

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(7):677-684; 4 July 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

禽致病性大肠杆菌 E058 株毒力基因 (aerobactin) 与 *sit* 操纵子基因突变株的构建及其致病性

凌洁璐, 陈思懿, 高清清, 许慧卿, 高崧*, 刘秀梵

扬州大学兽医学院, 农业部禽用生物制剂创制重点实验室, 扬州 225009

摘要:【目的】探究毒力基因 aerobactin 与 *sit* 操纵子与禽致病性大肠杆菌 E058 株致病作用的相关性。【方法】利用 Red 同源重组方法, 构建 APEC E058 株 aerobactin 与 *sit* 操纵子基因缺失株 E058 Δ vir, 并通过一系列的体内及体外试验对其生物学特性进行研究。【结果】生长曲线测定、细菌侵袭试验及体外竞争等试验结果表明, 突变株与亲本株差异不显著; 体内动态分布试验结果显示, 突变株 E058 Δ vir 在 5 个被检脏器中均极显著地低于亲本株 ($P < 0.001$)。【结论】aerobactin 与 *sit* 操纵子与禽致病性大肠杆菌 E058 株的致病性相关, 是其重要的致病因子。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, aerobactin/*sit* 操纵子, 突变株, 致病性

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)07-0677-08

禽大肠杆菌病指由禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 所引起的局部或全身性、急性或慢性传染性疾病的总称。大肠杆菌病给养禽业造成了严重的经济损失, 已成为最严重的细菌性传染病之一。1894 年, Ligniers 首次报道了鸡的大肠杆菌病, 接着世界上许多地区都有了关于此病的报道, 大肠杆菌病成为危害养禽业的重要疾病之一^[1]。大肠杆菌抗原结构主要包括菌体 (O) 抗原、鞭毛 (H) 抗原、荚膜 (K) 抗原、菌毛 (F) 抗原。大肠杆菌主要依靠 O、K、H、F 4 种抗原进行血清型鉴定, 在禽大肠杆菌病的血清型方面, 主要是 O1、O2、O78 最为常见^[2]。到现在为止, 我国已经报道的血清型很多, 20 世纪 90 年代, 高崧等从大肠杆菌分离株鉴定出优势血清型主要有六种: O18、O78、

O2、O88、O11 和 O26^[3]。

禽致病性大肠杆菌多产生铁结合性复合物, 这种复合物称为铁载体 (siderophore), 可分为 2 种: 一种是 Hydroxymate (又称气杆菌素, aerobactin); 另一种是 Phenolate (又称肠菌素, enterobactin), 气杆菌素的表达与 APEC 的致病性有关^[4]。在 APEC 的致病性和持续感染中, 特别是在深部组织损伤中, 气杆菌素发挥着独立的作用, 因为气杆菌素将运载的铁释放到细胞内后, 还可以循环利用铁元素^[5-6]。铁是细菌代谢过程中必不可少的元素, 细菌生长所需铁 (离子) 的浓度约为 10^{-7} mol/L, 而在宿主体内游离铁离子的浓度低于 10^{-12} mol/L^[7], 因此, 细菌在其生长繁殖过程中形成了利用铁元素的能力, 从而可以克服低铁离子浓度对生长代谢不利因素的影响。

基金项目: 国家自然科学基金 (31272559, 30972196, 30771604 和 30471281); 江苏省大学生实践创新项目; 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

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

作者简介: 凌洁璐 (1987-), 江苏泰州人, 硕士研究生, 主要从事禽致病性大肠杆菌致病机理研究。E-mail: lingjielu@126.com

收稿日期: 2012-12-10; **修回日期:** 2013-03-26

响^[8]。沙门菌铁转运子 (Salmonella iron transporter, SitABCD) 最早在鼠伤寒沙门菌中鉴定出, 该系统既可定位于基因组岛, 也可定位于大质粒。sit 操纵子主要包括 sitABCD 四个基因, 主要功能是转运铁和锰, 在 APEC 的毒力方面有着重要的作用, 在一些菌株中 sit 基因的缺失会导致菌株毒力的减弱^[9]。Williams 最早在大肠杆菌中发现了致病性大肠杆菌天然的利用铁元素的特定的系统 (specific iron assimilation system)^[10], 这一系统包括两部分: 气杆菌素 (aerobactin) 的合成以及其特定的外膜蛋白受体 (由 iutA 编码) 的表达^[11-12]。编码气杆菌素合成的 4 个基因为 iucA、iucB、iucC、iucD, 而 IutA 负责其转运, 是气杆菌素特定的外膜受体蛋白^[13-14]。其中, iutA 编码 74 kDa 的气杆菌素受体, 且这一受体是唯一由质粒编码的^[15], iucA 编码 63 kDa 的蛋白, 负责气杆菌素合成的起始; iucB 编码 33 kDa 蛋白, 为乙酰转移酶 (acetylase); iucC 主要编码气杆菌素合成酶 (aerobactin synthetase); iucD 可能是赖氨酸单氧化酶 (lysine monooxygenase), 主要编码 53 kDa 蛋白^[16]。

Johnson 等进行全序列测定和分析了在 APEC O2 分离株中鉴定出的 184 kb 的质粒, 并命名为 pAPEC-O2-ColV^[17], 而 APEC 的 aerobactin 操纵子就位于这一大质粒 (ColV) 上。流行病学调查研究表明, 气杆菌素相关基因只存在于有毒力的菌株, 在无

毒力菌株中尚未发现^[4]。到目前为止, 我们已经对气杆菌素单个基因开展了研究^[18-19], 但是对编码气杆菌素及 sit 操纵子与 APEC 的致病性间的关系还不明确, Dozois 等认为 aerobactin 操纵子和温度敏感血凝素 (temperature sensitive hemagglutinin, TSH) 基因的突变, 对 APEC 的致病性, 尤其是在 SPF 鸡体内的定居、繁殖能力有影响^[6], 而 Skyberg 等则认为 aerobactin 操纵子基因和 sitABC 转运系统操纵子的缺失, 对鸡胚的致死率、抗血清杀伤能力等几乎无影响^[20]。虽然 Sabri 等证明 APEC 株 χ 7122 (O78:K80:H9) 的 sitABCD 整体突变株无论在鸡体内定植能力, 还是体内竞争能力方面, 与亲本株 χ 7122 相比, 均有下降^[9]; 也曾有研究结果表明, χ 7122 株的 sitABCD 整体突变株所致鸡的病理变化与亲本株相似^[21]。为了探讨 aerobactin 操纵子与 sitABCD 操纵子两者与 APEC 致病性的关系, 本文运用 Red 同源重组方法, 构建 E058 Δ vir 突变株, 评价其致病性, 进一步明确气杆菌素、sit 两者对 APEC 致病作用的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用的质粒和菌株见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains	Description	Source
E058	wild-type avian <i>E. coli</i> serotype O2	[3]
DH5 α	endA1 hsdR17 (rk-mk +) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) RelA1 Δ (lacIZYA-argF) U169deoR (ϕ 80d lac Δ (lacZ) M15)	Invitrogen
E058 Δ vir	sit operon and aerobactin operon mutant of E058, KanR	This study
Plasmids		
pUC4K	kanamycin-resistant cassette	Invitrogen
Cell line		
HD-11	chicken macrophage line, chicken myelomonocytic transformed with the myc-encoding MC29 virus	[29]

1.1.2 主要试剂: dNTP、DNA 限制性内切酶、DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司; PCR clean up kit、Agarose Gel DNA Purification Kit 购自杭州 Axygen 公司; Taq DNA Polymerase 购自深圳 Fermentas 公司; PCR DIG probe synthesis kit、DIG DNA Labeling and Detection Kit、Nylon Membranes (positively charged) 购

自德国 Roche 公司; L-阿拉伯糖购自 Bio Basic 公司; DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 庆大霉素静脉注射液, 购自山东鲁抗辰欣药业有限公司; Tryptone、Yeast extract 为 Oxoid 产品; 其它试剂均为国产分析纯级产品; 抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 (Ampicillin) 60 μ g/mL、卡那霉素

(Kanamycin) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.3 试验鸡及试验鸡胚:1 日龄罗曼商品鸡,购自江苏省扬州市高邮种鸡场;SPF 种蛋,购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司;SPF 鸡为本实验室自行孵化,其种蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.2 分子生物学及数据分析软件

Primer Premier5.0 引物设计软件;DNASStar v17.0 序列分析软件;GraphPad Prism 5 数据处理软件。

1.3 运用 Red 重组功能构建基因缺失突变株 E058 Δ vir

1.3.1 PCR 引物的设计:用于同源重组的一对引物 vir-F/vir-R,该引物分别由两部分组成,由于 vir 突变株缺失了包括 *sit* 操纵子及 aerobactin 操纵子在内的约 15 kb 大小的片段,上游引物 vir-F 5'端加划线的序列与 *sitA* 基因序列同源,3'端未加下划线的序列与质粒 pUC4K 上 Kanamycin 序列同源;下游引物 vir-R 5'端加划线的序列与 *iutA* 基因序列互补,3'端未加下划线的序列与质粒 pUC4K 上 Kanamycin 序列互补(表 2)。

表 2. 用于同源重组的引物 vir-F/vir-R

Table 2. Primers vir-F/vir-R used for homologous recombination

Primer	Sequence(5'→3')
vir-F	TGCTCACTATAGGTAATAAATTATGCACTCAATAAAAAAACTCGTGA AGAAGGTGTTGCT
vir-R	ATATCAGCGTACCTTTGTTGTAAAGGAATACCGGTCAGAACAAGCCACGTTGTGTCTCA

1.3.2 vir 片段的扩增:以 pUC4K 质粒 DNA 为模板,应用 vir-F/virR 引物,PCR 扩增片段约 1.3 kb,PCR 产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。经电泳鉴定为预期长度的 PCR 产物,用 Agarose Gel DNA Purification Kit 回收纯化 DNA 片段。

1.3.3 E058 Δ vir 突变株构建:将 PCR 扩增的 vir 片段电转化到含有 pKD46 的感受态细胞 E058 中,通过 λ -Red 重组系统产生了基因缺失突变株 E058 Δ vir^[18]。

1.4 Southern 杂交

以 pUC4K 质粒 DNA 为模板,应用 Kan-F/Kan-R 引物(Kan-F: 5'-GGTGGCACAATCTATCGA-3'; Kan-R: 5'-CTCATCGAGCATCAAATG-3')扩增出 Kanamycin 抗性基因,作为探针使用的 PCR 产物是以 DIG 标记的,标记方法参照说明书进行(Roche)。用 CTAB/NaCl 法提取细菌大分子 DNA,参照《分子克隆》方法,对 DNA 酶切后进行 Southern-blot 分析。Southern blot 操作参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection kit(Roche)说明书进行。

1.5 突变株 E058 Δ vir 生物学特性

1.5.1 细菌生长曲线的测定:将 LB 液体培养基中过夜培养的野生型菌株 E058 和突变株 E058 Δ vir 加入 10 mL 的 LB 液体培养基中(调节 $OD_{600} = 0.05$)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中,以 220 r/min 振荡培养;连续 4 h,每隔 0.5 h 测定培养物的 OD_{600} 值,并绘制细菌的生长曲线,观察突变株和亲本株的生长速度。

1.5.2 鸡巨噬细胞 HD-11 吞噬试验:吞噬实验前,细胞以 2×10^5 密度接种到 24 孔板上,滴加含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养 24 h,使细胞贴紧 24 孔板,24 h 后,取出细胞板,每孔接种 2×10^7 菌落形成单位(colony forming units, CFU)的细菌(细菌:细胞 = 100:1),接种过细菌的细胞板继续培养 1 h,使细菌内吞到细胞内,取出细胞板,用 PBS 洗涤 3 次,去除胞外细菌,然后滴加 1 mL 含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基,培养 1.5 h,取出,洗涤 3 次,用 1 mL 0.1% 的 Triton X-100 裂解细胞,释放细菌,经过连续倍比稀释,用无抗性的 LB 平板进行细菌计数,培养 18 h 后观察结果。

1.5.3 12 日龄 SPF 鸡胚的致死率试验:细菌在 LB 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h,挑取 10 个单菌落在 LB 平板上满板划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 4 h;用 1 mL 含 15% 甘油的 PBS 将 LB 平板上所有菌落刮下,调细菌至相应的浓度。

将细菌浓度调至 5×10^3 CFU/mL。70 只 12 日龄的 SPF 鸡胚,随机分为 4 组,其中 2 个实验组各 30 只,对照组为 10 只。实验组由尿囊腔分别接种 0.1 mL E058 或 E058 Δ vir 细菌悬液,对照组不攻毒。观察 96 h 内的死亡情况,计算死亡率。

1.5.4 体外竞争试验:将细菌浓度调至 1×10^8 CFU/mL。亲本株 E058 与突变株 E058 Δ vir 以 1:1 的比例混合均匀,接种于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4

h. 培养物分别以无抗性的 LB 平板和含卡那霉素抗性的 LB 平板进行细菌计数, 18 h 后观察结果。竞争指数(CI)的计算方法是: 输出量的比率(突变株/亲本株)除以输入量的比率(突变株/亲本株)。

1.5.5 体内动态分布试验: 细菌浓度调至 1×10^8 CFU/mL。40 只 21 日龄的 SPF 鸡, 随机分为 3 组, 实验组 15 只/组, 健康对照组 10 只。实验组鸡分别左胸气囊接种 0.1 mL 的 E058 株或 E058 Δ vir 突变株。接种 24 h 后, 扑杀, 取扑杀鸡心血及肝脏、脾脏、肺脏、肾脏, 经过称重后加入含有 15% 甘油的 PBS 进行研磨, 用含 15% 甘油的 PBS 连续稀释, 以无抗性的 LB 平板或者含有 Kanamycin 抗性的 LB 平板进行培养计数, 18 h 后观察细菌计数结果。动态分布试验结果用 Mann Whitney test 方法进行统计分析 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

2 结果

2.1 突变株 E058 Δ vir 的鉴定

突变株 E058 Δ vir 经引物 vir-F/R PCR 扩增出 1200 bp 的条带, 而亲本株 E058 扩增不出条带。与预期结果一致。

2.2 Southern 杂交

将突变株 E058 Δ vir 以及亲本株 E058 提取的基因组 DNA, 经 *EcoR* V 酶切; Kanamycin 抗性基因阳性对照为 3 μ g pUC4K 质粒经 *Bam*H I 酶切的产物。37 $^{\circ}$ C 过夜酶切, 通过电泳分离 DNA。凝胶过夜转印, 使其上的 DNA 转移至尼龙膜上, 以 DIG 标记的 Kanamycin 抗性基因作为探针, 杂交后, 经免疫检测, 显色, 结果如图 1 所示。

2.3 突变株 E058 Δ vir 的生物学特性

2.3.1 从生长曲线的测定结果, 可以看出突变株 E058 Δ vir 的生长速度与亲本株 E058 株相似(图 2)。

2.3.2 HD-11 细胞吞噬试验: E058 的内吞率为 0.24%, E058 Δ vir 的内吞率为 0.25%。与亲本株 E058 相比, 突变株的抗吞噬的能力并没有显著的差异(表 3)。

2.3.3 12 日龄 SPF 鸡胚的致死率: E058 株接种组 30 只鸡胚死亡 27 只, 死亡率为 90.0%; E058 Δ vir 株接种组 30 只鸡胚死亡 24 只, 死亡率 80.0%, 对照组 10 只鸡胚未有死亡。突变株与亲本株 E058 间差异不显著(表 4)。致死的鸡胚分离到相应的接种菌株。

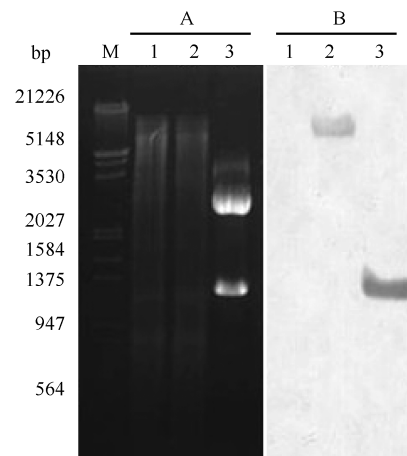


图 1. 突变株 E058 Δ vir 的 Southern blot 分析

Figure 1. Detection of Kan^r gene inserted into E058 Δ vir pAPEC-O2-ColV-like plasmid DNA by Southern blotting. Lane 1 and 2 of pAPEC-O2-ColV-like plasmid DNA from E058, E058 Δ vir plus *EcoR* V; lane 3, 1 μ g of pUC4K (a plasmid with a Kan^r cassette as positive control) plus *Bam*H I. Each digested sample was resolved on a 0.8% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining (A). Southern blotting was performed using DIG-labeled Kan^r gene probe (B). Lambda DNA/*Eco*RI-plus-*Hind* III molecular size standards (Fermentas) are shown in base pairs on the left (lane M).

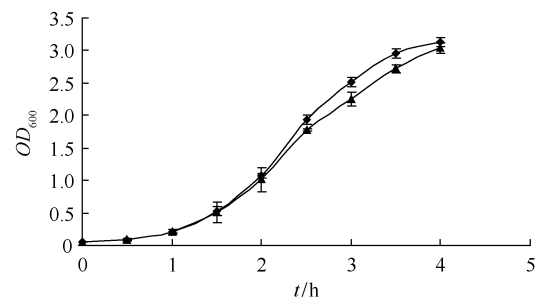


图 2. E058 和 E058 Δ vir 株生长曲线

Figure 2. Growth curves of APEC strain E058 and E058 Δ vir. Growth curves of APEC wild-type strain E058 (\blacklozenge) and E058 Δ vir (\blacktriangle) in LB broth at 37 $^{\circ}$ C, respectively, and their OD_{600} optical density was checked at different times.

表 3. 细胞吞噬试验

Strain	Percent of intracellular bacteria/%
E058	0.24 \pm 0.000 19
E058 Δ vir	0.25 \pm 0.000 2

表 4. 12 日龄鸡胚致死试验

Strains	Embryo inoculated	Deaths	Embryo lethality/%
NC	10	0	0
E058	30	27	90
E058 Δ vir	30	24	80

2.3.4 体外竞争试验:对 E058 及 E058 Δ vir 株分别细菌计数至 10^8 CFU/mL, 将等量的 E058 Δ vir 与 E058 混合, 经 37 $^{\circ}$ C 培养后, 根据其在有无抗性的 LB 平板上的计数结果, 计算得到 CI 值, E058 Δ vir 和 E058 体外竞争的 CI 值为 0.70。体外竞争试验结果表明, 与亲本株相比, 突变株 E058 Δ vir 的体外生长能力被轻度致弱。

2.3.5 动态分布试验结果:24 h 的动态分布试验结果表明, 与亲本株相比, 突变株 E058 Δ vir 的毒力被

高度致弱 ($P < 0.001$) (图 3)。接种 24 h 后, 亲本株 E058 在心血、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏中的细菌检出量分别是 8.8×10^2 CFU/mL、 8.7×10^4 CFU/g、 9.3×10^4 CFU/g、 4.7×10^5 CFU/g、 5.8×10^4 CFU/g; 突变株 E058 Δ vir 在心血、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏中的细菌检出量分别是 45 CFU/mL ($P < 0.001$)、 1.02×10^2 CFU/g ($P < 0.001$)、 6.4×10^3 CFU/g ($P < 0.001$)、 6.5×10^3 CFU/g ($P < 0.001$)、93 CFU/g ($P < 0.001$)。

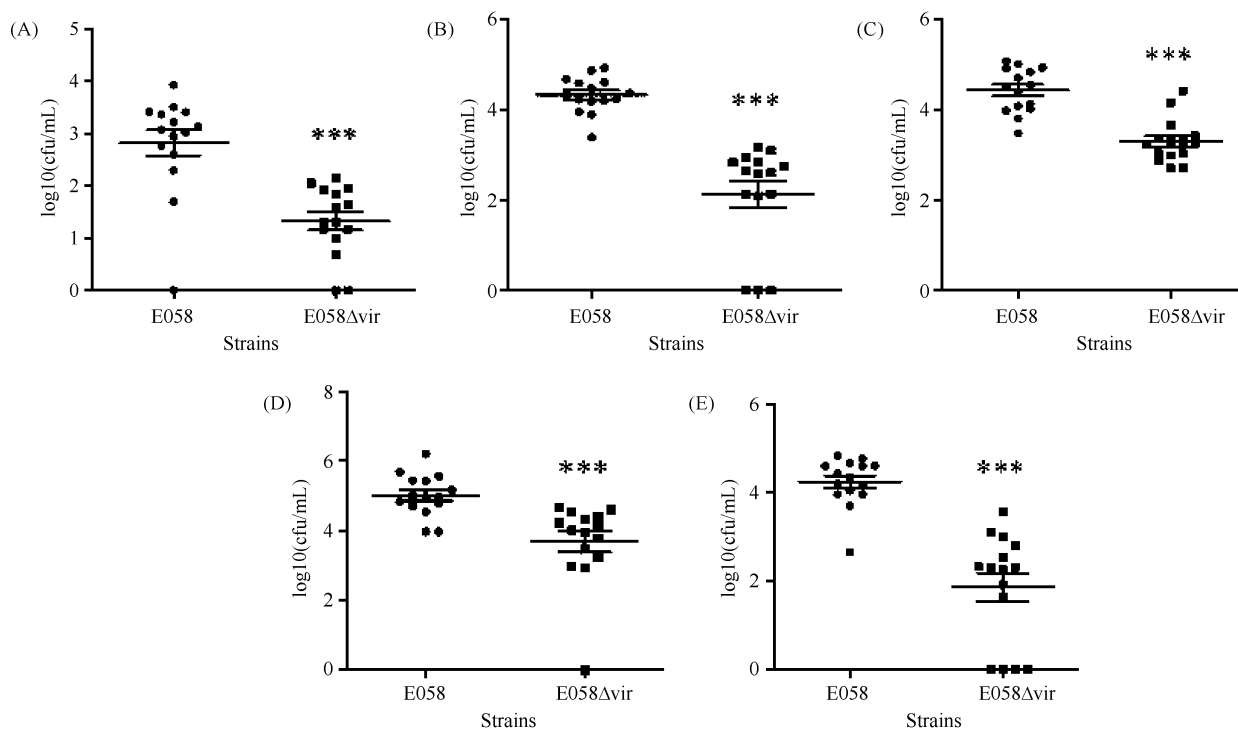


图 3. 21 日龄 SPF 鸡体内动态分布试验

Figure 3. Colonization and persistence *in vivo* of 21-day-old SPF chickens (*** $P < 0.001$). A: blood; B: liver; C: spleen; D: lung; E: kidney.

3 讨论

禽大肠杆菌病对世界养禽业造成了巨大的经济损失, 并且其致病机理复杂, 部分毒力因子的功能还有待确定。运用基因重组方法对可能毒力基因进行突变, 通过对亲本株和突变株生物学特性及致病性的比较, 可以使我们初步了解和推测相关基因的生物学意义和功能, 特别是其在致病性方面的作用。因此基因突变技术是病原菌毒力基因生物学功能研究中的重要方法。细菌菌株的毒力很可能是由多种基因共同作用的, 一些遗传因子如毒力岛或毒力质

粒都会影响病原菌的毒力^[22-25], 以前研究发现, 许多 APEC 分离株携带大质粒, 其中有些编码潜在的毒力因子, 比如, *tsh*、铁摄取机制如气杆菌素的产生, 大肠杆菌素 V 的产生。Johnson 等 2006 年指出根据从 595 株 APEC 分离株中, 得出的基因流行数据, 可以看出 pAPEC-O2-CoIV 上存在的 93 kb 的毒力区域, 可分为保守区及可变区两部分。保守区主要包括 *sitABCD*、aerobactin 操纵子以及 *iroA* 基因簇^[26]。通过气囊接种发现, 所有的这些因子对 APEC 菌株 χ 7122 的毒力有着重要作用^[6,9]。另外, 荚膜对 APEC 菌株的致病性很明显, 在一些实验中发现, K1 荚膜突变株彻底失去了致病性^[27]。

虽然气杆菌素、沙门菌铁转运子 (SitABCD) 与

APEC 气杆菌素 (aerobactin) 的合成及受体或胞内铁离子的转运相关, 它们也可能同时定位于 pAPEC-O2-ColV 质粒的保守区^[26], 但它们分属 2 个独立的系统。将其合并研究, 是因为对这 2 个系统与 APEC 致病性间的关系尚不明确, 甚至存在争议^[6,9,20-21]。本文旨在通过对这 2 个独立系统的整体突变, 明确其与 APEC 间的关系。

本文以 aerobactin 与 *sit* 操纵子作为研究对象, 利用 λ 噬菌体 Red 重组系统成功构建了基因突变株 E058 Δ vir, 并对它们进行了一系列的致病性研究, 体外生长试验结果表明, 突变株和亲本株在生长速度上没有差异, 说明基因的缺失并没有影响细菌的生长。鸡巨噬细胞 HD-11 的内吞试验、12 日龄 SPF 鸡胚致死率实验结果表明突变株较亲本株的毒力有轻度的下降, 但不显著。21 日龄 SPF 鸡动态分布试验表明, 与亲本株 E058 相比, 突变株 E058 Δ vir 在试验鸡脏器中的带菌量显著减少, 差异极显著 ($P < 0.001$)。这可能是由于鸡胚致死试验的敏感性不够^[20]。显然, 就 APEC 致病性研究而言, 体内动态分布试验的敏感性比鸡胚致死性试验高。aerobactin 与 *sit* 操纵子与 APEC 菌株 E058 的致病性有关, 是其重要的致病因子。

值得强调的是, APEC 的致病因子绝非气杆菌素、沙门菌铁转运子 2 个, APEC 的致病性无疑是多个“因子”共同作用的结果。单就摄铁系统而言, 我们最近以 APEC E058 株的血红素、沙门菌素和气杆菌素 3 种铁摄取系统为研究对象, 分别选取其摄铁相关基因 *chuT*、*iroD*、*iucD*, 构建了缺失突变株, 开展了多项体外及体内试验, SPF 鸡致病性试验表明介导沙门菌素摄铁的 *iroD* 基因和编码气杆菌素合成的 *iucD* 基因与 APEC 致病性有较强的相关性, 而介导血红素摄铁基因 *chuT* 对其致病性影响不大^[28]。再次证明 APEC 致病因子的复杂性、多样性。

我们利用 λ 噬菌体 Red 重组系统构建的突变株, 对于进一步深入研究大肠杆菌三大铁摄取系统对大肠杆菌致病性的影响及其相互作用的分子机制提供了材料。试验过程中, 有一些问题需要进一步进行探讨, 如整个 aerobactin 和 *sit* 操纵子中单个基因及其组合的致病作用等。试验中构建的 E058 Δ vir 突变株主要采用 Red 同源重组方法, 该方法操作简便, 重组效率高, 无须进行长链 PCR 扩增及寻找合适的酶切位点, 可直接在任何位置进行点突变、缺

失、插入和克隆, 这项技术是构建基因缺失株, 研究基因功能的重要手段, 这一系统使过去较繁琐的基因敲除方法变得简单。相信随着研究工作的深入, 该系统将普遍应用于多种菌株基因功能的研究, 为后基因组时代功能基因组计划的成功实施提供一种新的工具。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学. 北京: 中国农业出版社, 1999, 161-171.
- [2] Zhang C, SuYa L. The prevalent serotypes of chicken pathogenic *Escherichia coli* in China. *China Animal Health Inspection*, 1996, 13(1): 27. (in Chinese)
张春荣, 苏亚拉图. 我国流行的鸡致病性大肠杆菌血清型. *中国动物检疫*, 1996, 13(1): 27.
- [3] Gao S, Liu X, Zhang R, Jiao X, Wen Q, Wu C, Tang Y, Zhu X, Li C, Chen J, Cui L, Cui H. The isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* isolates of chicken origin from some regions in China. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1999, 30: 164-171. (in Chinese)
高崧, 刘秀梵, 张如宽, 焦新安, 文其乙, 吴长新, 唐一鸣, 朱晓波, 李琮, 陈娟, 崔力兵, 崔洪平. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定. *畜牧兽医学报*, 1999, 30: 164-171.
- [4] Lafont JP, Dho M, D'Hauteville HM, Bree A, Sansonetti PJ. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1987, 55(1): 193-197.
- [5] Finkelstein RA, Sciortino CV, McIntosh MA. Role of iron in microbe-host interactions. *Reviews of Infectious Diseases*, 1983, 5 Suppl 4: S759-777.
- [6] Dozois CM, Daigle F, Curtiss R, 3rd. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(1): 247-252.
- [7] Waters VL, Crosa JH. Colicin V virulence plasmids. *Microbiology Reviews*, 1991, 55(3): 437-450.
- [8] Wayne R, Frick K, Neilands JB. Siderophore protection against colicins M, B, V, and Ia in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1976, 126(1): 7-12.
- [9] Sabri M, Caza M, Proulx J, Lymberopoulos MH, Bree A, Moulin-Schouleur M, Curtiss R, 3rd, Dozois CM. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal

- transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity*, 2008, 76(2): 601-611.
- [10] Williams PH. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids; an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1979, 26(3): 925-932.
- [11] Warner PJ, Williams PH, Bindereif A, Neilands JB. ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1981, 33(2): 540-545.
- [12] Bindereif A, Braun V, Hantke K. The cloacin receptor of ColV-bearing *Escherichia coli* is part of the Fe³⁺-aerobactin transport system. *Journal of Bacteriology*, 1982, 150(3): 1472-1475.
- [13] Carbonetti NH, Williams PH. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. *Infection and Immunity*, 1984, 46(1): 7-12.
- [14] Gross R, Engelbrecht F, Braun V. Genetic and biochemical characterization of the aerobactin synthesis operon on pColV. *Molecular and General Genetics*, 1984, 196(1): 74-80.
- [15] de Lorenzo V, Neilands JB. Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1986, 167(1): 350-355.
- [16] de Lorenzo V, Bindereif A, Paw BH, Neilands JB. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1986, 165(2): 570-578.
- [17] Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, Olah P, Kercher R, Sherwood JS, Foley SL, Nolan LK. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*, 2002, 46(2): 342-352.
- [18] Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, Gao S, Liu X. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57794, DOI. 10.1371/journal.pone.0057794.
- [19] Xiong L, Ling J, Gao Q, Zhou Y, Li T, Gao S, Liu X. Construction of *iucB* and *iucBiutA* mutants of avian pathogenic *Escherichia coli* and evaluation of their pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3-4): 420-431.
- [20] Skyberg JA, Johnson TJ, Nolan LK. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 24.
- [21] Sabri M, Leveille S, Dozois CM. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 3): 745-758.
- [22] Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(1): 14-56.
- [23] Ideses D, Gophna U, Paitan Y, Chaudhuri RR, Pallen MJ, Ron EZ. A degenerate type III secretion system from septicemic *Escherichia coli* contributes to pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(23): 8164-8171.
- [24] Chouikha I, Germon P, Bree A, Gilot P, Moulin-Schouleur M, Schouleur C. A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(3): 977-987.
- [25] Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, 2006, 74(11): 6287-6292.
- [26] Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 745-758.
- [27] Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, 3rd, Brown PK, Arne P, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 536-540.
- [28] Gao Q, Wang X, Xu H, Xu Y, Ling J, Zhang D, Gao S, Liu X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 143.
- [29] Phi van L. Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF-kappa Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF-kappa Bp50. *The Biochemical Journal*, 1996, 313 (Pt 1): 39-44.

Construction of aerobactin and *sit* operon mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* E058 and evaluation of its pathogenicity

Jielu Ling, Siyi Chen, Qingqing Gao, Huiqing Xu, Song Gao^{*}, Xiufan Liu

Key Laboratory of Avian Bioproducts Development, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [**Objective**] To elucidate the pathogenesis role of the vir region of APEC O2 strain E058. [**Methods**] The gene aerobactin/*sitABC* operon knockout mutants E058 Δ vir of APEC E058 strain was generated using Red recombination system. A series of pathogenicity tests including chick embryo inoculation, the competition experiment and the colonization and persistence *in vivo* were used to evaluate the pathogenicity of APEC E058 Δ vir and the wild-type strain E058. [**Results**] E058 Δ vir was similar to its parental strain E058 in the growth curves, invasion assays of HD-11 cell and *in vitro* competition assay. In the colonization and persistence test, the recovery colonies of E058 Δ vir were significantly decreased in all of the organs tested ($P < 0.001$). [**Conclusions**] These results indicate that the virulence factors encoded by aerobactin/*sit* operon genes were important for the pathogenesis of APEC E058.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*, aerobactin/*sit* operon, mutant, pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31272559, 30972196, 30771604, 30471281), by the Practice Innovation Training Program Projects for the Jiangsu College Students and by the Priority Academic Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

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

Received: 10 December 2012/Revised: 26 March 2013

《微生物学报》审稿程序

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。