

冯艳红, 赵 娣, 张留君, 等. 不同培养基对粪肠球菌基因表达及黏附细胞能力的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 854-859.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.022

## 不同培养基对粪肠球菌基因表达及黏附细胞能力的影响

冯艳红, 赵 娣, 张留君, 刘玲玲, 陈丽颖, 王亚宾  
(河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为探讨粪肠球菌(*E. faecalis*) N10 菌株在血清肉汤培养基和 TSB 培养基中不同生长时期 15 种毒力基因 mRNA 的表达情况及对 IPEC-J2 细胞黏附能力的影响, 采用分光光度计测量 N10 菌株在血清肉汤培养基和 TSB 培养基中的 OD 值, 绘制生长曲线, 确定生长时期(对数中期、对数后期和稳定期), 用 RT-PCR 方法检测 N10 菌株中不同基因不同生长时期的 mRNA 转录水平, 然后将不同培养基不同时期的细菌黏附 IPEC-J2 细胞, 平板计数细菌黏附数量。结果显示, 血清肉汤培养基培养的细菌浓度低于 TSB 培养基培养的细菌浓度( $P < 0.01$ )。在血清肉汤培养基中, 仅有 *fsrC*、*sprE*、*gelE* 和 *ant* 基因的最高表达量低于在 TSB 培养基中的, 其他基因的最高表达量均高于在 TSB 培养基中的。黏附试验中对数中期细菌的黏附数量最多, 血清肉汤培养基培养的细菌黏附数量比 TSB 培养基培养的细菌黏附数量少( $P > 0.05$ ), 但比不加血清的肉汤培养基培养的细菌黏附数量多( $P < 0.01$ )。可见, 血清肉汤培养基有利于菌毛相关基因的表达, 肉汤培养基中加入血清可促进细菌黏附。

**关键词:** 粪肠球菌; 毒力基因; RT-PCR; IPEC-J2 细胞

中图分类号: S852.61<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)04-0854-06

## Influence of culture media on the expression levels of *Enterococcus faecalis* genes and the adhesion to IPEC-J2 cells

FENG Yan-hong, ZHAO Di, ZHANG Liu-jun, LIU Ling-ling, CHEN Li-ying, WANG Ya-bin  
(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The mRNA expression levels of 15 virulence genes of *Enterococcus faecalis* strain N10 cultured in the broth with serum and TSB medium and the adhesion to IPEC-J2 cells were detected by RT-PCR and spectrophotometer. The bacteria concentration in the broth with serum was lower than that in the TSB culture medium ( $P < 0.01$ ). In broth medium with serum, the maximum expression levels of *fsrC*, *sprE*, *gelE* and *ant* genes were lower than those in TSB culture medium. The amount of bacteria adhesive to IPEC-J2 cells was the greatest at mid-log phase, and the adhesive bacteria in broth medium with serum was less than those in TSB ( $P > 0.05$ ), but more than that in serum-free broth medium ( $P < 0.01$ ). It was indicated that broth culture medium with serum was better for gene expression, and the serum conducive to bacterial adhesion.

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 河南省重大攻关项目(112101110100); 郑州市重点实验室基金项目(114PYZX509)

作者简介: 冯艳红(1989-), 女, 河南开封人, 硕士研究生, 研究方向为动物疫病分子病原学与免疫学

通讯作者: 王亚宾, (E-mail) ybwang8686@126.com

**Key words:** *Enterococcus faecalis*; virulence gene; real-time PCR; IPEC-J2 cell

粪肠球菌是一种重要的条件致病菌<sup>[1]</sup>。近年来粪肠球菌引起的感染呈上升趋势, 该菌不但能引

起人的泌尿道、心内膜炎等感染<sup>[2]</sup>,还可引起多种动物发病<sup>[3]</sup>,且可在人与动物之间传播<sup>[4]</sup>。

粪肠球菌的致病是多个毒力基因和生长环境相互协同作用的结果<sup>[5-6]</sup>。不同来源粪肠球菌所携带的毒力基因不同,且不同地区相同来源菌株携带的毒力基因的种类也不尽相同<sup>[7-9]</sup>,虽然这些毒力基因在动物模型中能明显增强细菌的致病性<sup>[10]</sup>,但在感染病例中这些毒力基因并不都能够完全表达。说明粪肠球菌生存的环境与其致病基因的表达有密切关系。为进一步了解不同营养成分对粪肠球菌致病基因的表达及对细胞黏附能力的影响。本试验采用 N10 菌株的 *ebpABC*、*ebpR*、*rnjB*、*esp*、*gelE*、*sprE*、*ace* 等 15 种基因在不同时期(对数中期、对数后期和稳定期)对血清肉汤培养基和 TSB 培养基的应答变化,测定不同生长时期 15 种基因 mRNA 的表达情况,然后用平板计数法测定肉汤培养基、血清肉汤培养基和 TSB 培养基培养 N10 菌株黏附细胞的情况,为研究粪肠球菌的致病机制以及预防和控制其感染奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞来源

粪肠球菌 N10 是由本实验室分离自河南地区发病猪的病变内脏,菌株经 Vitek-32 全自动细菌鉴定系统及 16SrRNA 测序鉴定到种水平。猪肠道上皮细胞(IPEC-J2)为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

普通肉汤培养基、脑心浸出液肉汤(BHI)购于青岛高科园海博生物技术有限公司,胰酪胨大豆肉汤(TSB)培养基购于北京奥博星生物技术有限公司,胎牛血清(FBS)购于浙江天航生物科技有限公司,DMEM 液体培养基、0.25%胰蛋白酶、D-Hank's 缓冲液均购于 GIBCO 公司,细胞培养板、细胞培养瓶购于 NEST Biotechnology 公司,Triton X-100、马血清购于 Solarbio 公司,DNA 抽提试剂盒、RNA 抽提试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司,反转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq II 购于大连 TaKaRa 公司。

### 1.3 菌株、细胞的培养

将 N10 菌种活化后无菌条件下划线于 BHI 琼脂平板上,37 °C 培养 24~48 h。挑取单个菌落,接种于 5 ml 液体 BHI 培养基中,培养至  $OD_{600}$  值为

0.8。按 1% 的比例分别接种于 40% 灭活马血清肉汤培养基和 TSB 培养基中摇匀,置 37 °C 震荡培养,每隔 1 h 用分光光度计测  $OD_{600}$  吸光度。试验重复 3 次,求其平均值,然后绘制生长曲线。选取的细菌生长时期为:对数中期(ML)、对数后期(LL)、稳定期(SS)。黏附试验前,细菌培养物用无血清无双抗的 DMEM 培养基洗涤并稀释到  $1 \times 10^8$  CFU/ml 备用。

IPEC-J2 细胞生长在含 10% 灭活胎牛血清和双抗的细胞培养液中,37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中培养,待细胞贴壁生长为单层细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化并计数。调整细胞数为 1 ml  $5 \times 10^5$  个,接种到 24 孔细胞培养板中,置 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中培养,待培养板底部形成单层细胞时用于试验。试验前细胞用 D-Hank's 缓冲液洗 3 次。

### 1.4 RNA 的提取和反转录

对数中期、对数后期、稳定期的菌液取样后立即进行 RNA 的提取和反转录,操作按试剂盒内说明书进行。

### 1.5 荧光定量 PCR

1.5.1 引物选择与合成 应用 Primer Express5.0 软件设计引物,在 NCBI 上 BLAST 对引物特异性检验后交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物名称及序列见表 1。

1.5.2 荧光定量 PCR 反应体系(20.0  $\mu$ l): SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) 10.0  $\mu$ l, cDNA 1.0  $\mu$ l, 上下游引物各 0.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 8.0  $\mu$ l。反应程序:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 15 s,56 °C 退火 34 s,72 °C 延伸 20 s,40 个循环。重复 3 次,结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak) 方法进行比较分析,以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示。

### 1.6 细菌黏附试验

细菌黏附试验分为 3 组:肉汤培养细菌、血清肉汤培养细菌、TSB 培养细菌,每组 3 个平行孔,每孔 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  CFU),37 °C、5%  $CO_2$  培养 1.5 h。D-Hank's 缓冲液洗 3 次,用 1% Triton X-100 溶解细胞,并用 PBS 混匀制成悬液进行 10 倍倍比稀释。各稀释度取 100  $\mu$ l 涂布 BHI 琼脂平板,记录平均菌落数,重复 3 次。

### 1.7 统计分析

采用 GraphPad Prism5.0 软件进行数据处理。以 \*\*\* ( $P < 0.001$ )、\*\* ( $P < 0.01$ )、\* ( $P < 0.05$ ) 表示不同程度的差异显著性。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Names and sequences of the primers

基因	引物	序列(5'→3')	基因	引物	序列(5'→3')
<i>ebpA</i>	F	CAACAACACCAGGGCTTTTGG	<i>sprE</i>	F	TCGTTCTGCCGAAAGTCAT
	R	ACCGGACCAGTCAACGACTAAG		R	TTCCGATTGACGCAAAGGC
<i>ebpB</i>	F	CGTACAGGCGGCAAGTCTTT	<i>gelE</i>	F	TCAGTGATGCTCGTGATG
	R	AGGTATTCCCCGCTTGATTT		R	CTTTAGCTCCGATTCCAG
<i>ebpC</i>	F	GCGGCACACTAAAATTCGTTTA	<i>esp</i>	F	ATTGCCCCAGTATGTTGA
	R	GTCGTCGGTATGACCGTTATCA		R	CACCGTTAGGAGCAGTTT
<i>ebpR</i>	F	AAAACGTCAACGACCACC	<i>ace</i>	F	TCACTTGCCGAGTTTGAG
	R	CAACGATAACCGAAGAG		R	CGTTGCGTCTTGATTGTT
<i>rnjB</i>	F	CCAAGGTGAATACCGCCAGT	<i>psr</i>	F	TCACTTGGGAAATTACTCG
	R	ATATGCGCCGACCAATCCC		R	TGCCTGCATAAGAGGATT
<i>fsrA</i>	F	ATAGCGCCTTGACCTGAGTA	<i>srtA</i>	F	TCGTACGCCGTTAGCAAGTT
	R	CATCGTGTGTCAATGGTFGGT		R	TTCATCACCGCTTCTGTGCT
<i>fsrB</i>	F	TTCCTTGTGGCGCATACCAA	<i>atn</i>	F	GGTTACACCCGATGATGAAG
	R	GTGGCTGGCATGCAAAAATA		R	ACGAGCTAACTCGGCAATAA
<i>fsrC</i>	F	AATACCGCAAAGCAAGCA	23S rRNA	F	GTGATGGCGTGCCCTTTTGTGA
	R	TAGCCAACAACGAATCACA		R	CGCCCTATTACAGACTCGCTTT

注: 23S rRNA 为内参基因

## 2 结果与分析

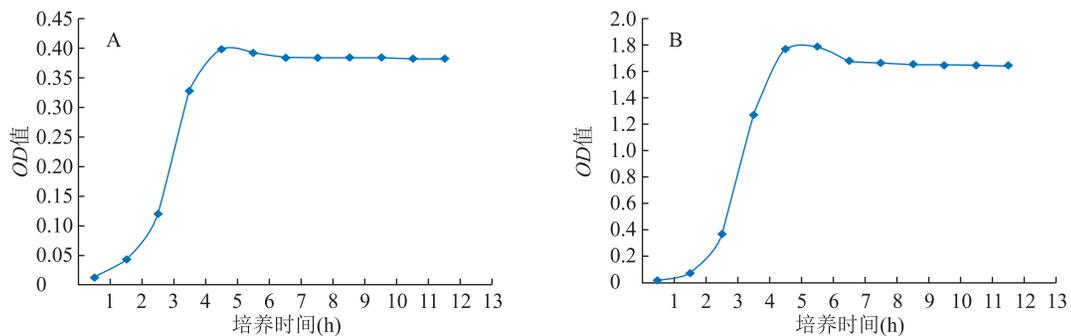
### 2.1 N10 菌株生长曲线

N10 菌株在血清肉汤和 TSB 培养基中生长趋势相同, 均呈 S 型(图 1)。但血清肉汤培养基中菌液  $OD_{600}$  值明显低于 TSB 培养基中的  $OD_{600}$  值 ( $P < 0.01$ )。两种培养基中细菌对数中期、对数后期、稳定期对应的培养时间为 3.5 h、5.0 h、7.0 h。

### 2.2 15 种基因的荧光定量 PCR 结果

#### 2.2.1 15 种基因 mRNA 的相对表达量 血清肉汤

培养基中, *ebpA*、*ebpB*、*ebpC*、*ebpR*、*rnjB*、*fsrA*、*fsrC*、*gelE*、*esp*、*ace*、*psr*、*srtA* 和 *atn* 这 13 种基因在对数后期的表达量最高, 仅 *fsrB*、*sprE* 在稳定期的表达量最高; TSB 培养基中, *ebpA*、*ebpC*、*ebpR*、*fsrA*、*fsrC*、*gelE*、*ace* 和 *psr* 这 8 种基因在对数中期的表达量最高, 但除 *ebpC*、*fsrC* 和 *ace* 在对数中期和对数后期基因的表达量有显著差异 ( $P < 0.05$ ) 外, *ebpA*、*ebpR*、*fsrA*、*gelE* 和 *psr* 这 5 种基因在对数中期和对数后期表达量差异均不显著。 *ebpB*、*rnjB*、*fsrB*、*sprE*、*esp*、*srtA* 和 *atn* 这 7 种基因在对数后期的表达量最高(表 2)。



A: N10 在血清肉汤培养基中的生长曲线; B: N10 在 TSB 培养基中的生长曲线。

图 1 粪肠球菌 N10 菌株的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Enterococcus faecalis* N10

2.2.2 菌毛相关基因 mRNA 的表达 两种培养基中菌毛相关 5 种基因的最高表达量情况见图 2。在两种培养基中, *ebpB* 的表达量最高。在血清肉汤培

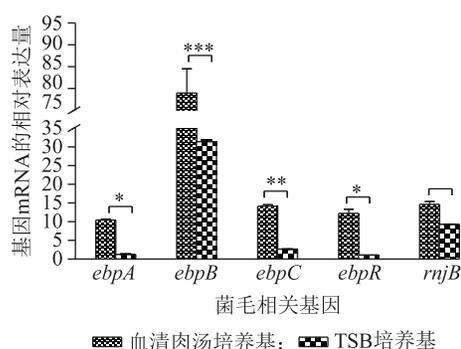
养基中, *ebpA*、*ebpB*、*ebpC*、*ebpR* 和 *rnjB* 的最高表达量均高于在 TSB 培养基中的。

表 2 毒力基因在不同培养基中的相对表达量

Table 2 The relative expression levels of virulence genes in different media

基因	基因 mRNA 相对表达量					
	血清肉汤培养基			TSB 培养基		
	对数中期 (ML)	对数后期 (LL)	稳定期 (S)	对数中期 (ML)	对数后期 (LL)	稳定期 (S)
<i>ebpA</i>	1.00 ± 0	10.44 ± 0.33	4.26 ± 0.05	1.25 ± 0.11	0.87 ± 0.10	0.57 ± 0.01
<i>ebpB</i>	15.01 ± 2.58	79.00 ± 9.55	26.85 ± 0.65	14.97 ± 0.52	31.35 ± 0.86	6.27 ± 0.24
<i>ebpC</i>	1.26 ± 0.03	14.13 ± 0.69	9.32 ± 0.42	2.65 ± 0.06	1.99 ± 0.15	0.90 ± 0.09
<i>ebpR</i>	6.93 ± 6.11	12.20 ± 1.98	0.79 ± 0.05	1.08 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.56 ± 0.01
<i>rnjB</i>	1.24 ± 0.09	14.62 ± 1.26	10.66 ± 0.44	7.16 ± 0.30	9.25 ± 0.11	0.96 ± 0.13
<i>fsrA</i>	1.23 ± 0.11	10.47 ± 1.63	0.78 ± 0.12	0.88 ± 0.06	0.53 ± 0.07	0.38 ± 0.02
<i>fsrB</i>	0.41 ± 0.03	4.11 ± 0.06	7.47 ± 0.85	5.29 ± 0.04	6.02 ± 0.13	0.76 ± 0.06
<i>fsrC</i>	2.96 ± 1.55	16.92 ± 0.07	10.46 ± 0.18	21.51 ± 0.23	14.52 ± 0.10	1.39 ± 0.02
<i>sprE</i>	1.48 ± 0.15	12.66 ± 0.79	16.91 ± 3.42	22.95 ± 0.73	26.53 ± 3.04	3.96 ± 0.07
<i>gelE</i>	1.02 ± 0.05	1.19 ± 0.43	1.01 ± 0.01	2.49 ± 0.02	2.29 ± 0.23	0.36 ± 0.04
<i>esp</i>	0.04 ± 0.04	0.22 ± 0.01	0.01 ± 0	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0
<i>ace</i>	4.03 ± 0	10.01 ± 0.34	0.91 ± 0.07	4.81 ± 0.18	2.27 ± 0.06	1.11 ± 0.03
<i>psr</i>	1.15 ± 0	8.04 ± 1.14	2.36 ± 0.18	0.99 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.54 ± 0.17
<i>srtA</i>	1.29 ± 0.04	13.15 ± 1.19	5.24 ± 0.06	1.77 ± 0.06	2.52 ± 0.03	0.64 ± 0.03
<i>atn</i>	1.52 ± 0.09	12.10 ± 0.38	1.94 ± 0.04	3.26 ± 0.03	17.13 ± 1.77	1.58 ± 0.07

以 *ebpA* 基因对数中期的表达量为对照,通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算其他基因相对表达量。



\*\*\*、\*\*、\* 分别表示差异到达 0.001、0.01、0.05 显著水平。

图 2 菌毛相关基因 mRNA 的相对表达量

Fig.2 The expression levels of pilus-associated genes mRNA

2.2.3 生物膜相关基因 mRNA 的表达 毒力基因 *sprE*、*gelE*、*esp*、*ace*、*psr*、*srtA* 和 *atn* 与肠球菌的生物膜形成有关。在这两种培养基中, *sprE* 和 *atn* 的相对表达量较高, *esp* 的相对表达量最低;在血清肉汤培

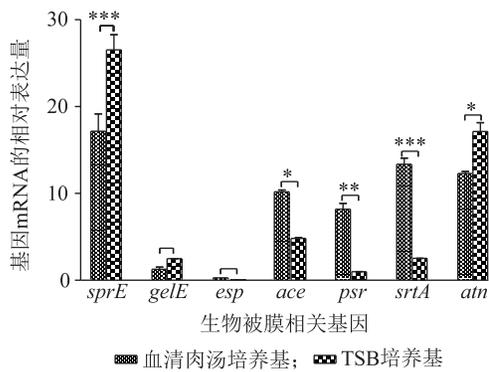
养基中, *esp*、*ace*、*psr* 和 *srtA* 的最高相对表达量高于在 TSB 培养基中的,而 *sprE*、*gelE* 和 *atn* 的最高相对表达量低于在 TSB 培养基中的(图 3)。

### 2.3 细菌对 IPEC-J2 细胞的黏附

不同培养基不同生长时期细菌黏附数量不同,对数中期(培养 3.5 h)的黏附数量最多。TSB 培养基培养的细菌黏附能力强于肉汤培养基培养的细菌黏附能力。血清肉汤培养基培养的细菌黏附数量低于 TSB 培养的细菌(对数期  $P > 0.05$ , 稳定期  $P < 0.01$ ),但高于肉汤培养基培养的(对数期  $P < 0.01$ , 稳定期  $P > 0.05$ )(图 4)。

## 3 讨论

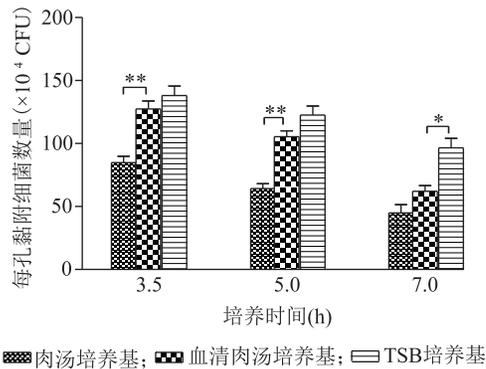
粪肠球菌对营养要求较高,从 N10 菌株生长曲线中可以看到,用血清肉汤培养基培养的细菌浓度低于 TSB 培养基的( $P < 0.01$ ),这可能与血清肉汤



\*\*\*、\*\*、\* 分别表示差异到达 0.001、0.01、0.05 显著水平。

图3 生物被膜相关基因 mRNA 的相对表达量

Fig.3 The expression level of biofilm-related genes mRNA



\*\*\*、\*\*、\* 分别表示差异到达 0.001、0.01、0.05 显著水平。

图4 不同培养条件下粪肠球菌 N10 对 IPEC-J2 细胞的黏附

Fig.4 The adhesion of *E. faecalis* N10 to IPEC-J2 cells in different culture media

培养基中营养成分少有关。而 15 种基因 mRNA 表达量测定结果显示,血清肉汤培养基中 13 种基因的表达量都是在对数后期最高,TSB 培养基中 8 种基因的表达量在对数中期最高,但多数与对数后期的表达量差异不显著。说明粪肠球菌各基因表达情况的复杂性,而这种受培养基营养成分和细菌代谢产物共同调节的机制有待于进一步研究。

粪肠球菌主要通过黏附、侵袭和机体损伤导致疾病发生,其中黏附是感染的关键一步。菌毛是重要表面黏附结构之一,菌体借助菌毛可牢固黏附在宿主细胞上。*ebpABC* 作为粪肠球菌菌毛相关操纵子,与其菌毛的生成和生物膜形成有关<sup>[11]</sup>。*ebpR* 是 *ebpABC* 的转录调节子,Bourgogne 等<sup>[2]</sup> 研究发现,与野生株相比,Δ*ebpR* 突变株的 *ebpABC* 表达水平和菌毛蛋白生成量均减少,早期黏附能力下降,从而导

致生物膜形成量下降。*mjB* 也参与菌毛蛋白基因表达和生物膜的形成<sup>[12]</sup>。血清肉汤培养基培养的细菌菌毛相关基因的最高表达量均高于 TSB 培养基培养的,说明血清肉汤培养基对菌毛的生成可能有促进作用<sup>[13]</sup>。本研究中黏附试验结果表明,在血清肉汤培养基中培养的 N10 细菌黏附数量明显比在肉汤培养基中培养的细菌黏附数量多 ( $P < 0.01$ ),说明肉汤培养基中加入血清可促进细菌黏附。

生物被膜是细菌为适应外界环境,吸附在惰性物体如生物材料或者机体粘膜表面,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等,将自身包绕而形成的大量细菌聚集体<sup>[14]</sup>。可保护细菌抵御抗生素、抗菌物质和吞噬作用<sup>[15]</sup>。*gelE*、*sprE*、*esp*、*ace*、*psr*、*srtA* 和 *atn* 等基因均能不同程度地影响生物膜的形成及其结构变化,而生物膜的形成与肠球菌的致病性有密切关系。在血清肉汤培养基中 *esp*、*ace*、*psr* 和 *srtA* 基因的最高表达量高于在 TSB 培养基中的,*srtA* 使表面蛋白 (Esp) 被锚定到细胞壁上,参与细菌的表面黏附和毒力效应<sup>[16]</sup>。*ace*、*esp* 和 *srtA* 均与细菌黏附和生物被膜形成有关。在血清肉汤培养基中黏附相关基因的表达量高于在 TSB 培养基中的,而体外黏附试验中血清肉汤培养基培养的细菌黏附数量却比 TSB 培养基培养的少 ( $P > 0.05$ ),这可能与菌毛 mRNA 翻译蛋白质水平的差异有关。影响细菌黏附及生物被膜形成的相关基因还有很多,比如 *as*、*efaA*、*epa* 等,而我们研究的只是细菌的一部分基因。在 TSB 培养基中 *sprE*、*gelE* 和 *atn* 基因的表达量均高于血清肉汤培养基中的。*gelE* 基因位于肠球菌染色体上,参与炎症反应,其上游是粪肠球菌调节基因 *fsr* 的 3 个启动子,在转录水平调控明胶酶基因的表达;下游是 *sprE*,与肠球菌损伤宿主组织有关<sup>[17]</sup>。有研究报道,*sprE* 与细菌耐高温和抗氧化作用相关,且 *sprE* 可能是参与粪肠球菌致病较为重要的毒力基因,能够通过对其的突变降低粪肠球菌的毒力<sup>[18]</sup>。*atn* 是主要的粪肠球菌自溶素,与细菌生物被膜的形成有关<sup>[19]</sup>。故推测 TSB 培养基中生长的细菌对宿主的损伤及不利生存环境的抵抗能力可能更强一些。以上结论也证明了不同理化条件能影响粪肠球菌生物被膜有关基因的表达<sup>[20]</sup>,不同营养成分对粪肠球菌黏附细胞的能力有影响。

细菌生长是一个动态变化的过程,它们利用培养基中营养物质满足自身的生长繁殖。然而随着细

菌代谢产物和废物的连续产生与释放,就会引起培养环境理化性质发生变化,如渗透压、pH、氮源、碳源、厌氧环境等因素均能影响不同基因的表达。由于本试验仅研究了基础培养基培养 12 h 对粪肠球菌 N10 菌株 15 种基因的影响作用,其他因素的影响都有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 朱波,强华.肠球菌的毒力因子[J].检验医学与临床,2006,3(3):113-115.
- [2] BOURGOGNE A, SINGH KV, FOX KA, et al. EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (ebpABC) of *Enterococcus faecalis* OG1RF[J]. J Bacteriol, 2007, 189(17):6490-6493.
- [3] 王亚宾,张祥,胡清林,等.仔猪关节炎粪肠球菌生物学特性研究[J].河南农业大学学报,2011,45(2):183-187.
- [4] LU H Z, WENG X H, LI H, et al. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3):913-917.
- [5] YU H B, ZHANG Y L, LAU Y L, et al. Identification and characterization of putative virulence of genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8):4469-4477.
- [6] 朱大玲,李爱华,汪建国,等.嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J].中山大学学报,2006,45(1):82-85.
- [7] GRETI R, IMPERI M, BERTUCCINI L, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt1):13-20.
- [8] ELISA B M, SÉRGIO S. Occurrence of virulence associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil [J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt11):1069-1073.
- [9] 郭秉娇,王东,王熙楚,等.致羔羊脑炎粪肠球菌 *asa1*、*ace* 和 *esp* 基因的克隆与原核表达[J].江苏农业学报,2014,30(3):685-687.
- [10] MUNDY L M, SAHM D F, GILMORE M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4):513-522.
- [11] 程璐,王肖,招洛丹,等.粪肠球菌毒力基因与生物膜形成关系的研究[J].牙体牙髓周病学杂志,2013,23(10):627-632.
- [12] GAO P, PINKSTON K L, NALLAPAREDDY S R, et al. *Enterococcus faecalis* *mjB* is required for pilin gene expression and biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2010, 192(20):5489-5498.
- [13] NALLAPAREDDY S R, SINGH K V, SILLANPÄÄ J, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis* [J]. J Clin Invest, 2006, 116(10):2799-2807.
- [14] 周坚芬.细菌生物被膜的形成及治疗[J].国外医药(抗生素手册),1998,19(2):48-60.
- [15] GUITON P S, HUNG C S, KLINE K A, et al. Contribution of autolysin and sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development [J]. Infect Immun, 2009, 77:3626-3638.
- [16] LÉVESQUE C M, VORONEJSKAIA E, HUANG Y C, et al. Involvement of sortase anchoring of cell wall proteins in biofilm formation by streptococcus mutans [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(6):3773-3777.
- [17] QIN X, SINGH K V, WEINSTOCK G M, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence [J]. Infect Immun, 2000, 68(5):2579-2586.
- [18] 吴利先,黄文祥,孙小平.粪肠球菌类毒力基因 *sprE* 功能的动物实验研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(2):155-159.
- [19] ECKERT C, LECERF M, DUBOST L, et al. Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis* [J]. J Bacteriol, 2006, 188(24):8513-8519.
- [20] 冉淑君,鄂佳,朱彩莲,等.不同理化条件对粪肠球菌生长周期及生物膜形成能力的影响[J].中华口腔医学杂志,2013,48(9):529-534.

(责任编辑:张震林)