

吴剑梅, 傅丹丹, 李佳璇, 等. ETT2 转录因子 EivF 调控禽致病性大肠杆菌运动性和环境胁迫耐受性[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 438-445.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.018

ETT2 转录因子 EivF 调控禽致病性大肠杆菌运动性和环境胁迫耐受性

吴剑梅, 傅丹丹, 李佳璇, 邵颖, 宋祥军, 涂健, 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, 安徽省动物性食品质量与生物安全工程实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为探究禽致病性大肠杆菌(*Avian pathogenic Escherichia coli*, APEC) 中大肠杆菌Ⅲ型分泌系统(*Escherichia coli* Type Ⅲ secretion system2, ETT2) 转录因子 EivF 的功能, 通过透射电镜观察检测野生株(AE81)、缺失株(AE81 Δ *eivF*) 和回复株(AE81 Δ *eivF*-comp) Curli 菌毛的合成能力, 并探究 3 种菌株在不良环境中的存活情况, 通过 RT-qPCR 检测鞭毛和环境耐受相关基因的转录水平。结果表明, 与野生株相比, 缺失株的 curli 菌毛合成能力无明显变化, 在透射电镜下缺失株鞭毛数量明显减少, 缺失株在强酸、强碱、氧化应激、高温、高渗环境中的存活率均显著($P < 0.05$) 或极显著($P < 0.01$) 降低, 回复株上述表型基本恢复。转录组数据显示, 缺失株的 *flgB*、*flgC*、*flgE* 等鞭毛相关基因和 *proV*、*cadA* 等环境耐受相关基因的转录水平下调。RT-qPCR 结果显示, *flgB*、*flgC*、*flgE*、*proV* 等基因的转录水平下调。综上所述, ETT2 转录因子 EivF 参与调控禽致病性大肠杆菌运动能力和在不良环境中的存活能力。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; ETT2 转录因子 EivF; 鞭毛; 环境胁迫

中图分类号: S858.351⁺.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2022)02-0438-08

Regulation of ETT2 transcription factor EivF on avian pathogenic *Escherichia coli* motility and tolerance to environmental stress

WU Jian-mei, FU Dan-dan, LI Jia-xuan, SHAO Ying, SONG Xiang-jun, TU Jian, QI Ke-zong

(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathology and Disease Control, Anhui Provincial Animal Food Quality and Biosafety Engineering Laboratory, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To investigate the function of transcription factor EivF of *Escherichia coli* Type Ⅲ secretion system2 (ETT2) in avian pathogenic *E. coli* (APEX), the synthetic ability for Curli pili of wild strain (AE81), deleted strain (AE81 Δ *eivF*) and revertant strain (AE81 Δ *eivF*-comp) were detected by transmission electron microscopy, and the survival condition of three strains in adverse environment was investigated. The transcriptional levels of flagella and environmental tolerance related genes were detected by RT-qPCR. The results showed that, there was no significant change in Curli pili synthetic ability of the deleted strain compared with the wild strain. The flagella number of deleted strain (AE81 Δ *eivF*) decreased significantly under transmission electron microscope. The survival rates of deleted strain under the environments of strong acid, strong alkali, oxidative stress, high temperature and hyperosmotic pressure were significantly ($P < 0.05$) or extremely significantly ($P < 0.01$) decreased, and the above phenotype was basically restored in the revertant strain. Transcriptome data showed that, the transcriptional levels of flagellum-related genes such as *flgB*, *flgC*, *flgE* and environmental tolerance related genes such as *proV*,

cadA were down-regulated in the deleted strains. The results of RT-qPCR showed that, the transcriptional levels of *flgB*, *flgC*, *flgE*, *proV* and other genes were down-regulated. In conclusion, the ETT2 transcriptional factor EivF is involved in the regulation of motor ability and survival ability of avian pathogenic *E. coli* in adverse environments.

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772707); 安徽农业大学 2019 年度研究生创新基金项目(2019ysj-24)

作者简介: 吴剑梅(1998-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事动物性食品安全研究。(E-mail) 1916679282@qq.com

通讯作者: 祁克宗, (E-mail) qkz@ahau.edu.cn

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*; ETT2 transcription factor EivF; flagella; environmental stress

禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)属于肠外致病性大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ExPEC),常与其他病原混合感染引起禽类细菌性疾病或死亡,主要临床症状有腹膜炎、输卵管炎、慢性呼吸道疾病和败血症等^[1-2]。APEC 血清型众多,且不同血清型、不同菌株之间缺乏交叉免疫,给养殖业造成巨大的经济损失^[3]。研究发现,APEC 与脑膜炎大肠杆菌(Necrotogenic *Escherichia coli*, NMEC)有相似的遗传因子,是人源肠外致病性大肠杆菌毒力基因的贮存库^[4],因此开展 APEC 致病机制相关的研究对防控 APEC 引起的疾病具有重要的公共卫生学意义。

大肠杆菌Ⅲ型分泌系统(*Escherichia coli* type Ⅲ secretion system2, ETT2)首次在肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 中发现^[5]。ETT2 的基因簇包含 5 个转录因子,分别是 YqeI (ECs_3704)、YgeH (ECs_3709)、YgeK (ECs_3712)、EtrA (ECs_3720)和 EivF (ECs_3734)^[6]。转录因子 YgeK 直接与 EHEC 的 *ler* 调控区相互作用,激活肠细胞脱落位点 LEE 毒力岛表达,促进黏附及擦拭性损伤(Attaching and effacing lesions, A/E Lesions)形成^[7]。在肠聚集菌株 042 中,转录因子 YgeH 诱导了 *invF* 的表达^[8]。*etrA* 基因缺失显著降低了 APEC 菌毛的表达量、在巨噬细胞中的存活能力以及在鸭中的增殖能力和毒力^[9]。同时 ETT2 转录因子还能够参与调控细菌生物被膜形成、运动鞭毛组装、抗血清杀菌、调节肠细胞脱落位点(LEE)毒力岛分泌等致病过程^[10-12]。转录因子 EivF 位于 ETT2 *eiv* 侵袭基因簇最末端^[13],与沙门氏菌 SPI-1 毒力岛核心转录调控基因 *invF* 同源。研究发现,在 EHEC O157:H7 中,缺失 EivF 导致细菌 LEE 毒力岛编码的蛋白质分泌量大幅增加,细菌对人肠细胞的黏附力增加^[14]。

鞭毛是 APEC 的毒力因子,是细菌蛋白质输出装置,控制细菌的运动和行为^[15]。研究发现,KdpD/KdpE 双组分系统、转录调节因子 ArcA、群体感应系统等多种调控因子影响 APEC 鞭毛组装过程^[15-17]。APEC 在入侵和定殖机体的过程中,会经过机体的高氧、强酸等不良环境,细菌通过调节相关基因从而适应不良环境,增强其存活能力^[18-19]。

PhoR/PhoB 双组分系统、转录因子 IbeR 等参与调控 APEC 对环境胁迫的耐受^[18,20]。EivF 是 ETT2 毒力岛重要的转录因子,在鞭毛组装和环境胁迫耐受过程中扮演的作用尚未见报道。

本研究以 APEC ETT2 转录因子 *eivF* 基因为研究对象,基于转录组数据分析 EivF 参与调控的细菌信号通路,通过透射电镜、环境耐受和荧光定量 PCR 等试验,探究 *eivF* 基因调控 APEC 运动和响应环境胁迫的能力,为深入研究禽致病性大肠杆菌致病机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 禽致病性大肠杆菌 AE81 菌株为本实验室保存的临床分离株,缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 和回复株 AE81 $\Delta eivF$ -comp 由本实验室构建和保存^[12]。

1.1.2 主要试剂和仪器 酵母浸粉、胰蛋白胨、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、刚果红、考马斯亮蓝购自生物工程(上海)股份有限公司,氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司,琼脂粉购自索莱宝科技有限公司,RNA 裂解液、HiScript[®] Ⅲ RT SuperMix for qPCR、AceQ qPCR SYBR Green Master PCR Master Mix 购自诺唯赞生物科技有限公司,超净工作台(型号 SW-CJ-2F)购自苏州设备进化有限公司,恒温培养箱(型号 DHP-9082)购自上海一恒科技有限公司,ViiA[™] 7 Real-time PCR 仪购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 基于转录组学测序筛选差异基因

本实验室前期获得 AE81 和 AE81 $\Delta eivF$ 转录组数据^[12]。使用 Bowtie2 比对软件(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/Bowtie2/index.shtml>)将 clean reads 与 *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai 参考基因进行比对,使用 RSEM 软件包(<http://deweylab.bio-stat.wisc.edu/RSEM>)计算基因的表达水平。使用 possionDis 差异分析方法检测样品之间的差异表达基因(DEGs),对差异表达基因进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。

1.3 透射电镜观察

将野生株 AE81、缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 和回复株 AE81 $\Delta eivF$ -comp 培养至对数生长期,取 5 ml 菌液,用无菌滤膜过滤,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2

次,加入等体积 PBS 重悬。铜网正面覆盖在菌液表面,静置约 2 min,滴加磷酸钨负染液,用滤纸吸干铜网表面多余样品,然后将铜网覆在负染液上,负染 2~3 min,再用滤纸吸取多余的染液,烘干铜网,用透射电镜观察拍照。

1.4 红色、干燥、粗糙 (rdar) 表型的观察

将野生株 AE81、缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 和回复株 AE81 $\Delta eivF$ -comp 于 37 °C 静置培养至对数生长期,用 PBS 洗涤菌液 2 次,再用 PBS 重悬,浓缩至 OD_{600} 为 3.0。按参考文献[21],配制 CR 培养基(刚果红 0.008 g,考马斯亮蓝 0.004 g,蛋白胨 2.000 g,酵母粉 1.000 g,琼脂粉 1.600 g,200 ml ddH₂O)。取 1 μ l 菌液滴于刚果红 (CR) 培养基上,37 °C 培养 48 h,观察菌落形态。

1.5 环境耐受试验

将野生株 AE81、缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 和回复株 AE81 $\Delta eivF$ -comp 培养至对数生长期,用 PBS 洗涤 2 次,重悬备用。分别检测野生株、缺失株及回复株在酸性、碱性、氧化、高渗透压和高温不利环境中的存活情况。

1.5.1 耐酸试验 用乙酸 (HAC) 溶液调节 LB 培养基 pH 至 4.0。将菌液与酸性培养基等体积混合,37 °C 培养 30 min。用 PBS 进行 10 倍梯度稀释,挂板于 LB 固体培养基平板上,37 °C 过夜培养,次日进行菌落计数,比较 3 株菌存活情况。

1.5.2 耐碱试验 菌液与 Tris-HCl 缓冲液 (100 mmol/L, pH=10.0) 等体积混匀后,于 37 °C 作用 30 min。梯度稀释后挂板于 LB 固体培养基平板上,于 37 °C 过夜培养后,进行菌落计数。

1.5.3 氧化应激试验 菌液与 10 mmol/L H₂O₂ 溶液等体积混合,37 °C 培养 20 min。用 PBS 进行 10 倍梯度稀释,滴板于 LB 固体培养基平板上,37 °C 过夜培养后,进行菌落计数。

1.5.4 渗透压试验 菌液与等体积的 NaCl 溶液 (4.8 mol/L) 混匀后,37 °C 作用 60 min。用 PBS 进行 10 倍梯度稀释,滴板于 LB 固体培养基平板上,37 °C 过夜培养后,进行菌落计数。

1.5.5 耐热试验 菌液于 54 °C 作用 3 min。用 PBS 稀释到一定梯度后滴板于 LB 固体培养基平板上,37 °C 过夜培养后,进行菌落计数。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测鞭毛和环境胁迫相关基因转录量

1.6.1 设计引物 根据 GenBank 中已发布的内参

基因 *16S rRNA*,选取环境耐受相关基因 *cadA*、*cadB*、*cadC*、*adiA*、*adiC*、*gadA*、*gadC*、*proV* 和鞭毛组装相关基因 *flgB*、*flgC*、*flgE*,用 Primer Premier 5 软件分析并设计特异性引物,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物列表

Table 1 Primers for real-time PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')
Rt-16S rRNA-F	TTTGAGTTCCTCCGCC
Rt-16S rRNA-R	CGGCCGCAAGGTTAA
Rt-cadA-F	CGTAGTGCAGGAGAAGTGCTG
Rt-cadA-R	CTCCACAGTCTTAACATTCT
Rt-cadB-F	AGACCTTTTTTCGGAATACCGTTGC
Rt-cadB-R	CTTCTCTGGGCTCCTGGATGA
Rt-cadC-F	AACGCTACCAGTGCTACA
Rt-cadC-R	CTCCACAGTCTTAACATTCT
Rt-adiA-F	TGGAGTAGTTCCGACCTTGA
Rt-adiA-R	ACTTGCCCTGCCCTTTAT
Rt-adiC-F	ACGGGCAAAAATCGGTGGGA
Rt-adiC-R	CTGCGGGTTGCTTAGGTTCACTG
Rt-gadA-F	TCCAGCAACAGTTCAGCA
Rt-gadA-R	AGATCCGCGATACACCTT
Rt-gadC-F	GCCACCAAAGTGCCTAA
Rt-gadC-R	TTCGGCTGCGTATCAAAT
Rt-proV-F	CACAGCTACCCGAATGAA
Rt-proV-R	TCGTGGGAAATAAAGACAA
Rt-flgB-F	AACAAGAGGTGCTCAATC
Rt-flgB-R	AGTTCTGCGGTAGGAGCC
Rt-flgC-F	CGTAAAGGTTGCCGATGT
Rt-flgC-R	GTATTGACCGAGCGTAAGG
Rt-flgE-F	CTTTACCGATGGCACGAC
Rt-flgE-R	TATTCACCAGGTTACGATT

1.6.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 将 AE81、AE81 $\Delta eivF$ 和 AE81 $\Delta eivF$ -comp 3 株菌培养至对数生长期,取 1 ml 菌液于 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 1 ml RNA isolater 吹打混匀,再加入 200 μ l 三氯甲烷剧烈振荡 15 s,4 °C 静置 5 min,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,加入等体积的异丙醇,上下颠倒混匀,4 °C 静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 1 ml 去 RNA 酶的 75% 乙醇,上下颠倒混匀并室温静置 3~5 min,12 000 r/min

离心 5 min,弃上清液,开口干燥3~5 min,加入 30 μ l RNase-free H₂O 溶解,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。将 AE81、AE81 Δ *eivF* 和 AE81 Δ *eivF*-comp 3 株菌培养至对数生长期,用 PBS 洗涤 2 次,加入等量的酸性 LB 培养基(pH=4.0),37 $^{\circ}$ C 静置共培 1 h。按上述方法提取细菌 mRNA,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。使用反转录试剂 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR,按试剂盒说明书进行反转录,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6.3 荧光定量 PCR 以 *16S rRNA* 为内参基因,用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 荧光定量试剂盒检测各菌株 *cadA*、*cadB*、*adiA*、*proV* 等基因的表达水平。RT-qPCR 反应体系(10 μ l):2 \times Taq PCR Master Mix 5.0 μ l,cDNA 1.0 μ l,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ l,ddH₂O 3.6 μ l。PCR 反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;溶解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。每株菌进行 3 次重复。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算上述基因的 mRNA 转录水平。

1.7 数据统计分析

利用 GraphPad Prism 5 软件分析数据,采用 *t* 检验法对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 转录组学差异基因分析

以差异倍数(Fold Change) ≥ 2 为筛选标准,分析显著差异表达基因。与 AE81 相比,缺失株 AE81 Δ *eivF* 有 576 个基因差异表达,其中上调表达基因 368 个,下调表达基因 208 个。KEGG 信号通路分析发现 EivF 参与调控细菌多个信号通路,其中参与鞭毛组装和微生物在不良环境中代谢这 2 条信号通路的基因表达差异显著。筛选转录组数据中与之相关的差异表达基因,发现与鞭毛组装相关基因均下调表达,在不良环境中微生物代谢相关基因以下调表达为主(表 2)。

2.2 *eivF* 基因对禽致病性大肠杆菌 AE81 鞭毛微观形态的影响

透射电镜观察结果(图 1)显示,野生株(AE81)鞭毛数量多且长,结构完整;而缺失株(AE81 Δ *eivF*)鞭毛数量明显减少,只有几根;回复株(AE81 Δ *eivF*-comp)鞭毛数量基本恢复至野生株水平。表明转录因子 EivF 参与 APEC 鞭毛的形成。

表 2 与鞭毛组装和环境代谢相关的显著差异表达基因

Table 2 Genes with significant difference in expression related to flagella package and environmental metabolism

基因编号	基因	功能	差异表达倍数 (AE81 Δ <i>eivF</i> / AE81)
ECs_1879	<i>puuE</i>	氨基酸转氨酶	3.70
ECs_3326	<i>talA</i>	转醛醇酶	2.40
ECs_2071	<i>narG</i>	硝酸还原酶	2.24
ECs_3606	<i>cysD</i>	硫酸腺苷基转移酶亚基 2	2.12
ECs_2097	<i>gadC</i>	谷氨酸: γ -氨基丁酸(GABA)逆向转运	1.85
ECs_1416	<i>csgE</i>	Curli 生产装配/运输组件(<i>csgE</i>)	1.44
ECs_2098	<i>gadA</i>	谷氨酸脱羧酶	1.26
ECs_1741	<i>adhE</i>	乙醛脱氢酶/醇脱氢酶	1.18
ECs_5115	<i>cadC</i>	<i>cad</i> 操纵子的转录激活因子	0.37
ECs_1451	<i>flgB</i>	鞭毛基体棒蛋白(FlgB)	-3.51
ECs_5113	<i>cadA</i>	赖氨酸脱羧酶	-3.40
ECs_1452	<i>flgC</i>	鞭毛基体棒蛋白(FlgC)	-2.04
ECs_3882	<i>hybO</i>	氢化酶小亚基	-1.53
ECs_5114	<i>cadB</i>	赖氨酸脱羧酶	-1.49
ECs_3540	<i>proV</i>	甘氨酸甜菜碱/脯氨酸运输系统 ATP 结合蛋白	-1.39
ECs_1457	<i>flgH</i>	鞭毛 L 环蛋白前体(flglH)	-1.34
ECs_2590	<i>flhB</i>	鞭毛生物合成蛋白(flhB)	-1.28
ECs_5097	<i>adiC</i>	精氨酸: 胍基丁胺转运体	-1.25
ECs_1454	<i>flgE</i>	鞭毛钩蛋白(FlgE)	-1.14
ECs_4725	<i>wzxE</i>	肠杆菌共同抗原翻转酶	-1.08
ECs_3436	<i>rseC</i>	sigma-E 因子负调控蛋白(<i>rseC</i>)	-1.06
ECs_5099	<i>adiA</i>	精氨酸脱羧酶	-0.83

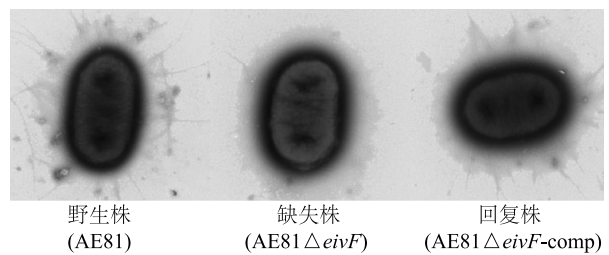


图 1 禽致病性大肠杆菌 AE81 的鞭毛形态($\times 10\ 000$)

Fig.1 Flagellum morphology of avian pathogenic *Escherichia coli* AE81($\times 10\ 000$)

2.3 禽致病性大肠杆菌 AE81 的 rdar(红色、干燥、粗糙)形态

如图 2 所示,在 CR 培养基上,AE81、AE81 Δ *eivF* 和 AE81 Δ *eivF*-comp 3 种菌株菌落形态均无差异,均呈现 rdar(红色、干燥、粗糙)表型,说明这 3 株菌产生 Curli 菌毛和纤维素^[22],缺失 *eivF* 基因不会影响 AE81 菌毛和纤维素合成的能力。

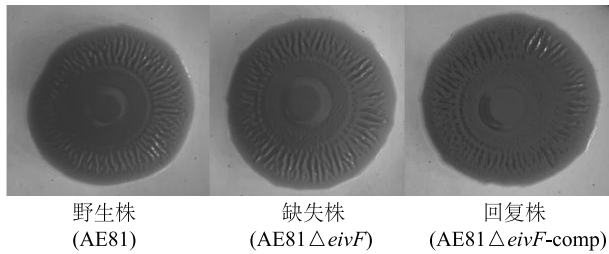
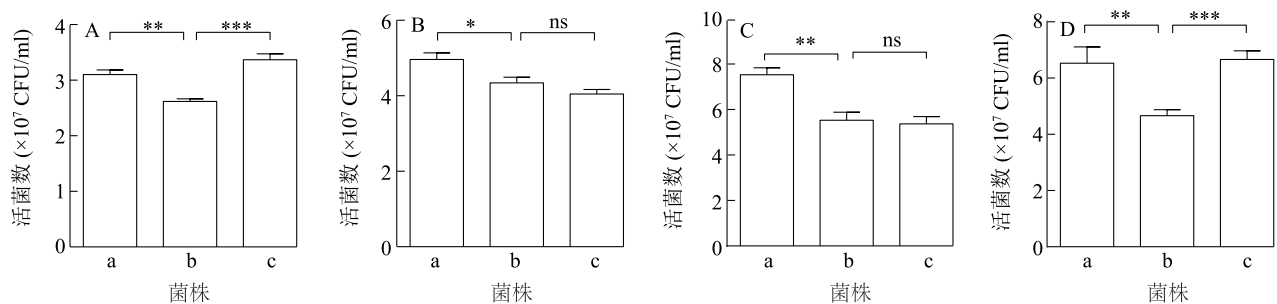


图2 禽致病性大肠杆菌 AE81 的 Curli 菌毛合成能力比较
Fig.2 Comparison of the synthetic ability of Curli pili of avian pathogenic *Escherichia coli* AE81



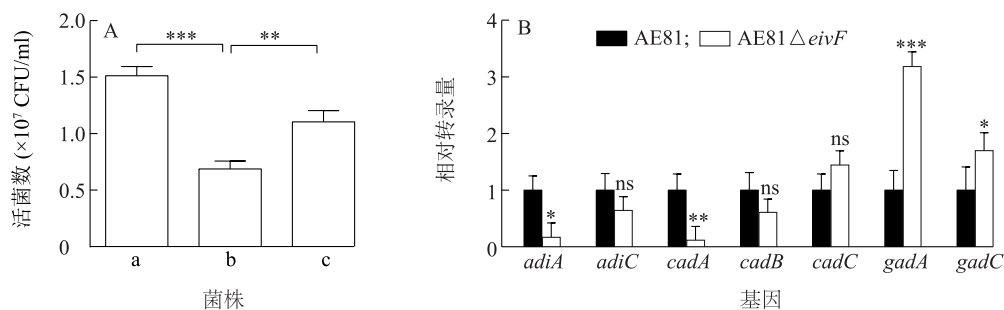
A:碱性(pH=10);B:氧化应激(10 mmol/L H₂O₂);C:高渗透压(4.8 mol/L NaCl);D:高热(54 °C)。a:野生株(AE81);b:缺失株(AE81 $\Delta eivF$);c:回复株(AE81 $\Delta eivF$ -comp)。*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$),***表示差异极显著($P<0.001$),ns表示差异不显著。

图3 AE81在酸性、氧化应激、高渗、高热条件下的存活情况

Fig.3 Survival condition of AE81 under acid, oxidative stress, hyperosmosis and high temperature

2.5 转录因子 EivF 对 APEC 抗酸能力的影响

在酸胁迫下,与野生株 AE81 比较,缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 存活率(活菌数)极显著降低($P<0.001$),回复株有所回升;RT-qPCR 结果显示,在酸胁迫下耐酸基因 *adiA*、*adiC*、*cadA*、*cadB* 均下调表达,*cadC*、*gadA*、*gadC* 均上调表达(图4)。表明转录因子 EivF 影响 APEC 的耐酸能力。



A:酸性(pH=4.0)条件下的活菌数;B:酸胁迫下的 RT-qPCR 数据。a:野生株(AE81);b:缺失株(AE81 $\Delta eivF$);c:回复株(AE81 $\Delta eivF$ -comp)。*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$),***表示差异极显著($P<0.001$),ns表示差异不显著。

图4 禽致病性大肠杆菌 AE81 的耐酸能力

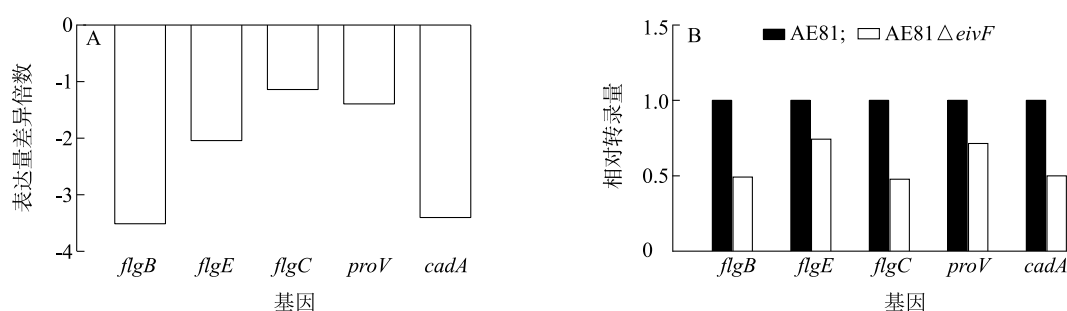
Fig.4 Acid resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* AE81

2.4 转录因子 EivF 对禽致病性大肠杆菌 AE81 环境耐受能力的影响

如图3所示,在碱性(pH=10)、氧化应激(10 mmol/L H₂O₂)、高渗透压(4.8 mol/L NaCl)、高热(54 °C)环境中 AE81 的存活率显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)低于野生株,碱性、高热环境下回复株的存活率有所回升,表明转录因子 EivF 影响 APEC 的环境耐受能力。

2.6 转录因子 EivF 的缺失对 AE81 鞭毛和环境耐受基因转录水平的影响

图5的转录组数据显示,鞭毛相关基因 *flgB*、*flgE*、*flgC* 下调表达,环境耐受相关基因 *proV*、*cadA* 下调表达,qRT-PCR 结果与转录测序结果一致,说明转录组数据可信,基因 *eivF* 的缺失影响其鞭毛和环境耐受基因的转录。



A:不同基因的差异表达倍数;B:不同基因的相对转录量。

图5 AE81 鞭毛和环境耐受基因的转录水平

Fig.5 Transcription levels of flagella and environmental tolerant genes of AE81

3 讨论

APEC 作为典型的肠道外致病菌,具有促使细菌远离外界不利环境的运动系统,还具备抵抗外界不良环境的能力。ETT2 是大肠杆菌重要的毒力岛,其转录因子参与调控 LEE 毒力岛基因的表达^[7,14],目前还未见 ETT2 转录因子 EivF 对 APEC 鞭毛组装和不良环境存活影响的报道。本研究结果表明,缺失 ETT2 毒力岛的转录因子 *eivF* 基因将减弱 APEC 鞭毛的形成能力,降低其在不良环境中的存活率。本研究初步探讨了转录因子 EivF 对 APEC 运动能力及环境耐受的影响,研究结果可以为深入研究禽致病性大肠杆菌致病机制和禽大肠杆菌病的防治提供参考。

鞭毛是细菌的运动装置,当细菌受到外界刺激时,鞭毛驱使细菌躲避不良环境,同时还能定植于宿主细胞引起感染^[23]。ETT2 转录因子 YqeI 影响 APEC 鞭毛形成能力^[15],*eivC* 的缺失导致 APEC 鞭毛减少^[24]。在本研究中,*eivF* 基因不影响细菌 *rdar* 形态,影响 APEC 鞭毛的形态。*flgB* 和 *flgE* 基因参与细菌鞭毛组成。*flgB* 是鞭毛复合体 MS 环上亚基,介导从 MS 环到杆的扭矩传递,可克服电机旋转结构和螺旋结构之间的对称不匹配^[25];*flgE* 参与编码鞭毛环蛋白^[26]。转录组数据中与鞭毛组装相关的基因 *flgB*、*flgE*、*flgH*、*flgC* 等的表达量均下调。RT-qPCR 结果显示,基因 *flgB*、*flgE*、*flgC* 也表现出明显下调表达,猜测转录因子 EivF 可能通过调控 *flgB*、*flgE*、*flgC* 等基因,进而影响细菌鞭毛组装过程。

细菌在感染过程中,除通过鞭毛运动远离不良

环境、定植机体外,还必须快速响应外界环境变化,以促进其在局部微环境或宿主细胞中的适应和生存。本研究结果表明,*eivF* 基因参与 APEC 在酸性、碱性、氧化应激、渗透压和高温等不良环境中存活情况的调控。转录组数据显示,*hybO*、*wzxE*、*proV*、*rseC* 等均下调表达。*hybO* 基因参与还原型辅酶 II (NADPH) 合成,NADPH 在细胞代谢、生物合成和氧化应激反应中起着至关重要的作用^[27-28]。*proV* 编码脯氨酸运输系统 ATP 结合蛋白以应对高渗透条件,增强细菌的存活能力^[29-30]。猜测转录因子 EivF 正调控 *hybO*、*wzxE*、*proV* 等基因的表达,从而促进 APEC 在不良环境中存活。

细菌引起机体感染,需要突破机体免疫系统,而这会使细菌暴露在酸性环境中。细菌主要依赖氨基酸脱羧酶系统来中和细胞内酸性,快速适应酸性环境^[31]。相关研究结果表明,精氨酸/胍丁胺和赖氨酸/1,5-戊二胺系统有助于沙门氏菌适应酸性环境,细菌通过逆向转运体(*adiC* 和 *cadB*)将精氨酸脱羧成胍丁胺和赖氨酸,这个过程消耗细胞中质子,从而调节胞内 pH^[32]。RT-qPCR 结果显示,在酸胁迫条件下,缺失株 AE81 $\Delta eivF$ 的基因 *adiA*、*adiC*、*cadA*、*cadB* 表达量下调,而 *gadA*、*gadC* 表达量上调,猜测原因可能是转录因子 EivF 能够正向调控 *adiA*、*adiC*、*cadA*、*cadB*,进而促进细菌适应酸性环境。本研究初步探讨了转录因子 EivF 对 APEC 的鞭毛组装和环境耐受能力的影响,*eivF* 的缺失使得细菌鞭毛数量减少,对不良环境的耐受力减弱。

参考文献:

- [1] JOHNSON J R, RUSSO T A. Extraintestinal pathogenic *Escherich-*

- ia coli*: "The other bad *E. coli*" [J]. Journal of Laboratory & Clinical Medicine, 2002, 139(3): 155-162.
- [2] WANG S, NIU C, SHI Z, et al. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Infect Immun, 2011, 79(1): 279-287.
- [3] 马兴树, 范翠蝶, 夏玉龙. 禽致病性大肠杆菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 169-174.
- [4] TIVENDALE K A, LOGUE C M, KARIYAWASAM S, et al. 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[J]. Infect Immun, 2010, 78(8): 3412-3419.
- [5] PERNA N T, PLUNKETT G, BURLAND V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Nature, 2001, 409(6819): 529-533.
- [6] 尹磊, 祁克宗, 宋祥军, 等. 大肠杆菌Ⅲ型分泌系统2毒力岛研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 3031-3037.
- [7] LUZADER D H, WILLSEY G G, WARGO M J, et al. The type three secretion system 2-encoded regulator EtrB modulates enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene expression[J]. Infection & Immunity, 2016, 84(9): 2555-2565.
- [8] HÜTTENER M, DIETRICH M, PAYTUBI S, et al. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042 [J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 268.
- [9] SHAOHUI W, XUAN X, XIN L, et al. *Escherichia coli* type III secretion system 2 regulator EtrA promotes virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Microbiology, 2017, 163(10): 1515-1524.
- [10] 肖亚婷, 傅丹丹, MUHAMMAD A R, 等. Ⅲ型分泌系统2转录因子 YqeI 对禽致病性大肠杆菌生物被膜调控机制的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(12): 2488-2497.
- [11] 王泽平, 李倩文, 尹磊, 等. 大肠杆菌三型分泌系统2转录调节因子 EtrA 对禽致病性大肠杆菌致病性的影响[J]. 微生物学通报, 2020(5): 1515-1523.
- [12] 傅丹丹, 肖亚婷, 薛媚, 等. 禽致病性大肠杆菌 ETT2 转录因子 *eivF* 缺失株的生物学特性及转录组学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(8): 28-36.
- [13] PRAGER R, BAUERFEIND R, TIETZE E, et al. Prevalence and deletion types of the pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli* strains from oedema disease and colibacillosis in pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 99(3/4): 287-294.
- [14] ZHANG L, CHAUDHURI R R, CONSTANTINIDOU C, et al. Regulators encoded in the *Escherichia coli* Type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 [J]. Infection and Immunity, 2004, 72(12): 7282-7293.
- [15] XUE M, RAHEEM M A, GU Y, et al. The KdpD/KdpE two-component system contributes to the motility and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Research in Veterinary Science, 2020, 131: 24-30.
- [16] HELMY Y A, DEBLAIS L, KASSEM I I, et al. Novel small molecule modulators of quorum sensing in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [J]. Virulence, 2018, 9: 1640-1657.
- [17] JIANG F, AN C, BAO Y, et al. ArcA controls metabolism, chemotaxis, and motility contributing to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Infection & Immunity, 2015, 83(9): 3545-3554.
- [18] CRÉPIN S, LAMARCHE M G, GARNEAU P, et al. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 568.
- [19] FLECHARD M, CORTES M, REPERANT M, et al. New role for the *ibeA* gene in H₂O₂ stress resistance of *Escherichia coli* [J]. Journal of bacteriology, 2012, 194(17): 4550-4560.
- [20] WANG S, BAO Y, MENG Q, et al. *IbeR* facilitates stress-resistance, invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119698.
- [21] RMLING U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae* [J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2005, 62(11): 1234-1246.
- [22] CIMDINS A, SIMM R. Semiquantitative analysis of the red, dry, and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* using Congo Red [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1657: 225-241.
- [23] PRÜB B M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development [J]. Bacteriol, 2017, 199(18): e00259-17.
- [24] WANG S, LIU X, XU X, et al. *Escherichia coli* Type III secretion system 2 ATPase EivC is involved in the motility and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2016, 31: 1387.
- [25] TAN J X, ZHANG X, WANG X F, et al. Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor [J]. Cell, 2021, 184(10): 2665-2679.
- [26] KOMEDA Y, ONO N, KAGAWA H. Synthesis of flagellin and hook subunit protein in flagellar mutants of *Escherichia coli* K12 [J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1984, 194(1/2): 49-51.
- [27] PINSKE C, KRÜGER S, SOBOH B, et al. Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli* is dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small subunit [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(12): 893-903.

- [28] SPIELMANN A, BAUMGART M, BOTT M. NADPH-related processes studied with a SoxR-based biosensor in *Escherichia coli* [J]. Microbiologyopen, 2018, 25: e785.
- [29] MAY G, FAATZ E, LUCHT J M, et al. Characterization of the osmoregulated *Escherichia coli* proU promoter and identification of ProV as a membrane-associated protein [J]. Molecular Microbiology, 2010, 3(11): 1521-1531.
- [30] SCHIEFNER A, BREED J, BOSSER L, et al. Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(7): 5588-5596.
- [31] SEN H, AGGARWAL N, ISHIONWU C, et al. Structural and functional analysis of the *Escherichia coli* acid-sensing histidine kinase EvgS [J]. Journal of Bacteriol, 2017, 22: e00310-17.
- [32] GAVRIIL A, PARAMITHIOTIS S, SKORDAKI A, et al. Prior exposure to different combinations of pH and undissociated acetic acid can affect the induced resistance of *Salmonella* spp. strains in mayonnaise stored under refrigeration and the regulation of acid-resistance related genes [J]. Food Microbiol, 2021, 95: 103680.

(责任编辑:张震林)