



## 研究报告

## 酰基高丝氨酸内脂合成酶 LasI 对禽致病性大肠杆菌生物学特性的影响

王志豪<sup>1,2</sup> 左佳坤<sup>2</sup> 蒋蔚<sup>2</sup> 黄燕<sup>2</sup> 米荣升<sup>2</sup> 陈兆国<sup>2</sup> 祁克宗<sup>\*1</sup> 韩先干<sup>\*2</sup>

1 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

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

**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,群体感应(Quorum sensing, QS)系统可通过信号分子调控其生物学特性。在 APEC 中信号分子 AHL 对其生物学特性的影响目前尚不清楚。【目的】研究信号分子 AHL 对 APEC 生物学特性的影响。【方法】将含铜绿假单胞菌酰基高丝氨酸内脂合成酶(Acyl-homoserine-lactone synthase, *lasI*)基因的表达质粒转化至 APEC 菌株 DE17 中,构建重组菌株 DE17-*lasI*,利用 LasI 在 DE17 中合成 AHL。比较野生株和重组菌株产生 AHL 信号分子、生长特性、生物被膜形成能力、运动性以及耐药性等生物学特性的差异;运用 Real-time PCR 技术,比较野生株和重组菌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】对重组菌株 AHL 信号分子检测表明,DE17-*lasI* 能够产生 AHL 信号分子,与野生株 DE17 相比,DE17-*lasI* 生物被膜形成能力和运动性显著降低( $P < 0.01$ ),但其生长特性和耐药性无显著变化( $P > 0.05$ );Real-time PCR 检测结果表明,重组菌株的毒力因子 *fimH* 转录水平上调了 58.8 倍,而 *ompA*、*iss* 分别下调了 95.4%、77.3%。与生物被膜形成相关基因 *agn43* 下调了 75%,鞭毛合成基因 *flhA* 下调了 80.8%。此外,AHL 受体 *sdiA* 的转录水平上调了 19.8 倍。【结论】转化 *lasI* 至 APEC 中,能促进其在 APEC 中合成信号分子 AHL,并显著影响 APEC 的部分生物学特性,为进一步探讨 AHL 型群体感应系统对 APEC 的调控作用提供参考。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌, 群体感应, *lasI* 基因, 信号分子 AHLs, 生物被膜, 运动性

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31572546, 31872843, 31772707); Shanghai Science and Technology Commission Research Project (17140900400, 18140900700); National Basic Fund for Research Institutes, which is supported by Chinese Academy of Agricultural Sciences (2019JB01)

**\*Corresponding authors:** QI Ke-Zong: Tel: 86-551-65785310; E-mail: qkz@ahau.edu.cn

HAN Xian-Gan: Tel: 86-21-34293157; E-mail: hanxgan@163.com

**Received:** 23-02-2019; **Accepted:** 24-09-2019; **Published online:** 17-10-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(31572546, 31872843, 31772707);上海市科学技术委员会科研计划项目(17140900400, 18140900700);中央级科研院所公益性研究专项(2019JB01)

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

韩先干: Tel: 021-34293157; E-mail: hanxgan@163.com

**收稿日期:** 2019-02-23; **接受日期:** 2019-09-24; **网络首发日期:** 2019-10-17

## Effect of acyl homoserine lactone synthase LasI on the biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*

WANG Zhi-Hao<sup>1,2</sup> ZUO Jia-Kun<sup>2</sup> JIANG Wei<sup>2</sup> HUANG Yan<sup>2</sup> MI Rong-Sheng<sup>2</sup>  
CHEN Zhao-Guo<sup>2</sup> QI Ke-Zong<sup>\*1</sup> HAN Xian-Gan<sup>\*2</sup>

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

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

**Abstract:** [Background] Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is one of the main pathogens of poultry. The quorum sensing (QS) system regulates its biological properties through signaling molecules. Currently, the effect of the signaling molecule AHLs on its biological properties in APEC is unclear. [Objective] To study the effect of AHL on the biological characteristics of APEC. [Methods] The plasmid containing the acyl-homoserine-lactone synthase (*lasI*) gene was transformed into the DE17 strain of APEC to construct the recombinant strain DE17-*lasI*. Then the biological characteristics, including AHLs production, growth characteristics, biofilm formation ability, motility and drug resistance was compared between DE17 and DE17-*lasI*, respectively. Besides, the transcriptional levels of virulence genes, biofilm formation related genes and flagellin synthesis genes of wild and recombination strain were compared by real-time PCR. [Results] The level of AHL produced by DE17-*lasI* was significantly enhanced ( $P < 0.01$ ), while the biofilm formation and motility were significantly decreased ( $P < 0.01$ ) compared with the wild strain DE17. However, the growth characteristics and drug resistance were no significant change ( $P > 0.05$ ) between DE17 and DE17-*lasI*. Furthermore, the results showed that the transcription level of virulence factor *fimH* of the DE17-*lasI* was up-regulated by 58.8 times, while *ompA* and *iss* were down-regulated by 95.4% and 77.3% times compared with DE17, respectively. The biofilm formation related gene *agn43* and the flagellar synthesis gene *flhA* was down-regulated by 75% and 80.8%, respectively. In addition, the transcription level of the AHL receptor *sdiA* was up-regulated by 19.8-fold. [Conclusion] Transformation of *lasI* into APEC can promote the synthesis of AHL in APEC, which significantly affect some biological characteristics of APEC. This study provides a reference for further study on the regulation of AHLs in APEC.

**Keywords:** Avian pathogenic *Escherichia coli*, Quorum sensing, *lasI*, Acyl-homoserine-lactone, Biofilm, Motility

禽致病性大肠杆菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)能引起禽类大肠杆菌病。因其血清型复杂且耐药性日益严重,严重制约影响养禽业的健康发展<sup>[1]</sup>。APEC的生物学特性受多种系统调控,如双组分系统、分泌系统和群体感应系统(Quorum sensing, QS)等。研究表明,细菌中存在多种QS系统,如在APEC等细菌中存在的LuxS/AI-2型QS系统,AI-2是其信号分子且不具有种属特异性<sup>[2]</sup>。此外,存在于多种革兰阴性菌中的LuxI/LuxR型QS系统,其LuxI类蛋白酶可催化合成具有种属特异性的信号分子——高丝氨酸内酯类化合物(AHLs,又称为AI-1),LuxR类蛋白是AHLs的胞内受体,作为转录调节因子结合

AHLs后可激活所调控基因的表达<sup>[3]</sup>。存在于铜绿假单胞菌中的LasI/LasR型QS系统类似于LuxI/LuxR型QS系统,在该系统中,LasI合成其AHL信号分子<sup>[4]</sup>,LasR作为AHL的受体,通过结合AHL后调控其靶基因的表达。

研究表明,作为LuxR的同源物,SdiA被发现存在于埃希菌属、沙门菌属、志贺菌属和克雷伯菌属中,SdiA作为AHLs的胞内受体,参与调控细菌的多种功能<sup>[5-6]</sup>。研究表明,部分细菌虽不产生AHLs,但能通过其胞内受体(如LuxR、SdiA等)结合其他细菌产生的AHLs分子<sup>[7]</sup>,从而调控其生物学功能。Lu等<sup>[8]</sup>研究发现铜绿假单胞菌产生的QS信号分子可通过激活大肠杆菌SdiA,从而调控

其靶基因的转录。

研究表明, QS 系统可通过信号分子参与调控细菌的多种功能, 生物被膜(Biofilm, BF)和运动性(Motility)是 QS 系统调控的 2 种主要的细菌表型。BF 是由细菌分泌的胞外多聚物(Extracellular polymeric substances, EPS)包裹自身而形成的自我保护结构, 在 BF 形成的前期受运动性的影响。而细菌的运动性除了受 QS 调控, 环二鸟苷酸(c-di-GMP)也参与对其调控<sup>[9-10]</sup>。He 等<sup>[11]</sup>研究表明, 在粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中缺失 *luxS* 后其 BF 产量显著降低。此外, 细菌毒力因子的表达也受到 QS 系统的调控, Cheng 等<sup>[12]</sup>研究发现, 通过基因改造使烟草产生 AHL 分子, 能降低丁香假单胞菌对烟草的感染率。

目前, 在 APEC 中信号分子 AHLs 对其生物学特性的影响尚不清楚。本研究通过将铜绿假单胞菌 *lasI* 导入 APEC 菌株 DE17 中, 构建重组菌株 DE17-*lasI*, 利用 LasI 在 DE17 中合成 AHLs, 并开展野生株和重组菌株生物学特性的研究, 本研究为进一步探讨 AHLs 型群体感应系统对 APEC 的调控作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

M9 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司; ABM 固体培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.30,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03, 甘露醇 2.00, 琼脂 10.00, pH 7.20。

APEC O<sub>2</sub> 血清型菌株 DE17 及铜绿假单胞菌 PAO1 由本实验室保存; *A. tumefaciens* NTL4(pZLR<sub>4</sub>) 由中国农业科学院农业资源与农业区划研究所张桂山老师惠赠。96 孔细胞培养板购于 Corning 公司; 药敏纸片购于杭州天河生物公司; HiScript<sup>®</sup> Q Select RT SuperMix、ChamQ<sup>™</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix 购于南京 Vazyme 公司; pSTV28 载体、限制性内切酶 *Bam*H I、*Kpn* I、T4 连接酶购于 TaKaRa 公司; X-Gal 购于天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒、荧光定量 PCR Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪, 赛

默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.2 质粒构建与转化

依据 NCBI 的铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的 *lasI* 基因序列和大肠杆菌 MG1655 的 NP\_416308.5 基因的启动子序列, 设计 2 对引物分别扩增 *lasI* 的 ORF (606 bp) 以及大肠杆菌启动子序列(155 bp), 分别包含 *Bam*H I 及 *Kpn* I 酶切位点(表 1)。

利用重叠 PCR 扩增出含启动子和 *lasI* 基因 ORF 的 DNA 片段, PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): PCR Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , 基因组模板(100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 98  $^\circ\text{C}$  4 min; 98  $^\circ\text{C}$  40 s, 58  $^\circ\text{C}$  30 s, 72  $^\circ\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  10 min。PCR 扩增产物纯化、回收备用。

以 *Bam*H I 及 *Kpn* I 酶切上述 PCR 产物及 pSTV28 载体, 回收目的片段及质粒, 连接、转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37  $^\circ\text{C}$  培养 16 h 后挑取单克隆。PCR 鉴定、测序为阳性的质粒命名为 pSTV28-*lasI*。

参照文献[13]进行感受态细胞的制备, 取 200  $\mu\text{L}$  感受态细胞与 10  $\mu\text{L}$  质粒混合于电击杯中, 2 500 V、250  $\Omega$  进行电击后迅速加入 800  $\mu\text{L}$  新鲜 LB 培养液, 37  $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 1 h 后涂布于氯霉素平板(30 ng/ $\mu\text{L}$ ), 37  $^\circ\text{C}$  培养过夜, 以 Pro-*Kpn* I-F/*lasI*-*Bam*H I-R 为引物对重组菌进行 PCR 鉴定。

### 1.3 AHLs 信号分子检测

参照文献[14]并作适当修改, 检测重组菌株 AHL 信号分子分泌情况。(1) 配置 ABM 固体培养基, 103.4 kPa 灭菌 15 min 后待冷却至 40  $^\circ\text{C}$ , 加入终浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  的 X-Gal 和 5% 的 OD<sub>600</sub> 为 1.0 的 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR<sub>4</sub>) 菌液, 充分混匀后制成指示平板, 37  $^\circ\text{C}$  静置 30 min。(2) 将待检测菌株 DE17、DE17-*lasI* 培养至对数后期, 分别取 3  $\mu\text{L}$  置于指示平板, 同时以铜绿假单胞菌 PAO1 作为阳性对照, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  作为阴性对照, 28  $^\circ\text{C}$  静置培养 12 h 后观察平板颜色变化。

### 1.4 生长曲线及运动性测定

参照文献[15-16]并作适当修改, 测定野生株与

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物<br>Primer           | 序列<br>Sequence (5'→3')        | PCR 产物<br>PCR product (bp) | GenBank 登录号<br>GenBank accession No. |
|------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Pro- <i>Kpn</i> I-F    | GGGGTACCTTATTGATCTCACATATT    | 155                        | NP_416308.5                          |
| Pro-R                  | GTACGATCATGGAACAACCTCCAGGATAC |                            |                                      |
| lasI-F                 | GAGTTGTTCCATGATCGTACAAATTGGT  | 606                        | NC_002516.2                          |
| lasI- <i>Bam</i> H I-R | CGGGATCCTCATGAAACCGCCAGTTCG   |                            |                                      |
| agn43-F                | GATGACGGTAAGGACAACGC          | 202                        | YP_026164.1                          |
| agn43-R                | GCTGAAGGTGCGGATAACAG          |                            |                                      |
| fimH-F                 | CTATACGGCGCTGCTTAACC          | 233                        | NP_418740.1                          |
| fimH-R                 | TTACGACCCGACAATCACCA          |                            |                                      |
| fliM-F                 | CGCTGGAAGTTGAGTACGTG          | 265                        | NP_416455.1                          |
| fliM-R                 | TATCGCGCCAGTTCTGATCT          |                            |                                      |
| motB-F                 | CGGCTGCTTATTCACCTCCC          | 209                        | NP_416403.1                          |
| motB-R                 | ATCTCCAGCCAAAAGAGCT           |                            |                                      |
| ompA-F                 | ACGCAGCTTATTGTACAGCG          | 266                        | NP_415477.1                          |
| ompA-R                 | CTTGCGGGCTTTCAATGACT          |                            |                                      |
| iss-F                  | ATTACGTCTGGTTTCGGT            | 254                        | YP_002527496.1                       |
| iss-R                  | AACGCACACCACATACAC            |                            |                                      |
| flhA-F                 | ATGCTCATGCCATGTTGCAG          | 222                        | NP_415543.1                          |
| flhA-R                 | TAAGTTTGTTTCGCGGCGATG         |                            |                                      |
| sdiA-F                 | AAACGCATCAGAGCCATCAG          | 107                        | NP_416426.1                          |
| sdiA-R                 | TTGTCCTTTTCCCGTTGCAG          |                            |                                      |
| dnaE-F                 | TGATGCCGTAGGTCCGAC            | 256                        | NP_414726.1                          |
| dnaE-R                 | GTTATCAACCAGATGGGC            |                            |                                      |

重组菌株的生长曲线。参照文献[16], 配制涌动培养基以检测野生株 DE17 与重组菌株 DE17-lasI 的运动性, 分别取培养至  $OD_{600}$  为 1.0 的野生株 DE17 和重组菌株 DE17-lasI 菌液各 5  $\mu$ L, 滴于涌动培养基中央, 37  $^{\circ}$ C 静止培养 6–8 h 后统计培养基中的运动半径。

### 1.5 耐药性测定

采用 K-B 法检测细菌耐药性, 测定野生株和重组菌株对阿奇霉素、大观霉素、环丙沙星、甲氧苄啶、卡那霉素、利福平、庆大霉素、四环素、头孢吡肟、头孢噻吩、头孢曲松、头孢他啶等 12 种抗生素的耐药性。取培养至  $OD_{600}$  为 0.4 的 DE17 和 DE17-lasI 菌液各 100  $\mu$ L, 涂布于 LB 平板, 将药敏纸片置于平板表面后 37  $^{\circ}$ C 静止培养 8 h, 测量各药敏纸片的抑菌圈直径, 参照 CLSI 标准判定其敏感性。

### 1.6 生物被膜形成能力检测

参照文献[17], 在 96 孔细胞培养板中加入  $OD_{600}$  为 1.0 的 DE17 和 DE17-lasI 菌液各 200  $\mu$ L, 用等量的 M9 培养基作阴性对照, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h。弃去培养液并用无菌 PBS 洗涤 2 次, 加入 200  $\mu$ L

的 0.1% 结晶紫后 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 自然风干。每孔加 200  $\mu$ L 95% 乙醇静置 15 min 后, 酶标仪测定  $OD_{595}$  值。

### 1.7 相关基因转录水平检测

参照文献[18-19], 选取细菌毒力基因: I 型菌毛 H 亚基(*fimH*)、促血清存活因子(*iss*)、外膜蛋白 A (*ompA*), 与运动性相关基因: 运动蛋白 B (*motB*)、鞭毛马达开关蛋白(*fliM*)、鞭毛合成基因(*flhA*), 与生物被膜形成相关基因: 自黏附素(*agn43*)、外膜多糖输出蛋白(*wza*), 以及 AHL 受体蛋白基因(*sdiA*) 进行 Real-time PCR, 分析重组菌株与野生株相关基因的转录差异。

依据文献[19]方法, 将上述菌株培养至对数前期 ( $OD_{600}=1.00$ ), 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 为模板进行 RT-PCR。RT-PCR 反应体系(20  $\mu$ L): SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (0.5  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 (1.5 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 2 min;

95 °C 5 s, 60 °C 10 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析并计算目的基因的转录水平<sup>[20]</sup>。

### 1.8 统计分析

所有统计分析均使用 SPSS V19。单因素方差分析用于评估数据差异,  $P < 0.05$  认为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒构建及转化

将包含大肠杆菌启动子序列(155 bp)和 *lasI* 基因 ORF (606 bp) 的 PCR 产物与 pSTV28 质粒连接、转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对疑似阳性克隆进行 PCR 鉴定。以 Pro-*Kpn* I-F/Pro-R 为引物, 扩增大小约为 155 bp 的启动子片段(图 1 泳道 1); 以 *lasI*-F/*lasI*-BamH I-R 为引物, 扩增大小约为 606 bp 的 *lasI* 基因片段(图 1 泳道 3)。以 Pro-*Kpn* I-F 及 *lasI*-BamH I-R 为引物, 扩增大小约为 761 bp 的目的片段(图 1 泳道 5)。测序结果表明成功构建含 *lasI* 基因的重组质粒 pSTV28-*lasI*。

将 pSTV28-*lasI* 电转至 DE17 中, 以 Pro-*Kpn* I-F 及 *lasI*-BamH I-R 为引物, 进行 PCR 鉴定, 成功获得含有 pSTV28-*lasI* 的重组菌株 DE17-*lasI* (图 1 泳道 7)。

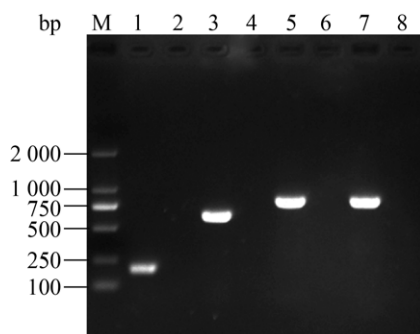


图 1 PCR 鉴定结果

Figure 1 The results of PCR detection

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 大肠杆菌启动子 PCR 鉴定; 3: *lasI* 基因 ORF PCR 鉴定; 5: 重组质粒 pSTV28-*lasI* 鉴定; 7: 重组菌株 DE17-*lasI* 鉴定; 2, 4, 6, 8: 阴性对照。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: *E. coli* promoter; 3: *lasI* ORF; 5: Plasmid pSTV28-*lasI*; 7: Recombinant strain DE17-*lasI*; 2, 4, 6, 8: Negative control.

### 2.2 AHLs 信号分子检测

对 DE17 与 DE17-*lasI* 的 AHL 信号分子检测结果表明, 重组菌株 DE17-*lasI* 能够使指示平板显示蓝色, 与阳性对照一致, 而野生株 DE17 则不能显示蓝色(图 2), 表明 *lasI* 在 DE17 中参与合成 AHL 信号分子。

### 2.3 生长曲线及耐药性

对 DE17 与 DE17-*lasI* 生长曲线及耐药性测定结果表明, *lasI* 对 DE17 的生长及耐药性没有显著影响( $P > 0.05$ ) (图 3)。

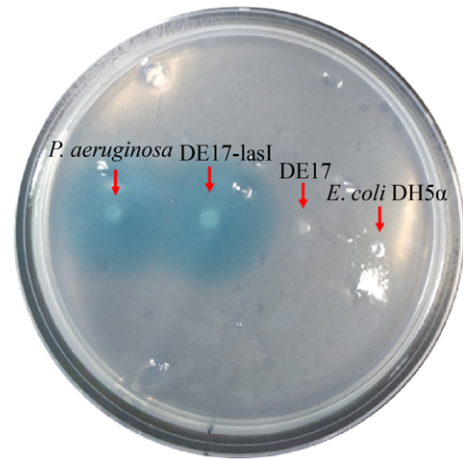


图 2 AHL 信号分子检测结果

Figure 2 The result of AHL

注: 蓝色表示能够产生 AHL 分子(如 *P. aeruginosa*, DE17-*lasI*), 无颜色变化则表明无 AHL 分子产生(如 DE17、*E. coli* DH5 $\alpha$ )。

Note: The strains that could produce AHL molecules (such as *P. aeruginosa*, DE17-*lasI*) are blue. No color changed indicated that no AHL molecules produced by bacteria (such as DE17, *E. coli* DH5 $\alpha$ ).

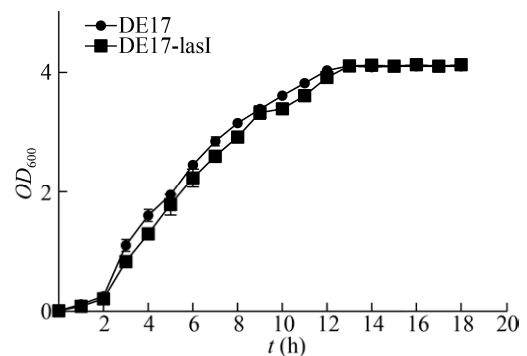


图 3 DE17 与重组菌株 DE17-*lasI* 生长曲线测定

Figure 3 Growth curve detection of DE17 and DE17-*lasI*

## 2.4 运动性检测

运动性检测结果表明,野生株 DE17 的运动半径为  $11.0 \pm 0.3$  mm,而 DE17-lasI 的运动半径为  $8.0 \pm 0.5$  mm, *lasI* 显著降低 DE17 的运动性 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。

## 2.5 生物被膜形成能力检测

生物被膜检测结果表明,重组菌株 DE17-lasI 的生物被膜形成能力与野生株相比显著降低 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。

## 2.6 相关基因转录水平检测

对 DE17 和 DE17-lasI 基因转录水平检测结果表明,与野生株 DE17 相比,DE17-lasI 的毒力因子 *fimH* 转录水平上调了约 58.8 倍,而 *ompA* 和 *iss* 的转录水平分别下调了约 95.4% 和 77.3%;生物被膜形成相关基因中自识别抗原 *agn43* 下调了约 75%,而外膜多糖输出蛋白 *wza* 无明显变化。鞭毛合成基因 *flhA* 转录水平下调了约 80.8%,而鞭毛马达开关蛋白 *fliM* 和运动蛋白 *motB* 并无明显变化。此外,AHL 受体蛋白 *sdiA* 的转录水平上调了 19.8 倍(图 6)。

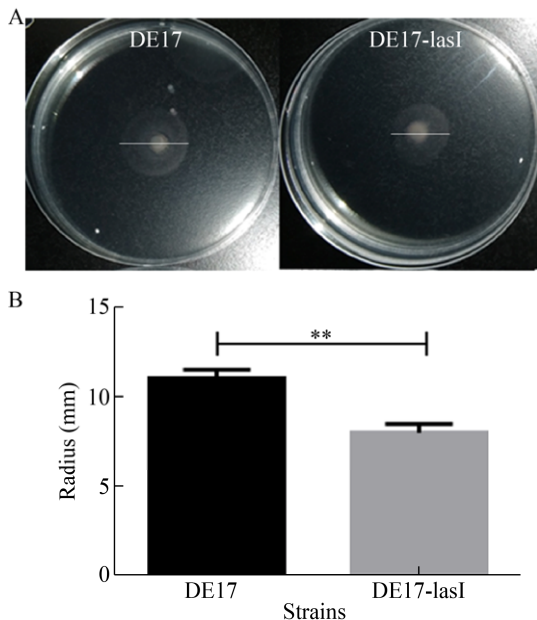


图 4 运动性分析

Figure 4 Motility analysis of DE17 and DE17-lasI

注: A: 运动半径表示运动能力的强弱. B: 运动半径数据分析. \*\*:  $P < 0.01$

Note: A: The radius represent the ability of bacterial motility. B: Data analysis of motility radius; \*\*:  $P < 0.01$ .

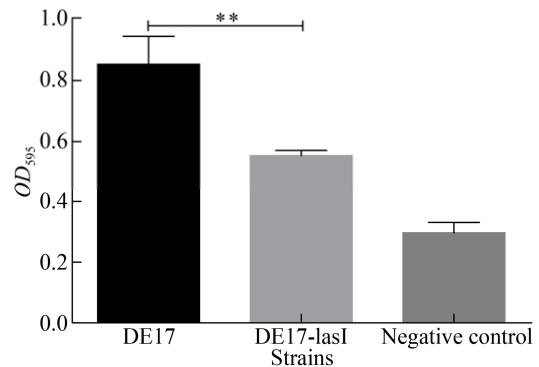


图 5 生物被膜形成能力检测

Figure 5 Biofilm formation ability

Note: \*\*:  $P < 0.01$ .

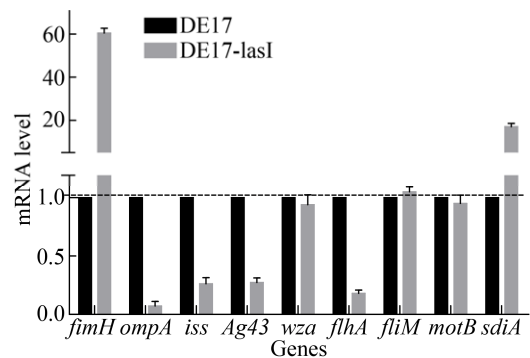


图 6 毒力、生物被膜、运动性相关基因的转录水平

Figure 6 Transcription level of virulence, biofilm and motility-related genes

## 3 讨论与结论

群体感应是细菌通过分泌信号分子来调控其不同生物学功能的一种群体行为。群体感应参与调控细菌多种生物学特性,包括生物被膜、耐药性、运动性以及毒力因子的表达和生物素的合成<sup>[21]</sup>。在大多数革兰阴性细菌中存在典型的 LuxI/LuxR 型 QS 系统,其信号分子 AHL 由 LuxI 合成后,与受体 LuxR 结合进而调控下游基因的表达。在大肠杆菌和沙门菌中未发现 AHLs 合成酶,但却存在 LuxR 同源蛋白 SdiA。Yang 等<sup>[22]</sup>研究表明,猪肠道内分离株产生的 AHL 分子能与同时分离的大肠杆菌发生互作,导致大肠杆菌中 SdiA 蛋白被激活,而调控其鞭毛基因转录水平的下调。在铜绿假单胞菌中, LasI 作为 LuxI 同源物,能合成 AHL 分子,

并激活转录调控因子 LasR, 从而调控其毒力因子的表达以及生物被膜形成能力等<sup>[23]</sup>。

禽致病性大肠杆菌也存在 SdiA 蛋白, 但其 AHL 合成基因及 AHL 对其生物学特性的影响尚未见相关报道。本研究通过在 DE17 中导入铜绿假单胞菌 *lasI*, 运用 *A. tumefaciens* NTL4(pZLR<sub>4</sub>) 报告菌株检测 AHL 信号分子的方法, 证明 *lasI* 在 DE17 中能够产生 AHL 信号分子。然而重组菌株 DE17-*lasI* 的生物被膜形成能力显著降低, 与在铜绿假单胞菌中 *lasI* 对其生物被膜的形成作用相反<sup>[24]</sup>。推测其可能原因为: SdiA 作为转录调控因子, 可结合下游基因的启动子区域, 从而调控细菌的生物学特性。研究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*、鞭毛结构蛋白 *fliC* 及 Curlin 菌毛合成亚基 *csgA*) 转录水平上调, 且生物被膜的形成及运动能力增强。而在本研究中, APEC 中导入 *lasI* 后, SdiA 的转录水平上调了约 19.8 倍, 可能通过抑制生物被膜等相关基因(如 *agn43*) 的转录而降低其生物被膜的形成。此外, 上述结果提示 *sdiA* 可能对细菌的生物被膜形成具有负调控作用, 其具体机制仍有待进一步研究。

此外, LasI 显著降低了 DE17 的运动性, 而 *fliM* 和 *motB* 的转录水平无明显变化, 但 *flhA* 的转录水平下调了 80.8%, 推测 LasI 可能通过降低 *flhA* 转录水平进而调控其鞭毛的合成, 从而调控 DE17 的运动性。FimH 是大肠杆菌的菌毛黏附素, 与细菌对宿主的黏附作用相关, 本研究中 *fimH* 上调了约 58.8 倍, 推测 *lasI* 可能参与调控 APEC 对宿主细胞的黏附。OmpA 和 Iss 在参与细菌抵抗宿主清除及促进细菌在血清中的存活起着重要作用<sup>[25]</sup>, 本研究结果显示, 导入 *lasI* 后使 *ompA* 和 *iss* 转录水平下调, 表明 *lasI* 可能负调控 APEC 致病性, 推测 APEC 不合成 AHL 可能更有利于其对宿主的感染和致病特性, 其具体机制需要进一步开展研究。

本研究结果表明, 转化 *lasI* 至 APEC 中能促进其在 APEC 中合成 AHL 信号分子, 并显著影响 APEC 的部分生物学特性, 这可为进一步探讨 AHLs 型群体感应系统对 APEC 的调控作用提供参考。

## REFERENCES

- [1] Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, et al. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 22
- [2] Bai H, Han XG, Liu L, et al. The regulation of autoinducer-2 in Avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(24): 5110-5116 (in Chinese)  
白灏, 韩先干, 刘蕾, 等. 信号分子 AI-2 对禽致病性大肠杆菌的调控作用[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(24): 5110-5116
- [3] Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588
- [4] Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(9): 3000-3009
- [5] Culler HF, Couto SCF, Higa JS, et al. Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Genes*, 2018, 9(5): 253
- [6] Styles MJ, Blackwell HE. Non-native autoinducer analogs capable of modulating the SdiA quorum sensing receptor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2018, 14: 2651-2664
- [7] Smith JL, Fratamico PM, Yan X. Eavesdropping by bacteria: the role of SdiA in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium quorum sensing[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(2): 169-178
- [8] Lu Y, Zeng JM, Wang LJ, et al. Antibiotics promote *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* conjugation through inhibiting quorum sensing[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(12): e01284-17
- [9] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [10] Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(8): 1913-1928
- [11] He ZY, Liang JP, Zhou W, et al. Effect of the quorum-sensing *luxS* gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*[J]. *European Journal of Oral Sciences*, 2016, 124(3): 234-240
- [12] Cheng FF, Ma AZ, Zhuang GQ, et al. Exogenous *N*-acyl-homoserine lactones enhance the expression of flagella of *Pseudomonas syringae* and activate defence responses in plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(1): 104-115



- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [14] Zhang GS, Zhang F, Ding G, et al. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon[J]. The ISME Journal, 2012, 6(7): 1336-1344
- [15] Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2011, 9: 34
- [16] Kim YJ, Im SY, Lee JO, et al. Potential swimming motility variation by AcrR in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(10): 1824-1828
- [17] Coffey BM, Anderson GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate[A]/Filloux A, Ramos JL. Pseudomonas Methods and Protocols[M]. New York, NY: Humana Press, 2014: 631-641
- [18] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(1): 26-38
- [19] O'Neill J, Roujeinikova A. Cloning, purification and crystallization of MotB, a stator component of the proton-driven bacterial flagellar motor[J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2008, 64: 561-563
- [20] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108
- [21] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures[J]. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 197-222
- [22] Yang Y, Yao FH, Zhou MX, et al. F18ab *Escherichia coli* flagella expression is regulated by acyl-homoserine lactone and contributes to bacterial virulence[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 165(3/4): 378-383
- [23] Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(6): 1053-1064
- [24] Mukherjee S, Moustafa D, Smith CD, et al. The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(7): e1006504
- [25] Wang Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 292(2): 396-401

(上接 p.3324)

## 征 稿 简 则

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文：凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文，请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本)，申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权：(1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品，享有自主知识产权，无抄袭问题；文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过，并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题；论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题；全部数据真实可靠，且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题，编辑部调查核实后可随时终止流程，已发表的将发布公告公开撤销发表，并将作者列入黑名单，本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章，所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议，敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工，但如涉及内容的大量改动，将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表：(1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件，一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因，作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后，作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿，编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单，稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准，对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用，将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/swsxtbcn>