, 按 1:100 转接到 LB 培养基中, 当培养液 OD_{600} 为 0.8 时收集菌体, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.6) 洗涤 2 次。将菌体溶于裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 100 mmol/L NaCl, 5% 甘油) 中进行超声破碎。破碎液经 10000 \times g 离心 15 min 后, 取上清进行 100000 \times g 45 min 超速离心, 沉淀即为膜蛋白, 用 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10% 甘油及 0.8% Triton X-100 溶解, 分装保存于 -80℃, 或进行 SDS-PAGE。一块凝胶进行染色, 并割取差异条带进行质谱鉴定。另一块胶用于转膜, 进行 Western blot 分析 (所用 *OmpW* 多克隆抗体由本课题组制备^[16])。

1.6 $\Delta ompW$ 的生长曲线测定

分别挑取正常菌 K12 和 $\Delta ompW$ 的单菌落接种于 LB 培养基, 37℃ 过夜培养后, 按 1:100 转接到 LB 培养基中, 37℃ 250 r/min 继续培养, 每隔 1 h 测定菌的 OD_{600} 。

1.7 最小抑菌浓度测定

采用倍比稀释法测定硫酸新霉素和氨苄青霉素的最小抑菌浓度(MIC)。倍比稀释 10 个浓度,使药物终浓度为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。菌的初始浓度为 $5 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h,观察细菌生长情况。细菌没有生长的最低浓度即为细菌的最小抑菌浓度。

1.8 次抑菌浓度下菌的生存率^[13]

将 $5 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{mL}$ 的 K12 和 ΔompW 分别接种到正常 LB 培养基(对照组)和添加次抑制浓度(1/2 MIC) 抗生素的 LB 培养基(实验组)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h 后分别取各菌液进行稀释涂板计数,并计算各菌生存率,即实验组菌的数量与对照组菌的数量的比值。

2 结果

2.1 *ompW* 敲除菌构建

首先,以 pKD13-F 和 pKD13-R 为引物,质粒

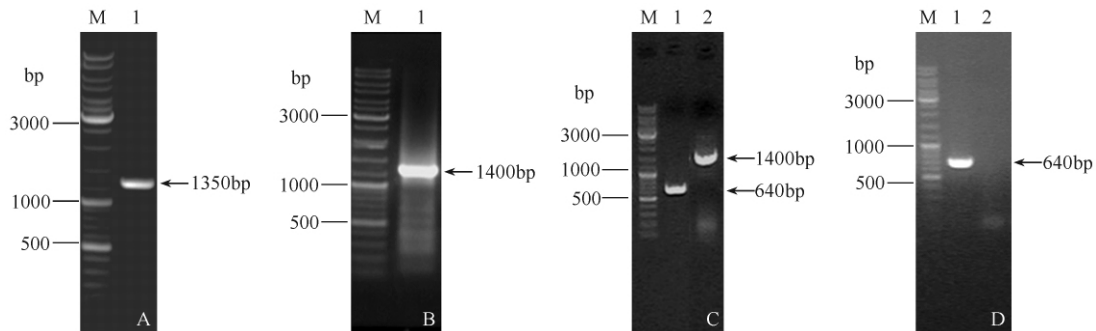


图 1 筛选标记片段获得及敲除菌验证的电泳鉴定

Fig. 1 Construction and identification of ΔompW mutant by PCR analysis. A: PCR products of *kan* gene in pKD13; B: PCR products of *kan* containing up- and down-stream sequences of *ompW*; C: Identification of the products of B by PCR (1, K12; 2, transformant); D: Identification of *kan* whether be eliminated or not by PCR (1, K12; 2, transformant).

2.2 膜蛋白 SDS-PAGE 及 Western blot 验证

为进一步验证 *ompW* 是否成功敲除,提取 K12 和 ΔompW 膜蛋白进行 SDS-PAGE(图 2-A),并利用 OmpW 抗体进行 Western blot 分析证实 ΔompW 菌的 OmpW 蛋白是否不表达。结果显示在 ΔompW 菌中,该蛋白并没有表达(图 2-B)。此外,对 K12 和 ΔompW 膜蛋白中明显差异蛋白进行了鉴定(图 2-A,箭头所示),其中 a 为 Fiu(铁离子摄取蛋白),b 为 CirA(Colicin I 受体),c 为 RplE(50s 核糖体蛋白 L5),d 为 OmpW(质谱鉴定结果未提供)。

pKD13 的 DNA 为模板,扩增出 *kan* 基因片段,大小为 1356 bp(图 1-A);然后以 *ompW*-F 和 *ompW*-R 为引物,*kan* 基因片段为模板,扩增出两端与 *ompW* 基因上下游序列同源,中间为卡那抗性基因 *kan* 的 DNA 片段,大小为 1404 bp(图 1-B)。分别以从含有氨苄霉素和卡那霉素的平板上筛选到的转化子和正常菌 K12 以 *ompW*-F 和 *ompW*-R 为引物进行菌落 PCR。对照株 *E. coli* K12 经 PCR 得到的片段大小约为 640 bp(图 1-C 中的泳道 1),与 *ompW* 基因大小相一致,而发生重组的转化子片段大小为 1404 bp(图 1-C 中的泳道 2)。说明重组菌染色体上的 *ompW* 基因已经被 *kan* 基因取代。然后进一步对转化子进行 *kan* 抗性基因的去除,并进行 PCR 检测,结果显示对照 K12 PCR 片段的大小为 640 bp(图 1-D 中的泳道 1),而转化子没有条带(图 1-D 中的泳道 2);而用抗性平板进行验证,转化子在卡那霉素平板不能生长,而在普通平板却可以生长,这说明抗性基因已经去除。

2.3 *E. coli*K12 与 ΔompW 的生长曲线

虽成功构建 *ompW* 敲除菌,但因部分蛋白的表达发生了改变,为此测定了 K12 和 ΔompW 的生长曲线(图 3)。结果表明,二者的生长趋势并无明显变化。

2.4 最小抑菌浓度和在次抑菌浓度下的生存率分析

为了探讨 *ompW* 在细菌对抗生素敏感性中的作用,分别对正常 K12 和 ΔompW 菌的最小抑菌浓度(MIC)和生存率进行了分析,结果见图 4 和图 5。

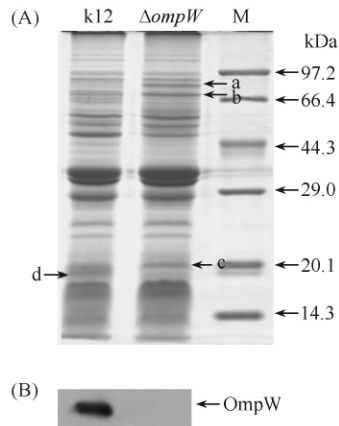


图2 膜蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot 分析 (B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of membrane protein extracted from *E. coli* K12 and $\Delta ompW$.

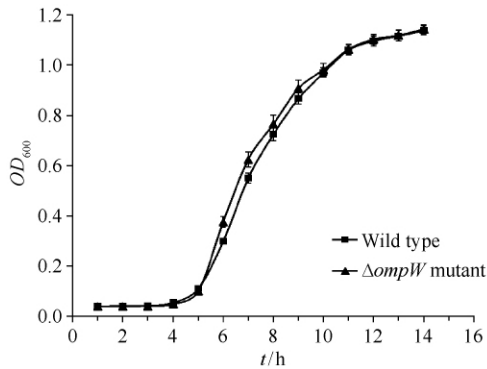


图3 K12 与 $\Delta ompW$ 的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of *E. coli* K12 and $\Delta ompW$.

其中硫酸新霉素对 K12 的 MIC 为 $8.0 \mu\text{g/mL}$, 而对 $\Delta ompW$ 的 MIC 仅为 $1.7 \mu\text{g/mL}$ (图 4-A); 氨苄青霉素对 K12 的 MIC 为 $16.0 \mu\text{g/mL}$, 而对 $\Delta ompW$ 的 MIC 为 $3.3 \mu\text{g/mL}$ (图 5-A), 经统计分析表明差异都达到极显著水平 ($P < 0.01$)。为进一步分析 *ompW* 的作用, 测定了比 MIC 值更加敏感的两菌株的生存率来分析其重要性。在 $1/2$ MIC 硫酸新霉素浓度下, $\Delta ompW$ 菌生存率仅为 39.0%, 而 K12 菌生存率高达 98.0% (图 4-B); 而在 $1/2$ MIC 的氨苄青霉素浓度下, $\Delta ompW$ 菌生存率仅为 30.3%, 而 K12 菌生存率为 70.4% (图 5-B), 二者同样达到极显著差异 ($P < 0.01$)。以上分析表明, OmpW 对促进细菌抵抗抗生素的抑菌作用具有至关重要的作用。

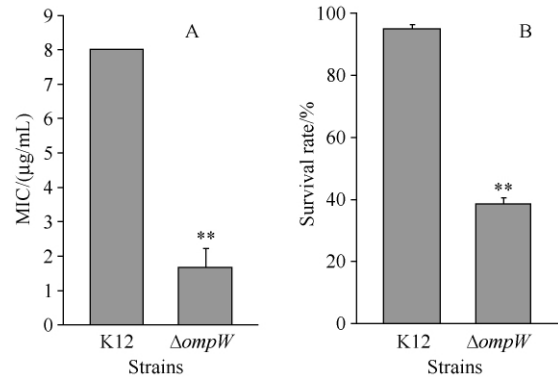


图4 K12 和 $\Delta ompW$ 对硫酸新霉素的 MIC (A) 及 $1/2$ MIC 下的生存率 (B)

Fig. 4 MIC (A) and survival rate under $1/2$ MIC (B) to neomycin sulphate of *E. coli* K12 and $\Delta ompW$.

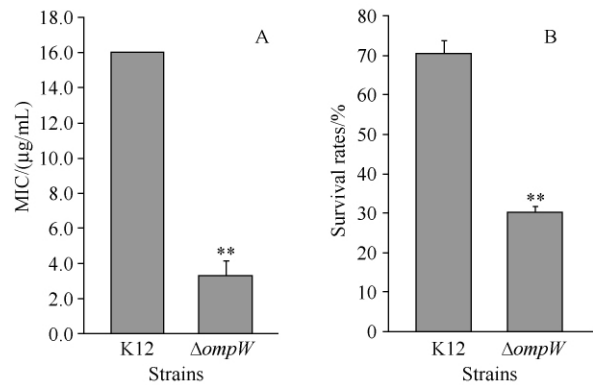


图5 K12 和 $\Delta ompW$ 对氨苄青霉素的 MIC (A) 及 $1/2$ MIC 下的生存率 (B)

Fig. 5 MIC (A) and survival rate under $1/2$ MIC (B) to ampicillin of *E. coli* K12 and $\Delta ompW$.

3 讨论

Red 重组技术是基于 λ 噬菌体 Red 重组酶作用的同源重组技术, 该技术的发明促进了病原微生物功能蛋白质的研究^[15]。Red 同源重组技术的原理是将一段携带与靶基因两翼各有 40–60 bp 同源序列的 PCR 片段导入宿主菌细胞, 利用 λ 噬菌体 Red 重组酶 (Exo、Beta 和 Gam 3 种蛋白) 的作用, 使线性 DNA 片段与染色体的特定靶序列进行同源重组, 靶基因被标记基因置换下来。这种重组技术是基因功能研究和新菌株构建的有力工具。因此本文为探讨外膜蛋白 OmpW 在对抗抗生素中的作用, 运用该技术构建了 *ompW* 敲除菌株 ($\Delta ompW$), 并通过 PCR

(图 1-D) 和 Western blot (图 2-B) 进行了验证。

同时, 本研究进一步探讨了 $\Delta ompW$ 菌与正常 K12 菌的生长情况, 以及对硫酸新霉素和氨苄青霉素的最小抑菌浓度和生存率的差异情况。结果表明, 尽管 *ompW* 敲除后, 其生长速度并无明显变化 (图 3), 但硫酸新霉素和氨苄青霉素对 K12 的最小抑菌浓度约是 $\Delta ompW$ 的 5 倍 (图 4-A 和图 5-A), 且二者在 1/2MIC 下的存活率也存在极显著差异 (图 4-B 和图 5-B), 这表明 OmpW 在促进细菌抵抗抗生素过程中起关键作用。硫酸新霉素属于氨基糖苷类抗生素, 通过细菌表面的亲水性通道进入细菌细胞内部, 并与负责蛋白质合成的核糖体结合, 形成无法移动的复合物, 使得蛋白质的合成停止在起始阶段, 从而因干扰细菌蛋白质合成而达到抗菌作用。氨苄青霉素作为 β -内酰胺类抗生素, 它的作用机制主要是青霉素结合蛋白从而阻碍细胞壁粘肽合成, 使细菌胞壁缺损, 菌体膨胀裂解抑制胞壁粘肽合成酶。研究结果表明敲除 *ompW* 后, 细菌对抗生素的敏感性大大增加。而目前认为 OmpW 为窄的疏水通道, 主要参与疏水分子和离子 (尤其是铁离子) 的跨膜转运^[1]。Gil 等^[8] 对鼠伤寒杆菌的 OmpW 的研究认为 OmpW 是一种动态变化的通道, 可作为除草剂百草枯的外排通道。结合本实验结果, 我们认为 OmpW 很可能也是一种外排抗生素的通路, 故当敲除 *ompW* 后, 其对抗生素的敏感性大大增加。

此外, 由于 OmpW 是铁离子的运输通道, 其表达受铁离子调控^[16], 故当 *ompW* 敲除后其他可能参与铁离子运输的外膜蛋白的表达量上升, 如 Fiu (图 2-A, a) 和 CirA (图 2-A, b), 二者均为 tonB 依赖的受体, 参与转运铁离子。因此当细菌缺少了 OmpW, 需要高表达其他相关蛋白来摄取铁离子来维持生长, 这可能也是敲除菌的生长速度未受明显影响的原因 (图 3)。而核糖体蛋白 L5 (图 2-A, c) 的变化, 可能与多种蛋白质的表达变化有关。

参考文献

- [1] Hong H, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B. The outer membrane protein ompw forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(11):7568-7577.
- [2] Jalajakumari MB, Manning PA. Nucleotide sequence of the gene, ompw, encoding a 22 kDa immunogenic outer membrane protein of *vibrio cholerae*. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(8):2180.
- [3] 马振宁, 郑磊, 林海美, 郑允权, 唐凤翔, 石贤爱, 郭养浩. 抗 OmpW 单克隆抗体的制备与特性鉴定. *细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)*, 2011, 27(9):982-984.
- [4] Goel AK, Jiang SC. Genetic determinants of virulence, antibiogram and altered biotype among the *Vibrio cholerae* O1 isolates from different cholera outbreaks in India. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010, 10(6):815-819.
- [5] Singh R, Shasany AK, Aggarwal A, Sinha S, Sisodia BS, Khanuja SP, Misra R. Low molecular weight proteins of outer membrane of *Salmonella typhimurium* are immunogenic in Salmonella induced reactive arthritis revealed by proteomics. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007, 148(3):486-493.
- [6] Iltanen S, Tervo L, Halttunen T, Wei B, Braun J, Rantala I, Honkanen T, Kronenberg M, Cheroutre H, Turovskaya O, Autio V, Ashorn M. Elevated serum anti-I2 and anti-OmpW antibody levels in children with IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006, 12(5):389-394.
- [7] Xu C, Wang S, Ren H, Lin X, Wu L, Peng X. Protein analysis on the expression of outer membrane proteins of *vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*, 2005, 5(12):3142-3152.
- [8] Gil F, Ipinza F, Fuentes J, Fumeron R, Villarreal JM, Aspée A, Mora GC, Vásquez CC, Saavedra C. The ompw (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in salmonella enterica serovar typhimurium. *Research in Microbiology*, 2007, 158(6):529-536.
- [9] Shimoshige H, Kobayashi H, Shimamura S, Usami R. Gravity sensing by *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74(12):2511-2514.
- [10] Shimoshige H, Kobayashi H, Usami R. Inhibition of gene expression in *Escherichia coli* under hypergravity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(1):175-177.
- [11] Xu C, Lin X, Ren H, Zhang Y, Wang S, Peng X. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics*, 2006, 6(2):462-473.

- [12] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. High-efficiency transformation and gene inactivation in streptococcus suis type 2. *Microbiology*, 1995, 141 (Pt1) :181-188.
- [13] Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Asako H, Aono R. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (6) :2302-2307.
- [14] 邹海杰, 吴贤斌, 潘建义, 赵辅昆. 大肠埃希菌外膜蛋白 OmpW 的克隆及在外膜上高表达. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2011, 31 (12) :46-50.
- [15] Kirill AD, Barry LW. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12) : 6640-6645.
- [16] Thompson DK, Beliaev AS, Giometti CS, Tollaksen SL, Khare T, Lies DP, Nealson KH, Lim H, Yates J 3rd, Brandt CC, Tiedje JM, Zhou J. Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (*fur*) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of *fur* in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (2) :881-892.

Construction of *ompW* knock-out mutants of *Escherichia coli* to increase sensitivity to neomycinsulphate and ampicillin

Xianbin Wu, Haijie Zou, Lihua Tian, Jianyi Pan^{*}, Fukun Zhao

Lab of Proteomics and Molecular Enzymes, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: [Objective] To investigate the contribution of an outer membrane protein OmpW to tolerance neomycinsulphate and ampicillin of *Escherichia coli* K12. [Methods] The *ompW* knock-out mutant ($\Delta ompW$) of *E. coli* K12 was generated using λ -Red recombination system. Then the minimal inhibitory concentration (MIC) and the survival rates under 1/2 MIC of neomycinsulphate or ampicillin of $\Delta ompW$ and *E. coli* K12 were determined respectively. [Results] The $\Delta ompW$ was successfully obtained through confirmation of PCR analysis at the gene level and Western blot analysis at the protein level. The MIC of neomycinsulphate of $\Delta ompW$ is 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The value is much lower than that of *E. coli* K12, which is 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Difference of survival rates under 1/2 MIC of neomycinsulphate of $\Delta ompW$ and *E. coli* K12 was also observed, and their survival rates are 39% and 98%, respectively. The MIC of ampicillin of $\Delta ompW$ is 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The value is also lower than that of *E. coli* K12 (16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The survival rates under 1/2 MIC ampicillin of $\Delta ompW$ and *E. coli* K12 are 30.3% and 70.38%, respectively. [Conclusion] The $\Delta ompW$ is much more sensitive to neomycinsulphate and ampicillin than its parent strain. The result indicated that OmpW played crucial role in bacteria resistance of drug.

Keywords: Red recombination, outer membrane protein, OmpW, MIC, survival rate

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y2090396) and by the Commonweal Technology Application project program of Zhejiang province (2011C23067)

^{*} Corresponding author. Tel: + 86-571-86843748; E-mail: panjy@zstu.edu

Received: 5 March 2012 / Revised: 30 March 2012