

研究报告

外膜蛋白 CsgG 影响禽致病性大肠杆菌生物被膜形成

彭浩恒^{1,2}, 林子竹^{1,2}, 胡剑刚², 张贝贝², 郭伟奇², 王欣宇², 王芷洋^{1,2}, 祁晶晶², 田明星², 鲍衍清², 李海花^{*1}, 王少辉^{*1,2}

1 天津农学院 动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300384

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

彭浩恒, 林子竹, 胡剑刚, 张贝贝, 郭伟奇, 王欣宇, 王芷洋, 祁晶晶, 田明星, 鲍衍清, 李海花, 王少辉. 外膜蛋白 CsgG 影响禽致病性大肠杆菌生物被膜形成[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 811-821.

PENG Haoheng, LIN Zizhu, HU Jiangang, ZHANG Beibei, GUO Weiqi, WANG Xinyu, WANG Zhiyang, QI Jingjing, TIAN Mingxing, BAO Yanqing, LI Haihua, WANG Shaohui. The outer membrane protein CsgG influences biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 811-821.

摘要:【背景】禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)能够引起禽类气囊炎、心包炎等症状, 严重制约养禽业的健康发展。同时, APEC 与人类肠道外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)具有相似的毒力因子, 严重威胁公共卫生。APEC 形成生物被膜可抵抗抗生素杀伤及逃避宿主免疫。因此, 探究 APEC 生物被膜形成的关键基因和调控机制, 对于防控 APEC 具有重要的理论和实践意义。【目的】探讨外膜蛋白 CsgG 在 APEC 生物被膜形成中的作用, 揭示 APEC 生物被膜形成的分子机制, 为禽大肠杆菌病的防治提供理论基础。【方法】利用 Red 同源重组技术构建的 *csgG* 基因缺失株 $\Delta csgG$ 及其互补株 $C\Delta csgG$, 分析了 *csgG* 对 APEC 生长、运动能力、膜通透性、胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS)产量及生物被膜形成能力的影响。【结果】*csgG* 的缺失并不影响 APEC 的生长和细胞膜的通透性, 但增强了 APEC 的运动性。*csgG* 的缺失显著降低了 APEC 生物被膜形成能力, 扫描电子显微镜观察发现缺失株生物被膜细菌组成由多层变为单层, 细菌间黏附减少。激光扫描共聚焦显微镜观察发现 *csgG* 的缺失导致生物被膜结构松散, 黏附的细菌数量减少, 同时发现 *csgG* 缺失显著降低 APEC 的 EPS 产量。实时荧光定量 PCR 分析显示, *csgG* 的缺失导致与生物被膜形成相关基因的转录水平显著降低。【结论】CsgG

资助项目: 国家自然科学基金(32302881, 32172856); 上海市自然科学基金(22ZR1476100, 23ZR1476600); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2021-SHVRI-07)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32302881, 32172856), the Shanghai Natural Science Foundation (22ZR1476100, 23ZR1476600), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2021-SHVRI-07).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Shaohui, shwang0827@126.com; LI Haihua, lihaihuaok@126.com

Received: 2024-11-12; Accepted: 2024-12-28; Published online: 2025-01-13

在 APEC 生物被膜形成过程中起着关键作用, 严重影响生物被膜结构的完整性。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; CsgG; 生物被膜; 胞外多糖

The outer membrane protein CsgG influences biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*

PENG Haoheng^{1,2}, LIN Zizhu^{1,2}, HU Jiangang², ZHANG Beibei², GUO Weiqi², WANG Xinyu², WANG Zhiyang^{1,2}, QI Jingjing², TIAN Mingxing², BAO Yanqing², LI Haihua^{*1}, WANG Shaohui^{*1,2}

1 Tianjin Key Laboratory of Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Background] Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) could cause inflammatory conditions such as avian airsacculitis and pericarditis, which seriously restricts the healthy development of the poultry industry. Meanwhile, APEC and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) have similar virulence factors, posing a serious threat to public health. Biofilm formation can enhance the antibiotic resistance of APEC and help it escape from the host immune system. Therefore, exploring the key genes and regulatory mechanisms of the biofilm formation of APEC are of great theoretical and practical significance for the prevention and control of APEC. [Objective] To elucidate the role of the outer membrane protein CsgG in the biofilm formation of APEC, reveal the molecular mechanism of its biofilm formation, and provide a theoretical basis for the prevention and control of avian diseases associated with APEC. [Methods] The *csgG*-deleted strain $\Delta csgG$ and its complementary strain $C\Delta csgG$ were constructed by Red homologous recombination. The strains were then used to study the effects of *csgG* on the growth, motility, membrane permeability, extracellular polysaccharide (EPS) production, and biofilm formation of APEC. [Results] The deletion of *csgG* did not impact the growth or membrane permeability but enhanced the motility of APEC. The deletion of *csgG* significantly reduced the biofilm formation of APEC. Scanning electron microscopy revealed that the biofilm changed from multilayers to monolayers after the deletion of *csgG*, with reduced intercellular adhesion. Confocal laser microscope revealed that the deletion of *csgG* led to a loose structure of the biofilm and a decrease in the number of adherent bacteria. Furthermore, the deletion of *csgG* significantly reduced the EPS production of APEC. The RT-qPCR results showed that the deletion of *csgG* led to significant reductions in the transcript levels of genes related to biofilm formation. [Conclusion] CsgG is a pivotal factor in the biofilm formation of APEC, influencing the structural integrity of the biofilm.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*; CsgG; biofilm; extracellular polysaccharides

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 感染禽类引起禽大肠杆菌病, 临床症状包括气囊炎、心包炎、关节滑

膜炎、输卵管炎、腹膜炎和败血症等, 对养禽业造成了巨大经济损失^[1-3]。APEC 血清型复杂且广泛耐药, 严重制约禽大肠杆菌病的防控。

此外, APEC 与 ExPEC 具有相似的毒力因子和致病机制, 因此 APEC 可能通过禽类及其产品传播给人类, 对人类健康和公共卫生构成威胁^[4]。

生物被膜是细菌在表面聚集并由自身分泌的多糖、脂蛋白和纤维蛋白等物质构成的保护层, 该结构使得细菌群体紧密相连^[5-6]。APEC 的生物被膜参与抵抗高水平的抗生素并扰乱宿主细胞免疫机制, 从而实现在宿主中的持续定殖, 常常造成慢性感染^[7-9]。Curli 菌毛是大肠杆菌黏附和毒力相关的重要细胞器, 区别于鞭毛和其他类型的菌毛, 对于生物被膜的形成至关重要^[10-12]。Curli 菌毛由 *csgBAC* 操纵子编码, 由 *csgDEFG* 操纵子编码的蛋白分泌和装配。CsgA 和 CsgB 是构成 Curli 的主要成分, 周质蛋白 CsgC 可防止淀粉样中间体在周质中形成以避免其产生细胞毒性^[13]。CsgE 和 CsgF 帮助 Curli 的分泌和组装, CsgD 激活 Curli 相关基因的表达, CsgG 形成帮助蛋白质分泌的通道^[14]。这些蛋白质共同作用, 让 Curli 能够从细菌内部分泌到外部^[13-15]。在大肠杆菌中, CsgG 是一个大型的 β 桶状整合膜蛋白, 由 36 条跨膜 β 链组成, 形成多聚体结构, 是细菌外膜上已知最大的 β 桶状蛋白之一^[16]。该结构使得 CsgG 能形成一条通道, 允许 Curli 菌毛的主要成分 CsgA 和 CsgB 以未折叠的形式通过^[17]。CsgG 与辅助蛋白 CsgE 和 CsgF 的相互作用对 Curli 菌毛的有序组装至关重要, CsgE 通过形成多聚体与 CsgG 结合, 创建促进 CsgA 分泌并防止其过早聚集的前缩窄室, 而 CsgF 则可能作为 CsgG 和 Curli 菌毛之间的桥梁, 促进 CsgA 纤维化和细胞表面附着^[17-18]。

实验室前期通过随机突变库筛选发现 *csgG* 基因的缺失导致 APEC81 生物被膜形成能力减弱^[19]。虽然已报道 *csgG* 参与 Curli 菌毛的分泌, 但是 *csgG* 对 APEC 生物被膜形成的机制有待进

一步研究。本研究使用 *csgG* 基因缺失和互补株, 探讨 *csgG* 对 APEC81 生物被膜的调控作用, 进一步拓展 APEC 生物被膜形成的调控网络, 并为从生物被膜角度挖掘 APEC 防控靶标提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

禽致病性大肠杆菌临床分离株 APEC81, 缺失株 $\Delta csgG$ 及互补质粒 pSTV28 均由中国农业科学院上海兽医研究所畜禽细菌性传染病防控与预警团队实验室保存^[19]。

1.2 主要试剂和仪器

2×PrimeSTAR Max DNA Polymerase, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 蛋白酶 K、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, NPN), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 碘化丙啶(propidium iodide, PI), 上海碧云天生物技术有限公司; LIVE/DEAD BacLight 细菌细胞活性测定试剂盒(包含核酸染料 SYTO 9 和 PI), 赛默飞世尔科技有限公司; 2×Taq Plus Master Mix、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 和 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。酶标仪, 安捷伦科技有限公司; 激光扫描共聚焦显微镜, 卡尔蔡司光学有限公司; 临界点干燥仪, 上海维纳国际贸易有限公司; 离子溅射仪和扫描电子显微镜, 日立有限公司。

1.3 引物设计

根据 APEC81 菌株基因组序列设计 *csgG* 基因缺失鉴定引物及互补质粒构建引物, 同时设计该菌株生物被膜相关基因荧光定量引物(表 1), 由上海睿勉生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>CsgG</i> -co-F	AATATTGAAAAAGGAAGAGTTGACTTTGGTATTGAAACACCCTC	937
<i>CsgG</i> -co-R	CCGTCATGGTCTTTGTAGTCGGATTCCGGTGGAAACCGA	
<i>CsgG</i> -in-F	AATCTTTCAATGCCGTGACC	240
<i>CsgG</i> -in-R	TCATGTTACTGAGCGGATGC	
<i>CsgG</i> -out-F	TGGTTACGCAATGAAAAACA	1 296
<i>CsgG</i> -out-R	CAGGCCAAAACCTTTATAA	
RT- <i>fimA</i> -F	TTGCGATACCAATGTTGCAT	194
RT- <i>fimA</i> -R	TCAGGGTTGTTTGCTCACTG	
RT- <i>fimH</i> -F	CTTATGGCGGCGTGTATCT	154
RT- <i>fimH</i> -R	CTGCTCACAGGCGTCAAATA	
RT- <i>dgcM</i> -F	CATCATTTTTTCGCCCGATAC	190
RT- <i>dgcM</i> -R	CTACCAAGAACCCCACTGGA	
RT- <i>glgA</i> -F	CCGAACAACAGCGTGATATG	192
RT- <i>glgA</i> -R	AGAGATGTTCCCGCTGCTTA	
RT- <i>csgD</i> -F	TGCAACCCATTGACAACACG	82
RT- <i>csgD</i> -R	ACCGCGACATTGAAAACCTGG	
RT- <i>pgaA</i> -F	AACGCGCCAAGATGATCAAC	138
RT- <i>pgaA</i> -R	TACGCGCAGTGAAAGTGAAC	
RT- <i>dnaE</i> -F	TACCATTTCCACGTCAACGA	161
RT- <i>dnaE</i> -R	AACTTTTTGGTGTCCGGTTCG	

1.4 缺失株的鉴定以及互补株的构建

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒分别提取 APEC81 的基因组 DNA 和 pSTV28 质粒 DNA, 之后以 APEC81 菌株的基因组 DNA 为模板, 用引物 *CsgG*-co-F/*CsgG*-co-R 扩增 *csgG* 基因及启动子序列, PCR 反应体系: 2×PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 53 °C 15 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。随后对 PCR 产物进行核酸电泳并使用胶回收试剂盒对目的条带(937 bp)进行胶回收, 获得对应基因片段后利用同源重组酶连接到 pSTV28 质粒上构建互补质粒 pSTV28-*csgG*, 最后将互补质粒 pSTV28-*csgG* 电转化至 $\Delta csgG$ 感受态细胞中, 使用氯霉素浓度为 35 μg/mL 的抗性 LB 平板筛选菌株, 使用内外检引物 *CsgG*-in-F/*CsgG*-in-R 与

CsgG-out-F/*CsgG*-out-R 对获得的互补株 $C\Delta csgG$ 与缺失株 $\Delta csgG$ 进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系: 2×*Taq* Plus Master Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 6 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 53 °C 15 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.5 生长曲线及运动能力的测定

将菌株 APEC81、 $\Delta csgG$ 和 $C\Delta csgG$ 接种于 LB 培养基中在 37 °C、220 r/min 条件下培养, 直至其 *OD*₆₀₀ 值达到约 1.0。随后, 将各菌株转移至新的 LB 培养基中继续培养, 每隔 1 h 测定其 *OD*₆₀₀ 值。每个样本均进行 3 次独立重复实验, 同时使用未接种的 LB 培养基作为阴性对照组。

将菌株 APEC81、 $\Delta csgG$ 和 $C\Delta csgG$ 接种于 LB 培养基中在 37 °C、220 r/min 条件下培养至 *OD*₆₀₀ 值约为 1.0, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min

收集细菌,并用 PBS 洗涤 2 次,随后调整 OD_{600} 至约 3.0。接着,将 2 μL 的细菌悬浮液滴入含有 0.3%琼脂的 LB 培养皿中心,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h,测量并记录 APEC 游动直径。

1.6 生物被膜形成能力的测定

采用 96 孔微孔板法对生物被膜进行定量分析测定,转接培养过夜的菌株 APEC81、 ΔcsgG 和 $\text{C}\Delta\text{csgG}$ 培养至 OD_{600} 为 1.0,使用 LB 液体培养基稀释 10 倍,随后分别加入 96 孔细胞板中,每孔 200 μL 。培养 48 h 后弃掉菌液,并用 PBS 洗涤细胞板 3 次,向每孔加入 200 μL 浓度为 0.001 g/mL 的结晶紫溶液,染色 30 min,去除结晶紫溶液后用 PBS 洗 3 次后干燥,再以 95%乙醇(200 μL /孔)溶解染色,测定 OD_{595} 值,以 LB 培养基作为阴性对照。

1.7 激光扫描共聚焦显微镜观察生物被膜

将菌株 APEC81、 ΔcsgG 和 $\text{C}\Delta\text{csgG}$ 在 12 孔板中静置培养 48 h,使生物被膜生长在无菌玻璃片上,随后生物被膜用 LIVE/DEAD BacLight 细菌细胞活性测定试剂盒染色,继而使用激光扫描共聚焦显微镜进行生物被膜的可视化分析。SYTO 9 用于标记活细菌,活细菌在 488 nm 激光激发下发出绿色荧光,而 PI 染色的死亡细菌在 560 nm 激光激发下发出红色荧光。

1.8 扫描电子显微镜观察生物被膜

参照 1.7 的方法使菌株生物被膜附着在玻璃片上,所有样本在 2.5%的戊二醛中浸泡 2 h,再用 PBS 洗涤 3 次,随后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 3%戊二醛中浸泡过夜。接着,样本依次用递增浓度的酒精与乙酸异戊酯(30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%)孵育 15 min。之后,将样本放入临界点干燥仪内进行干燥,干燥后将样本紧贴于导电碳膜双面胶上放入离子溅射仪样品台上喷金 30 s 左右,最后用扫描电子显微镜观察采图。

1.9 胞外多糖产量的检测

根据文献[20]的方法进行 APEC 胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS)的测定。首先,将过夜培养物以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 再煮沸 15 min 以固定细胞。然后,加入蛋白酶 K 并在室温下孵育 1 h 以分解蛋白质。接着,加入三氯乙酸冰浴 30 min,离心 20 min 收集沉淀。将沉淀物与乙醇混合,孵育 1 h 后再次离心,收集沉淀。最后,用乙醇洗涤沉淀 2 次,离心后将沉淀物溶解于去离子水中,并储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。使用苯酚-硫酸法和分光光度计在 490 nm 处测定总 EPS 浓度^[21]。

1.10 外膜渗透性的测定

应用 NPN 荧光探针来评估 APEC81、 ΔcsgG 和 $\text{C}\Delta\text{csgG}$ 的外膜渗透性。NPN 是一种疏水性荧光探针,细胞外膜结构受损时可进入外膜疏水区域并发出强烈荧光,由于细胞膜磷酸双分子层亲水-疏水性质,疏水性的 NPN 难以通过亲水性的磷脂头部进入细胞内膜,因此可用 NPN 来评估细胞外膜渗透性^[22]。首先将新鲜菌液与 NPN 溶液混合,确保 NPN 的最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,然后避光培养 1 h。将培养后样品转移到 96 孔酶标板中,每孔 200 μL ,并进行 3 次重复实验,使用 0.6 mg/L 黏菌素作为阳性对照,最后使用酶标仪测量样品在激发波长 350 nm 和发射波长 420 nm 处的荧光强度。

1.11 内膜完整性的测定

利用 PI 荧光标记物来评估细菌的内膜完整性。PI 作为核酸染料,能够嵌入碱基之间实现与 DNA 结合,但通常不能穿透完整的细胞膜,只有在细胞膜受损时,PI 才能进入细胞并与 DNA 结合,产生红色荧光^[23]。首先,将新鲜菌液与 10 μL PI 溶液混合均匀,使 PI 的最终浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$,然后避光培养 1 h。培养结束后,将样本转移到 96 孔酶标板中,每孔 200 μL ,

并进行3次独立重复实验,使用0.6 mg/L黏菌素作为阳性对照。最后,使用酶标仪测量样品在535 nm的激发波长和615 nm的发射波长下的荧光强度。

1.12 实时荧光定量PCR检测

将菌株APEC81、 Δ csgG和C Δ csgG在37℃的LB培养基中培养至 OD_{600} 约1.0。随后,使用Trizol试剂提取总RNA,然后检测RNA的浓度和纯度。使用逆转录预混液将RNA逆转录成cDNA,然后进行实时荧光定量PCR,以检测生物被膜形成相关的基因表达,PCR反应体系:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。PCR反应条件:95℃ 30 s, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40个循环;95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。以*dnaE*作为内参基因,每个样本重复3次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算每个基因的转录水平。RT-qPCR检测所使用的引物RT-*fimA*-F/R、RT-*fimH*-F/R、RT-*dgcM*-F/R、RT-*glgA*-F/R、RT-*csgD*-F/R、RT-*pgaA*-F/R和RT-*dnaE*-F/R序列如表1所示。

2 结果与分析

2.1 *csgG*的缺失并不影响APEC81的生长

使用内外检引物*CsgG*-in-F/*CsgG*-in-R与*CsgG*-out-F/*CsgG*-out-R对缺失株 Δ csgG及互补株C Δ csgG进行鉴定。缺失株与互补株外检条带大小为462 bp,野生株条带大小为1 296 bp;互补株与野生株内检条带大小为240 bp,缺失株内检无条带,与预期相符,表明互补株C Δ csgG构建成功(图1A)。生长曲线结果显示,缺失菌株 Δ csgG的生长与APEC81、C Δ csgG并无显著差异,表明*csgG*不影响禽致病性大肠杆菌的生长(图1B)。

2.2 缺失*csgG*增强了APEC81的运动性

通过分析菌株APEC81、 Δ csgG和C Δ csgG在半固体培养基上的菌圈直径来检测APEC的运动性,结果发现 Δ csgG在培养基上的菌圈直径显著大于APEC81(图1C),同时在互补菌株C Δ csgG中,运动性部分恢复,表明*csgG*与APEC的运动性相关。

2.3 缺失*csgG*降低了菌株APEC81生物被膜形成能力

利用结晶紫染色的方法分析CsgG蛋白对APEC81生物被膜形成能力的影响,结果显示,相较于野生株APEC81,缺失株 Δ csgG的生物被膜形成能力显著下降(图2A),互补株的生物被膜形成能力恢复至野生株水平,表明CsgG有利于APEC生物被膜的形成。

2.4 扫描电子显微镜观察生物被膜结果

扫描电子显微镜观察生物被膜的结果如图2B所示,缺失菌株 Δ csgG的生物被膜由单层细菌组成,细菌之间黏附较少并且分布较为稀疏。然而,菌株APEC81形成的生物被膜与C Δ csgG相似,由多层细菌组成,它们之间有明显的黏附。

2.5 激光扫描共聚焦显微镜观察生物被膜结果

通过激光扫描共聚焦显微镜观察生物被膜发现(图2C),菌株APEC81和C Δ csgG的生物被膜由大量细菌聚集在一起,同时纵向图上具有极强立体感,并且形成的生物被膜结构较为致密。而 Δ csgG与野生株及互补菌株相比,整体结构图显示其生物被膜的结构完整性显著受损,菌株的生物被膜结构也显得松散,并且细胞数量显著减少,纵向图显示 Δ csgG生物被膜厚度的降低。结果表明CsgG有助于维持APEC生物被膜结构的完整性。

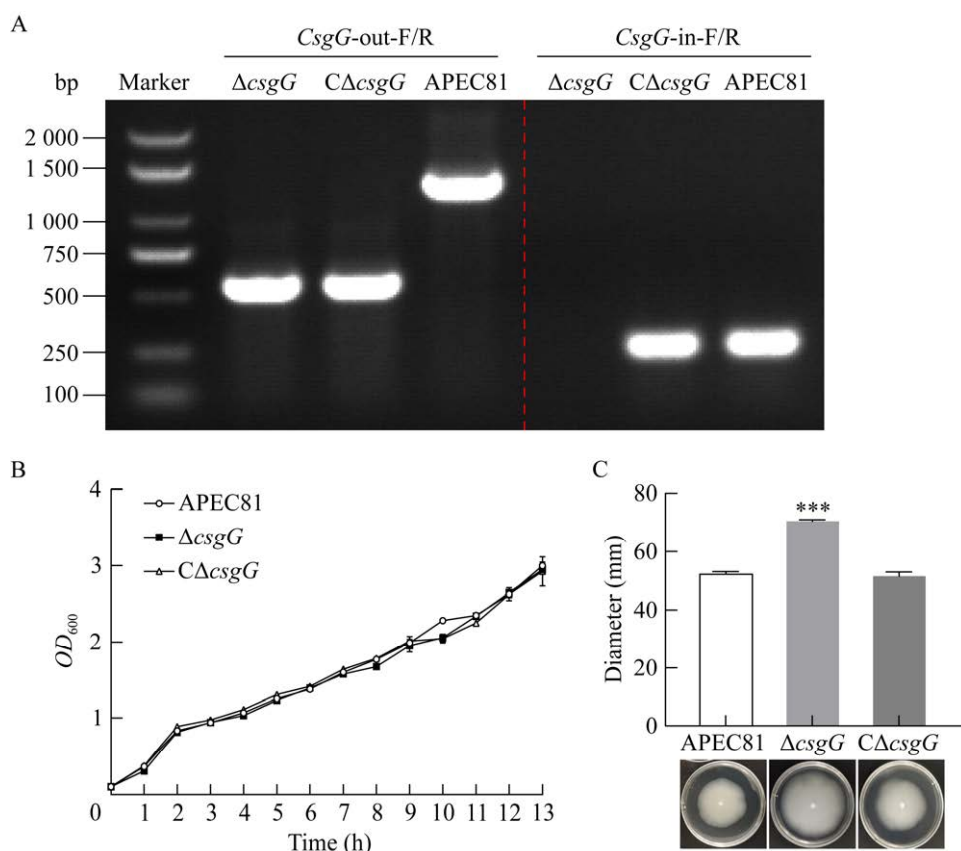


图1 APEC生长特性及运动性分析 A: APEC缺失株及互补株的鉴定; B: APEC生长曲线; C: APEC运动性测定。

Figure 1 Analysis of growth characteristics and movement of APEC. A: Identification of APEC deletion strain and complementary strain; B: Growth curves; C: Athletic bar graphs and pictures. ***: $P < 0.001$.

2.6 *csgG* 的缺失降低了胞外多糖的产量

大肠杆菌分泌的EPS是生物被膜形成的关键组成部分,由多糖、蛋白质、核酸等生物聚合物组成。它们主要黏附在周围环境中,以此保证生物被膜的正常功能与结构完整性^[24]。EPS是生物被膜走向成熟的标志,对生物被膜的结构和被膜量以及细胞间的相互作用具有重要影响^[24],通过定量分析发现(图3A),相较于野生型APEC81和互补株, $\Delta csgG$ 突变株的EPS产量降低33.68%。因此,CsgG在EPS的组装和转运过程中发挥着至关重要的作用,从而影响生物被膜形成。

2.7 CsgG 不影响外膜渗透性与内膜完整性

CsgG是大肠杆菌中的重要外膜蛋白,其对生物被膜的影响可能与内外膜有关,分别利用NPN和PI测定了的外膜渗透性和内膜完整性,结果显示*csgG*的缺失对APEC的外膜渗透性和内膜完整性没有影响(图3B、3C)。

2.8 下调生物被膜形成相关基因的mRNA水平

由于CsgG影响生物被膜的形成,参考文献[25]检测生物被膜形成相关基因的转录水平,生物被膜相关基因包括二鸟苷酸环化酶基因

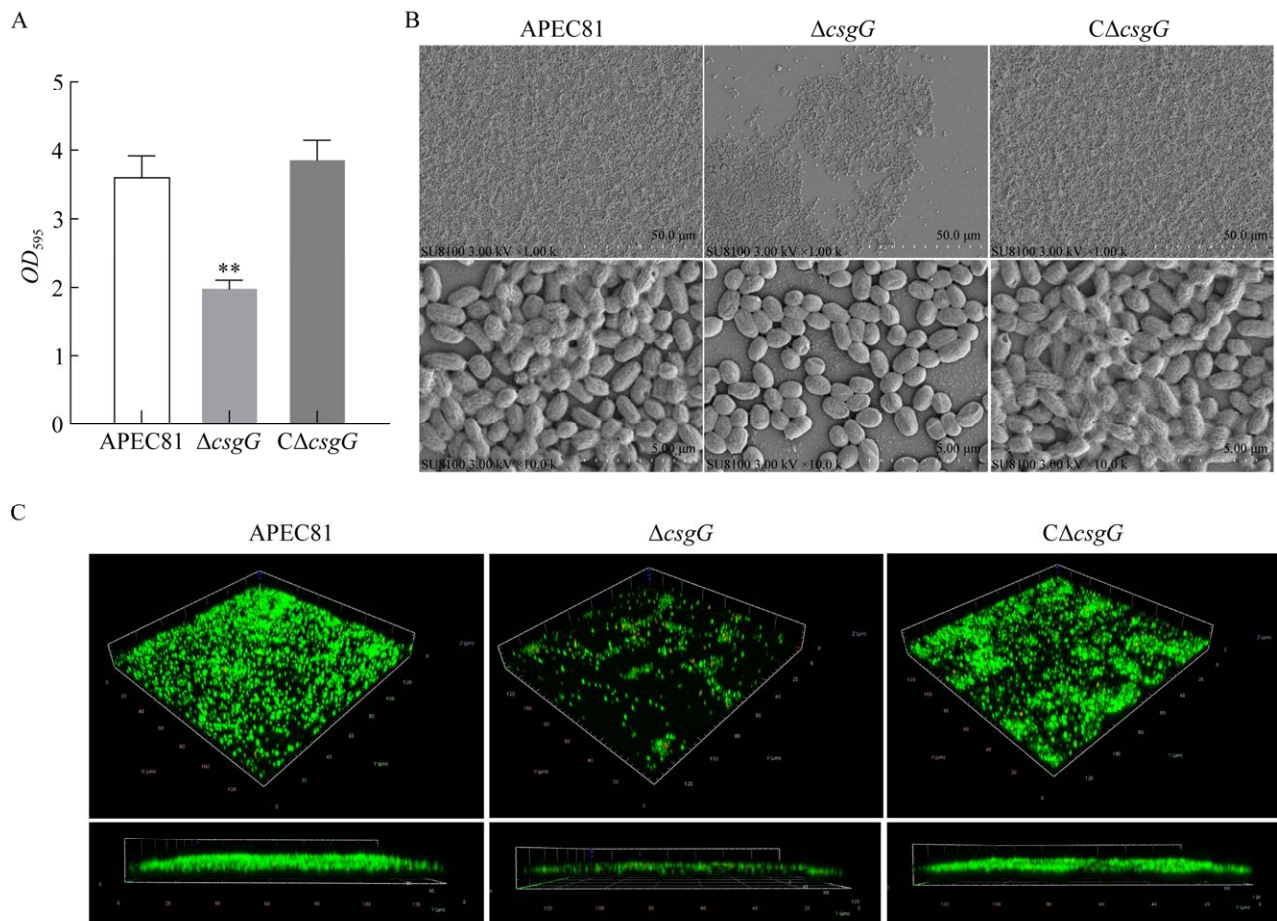


图2 CsgG对APEC生物被膜的影响 A: 结晶紫染色方法检测生物被膜(**: $P < 0.01$); B: 扫描电子显微镜观察生物被膜; C: 激光扫描共聚焦显微镜观察生物被膜。

Figure 2 The effects of CsgG on biofilm of APEC. A: Detection of biological periplasm by crystalline violet staining (**: $P < 0.01$); B: Analysis of biofilm formation by scanning electron microscope; C: Analysis of biofilm formation by confocal laser microscope.

dgcM、糖蛋白基因 *pgaA*、Curli 菌毛转录调节因子基因 *csgD*、糖原合酶基因 *glgA*、1型菌毛基因 *fimA* 和 *fimH*。结果如图4所示,相较于菌株 APEC81, 缺失株中 *dgcM*、*pgaA*、*csgD*、*glgA*、*fimA* 和 *fimH* 转录水平都显著降低。同时,在互补株 CΔcsgG 中, 这些基因的 mRNA 水平部分恢复。表明 *csgG* 的缺失导致二鸟苷酸环化酶、多糖跨膜转运蛋白、Curli 菌毛转录调节及 1型菌毛基因表达水平显著下调, 从而影响生物被膜形成。

3 讨论

本研究探讨了 CsgG 在 APEC 中生物被膜形成的作用, 生长曲线结果表明 CsgG 在 APEC81 的生长过程中不是必需的。但缺失 *csgG* 的菌株表现出更强的运动性, 大肠杆菌的运动性增强可能与细菌的生理适应和生存策略有关。当生物被膜的形成受阻时, 细菌可能会调整其生理状态, 以增强运动性来补偿其在定殖能力上的损失, 从而提高其在环境中的扩散能力和对新生态位的适应性^[23]。c-di-GMP 是一种关键的信

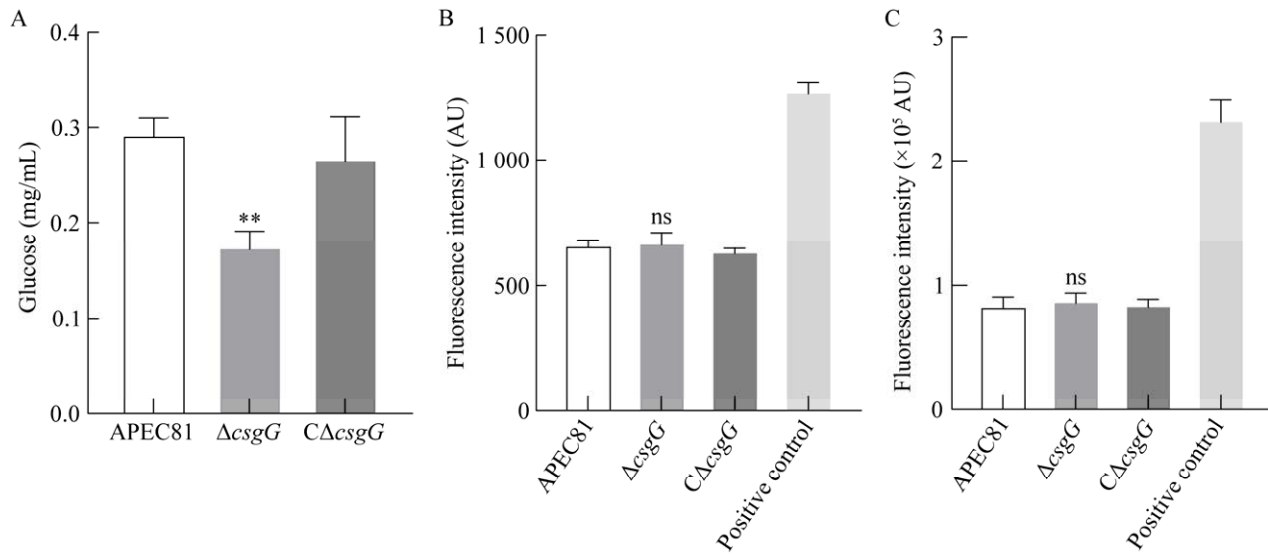


图 3 CsgG 对胞外多糖及细胞膜的影响 A: 胞外多糖产量分析; B: 内膜完整性测定; C: 外膜渗透性测定。

Figure 3 The effects of CsgG on EPS and cell membrane of APEC. A: Analysis of EPS production; B: Inner membrane integrity assay; C: Outer membrane permeability assay. **: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$.

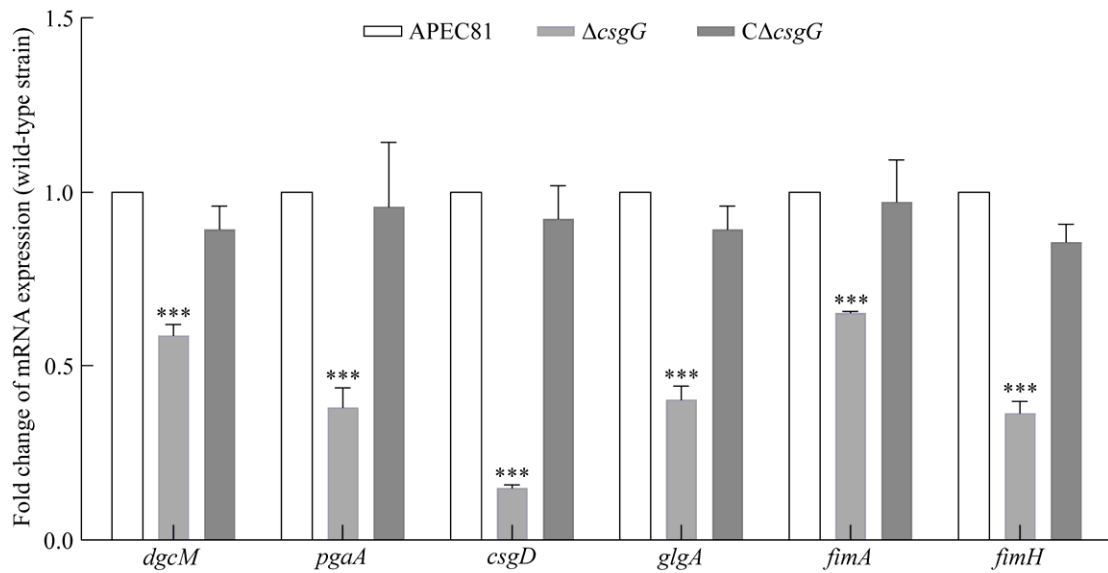


图 4 实时荧光定量 PCR 分析 CsgG 对生物被膜相关基因转录水平的影响

Figure 4 Real-time fluorescence quantitative PCR analysis of the impact of CsgG on the expression level of biofilm-related genes. ***: $P < 0.001$.

号分子，它在细菌中起着切换生物被膜形成和运动性的作用。荧光定量 PCR 结果表明缺失株中二鸟苷酸环化酶基因 *dgcM* 转录水平明显下

调，这提示缺失株的 c-di-GMP 水平可能降低，低水平的 c-di-GMP 不利于生物被膜的形成，这种情况下，细菌运动性相关基因的表达增强，

从而促进细菌的运动^[26]。

CsgG 是 Curli 菌毛生物合成途径中的关键外膜蛋白,其主要功能是形成分泌通道,介导 Curli 菌毛亚基 CsgA 和 CsgB 的转运^[27]。转录调节因子 CsgD 是 c-di-GMP 信号的主要靶标,它可以激活 Curli 菌毛和胞外多糖纤维素的表达,从而参与生物被膜的形成^[26]。荧光定量 PCR 分析显示缺失株的 *csgD* 基因表达水平明显下调,表明 *csgG* 可能通过调控 *csgD* 的表达来影响 c-di-GMP 水平从而影响生物被膜的形成。前期研究中已通过 Rdar 形态观察证明 *csgG* 的缺失会阻碍 APEC 中 Curli 菌毛和纤维素的表达^[19],而 Curli 菌毛是生物被膜基质的重要组成部分, Curli 菌毛的抑制表达会导致生物被膜的成熟结构变得松散,厚度变薄,并且可能出现中央空隙,这与激光扫描共聚焦显微镜以及扫描电子显微镜结果相符^[16]。因为菌毛在生物被膜中起到了“支架”的作用,它们帮助细菌细胞相互连接,并与周围的环境相互作用。当这种支架作用减弱或丧失时,生物被膜的稳定性和结构完整性就会受到影响,导致生物被膜的多孔性和脆弱性增加^[16]。这种结构的变化可能会进一步促进细菌从生物被膜中的分散,致使细胞间的连接不再紧密,更容易被外部因素如机械振动所破坏,可见 Curli 菌毛直接影响生物被膜的结构完整性^[24]。同时,生物被膜中细菌间黏附能力减弱,这可能与缺失株的 *fimH* 转录水平下调,影响 1 型菌毛的合成相关。

csgG 的缺失对生物被膜的结构和功能产生了显著影响,对胞外多糖的定量分析中 $\Delta csgG$ 胞外多糖的产量也有所下降,胞外多糖是生物被膜基质的主要成分之一,对维持生物被膜的结构和功能至关重要^[17]。当细菌的生物被膜形成能力减弱时,通常伴随着胞外多糖产量的下降。CsgG 作为分泌通道,不仅参与 Curli 菌毛

的分泌,也可能与胞外多糖的分泌相关^[28]。若 CsgG 功能受损,可能影响胞外多糖的分泌效率,导致生物被膜形成能力和胞外多糖产量双双下降^[17],并且缺失株 *pgaA* 和 *glgA* 转录水平的降低也与 EPS 产量的降低相对应^[28-31]。

4 结论

本研究揭示了 CsgG 在 APEC81 生物被膜形成中的作用,特别是在维持生物被膜的形态和完整性方面尤为重要,为理解 APEC 生物被膜形成的分子机制提供了参考。

REFERENCES

- [1] MANGES AR. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(2): 122-129.
- [2] RODRIGUEZ-SIEK KE, GIDDINGS CW, DOETKOTT C, JOHNSON TJ, FAKHR MK, NOLAN LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 6): 2097-2110.
- [3] RUSSO TA, JOHNSON JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(5): 1753-1754.
- [4] BAUCHART P, GERMON P, BRÉE A, OSWALD E, HACKER J, DOBRINDT U. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli*: search for factors involved in host specificity or zoonotic potential[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 49(3): 105-115.
- [5] HUNG C, ZHOU YZ, PINKNER JS, DODSON KW, CROWLEY JR, HEUSER J, CHAPMAN MR, HADJIFRANGISKOU M, HENDERSON JP, HULTGREN SJ. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00645-13.
- [6] SANCHEZ-VIZUETE P, ORGAZ B, AYMERICH S, Le COQ D, BRIANDET R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 705.
- [7] SKYBERG JA, SIEK KE, DOETKOTT C, NOLAN LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(2): 548-554.
- [8] FILLOUX A, VALLET I. Biofilm: set-up and organization of a bacterial community[J]. *Médecine Sciences*, 2003, 19(1): 77-83.
- [9] COLLINSON SK, DOIG PC, DORAN JL, CLOUTHIER S, TRUST TJ, KAY WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(1): 12-18.

- [10] DUEHOLM MS, ALBERTSEN M, OTZEN D, NIELSEN PH. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51274.
- [11] REISNER A, KROGFELT KA, KLEIN BM, ZECHNER EL, MOLIN S. *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3572-3581.
- [12] RODRIGUES SV, LAVINIKI V, BORGES KA, FURIAN TQ, MORAES HLS, NASCIMENTO VP, SALLE CTP. Biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli* is not related to *in vivo* pathogenicity[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(2): 194-199.
- [13] OLSÉN A, JONSSON A, NORMARK S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 1989, 338(6217): 652-655.
- [14] CHAPMAN MR, ROBINSON LS, PINKNER JS, ROTH R, HEUSER J, HAMMAR M, NORMARK S, HULTGREN SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 851-855.
- [15] HAMMAR M, ARNQVIST A, BIAN Z, OLSÉN A, NORMARK S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(4): 661-670.
- [16] CAO BH, ZHAO Y, KOU YJ, NI DC, ZHANG XC, HUANG YH. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): E5439-E5444.
- [17] GOYAL P, KRASTEVA PV, van GERVEN N, GUBELLINI F, van den BROECK I, TROUPHOTIS-TSAÏLAKI A, JONCKHEERE W, PÉHAU-ARNAUDET G, PINKNER JS, CHAPMAN MR, HULTGREN SJ, HOWORKA S, FRONZES R, REMAUT H. Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG[J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 250-253.
- [18] ZHANG MF, SHI HG, ZHANG XM, ZHANG XZ, HUANG YH. Cryo-EM structure of the nonameric CsgG-CsgF complex and its implications for controlling curli biogenesis in Enterobacteriaceae[J]. *PLoS Biology*, 2020, 18(6): e3000748.
- [19] HU JG, GU Y, LU HQ, RAHEEM MA, YU FH, NIU XP, ZUO JK, YIN HF, HUANG CQ, SONG XJ, TU J, ZHOU W, JIANG W, CHEN ZG, HAN XG, QI KZ. Identification of novel biofilm genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Tn5 transposon mutant library[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(8): 130.
- [20] JUNG JH, CHOI NY, LEE SY. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions[J]. *Food Microbiology*, 2013, 34(1): 70-80.
- [21] DuBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [22] TANG H, ZHANG P, KIEFT TL, RYAN SJ, BAKER SM, WIESMANN WP, ROGELJ S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(7): 2562-2571.
- [23] LIU Y, JIA YQ, YANG KN, TONG ZW, SHI JR, LI RC, XIAO X, REN WK, HARDELAND R, REITER RJ, WANG ZQ. Melatonin overcomes MCR-mediated colistin resistance in Gram-negative pathogens[J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10697-10711.
- [24] SOUSA C, TEIXEIRA P, OLIVEIRA R. The role of extracellular polymers on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and metabolic activity[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(4): 363-370.
- [25] HU JG, LV XL, NIU XP, YU FH, ZUO JK, BAO YL, YIN HF, HUANG CQ, NAWAZ S, ZHOU W, JIANG W, CHEN ZG, TU J, QI KZ, HAN XG. Effect of nutritional and environmental conditions on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(6): 4236-4251.
- [26] RUMBAUGH KP, SAUER K. Biofilm dispersion[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(10): 571-586.
- [27] LI FY, CIMDINS A, ROHDE M, JÄNSCH L, KAEVER V, NIMTZ M, RÖMLING U. DncV synthesizes cyclic GMP-AMP and regulates biofilm formation and motility in *Escherichia coli* ECOR31[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e02492-18.
- [28] ROBINSON LS, ASHMAN EM, HULTGREN SJ, CHAPMAN MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 870-881.
- [29] DUNSTAN RA, HAY ID, WILKSCH JJ, SCHITTENHELM RB, PURCELL AW, CLARK J, COSTIN A, RAMM G, STRUGNELL RA, LITHGOW T. Assembly of the secretion pores GspD, Wza and CsgG into bacterial outer membranes does not require the Omp85 proteins *BamA* or *TamA*[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(4): 616-629.
- [30] WANG HX, XU KW, WANG J, FENG C, CHEN YH, SHI JH, DING Y, DENG CX, LIU XW. Microplastic biofilm: An important microniche that may accelerate the spread of antibiotic resistance genes *via* natural transformation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 459: 132085.
- [31] LEPEK VC, D'ANTUONO AL, TOMATIS PE, UGALDE JE, GIAMBIAGI S, UGALDE RA. Analysis of *Mesorhizobium loti* glycogen operon: effect of phosphoglucomutase (*pgm*) and glycogen synthase (*glgA*) null mutants on nodulation of *Lotus tenuis*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(4): 368-375.