



lpxL 和 *lpxM* 基因对 O1、O78 血清型禽致病性大肠杆菌毒力的影响

屈香, 杨梓纯, 许炎辉, 王娅玲, 喻婷, 樊毛迪, 王航, 高清清, 高崧*, 刘秀梵
江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 农业部禽用生物制剂创制重点实验室, 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】为探究脂多糖对O1、O78血清型禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)致病作用的影响。【方法】选取负责脂质A生物合成相关基因*lpxL*和*lpxM*, 利用λ噬菌体的Red同源重组系统分别构建APEC E516 (O1血清型)和APEC E522 (O78血清型)缺失株E516Δ*lpxL*、E516Δ*lpxM*、E516Δ*lpxL*Δ*lpxM*、E522Δ*lpxL*、E522Δ*lpxM*和E522Δ*lpxL*Δ*lpxM*, 并通过体内外试验对其生物学特性及致病性进行研究。【结果】各菌株生长速度基本一致。E516Δ*lpxL*、E516Δ*lpxL*Δ*lpxM*、E522Δ*lpxM*和E522Δ*lpxL*Δ*lpxM*的抗血清补体杀菌能力和抗鸡巨噬细胞HD-11吞噬能力较野生株显著下降, 而缺失株E516Δ*lpxM*、E522Δ*lpxL*与野生株相比无明显差异; 半数致死剂量测定结果显示, 除E516Δ*lpxM*、E522Δ*lpxL*外, 各缺失株毒力降低1000倍左右; SPF鸡体内动态分布试验结果显示, 各缺失株在鸡体内定殖能力较野生株显著下降, 但回补株的毒力未能恢复至野生株水平。【结论】*lpxL*和*lpxM*基因与O1血清型APEC E516株和O78血清型APEC E522株的毒力有关, 但是*lpxL*和*lpxM*基因对E516和E522菌株毒力的影响存在差异。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 类脂 A, 缺失株, 致病力

禽致病性大肠杆菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可以引起多种禽类发病, 形成局部或全身典型的感染症状, 严重影响禽的正常生长和饲料转化, 给养殖业造成了巨大损

失^[1]。APEC 是引起禽大肠杆菌病最重要的病原体, 与人类肠外致病性大肠杆菌(如新生儿脑膜炎大肠杆菌 NMEC、尿道性大肠杆菌 UPEC)共有部分毒力基因^[2-3]。APEC 抗原结构复杂多样, 主要

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0500705, 2017YFD0500203); 国家自然科学基金(31972711, 31672553, 31602059); 扬州大学大学生创新创业训练计划; 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

*通信作者。Tel: +86-514-87972117; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-20; 修回日期: 2020-04-07; 网络出版日期: 2020-05-27

由菌体抗原(O 抗原)、菌毛抗原(F 抗原)、鞭毛抗原(H 抗原)等组成, 其中 O 抗原常作为 APEC 血清型分型依据, 且以 O1、O2、O78 等优势致病血清型为主^[4]。

大肠杆菌细胞壁表面的主要组分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是 APEC 致病的重要毒力因子^[5], LPS 分子的合成和运输是细菌正常生存的必需条件, 其由脂质 A、核心多糖和 O 抗原单位等不连续的结构区域组成^[6]。研究表明, 脂质 A 与致病力密切相关, 是 LPS 分子中内毒素活性的基团^[5,7]。当致病性大肠杆菌侵入动物机体后, 菌体表面的 LPS 分子释放脂质 A, 激活了机体的脂质 A 受体, 随之通过系列免疫反应, 激活宿主的先天免疫系统, 产生多种促炎性细胞因子^[8]。在革兰氏阴性菌的感染中, 脂质 A 是动物体先天免疫应答的有效刺激物^[9], 对多种病理生理变化起着重要作用。

脂质 A 的合成和转运步骤复杂, 主要在细胞内膜和细胞质中完成, 共涉及 13 个反应^[10]。酰基转移酶在脂质 A 合成的后期发挥着重要作用, 其特异性位置关系到细菌 LPS 与宿主细胞的特异性结合和免疫反应^[11]。酰基转移酶 LpxL 和 LpxM 主要负责在由 2 个氨基葡萄糖和 4 个脂肪酸链构成的兼性分子 DSMP 上分别加上月桂酸、肉豆蔻酸和棕榈烯酸替代月桂酸^[12-14], 而 LpxL 和 LpxM 则分别由 *lpxL* (*htrB*)和 *lpxM* (*msbB*)基因编码^[15]。本文为了探讨脂多糖合成基因 *lpxL*、*lpxM* 与 APEC O1 和 O78 血清型菌株致病性的关系, 通过构建 *lpxL*、*lpxM* 基因缺失株, 进行相关生物学特性的研究, 分析脂多糖对于 APEC 生物学特性、致病性的影响, 以及 *lpxL*、*lpxM* 基因在 APEC O1 和

O78 血清型中的影响有无差异, 从而进一步探讨 APEC 的致病机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物、菌株、质粒和细胞

420 羽 1 日龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸡和 180 羽 21 日龄的 SPF 鸡由北京梅里亚种蛋自行孵化后于隔离器内饲养, 自由采食、饮水。APEC E516 (O1)和 APEC E522 (O78)菌株均为本实验室由临床发病鸡中分离的鸡源强毒株^[16], 本研究所用的菌株、质粒和细胞见表 1。

1.2 酶类和相关试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNase I (RNase-free)、DNA Ladder Mix marker、DNA 限制性内切酶、Agarose Gel DNA 纯化试剂盒、PCR 纯化试剂盒、RNAiso Plus、PrimeScript RT-PCR Kit 和 DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司; 庆大霉素(Gentamicin)、氨苄青霉素(Ampicillin)和氯霉素(Chloramphenicol)购自上海生物工程技术服务有限公司; L-阿拉伯糖购自 BioBasic 公司。

1.3 缺失株的构建

1.3.1 引物设计:根据 GenBank 公布的 APEC O1、O78 的序列, 分析启动子区域显示基因 *lpxL* (*htrB*)、*lpxM* (*msbB*)拥有独立的单个开放阅读框, 分别含有 921、972 bp, 基因序列在大肠杆菌中高度保守。*lpxL* 基因的上下游基因分别为 *yceE*、*yceA* (图 1-A), *lpxM* 基因的上下游基因分别为 *pykA*、*mepM* (图 1-B)。本研究引物按照表 2 设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1. 本研究中使用菌株、质粒和细胞

Table 1. Bacterial strains and plasmids and cell used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source or reference
Strains		
E516	Wild-type avian pathogenic <i>E. coli</i> serotype O1	[16]
E522	Wild-type avian pathogenic <i>E. coli</i> serotype O78	[16]
E516 Δ <i>lpxL</i>	Lauroyl transferase-deficient strain	This study
E516 Δ <i>lpxM</i>	Myristoyl transferase-deficient strain	This study
E516 Δ <i>lpxL</i> Δ <i>lpxM</i>	Both lauroyl transferase and myristoyl transferase deficient strain	This study
E522 Δ <i>lpxL</i>	Lauroyl transferase-deficient strain	This study
E522 Δ <i>lpxM</i>	Myristoyl transferase-deficient strain	This study
E522 Δ <i>lpxL</i> Δ <i>lpxM</i>	Both lauroyl transferase and myristoyl transferase deficient strain	This study
DH5 α	Cloning strain	Invitrogen
Plasmids		
pMD®19-T Vector	TA Cloning Vector, Amp ⁺	TaKaRa
pACYC184	Complementary vector, Cam ⁺	Gift from Professor Zhu Guoqiang of Yangzhou University
pKD46	Amp ⁺ , expresses λ -phage Red recombinase	[17]
pKD3	<i>cat</i> ⁺ gene, template plasmid	[17]
pCP20	Cm ⁺ , Amp ⁺ , yeast Flp recombinase gene, FLP	[17]
Cell		
HD-11	Chicken macrophage line, chicken myelomonocytic cell transformed by the Myc-encoding MC29 virus	Gift from Professor Jiao Xi'an of Yangzhou University

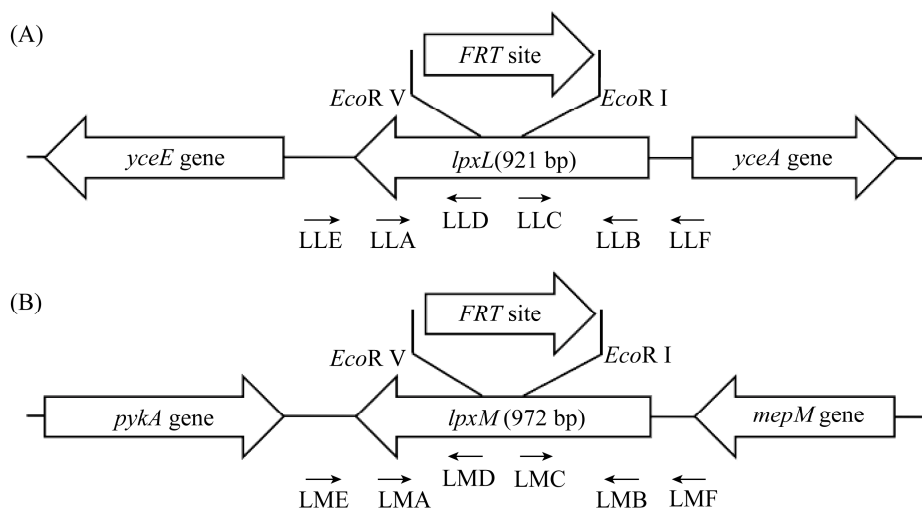
图 1. *lpxL* 和 *lpxM* 在 APEC E516、E522 基因组中的位置及缺失的位点

Figure 1. Position and mutation site of *lpxL* and *lpxM* genes in the APEC E516, E522 genome. Primers presented in Table 2.

表 2. 本研究中缺失株构建使用的引物

Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Target genes
LLA	CTCTCTAGATGGTGCCATCATGATGCA (<i>Xba</i> I)	<i>lpxL</i>
LLB	CTCGAGCTCATTGTGCATCGCAACCTG (<i>Sac</i> I)	<i>lpxL</i>
LLC	CTCGAATTCGGTTCGAGCATCGATTTA (<i>EcoR</i> I)	<i>lpxL</i>
LLD	CTCGATATCGCACCGGATCATGATTAC (<i>EcoR</i> V)	<i>lpxL</i>
LLE	CCAGTTTATAGGGGTGTC	<i>lpxL</i>
LLF	GGTTGTGTAACACTGGCA	<i>lpxL</i>
LMA	CTCTCTAGACGCGCAATCGTATGATCA (<i>Xba</i> I)	<i>lpxM</i>
LMB	CTCGAGCTCCAAAGTTCCGTGATCCCA (<i>Sac</i> I)	<i>lpxM</i>
LMC	CTCGAATTCCTTATGGAACATCGCTGCC (<i>EcoR</i> I)	<i>lpxM</i>
LMD	CTCGATATCCGTCTGCATGCGAGAAAT (<i>EcoR</i> V)	<i>lpxM</i>
LME	CCACGCGTATTTTAACGG	<i>lpxM</i>
LMF	CGCAGCTACGGTTTGATT	<i>lpxM</i>
CFEV	CTCGATATCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCT (<i>EcoR</i> V)	pKD3
CRVI	CTCGAATTCATGGGAATTAGCCATGGTCC (<i>EcoR</i> I)	pKD3
Rel <i>lpxL</i> -184-F	CGTAGGTATACTTTCAACATTGCTCGCAGGT (<i>Sna</i> I)	pACYC184
Rel <i>lpxL</i> -184-R	CGCCGAGTACTTAATAGCGTGAAGGAACGC (<i>Sca</i> I)	pACYC184
Rel <i>lpxM</i> -184-F	CTAATTCGCGGTGTTGATTTTGCCATGCCAC (<i>Sca</i> II)	pACYC184
Rel <i>lpxM</i> -184-R	CGGCCAGTACTTTATTTGAAGGGATAAAGAT (<i>Sca</i> I)	pACYC184
pACYC184-F	GGTAAACCGAAAGGCAGG	<i>lpxL</i> , <i>lpxM</i>
pACYC184-R	GGCTATTTAACGACCCTG	<i>lpxL</i> , <i>lpxM</i>
<i>lpxL</i> -F	ATGACGAATCTACCCAAGT	<i>lpxL</i>
<i>lpxL</i> -R	TTAATAGCGTGAAGGAACG	<i>lpxL</i>
<i>lpxM</i> -F	GCGAATACATTCCTGAGT	<i>lpxM</i>
<i>lpxM</i> -R	GATCTTTGCGCTTATACG	<i>lpxM</i>

1.3.2 重组质粒 pMD19-T-*lpxL* 和 pMD19-T-*lpxM*

的构建: 用全菌裂解法制备 DNA 模板^[18]。PCR 扩增目的基因 *lpxL* 和 *lpxM*, 将目的片段与克隆载体 pMD19-T Simple Vector 连接, 构建重组质粒 pMD19-T-*lpxL* 和 pMD19-T-*lpxM*, 并测序验证。

1.3.3 重组质粒 pMD19-T-*lpxLcat* 和 pMD19-T-*lpxMcat* 的构建:

使用引物 LLC/LLD、LMC/LMD 分别以重组质粒 pMD19-T-*lpxL* 和 pMD19-T-*lpxM* 为模板 PCR 反向扩增 *lpxL* 及 *lpxM* 基因; 使用引物 CFEV/CRVI 以质粒 pKD3 为模板 PCR 扩增氯

霉素基因片段, 上述扩增片段经 *EcoR* I、*EcoR* V 双酶切, 连接后转化至大肠杆菌 DH5 α , 鉴定正确的重组质粒分别命名为 pMD19-T-*lpxLcat* 和 pMD19-T-*lpxMcat*。

1.3.4 E516 和 E522 株 *lpxL*、*lpxM* 基因缺失株的

构建: 按高清清等^[19]的方法, 应用 λ 噬菌体的 Red 同源重组系统构建 E516、E522 株 *lpxL*、*lpxM* 单基因缺失株, 分别命名为 E516 Δ *lpxL*、E516 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL*、E522 Δ *lpxM*; 在此基础上, 分别构建双缺失株 E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 和 E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; 最终通过 λ 噬菌体的 Red 同源重组系统中的辅助

质粒去除所有单、双缺失株的氯霉素抗性后作为后续试验菌株。

1.3.5 E516 和 E522 株 *lpxL*、*lpxM* 基因回补株的构建:设计引物 Re*lpxL*-184-F/R 和 Re*lpxM*-184-F/R (表 2)分别扩增 *lpxL*、*lpxM* 基因及其可能的启动子,并将其克隆到质粒 pACYC184 中。启动子预测分析使用 http://www.fruitfly.org/seq_tools/启动子的预测程序工具进行。由此构建出重组质粒 p184-*lpxL* 和 p184-*lpxM*,电转入缺失株 E516Δ*lpxL*、E516Δ*lpxM*、E522Δ*lpxL* 和 E522Δ*lpxM* 生成回补株,分别命名为 ReE516Δ*lpxL*、ReE516Δ*lpxM*、ReE522Δ*lpxL* 和 ReE522Δ*lpxM*。

1.4 遗传稳定性分析及电镜观察

1.4.1 遗传稳定性分析:将获得的缺失株和回补株分别进行连续传 20 代,通过 PCR 鉴定及测序验证,分析其遗传稳定性。

1.4.2 生长曲线测定:将待测菌株在基础培养基(minimal medium, MM)中的初始浓度调节为 $OD_{600}=0.05$,在 37 °C 恒温摇床中以 220 r/min 振荡培养 10 h,其间每隔 1 h 测定培养物的 OD_{600} 值,并绘制各菌株的生长曲线。

1.4.3 电镜观察:参考文献[20]方法进行。将新鲜的细菌培养液离心,去上清,以磷酸盐缓冲盐水(PBS)重悬,调整菌液至适当的浓度滴于铜网上,磷钨酸染色后在透射电镜(Tecnaï 12, 荷兰 Philips 公司)下观察。

1.5 RNA 提取和逆转录 RT-PCR 分析

取野生株、缺失株及回补株单菌落于液体 LB 培养基中过夜振荡培养,培养物洗涤后悬浮于 PBS 中。使用 RNAiso Plus 试剂盒提取总 RNA。使用 gDNA Eraser (TaKaRa, 中国大连)去除样品

中可能残留的 DNA,再使用 PrimeScript RT (TaKaRa, 中国大连)试剂盒进行 cDNA 合成。在目的基因 *lpxL*、*lpxM* 两端设计引物(表 2),以菌株的 DNA、RNA、cDNA 为模板分别进行 PCR 鉴定。

1.6 血清补体杀菌试验

将浓度调至 10^8 菌落形成单位(colony forming units, CFU)/mL。用 PBS 缓冲液分别稀释 SPF 鸡血清至 0.5%、2.5%、5%、12.5%、25%,上述浓度的血清以及 25%补体灭活血清(56 °C 金属浴 30 min)分别作为试验用血清。取 10 μL 菌液分别混合 190 μL 不同浓度的血清悬液和灭活血清中,于 37 °C 静置培养 30 min,取 100 μL 培养物在 LB 平板上进行细菌计数,18 h 后观察结果。

1.7 1 日龄鸡的半数致死量(LD₅₀)测定

菌株在 37 °C 恒温条件下静置培养至对数期,收获后 4 °C 离心,野生株和回补株用 15%甘油 PBS 缓冲液洗涤、悬浮并稀释至 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 和 10^4 CFU/mL,缺失株分别稀释为 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 和 10^6 CFU/mL。每个稀释度取 0.1 mL 菌液气囊接种 7 羽 1 日龄 SPF 鸡,攻毒后连续观察 7 d 记录雏鸡存活情况。LD₅₀ 的计算采用 SPSS 统计软件(IBM SPSS statistics 22, IBM 公司,美国)进行。

1.8 21 日龄 SPF 鸡体内定居试验

180 羽 21 日龄的 SPF 鸡分为 12 组,每组 15 羽分别经左胸气囊接种含 10^8 CFU 的野生株、缺失株或回补株细菌悬液,感染 24 h 后扑杀,无菌采集心脏血液 100 μL 及称取肝脏、脾脏、肺脏和肾脏各 0.25 g 研磨,用含 15%甘油 PBS 缓冲液连续稀释后,用固体 LB 培养基进行细菌计数,以确定在各内脏器官中的细菌数量。

1.9 鸡巨噬细胞感染试验

1.9.1 HD-11 细胞的吞噬试验: 将 2×10^5 个/孔的细胞接种至 24 孔细胞培养板, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37°C 、5% CO_2 条件下培养获得单层细胞, 用 PBS 洗涤培养至对数期的细菌, 按 moi 为 100:1 的比值将细菌加入细胞中。室温 1000 r/min 离心 5 min, 使细胞的吞噬作用同步。 37°C 孵育 1 h, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含 10% FBS 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基, 37°C 孵育 1.5 h, 杀灭胞外细菌。PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 1 mL 0.1% Triton X-100 溶液裂解细胞。取 $100 \mu\text{L}$ 加入到 $900 \mu\text{L}$ 的 PBS, 依次稀释。每个稀释度的稀释液取 $100 \mu\text{L}$, 涂布 LB 平板进行细菌计数。每次重复 3 个孔。细胞对细菌的内吞率 = (吞入细胞的细菌数 ÷ 每孔接种的细菌数) $\times 100\%$ 。

1.9.2 胞内存活试验: 细菌感染细胞至庆大霉素杀灭胞外菌过程同 1.9.1, 加入含 10% FBS 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基, 37°C 孵育 1.5 h, 此时计为 0 h。用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含 10% FBS 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基, 用于抑制胞外细菌的生长增殖。自加入

$10 \mu\text{g/mL}$ 庆大霉素 DMEM 培养基时开始计时, 分别在细菌增殖 4、8 和 12 h 时, 加入 1 mL 0.1% Triton X-100 溶液裂解细胞进行胞内细菌涂板计数。以 0 h 时细胞内的细菌数作为基数 1, 计算各菌的胞内存活率。细菌在胞内存活率 = 在一定时间内胞内计数的细菌数 ÷ 每孔 0 h 时间点细胞内吞的细菌数。

1.10 数据处理

采用 GraphPad Prism 软件程序 (GraphPad Prism 软件程序, 版本 7.00, 美国) 分析组间差异的显著性。所有数据均采用 Mann-Whitney 检验进行分析。

2 结果和分析

2.1 缺失株和回补株的构建及稳定性研究

将筛选到的 *lpxL* 基因单缺失株、双缺失株和野生株用鉴定引物 LLE/LLF 扩增后分别得到 1420 bp、1466 bp 和 1371 bp 的单一一条带 (图 2, 1-6 道), 测序结果显示基因序列正确, 即成功构建缺失株 *E516ΔlpxL*、*E522ΔlpxL*、*E516ΔlpxLΔlpxM*

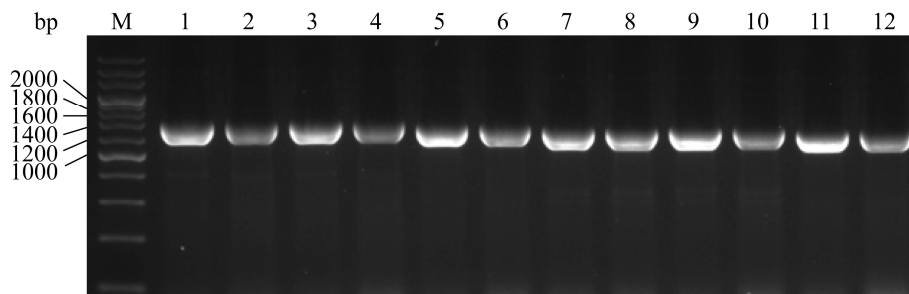


图 2. 基因 *lpxL* 和 *lpxM* 缺失株的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of *lpxL*- and *lpxM*-deletion strains by PCR. M: DNA marker; lanes 1-6: the amplified of *lpxL* fragment of gene-deletion strains (*E516ΔlpxL*, *E522ΔlpxL*, *E516ΔlpxLΔlpxM* and *E522ΔlpxLΔlpxM*) and wild-type strains (*E516* and *E522*) by primer LLE/LLF; lanes 7-12: the amplified of *lpxM* fragment of gene-deletion strains (*E516ΔlpxM*, *E522ΔlpxM*, *E516ΔlpxLΔlpxM* and *E522ΔlpxLΔlpxM*) and wild-type strains (*E516* and *E522*) by primer LME/LMF.

和 E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*。 *lpxM* 基因单缺失株、双缺失株和野生株用鉴定引物 LME/LMF 扩增后得到大小约为 1300 bp 的单一一条带(图 2, 7-12 道), 测序结果显示基因序列正确, 即成功构建缺失株 E516 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxM*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 和 E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*。

将构建的互补重组质粒 p184-*lpxL*、p184-*lpxM* 测序正确后分别电转到 *lpxL* 基因缺失株和 *lpxM* 基因缺失株, 用鉴定引物 pACYC184-F/R 扩增后分别得到大小约为 1900 bp 和 1800 bp 的单一一条带(图 3), 测序结果显示回补株的 *lpxL*、*lpxM* 基因序列正确, 即成功构建回补株 ReE516 Δ *lpxL*、ReE522 Δ *lpxL*、ReE516 Δ *lpxM* 和 ReE522 Δ *lpxM*。将缺失株、回补株连续传 20 代后, PCR 鉴定未发生回复突变, 序列测序结果无突变, 表明其具有良好的遗传稳定性。

2.2 电镜观察

在透射电镜下, E516 Δ *lpxL* (图 4-C)、E522 Δ *lpxM* (图 4-F)、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* (图 4-G)

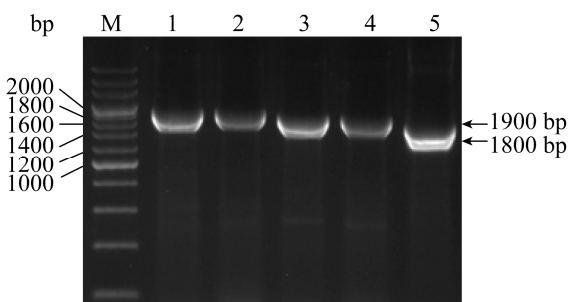


图 3. 基因 *lpxL*、*lpxM* 回补株的 PCR 鉴定

Figure 3. Identification of *lpxL*- and *lpxM*-complementary strains by PCR. M: DNA marker; lanes 1-4: complemented strains ReE516 Δ *lpxL*, ReE522 Δ *lpxL*, ReE516 Δ *lpxM* and ReE522 Δ *lpxM*; lane 5: pACYC184.

和 E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* (图 4-H)缺失株与野生株相比, 细胞外膜及表面结构层明显变薄, 局部表面结构甚至不完整, 而 E516 Δ *lpxM* (图 4-D)、E522 Δ *lpxL* (图 4-E)的表面结构相对完整; 回补株细胞表面结构与 E516 Δ *lpxL*、E522 Δ *lpxM*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 和 E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 缺失株相比, 稍有恢复, 但并未完全恢复至野生株表面结构的完整性(图 4-I、J、K、L)。

2.3 生长曲线测定

生长曲线测定结果表明, 野生株 E516、E522 及其缺失株、回补株在 MM 培养基中的生长速度基本一致(图 5)。

2.4 RNA 提取和逆转录 RT-PCR 分析

RT-PCR 结果显示, *lpxL* 和 *lpxM* 基因缺失株去除氯霉素基因后, *lpxL* 和 *lpxM* 基因同源臂与 FRT 位点残基形成意外转录子^[20] (图 6 和图 7)。所谓“意外转录子”, 是指缺失株中残留的缺失基因同源臂与氯霉素去除时遗留的 FRT 临时组成新的转录本正常转录, 产生的转录序列称为“意外转录子”^[21]。在 *lpxL* 缺失株中, 删除了 *lpxL* 开放阅读框中的 55 bp 片段, 保留了 105 bp FRT 残基, 因此 E516 Δ *lpxL*、E522 Δ *lpxL* 意外转录子大小为 971 bp, E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 意外转录子大小为 1021 bp, 大于 *lpxL* 基因的 921 bp (图 6)。在 *lpxM* 缺失株中, 删除了 *lpxM* 开放阅读框中的 58 bp 片段, 保留了 105 bp FRT 残基, 因此 E516 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxM* 意外转录子大小为 979 bp, E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 意外转录子大小为 1029 bp, 大于 *lpxM* 基因经设计引物扩增的片段 932 bp (图 7)。

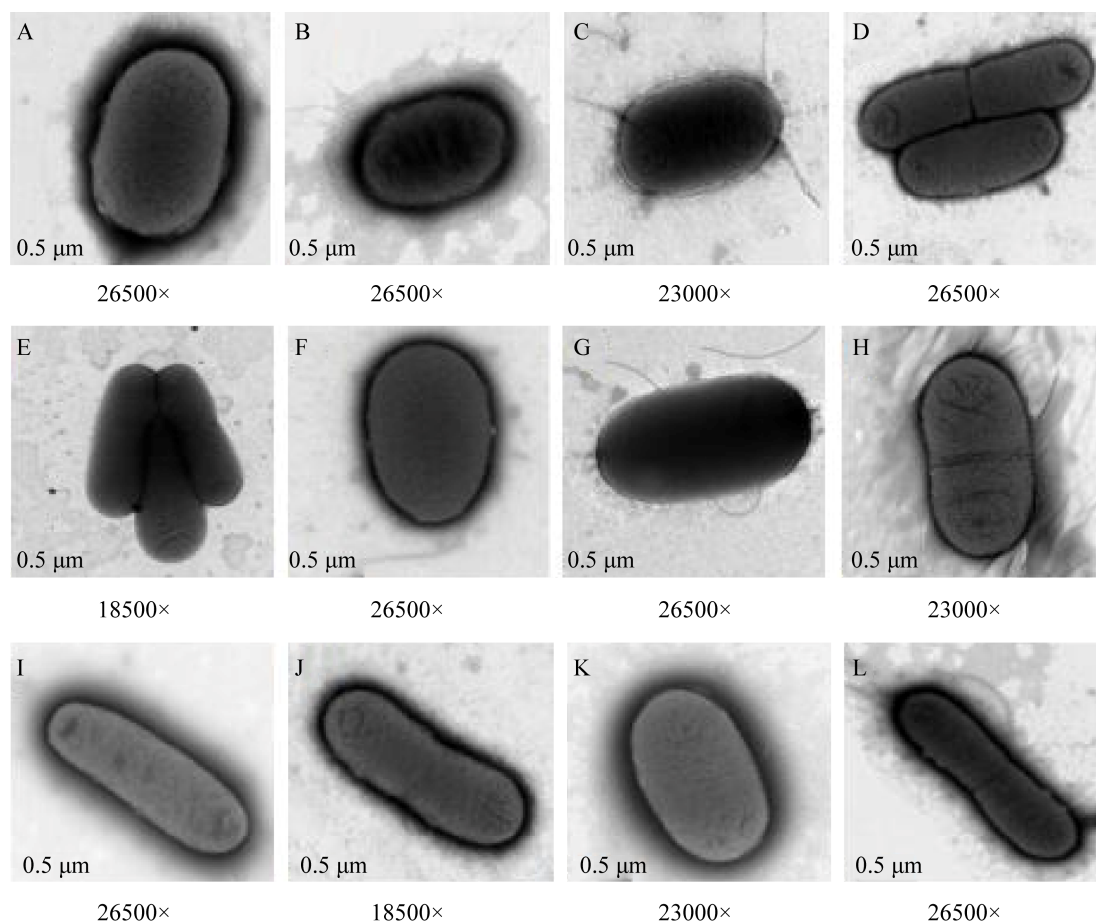


图 4. APEC E516、E522 野生株、缺失株及回补株的电镜观察

Figure 4. Observation of APEC E516, E522, gene-deletion strains and their complementary strains under the electron microscope. A: E516; B: E522; C: E516 Δ *lpxL*; D: E516 Δ *lpxM*; E: E522 Δ *lpxL*; F: E522 Δ *lpxM*; G: E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; H: E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; I: ReE516 Δ *lpxL*; J: ReE516 Δ *lpxM*; K: ReE522 Δ *lpxL*; L: ReE522 Δ *lpxM*.

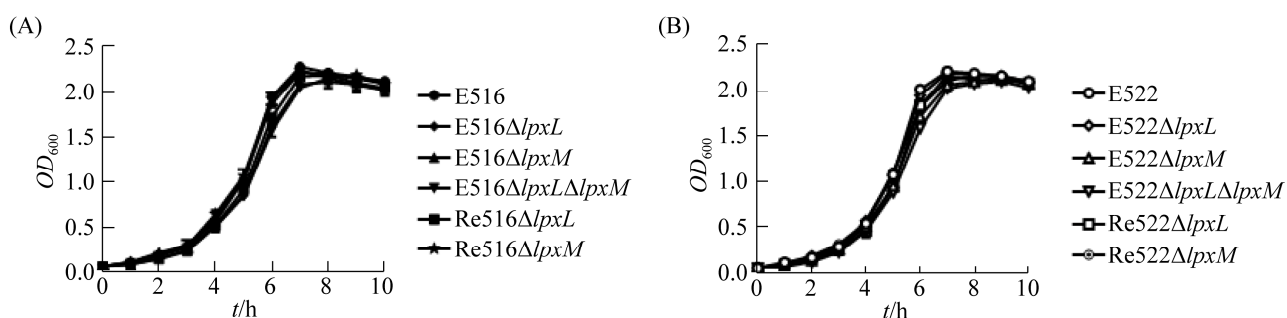


图 5. 野生株、缺失株和回补株在 MM 中的生长曲线

Figure 5. Growth curves of wild-type strains, gene-deletion strains and complementary strains in MM at 37 °C and their optical densities checked at different times.

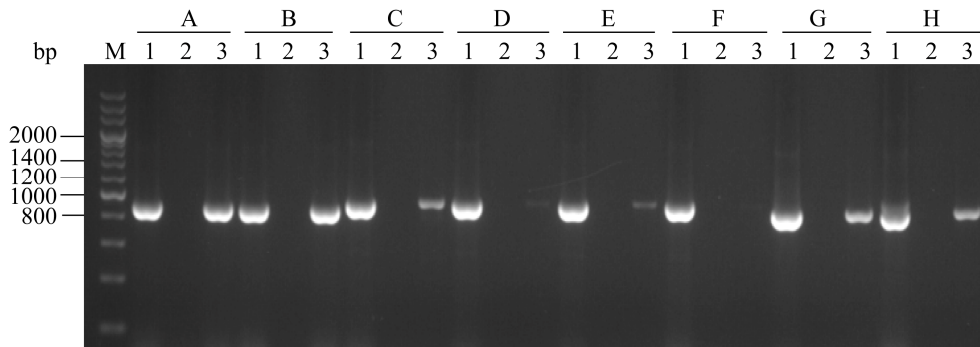


图 6. *lpxL* 基因相关野生株、缺失株和回补株的 RT-PCR 鉴定

Figure 6. Identification of *lpxL* gene in wild-type strains, gene-deletion strains and complementary strains by RT-PCR. M: DNA marker; A: E516; B: E522; C: E516 Δ *lpxL*; D: E522 Δ *lpxL*; E: E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; F: E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; G: ReE516 Δ *lpxL*; H: ReE522 Δ *lpxL*. Sample identities: lane 1: genomic DNA from strains; lane 2: total RNA from strains, ReE522 Δ *lpxL* without RT after genomic DNA was removed; lane 3: cDNA derived from the total RNA of strains.

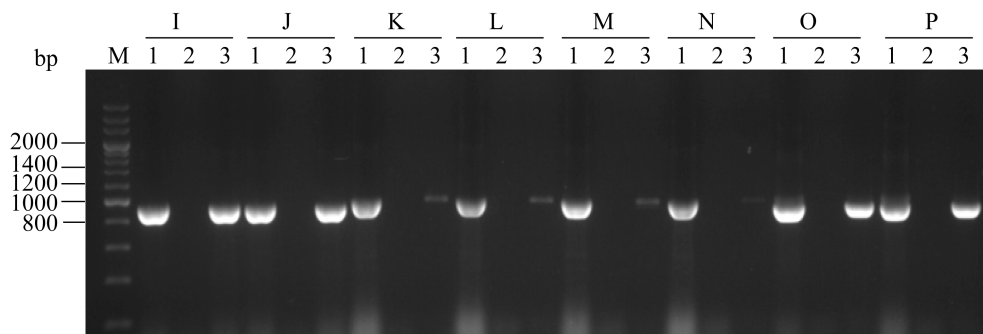


图 7. *lpxM* 基因相关野生株、缺失株和回补株的 RT-PCR 鉴定

Figure 7. Identification of *lpxM* gene in wild-type strains, gene-deletion strains and complementary strains by RT-PCR. M: DNA marker; I: E516; J: E522; K: E516 Δ *lpxM*; L: E522 Δ *lpxM*; M: E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; N: E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*; O: ReE516 Δ *lpxM*; P: ReE522 Δ *lpxM*. Sample identities: lane 1: genomic DNA from strains; lane 2: total RNA from strains without RT after genomic DNA was removed; lane 3: cDNA derived from the total RNA of strains.

2.5 血清补体杀菌试验结果

在浓度为 12.50% 和 25.00% 的 SPF 鸡血清中, E516 Δ *lpxL*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 部分死亡, 与野生株相比差异显著 ($P < 0.05$)。低于 12.50% 的 SPF 鸡血清以及灭活

血清对所有菌株的生长无明显影响。结果表明, 在 APEC E516 菌株中, *lpxL* 基因对 APEC E516 抵抗血清补体杀菌能力有明显影响, 在 APEC E522 菌株中, *lpxM* 基因对 APEC E522 抵抗血清补体杀菌能力有明显影响(图 8)。

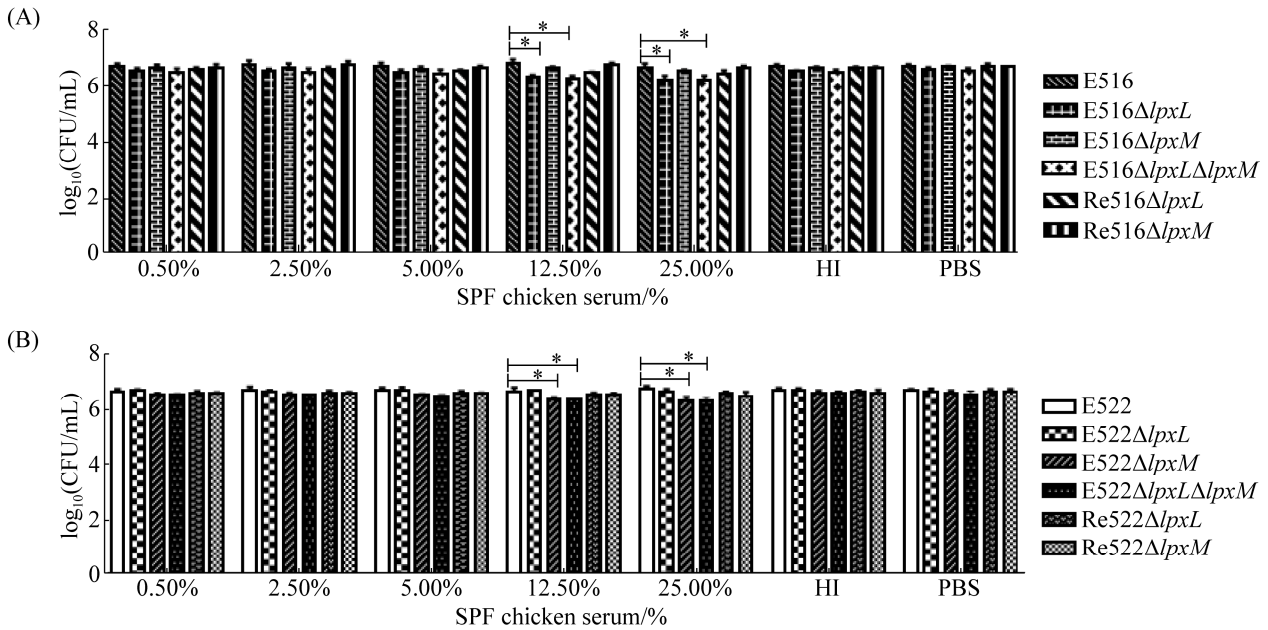


图 8. APEC 野生株、缺失株和回补株血清补体杀菌试验

Figure 8. Influence of the lipid A on serum resistance of wild-type strains E516 and E522, gene-deletion strains and complementary strains. Bacteria were incubated in different concentrations serum obtained from SPF chicks. The graph shows means standard errors. *: $P < 0.05$.

2.6 APEC E516、E522 野生株、缺失株和回补株对 1 日龄 SPF 鸡的半数致死量(LD₅₀)测定结果

1 日龄 SPF 鸡 LD₅₀ 结果显示,与野生株相比,除 E516ΔlpxM、E522ΔlpxL 外,各缺失株毒力降低 1000 倍左右,回补株的毒力仅部分恢复。具体测定结果见表 4。

表 4. E516 和 E522 野生株、缺失株和回补株 LD₅₀ 的测定

Table 4. The LD₅₀ of wild-type strains, gene-deletion strains and complementation strains of APEC E516 and E522

Strains	LD ₅₀	Strains	LD ₅₀
E516	10 ^{4.722}	E522	10 ^{6.571}
Re516ΔlpxL	10 ^{8.056}	Re522ΔlpxL	10 ^{7.141}
Re516ΔlpxM	10 ^{6.015}	Re522ΔlpxM	10 ^{7.601}
E516ΔlpxL	10 ^{9.604}	E522ΔlpxL	10 ^{7.369}
E516ΔlpxM	10 ^{7.549}	E522ΔlpxM	10 ^{9.328}
E516ΔlpxLΔlpxM	10 ^{10.388}	E522ΔlpxLΔlpxM	10 ^{9.375}

2.7 SPF 鸡体内动态分布试验

24 h 体内动态分布试验结果表明,与野生株 E516 相比,缺失株 E516ΔlpxL、E516ΔlpxM、E516ΔlpxLΔlpxM 在血液、脏器中的带菌量极显著下降,毒力被高度致弱 ($P < 0.0001$),回补株 ReE516ΔlpxL、ReE516ΔlpxM 毒力部分恢复,但未恢复到野生株水平(图 9)。

与野生株 E522 相比,缺失株 E522ΔlpxL 在血液、脏器中的带菌量显著下降 ($P < 0.001$),缺失株 E522ΔlpxM、E522ΔlpxLΔlpxM 的带菌量极显著下降,毒力被高度致弱 ($P < 0.0001$),回补株 ReE522ΔlpxL、ReE522ΔlpxM 毒力部分恢复,也未恢复到野生株水平(图 10)。

2.8 细胞感染试验结果

2.8.1 HD-11 细胞吞噬试验: HD-11 细胞吞噬试

验结果显示, 缺失株 E516 Δ *lpxL*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 对 HD-11 细胞的抗吞噬能力极显著低于野生株 E516 ($P<0.0001$), 回补株 Re516 Δ *lpxL* 抗吞噬能力部分恢复, 其余菌株与野生株 E516 相比无显著差异(图 11-A)。缺失株 E522 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 对 HD-11 细胞的抗吞噬能力极显著低于野生株 E522 ($P<0.0001$), 回补株 Re522 Δ *lpxM* 抗吞噬能力部分恢复, 其余菌株与野生株 E522 相比无显著差异(图 11-B)。

2.8.2 细菌胞内存活率: 细菌胞内存活试验结果

显示, 菌株在感染后 8 h, 胞内存活的细菌量达到最大值。感染 8 h、12 h 时, 缺失株 E516 Δ *lpxL*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 在 HD-11 细胞内的存活率与野生株 E516 相比极显著下降($P<0.0001$), 互补株 Re516 Δ *lpxL* 的存活能力部分恢复, 其余菌株与野生株 E516 相比无显著差异(图 12-A)。缺失株 E522 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 在 HD-11 细胞内的存活率与野生株 E522 相比极显著下降($P<0.0001$), 互补株 Re522 Δ *lpxM* 的存活能力部分恢复, 其余菌株与野生株 E522 相比无显著差异(图 12-B)。

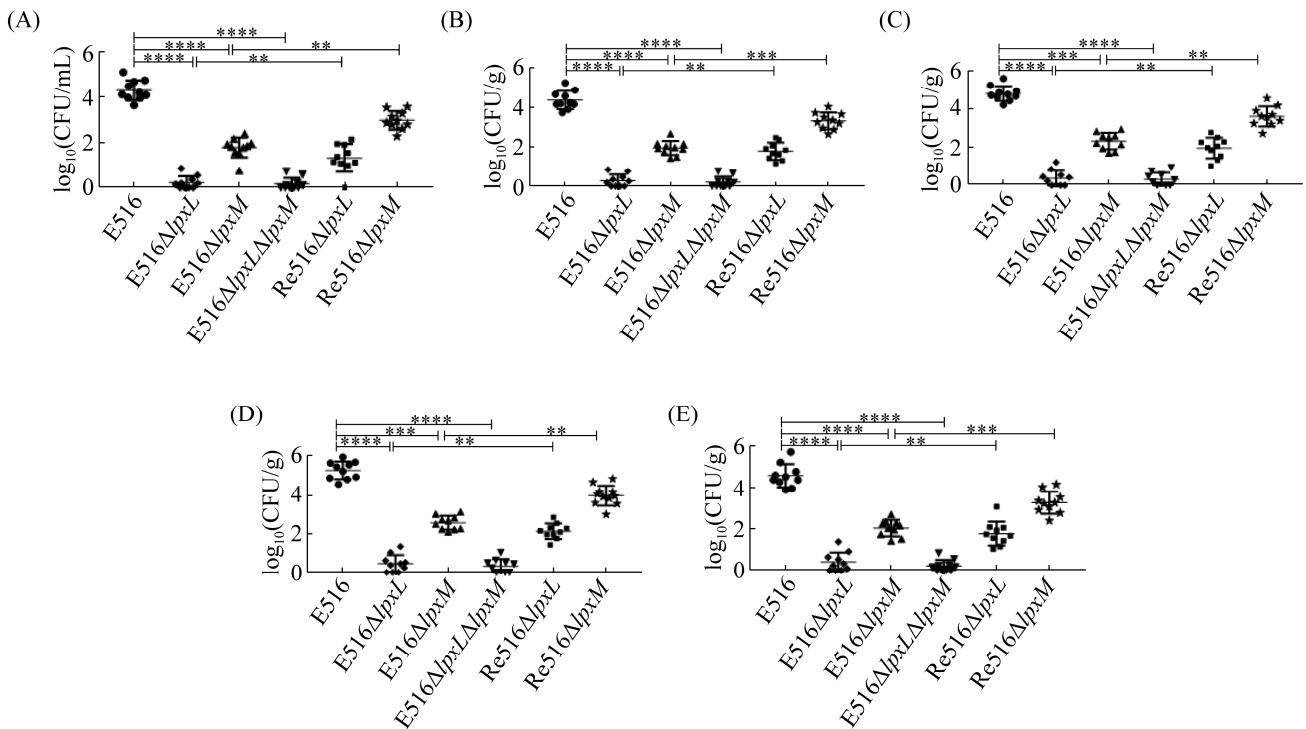


图 9. E516 及其缺失株、回补株体内动态分布结果

Figure 9. Colonization and persistence of the wild-type strain E516 (●), E516 Δ *lpxL* (◆), E516 Δ *lpxM* (▲), E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM* (▼), ReE516 Δ *lpxL* (■) and ReE516 Δ *lpxM* (★) during systemic infection. A: blood; B: liver; C: spleen; D: lung; E: kidney. Data were presented as log₁₀ (CFU/mL) of heart blood or log₁₀ (CFU/g) of tissues. Horizontal bars indicated the mean values. Each data represented a sample from an individual chicken. Statistically significances as determined by the Mann-Whitney test were indicated by asterisks. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

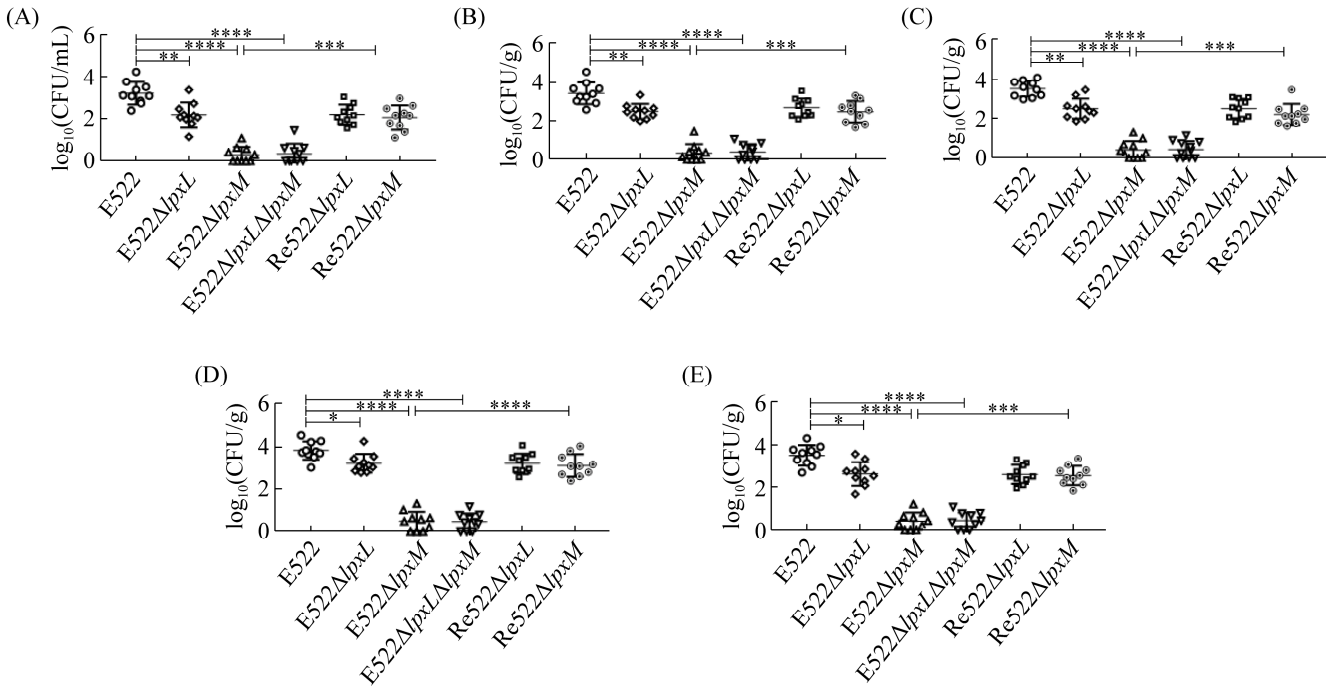


图 10. E522 及其缺失株、回补株体内动态分布结果

Figure 10. Colonization and persistence of the wild-type strain E522 (○), E522Δ*lpxL* (◇), E522Δ*lpxM* (Δ), E522Δ*lpxLlpxM* (▽), ReE522Δ*lpxL* (□), and ReE522Δ*lpxM* (⊙) during systemic infection. A: blood; B: liver; C: spleen; D: lung; E: kidney. Data were presented as log₁₀ (CFU/mL) of heart blood or log₁₀ (CFU/g) of tissues. Horizontal bars indicated the mean values. Each data represented a sample from an individual chicken. Statistically significances as determined by the Mann-Whitney test were indicated by asterisks. *: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001; ****: *P*<0.0001.

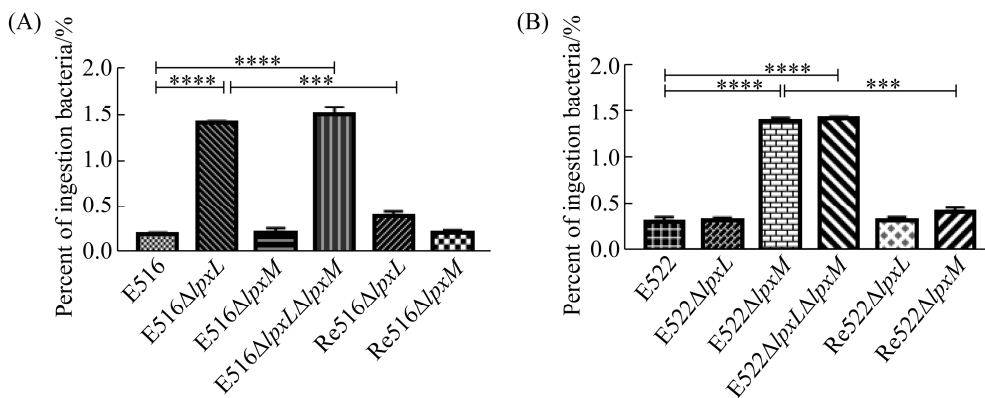


图 11. 鸡巨噬细胞 HD-11 细胞吞噬试验

Figure 11. Ingestion assays of bacteria by HD-11. Asterisks indicate statistically significant differences. ***: *P*<0.001; ****: *P*<0.0001.

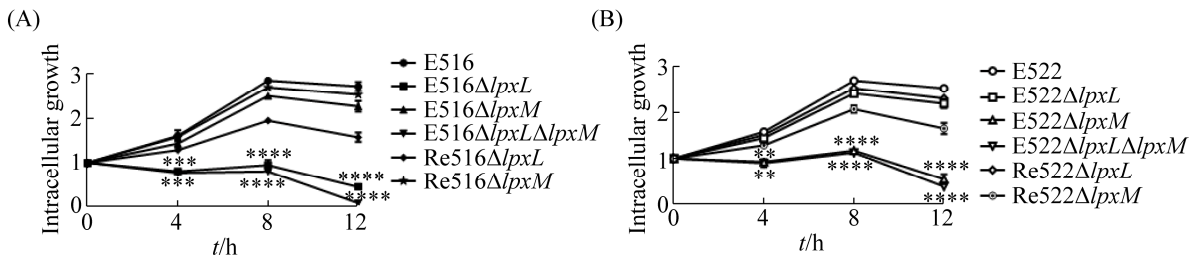


图 12. APEC 野生株、缺失株和回补株胞内存活试验

Figure 12. Intracellular survival of bacteria in chicken macrophage HD-11 cells. Asterisks indicate statistically significant differences. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨论

APEC 的致病机理比较复杂, 涉及到诸多因子的相互作用, 其中毒力相关因子尤为重要。LPS 是毒力因子之一, 其中的类脂 A 是维持革兰氏阴性细菌细胞外膜渗透性屏障作用的主要组分^[20]。APEC 中常见引起禽大肠杆菌病的血清群是 O1、O2、O78, 目前类脂 A 合成过程中发挥作用的两个后期酰基转移酶所编码的基因 *lpxL*、*lpxM*, 在禽致病性大肠杆菌优势血清型 O2 菌株的生物学特性中的作用已有研究, 类脂 A 结构的完整性影响 APEC O2 的血清杀菌、致病性等一系列生物学特性^[20]。而这两个基因对于 APEC O1 E516 和 APEC O78 E522 菌株功能的影响尚不清楚。

在生长曲线测定中, 各菌株在 MM 培养基中的生长速度虽然比较缓慢, 但是生长速度基本一致, 表明 *lpxL*、*lpxM* 基因的缺失对菌株吸收基础碳酸盐等营养成分无明显影响。许慧卿等^[19]对 APEC O2 的血清型 E058 株 *lpxL*、*lpxM* 基因缺失株类脂 A 进行了糖组分分析, 类脂 A 中月桂酸酯 (C12:0) 和肉豆蔻酸酯 (C14:0) 的脂肪酸组成分别由大肠杆菌后期酰基转移酶 *LpxL* 和 *LpxM* 催化, 与野生株相比, *lpxL* 缺失株的 Lipid A 失去了一条次级月桂酸链 (C12:0), *lpxM* 缺失株的 Lipid A 失去了

一条次级豆蔻酸链 (C14:0), 双缺失株的 Lipid A 的两条次级脂肪酸链 (C12:0 和 C14:0) 均丢失。虽然我们未进行缺失株的糖代谢反应组分分析, 但是, 电镜观察结果清楚地表明, 血清 O1 型 E516 株 *lpxL* 基因缺失、血清 O78 型 E522 株 *lpxM* 基因缺失对细菌表面结构的完整性影响明显; 而回补株也不能将其表面结构恢复至野生株水平 (图 4)。巧合的是, 这一结果, 与我们观察到的缺失株多数生物学特性的改变相吻合, 再次证明了 *lpxL*、*lpxM* 基因对 APEC 维持其生物学特性、致病性十分重要。人和动物的血液中存在补体等成分, 宿主在抗病原菌感染中的第一道防线是血清补体系统的杀菌作用, 血清补体抗性是 APEC 的一个毒力参数^[22-23]。本研究部分缺失株类脂 A 的酰基链缺失后, 对血清补体杀菌的抵抗能力也相应发生了变化, 可能由于类脂 A 次级酰基链的缺失致使外膜孔道发生改变, 通透性增加, 从而提高了缺失株对血清中补体和其他杀菌因子的敏感性。幸运的是, 我们的电镜观察结果较好地支持了这一推测。

APEC 感染宿主时, 往往需要抵御宿主巨噬细胞的吞噬作用, 而在巨噬细胞内的定殖可帮助 APEC 菌株逃避宿主免疫系统的清除、杀伤作用^[24]。有研究表明大肠杆菌已经进化出一些复杂的逃逸防御机制, 其中之一便是抵御宿主巨噬细

胞的吞噬作用^[25]。HD-11 巨噬细胞吞噬和存活试验结果显示, E516 Δ *lpxL*、E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxM*、E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* 缺失株的抗吞噬能力和细胞内定殖、存活能力较野生株显著下降, 回补株存活能力有所提高。

在细菌致病性研究中, 动物感染试验往往是直观评价病原菌毒力因子致病作用的“金标准”。LD₅₀ 是评价 APEC 对鸡致病性的一个重要指标, 本研究 LD₅₀ 测定结果显示, 与野生株相比, 缺失株已基本丧失毒力, 而回补株的毒力未恢复至野生株水平。体内动态分布试验有助于判定菌株在鸡体脏器中的定殖能力, 试验结果显示, 缺失株在感染鸡各脏器的定殖能力与野生株相比下降显著, 回补株未恢复至野生株水平。上述结果均证实, 类脂 A 作为 APEC 的一种重要毒力因子, 在细菌的致病过程中发挥了不可或缺的作用。致病菌感知环境信号, 通过控制毒力基因的转录、表达发挥致病作用^[26]。 λ 噬菌体的 Red 重组系统因其简便性和高效率而适合构建 APEC 缺失株, 但有研究发现, 该系统具有局限性。将氯霉素抗性基因从缺失株删除后, 原本目的基因的启动子驱使缺失基因的上下游同源臂及残留的 FRT 位点进行正常转录, 这一转录的序列, 称为“意外转录子”, 而且“意外转录子”的转录会影响缺失株的致病力^[21]。本研究中, 我们再次证实, 当去除氯霉素抗性基因后, 缺失株确实产生了“意外转录子”, 但存在“意外转录子”的缺失株与氯霉素抗性去除之前的缺失株相比, 致病性有无变化, 本文尚未涉及。

综合本研究, *lpxL*、*lpxM* 基因对 O1 血清型 APEC E516 菌株致病性的影响与 APEC O2 E058 株相似, 即 *lpxL* 基因影响程度大于 *lpxM* 基因; 而 *lpxL*、*lpxM* 基因在 O78 血清型 APEC E522 菌

株致病性中发挥的作用出现明显差别, 即 *lpxM* 基因影响程度大于 *lpxL* 基因, 这一结果出乎预料。有研究发现, 同一基因由于表达量的高低不同, 在不同基因型菌株中发挥的作用有所不同, 从而导致了菌株的毒力强弱的变化^[27]。根据本研究结果, *lpxL* 和 *lpxM* 对不同血清型菌株生物学特性的影响程度不同, 对其毒力和致病性的影响也不尽相同。然而, 具体机制还需要更进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Wang XM, Liao XP, Zhang WJ, Jiang HX, Sun J, Zhang MJ, He XF, Lao DX, Liu YH. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(9): 1099–1106.
- [2] Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(22): 7043–7050.
- [3] Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li GW, Wannemuehler Y, Nolan LK. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 2010, 78(8): 3412–3419.
- [4] Tuntufye HN, Lebeer S, Gwakisa PS, Goddeeris BM. Identification of avian pathogenic *Escherichia coli* genes that are induced *in vivo* during infection in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3343–3351.
- [5] Triantafilou M, Triantafilou K. Receptor cluster formation during activation by bacterial products. *Journal of Endotoxin Research*, 2003, 9(5): 331–335.
- [6] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(4): 593–656.
- [7] Sandford EE, Orr M, Balfanz E, Bowerman N, Li XY, Zhou HJ, Johnson TJ, Kariyawasam S, Liu P, Nolan LK, Lamont SJ. Spleen transcriptome response to infection with avian

- pathogenic *Escherichia coli* in broiler chickens. *BMC Genomics*, 2011, 12: 469.
- [8] Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999, 11(4): 443–451.
- [9] Babinski KJ, Raetz CRH. Identification of a gene encoding a novel *Escherichia coli* UDP-2, 3-diacetylglucosamine hydrolase. *The FASEB Journal*, 1998, 12(8): A1288.
- [10] Raetz CRH. Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59: 129–170.
- [11] Hittle LE, Powell DA, Jones JW, Tofigh M, Goodlett DR, Moskowitz SM, Ernst RK. Site-specific activity of the acyltransferases HtrB1 and HtrB2 in *Pseudomonas aeruginosa* lipid A biosynthesis. *Pathogens and Disease*, 2015, 73(8): ftv053.
- [12] Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76: 295–329.
- [13] 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9677–9685.
- [14] Vorachek-Warren MK, Carty SM, Lin SH, Cotter RJ, Raetz CRH. An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 degrees C. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(16): 14186–14193.
- [15] Clementz T, Bednarski JJ, Raetz CRH. Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A: *htrB* catalyzed incorporation of laurate. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(20): 12095–12102.
- [16] Gao S, Liu XF, Zhang RK, Jiao XA, Wen QY, Wu CX, Tang YM, Zhu XB, Li C, Chen J, Cui Lb, Cui HP. The isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* isolates of chicken origin from some regions in China. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1999, 30(2): 164–171. (in Chinese)
高崧, 刘秀梵, 张如宽, 焦新安, 文其乙, 吴长新, 唐一鸣, 朱晓波, 李琮, 陈娟, 崔力兵, 崔洪平. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定. *畜牧兽医学报*, 1999, 30(2): 164–171.
- [17] 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 of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [18] Schilling B, Hunt J, Gibson BW, Apicella MA. Site-specific acylation changes in the lipid A of *Escherichia coli lpxL* mutants grown at high temperatures. *Innate Immunity*, 2014, 20(3): 269–282.
- [19] Xu HQ, Ling JL, Gao QQ, He HB, Mu XH, Yan Z, Gao S, Liu XF. Role of the *lpxM* lipid A biosynthesis pathway gene in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* strain E058 in a chicken infection model. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(3/4): 516–526.
- [20] Xu HQ. Construction, pathogenicity and immune characterization of *lpxL*, *lpxM* and *lpxP* mutants of avian pathogenic *Escherichia coli* E058. Doctor Dissertation of Yangzhou University, 2013. (in Chinese)
许慧卿. 禽致病性大肠杆菌 E058 株 *lpxL*、*lpxM* 和 *lpxP* 基因突变株构建及致病性、免疫特性研究. 扬州大学博士学位论文, 2013.
- [21] Liu JH, Mu XH, Wang XB, Huan HX, Gao QQ, Chen J, Qiao PZ, Jiang LY, Gao S, Liu XF. Unexpected transcriptome *pompT* contributes to the increased pathogenicity of a *pompT* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2019, 228: 61–68.
- [22] Gao QQ, Xia L, Liu JH, Gao S, Liu XF. Dual deletion of the *kpsE* and *kpsD* genes reduced the bacterial virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(10): 1571–1582. (in Chinese)
高清清, 夏乐, 刘娟华, 高崧, 刘秀梵. *kpsE* 和 *kpsD* 双基因缺失显著降低肠道外致病性大肠杆菌的毒力. *微生物学报*, 2016, 56(10): 1571–1582.
- [23] La Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science*, 2002, 73(1): 27–35.
- [24] Fetherston JD, Kirillina O, Bobrov AG, Poulley JT, Perry RD. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 2045–2052.
- [25] Brubaker RR. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to yersiniae: roles of yops and IcrV (V antigen). *Infection and Immunity*, 2003, 71(7): 3673–3681.
- [26] Gao QQ, Xu HQ, Wang XB, Zhang DB, Ye ZQ, Gao S, Liu

- XF. RfaH promotes the ability of the avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058 to cause avian colibacillosis. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(11): 2474–2480.
- [27] Du DC, Yu YF, Ma CF, Yao HC, Lu CP, Zhang W. Genotype of *mrp* and its relationship with the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 147–155. (in Chinese)
- 杜德超, 于岩飞, 马彩凤, 姚火春, 陆承平, 张伟. 猪链球菌 2 型不同 *mrp* 基因型与毒力的关系. *微生物学通报*, 2016, 43(1): 147–155.

Effect of *lpxL* and *lpxM* genes on virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* belonging to O1 and O78 serogroups

Xiang Qu, Zichun Yang, Yanhu Xu, Yaling Wang, Ting Yu, Maodi Fan, Hang Wang, Qingqing Gao, Song Gao*, Xiufan Liu

Key Laboratory of Avian Bioproducts Development, Ministry of Agriculture, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To explore the role of lipopolysaccharide in Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). [Methods] By using λ -phage Red recombination system, we generated the lipid A biosynthesis associated genes *lpxL* and *lpxM* mutants E516 Δ *lpxL*, E516 Δ *lpxM*, E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*, E522 Δ *lpxL*, E522 Δ *lpxM* and E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM*. We conducted a series of *in vivo* and *in vitro* assays to investigate their biological characteristics and pathogenicity. [Results] The growth rate of the strains was basically the same. The ability of resistance to serum and killing by chicken macrophages were significantly impaired, E516 Δ *lpxL*, E516 Δ *lpxL* Δ *lpxM*, E522 Δ *lpxM* and E522 Δ *lpxL* Δ *lpxM* were significantly attenuated than those of the wild-type strains, and E516 Δ *lpxM* and E522 Δ *lpxL* had no obvious difference in relation to their parent strains. LD₅₀ results show that the pathogenicity of mutants was significantly attenuated than those of the wild-type strains. The colonization and survival model demonstrated that the loads of mutants were significantly decreased compared with those of the wild-type strains in all bloods and organs tested in chickens. The ability of mutants to enter and survive in chicken macrophage HD-11 is significantly reduced compared with those of the parent strains. [Conclusion] These results indicated that *lpxL* and *lpxM* genes are critical to the pathogenicity of APEC E516 and E522, *lpxL* had a more significant effect on virulence of APEC E516, and *lpxM* gene on virulence of APEC E522.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, lipid A, mutant, pathogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R&D Program of China (2017YFD0500705, 2017YFD0500203), by the National Natural Science Foundation of China (31972711, 31672553, 31602059), by the College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program of Yangzhou University, and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972117; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 20 January 2020; Revised: 7 April 2020; Published online: 27 May 2020