

AI-2 对鸭疫里氏杆菌粘附入侵 Vero 细胞及其相关基因转录水平的影响

刘蕾, 韩先干*, 刘瑞, 白灏, 董洪亮, 丁铲, 刘海文, 于圣青*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要: 【目的】自诱导信号分子 AI-2 (Autoinducer-2, AI-2) 作为细菌间的通用自诱导信号分子, 参与细菌众多生理功能的调控。本研究通过开展 AI-2 在鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella antatipestifer*, RA) CH3 株对非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 的粘附、入侵以及对 RA 相关基因调控作用的研究, 为进一步研究 AI-2 对 RA 的调控作用奠定基础。【方法】在 CH3 (血清型 1 型) 对 Vero 细胞的粘附、入侵过程中加入不同浓度的 AI-2, 研究其对 CH3 粘附、入侵 Vero 的影响; 在添加 184.0 $\mu\text{mol/L}$ AI-2 的胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 中培养 RA CH3 菌株, 利用 real-time PCR 来检测 AI-2 对 RA 相关基因转录水平的影响。【结果】结果表明, AI-2 浓度为 18.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, AI-2 对 CH3 粘附 Vero 细胞的抑制性最强, 为 62%, 当 AI-2 浓度为 184.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, AI-2 对 CH3 入侵 Vero 细胞的促进性最强为 194%。荧光定量 PCR 结果表明 AI-2 对部分基因的转录有促进作用, 对部分基因的转录有抑制作用。【结论】AI-2 参与调控 RA 粘附、入侵 Vero 细胞及 RA 毒力因子、免疫原性蛋白基因以及代谢相关基因转录水平的调控。

关键词: 鸭疫里氏杆菌, 粘附, 入侵, 非洲绿猴肾细胞 (Vero), 自诱导信号分子 AI-2, real-time PCR

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0313-07

鸭疫里氏杆菌病是由鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella antatipestifer*, RA) 引起的鸭、鹅、火鸡及其它鸟类的一种高致病性、接触性传染病, 造成的疾病为鸭传染性浆膜炎, 一般侵害 1-8 周龄 (尤其是 2-3 周龄) 的雏鸭, 在临床上表现为精神不振、纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎等, 是目前危害养鸭业最为严重的传染病之一。RA 血清型众多, 已确定的血清型有 21 种, 国内流行的主要是血清 1 型、2 型和 10 型。

密度感应 (Quorum Sensing, QS) 是细菌通过分泌自诱导信号分子 (Autoinducer, AI) 来监测细菌群

体密度并协调细菌生物功能的信息交流机制。存在于革兰氏阴性和阳性菌中的 LuxS/AI-2 型密度感应系统, 可产生用于细菌种间交流的通用自诱导信号分子 AI-2。在细菌体内, AI-2 的产生来源于 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 代谢, 通过酶 Pfs 和 LuxS 催化的酶促反应生成 AI-2 的前体物质 4, 5-二羟基-2, 3-戊二酮 (4, 5-dihydroxy-2, 3-pentanedione, DPD), DPD 不稳定, 重排后形成 AI-2^[1]。

AI-2 作为细菌通用信号分子对细菌具有重要

基金项目: 国家自然科学基金 (31072161, 31001078)

* 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: 刘蕾 (1988-), 女, 山西省长治市人, 硕士研究生。E-mail: liulei0606@gmail.com

收稿日期: 2012-10-11; 修回日期: 2012-12-04

的调控作用,细菌通过识别、呈递、内化 AI-2 来调节自身一系列基因的表达,如毒力因子的表达、运动性、孢子形成以及生物被膜的形成等^[2-4]。研究表明细菌可以通过分泌 AI-2 来干扰其他细菌的生理行为^[5],如戈登氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)可以通过分泌 AI-2 来调节白色念珠菌(*Candida albicans*)的生物被膜形成^[6]。最近的研究表明,有些细菌自身并不产生 AI-2,但是却可以利用其他细菌产生的 AI-2 来调节自身的行为,比如苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)自身没有产生 AI-2 的能力,但是可以利用胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)分泌的 AI-2^[7]对其生理进行调控。

目前,关于 RA 是否产生 AI-2 的研究尚未见报道,而且关于 RA 是否可以利用外源 AI-2 的研究也未见报道。本实验通过研究 AI-2 对 CH3 粘附、入侵 Vero 细胞的影响以及其对 CH3 毒力因子、代谢相关基因的影响,探讨 AI-2 对 CH3 的调控作用,为进一步研究 AI-2 的作用提供基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、细胞及试剂

鸭疫里氏杆菌 CH3 株,本实验室分离、鉴定^[8]和保存。Vero 细胞,本实验室保存。商品化 AI-2 购于美国 OMM 公司,分装于细胞冻存管中置于 -80℃ 待用;反转录试剂盒购于 Promega 公司;SYBGRREE 购于 Promega 公司;Trizol 购于 Invitrogen 公司;DNA-free kit 购于 Ambion 公司。

1.2 AI-2 对 CH3 粘附 Vero 细胞的影响

鸭疫里氏杆菌 CH3 株 1:100 接种 TSB 培养基中,于 37℃ 培养 5 h 后,4℃、3824 × g 离心 15 min,用 PBS (140 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 10 mmol/L NaH₂PO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3) 洗两遍,制成浓度为 1 × 10⁸ CFU/mL 悬液。

用含青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM (Hyclone) 培养 Vero 细胞,置于 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃ 培养,传代至 24 孔板上,待其长满单层(每孔约含 2.5 × 10⁵ 个细胞)后,用于粘附入侵试验。参照本实验室建立的 RA 粘附、入侵 Vero 细胞的方法进行实验^[8]。将对数生长期的 CH3 细菌离心, PBS 洗两次,用不含抗生素的细胞培养液重悬。待 24 孔板中的细胞满单层,每孔接种 100 μL 菌悬

液,同时分别加入 18.4 μmol/L, 92.0 μmol/L 和 184.0 μmol/L 的 AI-2,200 g 离心 5 min 后置入 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱培养 1.5 h,弃培养液, PBS 洗涤,加 100 μL 的 0.1% 胰酶 - 0.02% EDTA 室温 10 min,消化细胞,再加 900 μL DMEM,并用巴氏吸管吹打,取 100 μL 进行 10 倍稀释,各稀释度取 100 μL 接种 TSB 平板,37℃ 培养,记录菌落数,计算粘附率。实验设 3 个重复,整个试验重复两次进行。

1.3 AI-2 对 CH3 入侵 Vero 细胞的影响

侵袭实验按照粘附实验方法进行,但是加庆大霉素(100 μg/mL)杀胞外菌,洗细胞时用 PBS 洗 5 次。粘附细菌的计数情况同 1.2。

1.4 细菌总 RNA 的提取与 cDNA 合成

将 CH3 于 TSB 液体培养基或添加了 184.0 μmol/L AI-2 的 TSB 液体培养基中培养 5 h,离心收集细菌,按 Invitrogen 公司的 Trizol 步骤进行总 RNA 的抽提。cDNA 的合成参照 Promega 公司的 M-MLV 说明书进行:cDNA 合成:8 μL RNA (2 μg) 溶液中加入 1 μL 随机引物(100 pmol)和 6 μL ddH₂O,混匀后 70℃ 水浴 5 min,冰浴。再加入下列组分:5 μL 5 × RT Buffer, 1.25 μL dNTP (10mM), 1 μL RNase Inhibitor (Promega, USA), 1 μL M-MLV 反转录酶 (Promega, USA), 2.75 μL ddH₂O 混匀,42℃ 作用 1 h。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 AI-2 对 CH3 部分毒力及代谢相关基因的影响

参照 RA NCBI 递交的相关基因序列,选取 Met、ABC、Hsm、Dam、Tr、Ompa、GroEL 基因,运用 Primer 3 Input (version 0.4.0) 设计 8 对引物用于反转录和进行 real-time PCR (表 1)。

AI-2 对 RA 基因转录水平的影响参照本实验室建立的方法进行适当修改后进行^[9],以 CH3 的 cDNA 为参照模板,以添加 184 μmol/L AI-2 的 CH3 的 cDNA 为目标模板运用相对定量法进行分析。

以 16S rDNA 为内参基因,荧光定量 PCR 的反应体系参照 SYBR Premix Ex Taq (Promega) 进行,25 μL 反应体系中加入:12.5 μL 2 × SYBR Buffer, 2 μL cDNA (或者灭菌水作为空白对照), 0.5 μL 上游引物 (10 μmol/L), 0.5 μL 下游引物 (10 μmol/L), 9.5 μL ddH₂O。反应条件为:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,40 个循环。

数据分析采用 2^{-ΔΔCT} (Livak) 法^[10]。

表 1 用于荧光定量检测的特异性引物

Table 1 Primers for real-time PCR

Gene	Description	Primer	Sequence (5'→3')	$T_m / ^\circ\text{C}$
Met	Methionine synthase	MetF	GCTCTTGCCGATAGATTTGC	59.95
		MetR	TGGTCTGGACATGCAGGATA	60.07
ABC	ABC transporter	ABCF	CCGACCATAATGTGCAACAG	59.99
		ABCR	TCTGGGTCGTTGGCTAAATC	60.07
Hsm	HomocysteineS-methyltransferase	HsmF	GACGGTGCTATGGGCACTAT	59.98
		HsmR	CAGGGTGCTCCCAATCTTTA	60.07
Dam	DNA-adenine methylase	DamF	AAGCCGCCCTGTTTATTTTT	59.52
		DamR	CAAAATCAAGCGTTTGCTCA	60.11
Tr	Thioredoxin reductase	TrF	TAGAGCGTGCACTGGTCATC	60.02
		TrR	ACATCTCCTGCCGCAAAATAC	60.10
Ompa	ompa/motbdomain-containing protein	OmpaF	ACTCAAGGAAGAGCGGATCA	59.95
		OmpaR	GACGCTTGCCAAAAGTTAGC	60.02
GroEL	protein GroEL	GroELF	TAGCGCAAGCTATCGTGAGA	59.88
		GroELR	TGCCTTGCAATCCCTCTTT	59.67

2 结果

2.1 AI-2 对 CH3 粘附入侵 Vero 细胞的影响

2.1.1 不同浓度 AI-2 对 CH3 生长速率的影响

本实验分别添加 18.4 $\mu\text{mol/L}$, 92.0 $\mu\text{mol/L}$, 184 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 于 TSB 液体培养基中以培养菌株 CH3, 并设不添加 AI-2 的 CH3 为空白对照, 以分别获得不同 AI-2 浓度的培养物。结果如图 1 所示, 不同浓度的 AI-2 对 CH3 的生长速率都没有影响。因此, 本实验中 AI-2 对 CH3 粘附入侵 Vero 细胞的影响只与 AI-2 的浓度有关。

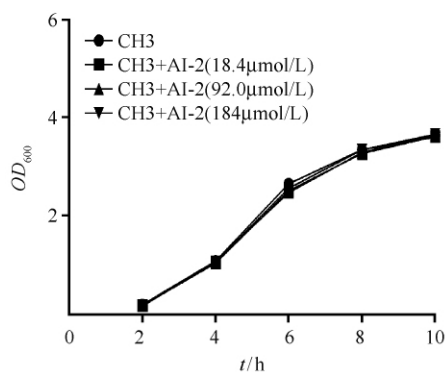


图 1 菌株 CH3 在不同浓度 AI-2 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of strain CH3 growing in different concentrations of AI-2

2.1.2 不同浓度 AI-2 对 CH3 粘附率和入侵率的影响

AI-2 对 CH3 粘附 Vero 细胞的结果表明, 低浓

度 AI-2 能抑制 CH3 的粘附性, 当 AI-2 浓度为 18.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, CH3 对 Vero 细胞的粘附率最低, 约

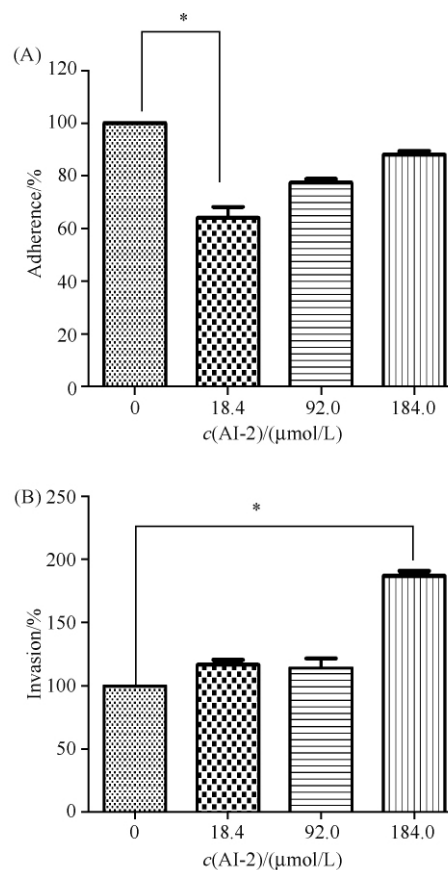


图 2 不同浓度 AI-2 对 CH3 的粘附作用 (A) 和入侵作用 (B) 的影响

Fig. 2 Effects of AI-2 on CH3 bacterial adherence (A) and invasion (B) to Vero cells.

为 60%。随着 AI-2 浓度的增加, AI-2 对 CH3 粘附 Vero 细胞的抑制性逐渐降低。不加入 AI-2 时, CH3 对 Vero 细胞的粘附率定义为 100% (图 2-A)。

粘附率计算公式为: 原始粘附率 (%) = 粘附细菌数 / 原始接种细菌数 \times 100%^[11], 再根据 CH3 组原始粘附率为 100% 进行换算。

AI-2 对 CH3 入侵 Vero 细胞的结果表明, 当 AI-2 浓度为 184 μ mol/L 时, CH3 对 Vero 细胞的入侵率为 190%, 随着 AI-2 浓度的降低, CH3 入侵 Vero 细胞的入侵率逐渐降低。不加入 AI-2 时, CH3 对 Vero 细胞的入侵率定义为 100% (图 2-B)。

入侵率计算公式为: 原始入侵率 (%) = 入侵细菌数 / 原始接种细菌数 \times 100%^[11], 在根据 CH3 组原始入侵率为 100% 进行换算。

2.2 实时荧光定量 PCR 引物设计及其特异性分析

依据已发表的鸭疫里氏杆菌全基因组序列 (NC_014738.1), 运用 Primer 3 Input (version 0.4.0) 设计 8 对引物用于实时荧光定量 PCR 检测。对引物的 PCR 检测结果表明, 8 对引物均可以扩增出预期片段 (图 3), 运用 real-time PCR 对引物的特异性进行检测, 结果表明所设计 8 对引物特异性高, 可用于荧光定量的检测。

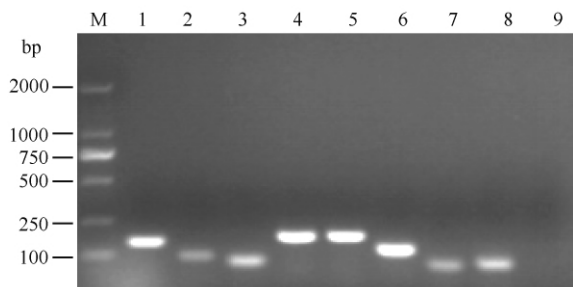


图 3 PCR 检测所设计引物的特异性

Fig.3 PCR amplification for the target genes. 1. Met; 2. ABC; 3. Hsm; 4. Dam; 5. Tr; 6. Ompa; 7. GroEL; 8. 16s; 9. Negative control.

2.3 AI-2 对 CH3 毒力因子、免疫原性蛋白基因及代谢相关基因的转录影响

AI-2 对 CH3 8 个基因的转录水平影响结果表明: *ompA* 平均上调 1.24 倍 *GroEL* 平均上调 1.31 倍, 与不添加 AI-2 时的转录水平相比差异极显著, 其余基因均下调, *Met*, *ABC*, *Hsm* 平均下调为初始水平的 0.34 倍, 0.54 倍和 0.64 倍, 差异极显著, *Tr* 下调为初始水平的 0.74 倍, 差异显著, *Dam* 下调为

初始水平的 0.92 倍, 差异不显著 (表 2, 图 4)。

表 2 184 μ mol/L AI-2 对基因转录水平的影响

Table 2 Transcriptional levels of the genes regulated by 184 μ mol/L AI-2

Gene	Fold change in expression	P value
Met	0.34 ↓	<0.01
ABC	0.54 ↓	<0.01
Hsm	0.64 ↓	<0.01
Dam	0.92 ↓	>0.05
Tr	0.74 ↓	<0.05
Ompa	1.24 ↑	<0.01
GroEL	1.31 ↑	<0.01

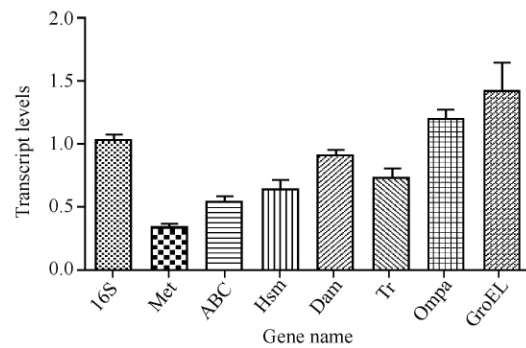


图 4 184 μ mol/L 的 AI-2 对基因转录的调节

Fig.4 Genes regulated by 184 μ mol/L AI-2.

3 讨论

病原菌侵入机体, 首先要粘附在特定的靶器官或靶细胞上, 而病原菌的粘附、入侵能力常常与毒力因子表达有关^[12]。此外, 病原菌代谢能力的改变也影响其毒力因子的表达, 因此病原菌因代谢能力的改变及影响的毒力因子的表达都有可能影响病原菌的粘附能力和入侵能力^[13]。

AI-2 (Autoinducer-2) 是 2 型密度感应系统 (QS, quorum sensing system) 的信号分子, 可被同种细菌或不同细菌通过感知周围 AI-2 的密度来调节自身各基因的表达^[14]。Cao M 等研究 SS2 (*Streptococcus suis* serotype 2) *LuxS* 的功能时发现 AI-2 涉及到许多毒力因子的表达调控^[15]。Gospodarek E 等研究发现病原微生物间的通过 QS 相互交流是毒力因子产生的基础^[16]。而 AI-2 本身是蛋氨酸甲基活化途径的副产物^[17], 故它不仅调控 QS, 也与细菌代谢息息相关。Li L 等研究发现 AI-2 可以影响细菌的粘附性和入侵性^[18]。

AI-2 对 RA 粘附入侵能力的影响,目前尚未见报道,本研究通过体外添加 AI-2,发现 AI-2 对其粘附能力和入侵能力的影响均呈现浓度依赖性,即低浓度的 AI-2 显著抑制了 RA 对 Vero 细胞的粘附性,浓度升高其抑制性却降低;而高浓度的 AI-2 显著促进了 RA 对 Vero 细胞的入侵性,低浓度时几乎没有影响。上述结果的可能原因是:由于细菌对细胞的粘附与入侵机制不同,因此粘附率与入侵率并非一定成正相关。细菌的粘附性与其生物被膜形成能力有一定的关系。已有文献报道外源 AI-2 会抑制生物被膜的形成能力^[19]。

根据之前的研究,细菌粘附分为四个阶段:先锋(Pionners), 移居(Settlers), 团体(Society), 群落(Community)。部分先锋细菌首先大面积的粘附并建立分子桥梁,然后小面积地建立紧密的特异性的联系,接着与周围环境互相作用,同时 QS 发挥作用协调细菌的行为,最后细菌细胞之间进行信号交流,共聚集,代谢协同并进行基因之间的交流^[20]。本实验通过外源添加 AI-2,可能干扰了细菌群体之间的正常交流,也有可能影响了细菌之间的代谢协同,从而导致粘附力下降。而细菌侵袭细胞更多地与毒力因子的表达以及与宿主细胞之间的相互关系有关。

接着我们通过 real-time PCR 进一步研究外源 AI-2 究竟调节了 RA 哪些与粘附入侵能力相关基因的在转录水平的表达。由于对 RA 粘附入侵细胞的分子机制研究尚少,我们选择了检测与 AI-2 自身代谢相关的基因:表达蛋氨酸合成酶的基因(*Methionine synthase*),表达同型半胱氨酸甲基转移酶的基因(*Homocysteine S-methyltransferase*),可能相关的参与甲基化的基因:表达 DNA-腺嘌呤甲基化酶的基因(*DNA-adenine methylase*),Sun 等研究发现其与 *Edwardsiella iceda* 的致病性有关^[21],可能相关的还原性酶表达基因:硫氧还原蛋白还原酶(*Thioredoxin reductase*),与能量相关的 ABC 转运蛋白表达基因,同时选择了已被证实是毒力因子的 *Ompa*^[8],选择和具有免疫原性的 GroEL 作为检测对象^[22]。real-time PCR 结果说明,AI-2 可能通过下调 RA 的 *Methionine synthase*, *Homocysteine S-methyltransferase*, *DNA-adenine methylase*, *Thioredoxin reductase* 等类似的代谢相关基因以及下调 ABC 等类似的能量相关基因来干扰细菌间信息交流,阻碍细菌代谢协同能力,以及减少细菌能量供应,来降低

细菌的粘附能力。而外源添加 AI-2 上调了 RA *Ompa* 基因的表达和增强了对 Vero 细胞的侵袭性,该结果与本实验室先前的有关 RA *Ompa* 基因的研究相一致,本实验室先前的研究表明 *Ompa* 可能是 RA 的一种粘附因子,*Ompa* 基因缺失株对 Vero 细胞的粘附和入侵能力均降低^[8]。当然,AI-2 在细菌液体培养基中对细菌基因的表达的影响与其在与细胞共培养时对细菌粘附侵入细胞时基因的表达可能有所不同。同时培养时间不同,基因表达也不尽相同。所以,AI-2 对 RA 毒力及致病性的影响及其分子机制还需要进一步实验加以证明。

本研究通过外源添加 AI-2 来检测其对 RA 粘附入侵能力的影响以及转录水平的影响,为进一步研究 AI-2 对 RA 的调控奠定了基础。

参考文献

- [1] De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (3) : 115-119.
- [2] González Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (1) : 305-316.
- [3] Asad S, Opal SM. Bench-to-beside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical Care*, 2008, 12 (6) : 236.
- [4] Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1999, 96 (26) : 15196-15201.
- [5] Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (10) : 4258-4263.
- [6] Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and Immunity*, 2009, 77 (9) : 3696-3704.
- [7] Pereira CS, McAuley JR, Taga ME, Xavier KB, Miller ST. *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the

- autoinducer-2 synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria. *Molecular Microbiology*, 2008, 70 (5) : 1223-1235.
- [8] Hu Q, Han X, Zhou X, Ding C, Zhu Y, Yu S. OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiol*, 2011, 150 (3-4) : 278-283.
- [9] Han X, Lu C. Biological activity and identification of a peptide inhibitor of LuxS from *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294: 216-234.
- [10] 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.
- [11] Germon P, Chen YH, He L, Blanco JE, Brée A, Schouler C, Huang SH, Moulin-Schouleur M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2005, 151 (4) :1179-1186.
- [12] Celli J, de Chastellier, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198 (4) : 545-556.
- [13] Xu H, Liu Y. Control of microbial attachment by inhibition of ATP and ATP-mediated autoinducer-2. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107 (1) :31-36.
- [14] Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (4) : 1639-1644.
- [15] Cao M, Feng Y, Wang C, Zheng F, Li M, Liao H, Mao Y, Pan X, Wang J, Hu D, Tang J. Function definition of LuxS, an autoinducer-2 (AI-2) Synthase and its role in full virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Microbiology*, 2011, 49 (6) :1000-1011.
- [16] Gospodarek E, Bogiel T, Zalas-Wiecek P. Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*, 2009, 58 (3) : 191-198.
- [17] Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (2) : 463-476.
- [18] Li L, Xu Z, Zhou Y, Li T, Sun L, Chen H, Zhou R. Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 2011, 50 (6) : 293-362.
- [19] Auger S, Krin E, Aymerich S, Gohar M. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environment Microbiology*. 2006, 72 (1) : 937-941.
- [20] Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73 (3) : 407-450.
- [21] Han X, Hu Q, Ding S, Chen W, Ding C, He L, Wang X, Ding J, Yu S. Identification and immunological characteristic of chaperonin GroEL in *Riemerella anatipestifer*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93 (3) : 1197-1205.
- [22] Sun K, Jiao XD, Zhang M, Sun I. DNA adenine methylase is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Veterinary Microbiology*, 2010, 141 (1-2) : 149-154.

Effect of autoinducer 2 on *Riemerella antatipestifer* adherence and invasion to Vero cells

Lei Liu, Xianghan Han^{*}, Rui Liu, Hao Bai, Hongliang Dong, Chan Ding,
Haiwen Liu, Shengqing Yu^{*}

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

Abstract: [Objective] Autoinducer 2 (AI-2), used to communicate among bacterial species, regulates numerous physiological functions of bacteria. In this study, we studied the effect of AI-2 on adherence and invasion of *Riemerella antatipestifer* (RA) strain CH3 to Vero cells and transcriptional levels of virulence-related and metabolism-related genes were investigated. [Methods] To verify whether the adherence and invasion of CH3 was affected by AI-2, we added different concentrations of AI-2 to the cocultures of Vero cells and CH3 and then calculated adherence percentages and invasion percentages of tested groups. We further added AI-2 (184.0 μmol/L) to the tryptone soya broth culture of CH3 and then detected the effect of transcriptional levels of related genes of CH3 using real-time PCR. [Results] The adherence of CH3 to Vero cells was decreased most to 62% with 18.4 μmol/L AI-2 and the invasion of CH3 to Vero cells was increased most to 194% with 184.0 μmol/L AI-2. The result of real-time PCR shows that AI-2 increased transcriptional levels of some virulence-related genes and decreased transcriptional levels of some metabolism-related genes. [Conclusion] These results suggest that AI-2 affected adherence and invasion of CH3 to Vero cells. Moreover, AI-2 could regulate some genes of CH3 to modulate particular physiological behaviors.

Keywords: *Riemerella antatipestifer*, adherence, invasion, Vero cells, autoinducer 2, real-time PCR

(本文责编:王晋芳)

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

^{*} 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: 11 October 2012/Revised: 4 December 2012

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。