

涂 健,阮 苑,蔡伟真,等. *RyhB-cysE* 基因对禽致病性大肠杆菌生物表型的影响[J].江苏农业学报,2020,36( 5 ) : 1247-1254.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.023

## *RyhB-cysE* 基因对禽致病性大肠杆菌生物表型的影响

涂 健, 阮 苑, 蔡伟真, 宋祥军, 邵 颖, 祁克宗  
(安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室,安徽 合肥 230036)

**摘要:** 在禽致病性大肠杆菌(APEC) AE17 及 AE17 $\Delta$ *RyhB* 的基础上利用 Red 同源重组技术构建基因缺失株 AE17 $\Delta$ *cysE*、AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE*, 对野生株和基因缺失株的生长、生物被膜形成和运动特性进行分析,并采用 qRT-PCR 技术比较野生株和缺失株中与运动性、生物被膜形成相关基因的转录水平。结果显示,各菌株生长曲线无显著差异;AE17 $\Delta$ *RyhB*、AE17 $\Delta$ *cysE*、AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* 生物被膜形成能力较 AE17 显著下降;AE17 $\Delta$ *cysE*、AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* 运动能力与 AE17 相比下降;AE17 $\Delta$ *cysE*、AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* 与 AE17 相比 *flhB*、*flgD*、*fliF* 和 *cheY* 转录水平均降低,而 AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* 与 AE17 $\Delta$ *cysE* 相比基因转录水平均有所增强;AE17 $\Delta$ *RyhB*、AE17 $\Delta$ *cysE*、AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* 与 AE17 相比,*flhD*、*flgC*、*sidA* 转录水平均显著降低。表明 *cysE* 基因缺失降低了 APEC 生物被膜形成能力及运动能力,且 *RyhB* 基因缺失对 *cysE* 基因的运动能力调控作用有代偿作用,*RyhB*、*cysE* 基因均通过调节与生物被膜形成相关的基因(*flhD*、*flgC*、*sidA*)转录水平调控 APEC 生物被膜形成能力,本研究结果为研究 *RyhB-cysE* 基因对 APEC 的调控作用奠定了基础。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌; *RyhB* 基因; *cysE* 基因; 生物被膜; 运动性

**中图分类号:** S851.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)05-1247-08

## Effects of *RyhB-cysE* gene on biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*

TU Jian, RUAN Yuan, CAI Wei-zhen, SONG Xiang-jun, SHAO Ying, QI Ke-zong

(Key Laboratory of Veterinary Pathology and Disease Control and Prevention of Anhui Province, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** Based on avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) AE17 and AE17 $\Delta$ *RyhB*, gene-deleted strains AE17 $\Delta$ *cysE* and AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* were constructed using Red homologous recombination technology. The growth, biofilm formation and motion characteristics of wild and gene-deleted strains were analyzed and qRT-PCR technology was used to compare the transcription levels of genes related to motility and biofilm formation in wild and gene-deleted strains. The results showed that there was no significant difference in the growth curve of each strain. The biofilm formation ability of AE17 $\Delta$ *RyhB*, AE17 $\Delta$ *cysE*, AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* was significantly lower than that of AE17. Compared with AE17, the transcription levels of *flhB*, *flgD*, *fliF* and *cheY* in AE17 $\Delta$ *cysE* and AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* were reduced, while AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* had enhanced gene transcription levels compared with AE17 $\Delta$ *cysE*. The AE17 $\Delta$ *RyhB*, AE17 $\Delta$ *cysE*, AE17 $\Delta$ *RyhB* $\Delta$ *cysE* and AE17 $\Delta$ *flhD*, *flgC* and *sidA* were significantly reduced. The results indicated that the deletion of *cysE* gene reduced the ability

of APEC biofilm formation and exercise, and *RyhB* gene had a compensatory effect on the regulation of *cysE* gene's exercise capacity. *RyhB* and *cysE* genes regulated the biofilm formation ability of APEC by regulating transcription level of genes(*flhD*, *flgC* and *sidA*) related to biofilm formation. These results of this study lay a foundation for studying the regulatory effect of *RyhB-cysE* gene on APEC.

收稿日期:2020-03-07

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31502038);国家自然科学基金面上项目(31972644)

作者简介:涂 健(1980-),男,汉族,安徽安庆人,博士,副教授,主要从事动物疫病病理及生物防治等研究。(E-mail) tujian1980@126.com

通讯作者:祁克宗,(E-mail) qkz@ahau.edu.cn

**Key words:** avian pathogenic *Escherichia coli*; *RyhB* gene; *cysE* gene; biofilm; motility

禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)是肠外致病性大肠杆菌,可以导致禽类出现全身性感染,严重影响全球养禽业。同时 APEC 可以通过食源性途径传播给人类,是人源肠外致病性大肠杆菌毒力基因的潜在贮存宿主。加强对 APEC 研究,不仅有助于养禽业的发展,也具有较大的公共卫生学意义<sup>[1]</sup>。在大肠杆菌研究中,已经证明小分子 RNA 参与了诸多生命过程,其中包括转录翻译调控、铁代谢途径、糖代谢途径、膜蛋白生物合成、群体感应系统以及致病菌的致病力调节等。而 *RyhB* 作为小分子 RNA,是目前已知调控的靶 mRNA 数目最多,其作为关键组成部分参与大肠杆菌诸多调控网络,在细菌的致病过程中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。本试验前期已构建 AE17  $\Delta$ *RyhB* 并进行 Label-free 蛋白组学测序及生物信息学预测,筛选出 *RyhB* 基因与 RNA 伴侣 Hfq 共同靶基因 *cysE*<sup>[2]</sup>。

CysE(Serine acetyltransferase)蛋白属于转移酶家族的酰基转移酶,在微生物中参与合成半胱氨酸。在代谢调控系统中,半胱氨酸主要参与抵制细胞代谢中硫化物的进入,同时半胱氨酸是一些生物元件合成途径所必需的元素,例如甲硫氨酸、一些维生素和金属簇等均由半胱氨酸参与合成。这个蛋白质不仅参与半胱氨酸合成反应,同时也参与蛋氨酸代谢、硫代谢等<sup>[3]</sup>,对微生物的生长至关重要。

本研究利用 Red 重组技术在 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB* 的基础上,进一步构建了基因缺失株 AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE*,并比较它们的生长曲线、运动性、生物被膜形成能力等生物学特性差异,并采用 qRT-PCR 技术比较野生株和缺失株中与运动性、生物被膜形成相关基因的转录水平,为研究 *RyhB-cysE* 基因对 APEC 的调控作用以及揭示 APEC 的致病机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

1.1.1 菌种、质粒及试剂 APEC AE17,为本实验室保存的 O<sub>2</sub> 血清型临床分离株;AE17  $\Delta$ *RyhB* 由本实验室前期构建<sup>[4]</sup>。Red 同源重组辅助质粒:pKD46(氨苄青霉素抗性)、pKD3(携带可被 FLP 重组酶识别的 FRT 位点,氯霉素抗性)、pCP20(42 °C

可表达 FLP 重组酶,用于消除 FLP 位点间的氯霉素抗性基因)均由安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存。氯霉素、氨苄青霉素、酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠、琼脂糖、质粒小量提取纯化试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;高保真酶 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase、AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 购自诺唯赞生物科技有限公司。

1.1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 登录的 APEC *cysE* 基因序列(ID:4493517),分别设计用于扩增 *cysE* 基因上游、下游序列 2 对引物 *cysE*-U-F/*cysE*-U-R 和 *cysE*-D-F/*cysE*-D-R。用于扩增抗性基因的引物:*cysE*-cm-F/*cysE*-cm-R;设计的用于鉴定 *RyhB*、*cysE* 基因缺失株的 2 对引物:*cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R、*cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R、*RyhB*-IN-F/*RyhB*-IN-R、*RyhB*-OUT-F/*RyhB*-OUT-R。以上引物(表 1)均由合肥通用生物科技有限公司合成。

表 1 本研究用到的引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	大小(bp)
<i>RyhB</i> -IN-F	ACCCGGCTGGCTAAGTAATAC	157
<i>RyhB</i> -IN-R	CTTTCAAATGCGAGTCAAATG	
<i>RyhB</i> -OUT-F	CTGCCGATGTCATAAGCG	1 029
<i>RyhB</i> -OUT-R	GCACCTGTAGCGTGTGTGA	
pKD46-F	GATACCGTCCGTTCTTCCTT	888
pKD46-R	TGATGATACCGCTGCCCTTACT	
pCP20-F	TTAGTGGTTGTAAAAACACCTGACC	409
pCP20-R	GTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCC	
<i>cysE</i> -U-F	CTGATCGAAAAACAGATGAAAG	760
<i>cysE</i> -U-R	CCAGCCTACAGGATAGCGATAAACCGTCAAT	
<i>cysE</i> -cm-F	ATCGCTATCCTGTAGGCTGGAGCTGCTT	1 033
<i>cysE</i> -cm-R	AAGCTGAAGC CATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>cysE</i> -D-F	TATTCATATGGCTTCAGCTTTAATATTGTTC	808
<i>cysE</i> -D-R	TGATGCGCGTCTGCTGT	
<i>cysE</i> -IN-F	GGAACGCCAGCGGCAGTA	625
<i>cysE</i> -IN-R	ACGCGACGCTACTCAAGCAC	
<i>cysE</i> -OUT-F	TTAAGGGTTAGACGAATATCTGC	1 992
<i>cysE</i> -OUT-R	TGCTGCACTGTGGCAAAAAG	

### 1.2 试验方法

1.2.1 AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE* 构建与鉴定 以 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB* 为亲本株,使用改良的 Red

重组方法<sup>[5-6]</sup>构建 *cysE* 基因缺失菌株。以提取的 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB* 基因组为模板,分别使用引物 *cysE*-U-F/*cysE*-U-R 和 *cysE*-D-F/*cysE*-D-R,通过 PCR 扩增 *cysE* 基因的上游和下游片段。以 pKD3 为模板,用引物 *cysE*-cm-F/*cysE*-cm-R 通过 PCR 扩增氯霉素抗性 ( $\text{Cm}^+$ ) 片段。以上述纯化的 PCR 产物为模板,以 *cysE*-U-F/*cysE*-D-R 为引物,采用 Overlap-PCR 技术,PCR 扩增用于 *cysE* 基因缺失的打靶片段。将构建的打靶片段电转化至含有 pKD46 质粒的 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB* 感受态细胞中,重组细菌在 37 °C 培养 1 h 后涂布于含有 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{Cm}^+$  的 LB 平板上,孵育 24 h 后,挑取单克隆,用 *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R、*cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R 引物 PCR 鉴定 *cysE* 基因缺失株,利用 pCP20 质粒将 *cysE* 基因缺失株氯霉素抗性消除并测序,鉴定成功的阳性重组子菌株为 AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE*。

1.2.2 各菌株生长曲线测定 将 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB*、AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE* 4 株菌分别接种到 LB 平板,从平板上挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中振荡培养,每隔 1 h 测其 600 nm 吸光度  $OD_{600}$  值,根据  $OD_{600}$  值绘制上述菌株的生长曲线。上述试验重复 3 次。

1.2.3 各菌株生物被膜形成能力测定 将 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB*、AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE* 菌株分别培养至  $OD_{600} = 1.0$ ,用 LB 液体按照 1:50 (体积比) 稀释菌液,加入到 96 孔聚丙烯板中,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,以无菌培养基作为空白对照组,每组 3 个重复。28 °C 培养 48 h,每孔加入 200  $\mu\text{l}$  PBS 洗涤 3 遍,晾干后每孔加入 200  $\mu\text{l}$  0.1% 结晶紫溶液,37 °C 染色 20 min,PBS 洗涤 3 遍,晾干,每孔加入 200  $\mu\text{l}$  33% 乙酸,充分溶解后,酶标仪测定每孔样本 620 nm 处的吸光度  $OD_{620}$  值,并通过 GraphPad Prism 6 paired *t* 检验分析数据。

1.2.4 扫描电镜观察各菌株生物被膜 在 6 孔细胞板中放入细胞爬片,分别加入 2 ml 含量为  $10^8$  CFU/ml 的 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB*、AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE* 菌液,在 37 °C 培养箱中静置培养 48 h。将培养的细胞爬片取出,PBS 清洗 3 遍,晾干,细胞爬片经过固定、脱水、干燥、黏台、喷金处理后用扫描电镜观察。

1.2.5 各菌株运动性测定 将 AE17、AE17  $\Delta$ *RyhB*、AE17  $\Delta$ *cysE*、AE17  $\Delta$ *RyhB*  $\Delta$ *cysE* 菌株分别培养至  $OD_{600} = 1.0$ ,4 000 r/min 离心 10 min,弃去培养基用

无菌 PBS 缓冲液调整  $OD_{600} = 2.0$ ,配制新鲜运动性培养基(每 100 ml 含有 1.00 g 蛋白胨、0.50 g 氯化钠、0.80 g 葡萄糖、0.25 g 琼脂粉),待冷却后在板的中央加入 2  $\mu\text{l}$  菌体,置于 37 °C 培养箱静置培养 6~8 h,观察细菌运动情况并测量菌圈大小。

1.2.6 透射电镜观察各菌株鞭毛形态 将上述 4 株菌分别培养至  $OD_{600} = 1.0$ ,2 000 r/min 离心 10 min,弃去培养基并用无菌 PBS 缓冲液洗 3 次,最后用 PBS 重悬,吸取 200  $\mu\text{l}$  重悬液经负染处理后用透射电镜观察。

1.2.7 各菌株运动性、生物被膜相关基因转录水平检测 参照文献[7],选取与细菌运动性、生物被膜相关基因 *fliY*、*fliB*、*fliD*、*fliF*、*fliM*、*cheY*、*fliH*、*fliC*、*sdiA*、*16S* 作为内参基因,分别设计引物(表 2),进行 qRT-PCR 检测缺失株与野生株基因的转录水平差异。参照文献[8]的方法,将上述 4 株菌培养至对数中前期,各取 1 ml 菌液提取 mRNA,利用反转录试剂盒反转录为 cDNA,并以相应的 cDNA 为模板。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak) 法分析并计算各目的基因转录水平<sup>[9]</sup>。

表 2 用于 qRT-PCR 的引物

Table 2 Primers used for qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>fliY</i> -F	AGCACCAAACCATTTTTCGGA
<i>fliY</i> -R	GCTGCGTAAAGGAAATGAAGACC
<i>cheY</i> -F	GCCGCAGCAATGATGTTCTC
<i>cheY</i> -R	TTATGGATTGTTATCTCCGACTGG
<i>fliB</i> -F	CCTACCAAATCCATCGCATTACCC
<i>fliB</i> -R	CTCCTGGTTGGCAGCGTGA
<i>fliD</i> -F	ACCACCGATCCGACAAATACCG
<i>fliD</i> -R	CGCCACCAACAAAGTCAGAAA
<i>fliF</i> -F	GGTGGATCAGGGCGGACA
<i>fliF</i> -R	CGTTACCAACAATAGCGGACAG
<i>fliM</i> -F	CCTGAACCTTATCCATCTAAAACCG
<i>fliM</i> -R	TCCATCGCCGCCAAACA
<i>fliH</i> -F	AGAGTAATCGTCTGTTGGTGTCT
<i>fliH</i> -R	CGACAACATTAGCGGCACTG
<i>fliC</i> -F	GGCTGGTGAGCGTGGTAATA
<i>fliC</i> -R	AGTGCCCGCAAGCAGAAGAAG
<i>sdiA</i> -F	AAACGCATCAGAGCCATCAG
<i>sdiA</i> -R	TTGTCCTTTTCCCGTTGCAG
16S-F	TTTGAGTTCCTCCGCGCC
16S-R	CGCCCGCAAGGTTAA

## 2 结果与分析

### 2.1 AE17 $\Delta cysE$ 、AE17 $\Delta RyhB \Delta cysE$ 的鉴定

采用 Red 同源重组的方法构建 *cysE* 基因缺失株,通过特异性引物进行 PCR 鉴定。以 *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R 为引物,AE17、AE17  $\Delta RyhB$  扩增出 625 bp 的 *cysE* 基因片段, *cysE* 基因缺失株 (AE17

$\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$ ) 扩增不出目的片段 (图 1)。以 *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R 为引物, AE17、AE17  $\Delta RyhB$  扩增出 1 992 bp 目的片段, AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  扩增出 1 303 bp 目的片段 (图 1), 测序结果表明 AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  构建成功。

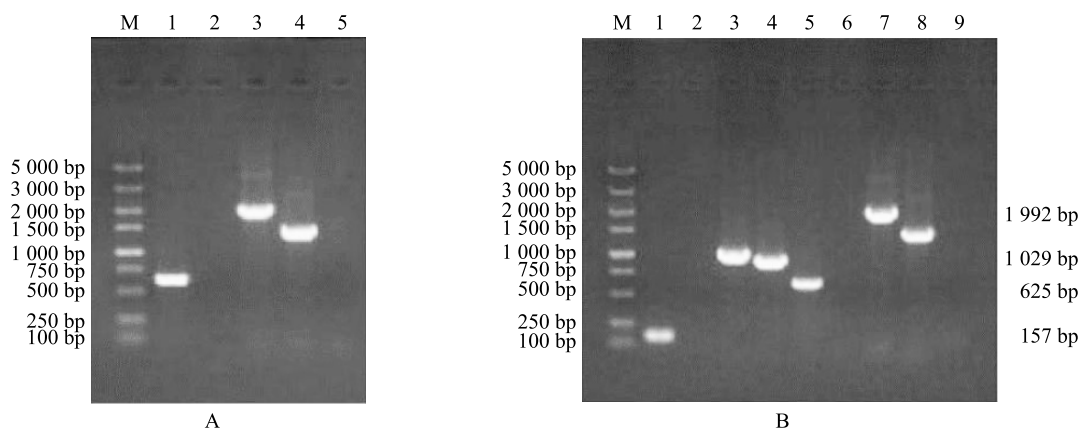


图 A, M: Marker; 1: AE17, *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R; 2: AE17  $\Delta cysE$ , *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R; 3: AE17, *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R; 4: AE17  $\Delta cysE$ , *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R; 5: 空白对照; 图 B, M: Marker; 1: AE17, *RyhB*-IN-F/*RyhB*-IN-R; 2: AE17  $\Delta RyhB$ , *RyhB*-IN-F/*RyhB*-IN-R; 3: AE17, *RyhB*-OUT-F/*RyhB*-OUT-R; 4: AE17  $\Delta RyhB$ , *RyhB*-OUT-F/*RyhB*-OUT-R; 5: AE17  $\Delta RyhB$ , *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R; 6: AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$ , *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R; 7: AE17  $\Delta RyhB$ , *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R; 8: AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$ , *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R; 9: 空白对照。

图 1 用 *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R、*cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R、*RyhB*-IN-F/*RyhB*-IN-R、*RyhB*-OUT-F/*RyhB*-OUT-R 引物对 PCR 鉴定 AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$

Fig.1 Identification of AE17  $\Delta cysE$  and AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  by PCR with *cysE*-IN-F/*cysE*-IN-R, *cysE*-OUT-F/*cysE*-OUT-R, *RyhB*-IN-F/*RyhB*-IN-R, *RyhB*-OUT-F/*RyhB*-OUT-R primers

### 2.2 各菌株的生长曲线

各菌株生长曲线显示, AE17、AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  均经历 0~3 h 的延滞期, 在第 3 h 进入对数生长期, 第 12 h 进入稳定期。4 株菌株在 2 h 之前没有明显区别; 在 2~3 h, AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  与 AE17 相比没有明显区别, AE17  $\Delta cysE$  与 AE17 相比生长缓慢; 在 3~12 h, AE17  $\Delta RyhB$  与 AE17 相比没有明显变化, AE17  $\Delta cysE$  与 AE17 相比生长缓慢, AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  与 AE17 相比在 9 h 后生长缓慢; 在 13~16 h 4 株菌株之间无明显区别 (图 2)。表明 *RyhB* 基因缺失对 APEC 的生长速度无影响, *cysE* 基因缺失 APEC 的对数期生长速度有所降低, *RyhB*、*cysE* 基因共同缺失对 APEC 的生长速度无显著影响。

### 2.3 各菌株生物被膜的 formation 能力

用改良结晶紫半定量法检测 AE17、AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  生物被膜形成

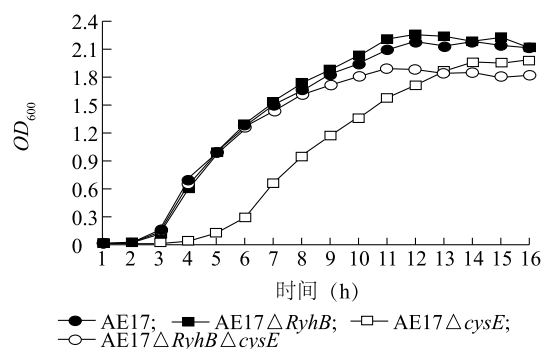


图 2 生长曲线的测定

Fig.2 The growth curve

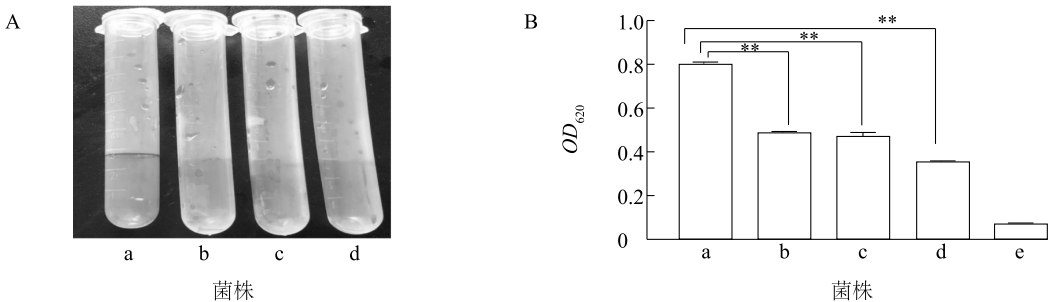
能力, 结果显示 AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  生物被膜形成能力极显著低于 AE17 ( $P < 0.01$ ), 表明 *RyhB*、*cysE* 基因缺失 APEC 生物被膜形成能力下降 (图 3)。

扫描电镜观察各菌株生物被膜, 结果显示, AE17 在堆状的微菌落中, 菌与菌之间丝状物较多,



而 AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  菌与菌之间丝状物较少;4 株菌株的生物被膜的片状结构均不明显,但 AE17 依稀可见有大片片状结构,而 AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB$

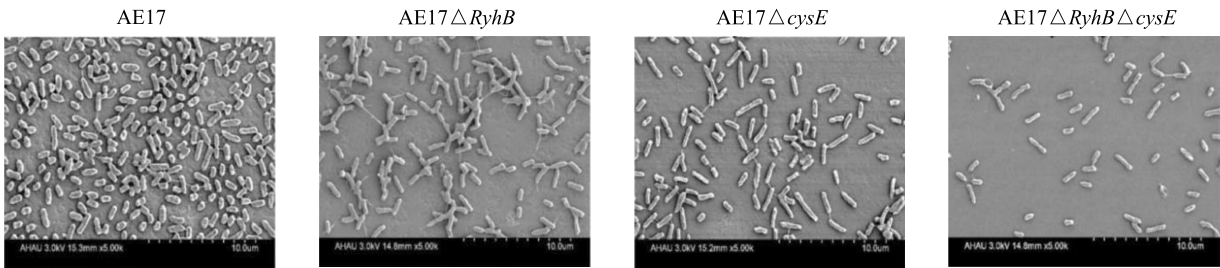
$\Delta cysE$  几乎看不到片状结构的存在(图 4)。表明 *RyhB*、*cysE* 基因缺失 APEC 导致生物被膜形成能力下降。



a: AE17; b: AE17  $\Delta RyhB$ ; c: AE17  $\Delta cysE$ ; d: AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$ ; e: LB 液体空白对照。 \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 3 基因缺失株与野生株生物被膜形成能力比较

Fig.3 Comparison of biofilm formation ability between gene-deleted strains and wild strains



该图是在放大了 5 000 倍的基础上观察的。

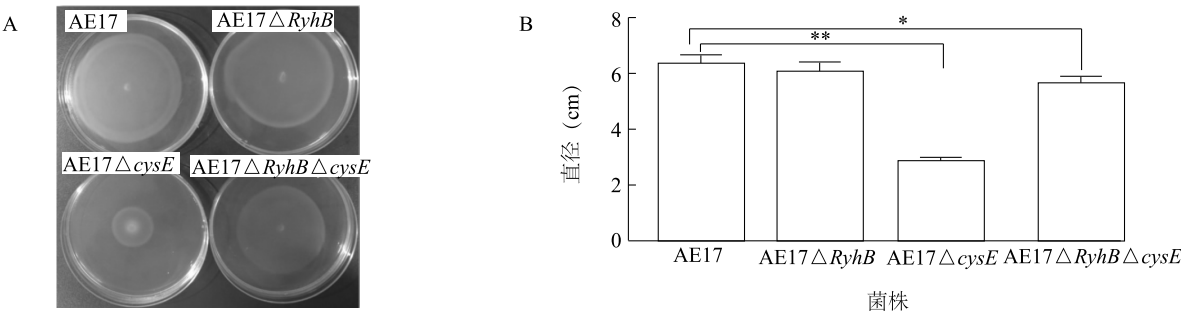
图 4 缺失株与野生株生物被膜形成能力比较

Fig.4 Comparison of biofilm formation ability between gene-deleted strains and wild strains

## 2.4 各菌株的运动能力

各菌株运动能力的测定结果显示:AE17  $\Delta RyhB$  运动圈直径与 AE17 相比无明显差异,AE17  $\Delta cysE$  运动圈直径极显著小于 AE17 ( $P < 0.01$ ), AE17

$\Delta RyhB \Delta cysE$  运动圈直径显著小于 AE17 ( $P < 0.05$ ),但比 AE17  $\Delta cysE$  大(图 5)。表明 *cysE* 基因缺失降低了 APEC 运动能力,*RyhB* 基因缺失对 *cysE* 基因运动能力调控有代偿作用。



\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 5 各菌株的运动能力

Fig.5 Exercise capacity of each strain

透射电镜观察各细菌鞭毛数,结果显示,AE17  $\Delta cysE$  鞭毛数与 AE17 相比显著减少,AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  鞭毛数与 AE17 相比有所减少,但比 AE17  $\Delta cysE$  多(图 6)。表明 *RyhB*、*cysE* 基

因缺失 APEC 鞭毛数均有所下降,但 *cysE* 基因对 APEC 鞭毛数的影响大于 *RyhB* 基因,且 *RyhB* 基因缺失对 *cysE* 基因的鞭毛调节作用有代偿作用。

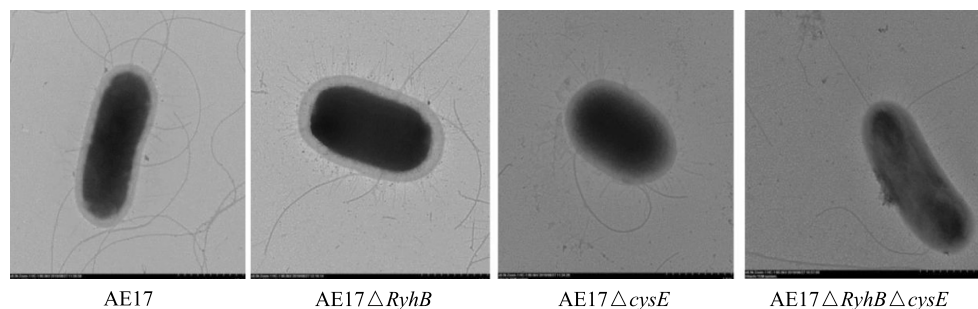


图 6 缺失株与野生株鞭毛形成能力比较

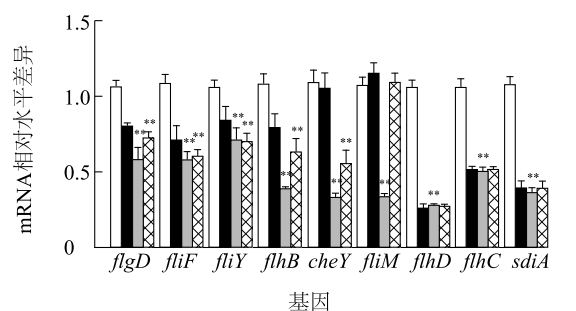
Fig.6 Comparison of flagellum formation ability between gene-deleted strains and wild strains

## 2.5 各菌株运动性、生物被膜形成相关基因的转录水平检测

采用 qRT-PCR 对 AE17、AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  运动性相关基因转录水平检测,结果显示,AE17  $\Delta cysE$  较 AE17 *fliY*、*fliH*、*fliD*、*fliF*、*fliM* 和 *cheY* 基因转录水平均显著下降,AE17  $\Delta RyhB$  较 AE17 *fliH*、*fliF*、*fliY*、*fliD*、*cheY* 基因转录水平有下降趋势,而 *fliM* 基因转录水平有上调趋势;AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  与 AE17 相比,其 *fliH*、*fliD*、*fliF* 和 *cheY* 基因转录水平均下降,但与 AE17  $\Delta cysE$  相比均有所增强(图 7)。表明 *cysE* 基因缺失 APEC 运动性相关基因转录水平下降,且 *RyhB* 基因缺失对 *cysE* 基因的转录水平有代偿作用。AE17、AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  生物被膜相关基因转录水平检测结果显示,AE17  $\Delta RyhB$ 、AE17  $\Delta cysE$ 、AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$  与 AE17 相比,*fliD*、*fliH*、*sidA* 转录水平均显著降低,且转录水平降低幅度相近,表明 *RyhB*、*cysE* 基因均通过调节与生物被膜形成的相关基因 *fliD*、*fliH*、*sidA* 转录水平来调控 APEC 生物被膜形成能力。

## 3 讨论

大肠杆菌是人及动物肠道的常在菌群,但是致病性大肠杆菌却可以引起人及动物诸多疾病<sup>[10-12]</sup>。病原菌的致病过程体现在病原和宿主细胞相互作用的过程,对病原来说要经历黏附、侵入、生长繁殖、抵



□ AE17; ■ AE17  $\Delta RyhB$ ; ▒ AE17  $\Delta cysE$ ; ▨ AE17  $\Delta RyhB \Delta cysE$

\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 7 生物被膜形成能力、运动性相关基因的转录水平

Fig.7 Transcription levels of biofilm-forming ability and motility-related genes

抗宿主免疫反应、产生毒素等过程,大肠杆菌亦是如此。细菌的生物被膜状态被认为是一种细菌适应不良环境而形成的保护模式,与浮游细胞相比,生活在生物被膜内的细菌抵抗抗生素和免疫系统的能力更强<sup>[13-14]</sup>。生物被膜通过增强细菌抗宿主免疫系统和提高在环境中的生存能力,进而能增强细菌的致病性<sup>[15]</sup>。细菌鞭毛介导的运动性和黏附性在细菌致病性中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。研究 *RyhB*、*cysE* 基因对禽致病性大肠杆菌的生物被膜形成及运动性影响,可为揭示其致病机理奠定基础。

*RyhB* 基因缺失株 AE17  $\Delta RyhB$  与野生菌株 AE17 相比生长曲线无明显变化,但 *cysE* 基因缺失 APEC 的对数期生长速度有所降低,而 *cysE*、*RyhB*

基因共同缺失时对 APEC 的生长速率无显著影响, 仅在生长对数期后期生长速率稍微缓慢。*cysE* 基因单缺失时会影响 APEC 生长对数期的生长速率, 猜测是由于基因影响细菌的代谢系统产生的, 而 *cysE*、*RyhB* 基因共同缺失时无显著影响, 仅在生长对数期后期生长速率较慢, 猜测是 *RyhB* 基因缺失对 *cysE* 基因调控的细菌代谢作用具有补偿机制且该机制具有时效性, 具体机制仍有待进一步研究。

用改良结晶紫半定量法检测 AE17、AE17  $\Delta$  *RyhB*、AE17  $\Delta$  *cysE*、AE17  $\Delta$  *RyhB*  $\Delta$  *cysE* 生物被膜形成能力, 结果显示, AE17  $\Delta$  *RyhB*、AE17  $\Delta$  *cysE*、AE17  $\Delta$  *RyhB*  $\Delta$  *cysE* 生物被膜形成能力极显著低于 AE17, 且 AE17  $\Delta$  *RyhB*、AE17  $\Delta$  *cysE*、AE17  $\Delta$  *RyhB*  $\Delta$  *cysE* 生物被膜形成能力相似。qRT-PCR 测定结果显示, AE17  $\Delta$  *RyhB*、AE17  $\Delta$  *cysE*、AE17  $\Delta$  *RyhB*  $\Delta$  *cysE* 与 AE17 *flhD* *flhC* *sdia* 均显著降低, 且转录水平降低幅度相近。推测 *RyhB* 基因通过 *cysE* 基因调控 APEC *flhD* *flhC* *sdia* 基因的生物被膜形成能力, APEC *cysE* 基因是 *RyhB* 基因调控生物被膜形成能力的调节靶点。*flhD* *flhC* *sdia* 均为 DNA 结合转录双重调节因子, 推测其结合下游基因的启动子区域, 从而调控细菌的生物被膜形成能力。*flhD* *flhC* 的突变可对生物被膜形成产生促进或抑制的影响, 具体取决于突变位点<sup>[17]</sup>。本试验结果显示, 缺失 *cysE*、*RyhB* 基因的 APEC 菌株中的 *flhD* *flhC* 基因转录水平下调, 说明 APEC *cysE*、*RyhB* 基因缺失菌株通过调节 *flhD* *flhC* 基因转录水平从而抑制生物被膜的形成。研究结果表明, 在肠致病性大肠杆菌中缺失 *sdia* 后, 其生物被膜形成和运动性相关基因 (如纤维素合成亚基 *bcsA* 基因、鞭毛结构蛋白 *fliC* 基因及 Curlin 菌毛合成亚基 *csgA* 基因) 转录水平上调, 生物被膜的形成及运动能力增强, 说明 *sdia* 对细菌的生物被膜形成具有负调控作用<sup>[18]</sup>。本试验 APEC 缺失 *cysE*、*RyhB* 基因后 *sdia* 基因转录水平下调, 可能通过抑制生物被膜形成相关基因的转录而降低其生物被膜的形成。具体机制仍有待进一步研究。

运动性能力测定以及透射电镜观察细菌鞭毛结果显示, *cysE* 基因缺失 APEC 运动性显著下降; *RyhB* 基因缺失 APEC 运动性无显著变化; *RyhB*、*cysE* 双基因缺失 APEC 运动性较 *cysE* 基因缺失 APEC 运动性增强, 与野生菌株相比降低。qRT-PCR 测定

结果显示, *cysE* 基因缺失株与 AE17 相比, APEC 运动性相关基因 *fliY*、*flhB* *flgD* *fliF* *fliM* 和 *cheY* 转录水平均显著下降; 但 AE17  $\Delta$  *RyhB*  $\Delta$  *cysE* *flhB* *flgD* *fliF* *fliM* 和 *cheY* 基因的转录水平较 AE17  $\Delta$  *cysE* 均有所增强, *flhB* 是鞭毛生物合成蛋白质<sup>[19]</sup>, 是 III 型分泌系统中与鞭毛蛋白转运有关的蛋白质; *cheY* 是扩散性反应调节蛋白质, 可以被 *cheA* 磷酸化, 能改变鞭毛的运动方向<sup>[20]</sup>; *fliY* 是细菌鞭毛马达开关蛋白质, 在病原菌侵袭相关鞭毛运动中发挥关键作用<sup>[21]</sup>; *fliF* 是鞭毛基体的 MS 环的主要成分, 将鞭毛固定在细胞质膜上; *flgD* 与 *fliM* 构成鞭毛基体的 C 环, 参与改变鞭毛旋转方向<sup>[22]</sup>。推测 *cysE* 基因缺失通过下调 *flgD* *fliF* *flhB*、*cheY*、*fliM* 基因转录水平控制鞭毛的合成及运动能力, 使 APEC 运动性下降, *RyhB* 基因缺失影响 *flgD* *fliF* *flhB*、*cheY*、*fliM* 基因转录水平, 对 *cysE* 基因调控菌株运动能力具有代偿作用。具体机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] JOHNSON T J, WANNEMUEHLER Y, KARIYAWASAM S, et al. Prevalence of avian-pathogenic *Escherichia coli* strain O<sub>1</sub> genomic islands among extraintestinal and commensal *E. coli* isolates [J]. J Bacteriol, 2012, 194(11): 2846-2853.
- [2] 张 煜. 非编码小 RNA (*RyhB*) 调控禽致病性大肠杆菌生物学表型分析及靶蛋白的筛选[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2017.
- [3] NAKAMORI S, KOBAYASHI S, KOBAYASHI C, et al. Overproduction of l-Cysteine and l-Cystine by *Escherichia coli* Strains with a Genetically Altered Serine Acetyltransferase [J]. Appl Environ Microb, 1998, 64(5): 1607-1611.
- [4] 尹 磊, 祁克宗, 涂 健, 等. 非编码小 RNA (*RyhB*) 调控禽致病性大肠杆菌毒力相关基因的分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(8): 1409-1416.
- [5] DATSENKO K A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [6] 王 栋, 王少辉, 孟庆美, 等. 禽致病性大肠杆菌 VI 型分泌系统 2 *eflC* 基因缺失株的构建及其生物学特性分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(3): 21-26.
- [7] NI B, GHOSH B, PALDY F S, COLIN R, et al. Evolutionary remodeling of bacterial motility checkpoint control [J]. Cell Rep, 2017, 18(4): 866 - 877.
- [8] O'NEILL J, ROUJEINIKOVA A. Cloning, purification and crystallization of *MotB*, a stator component of the proton-driven bacterial flagellar motor [J]. Acta Crystallogr F, 2008, 64(6): 561-563.
- [9] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by

- the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [10] 张 谦,刘一尘,徐 进,等. 加味白头翁散发酵产物对肉仔鸡大肠杆菌病的防治效果及对其肠道菌群的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 177-180.
- [11] 李 军,冯世文,曾 芸,等. 大肠杆菌 O157 : H7 氟苯尼考耐药菌株与敏感菌株的蛋白组学差异[J]. 南方农业学报, 2019, 50(4): 875-882.
- [12] 毕志香,朱亚露,赵 阳,等. 山东省某地区肉鸡 H9 亚型禽流感与大肠杆菌混合感染的诊治[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 163-165.
- [13] HØIBY N, BJARNSHOLT T, GIVSKOV M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. Int J Antimicro Agents, 2010, 35(4): 322-332.
- [14] COSTERTON J W, STEWART P S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms; a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [15] WOOD T K, GONZÁLEZ BARRIOS A F, HERZBERG M, et al. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(2): 361-367.
- [16] HAIKO J, WESTERLUND-WIKSTRM Z B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence[J]. Biol, 2013, 2(4): 1242-1267.
- [17] SHELLEY M H, JOSEPH S, NICHOLAS S, et al. Spontaneous mutations in the flhD operon generate motility heterogeneity in *Escherichia coli* biofilm[J]. BioMed Central, 2016, 16(1): 1-13.
- [18] HEBERT C, SAMUEL C, JULIANA H, et al. Role of SdiA on Biofilm Formation by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Pubmed, 2018, 9(5): 253.
- [19] MINAMINO T, INOUE Y, KINOSHITA Miki, et al. FlhK-Driven conformational rearrangements of FlhA and FlhB are required for export switching of the flagellar protein export apparatus [J]. Pubmed, 2020, 202(3): e00637.
- [20] QUAX TESSA E F, ALTEGORR F, ROSSI F, et al. Structure and function of the archaeal response regulator *CheY*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(6): 1259-1268.
- [21] LAM K H, CHAOLUN X, KAILEI S, et al. Three SpoA-domain proteins interact in the creation of the flagellar type III secretion system in *Helicobacter pylori*[J]. J Biol Chem, 2018, 293(36): 13961-13973.
- [22] 田 延,丁雪燕,岑 雪,等. 大肠杆菌鞭毛研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(6): 649-653.

(责任编辑:陈海霞)