

## 禽病原性大肠杆菌 *iro* 和 *tsh* 基因缺失株的构建

陈祥, 刘静, 高崧, 潘志明, 焦新安, 刘秀梵

扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室/江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009

**摘要:** 通过 SSH 和 SCOTS 研究, 铁系统(*Iro*)和温度敏感性血凝素(*Tsh*)在禽病原性大肠杆菌(APEC)的感染中可能发挥重要作用。基因检测发现, 在 243 个禽源大肠杆菌分离株中, 有 205 株为 *iro*+菌株, 其中高、中度和低致病株分别为 89.8%(184/205)、8.8%(18/205)和 1.5%(3/205); 有 167 株为 *tsh*+菌株, 高、中度、低致病株分别为 87.4%(146/167)、12.6%(21/167)和 0%(0/167), 结果显示 *iro*+或 *tsh*+株大多数为高致病株。为了确定 *iro* 和 *tsh* 基因在 APEC 致病力中的作用, 以 APEC E037 株为基础, 通过自杀性载体分别构建了 *iro* 和 *tsh* 基因缺失突变株 E037( $\Delta$ *iro*)、E037( $\Delta$ *tsh*)和 E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*)。动物感染性试验表明, 突变株在鸡体内的繁殖能力和致病性均明显下降, 但两个基因的协同致病作用不显著。进一步证实 *Iro* 和 *Tsh* 为 APEC 重要的致病因子。*

**关键词:** 禽病原性大肠杆菌, 铁系统, 温度敏感性血凝素, 缺失突变株

## Construction and Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Mutants with *iro* and/or *tsh* Gene Mutation

Xiang Chen, Jing Liu, Song Gao, Zhiming Pan, Xin'an Jiao and Xiufan Liu

Animal Infectious Disease Laboratory of Ministry of Agriculture, Jiangsu Key Laboratory of Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** *Iro* system and temperature-sensitive hemagglutinin (*Tsh*) genes were identified by suppression subtractive hybridization (SSH) and selective capture of transcribed sequences (SCOTS). To get more insights in the distribution and the occurrence of the *iroC* and *tsh* genes, we examined 243 avian *E. coli* strains for the presences of the these genes. Among 243 avian *E. coli* isolates, *iroC* gene was present in 84.4% strains (205/243). Of the 205 *iroC*-positive isolates, *iroC* gene was found in 184 (89.8%), 18(8.8%) and 3 (1.5%) isolates with high, intermediate and low pathogenicity, respectively. Of the 167 *tsh*-positive isolates, *tsh* gene was detected in 146 (87.4%), 21 (12.6%) and 0 (0%) isolates with high, intermediate and low pathogenicity, respectively. Among *tsh*-positive isolates, 89.5 to 100% of the highly pathogenic isolates of O1, O2 or O78 serogroups had the *tsh* gene, while 53.3% of the highly pathogenic isolates of non-O1, O2 and O78 serogroups had the *tsh* gene ( $P<0.01$ ). Suicide vectors for deletion of the *iroBCDEN* or *tsh* genes were constructed as follows. The 715-bp fragments of *iroB* and 603-bp fragment of the *iroN* were generated by PCR respectively. Both of these two fragments together with EGFP gene were cloned into pUC18, termed pUC18-*iroBNEGFP*. A resultant suicide vector containing the *iroB*-EGFP-*iroN* fragment was obtained and named pMEG375-*iroBNEGFP*. Similarly, both of the 685-bp fragment of *tshF* and the 692-bp fragment of the *tshR* together with gentamycin gene were cloned into pUC18, resulting in pUC18-*tshFRGm*. A resultant suicide vector containing the *tshF*-Gm-*tshR* fragment was named pMEG375-*tshFRGm*. Mutant derivatives of strain E037 were generated by allelic replacements and were named E037( $\Delta$ *iro*), E037( $\Delta$ *tsh*) and E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*). The 50% lethal dose (LD50) of*

**Received:** July 24, 2007; **Accepted:** August 18, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30471281, 30771604), Chinese National Programs for High Technology and Development (No. 2003AA222141).

**Corresponding author:** Song Gao. Tel: +86-514-87991448; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30471281, 30771604)和国家“863计划”(No. 2003AA222141)资助。

E037, E037( $\Delta$ iro), E037( $\Delta$ tsh) and E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh) in commercial day-old chickens experimentally inoculated via intratrachea were determined to be  $10^{5.6}$ ,  $10^{8.4}$ ,  $10^{9.0}$  and  $10^{9.5}$ CFU, respectively. In the chicken challenging model, the mutants were tested to determine the individual role of this system for virulence and persistence in chickens. The result suggested that Iro system and Tsh were important in the pathogenicity of APEC.

**Keywords:** avian pathogenic *Escherichia coli*, iro system, temperature-sensitive hemagglutinin, mutant

禽大肠杆菌病(Avian colibacillosis)指由禽病原性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)所引起的传染病,常引起局部或全身感染,是鸡、鸭、鹅和火鸡等禽类的一种常见传染病。部分 APEC 菌株基因组与人的尿道致病性大肠杆菌(Uropathogenic *E. coli*, UPEC)非常相似,提示部分 APEC 菌株可能是一种食源性病原微生物及人泌尿系统感染 UPEC 的来源,显示其重要的公共卫生意义<sup>[1]</sup>。禽大肠杆菌血清型复杂多样,世界许多地方都开展了禽病原性大肠杆菌血清型的调查工作,O78 为最优势的血清型<sup>[2]</sup>,近年来从我国分离的 1351 株禽源大肠杆菌中,O78 血清型有 271 株,占分离菌株的 20.1%,为最主要的血清型<sup>[3]</sup>。

禽大肠杆菌病致病机理复杂,许多毒力因子功能尚不清楚,本文以我国分离的 APEC E037 株(O78 血清型)获得的 SSH 差异片段和 SCOTS 体内转录序列为基础<sup>[4,5]</sup>,选取铁系统(Iro system, Iro)和温度敏感性血凝素(Temperature-sensitive hemagglutinin, Tsh)为研究对象,分别构建了 *iro* 和 *tsh* 基因缺失突变株 E037( $\Delta$ iro)、E037( $\Delta$ tsh)和 E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh),并初步研究了突变株的致病性,为深入研究 *iro* 和 *tsh* 基因的功能及研制肠道外感染大肠杆菌基因工程疫苗提供了有益尝试。

## 1 材料

### 1.1.1 菌株和质粒

本试验所用的菌株和质粒见表 1。

### 1.1.2 试剂和溶液

DNA 限制性内切酶、连接酶、*Taq* 酶、X-gal、IPTG 购自 Promega 公司;DNA marker 为大连 TaKaRa 和 Fermentas 公司产品;D-环丝氨酸购自 Sigma 公司;PCR 产物纯化试剂盒由大连 TaKaRa 公司提供;实验所用抗生素工作浓度为:氨苄青霉素(Ap)100  $\mu$ g/mL,链霉素(Sm)100  $\mu$ g/mL,氯霉素(Cm)30  $\mu$ g/mL,卡那霉素(Km)50  $\mu$ g/mL,庆大霉素(Gm)20  $\mu$ g/mL;10%的蔗糖培养基按已报道的方法<sup>[3]</sup>

配制。

### 1.2 禽大肠杆菌分离株 *iro*、*tsh* 基因的检测

受试的 243 个禽大肠杆菌分离株由本室分离和鉴定<sup>[3]</sup>。细菌 DNA 模板的制备按全菌裂解法进行<sup>[6]</sup>。运用表 1 中引物 Iro-1/2、Tsh-1/2 进行 *iroC*、*tsh* 基因的检测。

### 1.3 缺失株目的基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 中发表的序列,分别设计了针对 *iro*、*tsh*、EGFP 和 Gm 基因的 8 对特异性引物(表 1),引物 IroB-F/R、IroN-F/R、GFP-1/2、GM-1/2、TshF-1/2、TshR-1/2、Iro-1/2 和 Tsh-1/2 的扩增目的片段大小分别为 715、603、900、588、685、692、800 和 660 bp。

### 1.4 细菌固相交配和氯霉素富集法

采用固相滤膜杂交方法进行细菌交配<sup>[7]</sup>。氯霉素富集法主要按已报道的方法<sup>[8]</sup>进行。筛选出的 *iro*、*tsh* 基因缺失株分别命名为 E037( $\Delta$ iro)、E037( $\Delta$ tsh)和 E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)株。

### 1.5 缺失株半数致死量的测定和致病性试验

1 日龄罗曼商品代蛋鸡购自江苏省扬州市高邮种鸡场,将 170 羽 1 日龄罗曼商品代蛋鸡随机分为 17 组,每组 10 只,分别气管接种 E037、E037( $\Delta$ iro)、E037( $\Delta$ tsh)和 E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh),每组攻毒剂量分别为  $10^{10}$ 、 $10^8$ 、 $10^6$  和  $10^4$ CFU/羽,病变观察和细菌分离鉴定按文献报道的方法<sup>[3]</sup>进行,以 Karber 法计算 LD<sub>50</sub>。另设 1 组为健康对照组。

SPF 鸡由山东家禽所 SPF 种蛋自行孵化,将 50 羽 15 日龄白来航 SPF 鸡随机分为 5 组,隔离饲养,右胸气囊分别接种 E037、E037( $\Delta$ iro)、E037( $\Delta$ tsh)和 E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)株 0.1 mL( $10^8$  CFU/mL);在感染后 6、24 和 48h 分别剖杀 SPF 鸡,每次剖杀 3、3 和 4 只,无菌采集血液、心脏、肝脏、脾脏、左肺、肾脏进行细菌学检查,细菌分离鉴定按已报道的方法<sup>[3]</sup>进行。同时对感染后 48 h 扑杀的鸡进行病变评分(由轻到重):气囊病变为 0~4 分、心包病变为 0~2 分、肝脏病变为 0~2 分<sup>[9]</sup>。

表 1 试验所用菌株、质粒和引物  
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

	Genotypes and phenotypes	Sources or references
<b>Strains</b>		
SM10 $\lambda$ pir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc:Mu, Km<sup>R</sup>, <math>\lambda</math>pir</i>	[10]
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu araD <math>\Delta</math>lac X74 galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1, <math>\lambda</math>pir</i> )	[10]
E037	Wild-type avian <i>E.coli</i> serotype O78, Sm <sup>R</sup>	[4]
CC118-2	CC118 (pMEG375- <i>iro</i> BNEGFP), Cm <sup>R</sup>	This work
CC118-3	CC118 (pMEG375- <i>tsh</i> FRGm), Cm <sup>R</sup>	This work
SM10-2	SM10 (pMEG375- <i>iro</i> BNEGFP), Sm <sup>S</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	This work
SM10-3	SM10 (pMEG375- <i>tsh</i> FRGm), Cm <sup>R</sup>	This work
E037-2	E037 (pMEG375- <i>iro</i> BNEGFP), Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup>	This work
E037-3	E037 (pMEG375- <i>tsh</i> FRGm), Cm <sup>R</sup>	This work
E037-4	E037( $\Delta$ iro) (pMEG375- <i>tsh</i> FRGm), Cm <sup>R</sup>	This work
E037 ( $\Delta$ iro)	Stable $\Delta$ iro mutants of E037, Sm <sup>R</sup> , sacR <sup>R</sup> , Cm <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup>	This work
E037 ( $\Delta$ tsh)	Stable $\Delta$ tsh mutants of E037, Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , sacR <sup>R</sup> , Cm <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup>	This work
E037 ( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)	$\Delta$ iro $\Delta$ tsh double mutant of E037, Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , sacR <sup>R</sup> , Cm <sup>S</sup>	This work
<b>Plasmids</b>		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K, Cm<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup></i>	[10]
pUC18	Ap <sup>R</sup> , $\alpha$ -lac/MCS	Promega
pUC18- <i>iro</i> BNEGFP	pUC18:: $\Delta$ iroBCDEN:: EGFP, Ap <sup>R</sup>	This work
pUC18- <i>tsh</i> FRGm	pUC18:: $\Delta$ tsh:: Gm, Ap <sup>R</sup>	This work
pMEG375- <i>iro</i> BNEGFP	pMEG-375:: $\Delta$ iroBCDEN:: EGFP, Cm <sup>R</sup>	This work
pMEG375- <i>tsh</i> FRGm	pMEG-375:: $\Delta$ tsh:: Gm, Cm <sup>R</sup>	This work
pGEM-T <sup>®</sup> Easy Vector	TA cloning Vector, Ap <sup>R</sup>	Promega
pCR <sup>®</sup> 2.1 Vector	TA cloning Vector, Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Invitrogen
pEGFP	EGFP gene, Ap <sup>R</sup>	BD Clontech
pFastBac	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Invitrogen
<b>Primers</b>		
GM-1	5' -gg <u>tctaga</u> gaacga attgtt aggtgg c-3' ( <i>Xba</i> I site underlined)	pFastBac
GM-2	5' -ga <u>ctgcag</u> cgatgt ttgatg ttatgg-3' ( <i>Pst</i> I site underlined)	pFastBac
TshF-1	5' - cc <u>ggatcc</u> ttattc tcttcg ctacag-3' ( <i>Bam</i> HI site underlined)	AF218073
TshF-2	5' - ga <u>tctaga</u> gatgac aggcta cgcaca g-3' ( <i>Xba</i> I site underlined)	AF218073
TshR-1	5' - t <u>tctaga</u> ttaact gaccac tatacc-3' ( <i>Xba</i> I site underlined)	AF218073
TshR-2	5' - a <u>gcatgc</u> agagcg ttcaac ttcc-3' ( <i>Sph</i> I site underlined)	AF218073
Tsh-1	5' - aga aca tcg gaa ggt ggt gc-3'	AF218073
Tsh-2	5' - cag ggc ata gtc cag cgt ga-3'	AF218073
IroB-F	5' -ctc <u>ggatcc</u> ctatgg gctgtt gta-3' ( <i>Bam</i> HI site underlined)	AF449498
IroB-R	5' -ta <u>ctgcag</u> gcagga tgatct cgg-3' ( <i>Pst</i> I site underlined)	AF449498
IroN-F	5' -aac <u>gcatgc</u> tcctgg ttgggt tgaata-3' ( <i>Sph</i> I site underlined)	AF449498
IroN-R	5' -aaa <u>ctgcag</u> cagcca gaggcc cacta-3' ( <i>Pst</i> I site underlined)	AF449498
GFP-1	5' -at <u>gacgtc</u> gagcgc aacga attaat-3' ( <i>Aat</i> II site underlined)	BD Clontech
GFP-2	5' -gca <u>ctgcag</u> ttact tgtaca gctcgt c-3' ( <i>Pst</i> I site underlined)	BD Clontech
Iro-1	5' -gca gtt atc agg gat tgt cg-3'	AF449498
Iro-2	5' -gct gtt cgt ggg ttc cgt at-3'	AF449498

## 1.6 统计分析

两尾 Fisher's exact 检验进行组间差异分析。

用 SPSS 10.0 for windows 软件中的卡方检验和

## 2 结果

### 2.1 禽源分离株 *iro*、*tsh* 基因的 PCR 检测结果

对 243 株禽源大肠杆菌进行 *iroC*、*tsh* 基因的检测和致病性试验, 其中 205 株(84.4%)大肠杆菌 *iroC* 基因阳性, 有 167 株(68.7%)大肠杆菌 *tsh* 基因阳性。在 205 株 *iroC* 基因阳性的分离株中, 高、中等和低致病株分别为 89.8%、8.8%和 1.5%, 高致病与低致病株出现频率差异极显著( $P < 0.01$ ); 不同血清型 *iro*<sup>+</sup> 分离株之间在高、中等或低致病株中差异不明显(表

2)。提示 *iro*<sup>+</sup> 株大多数为高致病株, 且跟血清型的种类关系并不密切。在 167 株 *tsh* 基因阳性的禽源分离株中, 高、中等和低致病株分别为 87.4%、12.6%和 0%, 高致病株出现频率显著高于低致病株, 差异极显著( $P < 0.01$ ); 在不同血清型 *tsh*<sup>+</sup> 分离株中, O1、O2、O78 血清型分离株的高致病性菌株占所在血清型分离株的 89.5%~100%, 而其它血清型分离株的高致病株仅占其它分离株的 53.3%, 差异极显著( $P < 0.01$ ) (表 3)。结果提示 *tsh*<sup>+</sup> 株大多数为高致病性菌株, *tsh*<sup>+</sup> 株的致病性与血清型的种类有一定的相关性。

表 2 205 株 *iro*<sup>+</sup> 禽源分离株的血清型和致病性的关系

Table 2 Relationship between pathogenicity for 1-day-old chicks and the presence of *iroC* gene in avian *E. coli* isolates

Serogroups	Numbers	Percentage in 205 <i>iroC</i> -positive isolates		
		High-pathogenicity	Intermediate-pathogenicity	Low-pathogenicity
Total	205	89.8 (184/205)	8.8 (18/205)	1.5 (3/205)
O78	124	87.9 (109/124)	10.5 (13/124)	1.6 (2/124)
O2	46	91.3 (42/46)	6.5 (3/46)	2.2 (1/46)
O1	12	91.7 (11/12)	8.3 (1/12)	0 (0/12)
Non-O1, O2, O78	23	95.7 (22/23)	4.3 (1/23)	0 (0/23)

表 3 167 株 *tsh*<sup>+</sup> 禽源分离株的血清型和致病性的关系

Table 3 Relationship between pathogenicity for 1-day-old chicks and the presence of *tsh* gene in avian *E. coli* isolates

Serogroups	Numbers	Percentage in 167 <i>tsh</i> -positive isolates		
		High-pathogenicity	Intermediate-pathogenicity	Low-pathogenicity
Total	167	87.4 (146/167)	12.6 (21/167)	0
O78	114	89.5 (102/114)	10.5 (12/114)	0
O2	30	93.3 (28/30)	6.7 (2/30)	0
O1	8	100 (8/8)	0 (0/8)	0
Non-O1, O2, O78	15	53.3 (8/15)	46.7 (7/15)	0

### 2.2 *iroB*、*iroN* 和 EGFP 基因的克隆

通过 PCR 技术, 分别扩增 *iroB* 和 *iroN* 基因(以 E037 株 DNA 为模板), 大小分别为 715 bp 和 603 bp。将扩增到的 2 种片段分别克隆到 pUC18 中, 得到 pUC18-*iroBN*。pEGFP 载体用 *Hind*III 和 *Kpn*I 酶切补平后连接, 通过 GFP-1/2 引物 PCR 扩增 pEGFP 载体上约 900 bp 的 EGFP 片段(含启动子, 不含多克隆位点), 使其克隆到 pGEM-T 载体上, 筛选 *Pst* I 位点反向克隆, 在 pUC18-*iroBN* 载体的 *iroB*、*iroN* 片段中间的 *Pst* I 位点上插入 EGFP 片段, 获得重组载体 pUC18-*iroBNEGFP*(图 1 和图 2), 测序结果证实目的基因与 GenBank 中发表的序列

(AF449498)一致。

### 2.3 自杀性载体 pMEG375-*iroBNEGFP* 的构建

将重组载体 pUC18-*iroBNEGFP* 经 *Bam*H I 和 *Sph* I 双酶切后, 回收 *iroB-EGFP-iroN* 片段(大小为 2200 bp 左右), 将该片段克隆到自杀性载体 pMEG-375 的 *Bam*H I 和 *Sph* I 位点中(图 2), 得到 pMEG375-*iroBNEGFP* 重组载体质粒(含有中间缺失的 *iro* 基因), 转化 cc118 受体菌, 获得 cc118-2 重组菌(含有 pMEG375-*iroBNEGFP*), 从中提取并纯化重组质粒 pMEG375-*iroBNEGFP*, 将该质粒转化到 SM10 受体菌中, 获得 SM10-2 重组菌(含 pMEG375-*iroBNEGFP*)。

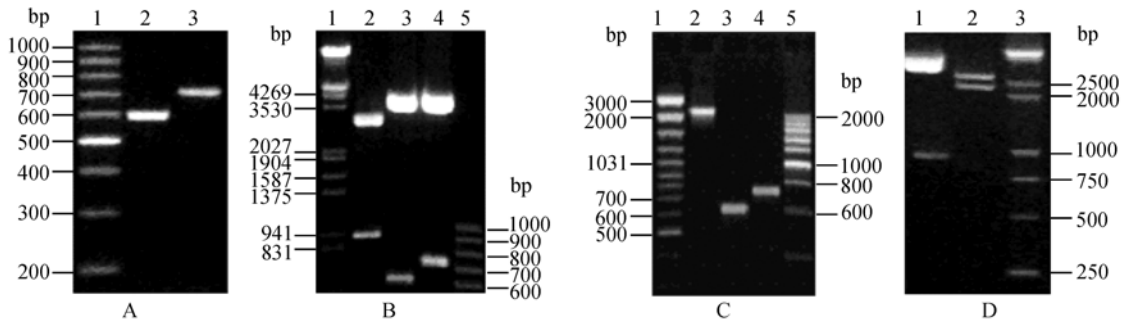


图 1 APEC *iroB*、*iroN* 和 EGFP 基因的克隆与鉴定

Fig. 1 Cloning and identification of *iroB*, *iroN* and EGFP gene

A. 1: 100 bp marker. 2: the amplified fragment of *iroN* gene; 3: the amplified fragment of *iroB* gene.  
 B. 1:  $\lambda$  DNA/*Hind* III+*Eco*R I marker; 2: pT-EGFP digested with *Pst* I; 3: pCR2.1-*iroN* digested with *Sph* I and *Pst* I; 4: pCR2.1-*iroB* digested with *Bam*H I and *Pst* I; 5: 100 bp marker.  
 C. 1: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 2: the amplified products of pUC18-*iroB*NEGFP by *IroB*-F and *iroN*-F primers; 3: the amplified fragment of *iroN* gene of pUC18-*iroB*NEGFP; 4: the amplified fragment of *iroB* gene of pUC18-*iroB*NEGFP PCR; 5: 200 bp marker.  
 D. 1: pUC18-*iroB*NEGFP digested with *Pst* I; 2: pUC18-*iroB*NEGFP digested with *Bam*H I and *Sph* I; 3: DL2000+15000 marker

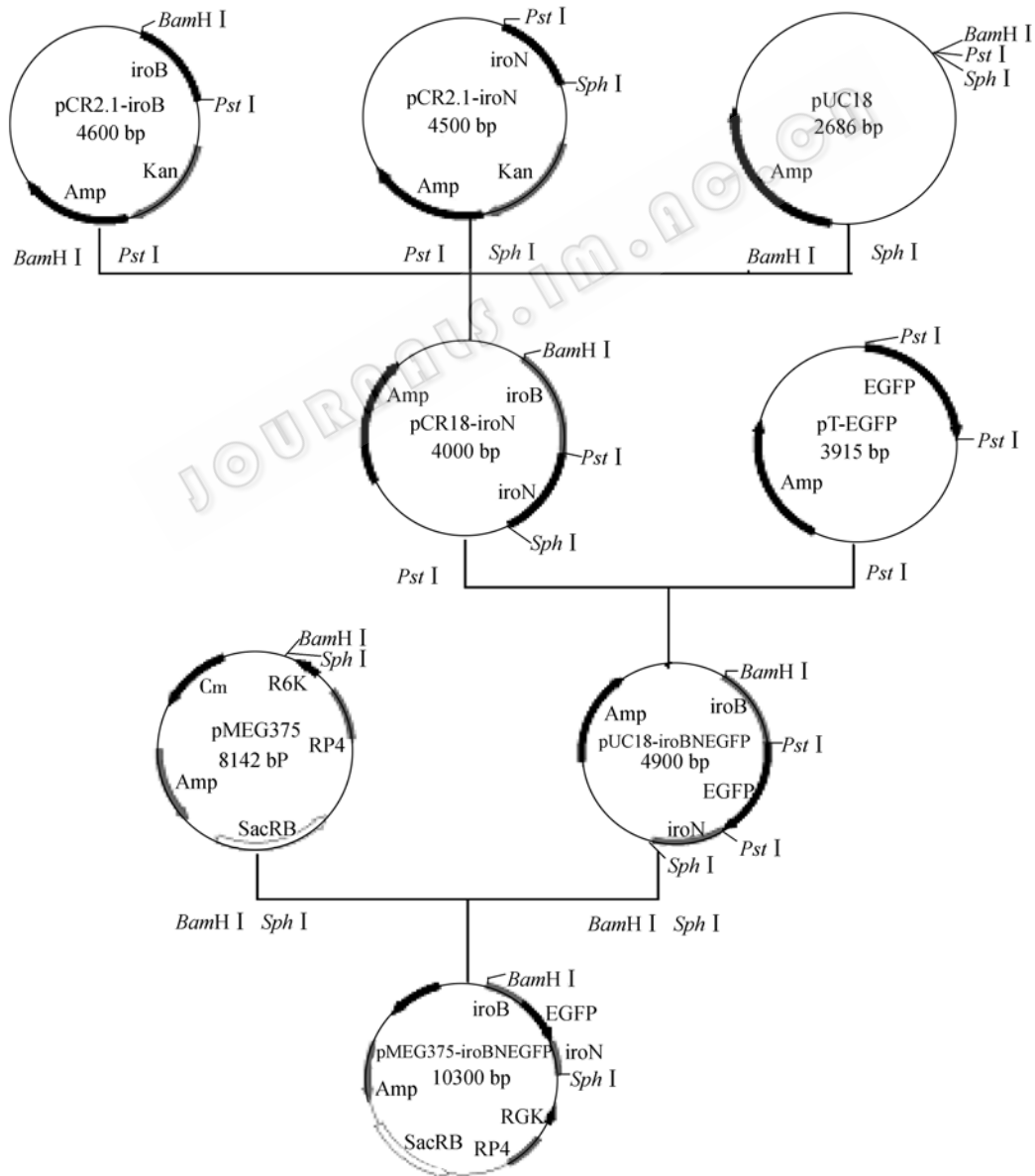


图 2 含 *iroB*-EGFP-*iroN* 突变基因的自杀性载体的构建

Fig. 2 Construction of the suicide transfer plasmid containing the *iroB*-EGFP-*iroN* mutant gene

## 2.4 *iro* 基因缺失突变株的构建和鉴定

分别挑取 E037 和 SM10-2 的单个菌落, 进行细菌固相交配, 获得 E037-2 重组菌(含有 pMEG375-*iro*BNEGFP 质粒的 E037 细菌, 具有  $Sm^R$ 、 $Cm^R$  和  $Km^S$  表型)。将 E037-2 进行氯霉素富集, 在 10% 的  $Sm$  蔗糖平板上筛选氯霉素敏感株, 以 *Iro*-1/2 引物进行 PCR、抗性标志、O 血清型鉴定, 筛选 E037( $\Delta$ *iro*) 基因缺失突变株。将获得的 E037( $\Delta$ *iro*) 株采用 GFP-1/2 和 *iro*-1/2 引物分别进行 PCR 扩增, 结果显示, E037( $\Delta$ *iro*) 和 E037-2 分别扩增出 EGFP 片段, E037 和 E037-2 分别扩增出 *iroC* 片段, 而 E037( $\Delta$ *iro*) 为 *iroC* 阴性, 表明 E037( $\Delta$ *iro*) 已经缺失了 *iro* 基因的中间片段(图 3)。

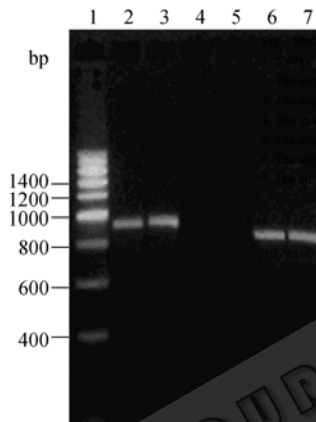


图 3 *iro* 基因缺失突变株的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of E037( $\Delta$ *iro*) by PCR

1: 200 bp marker; 2: the amplified fragment of EGFP gene of E037( $\Delta$ *iro*); 3: the amplified fragment of EGFP gene of E037-2; 4: the amplified fragment of EGFP gene of E037; 5: the amplified fragment of *iro* gene of E037( $\Delta$ *iro*); 6: The amplified fragment of *iro* gene of E037-2; 7: The amplified fragment of *iro* gene of E037

## 2.5 APEC E037 和 E037( $\Delta$ *iro*) 株的 *tsh* 基因缺失株的构建和鉴定

用 PCR 技术分别扩增 *tshF*、*tshR*(以 E037 株 DNA 为模板)和 *Gm* 基因(以 pFastBac 为模板), 其大小分别为 685、692 和 588 bp。分别将 *tshF* 和 *tshR* 克隆到 pUC18 的 *Bam*H I/*Xba* I、*Xba* I/*Sph* I 位点中, 得到 pUC18-*tshFR*, 将 *Gm* 基因克隆到 pCR<sup>®</sup>2.1 载体中, 得到 pCR2.1-*Gm* 载体。然后在 *tshF*、*tshR* 片段的 *Xba*I 位点处插入 *Gm* 片段, 获得重组载体 pUC18-*tshFRGm*。将该重组载体进行 *Bam*H I 和 *Sph* I 双酶切后, 回收 *tshF*-*Gm*-*tshR* 片段(大小为 2000 bp 左右), 将该片段克隆到自杀性载体 pMEG-375 的 *Bam*H I 和 *Sph* I 位点中, 得到重组载体质粒 pMEG375-

*tshFRGm*(含有中间缺失的 *tsh* 基因), 转化 cc118 受体菌, 获得重组菌 cc118-3(含有 pMEG375-*tshFRGm*), 提取重组质粒 pMEG375-*tshFRGm*, 将其转化到 SM10 受体菌中, 获得 SM10-3 重组菌(含 pMEG375-*tshFRGm*)。分别挑取 E037 和 SM10-3 的单个菌落, 进行细菌固相交配, 获得 E037-3, 该菌株的特征是 E037 细菌中含有 pMEG375-*tshFRGm* 质粒, 具有  $Sm^R$ 、 $Cm^R$ 、 $Gm^R$  和  $Km^S$  表型。将含有 pMEG375-*tshFRGm* 质粒的 E037-3 进行氯霉素富集法, 在 10% 的  $Sm$  蔗糖平板上, 筛选氯霉素敏感株, 以 *Tsh*-1/2 PCR、抗性标志、O 血清型筛选和鉴定 E037( $\Delta$ *tsh*) 基因缺失株, 具体构建过程和结果见文献[3]。

以 E037( $\Delta$ *iro*) 株和 SM10-3 进行细菌固相交配获得 E037-4, 通过氯霉素富集法筛选 E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 基因缺失突变株。获得的 E037( $\Delta$ *tsh*) 株和 E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 株具有  $Sm^R$ 、 $Gm^R$ 、 $Km^S$  和  $Cm^S$  表型, 采用 GM-1/2 引物和 *tshF* 上游引物、*tshR* 下游引物分别进行 PCR 扩增, E037( $\Delta$ *tsh*) 和 E037-3 分别扩增出 *Gm* 片段, E037-3 和 E037 分别扩增出 *tsh* 基因片段, 而 E037( $\Delta$ *tsh*) 为 *tsh* 阴性。**

## 2.6 突变株的 LD<sub>50</sub> 和致病性

经测定, E037、E037( $\Delta$ *iro*)、E037( $\Delta$ *tsh*) 和 E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 菌株的 LD<sub>50</sub> 分别为  $10^{5.6}$ 、 $10^{8.4}$ 、 $10^{9.0}$  和  $10^{9.5}$  CFU。3 个突变株的 LD<sub>50</sub> 都有了明显的下降, E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 下降最明显, E037( $\Delta$ *tsh*) 致病性低于 E037( $\Delta$ *iro*), 但 E037( $\Delta$ *tsh*) 与 E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 的致病性差异不显著。***

接种鸡 6 h 后, 突变株 E037( $\Delta$ *iro*) 在心脏和肝脏中的细菌数显著小于野生型菌株 E037( $P < 0.05$ ), E037( $\Delta$ *tsh*) 的细菌数与 E037 相比, 肺和血液中差异显著( $P < 0.05$ ), 在心脏和肝脏中差异极显著( $P < 0.01$ ), E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 突变株的细菌数与 E037 相比, 肺和血液中差异显著( $P < 0.05$ ), 在心脏和肝脏中细菌数显著小于 E037( $P < 0.01$ ), 而 E037 和其突变株在脾脏中均无差异性; E037 和突变株接种鸡 24 h 后, E037( $\Delta$ *iro*) 在肝脏和血液中的细菌数比 E037 显著降低( $P < 0.01$ ), 而在心脏、脾脏和肺中无显著差异性, E037( $\Delta$ *tsh*) 在肺和脾脏中的细菌数比 E037 明显减少( $P < 0.05$ ), 在心脏、肝脏和血液中细菌数差异极显著( $P < 0.01$ ), E037( $\Delta$ *iro $\Delta$ *tsh*) 突变株的细菌数与 E037 相比, 脾脏中差异显著( $P < 0.05$ ), 在心脏、肝脏、肺和**

血液中差异极显著( $P<0.01$ ); E037 和突变株接种鸡 48 h 后, E037( $\Delta$ iro)在肝脏和血液中的细菌数比 E037 明显降低( $P<0.01$ ), 心脏和脾脏中细菌数差异显著( $P<0.05$ ), E037( $\Delta$ tsh)在心脏、肝脏、脾脏和血液中的

细菌数比 E037 明显减少, 差异极显著( $P<0.01$ ), E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)突变株的细菌数与 E037 相比, 心脏、肝脏、脾脏和血液中细菌数显著降低( $P<0.01$ ), 而 E037 和其突变株在肺中无显著差异(表 4)。

表 4 E037 和突变株接种鸡后在内脏器官和血液中的细菌数比较

Table 4 Comparison of ability of APEC strain E037 and its mutants to persist in internal organs and blood samples of chickens experimentally inoculated via the airsacs

Strains	Mean no. of bacteria $\pm$ SD				
	Heart	Liver	Spleen	Lung	Blood
6 h post-inoculation					
E037	5.78 $\pm$ 0.7	5.45 $\pm$ 0.7	5.40 $\pm$ 1.0	6.27 $\pm$ 1.1	4.17 $\pm$ 0.5
E037 ( $\Delta$ iro)	4.21 $\pm$ 0.7*	3.50 $\pm$ 0.9*	5.16 $\pm$ 0.7	6.07 $\pm$ 0.2	3.32 $\pm$ 0.6
E037 ( $\Delta$ tsh)	3.07 $\pm$ 0.9**	2.82 $\pm$ 0.6**	4.73 $\pm$ 0.8	4.87 $\pm$ 0.7*	3.00 $\pm$ 0.7*
E037 ( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)	2.98 $\pm$ 0.6**	2.54 $\pm$ 1.4**	4.72 $\pm$ 0.3	4.83 $\pm$ 0.4*	2.75 $\pm$ 0.5*
24 h post-inoculation					
E037	5.80 $\pm$ 0.5	4.87 $\pm$ 0.8	4.77 $\pm$ 0.4	6.16 $\pm$ 0.3	3.29 $\pm$ 0.3
E037 ( $\Delta$ iro)	4.33 $\pm$ 1.4	2.24 $\pm$ 0.4**	4.05 $\pm$ 0.8	5.41 $\pm$ 0.4	2.09 $\pm$ 0.4**
E037 ( $\Delta$ tsh)	2.15 $\pm$ 1.2**	1.03 $\pm$ 0.1**	2.67 $\pm$ 1.5*	3.73 $\pm$ 0.6*	1.23 $\pm$ 0.4**
E037 ( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)	1.82 $\pm$ 1.4**	1.00 $\pm$ 0.0**	2.17 $\pm$ 1.1*	3.02 $\pm$ 1.7**	1.00 $\pm$ 0.0**
48 h post-inoculation					
E037	4.80 $\pm$ 1.0	4.06 $\pm$ 0.3	4.42 $\pm$ 0.3	5.18 $\pm$ 0.8	2.85 $\pm$ 0.6
E037 ( $\Delta$ iro)	3.24 $\pm$ 0.6*	2.12 $\pm$ 0.2**	2.62 $\pm$ 0.7*	3.67 $\pm$ 0.7	1.47 $\pm$ 0.4**
E037 ( $\Delta$ tsh)	1.44 $\pm$ 0.8**	1.00 $\pm$ 0.0**	1.52 $\pm$ 0.9**	3.50 $\pm$ 2.2	1.17 $\pm$ 0.3**
E037 ( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)	1.00 $\pm$ 0.0**	0.99 $\pm$ 1.0**	1.56 $\pm$ 1.0**	2.84 $\pm$ 1.2	1.13 $\pm$ 0.4**

\*indicates values significantly lower ( $P<0.05$ ) than those observed for strain E037; \*\*indicates values significantly lower ( $P<0.01$ ) than those observed for strain E037; Bacterial counts are presented as the mean log<sub>10</sub> CFU per gram (per milliliter for blood)  $\pm$ standard deviation for 3 birds from each infected group

E037 和突变株接种鸡 48h 后, 对感染鸡的大肠杆菌病变(气囊炎、心包炎和肝周炎)进行评价, 与 E037 相比, 3 个突变株引起轻度气囊炎, 差异极显著( $P<0.01$ ); E037( $\Delta$ iro)引起心包炎的严重程度低于 E037 株, 差异显著( $P<0.05$ ), E037( $\Delta$ tsh)和 E037 ( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)引起心包炎的严重程度明显低于 E037 株, 差异极显著( $P<0.01$ ); 与 E037 相比, 3 个突变株几乎不引起肝周炎, 差异显著( $P<0.05$ )(表 5)。

### 3 讨论

多种细菌都具备从宿主获取铁的能力, 这一能力的大小亦决定着细菌的致病性。近来发现在肠炎沙门氏菌 *iroA* 位置上, 有两个相向的操纵子, 即 *iroN* 和 *iroBCDE*。IroN 被认为是苯磷二酚铁结合性复合物的受体<sup>[11]</sup>。在 UPEC CFT073、UTI89 和 536 株中都存在 *iroBCDEN* 基因簇, 在人的尿道、体液和血液中 IroN 的表达增强<sup>[1,12]</sup>。Russo 等认为 IroN

可增强大肠杆菌苯磷二酚铁结合性复合物-肠菌素的铁摄取能力<sup>[13]</sup>。APEC 产生铁结合性复合物(Siderophore), 但在菌体内只有气杆菌素发挥作用, 气杆菌素是一个致病相关的铁分离系统, 可使细菌在低铁环境中摄取铁, 而铁系统可能编码铁结合性复合物受体, 它被认为在 APEC 的致病性和持续感染中, 特别是在深部组织损伤中发挥独立的作用。气杆菌素和铁系统可增强细菌在宿主体内摄取铁的能力<sup>[10]</sup>。

表 5 E037 和突变株气囊接种鸡 48 h 后大肠杆菌病变的比较

Table 5 Comparison of ability of APEC strain E037 and its mutants to induce colibacillosis lesions in chickens experimentally inoculated via the airsacs

<i>E. coli</i> strains	Mean lesion scores $\pm$ SD		
	Air sacs	Heart	Liver
E037	3.50 $\pm$ 0.6	2.00 $\pm$ 0.0	0.38 $\pm$ 0.5
E037( $\Delta$ iro)	1.38 $\pm$ 1.1**	1.00 $\pm$ 0.7*	0.00 $\pm$ 0.0*
E037( $\Delta$ tsh)	1.00 $\pm$ 0.7**	0.63 $\pm$ 0.5**	0.00 $\pm$ 0.0*
E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)	0.75 $\pm$ 0.5**	0.63 $\pm$ 0.5**	0.00 $\pm$ 0.0*

突变株 E037( $\Delta$ iro)的 LD<sub>50</sub> 显著低于亲本株, 在多个器官和血液中的细菌存活比例显著低于 E037 株, 产生的大肠杆菌病变也轻于 E037 株, 表明铁系统在 APEC 的致病性和持续感染中发挥重要的作用。在 205 株 *iroC* 基因阳性的禽源大肠杆菌中, 高、中等和低致病株分别占 89.8%、8.8%和 1.5%, 高致病株与低致病株出现频率差异极显著( $P < 0.01$ ); 不同血清型 *iro*<sup>+</sup>分离株之间在高、中或低致病株中差异不明显。提示 *iro*<sup>+</sup>株大多数为高致病株, 且跟血清型的类别无密切相关性, 可作为禽源大肠杆菌致病性的一个分子标记。

Tsh 首先于 1994 年发现于 APEC 菌株  $\chi$ 7122 中<sup>[14]</sup>。Tsh 低温时 (26~30°C)易于表达, 26°C 时表达最好, 而在 42°C 表达受抑制, Tsh 为丝氨酸蛋白酶, 是蛋白转运家族中的一个成员, 纯化的 Tsh 能够黏附红细胞、血色素、外膜基质纤维连接蛋白以及 IV 胶原。APEC  $\chi$ 7122 的 *tsh* 基因全长 4133 bp, 位于大的质粒上, 大多数为 colV 质粒, *tsh* 基因紧靠 colicinV 基因, Tsh 可能与 APEC 的铁摄取能力相关, 也可能起着黏附作用<sup>[9]</sup>。Tsh 在 APEC 早期感染中发挥作用, 特别是在气囊损伤中, 但在深部组织的持续感染中是不需要的<sup>[14]</sup>。但是 Tsh 在致病机理中作用还没完全弄清楚。Tsh 与 APEC 有关, 而与健康鸡粪样中分离的大肠杆菌菌株没有关系。在 300 株分离于法国和加拿大的大肠杆菌菌株中, 致病性和非致病性菌株中的检出率分别为 90.6%和 3.4%<sup>[2]</sup>, 而本研究中 *tsh* 基因的检出率为 68.7%(167/243)。

致病性试验证实, 突变株的 LD<sub>50</sub> 明显低于野生型菌株, 与亲本株 E037 相比, E037( $\Delta$ tsh)在多个器官和血液中的细菌存活比例明显下降, 产生的大肠杆菌病变不明显, 表明 Tsh 在 APEC 的致病性和持续感染中发挥独立的作用。在 *tsh* 基因阳性的 167 株分离株中, 高、中等和低致病株分别占 87.4%、12.6%和 0%, 高致病株与低致病株出现频率差异极显著( $P < 0.01$ ); 就血清型而言, 在 *tsh*<sup>+</sup>分离株中, O1、O2、O78 血清型的高致病株占所在血清型分离株的 89.5%~100%, 而其它血清型的高致病性菌株仅占 53.3%, 差异极显著( $P < 0.01$ )。结果提示, *tsh*<sup>+</sup>株大多数为高致病性菌株, 但优势血清型 O1、O2 和 O78 菌株的致病性总体上比其它血清型菌株高, *tsh*<sup>+</sup>株的致病性与血清型的种类有一定的相关性。

通过 LD<sub>50</sub>、内脏器官和血液中的细菌存活数及大肠杆菌病变程度可知, E037( $\Delta$ tsh)与 E037( $\Delta$ iro $\Delta$ tsh)的差异不显著, 可能由于 Iro 和 Tsh 均与 APEC 的铁摄取能力相关, 单基因就能致弱 APEC 的致病力, 而双基因的缺失对铁摄取系统的干扰没有叠加影响,

提示这两个基因的致病协同能力不明显。

## REFERENCES

- [1] Timothy JJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol*, 2007, **189** (8): 3228-3236.
- [2] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, 1999, **30** (2-3): 299-316.
- [3] Chen X, Liu J, Miao XQ, et al. Construction of defined mutations of avian pathogenic *Escherichia coli* strain and detection of *tsh* gene in avian isolates. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, **38**(5): 493-499.  
陈祥, 刘静, 苗晓青, 等. 禽病原性大肠杆菌 *tsh* 突变株的构建及分离株 *tsh* 基因的检测. 畜牧兽医学报, 2007, **38**(5): 493-499.
- [4] Chen X, Zhao J, Gao S, et al. Identification of genomic differences in avian pathogenic *Escherichia coli* using suppression subtractive hybridization analysis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**(5): 680-684.  
陈祥, 赵娟, 高崧, 等. 抑制差减杂交筛选禽致病性大肠杆菌基因组差异片段及其分析. 微生物学报, 2005, **45**(5): 680-684.
- [5] Chen X, Gao S, Wang XQ, et al. Identification of APEC genes expressed *in vivo* by selective capture of transcribed sequences. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, **47**(3): 407-412.  
陈祥, 高崧, 王晓泉, 等. 选择性捕获禽病原性大肠杆菌体内转录序列. 微生物学报, 2007, **47**(3): 407-412.
- [6] Chen X, Gao S, Jiao X, et al. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhea in eastern China. *Vet Microbiol*, 2004, **103** (1-2): 13-20.
- [7] Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol*, 1988, **170**(6): 2575-2583.
- [8] Sack DA, Huda S, Neogi PK, et al. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J Clin Microbiol*, 1980, **11**(1): 35-40.
- [9] Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, et al. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immun*, 2000, **68**(7): 4145-4154.
- [10] Dozois CM, Daigle F, Curtiss RIII. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(1): 247-252.
- [11] Bäumlér AJ, Norris TL, Lasco T, et al. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 1998, **180** (6): 1446-1453.
- [12] Russo TA, Carlino UB, Mong A, et al. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun*, 1999, **67**(10): 5306-5314.
- [13] Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald U B, et al. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2002, **70**(12): 7156-7160.
- [14] Provence DL, Curtiss RIII. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun*, 1994, **62**(4): 1369-1380.