

rmlA 基因缺失影响禽致病性大肠杆菌的生物被膜形成

韩月, 韩先干*, 白灏, 王少辉, 孟庆美, 丁铲, 于圣青*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要:【目的】构建禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)*rmlA* 基因缺失株, 研究该缺失株的生物学特性。【方法】利用 Red 重组系统构建 *rmlA* 缺失株; 比较野生株与缺失株在生长特性、运动性和生物被膜形成能力等方面的差异; 运用 Real-time PCR 技术, 比较野生株与 *rmlA* 缺失株对 APEC 部分毒力基因转录的影响。【结果】*rmlA* 缺失株, 不影响 APEC 的生长和运动特性, 但生物被膜形成能力显著增强, 且使 *luxS*、*irp2* 基因转录水平分别上调 2 倍、1.8 倍, *iucD*、*fyuA* 则下调 25 倍。【结论】APEC 的 *rmlA* 基因可以影响禽致病性大肠杆菌的生物被膜形成能力及部分毒力基因的转录水平; 而对 APEC 的生长、运动特性没有影响。

关键词: 禽治病性大肠杆菌, *rmlA* 基因, 基因缺失, 生物被膜, Real-time PCR

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1056-07

禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌引起的禽类不同疾病的总称, 其病原复杂, 血清型众多, 临床症状和病理变化多变, 且多与病毒性疾病和其他细菌性疾病并发, 给养禽业生产带来重大损失^[1]。

影响 APEC 致病性的毒力因子包括: 黏附素、外膜蛋白和摄铁系统等。这些毒力因子在大肠杆菌侵袭宿主的过程中起重要作用^[2]。此外, 研究表明大肠杆菌的内毒素可以与上述毒力因子产生协同效应, 增强对宿主的致病作用。Kaitiyar 等给 10–16 周龄来航鸡皮内注射大肠杆菌内毒素, 结果发现, 内毒素可引起产蛋鸡急性死亡, 病变以出血性坏死和血管内凝血为特征^[3]。脂多糖 LPS 是 APEC 的一个重要致病因子且是内毒素的主要成分^[4]。*rmlA* 基因编码 D-1-葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶, 是 L-鼠李糖合成中的重要基因, 参与 LPS 中 O 抗原的合成。在

对结核分枝杆菌的 *rmlA* 基因进行缺失后, 发现缺失株因缺乏 D-葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶, 而影响其生长和细胞形态, 这提示 *rmlA* 基因或许可作为抗结核新药的靶基因^[5]。而 *rmlA* 基因在 APEC 中的作用如何, 目前国内外尚未开展该方面的研究。

因此, 本研究拟利用 Red 同源重组系统构建禽致病性大肠杆菌 DE169 中的 *rmlA* 基因缺失株, 研究该基因是否会影响 APEC 的生物学特性。为进一步研究该基因在禽致病性大肠杆菌中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 载体、菌株、试剂

禽致病性大肠杆菌 DE169 株(DE169), 为本实

基金项目: 国家自然科学基金(31001078, 31370045, 31072161)

* 通信作者。于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; 韩先干, Tel: +86-21-34293412, E-mail: hanxgan@163.com

作者简介: 韩月(1989–), 女, 河南省辉县人, 硕士研究生, 主要从事兽医微生物方面的研究。E-mail: hzdxy2000@126.com

收稿日期: 2013-03-19; **修回日期:** 2013-05-20

验室 2008 年分离自安徽巢湖病鸭肝脏,对 7 日龄樱桃谷雏鸭的半数致死量为 3.65×10^7 CFU。限制性内切酶 *Sal*II, DNA ligation Kit Ver. 2.0 购自大连 TaKaRa 有限公司。L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司。pZero-Bank/blunt vector、大肠埃希氏菌 DH5 α , TOP10,质粒小量提取试剂盒均购自天根生化有限公司。SYBR Gree PCR Master Mix 和反转录试剂盒购于美国 Promega 公司。DNA-free kit 购于 Ambion 公司。DNA marker、PCR MasterMix 购自北京康为世纪公司。96 和 6 孔细胞板,购自美国 Corning 公司。

表 1. PCR 扩增所用的引物序列
Table1. Primers used for PCR in this study

Primers	Prime sequences(5'→ 3')	Size/bp	Restriction site
rmlA-F	CCGGAATTCATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTT	879	<i>Eco</i> R I
rmlA-R	CCGGAATTCCTTAATAACCTTTAATCATTTCAG		
rmlA-UF	GGCTCACACCGCAGTAGATAAGGCT	905	
rmlA-UR	TCAGTGTAGAAAAGCGGATAATAGAT		
rmlA-DF	TGGTTAGACACGGGGACAC	1074	
rmlA-DR	TATTCTTTGTCTCTCTATTCTGTG	522	
rmlA-F1	GTTAGCGGGTATTTCGCGATATTCTG		
rmlA-R1	CCCCATCATGGCAACAGATAAACG		
rmlA-IF	ACCAACAACCTGCCTATCCTACACCA	1235	<i>Sal</i> I
rmlA-IR	CCTGAACAAATTCAACTTTGCGGCC		
pkD4-salI-F	CGCGTCGACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	1476	
pkD4-salI-R	CGCGTCGACCATATGAATATCCTCCTTAG		

1.3 缺失载体的构建

分别用引物 rmlA-UF/rmlA-UR、rmlA-DF/rmlA-DR 和 pKD4-SalI-F/pKD4-SalI-R 扩增长度为 905 bp 的 *rmlA* 上游序列、长度为 1047 bp 的下游序列以及长度为 1476 bp 的卡那霉素抗性片段。连接上下游片段到 zero-bank 质粒上,构建 zero-bank-Up-Down 重组质粒。*Sal* I 酶切 zero-bank-Up-Down 和卡那抗性片段,酶切产物回收、纯化后,用 T4 酶连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,提取 zero-bank-Up-Km-DR 重组质粒。以构建的 zero-bank-Up-Km-DR 重组质粒为模板,用引物 rmlA-UF/rmlA-DR 扩增含有卡那抗性片段的的目的片段 Up-Km-Down,切胶回收,将回收片段电转化入含有 pKD46 的 DE169 野生菌株中,进行缺失株的构建。

1.4 缺失株的构建及抗性基因的敲除

参照文献进行感受态细胞的制备^[6],利用 Red 同源重组方法进行 *rmlA* 基因的敲除(图 1)。取纯化好的目的片段约 500 ng 与 100 μ L 感受态细胞混合,将混合物转入 0.2 cm 的 Bio-Rad 电极杯中,进行

LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kits 和 Trizol 均购自 Invitrogen 公司。0.22 μ m 的滤器,购自美国 Millipore 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank (NC_008563.1) 公布的 APEC *rmlA* 基因序列,分别设计用于扩增 *rmlA* 上、下游序列的 2 对引物 rmlA-UF/rmlA-UR 和 rmlA-DF/rmlA-DR。设计用于鉴定 *rmlA* 基因缺失株的 3 对引物: rmlA-F1/rmlA-R1, rmlA-IF/rmlA-IR 和 pKD4-SalI-F/pKD4-SalI-R。

电转化。在电压 2.5 kV,电阻 200 Ω ,脉冲 25 μ F 的参数下进行电击,电击后迅速加入 900 μ L SOC 培养基,200 r/min,37 $^{\circ}$ C 培养 45 min 后涂于卡那 LB 平板(卡那霉素浓度为 50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h,PCR 鉴定挑取的卡那抗性克隆。

1.5 生长曲线及运动性测定

参照 Chatterjee S 的方法^[7]测定野生株和缺失株的生长曲线。参照文献[8]配制泳动 (swimming) 培养基 (1% trytone, 0.5% NaCl, 0.8% glucose, 0.3% agar),取生长至 $OD_{600} = 1.0$ 的野生株 DE169 和缺失株 DE169- Δ rmlA 各 10 μ L 滴于板子中间,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h,观察细菌从中央向周围的运动情况。

1.6 生物被膜检测

参照 Kim 的方法^[9],在无菌 96 孔细胞培养板 (corning) 中加入 $OD_{600} = 0.1$ 的 DE169 和 DE169- Δ rmlA 菌液各 200 μ L,用等量的液体 LB 作阴性对照,37 $^{\circ}$ C 培养 36 h;弃去培养液并用灭菌 PBS 洗涤 3 次,自然风干;每孔加 100 μ L 0.1% 结晶紫染色

30 min,再用 PBS 洗涤 3 次,自然风干;每孔加 200 μ L 95% 乙醇溶解后,酶标仪测定 OD_{595} 。

参照文献[10],在 6 孔细胞培养板中,放入无菌的飞片,接种 $OD_{600} = 0.1$ 的 DE169、DE169- Δ rmlA 菌液,每孔加入 4 mL,每组重复 3 孔,对照组为空白 LB 培养基。培养 36 h 后,弃去培养物,用 PBS 洗 3 次,用 LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kits 进行染色,每孔加入 200 μ L,避光孵育 15 min, PBS 洗 3 次,将飞片放入载玻片,荧光显微镜观察细菌的生物被膜形成情况。

1.7 RNA 水平检测野生株和缺失株毒力基因转录情况

参照 Han XG 的方法^[11]用 Trizol 法进行 RNA 的提取。参照本实验室选取并设计的禽致病性大肠杆菌毒力基因 *pfs*, *ompA*, *vat*, *luxS*, *tsh*, *fuyA*, *iucD*, *iss* 等^[12]和看家基因 *dnaE* 引物^[13]。引物均由上海英俊生物技术有限公司合成(表 1)。反应体系 20 μ L: Real time PCR Master Mix 10 μ L,上游引物(-F)、下游引物(-R) (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L,模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。扩增条件:50℃ 2 min,95℃ 10 min; 95℃ 15 s,60℃ 1 min,循环 40 次。重复 3 次后采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) 法^[14]分析数据,计算毒力基因 mRNA 转录水平。

2 结果

2.1 *rmlA* 缺失株的构建及鉴定

对疑似缺失株用引物 pkD4-salI-F/pkD4-salI-R 进行 PCR 鉴定,结果表明,疑似缺失株可以扩增出卡那抗性片段(图 2 泳道 1),而野生株则没有扩增出条带(图 2 泳道 2),阴性对照也未扩增出条带(图 2 泳道 3)。

对疑似缺失株用引物 rmlA-F1/rmlA-R1 进行 PCR 鉴定,结果表明,疑似缺失株未扩增出条带(图 2 泳道 4),而野生株扩增出大小为 522 bp 的片段(泳道 5),阴性对照也未扩增出条带(泳道 6)。

对疑似缺失株用引物 rmlA-IF/rmlA-IR 进行 PCR 鉴定,结果表明,疑似缺失株可扩增出大小为 2139 bp 的片段(图 2 泳道 7),而野生株扩增的片段大小为 1235 bp(图 2 泳道 8),阴性对照也未扩增出条带(图 2 泳道 9)。

PCR 鉴定结果表明,含有卡那霉素抗性的

DE169- Δ rmlA 缺失株构建成功。

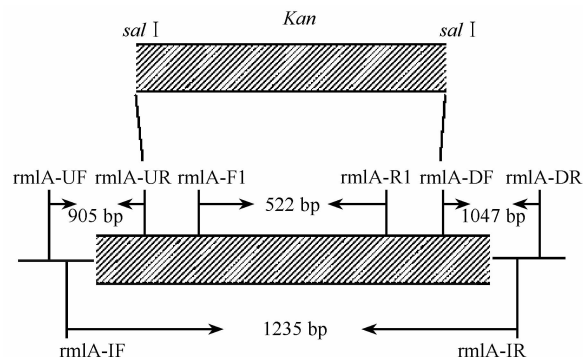


图 1. DE169- Δ rmlA 缺失株构建技术路线图

Figure 1. Schematic chart of the strategy for generating the mutant strain DE169- Δ rmlA.

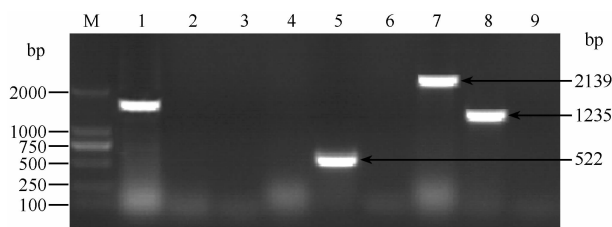


图 2. 含抗性缺失株的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of the knockout strain with Kan resistant gene by PCR. M: DL2000 DNA molecular; lane 1, 4, 7: kanamycin-resistant clones; lane 2, 5, 8: wild type strain DE169; lane 3, 6, 9: negative control.

2.2 *rmlA* 缺失株的抗性消除

电转 pCP20 到卡那抗性缺失株中,28℃ 培养 8 h 后,提高到 42℃ 过夜培养,通过温度的转换诱导 FLP 重组酶的表达,划线接种于固体 LB 培养基后,挑取单克隆点,进行卡那霉素抗性的鉴定。

用 rmlA-IF/rmlA-IR 引物进行 PCR 扩增结果野生型扩增出 1235 bp 的片段(图 3 泳道 4),而缺失株则扩增出大小为 713 bp 的片段(图 3 泳道 5),阴性对照未扩增出条带(图 3 泳道 6)。

用 rmlA-F1/rmlA-R1 引物扩增,结果野生株扩增出大小为 522 bp 的片段(图 3 泳道 7),而缺失株则没有扩增出条带(图 3 泳道 8),阴性对照未扩增出条带(图 3 泳道 9)。PCR 鉴定结果表明,成功获得了不含有 Kan 抗性的 APEC *rmlA* 基因缺失株,并命名为 DE169- Δ rmlA(图 3)。

2.3 生长曲线及运动性检测

用 LB 培养基培养细菌,对野生株 DE169 和缺

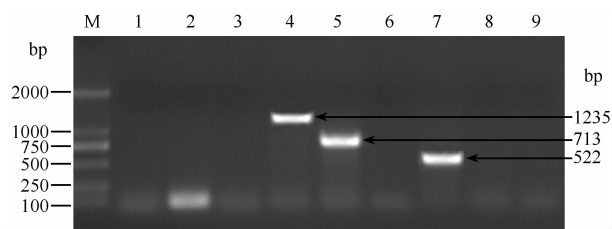


图 3. 卡那抗性基因消除的 PCR 鉴定图

Figure 3. Identification of the knockout strain without Kan resistant cassette by PCR. M: DL2000 DNA molecular; lane1, 4, 7: wild type DE169; lane2, 5, 8: the knockout strain DE169-Δ*rmlA*; lane 3, 6, 9: negative control.

失株 DE169-Δ*rmlA* 的生长和运动能力进行测定,重复 3 次,绘制生长曲线图并对其运动直径进行测量 ($P>0.05$),结果表明,*rmlA* 基因缺失后对 APEC 的生长和运动能力均没有影响。

2.4 生物被膜检测

生物被膜检测结果表明,*rmlA* 基因缺失后其生物被膜形成能力增强,是野生株的 1.78 倍(图 4),差异极显著 ($P<0.01$)。

对生物被膜进行荧光染色时发现,缺失株在荧光显微镜下观察为大量的细菌相互缠绕聚集在一起,形成一个致密的结构,相对于野生株 DE169 生物被膜要明显浓密(图 5)。

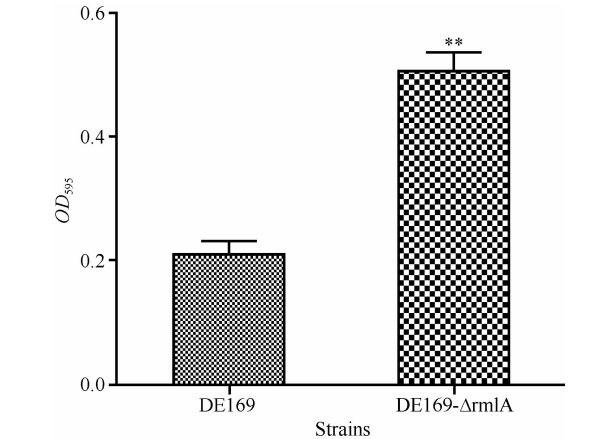


图 4. *rmlA* 对 APEC 生物被膜形成的影响

Figure 4. The effects of *rmlA* on biofilm formation of APEC.

2.5 相关毒力基因 mRNA 水平转录情况

对野生株 DE169 和缺失株 DE169-Δ*rmlA* 毒力基因的 mRNA 转录水平分析显示,*rmlA* 基因缺失后 *luxS*、*irp2* 基因转录水平分别上调 2 倍、1.6 倍;*iucD*、*fyuA* 均下调 25 倍;而其他基因的转录水平则无明显变化(表 2)。

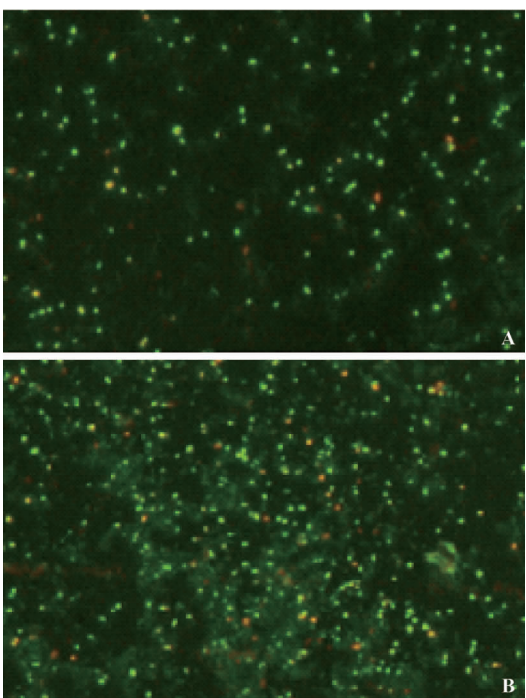


图 5. 36 h 生物被膜的荧光照片 (200 ×)

Figure 5. Fluorescence microscope image of APEC biofilm at 36 h (200 ×). A: DE169; B: DE169-Δ*rmlA*.

表 2. 部分毒力基因在 DE169 和 DE169-Δ*rmlA* 中的转录水平

Table 2. Evaluation of transcriptional levels of selected virulent genes in DE169 and DE169-Δ <i>rmlA</i>			
Gene	The level of mRNA		p value
	DE169	DE169-Δ <i>rmlA</i> (Mean ± SD)	
<i>luxS</i>	1	2 ± 0.09	0.007
<i>irp2</i>	1	1.6 ± 0.13	0.002
<i>ompA</i>	1	0.6 ± 0.00	0.0001
<i>pfs</i>	1	0.85 ± 0.04	0.0068
<i>ibeA</i>	1	0.3 ± 0.49	0.15
<i>tsh</i>	1	0.8 ± 0.19	0.29
<i>iucD</i>	1	0.04 ± 0.007	1.89 × 10 ⁻⁹
<i>fyuA</i>	1	0.04 ± 0.016	5.58 × 10 ⁻⁸
<i>vat</i>	1	0.7 ± 0.295	0.64
<i>fimC</i>	11.07 ± 0.153		0.875

3 讨论

本试验利用 Red 同源重组方法成功构建了 *rmlA* 缺失株,并对其生物学特性进行分析,结果表明 *rmlA* 基因的缺失并不影响 APEC DE169 菌株的生长,这与文献报道的 *rmlA* 基因缺失后可以影响结核分枝杆菌的生长并不相同^[5],分析其原因可能是:(1)菌株差异造成的:由于菌株不同,推测鼠李

糖对 APEC 的生长不起关键作用,在 APEC 中可能存在其他的糖合成路径,来代偿因 *rmlA* 基因缺失导致的鼠李糖合成缺陷;(2)在 APEC 中,除了 *rmlA*,可能还有其他基因参与鼠李糖的合成。除了影响细菌的生长,鼠李糖还参与细菌的群集运动。但本试验中将 APEC *rmlA* 基因敲除后并未影响菌株运动形态和运动能力,具体机制仍有待进一步的研究。

本试验通过结晶紫染色法和荧光染料染色对 APEC 野生株和 *rmlA* 缺失株的生物被膜形成能力进行检测,表明缺失株生物被膜形成能力较野生株增强。研究表明,细菌群体感应系统(QS)在生物被膜的形成过程中起着重要作用^[15]。受 QS 调节的胞外多糖、表面活性剂、鼠李糖脂、黏附因子的合成以及细菌的运动性等,参与细菌生物被膜形成的多个阶段^[16-18]。其中,高水平的鼠李糖脂可以阻碍生物被膜的形成^[19]。而 *rmlA* 是参与鼠李糖合成的重要基因^[5],因此可能是 *rmlA* 基因的缺失降低了鼠李糖脂的合成从而导致了其生物被膜形成能力增强。此外,*luxS* 基因是细菌群体感应系统(QS)中的重要基因,*luxS* 基因对细菌的生物被膜具有重要的调控作用,在表皮葡萄球菌中,*luxS* 基因缺失株形成生物被膜能力高于野生株^[20],在变形链球菌中,*luxS* 基因缺失后生物被膜形成量较野生株明显减少^[21]。在本研究中,*rmlA* 基因缺失后可以使 *luxS* 基因转录水平上调。因此,可能是 *rmlA* 基因通过影响 *luxS* 调控的 QS 来影响缺失株生物被膜形成能力。

irp2 基因是耶尔森菌强致病性毒力岛(HPI)中的保守基因,作为铁调节基因,仅存在于强致病株中^[22]。此外,本试验室前期研究结果表明,*luxS* 在 APEC 的致病过程中发挥重要作用^[23]。*fyuA* 基因是 HPI 中的鼠疫菌素受体基因,*iucD* 是产气杆菌素基因,两者均与铁的运输及利用有关,组成细菌的铁摄取系统,在 APEC 的致病性和持续感染中,特别是深部组织损伤中发挥重要的作用。本试验中 *rmlA* 基因的缺失导致 *luxS* 和 *irp2* 转录水平上调,*fyuA* 和 *iucD* 转录水平显著下调,*rmlA* 的缺失能否能导致 APEC 毒力的变化及其对铁摄取功能的影响,仍有待进一步研究。

本研究对 APEC 的 *rmlA* 基因缺失株的生物学特性进行了分析,为进一步研究 *rmlA* 基因的功能提供参考。

参考文献

- [1] Rojas TC, Parizzi LP, Tiba MR, Chen L, Pereira GA, Sangal V, Yang J, Yu J, Silverira WD. Draft genome of a brazilian avian-pathogenic *Escherichia coli* strain and in silico characterization of virulence-related genes. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(11):3023.
- [2] Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, Lu C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1):279-287.
- [3] Katiyar AK, Vegad JL, Awadhiya RP. Increased vascular permeability and leucocyte emigration in *Escherichia coli* endotoxin in jury in the chicken skin. *Research in Veterinary Science*, 1992, 52(2): 154-161.
- [4] Erridge C, Bennett-Guerrero ER, Poxton I. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 2002, 4(8): 837-851.
- [5] Qu H, XinY, Dong X, Ma Y. An *rmlA* gene encoding D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase is essential for mycobacterial growth. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275 (2): 237-243.
- [6] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [7] Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9: 34-41.
- [8] Ling H, Kang A, Tan MH, Qi X, Chang MW. The absence of the *luxS* gene increases swimming motility and flagella synthesis in *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 401: 521-526.
- [9] Kim Y, Oh S, Park S, Seo JB, Kim SH. *Lactobacillus acidophilus* reduces expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors by inhibiting autoinducer-2-like activity. *Food Control*, 2008, 11 (19):1042-1050.
- [10] Wang Y, Zhang W, Wu Z, Lu C. Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of

- Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 316 (1): 36-43.
- [11] Han XG, Lu CP. Detection of autoinducer-2 and analysis of the profile of *luxS* and *pfs* transcription in *Streptococcus suis* serotype 2. *Current Microbiology*, 2009, 58(2):146-152.
- [12] Chen W, Han X, He L, Hu Q, Yu S. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2010, 18(2): 34-40. (in Chinese)
陈文静, 韩先干, 何亮, 胡青海, 于圣青. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及生物学特性分析. 动物传染病学报, 2010, 18(2): 34-40.
- [13] Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S and Eberl L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology*, 147(Pt9): 2517-2528.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11621-11626.
- [16] Davey ME, Caiazza NC, Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(3): 1027-1036.
- [17] Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infection and Immunity*, 2003, 71(7): 4206-4211.
- [18] Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12(6): 526-530.
- [19] Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger K. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for Rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(4): 918-931.
- [20] Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Vadyvaloo V, Wang J, Yao J, Yao Y, Otto M, Gao Q. Role of the *luxS* Quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 2005, 74: 488-496.
- [21] Yoshida A, Ansai T, Takehara TK, Kuramitsu H. *LuxS*-based signaling affects *Streptococcus mutans* Biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2372-2380.
- [22] De Almeida AM, Guiyoule A, Guilvout I, Guilvout I, Iteman I, Baranton G, Carniel E. Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microbial Pathogenesis*, 1993, 14(1): 9-21.
- [23] Han XG, Bai H, Liu L, Dong H, Liu R, Song J, Ding C, Qi K, Liu H, Yu SQ. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 2(55): 21-27.

rmlA gene deletion affects biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*

Yue Han, Xianghan Han*, Hao Bai, Shaohui Wang, Qingmei Meng, Chan Ding, Shengqing Yu*

Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

Abstract: [**Objective**] To characterize *rmlA* gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). [**Methods**] We constructed the *rmlA* mutant of APEC by the Red recombination system. Then we analyzed the differences of growth, movement and biofilm formation between mutant strain and wild strain. We compared the differences of virulence gene transcription between mutant strain and wild strain by real-time PCR. [**Results**] The *rmlA* mutant did not affect the growth and motility of APEC, but enhanced the biofilm formation significantly. In addition, the transcription level of some virulence genes in *rmlA* mutant showed that the *luxS*, *irp2* were raised 2 and 1.6 times respectively, but decreased the *iucD* and *fyuA* by 25 times compared to the wild strain. [**Conclusion**] These data indicate that the *rmlA* gene could strengthen the ability of APEC biofilm formation, and affect the transcription level of some virulence genes, but not the growth and motility.

Keywords: Avian Pathogenic *Escherichia coli*, *rmlA* gene, gene deletion, biofilm formation, Real-time PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31001078, 31370045, 31072161)

* Corresponding authors. Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; Xianghan Han, Tel: +86-21-34293412, E-mail: hanxgan@163.com

Received: 19 March 2013/Revised: 20 May 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。