

研究报告



大肠杆菌三型分泌系统 2 转录调节子 EtrA 对禽致病性大肠杆菌致病性的影响

王泽平 李倩文 尹磊 涂健 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:【背景】禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)是禽类主要病原菌之一,大肠杆菌三型分泌系统 2 (*Escherichia coli* type III secretion system 2, ETT2)可通过转录调节子调控其致病性,但在 APEC 中转录调节子 EtrA 对其致病性的影响目前尚不清楚。【目的】研究 ETT2 中转录调节子 EtrA 对 APEC 致病性的影响。【方法】利用 Red 同源重组技术构建 ETT2-*etrA* 基因缺失株及回复株。比较生长性能、生物被膜形成、运动性及对血清敏感性的差异,基于 RNA-Seq 测序及 Real-time PCR 技术比较野生株和缺失株中与生物被膜形成、运动性以及毒力因子相关基因的转录水平。【结果】与野生株相比,缺失株及回复株生长特性无显著变化($P>0.05$),但 APEC40- Δ *etrA* 生物被膜形成能力和对血清敏感性明显增强($P<0.001$),运动性较野生株明显下降($P<0.01$),回复株的表型有所回复。转录组学筛选出 7 个毒力差异基因,生物被膜形成相关基因显著上调,参与影响细菌运动性的基因显著下调。qRT-PCR 验证与转录组学结果一致。【结论】*etrA* 缺失可以显著影响 APEC 的生物被膜形成、运动性及对血清的敏感性,这可为进一步探讨 ETT2 对 APEC 的致病作用提供参考。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 大肠杆菌三型分泌系统 2, *etrA*, RNA-Seq, 致病性Effect of ETT2 transcriptional regulator EtrA on the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*WANG Ze-Ping LI Qian-Wen YIN Lei TU Jian SONG Xiang-Jun SHAO Ying
QI Ke-Zong*

Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is one of the main pathogens of poultry. ETT2 (*Escherichia coli* type III secretion system 2) regulates its pathogenicity through transcriptional regulators. Currently, the effect of the transcriptional regulators EtrA on its pathogenicity in APEC is unclear. [Objective] To study the effect of ETT2 transcriptional regulator EtrA on the pathogenicity

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (3177130749); The University Synergy Innovation Program of Anhui Province (GXXT-2019-035); Graduate Innovation Fund Project of Anhui Agricultural University (2019ysj-35)

*Corresponding author: Tel: 86-551-65785310; E-mail: qkz@ahau.edu.cn

Received: 01-06-2019; Accepted: 04-12-2019; Published online: 06-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(3177130749); 安徽高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 安徽农业大学研究生创新基金(2019ysj-35)

*通信作者: Tel: 0551-65785310; E-mail: qkz@ahau.edu.cn

收稿日期: 2019-06-01; 接受日期: 2019-12-04; 网络首发日期: 2020-01-06

of APEC. **[Methods]** APEC40- Δ *etrA* and APEC40-C Δ *etrA* were constructed by the lambda Red recombinase system. Then the biological characteristics, including growth characteristics, biofilm formation ability, motility and sensitivity to serum was compared between APEC40 and APEC40- Δ *etrA*. Besides, the transcriptional levels of virulence genes, biofilm formation related genes and flagellin synthesis genes of wild and complementation strain were compared by RNA-Seq and real-time PCR. **[Results]** The growth characteristics did not significantly change between APEC40 and APEC40- Δ *etrA* ($P>0.05$). However, the biofilm formation and sensitivity to serum were significantly enhanced ($P<0.001$), while the motility was significantly decreased ($P<0.01$) compared with the wild strain APEC40. There was some recovery in the phenotype of the complemented strains. Furthermore, transcriptomics screened seven virulence difference genes, which showed that the genes related to biofilm formation were significantly up-regulated, and the genes involved in motility were significantly down-regulated. The results of qRT-PCR were consistent with those of RNA-Seq. **[Conclusion]** Loss of *etrA* can significantly affect the biofilm formation, motility, and sensitivity to serum in APEC. This study provides a reference for further study on the pathogenicity of ETT2 in APEC.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, ETT2, *etrA*, RNA-Seq, Pathogenicity

禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)病是由致病性大肠杆菌引起的一种高发病率、高死亡率的传染病, 该病存在于世界各地的家禽群体中, 其复杂多变的血清型给养禽业造成严重的经济损失^[1-2]。此外, APEC 是人肠道外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)毒力基因的贮存库, 其携带的毒力基因可通过基因漂移进入人肠道外致病性大肠杆菌的基因序列, 对人类健康造成严重威胁^[3]。因此, 加强对我国 APEC 的防控研究对养禽业和公共卫生都具有重要意义。

大肠杆菌三型分泌系统 2 (*Escherichia coli* type III secretion system 2, ETT2)作为新发现的导致 APEC 致病性的毒力基因簇, 位于细菌染色体上 tRNA 基因座 glyU 的附近, 大小约 29.9 kb, 编码至少 35 个开放性的阅读框, 包括 *yqe* (*ecs3703-3706*)、*yge* (*ecs3707-3712*)、*epr* (*ecs3716-3719*)、*etr* (*ecs3720*)、*epa* (*ecs3721-3726*)、*eiv* (*ecs3727-3734*)等, 与鼠伤寒沙门氏菌致病性岛的几个序列类似^[4]。同时, ETT2 由于多种不同位点基因的突变和缺失被认为是非功能性的分泌系统。虽然 ETT2 不一定具有分泌毒力效应蛋白的能力, 但有研究表明 ETT2 与粘附能力和其他毒力基因的表达有关, 位于 ETT2 中的转录调节子, 包括 YgeH、YqeI、YgeK/EtrB、EtrA 和 EivF 具有调节

致病性大肠杆菌肠毒基因表达的作用, 如在大肠杆菌 O42 中, YgeH 能够在功能上取代沙门氏菌中的调节子 HilA, 进而导致 SPI 编码效应子的激活或抑制^[5]; 在 EHEC O157:H7 ETT2 基因组中, *ecs3720* (*etrA*)和 *ecs3734* (*eivF*)这两个基因的突变会导致由 LEE 编码的毒力蛋白大量分泌, 并增加了对人类肠道细胞的粘附^[6]; 转录调节子 YgeK/EtrB 可以激活 LEE 的表达, 并与其他调控区域相互作用促进结肠上皮细胞附着和脱落损伤的形成^[7]; 同时, 有研究发现 *etrA* (*ecs3720*)能促进 APEC 在巨噬细胞中存活以及菌毛基因的表达^[8], 但对于转录调节子 EtrA 的生物学特性和致病性的影响尚不清楚。

本研究以禽致病性大肠杆菌 APEC40 野生株、缺失株 APEC40- Δ *etrA* 及回复株 APEC40-C Δ *etrA* 为研究对象, 通过生长性能、生物被膜形成、运动性测定、对血清的敏感性检测等试验比较野生株、缺失株、回复株的生物学特性, 基于转录组测序 (RNA-Seq)筛选 *etrA* 调控细菌毒力相关差异表达基因, 为进一步解析 *etrA* 基因功能以及调控 APEC 致病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

APEC40、质粒 pKD46、pKD3、pCP20 由兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存;

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R II 和 *Hind* III 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; SOB 培养基、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; RNA 提取试剂盒 EasyPureTM RNA Kit、反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with cDNA Eraser、荧光定量 PCR SYBR Premix *Ex Taq*TM II 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; SPF 级鸡血清购自 Gibco 公司。

SOC 培养基: 称取 0.532 g SOB 溶于 20 mL 超纯水成 SOB 液体培养基, 1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 15 min 后, 取 5 mL 的 SOB 液体培养基, 加入 100 μ L 经 0.22 μ m 滤膜过滤后的 1 mol/L 葡萄糖和 25 μ L 的 2 mol/L MgCl₂。

Gene Pulser Xcell 电穿孔系统, Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪, 上海昆士兰生物科技发展有限公司; 低温冷冻高速离心机, 北京博雅创新科技发展有限公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中公布的 *Escherichia coli* O157:H7 *str. Sakai* 菌株 ETT2 毒力岛中 *etrA* 基因序列(NC008563.1)设计引物, 通过 Primer Premier 5 软件设计引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 缺失株及回复株引物设计

Table 1 Primers used in the gene deletion and complemented strains

引物名称	序列	产物大小
Primers name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>etrA</i> -in-F	ATTTAGTTGCGTTGGTTG	327
<i>etrA</i> -in-R	GATTGAGGGCTCTTATTTT	
<i>etrA</i> -out-F	AACCCTATCCCTCAACG	1 067
<i>etrA</i> -out-R	TGGAGAATGCTGGACAAC	
<i>etrA</i> -up-F	AATGAATACTGCCAAACT	630
<i>etrA</i> -lap-cm-up-R	CCAGCCTACAATGCCAACCTGTACTCTA	
<i>etrA</i> -lap-cm-down-F	TATTCATATGAGAAAGTTGATATGTCAT	515
<i>etrA</i> -down-R	TAGATGAAATATTACGTC	
pkd3-cm-lap- <i>etrA</i> -F	AGGTTGGCATTGTAGGCTGGAGCTGCTT	1 014
pkd3-cm-lap- <i>etrA</i> -R	TCAACTTTCTCATATGAATATCCTCCTTAGTTC	
M13-F	CAGGAAACAGCTATGAC	750
M13-R	GTTTTCCCAGTCACGAC	
<i>etrA</i> -C- <i>Eco</i> R I-F	CCGGAATTCATGATGAGACAGAATAAAAAA	519
<i>etrA</i> -C- <i>Hind</i> III-R	CCCAAGCTTTCAACTTTCTCTTACGCAAG	

1.3 APEC40- Δ *etrA* 基因缺失株的构建

以 APEC40 基因组为模板, PCR 扩增 *etrA* 基因上、下游同源臂片段。以 pKD3 质粒为模板 PCR 扩增大小为 1 014 bp 的氯霉素抗性片段。将扩增的上述片段, 以 *etrA*-up-F/*etrA*-down-R 为引物, 进行重叠(overlap) PCR, 扩增出长度为 2 159 bp 的含有 *etrA* 上、下游同源臂和氯霉素抗性片段(Up-Cm-Down)的打靶片段, PCR 扩增采用高保真酶 Prime STAR Max DNA Polymerase, PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, DNA 模板(100 ng/ μ L) 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 4 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

制备含 pKD46 的 APEC40 感受态细胞, 将 10 μ L 打靶片段与 100 μ L 含 pKD46 的 APEC40 电转化感受态细胞混匀后, 冰浴 30 min, 转入预冷的电击杯, 用电转仪进行转化后加入 900 μ L 预先制备好的 SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 1 h 后, 涂布于含氯霉素(30 μ g/mL)抗性的固体平板。第二天挑取疑似缺失株的菌落进行 PCR 鉴定, 将 pCP20 质粒电转化至正确缺失株的感受态细胞中, PCR 鉴定后筛选消除抗性的缺失株, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 APEC40-C Δ etrA 基因回复株的构建

设计构建回复株所需的引物 *etrA*-C-EcoR I-F/*etrA*-C-Hind III-R (表 1), 通过 PCR 以 APEC40 为模板, 扩增出含酶切位点的 *etrA* 片段。提取 pSTV28 质粒, 以 EcoR I 和 Hind III 为酶切位点进行酶切回收, 将回收的 APEC40-*etrA* 片段和酶切后的 pSTV28 质粒用 T4 连接酶进行连接后转入 *E. coli* DH5 α , 提取质粒后电转化入 APEC40- Δ *etrA* 感受态细胞, 挑取单菌落, 用 M13 引物进行 PCR 鉴定。

1.5 生长性能测定

为确定 *etrA* 缺失是否影响细菌生长。用 LB 培养基测定菌株 APEC40、APEC40- Δ *etrA* 及其回复株 APEC40-C Δ *etrA* 的生长性能。将细菌在 37 °C、150 r/min 培养, 使用 96 孔板通过酶标仪以 2 h 间隔检测每个菌株的 OD_{620} 值, 持续 16 h。

1.6 运动性测定

将野生株、APEC40- Δ *etrA* 及回复株挑取单菌落, 37 °C 静置培养过夜, 转接二级菌, 将细菌培养至 OD_{600} 为 1.0, 取菌液 3 mL 于 3 000 r/min 离心 5 min, PBS 溶液洗 3 遍后, 用 1 mL 定容至 OD_{600} 为 3.0, 取 2 μ L 菌液点样于 LB 半固体培养基(0.25% 琼脂)上, 37 °C 培养 12 h 后观察细菌运动性菌圈直径, 比较菌株的运动能力。

1.7 生物被膜形成测定

将野生株、APEC40- Δ *etrA* 及回复株挑取单菌落, 37 °C 培养过夜后, 转接二级菌 37 °C 培养 OD_{600} 为 1.0 后, 取 3 mL 新鲜 LB 培养基置于 10 mL 聚苯乙烯离心管中将菌液调至 OD_{600} 为 0.03, 37 °C、150 r/min 培养 12 h, 然后 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液并用无菌 PBS 洗涤 2 次。加入 3 mL 的 0.1% 结晶紫后 37 °C 孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 自然风干。每孔加 200 μ L 95% 乙醇静置 15 min 后, 酶标仪测定 OD_{595} 值。

1.8 血清敏感性检测

挑取新鲜单菌落 37 °C 培养过夜后, 转接二级

菌培养至 OD_{600} 为 0.6, 并用磷酸缓冲液 PBS 洗涤 3 遍。将无特定病原体 (specific pathogen free chicken, SPF) 的鸡血清用 PBS 稀释至 10%、30%、70% 三个梯度, 同时将热灭活的相对应的梯度血清设置为阴性对照, 每组 3 个重复, 在 96 孔板中 37 °C 静置培养, 并通过酶标仪以 1 h 为间隔检测每个菌株的 OD_{620} 值, 持续 12 h。

1.9 转录组学测序

1.9.1 样品测序

禽致病性大肠杆菌 APEC40 为临床分离株, *etrA* 基因缺失株由本试验构建。取冻存菌液在 LB 固体培养基上连续纯化培养后, 挑取单一菌落于 LB 液体培养基中富集培养至 OD_{600} 为 1.5, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后收集沉淀, 用磷酸缓冲液清洗 3 次后取 50 mg 置于液氮中保存, 将样品送至深圳华大基因进行测序。

1.9.2 数据处理与分析

(1) 测序数据过滤及比对

使用华大自主研发的过滤软件 SOAPnuke 进行统计, 使用 Trimmomatic 进行过滤, 去除原始数据包含低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 Reads, 得到 Clean reads 之后, 使用 HISAT 将 Clean reads 与 *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai DNA 全基因组进行比对, 之后再使用 RSEM 计算基因和转录本的表达水平。

(2) 差异基因的筛选

基因组比对结果使用 Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) 法进行计算, 根据得到的基因表达量 (FPKM 值) 进行样本间差异分析。差异基因的筛选标准为 Fold-change 的绝对值 ≥ 2 且 False discovery rate (FDR) ≤ 0.001 。

1.10 qRT-PCR 验证转录组测序数据的差异基因 mRNA 表达水平

(1) 引物的设计与合成

根据 GenBank 中已发布的内参基因 *dnaE*, 同时选取基因 *ompF* (*ecs1012*)、*pgaB* (*ecs1269*)、*pgaA*

(*ecs1270*)、*ycgV* (*ecs1707*)、*ompW* (*ecs1756*)、*fimI* (*ecs5724*)、*flgC* (*ecs1452*), 用 Primer Premier 5 软件分析并设计特异性引物。引物序列见表 2。

(2) 细菌总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

挑取 APEC40、APEC40- Δ *etrA*、APEC40-C Δ *etrA* 的单菌落, 于 LB 液体培养基中 37 °C、150 r/min 培养过夜, 然后转接培养至对数期, 取适量的菌液于 4 °C、12 000×g 离心 2 min, 去除所有培养基上清, 用含有溶菌酶的 100 μ L TE 缓冲液(1 mg lysozyme 溶于 100 μ L TE 中)重悬菌体。参照 EasyPure™ RNA Kit 说明书提取 3 组细菌的总 RNA。使用核酸蛋白浓度测定仪检测 RNA 浓度, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。采用反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 消除提取产物中的基因组 DNA 并对 RNA 进行反转录。

(3) qRT-PCR 反应

采用 TransStart Top Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒, 对所筛选的 APEC 毒力基因的表达进行相对定量的检测。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算毒力基因 mRNA 的转录水平。

表 2 荧光定量 PCR 所用引物信息

Table 2 Primers for real-time PCR

基因名称	引物序列
Gene name	Primers sequence
<i>dnaE</i> (<i>ecs0186</i>)	F: GATTGAGCGTTATGTCGGAGGC R: GCCCCGCGACCCGTGAT
<i>ompF</i> (<i>ecs1012</i>)	F: AGCAACGGTGTCGTCTGAAC R: AGTGGGCGCAACCTACTACT
<i>pgaB</i> (<i>ecs1269</i>)	F: TTCACGCAGTGCTGATGTCC R: TATACCGCCACAGGATCGCA
<i>pgaA</i> (<i>ecs1270</i>)	F: GCGTTCCTGACCCTCAAGTG R: GCAACTGGAACGCCTCTCTC
<i>ycgV</i> (<i>ecs1707</i>)	F: ATGCCATGACCAACAGCCAG R: CGTCATGTTGCGTTGCGATG
<i>ompW</i> (<i>ecs1756</i>)	F: CTGGGTGGATTACAGCGTGA R: GTGTTGGCGGCAGATGATGA
<i>fimI</i> (<i>ecs5724</i>)	F: TCGATACCACCGCCAATTATAAAC R: TGAGAACATAAACACCCACGGA
<i>flgC</i> (<i>ecs1452</i>)	F: GGCGAATGCTGATAGCGTGA R: ACATCGGCAACCTTTACGCC

2 结果与分析

2.1 禽致病性大肠杆菌 APEC40- Δ *etrA* 缺失株和 APEC40-C Δ *etrA* 回复株的鉴定

对挑取的疑似阳性缺失株进行 PCR 鉴定, 以内检引物 *etrA*-in-F/*etrA*-in-R 进行检测, 野生株扩增的片段大小为 327 bp, 缺失株无扩增条带(图 1A 中泳道 1、3); 用外检引物 *etrA*-out-F/*etrA*-out-R 鉴定, 野生株扩增大小为 1 067 bp, 缺失株扩增大小为 566 bp (图 1A 中泳道 2、4)。测序表明缺失株构建

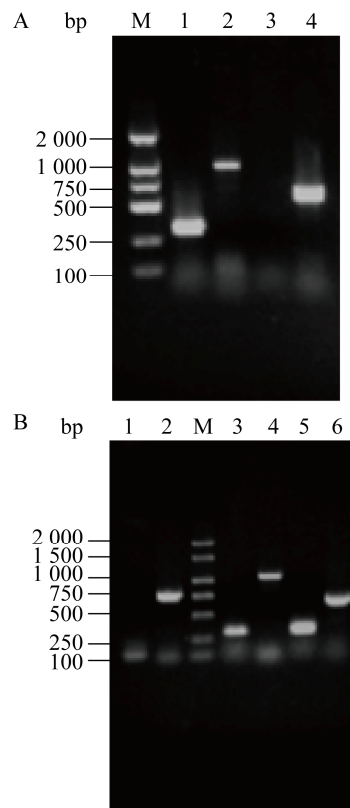


图 1 APEC40-*etrA* 基因缺失株(A)和回复株(B)的 PCR 鉴定

Figure 1 PCR identification of *etrA* gene mutant strain (A) and complement strain (B) of APEC40

注: M: DL2000 DNA Marker. A: 1、2: APEC40 野生株基因扩增; 3、4: 缺失株基因扩增. B: 1、3、4: 野生株基因扩增; 2、5、6: 回复株基因扩增.

Note: M: DL2000 DNA Marker. A: 1, 2: Amplification of *etrA* genes of APEC40 wild strain; 3, 4: Amplification of APEC40 mutant strain. B: 1, 3, 4: Amplification of *etrA* genes of APEC40 wild strain; 2, 5, 6: Amplification of *etrA* genes of APEC40 complement strain.

成功, 将缺失成功的菌株命名为 APEC40- Δ *etrA*。用内检引物 *etrA*-in-F/*etrA*-in-R 对疑似回复株的阳性克隆株进行鉴定, 野生株和回复株扩增的片段大小均为 327 bp (图 1B 中泳道 3、5), 用外检引物 *etrA*-out-F/*etrA*-out-R 鉴定野生株扩增大小为 1 067 bp, 回复株扩增出条带为 566 bp 的片段(图 1B 中泳道 4、6)。同时, 回复株用 M13 引物进行验证, 结果显示野生株无扩增条带, 回复株出现 566 bp 条带, 显示基因回复构建成功(图 1B 中泳道 1、2), 将阳性回复株命名为 APEC40-C Δ *etrA*。

2.2 生长性能差异比较

APEC40、APEC40- Δ *etrA*、APEC40-C Δ *etrA* 的菌株生长性能曲线结果显示, 缺失株、回复株同野生株相比, 在 LB 培养基中的生长性能无明显差异($P>0.05$), 见图 2。

2.3 野生株 APEC40 和缺失株 APEC40- Δ *etrA* 及 APEC40-C Δ *etrA* 回复株的运动性比较

运动性检测结果表明, APEC40- Δ *etrA* 突变体的运动能力显著减弱($P<0.01$), 回复株运动能力有所回复, 见图 3。

2.4 生物被膜形成能力比较

生物被膜检测结果表明, 缺失了 *etrA* 后, APEC40- Δ *etrA* 突变体的生物被膜形成能力极显著增强, 回复株生物被膜形成能力稍有回复, 见图 4。

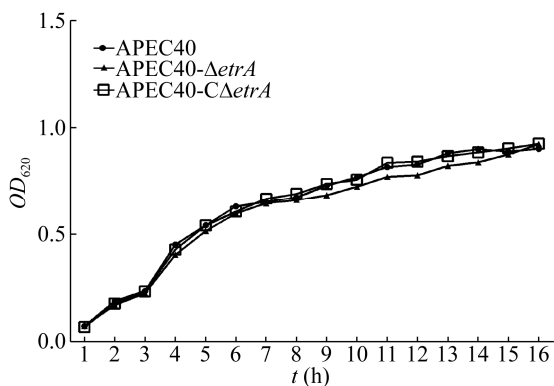


图 2 生长曲线测定

Figure 2 Growth curves determination

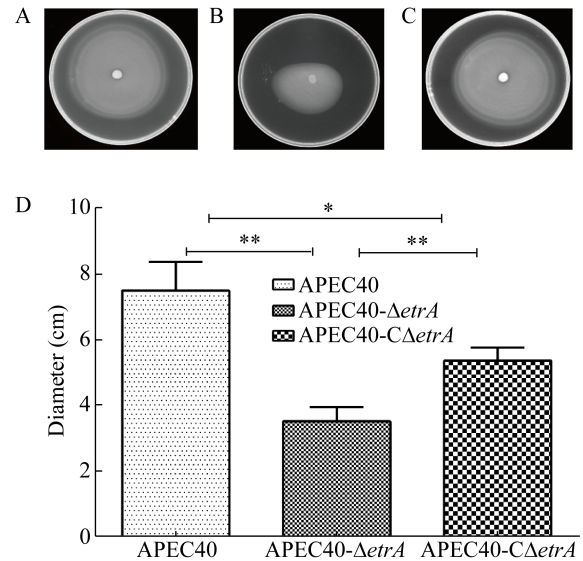


图 3 运动性测定

Figure 3 Motility assay

注: A: APEC40; B: APEC40- Δ *etrA* 突变体; C: APEC40-C Δ *etrA* 回复株; D: 运动直径数据分析. **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

Note: A: APEC40; B: APEC40- Δ *etrA*; C: APEC40-C Δ *etrA*; D: Data analysis of motility radius. **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

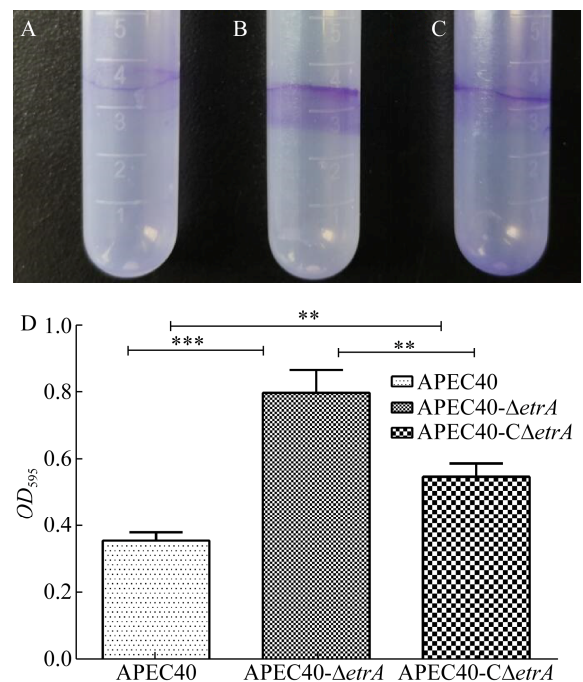


图 4 生物被膜形成能力检测

Figure 4 Biofilm formation ability

注: A: APEC40; B: APEC40- Δ *etrA* 突变体; C: APEC40-C Δ *etrA* 回复株; D: 生物被膜形成能力. ***: $P<0.001$; **: $P<0.01$.

Note: A: APEC40; B: APEC40- Δ *etrA*; C: APEC40-C Δ *etrA*; D: Biofilm formation ability. ***: $P<0.001$; **: $P<0.01$.

2.5 *etrA* 缺失对生长和血清敏感性的影响

体外血清敏感性试验检测结果表明,当血清含量为 30%时,野生株、缺失株及回复株开始出现差异,当血清含量为 70%以上时,缺失株 APEC40- Δ *etrA* 对血清的敏感性显著高于野生株 APEC40,见图 5。在热灭活阴性对照血清中,3 株菌无明显差异($P>0.05$)。

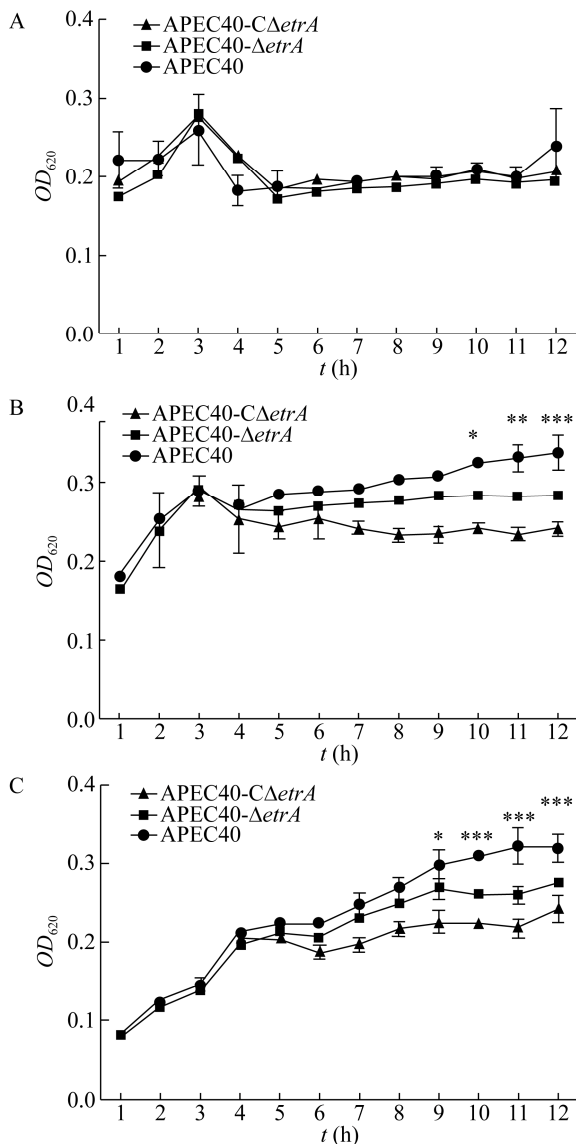


图 5 血清敏感性检测

Figure 5 Serum sensitivity test

注: A: 10%血清敏感性检测; B: 30%血清敏感性检测; C: 70%血清敏感性检测. ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$.
Note: A: 10% serum sensitivity test; B: 30% serum sensitivity test; C: 70% serum sensitivity test. ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$.

2.6 基于 RNA-Seq 比较 APEC40 和 APEC40- Δ *etrA* 之间的转录差异

2.6.1 测序质量评估及基因组比对结果

从转录组测序数据分析报告中得知, APEC40 以及 APEC40- Δ *etrA* 均获得 2 194 万条原始序列, 过滤不合格的序列后分别得到 2 137 万条和 2 133 万条高质量序列数据用于后续分析, 其分别占原始序列数据的 97.39%和 97.20%, 表明本次测序准确性较高, 可直接用于数据的分析。通过局部比对方法对纯净序列与 *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai DNA 全基因组进行基因组比对结果显示, APEC40 以及 *etrA* 基因缺失株的比对结果分别是 88.46%和 89.94% (表 3)。

2.6.2 差异基因的筛选

以 Fold-change 的绝对值 ≥ 2 且 $FDR\leq 0.001$ 为标准, 对差异表达基因进行筛选, 得到 176 个差异表达基因, 其中上调基因 124 个, 下调基因 52 个。从差异表达基因中筛选出了 7 个与生物被膜及运动性相关的毒力调控基因(表 4)。

表 3 基因组比对

Table 3 Mapping of genome

样品名称	APEC40	APEC40- Δ <i>etrA</i>
Samples_ID		
过滤前的 Reads 数	21.94	21.94
Total raw reads (Mb)		
过滤后的 Reads 数	21.37	21.33
Total clean reads (Mb)		
比对比例 Mapping ratio (%)	88.46	89.94

表 4 相关差异基因的转录水平

Table 4 Transcription level of differential related gene

基因名称	基因表达量		差异	P 值
	Expression level	倍数		
Gene symbol	APEC40	APEC40- Δ <i>etrA</i>	\log_2FC	
<i>ompF</i> (<i>ecs1012</i>)	442.19	1069.18	1.274	0
<i>pgaB</i> (<i>ecs1269</i>)	1.33	3.50	1.396	4.514×10^{-9}
<i>pgaA</i> (<i>ecs1270</i>)	2.23	7.56	1.761	3.08×10^{-29}
<i>ycgV</i> (<i>ecs1707</i>)	12.5	28.50	1.189	1.305×10^{-40}
<i>ompW</i> (<i>ecs1756</i>)	239.21	1 025.35	2.100	0
<i>fimI</i> (<i>ecs5724</i>)	144.77	766.16	2.404	1.756×10^{-142}
<i>flgC</i> (<i>ecs1452</i>)	7.47	2.91	-1.360	0.287×10^{-3}

2.7 qRT-PCR 验证相关基因转录水平

对 APEC40 和 APEC40- Δ *etrA* 基因转录水平检测结果表明, 在生物被膜形成相关基因中, APEC40- Δ *etrA* 的毒力因子 *pgaB/pgaA/ompW* 基因的表达水平显著上调, 而维持生物被膜结构稳定性的自转运粘附素基因 *ycgV* 和外膜蛋白 *ompF* 无明显变化; 在运动性相关基因中, *etrA* 的缺失导致 *flgC* 鞭毛的组成基因表达水平显著下调, *fimI* 与运动性拮抗的基因显著上调, 见图 6。

3 讨论

APEC 作为典型的肠道外致病性大肠杆菌, 通过感知外界环境信号分子, 进而利用转录调节蛋白来介导毒力基因的转录表达, 从而发挥致病作用。转录调节蛋白通过参与调控细菌多种生物学特性, 包括生物被膜、耐药性、运动性、毒力因子的表达和生物素的合成等影响宿主细胞生物学过程^[9-10], 并在感染宿主过程中利用复杂的调控网络控制毒力基因的转录表达^[11]。本研究通过 Red 同源重组系统构建 ETT2 中转录调节子 *etrA* 基因缺失株及回复株, 分析其生物学特性, 阐明转录调节子 EtrA 在 APEC 发病机理中的作用。结果表明, *etrA* 缺失突变体表现出与野生株和互补株相同的生长速度, 但与野生株相比, 突变株的运动性和血清抗性降低; 此外, *etrA* 的缺失增强了生物被膜的形成能力。结合 RNA-Seq 数据分析, 发现 *etrA* 调控多个毒力

基因的表达, 涉及鞭毛、生物被膜、外膜蛋白和菌毛。

鞭毛作为大肠杆菌的运动器官赋予细菌主动侵入宿主细胞、远离不利环境的特性, 在细菌的致病过程中发挥着重要作用。*flgC* (*ecs1452*) 是构成基底杆细胞近端部分鞭毛组分的关键基因, 其转录水平下调会导致鞭毛合成受阻。*ycgV* (*ecs1707*)、*fimI* (*ecs5724*) 是参与 I 型菌毛生物合成的菌毛蛋白, 有研究表明 UPEC 和大肠杆菌 K-12 MG1655 的 I 型菌毛表达量增加会显著抑制鞭毛蛋白的表达和细菌的运动性^[12], 因此, 我们推测 *etrA* 缺失后这三者协同导致了细菌运动能力的减弱。

生物被膜的形成是一个极其复杂的过程, 它能增强细菌抗宿主免疫系统和提高在环境中的生存能力, 同时还可以降低对抗菌药物的敏感性, 进而增强细菌的致病性。生物被膜形成的第一步是细菌定殖粘附于物体表面, *flgC* (*ecs1452*) 与生物被膜的形成初期有关, 主要参与固体表面的接触以及附着^[13]; 细菌的菌毛 *fimI* (*ecs5724*) 在生物被膜不可逆的附着阶段发挥作用^[14-15]; 细菌表面的自转运粘附素包括 Antigen 43、*ycgV*、*PGA* (poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine) 和 *tibA* 蛋白等在生物被膜的成熟阶段发挥作用, 维持生物被膜结构稳定性, 促使细胞与固体表面以及细胞与细胞之间的互作^[16-17]; 此外, 革兰氏阴性细菌的外膜(outer membrane)与生物被膜结构的稳定性也密切相关^[18]。因此, 本研究中 *etrA* 的缺失导致了 *pgaB*、*pgaA*、*fimI*、*ompF*、*ompW*、*ycgV* 基因表达量的上升和 *flgC* 的表达量下降, 进而增强了生物被膜的形成能力, 这对于防治 APEC 感染是不利的。

禽致病性大肠杆菌最初通过呼吸道感染家禽, 随后扩散至全身。菌体入侵宿主后, 抵抗血清的影响对于菌体的存活是必需的, 因此, 对血清的敏感性是判断 APEC 毒力的重要参数, 较低的血清敏感性有助于细菌在血清中存活并引起败血症^[19]。本研究结果显示 *etrA* 缺失株对血清敏感, 这个变化表明 *etrA* 对细菌在宿主体内的存活和扩散具有

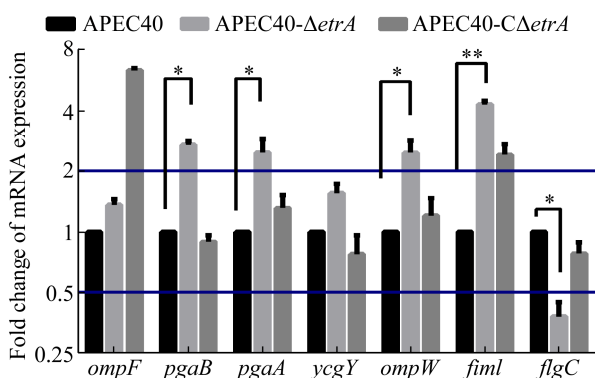


图 6 毒力、生物被膜、运动性相关基因的转录水平
Figure 6 Transcription level of virulence, biofilm and motility-related genes

Note: **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

全局性的影响,这对致病性尤其重要。另外,本研究发现, *etrA* 基因的缺失导致 APEC 运动性、生物被膜形成能力以及对血清敏感性的能力均未完全回复,可能是细菌通过不同的调控因子及系统协调控制基因转录表达,从而在不同条件下发挥作用。本文通过质粒将调控因子 *etrA* 互补至缺失株, *etrA* 基因的拷贝数和表达量均高于野生株,这可能是互补株未能回复至野生株水平的原因。

4 结论

本文分析了 APEC40 中转录调节子 *etrA* 基因缺失株及互补株的生物学特性及差异基因的表达变化,初步揭示了转录调节子 EtrA 影响 APEC40 的运动性、生物被膜形成能力并在血清存活方面发挥重要作用,在分子水平上为深入了解禽致病性大肠杆菌的致病机制及防控相关疾病奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. *Veterinary Research*, 1999, 30(2/3): 299-316
- [2] Carson CA, Shear BL, Ellersieck MR, et al. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by Ribotyping[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1503-1507
- [3] Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, et al. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012, 31(6): 1121-1129
- [4] Ren CP, Chaudhuri RR, Fivian A, et al. The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3547-3560
- [5] 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: 268
- [6] Zhang LH, Chaudhuri RR, 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
- [7] Luzader DH, Willsey GG, Wargo MJ, et al. The type three secretion system 2-encoded regulator EtrB modulates enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene expression[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(9): 2555-2565
- [8] Wang SH, Xu X, Liu X, 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
- [9] Schouler C, Schaeffer B, Brée A, et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(5): 1673-1678
- [10] Liu HY, Wang JW, Wang J, et al. Research progress of Avian *Escherichia coli* virulence factors[J]. *Chinese Animal Health Inspection*, 2013, 30(10): 25-29 (in Chinese) 刘红玉, 王君玮, 王娟, 等. 禽大肠杆菌毒力因子的研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2013, 30(10): 25-29
- [11] Wei CW, Zheng M. Research progress of virulence gene regulation of pathogenic *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2001, 35(2): 42-47 (in Chinese) 魏财文, 郑明. 致病性大肠杆菌毒力基因调控的研究进展(一)[J]. *中国兽药杂志*, 2001, 35(2): 42-47
- [12] Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, et al. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 75(1): 246-251
- [13] Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, et al. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(2): 361-367
- [14] Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms[A]//Romeo T. *Bacterial Biofilms[M]*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008: 249-289
- [15] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 49-79
- [16] Itoh Y, Rice JD, Goller C, et al. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(10): 3670-3680
- [17] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [18] Hejair HMA, Zhu YC, Ma JL, et al. Functional role of *ompF* and *ompC* porins in pathogenesis of Avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 29-37
- [19] Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 536-540