大肠杆菌脂多糖结构突变株 Δ waaC和 $\Delta(IpxL IpxM IpxP)$ 的脂质组变化

吴越¹,孙秀兰¹,纪剑¹,杨希²,吴淑燕³,王小元^{2,4},胡晓清^{2,4*}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)(2. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

(3. Hopkirk研究所, AgResearch有限公司, 北帕默斯顿 4442 新西兰)

(4.江南大学食品安全国际合作联合实验室,江苏无锡 214122)

摘要: 革兰氏阴性菌细胞外膜(Outer Membrane, OM)外侧的关键组分脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是 影响致病菌细胞外膜特性的重要毒力因子,但目前对细菌LPS的致病机制缺乏深入研究。该研究首次对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)W3110野生菌株和LPS结构突变株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta(lpxL lpxM lpxP)$ 进行差异脂质组学研究,探究 LPS结构变化对脂质组的影响。结果表明 *E. coli* 的 LPS 相关结构缺失会显著改变细胞脂质种类和相对含量,这与 其OM 特性改变密切相关。其中 $\Delta waaC$ 和 $\Delta(lpxL lpxM lpxP)$ OM 渗透性较W3110提高13.59%~19.00%,细胞膜流 动性降低23.71%~32.84%。差异脂质组学显示,W3110鉴定出22亚类416种脂质,2株突变株脂质种类均减少,但 出现新脂质 CL(14:0/14:0/15:0/12:0)-H,CL(17:3/15:0/12:0/14:0)-H 和 CL(18:3/12:0/14:0/15:0)-H。此外,2株突变株多 数脂质含量变化明显,尤其是单不饱和PE 减少3.07%~9.02%,单不饱和CL 增加1.11%~1.73%。 $\Delta waaC$ 与 $\Delta(lpxL lpxM lpxP)$ 脂质组也存在较大差异。该研究揭示LPS 结构变化引发脂质种类和相对强度显著改变,这是 *E. coli* 的 OM 特性变化的重要原因。

关键词:大肠杆菌;脂多糖;脂质组学;细胞外膜 文章编号:1673-9078(2025)03-98-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0107

Lipidomic Changes of Escherichia coli Lipopolysaccharide Structural

Mutants $\Delta waaC$ and $\Delta (lpxL lpxM lpxP)$

WU Yue¹, SUN Xiulan¹, JI Jian¹, YANG Xi², WU Shuyan³, WANG Xiaoyuan^{2,4}, HU Xiaoqing^{2,4*}

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)(2.Biotechnology School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)(3.AgResearch Co. Ltd., Hopkirk Research Institute, Palmerston North 4442, New Zealand)(4.International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lipopolysaccharide (LPS), a key component on the outer side of the outer membrane (OM) of Gramnegative bacteria, is an important virulence factor affecting the characteristics of the outer cell membrane of pathogenic

引文格式:

吴越,孙秀兰,纪剑,等.大肠杆菌脂多糖结构突变株ΔwaaC和Δ(*lpxL lpxM lpxP*)的脂质组变化[J].现代食品科技, 2025,41(3):98-106.

WU Yue, SUN Xiulan, JI Jian, et al. Lipidomic changes of *Escherichia coli* lipopolysaccharide structural mutants $\Delta waaC$ and $\Delta (lpxL lpxM lpxP)$ [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 98-106.

收稿日期: 2024-01-23

通讯作者:胡晓清(1978-),男,博士,副教授,研究方向:微生物学,E-mail: xiaoqinghu@jiangnan.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目(2023YFE0104400)

作者简介:吴越(1999-),女,硕士,研究方向:食品安全与质量控制,E-mail: 6210113105@stu.jiangnan.edu.cn

Modern Food Science and Technology

bacteria. However, at present, there is a lack of in-depth research on the pathogenic mechanism of bacterial LPS. In this study, differential lipidomic studies were carried out for the first time on the wild *Escherichia coli* strain W3110 and its LPS structural mutants $\Delta waaC$ and $\Delta (lpxL lpxM lpxP)$, and the effects of LPS structural changes on lipidome. The results indicated that the loss of LPS-related structure in *E. coli* significantly altered the type and relative content of cell lipids, which was closely related to the change of OM characteristics. Compared with W3110, the permeability of $\Delta waaC$ and $\Delta (lpxL lpxM lpxP)$ increased by 13.59% to 19.00%, and the fluidity of the OM decreased by 23.71% to 32.84%. Differential lipidomics revealed that 416 lipids of 22 subclasses were identified in W3110. The types of lipid species of the two mutant strains were reduced, while new lipids such as CL(14:0/14:0/15:0/12:0)-H, CL(17:3/15:0/12:0/14:0)-H, and CL(18:3/12:0/14:0/15:0)-H appeared in both mutants. In addition, most of the lipid contents of the two mutant strains changed significantly, in particular, the monounsaturated PE decreased by 3.07%~9.02%, and the monounsaturated CL increased by 1.11%~1.73%. There were also large differences in lipidome between $\Delta waaC$ and $\Delta (lpxL lpxM lpxP)$. This study revealed that the structural changes of LPS resulted in significant alterations in lipid type and relative strength, which was an important factor for the change in the OM characteristics of *E. coli*.

Key words: Escherichia coli; lipopolysaccharide; lipidomic; outer membrane property

革兰氏阴性细菌的细胞外壁包含两层膜结构, 称为细胞内膜和细胞外膜(Outer Membrane, OM)。 其中细胞内膜主要由磷脂双分子层构成, OM 主要 由脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)和磷脂的不对 称结构组成。LPS 位于 OM 的外侧, 也称为内毒素。 LPS 由类脂 A、核心多糖和 O- 抗原组成,其多样 化结构及其合成途径已有综述报道[1]。在大肠杆菌 (Escherichia coli)中, LPS 的核心多糖结构由 waa 基因簇编码的一序列酶催化合成^[2],其中关键酶之 一的庚糖基转移酶 I(WaaC)是合成完整 LPS 核心 多糖所必需的一种保守糖基转移酶^[3]。而 LPS 类脂 A 的生物合成也需要多种酶参与,其中关键酶酰基 转移酶 LpxL、LpxM 或 LpxP 催化二级酰基链的添 加^[4]。据报道,在不含抑制因子培养条件下,E. coli K-12 细菌生长的最简 LPS 类脂 A 结构为 Δ(lpxL lpxM lpxP)^[5]。自然界中,环境条件的变化会使 E. coli 产生多样化的 LPS 结构修饰⁶⁰,这些 LPS 结构修饰 对于细菌侵袭、黏附和致病过程具有重要意义。本 实验室前期研究^[7,8]揭示, LPS 结构变化会影响着诸 多细胞外膜特性 (如外膜疏水性及自凝集性),其 存在多重作用机制。LPS 结构变化(如核心多糖链 的长度) 会直接影响外膜的理化特性, 此外还可能 存在着间接机制,如细胞外膜的关键组分一脂质分 子是否会受到影响,从而改变细胞外膜特性?但目 前尚不见报道。有基于此,该文利用差异脂质组学 技术,对这一关键科学问题开展探究。

脂质组学是利用液质联用技术(LC-MS)开展 大规模脂质化合物研究的分析技术^[9],能准确全面 地提供生物样品的整体脂质信息^[10]。本实验室前期 利用差异脂质组学技术,对阪崎肠杆菌^[11]、毕赤酵 母^[12,13]脂质进行了系统研究,为该文研究比较 LPS 突变株脂质组差异奠定了基础。目前关于 *E. coli* 的 脂质组研究报道不多^[14,15],Hines 等^[16]对磷脂酰甘 油和心磷脂合成基因 *pgsA*和 *clsABC* 中染色体缺失 的 *E. coli* 菌株进行了脂质组学分析;Gold 等^[17]对 *E. coli* 菌株进行了脂质组学分析;Gold 等^[17]对 *E. coli* 菌酸胁迫适应进行脂质组学表征;Jeucken 等^[18]通过对 *E. coli* 脂质代谢中的相关脂质酶的过表 达、敲除相关 46 个单基因来分析脂质酶对脂质组 和细菌生长速率的影响。该文在 *E. coli* W3110 野生 型菌株中构建 LPS 核心多糖和类脂 A 结构突变株, 首次开展脂质组学差异分析,从脂质层面探究 LPS 结构修饰对细菌 OM 特性的影响,为深入革兰氏阴 性菌 LPS 致病机制研究奠定基础。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料与试剂
- 1.1.1 菌株、质粒和引物

该研究所用菌株和质粒列于表1,引物列于表2。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 酵母膏 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L 和 NaCl 10 g/L, 用于 *E. coli* W3110 及突变菌株的培养和 感受态细胞制备; 固体培养基中加入琼脂粉 18 g/L。

抗生素及诱导剂: 氨苄青霉素 100 mg/L, 卡那 霉素 30 mg/L, 氯霉素 30 mg/L; 敲除感受态细胞制 备时诱导剂浓度为: L-阿拉伯糖 30 mmol/L。

99

表 1 本实验中菌株和质粒

	Table 1 S	trains and plasmids employed in the present work		
	菌株和质粒	性质	来源	
菌株	W3110	野生型 Escherichia coli	ATCC	
	$\Delta waaC$	W3110 $\Delta waaC$	该研究	
	$\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$	W3110 $\Delta(lpxL lpxM lpxP)$	该实验室	
质粒	pBluescriptIISK(+)	高拷贝克隆载体、lacZ、Amp ^r	ATCC	
	pKD13	oriR6K、FRT Kan ^r FRT、Amp ^r	[19]	
	pKD46	oriR101、repA101、araBADpgam-bet-exo、Amp ^r	[19]	
	pCP20	oripSC101 cI857k P _R FLP、Amp ^r Cm ^r	[19]	
		表 2 本实验中所用PCR扩增引物	XA	
	Table 2 Prin	mers for PCR amplification used in the present work		
名称		引物序列 (5'-3')		
waaC-U-F		CGAATTGGGTACCGGGCTGCCGCAGCCATTGTTATG		
waaC-U-R		AACTGCAGGTCGACGGATCATAGCGGCGGTGTGAAGT		
waaC-D-F C		CTCAAGACGTGTAATGCTGCGGTGGGTATGGGAAGAATCA		
waaC-D-R C		AGGAATTCGATATCAAGCTGGTAAGTAGCACGAAATGGC		
waaC-Fkan-F		ACAAGAGGAAGCCTGACGGGATCCGTCGACCTGCAGTT		
waaC	C-Fkan-R C	CTATCCAGTGCCGCCGTTAGCAGCATTACACGTCTTGAGC		
waa	C-pBS-F C	GCCATTTCGTGCTACTTACCAGCTTGATATCGAATTCCTG		
waa(C-pBS-R	CGAGCCAAACAGAACCACGCCCGGTACCCAATTCG		

1.1.3 主要试剂

基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒, 北京天根生化科技有限公司;回收/DNA纯化试剂 盒、ClonExpress[®]II 快速克隆试剂盒,南京诺维赞 生物科技有限公司; 2×Hieff Canace[®] 高保真酶预 混液,上海翌圣生物科技股份有限公司;2×Es Taq MasterMix 酶, 康为世纪生物科技有限公司; 核酸 染料 GoldView, 北京赛百盛公司; 酵母膏、蛋白胨, 英国 OXOID 公司;琼脂粉,上海捷瑞生物工程有 限公司;氯化钠,国药集团化学试剂公司;卡那霉 素、氨苄青霉素、氯霉素和 L-阿拉伯糖, 上海源叶 生物科技有限公司; 四氢呋喃, 上海泰坦科技股份 有限公司; PBS 磷酸缓冲液速溶颗粒 (pH 值 7.4), 北京沃凯生物科技有限公司;N-苯基-1-萘胺、1,6-二 苯基-1,3,5-己三烯,美国 Sigma-Aldrich 公司;氯仿、 甲醇、及其它常规试剂均为国药集团上海化学试剂 有限公司产品。

1.2 主要仪器与设备

MLS-3750 高压灭菌锅, 日本三洋; DYY-8C 核酸电泳仪, 北京六一仪器厂; ETC811 梯度 PCR 仪, 苏州东胜兴业; Micro Pulser 电转仪, 美国 Bio-100 Rad 公司; SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州净化设备; Allegra@X-15 R 台式冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 公司; Legend Micro 17 小型普通离心机,美 国 Thermo Scientific 公司; HWS12 电热恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司; THZ-300C 恒温摇床,上 海一恒科学仪器有限公司; UV-1800 紫外可见光光 度计,上海科导超声仪器有限公司; G:BOX HR 凝 胶成像分析仪,美国 SYNGENE 公司; Vanquish Q Exactive Plus EI×800 液相质谱 LC-MS,美国赛默飞 世尔科技公司; BioTek Synergy 2 多功能酶标仪,美 国 Bio-Tek 公司; F-2700 荧光分光光度计,日本日 立高新技术公司; R-210 旋转蒸发仪,瑞士 BUCHI 有限公司。

1.3 方法

E. coli突变株ΔwaaC和Δ(lpxL lpxM lpxP)的 构建

实验参照 λ -red 介导的同源重组法^[7,19],对 *E. coli* W3110 中核心多糖合成基因 *waaC* 进行敲除,构建突变株 $\Delta waaC$;另外对类脂 A 合成基因 *lpxL*、 *lpxM* 和 *lpxP* 进行特异性敲除,构建突变株 Δ (*lpxL lpxM* lpxP),引物见表 2。

1.3.2 细菌生长曲线

测定 W3110 和突变株 ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP)的生长曲线,方法为:菌株在平板划线培养后,挑取单一菌落转移至 5 mL LB 液体试管,过夜培养。将种植业转入装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角形瓶,控制初始 OD₆₀₀ 为 0.02, 37 ℃, 200 r/min 摇床培养。测定 OD₆₀₀,绘制生长曲线。

1.3.3 脂质提取

对W3110和突变菌株进行脂质提取,参照 Folch等^[20]方法并略作修改如下:1)收集生长稳定 期的培养液,4000g离心10min,等量磷酸缓冲溶 液洗涤2次,调整菌悬液OD₆₀₀为5.00;2)置 于1.5mL离心管离心菌液,弃上清,液氮淬灭10min, 置于冰上融化,如此反复冻融3次,使细胞充分裂 解;3)样品与20倍体积氯仿/甲醇(2:1,*V/V*)和 100mg玻璃珠(直径1mm)在室温下涡旋20min, 2000 r/min离心10min,收集上层有机相;4)上 述萃取过程重复2次,合并有机相并用氮吹仪吹干; 5)提取物通过200 μL氯仿/甲醇(2:1,*V/V*)溶解, 最后进行 UPLC-MS分析。

色谱分离参照前期报道^[12],采用 Ultimate 3000 UHPLC 系统和 Waters CSH C18 色谱柱 (2.10 mm ×100 mm,1.70 μm)。流动相:A相,乙腈-水(60:40, *V/V*),含10 mmol/L甲酸铵;B相,异丙醇-乙腈 (90:10,*V/V*),含10 mmol/L甲酸铵。采用线性梯度 洗脱程序:40% B 0~3 min,40%~95% B 3~20 min, 95% B 20~22.50 min,95%~40% B 22.50~23 min, 40% B 23~25 min (体积分数),柱温 45 ℃,流量 0.30 mL/min,进样量 0.50 μL。

使用具有电喷雾电离(ESI)的QExactive™+ 混合四极Orbitrap™质谱仪分析洗脱剂^[12],采用正、 负两种模式,喷雾电压分别为3.50 kV和2.80 kV, 维持鞘内气体流量35(Arb),辅助气体流量15(Arb), 离子透镜射频水平50(Arb)。毛细管温度为325℃, 排气温度为350℃,全扫描范围为200~1800 m/z, 分辨率为140000 FWHM(m/z=200)。

1.3.4 细胞外膜渗透性和流动性测定

细胞外膜渗透性测定采用改良后的 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, NPN)荧光探针 法^[21]:1)细菌于 50 mL LB 液体培养基培养至 OD₆₀₀ 为1.20;2)菌液于室温下以4000 r/min 离心10 min,收 集菌体, pH 值 7.4 的 PBS 冲洗两次,调整菌悬液 OD₆₀₀ 为 0.50;3)取 1.92 mL 菌悬液于 24 孔板,迅 速加入 80 μL NPN 溶液 (10 μmol/L), 摇振 3 s; 4) 酶标仪测量荧光强度 (激发波长 350 nm, 发射波长 428 nm, 狭缝宽度 5 nm)。透过率以每单位 OD₆₀₀ 值的荧光吸收值来计算。

E. coli 外膜流动性通过荧光探针 1,6-二苯基 1,3,5-己三烯 (DPH)测定^[22],对细胞荧光偏振和 各向异性的测量来评估基因敲除前后膜流动性的变 化,具体为:1)取 OD₆₀₀为 2.00的培养液 5 mL, pH 值 7.40 的 PBS 洗涤 2 次,离心,调整菌悬液 OD₆₀₀为 0.50;2)取 1 mL 菌悬液加入 1.50 µL 浓 度为 0.20 mmol/L 的 DPH 溶液 (溶剂为四氢呋喃), 使最终探针的浓度保持在 3.00 µmol/L;3)将样品 于 37 ℃黑暗中孵育 30 min,随后 4 000 r/min离心 5 min;4) pH 值 7.40 的 PBS 洗涤样品,离心后重悬, 立即用荧光分光光度计测量样品的荧光偏振和各向 异性。激发波长为 360 nm (狭缝宽度 5 nm),发射 波长 450 nm (狭缝宽度 5 nm)。基于未标记样品, 测量并校正背景荧光和光散射的荧光强度,每个实 验重复 3 次。荧光偏振度 (P)计算如下:

$$\mathbf{P} = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$
(1)

$$=\frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$
(2)

式中:

P——荧光偏振度;

I_{VV}——起偏器和检偏器光轴同为垂直方向时的荧光强度;
I_{VH}——起偏器和检偏器光轴分别为垂直和水平方向时的荧光强度;

G--光栅校正因子;

I_{HV}——起偏器和检偏器光轴分别为水平和垂直方向时 的荧光强度;

I_{III}——起偏器和检偏器光轴同为水平方向时的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线、外膜渗透性和流动性

构建 E. coli W3110 的 LPS 突变株,并经 PCR 测序和验证,获得 ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP),随 后进行生长速率分析。生长曲线如图 1 所示,野生型 和突变株均呈现典型的四阶段生长特性,ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP)的最大生物量和生长速率较 W3110 略有降低,但降幅不大,这与前期研究报道^[23,24]的生 长变化趋势相似,LPS 核心多糖和类脂 A 结构变化 极可能改变了细胞对营养物质的运输和吸收。



Fig.2 Outer membrane permeability (a) and fluidity (b)

注: a 为 E. coli 野生菌株和突变株的外膜渗透性, b 为 E. coli 野生菌株和突变株的膜渗透性。

然后对 *E. coli* 的 OM 特性进行比较,结果显示,LPS 核心多糖和类脂 A 基因缺失会显著提高大肠杆菌的外膜渗透性,如图 2a 所示, Δ waaC 的 OM 渗透性最高,较 W3110 提高 19.00% (*P*<0.01),而 Δ (*lpxL lpxM lpxP*) 的 OM 渗透性也较 W3110 提高 13.59%。此外,LPS 结构突变还显著降低其 OM 流动性,图 2b 所示, Δ waaC 和 Δ (*lpxL lpxM lpxP*) 的 OM 流动性分别较 W3110 显著下降了 32.84% (*P*<0.001)和 23.71% (*P*<0.01)。核心多糖合成

基因 waaC 的缺失相较于脂质 A 修饰相关的合成基因 lpxL、lpxM、lpxP 缺失,对 OM 渗透性和 OM 流动性的影响更大。综上,LPS 核心多糖和类脂 A 脂肪酸链的数量变化均增加大肠杆菌细胞的通透性,这与 Cui 等^[25]研究结果类似。

2.2 W3110和LPS突变株脂质组学比较

LPS 和脂质分子是构成 OM 的两大组分,二者 通过疏水作用维系着 OM 结构稳定性。为揭示 LPS 结构变化是否对脂质种类及含量造成影响,该研究 首次进行了差异脂质组学研究。

2.2.1 E. coli W3110及其敲除菌株的脂质种类

如图3所示,W3110中共鉴定出416种脂质, 脂质种类涵盖以下5大类22亚类脂质:(1)甘油 磷脂类 (GPs): 心磷脂 (CL)、磷脂酸 (PA)、磷 脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘 油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI、PIP、PIP2)、磷脂酰 丝氨酸(PS)、磷脂酰甲醇(PMe)、溶血磷脂酰乙 醇胺(LPE)、磷脂酰乙醇(PEt)、溶血磷脂酰甘 油(LPG)、二甲基磷脂酰乙醇胺(dMePE)和溶 血性二甲基磷脂酰乙醇胺(LdMePE);(2)糖脂类 (SLs): 单糖基神经酰胺 (CerG1)、三糖基神经酰 胺(CerG3),单半乳糖基二酰甘油(MGDG)、磺 酰氧胺二酰甘油(SQDG)和二聚乳酸二酰甘油 (DGDG);(3) 鞘脂类(SPs): 神经酰胺(Cer) 和鞘磷脂 (SM); (4) 甘油酯类 (GLs): 甘油三酯 (TG);(5) 脂肪酰类(FAs):(O-乙酰基)-1-羟 基脂肪酸(OAHFA)。该研究使用的数据库是 Lipid Search 4.1 中通用目标数据库,包含脂肪酸的碳数、 双键数等信息。脂质分类参照国际脂质分类和命 名委员会(ILCNC)2009年更新的脂质图谱^[26]进 行汇总。

相较于 W3110, ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP)的 脂质种类总数均有减少。由图 3 可知, ΔwaaC 检测 到脂质 414 种, 和 W3110 相比, 5 种脂质消失, 3 种脂质出现; 而 Δ(lpxL lpxM lpxP) 检测到脂质 413 种, 有 6 种脂质消失, 3 种脂质出现。此外, 2 种 突变株均出现新脂质 CL(14:0/14:0/15:0/12:0)-H、 CL(17:3/15:0/12:0/14:0)-H 和 CL(18:3/12:0/ 14:0/15:0)-H, 而且均消失脂质 MGDG(18:1/25:6) +HCOO、PA(17:1/21:1)-H、PC(17:1/19:5)+CH3COO、 PEt(17:1/19:1)-H 和 PMe(18:0/18:1)-H, 此外, Δ(lpxL lpxM lpxP) 还有脂质 PI(31:1/24:0)+Na 消失,

Modern Food Science and Technology

为何 LPS 结构变化会引发这几种脂质出现或消失? 其变化原因有待进一步研究。目前对 E. coli 及 LPS 突变株的脂质差异缺乏报道,该文脂质组信息将为 研究 LPS 突变株提供重要参考。



Fig.3 Lipid species and quantities in E. coli and its mutants

进一步分析可知,由于 CL 分子的四条酰基链 可产生大量的分子物种^[27],CL 在 22 种脂质亚类中 种类数最多(图 3)。W3110 中检测到 116 种 CL,占 脂质总数的 27.88%,而 Δ*waaC* 和 Δ(*lpxL lpxM lpxP*)中多达 119 种,分别占脂质总数 28.74% 和 28.81%。此外有趣的是,两种突变株中均出现新脂质 CL(14:0/14:0/15:0/12:0)-H 和 CL(17:3/15:0/12:0/14:0)-H 和 CL(18:3/12:0/14:0 /15:0)-H。据报道,CL 与关键 OM 蛋白(如水通道蛋白等)之间存在相互作用^[28], 这 3 种新 CL 在 LPS 突变株中作用有待进一步 研究。

2.2.2 E. coli W3110及其敲除菌株的脂质相对强度

LPS 突变株中除了脂质种类的变化,脂质相对 强度也发生显著变化。下面以3株菌中相对强度最 高(超过99%)的GPs为例(图4a)加以分析。由 图4b可知,GPs中的PE亚类在22种脂类亚类中 相对强度最高,约占50%以上。其次是LdMePE (14%~16%)、CL(8%~10%)、PG(6%~9%)、LPE (5%~7%)和PS(3%~6%),这与Fabijanczuk^[29]使 用纳米电喷雾法测定结果类似。

一方面,相较 W3110 菌株,△*waaC* 有 198 种 脂质的相对强度增加、213 种脂质的相对强度减少, 其中 PE(35:6/16:0)-H 增幅最大,为 353 倍。增加 10 倍以上脂质有 5 种,占增加脂质总数 2.53%,增 加 2 倍以上脂质有 18 种,占总数的 9.09%。另外一 方面,部分脂质相对强度减少,其中减幅最大的是 PI(38:6/16:1)+Li,降低到 0.99%。



E. coli and its mutants

注: a 为 5 大类脂质甘油磷脂(GPs)、糖脂类(SLs)、 鞘脂类(SPs)、甘油酯(GL)、脂肪酰(FA)的相对强度, b 为甘油磷脂(GPs)不同亚类的相对强度。

相似的, 与 W3110 相比, Δ(*lpxL lpxM lpxP*) 有 212 种脂质相对强度增加、198 种脂质相对强度 减少,其中增加幅度最大的 PE(35:6/16:0)-H, 相 对强度增加了 1 277 倍。增加 10 倍以上脂质有 21 种,占增加脂质的 9.91%,增加 2 倍以上脂质有 73 种,占 34.43%。而脂质相对强度减少幅度最大的是 MGDG(16:4/28:7)-H,降低到 0.98%。

2 个突变株之间的脂质组也有显著差异,与 ΔwaaC 相比, Δ(*lpxL lpxM lpxP*)有260种脂质含 量增加,153种脂质减少。脂质 PI(38:6/16:1)+Li 增加高达3392倍,增加10倍以上的脂质有15 种,增加2倍以上脂质有67种。而减幅最大的是 MGDG(16:4/28:7)-H,降低至0.99%。



Fig.6 Relative amounts of unsaturated CL in E. coli and its mutants

注: a 为 E. coli 野生菌株和突变株脂质中不同双键数的心磷脂(CL)的相对强度, b 和 c 分别为 E. coli 野生菌株和突变株 中单不饱和心磷脂和双不饱和心磷脂的种类和相对强度。

2.2.3 不饱和脂质的变化

值得注意的是,上述脂质变化中不饱和磷脂的 变化尤其显著。如图 5a 所示,W3110 中含不饱和 双键的 PE 相对强度为 46.01%,而 Δ*waaC* 和 Δ(*lpxL lpxM lpxP*)中下降到 42.18%和 36.63%,尤其是单 不饱和 PE 降幅最为明显。进一步,对单不饱和 PE 分 析发现 2 个突变株呈现多样性,如图 5b 所示,较之 W3110, Δ*waaC* 中 PE (16:0/18:1)、PE (17:1/17:0)、 PE (18:0/18:1)和 PE (18:1/14:0)下降显著,其中 PE (17:1/17:0)降幅高达 53.20%,而在 Δ(*lpxL lpxM lpxP*)中,PE (18:1/14:0)、PE (17:1/16:0)、PE (16:0/18:1) 和 PE (17:1/17:0)降幅明显,其中降幅最大的也是 PE (17:1/17:0),下降了 84.32%,PE (17:1/17:0)极可 能在 OM 中具有特殊理化作用,值得后续研究。

另一个值得关注的脂质是 CL。如图 6c 所示, 3株菌中丰度最高的CL均为双不饱和,包括CL (17:1/16:0/16:0 16:1)、CL (18:1/16:0/16:0 16:1)、CL (17:1/16:0/16:0/18:1)、CL (18:1/16:0/16:0/18:1) 和 CL (14:0/18:1/16:0/16:1)。由图 6a 可知,与W3110 相比, $\Delta waaC$ 和 Δ (*lpxL lpxM lpxP*) 总不饱和 CL 脂 质的相对强度均为上升。W3110不饱和 CL 的相对 强度为 8.25%, 而 Δ waaC 和 Δ (lpxL lpxM lpxP) 分 别增至 9.29% 和 10.68%。对增幅最大的单不饱和 CL分析,发现ΔwaaC中CL(14:0/14:0/16:0/16:1)、 CL (15:0/15:0/16:0/18:1) 和 CL (17:1/16:0/14:0/14:0) 的 增 加 最 显 著 (图 6), 而 Δ (*lpxL lpxM lpxP*) 中 除 CL (14:0/14:0/16:0/16:1) 增加外,还有其他 显著上升的5种CL(14:0/16:0/16:0/16:1)、CL (15:0/16:0/16:1)、CL (15:0/15:0/16:0/18:1)、CL (17:1/16:0/14:0/12:0) 和 CL (17:1/16:0/14:0/14:0)。

综上所述,该研究首次揭示 LPS 核心多糖和类脂 A 的结构变化,会引发脂质组种类和含量的明显改变,脂质分子作为 OM 的内侧主要组分,其改变将导致 OM 特性改变,这极可能是 LPS 结构修饰影响 OM 特性的间接机制。

3 结论

针对 E.coli W3110 及 LPS 突 变 株 ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP),首次开展差异脂质组学研究,共 鉴定 22 亚类 416 种脂质,包括甘油磷脂类、糖脂类、 鞘脂类、甘油脂类和脂肪酰类;发现 LPS 突变株中 脂质种类和相对含量均有明显变化。与 W3110 相 比, ΔwaaC 和 Δ(lpxL lpxM lpxP) 中均有新脂质出现, 且包括3种共同新脂质CL(14:0/14:0/15:0/12:0)-H、CL(17:3/15:0/12:0/14:0)-H和CL(18:3/12:0/ 14:0/15:0)-H。相较于W3110, ΔwaaC和Δ(lpxL lpxM lpxP)中CL的不饱和程度均增加,双不饱和 CL是其中相对强度最高的脂质;ΔwaaC和Δ(lpxL lpxM lpxP)中不饱和脂质的相对强度减少,其中单 不饱和PE减幅最明显。因此,LPS结构改变引发 的脂质种类和相对强度改变是OM特性改变的物质 基础。

参考文献

- RAETZ C R, REYNOLDS C M, TRENT M S, et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria [J]. Annual Review of Biochemistry, 2007, 76: 295-329.
- [2] GEURTSEN J, DZIECIATKOWSKA M, STEEGHS L, et al. Identification of a novel lipopolysaccharide core biosynthesis gene cluster in *Bordetella pertussis*, and influence of core structure and lipid A glucosamine substitution on endotoxic activity [J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2602-2611.
- [3] GRONOW S, BRABETZ W, BRADE H. Comparative functional characterization *in vitro* of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli* [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(22): 6602-6611.
- [4] ZHOU Q, TAN X, MENG X, et al. Identification of four secondary acyltransferases for lipid A biosynthesis in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 68(6): 1486-1500.
- [5] KLEIN G, LINDNER B, BRABETZ W, et al. Escherichia coli K-12 suppressor-free mutants lacking early glycosyltransferases and late acyltransferases: minimal lipopolysaccharide structure and induction of envelope stress response [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(23): 15369-15389.
- [6] SIMPSON B W, TRENT M S. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences [J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(7): 403-416.
- [7] WANG Z, WANG J, REN G, et al. Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli* [J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 3325-3339.
- [8] LI Y, WU S, WANG L, et al. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(8): 1380-1383.
- [9] PAN M, QIN C, HAN X. Lipid metabolism and lipidomics applications in cancer research [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2021, 1316: 1-24.

- [10] HAN X, GROSS R W. The foundations and development of lipidomics [J]. Journal of Lipid Research, 2022, 63(2): 100164.
- [11] YANG X, WU S, LUO S, et al. Inactivation of carotenogenic-biosynthesizing genes altered lipids composition and intensity in *Cronobacter sakazakii* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2024, 21(3): 174-182.
- [12] LIU Z, YU K, WU S, et al. Comparative lipidomics of methanol induced *Pichia pastoris* cells at different culture phases uncovers the diversity and variability of lipids [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 160: 110090.
- [13] YU K, LIU Z, WU S, et al. Comparative lipidomics of *Pichia pastoris* using constitutive promoter reveals lipid diversity and variability at different growth phases [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2022, 68(12): 711-721.
- [14] RAETZ C R, DOWHAN W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(3): 1235-1238.
- [15] ALVES E, SANTOS N, MELO T, et al. Photodynamic oxidation of *Escherichia coli* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013, 27(23): 2717-2728.
- [16] HINES K M, XU L. Lipidomic consequences of phospholipid synthesis defects in *Escherichia coli* revealed by HILIC-ion mobility-mass spectrometry [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2019, 219: 15-22.
- [17] GOLD A, CHEN L, ZHU J. More than meets the eye: untargeted metabolomics and lipidomics reveal complex pathways spurred by activation of acid resistance mechanisms in *Escherichia coli* [J]. J Proteome Research, 2022, 21(12): 2958-2968.
- [18] JEUCKEN A, MOLENAAR M R, VAN DE LEST C H A, et al. A comprehensive functional characterization of *Escherichia coli* lipid genes [J]. Cell Reports, 2019, 27(5): 1597-1606.
- [19] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [20] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [J]. Journal of Biological Chemistry,

1957, 226(1): 497-509.

- [21] HELANDER I M, MATTILA-SANDHOLM T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 213-219.
- [22] MYKYTCZUK N C, TREVORS J T, LEDUC L G, et al. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress [J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2007, 95(1-3): 60-82.
- [23] VORACHEK-WARREN M K, RAMIREZ S, COTTER R J, et al. A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(16): 14194-14205.
- [24] WANG Z, WANG J, REN G, et al. Deletion of the genes waaC, waaF, or waaG in Escherichia coli W3110 disables the flagella biosynthesis [J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(9): 1021-1035.
- [25] CUI M, WANG Z, HU X, et al. Effects of lipopolysaccharide structure on lycopene production in *Escherichia coli* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 124: 9-16.
- [26] FAHY E, SUBRAMANIAM S, MURPHY R C, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids [J]. Journal of Lipid Research, 2009, 50 Suppl(Suppl): S9-14.
- [27] GARRETT T A, O'NEILL A C, HOPSON M L. Quantification of cardiolipin molecular species in *Escherichia coli* lipid extracts using liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012, 26(19): 2267-2274.
- [28] DOUGLASS M V, CLÉON F, TRENT M S. Cardiolipin aids in lipopolysaccharide transport to the gram-negative outer membrane [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 2021, 118(15): e2018329118.
- [29] FABIJANCZUK K C, HAGER J W, MCLUCKEY S A. Separation and simultaneous trapping of multiply charged and singly charged ions for mass spectrometry: application to lipid mixtures [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(14): 6115-6121.