



双组分系统 *rscC* 基因影响禽致病性大肠杆菌的致病性及相关生物学特性

王栋^{1,2}, 王少辉^{1*}, 张焕容², 刘新¹, 许漩¹, 易正飞¹, 田明星¹, 丁铲¹, 于圣青^{1*}

¹ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

² 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041

摘要:【目的】双组分系统 Rcs 感受外界环境变化, 并调控细菌的适应性及生存等。本文探讨 Rcs 双组分系统传感器激酶 RcsC 对禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)相关生物学特性及致病性的影响。【方法】采用 Red 同源重组的方法构建 *rscC* 基因缺失株, 并利用互补质粒构建互补株, 然后比较野生株、基因缺失株与互补株的生长特性、运动性、生物被膜、凝集沉淀能力、致病力及毒力基因转录水平的差异。【结果】*rscC* 基因缺失不影响 APEC 的生长速度, 然而, 缺失 RcsC 导致 APEC 的运动能力升高、生物被膜形成能力降低和凝集能力增强。凝集试验结果显示 *rscC* 基因有助于 APEC 的凝集沉降。细胞黏附入侵结果表明, *rscC* 在 APEC 侵袭 DF-1 细胞过程中发挥作用, 而对黏附能力无影响。动物感染试验结果表明 *rscC* 基因缺失能显著降低 APEC 的毒力。荧光定量 PCR 检测结果表明, *rscC* 基因缺失株中 *ompA*、*aatA*、*fyuA* 和 *luxS* 基因的转录水平均显著降低, 而 *fimC* 和 *tsh* 基因的转录水平显著升高。【结论】RcsC 参与调控 APEC 的运动性、生物被膜形成、凝集沉降和致病力。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 双组分系统, *rscC*, 生物学特性, 致病性

禽致病性大肠杆菌(APEC)可引起鸡、火鸡及其他禽类的大肠杆菌病, 其临床症状以气囊炎、心包炎、关节滑膜炎、输卵管炎、腹膜炎和败血症为主要特征。由于 APEC 复杂的血清型及广泛的耐药性, 严重制约禽大肠杆菌病的防控, 给养

禽业造成了巨大的经济损失^[1]。另外, 由于 APEC 和人源肠道外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)具有共同的毒力因子及类似的致病机制, 因此, APEC 可通过禽类及其产品传播给人类, 对人类健康及公共卫生造成潜在

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800); 国家自然科学基金(31572523)

*通信作者。王少辉, Tel: +86-21-34293412, E-mail: shwang0827@126.com; 于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-17; 修回日期: 2018-06-12; 网络出版日期: 2018-07-30

威胁^[2-4]。

细菌进化出多种分子调控系统调整细菌的营养代谢等,从而应对外界环境变化等不利条件。其中,双组分系统(two-component system, TCS)作为细菌的中枢信号传导途径,广泛存在于细菌、古生菌和真菌,其参与压力应激、耐药性及致病力等其他信号转导途径相关基因的表达。典型的TCS由位于跨膜区作为传感器的组氨酸蛋白激酶(histidine kinase, HK)和相应的位于细胞质的反应调节蛋白(response regulator, RR)组成。另外,许多TCS还含有额外的调控辅助蛋白,在蛋白磷酸化等过程发挥作用。组氨酸激酶的传感器结构能够感应各种环境变化,并将信号传递给反应调节蛋白使其活化,从而调控靶基因的转录表达^[5-6]。Rcs双组分系统广泛存在于肠杆菌科细菌中,其最初被鉴定为*cps*操纵子的调节因子,调控合成荚膜多糖可拉酸。Rcs是一个非典型的双组分系统,包括3个蛋白:传感器激酶RcsC(杂合激酶)、RcsD(包含组氨酸磷酸转移区域)和反应调控蛋白RcsB。研究表明,RcsC能够感受环境变化等信号,如高渗环境、膜不完整等,然后通过级联反应激活RcsB,调控靶基因的转录及表达,从而对环境的改变做出迅速适应性的调整。研究表明,Rcs双组分系统调控的靶基因主要与细菌细胞膜结构相关,表明Rcs磷酸化有助于细胞表面结构的修饰以应对外界环境的变化。Rcs双组分系统主要影响细菌的运动性、细胞分裂、生物膜形成。另外,Rcs双组分系统可以调控毒力基因的表达,在沙门菌的系统性感染过程中发挥重要作用^[7-10]。然而,APEC中Rcs双组分系统的作用尚不清楚。

因此,本文利用Red同源重组系统及互补质

粒构建*rcsC*基因缺失株及互补株,并探讨Rcs双组分系统传感器激酶RcsC对APEC相关生物学特性及致病性的影响,为进一步了解RcsC在APEC生存及致病过程中的作用以及APEC的致病机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、细胞和实验动物

菌株DE719为本实验室分离鉴定的APEC临床分离株,属于O2血清型,动物试验表明该菌株对鸡、鸭均具有致病性^[11]。Red同源重组系统质粒pKD46、pKD3、pCP20及互补质粒pSTV28由本实验室保存。鸡成纤维细胞DF-1由本实验室保存。1日龄樱桃谷鸭购自江苏省江阴市某肉鸭养殖专业合作社。

1.2 主要试剂和仪器

2×PCR Mix、DNA Marker购自北京康为世纪生物科技有限公司;高保真*Taq*酶购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司。质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;L-阿拉伯糖,购自Sigma公司;DMEM细胞培养基、胎牛血清购自Gibco公司。PCR仪购自ABI公司;电转化仪购自Bio-Rad公司;核酸电泳仪及全自动凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 引物设计

根据*rcsC*基因及其上下游基因序列,结合Red同源重组原理设计*rcsC*基因缺失引物、缺失鉴定引物;根据互补质粒pSTV28设计互补引物(表1),由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

表 1. 本研究中使用的引物
Table 1. Primers used in this study

| Primer | Sequence (5'→3') | Product size/bp |
|--------------|---|-----------------|
| rcsCMuUP-F | AGAGTCGAGAGGCCATCGGT | 915 |
| rcsCMuUP-R | GAAGCAGCTCCAGCCTACACCGCCAATGCTCTGAACATGT | |
| rcsCMupKD-F | ACATGTTTCAGAGCATTGGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | 1014 |
| rcsCMupKD-R | ACGATTCCC CGGATTTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG | |
| rcsCMuDown-F | CTAAGGAGGATATTCATATGCAGGAAATCGCGGGAATCGT | 848 |
| rcsCMuDown-R | GCCGATGACCATCCGATAGTC | |
| rcsC-F | CTGGATGCAGGAACGCTCCTG | 1885 |
| rcsC-R | CAACGTCAGTCCCAACTGACG | |
| rcsCOut-F | GCCAGTGATGACTTCTGCTGC | 4873/3085 |
| rcsCOut-R | GCAGTTATGTGAAACGCTGG | |
| rcsCCo-F | GGCGAATTCGTTAGGTGATTATCGCATCC | 3359 |
| rcsCCo-R | TATGGATCCCGATTCCC CGGATTTCTGA | |
| dnaERT-F | GATTGAGCGTTATGTCGGAGGC | 80 |
| dnaERT-R | GCCCCGAGCCGTGAT | |
| ompART-F | TCCAGAGCAGCCTGACCTTC | 152 |
| ompART-R | GCTGAGCCTGGGTGTTTCCT | |
| fimCRT-F | GCCGATGGTGTAAGGATGG | 127 |
| fimCRT-R | AACTTTCCC GATCCTGTGGC | |
| aatART-F | CCGTACCCGTGTCGCTGTTAC | 98 |
| aatART-R | CAGCATTATCAGCATTGCCACT | |
| tshRT-F | GCACGAACTGGGAAGTATGGA | 118 |
| tshRT-R | GGCATAGAAACCACCACCCC | |
| fyuART-F | TTGGCGACCAGGGTAAGAGC | 145 |
| fyuART-R | AGACCCGCAGTAGGCACGAT | |
| luxSRT-F | ACGCCATTACCGTTAAGATG | 81 |
| luxSRT-R | AGTGATGCCAGAAAGAGGGA | |

1.4 基因缺失株及互补株构建

根据 Red 同源重组系统原理及方法^[12], 通过扩增含有 *rcsC* 基因同源臂的氯霉素抗性片段, 然后将其电转化入野生株 DE719 感受态细胞中, 涂布氯霉素抗性平板筛选基因缺失株。挑取单克隆, 采用 PCR 及测序鉴定 *rcsC* 基因缺失株。

以 DE719 的基因组 DNA 为模板, 利用互补引物扩增 *rcsC* 基因, 并构建互补质粒 pSTV28-*rcsC*。测序正确后电转化入缺失株 DE719Δ*rcsC* 中, 构建基因互补株 DE719CΔ*rcsC*。

1.5 生长曲线及运动性测定

培养野生株 DE719、基因缺失株 DE719Δ*rcsC*、基因互补株 DE719CΔ*rcsC* 至对数生长期, 然后调整至 $OD_{600}=1.0$, 按 1:100 接种于 LB 培养基, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养, 每小时取样并测定菌液的 OD_{600} 吸光值, 记录并绘制细菌生长曲线。

分别将 5 μL 调整至 $OD_{600}=1.0$ 的菌液点样于运动性平板(0.5%琼脂 LB 平板)上, 37 °C 静置培养 12 h, 然后测定细菌菌圈直径。

1.6 生物被膜形成能力测定

根据文献[13]方法采用 96 孔微孔板法测定细菌的生物被膜形成能力。培养野生株 DE719、基因缺失株 DE719 Δ rscC、基因互补株 DE719C Δ rscC 至对数生长期, 然后调整至 $OD_{600}=1.0$, 按 1:100 稀释于 LB+0.5%葡萄糖培养基中, 并加入 96 孔聚丙烯板中, 每孔 200 μ L, 以无菌培养基作为对照组, 每组 6 个重复, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。用无菌 PBS 洗涤后加入结晶紫溶液染色 30 min。洗涤风干后加入 95%乙醇, 测定 OD_{595} 吸光值。

1.7 细菌凝集沉降试验

参考文献[13]方法通过测定沉降速度分析野生株、基因缺失株及互补株的凝集能力。培养野生株 DE719、基因缺失株 DE719 Δ rscC、基因互补株 DE719C Δ rscC 至对数生长期, 然后调整至 $OD_{600}=1.0$, 冰浴 10 min 后静置于室温, 每隔 30 min 从菌液表面取 100 μ L 样品, 测定 OD_{600} 吸光值。记录结果, 绘制各菌的沉降速度曲线。

1.8 细胞黏附与侵袭试验

鸡成纤维细胞 DF-1 细胞黏附及入侵试验参考文献[11]方法进行, 培养野生株 DE719、基因缺失株 DE719 Δ rscC、基因互补株 DE719C Δ rscC 至对数生长期, 用无菌 PBS 洗涤后以 DMEM 重悬, 按 100 个感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染 DF-1 细胞, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下作用 2 h。以无菌 PBS 洗涤细胞, 然后用 0.5% Triton-X 100 裂解细胞并倍比稀释后, 涂平板, 菌落计数。

细胞侵袭试验与细胞黏附试验的感染方式相同, 感染细胞 2 h 后以无菌 PBS 洗涤 3 次, 用含有庆大霉素(100 μ g/mL)的 DMEM, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下作用 1 h 杀死胞外细菌。然后用 0.5% Triton-X 100 裂

解细胞并倍比稀释后, 涂平板, 进行菌落计数。

1.9 致病性测定

参照文献[14]方法, 培养野生株 DE719、基因缺失株 DE719 Δ rscC、基因互补株 DE719C Δ rscC 至对数生长期, 无菌 PBS 洗涤、重悬, 以 1×10^5 CFU/只剂量腿部肌肉攻毒 7 日龄樱桃谷鸭, 每组 10 只, 攻毒后连续观察 7 d, 记录发病死亡情况, 计算致死率。

1.10 荧光定量 PCR 检测毒力基因转录水平

参照文献[15–16], 分别提取野生株 DE719、基因缺失株 DE719 Δ rscC、基因互补株 DE719C Δ rscC 的 mRNA, 利用反转录试剂盒反转录为 cDNA。进行荧光定量 PCR 检测, 反应体系为 20 μ L: SYBRGreen PCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物(表 1)各 1 μ L, cDNA 模板为 2 μ L, 补足 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。采用 $\Delta\Delta C_T$ (Livak)法^[17]分析毒力基因转录水平。

2 结果和分析

2.1 基因缺失株、互补株的构建及鉴定

利用 Red 同源重组系统及互补质粒 pSTV28 分别构建基因缺失株和互补株, 分别挑取疑似单菌落, 利用引物 rscC-F/R 进行 PCR 鉴定, 结果显示缺失株无法扩增出 rscC 基因片段, 而野生株和互补株可以扩增到 rscC 基因目的条带(图 1)。以引物 rscCOut-F/R 为引物进行 PCR 扩增并测序, 结果表明 rscC 基因缺失株及互补株构建成功。

2.2 生长曲线和运动性检测

生长曲线分析结果显示, 野生株、缺失株和互补株的生长速度基本保持一致, 无显著差异(图 2-A), 表明 rscC 基因不影响 DE719 的生长速

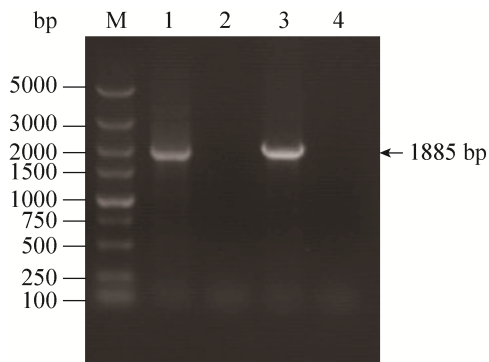


图 1. 基因缺失株、互补株的 PCR 鉴定

Figure 1. Identification of mutant and complementation strains by PCR. Lane 1: Wild-type strain DE719; lane 2: Mutant strain DE719 Δ rscC; lane 3: Complementation strain DE719C Δ rscC; lane 4: Negative control; M: DNA marker DM5000.

度。然而，运动性结果显示基因缺失株的运动性显著高于野生株，且互补株的运动性恢复至野生株水平($P < 0.05$)(图 2-B)。

2.3 *rscC* 基因缺失影响生物被膜的形成

生物被膜形成能力测定结果显示，缺失 *rscC* 基因导致 APEC 的生物被膜形成能力显著降低，

而互补株的生物被膜形成能力得以恢复($P < 0.001$; $P < 0.01$), 表明 *RcsC* 可以抑制 APEC DE719 生物被膜的形成(图 3)。

2.4 *rscC* 基因影响 APEC 的凝集沉降

如图 4 所示, 缺失株 DE719 Δ rscC 的沉降速度明显高于野生株, 而互补株则恢复了 APEC 的沉降速度及凝集能力, 结果表明, *rscC* 基因抑制 APEC 的凝集及沉降。

2.5 细胞黏附侵袭试验

细胞黏附侵袭结果(图 5)显示, 野生株、基因缺失株、互补株对 DF-1 细胞的黏附能力无明显差异($P > 0.05$); 然而, 基因缺失株对 DF-1 细胞的侵袭能力显著低于野生株, 互补株的黏附能力回复至野生株水平($P < 0.001$; $P < 0.01$), 表明 *rscC* 基因在 APEC 侵袭 DF-1 细胞过程中发挥作用。

2.6 致病力测定

分别以 1×10^5 CFU/只剂量的野生株 DE719、缺失株 DE719 Δ rscC、互补株 DE719C Δ rscC 感染

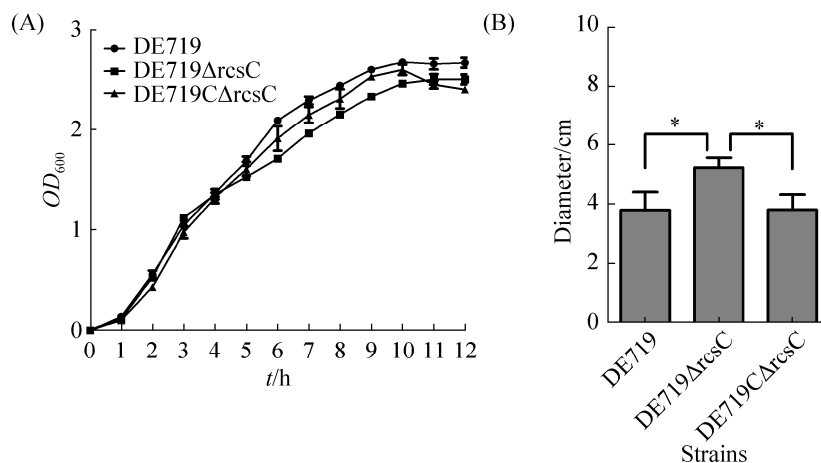


图 2. 不同菌株的生长曲线和运动性检测

Figure 2. Bacterial growth kinetics and motility of each strain. A: Growth curves, the values represent the average data of three experiments and the standard deviations were shown; B: Motility diameter of wild-type, mutant and complementation strains. Difference between mutant and wild-type, complementation strains were statistically significant with a $P < 0.05$.

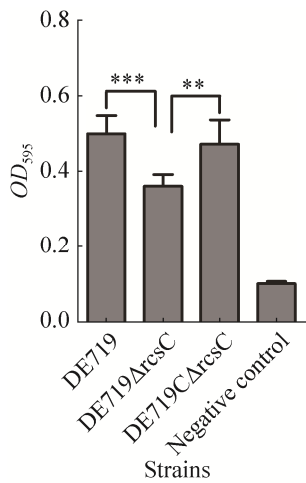


图 3. 生物被膜生成能力测定

Figure 3. Determination of the bacterial biofilm formation. The columns represent the mean±standard deviation of the data. Asterisks indicate statistically significant differences (**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$).

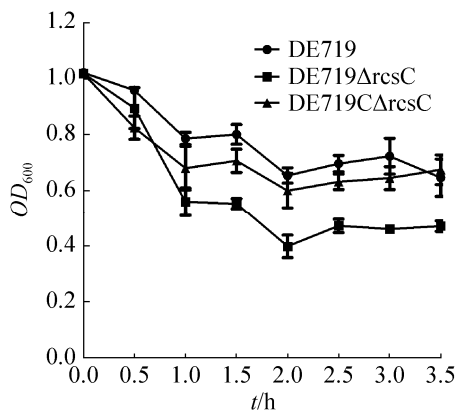


图 4. 野生株、缺失株及互补株的沉降速度

Figure 4. Settling rate of the wild-type, mutant and complementation strains. The data was represent the mean±standard deviation of the data.

雏鸭, 结果显示野生株、缺失株和互补株对 7 日龄樱桃谷鸭的致死率分别为 50% (5/10)、30% (3/10)和 50% (5/10)。另外, 缺失株感染组樱桃谷鸭死亡晚于野生株和互补株感染组樱桃谷鸭, 结果表明 *rcsC* 基因缺失导致 APEC 致病力下降。

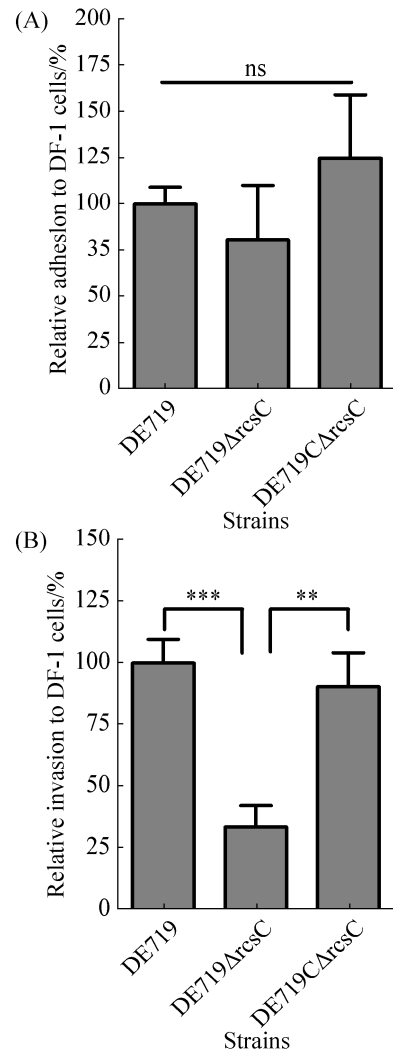


图 5. 禽致病性大肠杆菌菌株对 DF-1 细胞的黏附及侵袭能力

Figure 5. Adhesion and invasion capacity of APEC strains to DF-1 cells. A: Relative adhesion rate to DF-1 cells of APEC strains; B: Relative invasion rate to DF-1 cells of APEC strains. The data was represent the mean±standard deviation of the data. Asterisks indicate statistically significant differences (**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$).

2.7 毒力基因转录水平

对野生株、缺失株和互补株的毒力相关基因的转录水平分析表明, *rcsC* 基因缺失导致 *ompA*、*aatA*、*fyuA* 和 *luxS* 基因的转录水平均显著降低($P<0.001$), 而 *fimC* 和 *tsh* 基因的转录水平显著升高($P<0.001$)(图 6)。

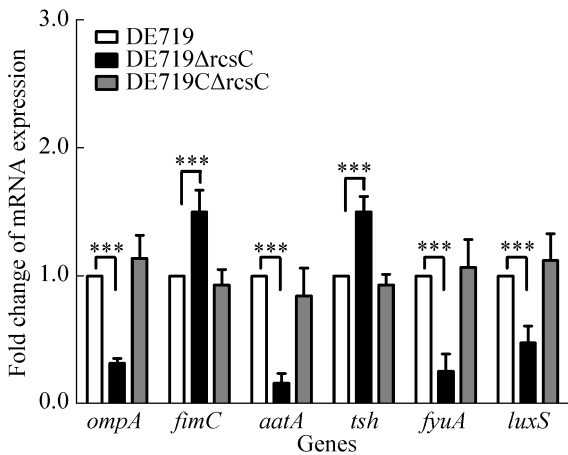


图 6. 毒力相关基因转录水平分析

Figure 6. Analysis for the transcription levels of virulence genes. Asterisks indicate statistically significant differences (***, $P < 0.001$).

3 讨论

在自然环境中, 细菌往往面临着环境的剧烈变化等不利条件。细菌通过多种不同的调控系统控制基因的转录表达, 进而调整其营养代谢、表面结构, 从而迅速适应不同环境。另外, 致病菌可以通过复杂的调控网络迅速改变其毒力基因的转录表达, 进而迅速适应宿主环境并导致疾病^[18]。在后基因组时代, 需要系统认识细菌的复杂调控网络, 深入阐述细菌的调控机制, 为疾病防控提供理论基础。TCS 广泛存在于细菌中, 其可以感应外界环境变化, 如养分、渗透压力和抗生素等, 通过双组分蛋白的磷酸化和去磷酸化调节细胞信号传导途径, 从而调控细菌的生理代谢、压力应激、生物被膜及致病性等方面^[5-6]。

APEC 不仅可以引起禽大肠杆菌病, 给养禽业造成严重的经济损失, 而且作为人类 ExPEC 的毒力基因储库, 严重危害人类健康及公共卫生安全^[2-4]。多种毒力因子共同参与 APEC 感染过程,

从而引起发病, 目前公认的 APEC 的毒力因子主要包括黏附素、侵袭素、抗血清存活因子、铁摄取系统、分泌系统、TCS 等。目前, 已有研究表明 TCS RstA/RstB 和 PhoP/PhoQ 在 APEC 致病过程中发挥作用^[19-20]。虽然国外研究表明 Rcs 双组分系统广泛存在于肠杆菌科细菌中, 其主要参与细菌的运动性、荚膜合成、生物被膜形成及致病性等方面^[7-10], 然而, APEC 中 Rcs 双组分系统的作用尚不清楚。因此, 本研究构建 Rcs 双组分系统感受激酶编码基因 *rcsC* 的缺失株及互补株, 并探讨 RcsC 对 APEC 生物学特性及致病性的影响。

本研究结果表明 *rcsC* 基因缺失不影响 APEC 的生长速度, 但可以显著增强细菌的运动性。与此相同, Rcs 双组分系统可以抑制大肠杆菌、沙门菌及奇异变形杆菌的泳动及丛动, 这是由于 Rcs 双组分系统可以抑制 *flhDC* 操纵子的转录, 从而负调控鞭毛的合成^[21-22]。生物被膜是细菌为适应环境、增强生存能力而形成的一种膜样结构, 其可提高细菌对抗生素及宿主免疫杀菌的抵抗力。研究表明, Rcs 双组分系统可以调控生物被膜形成的不同过程, 包括从最初的细菌附着于活组织或无活力的组织表面到生物被膜成熟为三维结构膜。Rcs 双组分系统可以抑制鞭毛、抗原 Ag43 和卷毛等的表达, 从而使细菌吸附于组织表面的能力下降。然而, Rcs 双组分系统则正向调控细菌荚膜多糖的合成, 其有利于生物被膜的成熟^[23-25]。因此, *rcsC* 基因缺失株的生物被膜形成能力显著降低, 与大肠杆菌 K12、沙门菌和奇异变形杆菌的结果一致。凝集沉降结果表明 *rcsC* 基因缺失增强了 APEC 的凝集沉降能力, 其可能是因为 *rcsC* 缺失后鞭毛、抗原 Ag43 的表达增强^[10], 这些细菌表面结构有助于大肠杆菌的凝集。

病原菌的黏附及侵袭能力对其定殖及抵抗宿主细胞清除至关重要^[26]。细胞黏附侵袭试验结果表明基因缺失株对 DF-1 的黏附能力无显著变化, 然而缺失株比野生株的细胞侵袭能力显著降低。研究表明, 荚膜在新生儿脑膜炎大肠杆菌侵袭脑血管内皮细胞过程中发挥重要作用, 而 *rscC* 缺失株的荚膜合成降低, 其可能引起 APEC 侵袭能力下降, 从而导致其对雏鸭的致病力降低。而互补株的侵袭能力及致病力恢复至野生株水平, 表明 RcsC 在 APEC 的致病过程中发挥作用。另外, 荧光定量 PCR 结果显示毒力基因 *ompA*、*aatA*、*fyuA* 和 *luxS* 基因的转录水平均显著降低, 其可能是基因缺失株毒力降低的原因之一。然而, 基因缺失株中 *fimC* 和 *tsh* 基因的转录水平上调, 与致病力结果不一致, 这可能由于细菌感染过程是由多个毒力因子共同发挥作用。并且, 研究表明 TCS RstA/RstB 和 PhoP/PhoQ 也通过调控 APEC 的毒力基因参与调控感染及致病过程^[19-20]。另外, Rcs 双组分系统也参与沙门菌、耶尔森菌、肠出血性大肠杆菌等的毒力调控。通过转录组学分析发现 Rcs 双组分系统通过调控沙门菌毒力岛 1 (SPI-1) 和毒力岛 2 (SPI-2) 的表达, 有助于沙门菌侵袭细胞及扩散^[9,27]。然而, Rcs 双组分系统反应蛋白 RcsB 则通过不同方式对肠出血性大肠杆菌的 LEE 毒力岛发挥正调控或者负调控作用, 在不同时期发挥作用。在 EHEC 感染的早期, RcsB 通过转录调控因子 GrvA 上调 LEE 毒力岛的表达及功能, 另外 RcsB 也可通过转录调节因子 PchA 抑制 LEE 的表达^[28]。

本文通过分析 RcsC 对 APEC 的生物学特性和致病性, 发现 RcsC 能够抑制 APEC 的运动能力及凝集沉降, 但能够促进生物被膜的形成及致病力,

为深入了解 RcsC 对 APEC 的致病作用提供参考。由于 TCS 广泛存在于细菌中, 而未在动物和人类中发现; 且 TCS 通过调控细菌的生长代谢, 从而参与致病过程。因此, 可以通过筛选鉴定 TCS 的抑制因子或者缺失 TCS, 控制病原菌的致病性, 为细菌病的防控及新药研发提供理论依据^[29]。

参 考 文 献

- [1] Dou XH, Gong JS, Han XG, Xu M, Shen HY, Zhang D, Zhuang LL, Liu JS, Zou JM. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. *Gene*, 2016, 576(1 Pt 2): 244–248.
- [2] Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid-Smith RJ, Zhanel GG, Manges AR. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(3): 415–421.
- [3] Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li GW, Wannemuehler Y, Nolan LK. 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. *Infection and Immunity*, 2010, 78(8): 3412–3419.
- [4] Mora A, Viso S, López C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Mamani R, Herrera A, Marzoa J, Blanco M, Blanco JE, Moulin-Schouleur M, Schouler C, Blanco J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3/4): 506–512.
- [5] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69(1): 183–215.
- [6] Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR. Evolution of two-component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(12): 1956–1970.
- [7] Hinchliffe SJ, Howard SL, Huang YH, Clarke DJ, Wren BW. The importance of the Rcs phosphorelay in the survival and pathogenesis of the enteropathogenic *Yersinia*. *Microbiology*, 2008, 154(4): 1117–1131.
- [8] Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 59: 379–405.
- [9] Erickson KD, Detweiler CS. The Rcs phosphorelay system is

- specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(3): 883–894.
- [10] Huang YH, Ferrières L, Clarke DJ. The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, 2006, 157(3): 206–212.
- [11] Wang SH, Dai JJ, Meng QM, Han XG, Han Y, Zhao YC, Yang DH, Ding C, Yu SQ. DotU expression is highly induced during *in vivo* infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 588.
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [13] Wang SH, Xia YJ, Dai JJ, Shi ZY, Kou YH, Li HQ, Bao YL, Lu CP. Novel roles for autotransporter adhesin AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2011, 63(3): 328–338.
- [14] Wang D, Wang SH, Xu F, Meng QM, Liu X, Xu X, Yang DH, Han XG, Ding C, Zhang HR, Yu SQ. Effects of type VI secretion system 2 core component ClpB on the biological characteristics and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(7): 834–840. (in Chinese)
王栋, 王少辉, 徐凤, 孟庆美, 刘新, 许漩, 杨登辉, 韩先干, 丁铲, 张焕容, 于圣青. VI型分泌系统2核心组分ClpB对禽致病性大肠杆菌生物学特性及致病性的影响. *中国兽医科学*, 2016, 46(7): 834–840.
- [15] Wang SH, Niu CL, Shi ZY, Xia YJ, Yaqoob M, Dai JJ, Lu CP. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1): 279–287.
- [16] Han XG, Bai H, Liu L, Dong HL, Liu R, Song J, Ding C, Qi KZ, Liu HW, Yu SQ. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55: 21–27.
- [17] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [18] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(5): 628–645.
- [19] Gao QQ, Ye ZQ, Wang XB, Mu XH, Gao S, Liu XF. RstA is required for the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 29: 180–188.
- [20] Li CX, Zhang YX, Qi KZ, Han XG, Tu J, Xue T, Zhou XH. The role of *phoP/Q* two-component system in virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(1): 157–164. (in Chinese)
李春晓, 张宇曦, 祁克宗, 韩先干, 涂健, 薛挺, 周秀红. *phoP/Q* 双组分系统对禽致病性大肠杆菌的毒力调控作用. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(1): 157–164.
- [21] Francez-Charlot A, Laugel B, van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C, Cam K. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(3): 823–832.
- [22] Wang QF, Zhao YF, McClelland M, Harshey RM. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8447–8457.
- [23] Ferrières L, Clarke DJ. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(5): 1665–1682.
- [24] Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(4): 450–464.
- [25] Oropeza R, Salgado-Bravo R, Calva E. Deletion analysis of RcsC reveals a novel signalling pathway controlling poly-N-acetylglucosamine synthesis and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2015, 161(4): 903–913.
- [26] Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(2): 136–169.
- [27] Mouslim C, Delgado M, Groisman EA. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(2): 386–395.
- [28] Tobe T, Ando H, Ishikawa H, Abe H, Tashiro K, Hayashi T, Kuhara S, Sugimoto N. Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(1): 320–333.
- [29] Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, Okamoto S, Doi A, Utsumi R. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 232–239.

Two-component system *rscC* gene affects pathogenicity and associated biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*

Dong Wang^{1,2}, Shaohui Wang^{1*}, Huanrong Zhang², Xin Liu¹, Xuan Xu¹, Zhengfei Yi¹, Mingxing Tian¹, Chan Ding¹, Shengqing Yu^{1*}

¹ Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

² College of Life Science and Technology, University of Southwest Nationalities, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] The two-component system (TCS) Rcs is involved in the regulation of bacterial adaptation to external environment and survival. The aim of this study is to elucidate effects of sensor kinase RcsC on associated biological characteristics and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **[Methods]** We constructed the *rscC* gene mutant and complementary strain of APEC by the Red recombination system and complementation plasmid. Then we compared the growth curve, motility, biofilm formation, agglutination, pathogenicity and virulence gene transcription levels of mutant, wild-type and complementary strains. **[Results]** *rscC* gene deletion had no influence on bacterial growth. However, inactivation of *rscC* gene resulted in enhanced motility, decreased biofilm formation and increased agglutination. Bacterial adherence and invasion assays showed that RcsC contribute to the invasion of APEC to DF-1 cells, whereas, it did not affect the adhesion capacity. Moreover, *rscC* gene mutant strain exhibited attenuated virulence in ducks. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that the transcription levels of virulence genes *ompA*, *aatA*, *fyuA* and *luxS* were significantly decreased in mutant strain. Whereas, the *fimC* and *tsh* transcription levels were significantly upregulated. **[Conclusion]** These data indicated that RcsC play roles in regulation of bacterial motility, biofilm formation, agglutination and virulence of APEC.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*, two component system, *rscC*, biological characteristics, virulence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500800) and by the National Natural Science Foundation of China (31572523)

*Corresponding author. Shaohui Wang, Tel: +86-21-34293412, E-mail: shwang0827@126.com; Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 17 April 2018; Revised: 12 June 2018; Published online: 30 July 2018