

## 禽病原性大肠杆菌 aes-31 基因突变株的构建和致病性鉴定

宦海霞<sup>1,2</sup>, 张科<sup>3</sup>, 陈祥<sup>2</sup>, 高崧<sup>2\*</sup>, 刘秀梵<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 淮阴师范学院生命科学院, 淮安 223300)

(<sup>2</sup> 扬州大学, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

(<sup>3</sup> 淮安出入境检验检疫局, 淮安 223001)

**摘要:**【目的】通过禽病原性大肠杆菌(APEC) aes-31 突变株的构建和动物实验来初步鉴定此基因片段对 E058 株的毒力影响。【方法】对在芯片杂交试验中筛选到的 APEC E058 株体外表达差异基因片段 aes-31 (来自 SSH 方法筛选到的 E058 株特异片段), 用 SSH 引物从重组质粒中扩增出目的片段, 克隆到 pGEM-T easy Vector 中, 然后用 *Sph* I 和 *Spe* I 从中切下此片段, 将之克隆到 pMEG-375 自杀性载体中, 构建自杀性重组质粒 pMEG375-aes-31, 将突变载体转化到受体菌中, 再和 APEC E058 株进行固相杂交, 根据同源重组原理, 筛选出基因突变株 E058 ( $\Delta$ aes-31)。【结果】E058 株和突变株的 LD<sub>50</sub> 没有明显差别, 突变株对 35 日龄 SPF 鸡的致死率高于 E058 株; 两者接种鸡 6 h 内, E058 ( $\Delta$ aes-31) 突变株在各内脏器官和血液中的细菌数和 E058 株差异均不显著; 接种鸡 24 h 后, E058 ( $\Delta$ aes-31) 突变株在脾脏和肺中的细菌数显著大于 E058 株, 差异显著, E058 ( $\Delta$ aes-31) 突变株在心脏、肝脏和血液中细菌数显著大于 E058 株, 差异极显著; 接种鸡 48 h 后, E058 ( $\Delta$ aes-31) 突变株在心脏、肝脏和脾脏中的细菌数比 E058 株多, 差异极显著, 而脾脏和血液中的细菌数均无明显差异; 48 h 后突变株所引起的感染鸡的大肠杆菌病变比亲本株稍严重。【结论】以上数据表明 aes-31 有可能与 E058 株毒力的负调控有关。

**关键词:** 禽病原性大肠杆菌 E058 株; aes-31 基因片段; 突变株; 致病性

**中图分类号:** S852      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1681-05

禽大肠杆菌病 (Avian Colibacillosis) 在 1938 年首先由 David 报道了肠杆状微生物引起的感染, 1954 年 Wasserman 等从鸡“气囊病”病例中分离出了大肠杆菌<sup>[1]</sup>。禽大肠杆菌病指部分或全部由禽病原性大肠杆菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 所引起的局部或全身性感染的疾病, 当宿主抵抗能力下降时, 常引起继发性局部或全身感染, 是 2 至 12 周龄鸡和火鸡的一种常见传染病。禽病原性大肠杆菌致病相关的毒力因子已被相继报道, 如脂多糖复合物、荚膜、黏附素、铁摄取系统、外膜蛋

白、毒素、大肠杆菌素等等<sup>[2-7]</sup>。然而, 自然条件下发病机理尚未完全清楚, 一些已知的致病因子仅能解释感染过程的某些步骤, 禽大肠杆菌病致病机理复杂, 部分毒力因子功能还有待明确。

本文从我国分离的禽病原性大肠杆菌 E058 株 (O2 血清型) 在芯片杂交实验中获得的表达差异片段中选取 aes-31 基因片段 (功能未知) 为研究对象<sup>[8]</sup>, 构建了 E058 ( $\Delta$ aes-31) 突变株, 通过动物实验探讨基因 aes-31 与 E058 株致病性的关系。

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30972196, 30771460, 30471281); 国家“863 计划” (2003AA222141); 江苏省高校自然科学研究项目 (09KJB230002)

\* 通信作者。Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

**作者简介:** 宦海霞 (1976-), 女, 江苏句容人, 博士, 研究方向是病原微生物学。E-mail: coocean@126.com

**收稿日期:** 2010-05-27; **修回日期:** 2010-06-27

# 1 材料

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**本试验所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 *E. coli* strains and plasmids used in this study

Strain and Plasmid	Genotype and phenotype	Source
Strain		
SM10 $\lambda$ pir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA</i> ; :RP4-2-Tc; Mu, Km <sup>R</sup> , $\lambda$ pir	9
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> $\Delta$ <i>lac</i> X74 galK phoA20 <i>thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> , $\lambda$ pir	9
DH5 $\alpha$	<i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>RelA1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR</i> ( $\phi$ 80d <i>lac</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) M15)	This lab
E058	Wild-type avian <i>E. coli</i> serotype O2, S <sup>R</sup>	10
CC118-2	CC118(pMEG375- aes-31), Cm <sup>R</sup>	This work
SM10-2	SM10(pMEG375- aes-31), S <sup>S</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	This work
E058-2	E058(pMEG375- aes-31), S <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup>	This work
E058( $\Delta$ aes-31)	Stable $\Delta$ aes-31 mutants of E058, S <sup>R</sup> , sacR <sup>R</sup> , Cm <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup>	This work
Plasmid		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> , Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	9
pMEG375- aes-31	pMEG-375 : : $\Delta$ aes-31, Cm <sup>R</sup>	This work
pGEM-T <sup>R</sup> Easy Vector	TA cloning Vector, Ap <sup>R</sup>	Promega

**1.1.2 引物:**本试验所用引物见表 2。

表 2 本研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp
Nested primer <sup>[12]</sup>		1240
primer 1	TCGAGCGGCCGCCGGGAGG	
primer 2	AGCGTGGTCGCGCCGAGGT	
<i>cvaC</i> primer		678
primer F	CACACACAAACGGGAGCTGTT	
primer R	CTTCCCGCAGCATAGTCCAT	

**1.1.3 试验鸡:**SPF 鸡由山东家禽所 SPF 种蛋自行孵化;1 日龄罗曼商品代蛋鸡,购自江苏省扬州市高邮种鸡场。

**1.1.4 主要试剂:**DNA 限制性内切酶、Taq、DNA Fragment Purification Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司;PCR 试剂盒、连接酶、dNTP 购自 Promega 公司;IPTG、X-gal、Ampicillin、Kanamycin、Streptomycin、Chloromycetin 购自 Roche 公司(德国);Agarose Gel Distributed by Shanghai Yito Enterprise Company Limited;tryptone、yeast extract 为 Oxoid 产品;D-环丝氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、NaAc、EDTA 购自 Sigma 公司;其它常规试剂均为国产分析纯级产品;抗生素使用浓度为:氨苄西林(Ap) 100mg/mL、链霉素(Sm) 50mg/L、氯霉素(Cm) 30mg/L、卡那霉素(Km) 50mg/L。

## 1.2 aes-31 基因片段的扩增

将 SSH 实验中筛选的含有 aes-31 的重组质粒<sup>[9]</sup> 1:100 稀释,取 1  $\mu$ L 作为 PCR 反应的模板。在 25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中,加入 10  $\times$  PCR 缓冲液(含 15 mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L 的 dNTP 1.2  $\mu$ L、Nested Primer1/2R(5  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L、Taq DNA Polymerase (3 U/ $\mu$ L) 0.3  $\mu$ L,加灭菌超纯水至 25  $\mu$ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s,67 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共进行 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每个样品取 2  $\mu$ L,加超纯水 8  $\mu$ L、6  $\times$  loading buffer (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 10% Ficoll 400) 2  $\mu$ L 混匀,1.2% 琼脂糖凝胶电泳 2 h,判断有无插入片段及片段大小。PCR 产物置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

## 1.3 aes-31 基因的克隆与鉴定

将 PCR 扩增的 aes-31 片段,大小为 1240 bp,克隆到 pGEM-T Easy Vector 中(图 1),经 *Sph* I 和 *Spe* I 双酶切、回收目的 DNA 片段。将该片段克隆到 pMEG-375 自杀性载体的 *Bam*H I 和 *Sph* I 位点中,这种带有 aes-31 基因片段的 pMEG375-aes-31 重组载体质粒被转化到 cc118 受体菌中,获得 cc118-2 重组菌(含有 pMEG375-aes-31),从中提取并纯化重组质粒 pMEG375- aes-31,将该质粒转化到 SM10 受体菌中,获得 SM10-2 重组菌(含 pMEG375-aes-31),经酶切和抗性鉴定其正确性。

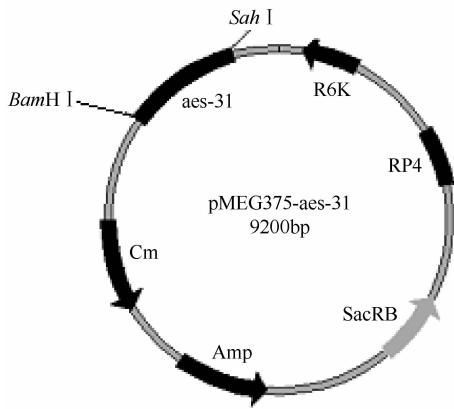


图1 含 *aes-31* 基因片段的自杀性载体的构建

Fig.1 Construction of the suicide transfer plasmid containing the *aes-31* mutant gene.

#### 1.4 分子生物学基本操作

琼脂糖凝胶电泳、DNA 目的片段的纯化回收、载体连接、转化、质粒提取、酶切鉴定、亚克隆等分子生物学操作按文献[11-12]方法进行。测序工作由上海联合基因科技有限公司完成。

#### 1.5 细菌固相接合试验

采用固相滤膜杂交方法<sup>[13]</sup>。分别接种受体菌 E058 株和供体菌 SM10 株(含目的片段的重组自杀性载体)到 5 mL LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养过夜。然后按 4:1 比例分别取 SM10 和 E058 的过夜培养物,混匀,用滤器过滤,细菌被收集到滤膜上,将滤膜置于无抗性的 LB 琼脂平板上(滤膜有细菌的一面向上),于 37℃ 培养过夜,注意不要倒置平板;然后用生理盐水洗下滤膜上的细菌进行倍比稀释后,分别涂布于的链霉素和卡那抗性的 LB 琼脂平板上,37℃ 培养过夜。

将具有 pMEG375-*aes-31* 质粒的 E058-2 以 Nested Primer 和 *cvaC* 引物分别进行 PCR 扩增、抗性标志、O 血清型筛选鉴定 E058( $\Delta$ *aes-31*) 突变株。

#### 1.6 LD<sub>50</sub>的测定

将 55 羽 1 日龄罗曼商品代蛋鸡随机分为 11 组,每组 5 只,分别气管接种 E058、E058( $\Delta$ *aes-31*) 株,每羽攻毒剂量分别为 10<sup>7</sup> CFU、10<sup>6</sup> CFU、10<sup>5</sup> CFU、10<sup>4</sup> CFU 和 10<sup>3</sup> CFU,每天上、下午各一次记录鸡的死亡数、病变,并以心血作细菌分离、鉴定,直到接种后 7 d 为止;7 d 后仍存活的鸡进行扑杀,观察病变并作细菌分离鉴定。以 Karber 法计算 LD<sub>50</sub>,另 1 组为健康对照组。

#### 1.7 致病性试验

将 20 羽 35 日龄的 SPF 鸡随机分为 3 组,其中 2 个实验组各 8 只,对照组 4 只。以 E058 株和 E058

( $\Delta$ *aes-31*) 株 24 h LB 肉汤静置培养物 0.1 mL(约 10<sup>9</sup> CFU/mL)进行左胸气囊注射,另一组 4 只注射 0.1 mL 的 LB 为对照。每天上、下午各一次记录鸡的死亡数、病变,并以心血作细菌分离鉴定,直到接种后 7 d 为止;7 d 后仍存活的鸡进行扑杀,观察病变并作细菌分离鉴定。根据鸡的死亡数确定 E058 株和 E058( $\Delta$ *aes-31*) 株的致病性:高致病株为 50% 及 50% 以上的接种鸡死亡;中等致病株为接种鸡死亡不超过 50%;低致病株为接种鸡不死亡。

#### 1.8 细菌感染的动力学试验

将 18 羽 15 日龄白来航 SPF 鸡随机分为 2 组,隔离饲养,左胸气囊分别接种 E058、E058( $\Delta$ *aes-31*) 株 0.1 mL(约 10<sup>7</sup> CFU/mL);在 6、24 和 48h 分别扑杀 SPF 鸡,每次每组扑杀 3 只,无菌采集血液、心脏、肝脏、脾脏、右肺进行细菌学检查,同时进行病变观察。血液直接用 PBS 进行倍比稀释均匀涂于麦康凯平板(链霉素 50 mg/L);心脏,肝脏,脾,左肺分别取 0.1 g 研磨,也用 PBS 进行倍比稀释均匀涂于麦康凯平板(链霉素 50 mg/L),每个稀释度取 100  $\mu$ L,37℃ 培养 18-20 h,计数每个稀释度的菌落。用特异的大肠杆菌 O2 单因子血清对分离到的细菌进行 O 抗原鉴定,以确定是否为接种菌。

对 48 h 扑杀的鸡进行临床病变评价: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>[14]</sup>。

#### 1.9 统计分析

用 SPSS 10.0 for windows 软件中的卡方检验和两尾 Fisher's exact 检验进行组间差异分析。

## 2 结果

#### 2.1 *aes-31* 基因片段的克隆与鉴定

经酶切和抗性鉴定,重组质粒 pMEG375-*aes-31* 为构建正确的质粒。

#### 2.2 APEC E058 株 *aes-31* 突变株的构建与鉴定

经 PCR 扩增、抗性标志筛选获得的 E058( $\Delta$ *aes-31*) 突变株为构建正确的突变株。O 血清型筛选鉴定 E058( $\Delta$ *aes-31*) 突变株仍然为 O2 血清型。

#### 2.3 LD<sub>50</sub>测定、致病性试验结果

E058、E058( $\Delta$ *aes-31*) 菌株对鸡的 LD<sub>50</sub> 分别为 10<sup>4.4</sup> CFU、10<sup>3.5</sup> CFU,两者的差异不显著。

在致病性试验中,E058 株和 E058( $\Delta$ *aes-31*) 株的致死率分别为 62.5% 和 75%,均表现出高致病性。虽然 E058( $\Delta$ *aes-31*) 株的致死率高于 E058 株,但两者的差异不显著。

## 2.4 细菌感染组织动力学试验结果

E058 株和突变株接种鸡后的 6 h, E058 ( $\Delta$ aes-31) 在各内脏器官和血液中的细菌数和 E058 株接种鸡相比差异均不显著。接种鸡后的 24 h, E058 ( $\Delta$ aes-31) 株在脾脏和肺脏中的细菌数大于 E058 株接种鸡, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); E058 ( $\Delta$ aes-31) 株在心脏、肝脏和血液中细菌数大于 E058 株接种鸡, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。接种鸡后的 48 h, E058 ( $\Delta$ aes-31) 在心脏、肝脏和脾脏中的细菌数比 E058 株接种鸡明显多, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 而肺脏和血液中的细菌数均无明显差异 (表 3)。

表 3 E058 株和突变株气囊接种鸡后各个器官及血液中的细菌动态分布比较

Table 3 Bacterial numbers present in the hearts, livers, spleens, lungs, and blood of chickens infected with wild-type APEC strain E058 or isogenic mutant E058 ( $\Delta$ aes-31)

<i>E. coli</i> strain	t/h	Bacterial number (means $\pm$ SD) §				
		Heart	Liver	Spleen	Lung	Blood
E058	6	2.32 $\pm$ 0.7	2.47 $\pm$ 1.2	3.86 $\pm$ 0.4	3.85 $\pm$ 1.5	2.25 $\pm$ 0.3
	24	1.47 $\pm$ 1.3	0.49 $\pm$ 0.8	1.04 $\pm$ 1.8	2.07 $\pm$ 1.9	0.49 $\pm$ 0.9
	48	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2.22 $\pm$ 1.9	0 $\pm$ 0
E058 ( $\Delta$ aes-31)	6	3.43 $\pm$ 0.6	2.37 $\pm$ 0.6	4.59 $\pm$ 0.3	5.31 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.6
	24	6.09 $\pm$ 0.2**	3.50 $\pm$ 0.3**	4.49 $\pm$ 0.8*	5.33 $\pm$ 1.0*	2.83 $\pm$ 0.1**
	48	2.47 $\pm$ 0.5**	2.22 $\pm$ 0.5**	2.18 $\pm$ 0.5**	2.98 $\pm$ 0.3	0.67 $\pm$ 0.6

§ Bacterial counts are presented as the mean  $\log_{10}$  CFU per gram (per milliliter for blood)  $\pm$  standard deviation for 3 birds from each infected group. \* indicates values significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of strain E058; \*\* indicates values significantly higher ( $P < 0.01$ ) than those of strain E058.

表 4 E058 株和突变株气囊接种鸡 48 h 后大肠杆菌病变的比较

Table 4 Comparison of APEC strain E058 and mutant E058 ( $\Delta$ aes-31) to induce colibacillosis lesions of chickens experimentally inoculated via the airsacs at 48 h

<i>E. coli</i> strain	Lesion score (means $\pm$ SD) §		
	Air sacs	Heart	Liver
E058	1.3 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.6
E058 ( $\Delta$ aes-31)	2.7 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.0

§ scoring values: 0 to 4 for air sacs, 0 to 2 for heart and 0 to 2 for liver.

E058 株和突变株接种鸡后的 6 h、24 h 和 48 h, 器官和血液中各组细菌计数显示: 随着时间的推移, E058 株细菌数逐步下降, 24 h 后下降幅度明显; 而突变株在接种后 24 h, 在所测脏器和血液中还维持在较高水平, 接种后 48 h, 除血液中的细菌数下降较快外, 其他脏器中细菌数还维持在一定水平 (表 3)。

E058 株和突变株接种鸡后的 48 h, 对感染鸡的大肠杆菌病病变 (气囊炎、心包炎和肝周炎) 进行评价, 与 E058 株接种鸡相比, 突变株引起气囊炎和心包炎病变要比 E058 株严重, 但差异不显著; 两者引起的肝周炎病变均不明显 (表 4)。

是如此 (表 3); 最终导致突变株在机体滞留时间延缓和病变有所加重 (表 4)。这些数据显示了 E058 株的突变株 E058 ( $\Delta$ aes-31) 表现出了毒力增强的趋势。由于在体外 LB 肉汤和鸡血清培养条件下, 与鸡体内的生长环境毕竟还存在差别, 而 aes-31 是在体外培养条件下表现为 E058 株的上调基因<sup>[8]</sup>, 我们推测此基因片段于 E058 株毒力的负调控有关, 当然, 此基因片段的确切功能及其调控机制还需进一步研究。

## 3 讨论

aes-31 片段为同属于 O2 血清型的 APEC 高致病株 E058 和低致病株 E526 进行 SSH 后获得的 E058 株特异的差异片段, 大小为 1240bp, 经 Blastn 搜索, 与尿道致病性大肠杆菌基因组同源性较高<sup>[10]</sup>, 是在芯片实验中表现为 E058 株在体外培养中的上调的基因<sup>[8]</sup>。我们选择它来构建 E058 株的突变株 E058 ( $\Delta$ aes-31), 进行动物试验, 初步对 aes-31 的功能进行探索。

试验结果表明, 尽管与亲本株 E058 相比, 突变株 E058 ( $\Delta$ aes-31) 对易感鸡的 LD<sub>50</sub>、致死性方面差异未达显著水平, 但 aes-31 基因的突变, 能促进突变株在鸡体内的定居和增殖, 尤其在受检脏器中更

## 参考文献

- [1] Cooke EM. *Escherichia coli*—an overview. *The Journal of Hygiene (Lond)*, 1985, 95(3): 523-530.
- [2] Dho-Moulin M, van den Bosch JF, Girardeau JP, Brée A, Barat T, Lafont JP. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infection and Immunity*, 1990, 58(3): 740-745.
- [3] Naveh MW, Zusman T, Skutelsky E, Ron EZ. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity. *Avian Diseases*, 1984, 28: 651-661.
- [4] Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doize B, Fairbrother JM. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology*, 1997, 58(24): 195-213.
- [5] Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bossé M. Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence

- determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infection and Immunity*, 1992, 60(7):2648-2656.
- [ 6 ] Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Diseases*, 1992, 36(3):504-511.
- [ 7 ] Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Muñoz F, Juárez A, Blanco J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains; relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Research of Microbiology*, 1997, 148(9):745-755.
- [ 8 ] 宦海霞,周琼,赵李祥,高崧,刘秀梵. 应用 DNA 芯片技术研究体外表达禽致病性大肠杆菌可能致病基因. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(1):103-111.
- [ 9 ] Dozois CM, Daigle F, Curtiss RIII. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of American*, 2003, 100(1):247-252.
- [ 10 ] 陈祥,赵娟,高崧,焦新安,刘秀梵. 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(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(5):680-684.
- [ 11 ] 奥斯伯 FM,布伦特 R,金斯顿 RE,穆尔 DD,塞德曼 JG,史密斯 JA,斯特拉尔 K. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998.
- [ 12 ] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [ 13 ] 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*. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6):2575-2583.
- [ 14 ] Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss RIII. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infection and Immunity*, 2000, 68(7):4145-4154.

## Construction and pathogenic identification of aes-31 gene mutant of Avian Pathogenic *Escherichia coli* strain E058

Haixia Huan<sup>1,2</sup>, Ke Zhang<sup>3</sup>, Xiang Chen<sup>2</sup>, Song Gao<sup>2\*</sup>, Xiufan Liu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

(<sup>2</sup>Animal Infectious Disease Laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(<sup>3</sup>Huaian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To find the primary function of aes-31 fragment through construction of defined mutation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* strain E058 and animal experiments. [ **Methods** ] The fragment of aes-31 was generated by PCR and cloned into pGEM-T-easy vector. A resultant suicide vector containing the aes-31 fragment named pMEG375-aes-31 was constructed and transformed to a receptor strain SM10. Then recombinant strain SM10 was hybridized with E058 strain in solid state. Mutant derivatives of strain E058 were generated by homologous recombination and were named E058 ( $\Delta$ aes-31). The 50% lethal dose ( $LD_{50}$ ) of E058 and E058 ( $\Delta$ aes-31) in commercial day-old chickens experimentally inoculated via intratrachea were  $10^{4.3}$  CFU and  $10^{3.5}$  CFU, respectively. The same way was used to inoculate with  $10^8$  CFU to obtain the pathogenic ability of E058 and E058 ( $\Delta$ aes-31) in 35-days-old SPF chickens. In the chicken challenge model, the mutant was tested to determine the individual function for virulence and persistence in 2-week-old SPF chicks. [ **Results** ] The pathogenicity test for E058 strain and E058 ( $\Delta$ aes-31) strain showed that the mutant had a higher mortality (75%) to 35-day-old specific pathogen-free (SPF) chicks than that of E058 (62.5%). In the chicken challenge model, there was no obviously CFUs difference in blood and lung in chicks of E058 group and E058 ( $\Delta$ aes-31) group 6 hours after inoculation. After 24 hours there was obvious CFUs difference in heart, liver, spleen, lung and blood in chicks of E058 group and E058 ( $\Delta$ aes-31) group. After 48 hours, there was also obvious CFUs difference in heart, liver and spleen in chicks of E058 group and E058 ( $\Delta$ aes-31) group. E058 ( $\Delta$ aes-31) had a trend of increasing virulence in chicks. [ **Conclusion** ] Aes-31 might be associated with negative regulatory gene for E058 virulence and its actual function needed further study.

**Keywords:** APEC E058 strain; aes-31; mutant; pathogenic identification

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972196, 30771460, 30471281), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA222141) and by the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions (09KJB230002)

\* Corresponding author. Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 27 May 2010 / Revised: 27 June 2010