

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1): 89–95; 4 January 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140186

禽致病性大肠杆菌 *gspL* 基因缺失株构建及生物学特性

范国博¹, 韩月¹, 张宇曦^{1,2}, 韩先干^{1*}, 王少辉¹, 白灏^{1,2}, 孟庆美¹, 祁克宗², 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 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 【目的】研究 *gspL* 基因缺失对禽致病性大肠杆菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli*, APEC) 生物学特性的影响。【方法】利用 Red 重组方法构建禽致病性大肠杆菌 DE17 株的 *gspL* 缺失株; 分析野生株与缺失株的生长特性、黏附和入侵 DF1 细胞的差异; 采用荧光定量 PCR 的方法比较野生株和缺失株毒力基因转录水平的变化; 比较野生株与缺失株的半数致死量 (LD₅₀) 差异。【结果】*gspL* 缺失不影响 DE17 的生长特性, 但其黏附和入侵 DF1 细胞能力显著下调。荧光定量 PCR 检测结果表明, 缺失株毒力基因 *luxS*, *pfs*, *fyuA* 和 *iss* 转录水平明显上调, *tsh* 的转录水平明显下调, 而 *vat*, *ibeA*, *stx2f* 和 *ompA* 的转录水平无显著变化; LD₅₀ 检测结果表明, 缺失株比野生株毒力增强了 12 倍。【结论】*gspL* 基因的缺失不影响禽致病性大肠杆菌的生长特性, 但能减弱其黏附和入侵能力, 且可以正调控禽致病性大肠杆菌部分毒力基因的转录水平, 推测 *gspL* 基因可能与 APEC 对宿主的致病性有关。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, *gspL* 基因, 缺失, 毒力检测

中图分类号: R392 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 01-0089-07

禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli*, APEC) 感染所引起的禽类不同类型疾病的总称^[1-2]。可引起禽类的败血症、气囊炎、卵黄性腹膜炎等, 是 2 至 12 周龄的鸡和火鸡的一种常见传染病^[3-6]。APEC 因其复杂的血清型性、广泛的耐药性成为其防控的难题, 同时也对人、畜健康构成了新的威胁^[7-8], 因此, 开展对 APEC 致病机理的研究, 对 APEC 的防控具有重要意义。

病原菌入侵宿主后, 在宿主体内与宿主是一个

复杂的、动态的多因子作用过程, 根据感染部位所遇环境随时调整各毒力基因的表达, 因此病原菌毒力基因表达在发病过程中起着关键的作用。阐明这些体内诱导基因的功能将有利于开展对致病菌在宿主体内诱导的毒力基因的功能及致病机理的研究, 同时对疫苗和抗生药的研究也提供了新的思路。

细菌的 *gspL* 基因编码 GspL 蛋白, 该蛋白为假定的 II 型分泌系统蛋白 (T2SS), 在多数革兰氏阴性细菌中, T2SS 作为分泌途径可以通过膜通道将细胞内的蛋白转移至胞外培养基, 如毒素, 蛋白酶, 纤维

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370045, 31372402)

* 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: 范国博 (1990-), 女, 黑龙江省七台河人, 硕士研究生。E-mail: fgb900719@126.com

收稿日期: 2014-04-11; **修回日期:** 2014-09-05

素酶和脂肪酶等,对细菌的致病性具有重要作用。

最近的研究表明^[6], *gspL* 参与 APEC 对鸡的持续性感染,但 *gspL* 在 APEC 致病过程中的作用以及 *gspL* 对 APEC 毒力基因的调控目前尚未见相关报道。因此,本研究利用 Red 重组系统^[7] 对本实验分离的 APEC DE17 株的 *gspL* 进行缺失,并对野生株与缺失株的生物学特性进行研究,为进一步研究 *gspL* 基因在 APEC 致病过程中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和试剂

APEC 临床分离株 DE17,本实验室保存,于 2008 年分离自安徽巢湖患病鸭肝脏。质粒 pZeroBack/blunt vector、大肠杆菌 Top10 感受态细胞,质粒小量提取试剂盒购自北京天根生化有限公司。限制性内切酶 *EcoRI*、*HindIII*、DNA Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自大连 TaKaRa 有限公司。ABI Power SYBR Green PCR Master Mix 购自 ABI 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,其它化学试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank (CP000468.1) 公布的 *gspL* 的序列,用 Primer 5 软件设计引物(表 1)。

表 1. 本研究中所用引物
Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
DE17- <i>gspL</i> -UF	ATGGCAATACCTACCCCGT	827
DE17- <i>gspL</i> -UR	CTGAAAAAATATCGCCCGCA	
DE17- <i>gspL</i> -DF	CCGGGAATGTAGAGTCAAT	1132
DE17- <i>gspL</i> -DR	ATCACCTACCACCAAAA	
lap- <i>gspL</i> -UR	ACATTCCCGCGCGTGCACCTGAAAAAATATCGCCCGCA	779
lap- <i>gspL</i> -DF	ATTTTTTCAGGTCGACGCGCGGGAATGTAGAGTCAAT	
pkD3-SalI-F	CGCGTCGACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	1013
pkD3-SalI-R	CGCGTCGACCATAGAATATCCTCCTTAG	
DE17- <i>gspL</i> -IF	ACCTACCCCGTCCAAAAC	2059
DE17- <i>gspL</i> -IR	GCCAGCAAATCAACATCA	
DE17- <i>gspL</i> -F1	AAGAACTTTTTTCCGCC	440
DE17- <i>gspL</i> -R1	ATGTCCATTCCTGTGGG	

1.3 重组质粒 pZero-*gspL*-U-CAT-D 构建

以 DE17-*gspL*-UF/DE17-*gspL*-UR 和 DE17-*gspL*-DF/DE17-*gspL*-DR 为引物,扩增 *gspL* 上游(827 bp)和下游(1132 bp)序列。以 DE17-*gspL*-UF/DE17-*gspL*-DR 为引物,进行 Overlap-PCR。回收、纯化 PCR 产物,T4 酶连接 pZeroBack/blunt vector 质粒,转化至 Top10 感受态细胞,阳性重组质粒命名为 pZero-*gspL*-U-D。

以 pkD3-SalI F/pkD3-SalI R 为引物,pkD3 质粒为模板,扩增氯霉素抗性基因。将 SalI 酶切的氯霉素抗性片段和质粒 pZero-*gspL*-U-D 连接、转化,阳性重组质粒命名为 pZero-*gspL*-U-CAT-D。

1.4 *gspL* 基因缺失株的构建

以质粒 pZero-*gspL*-U-CAT-D 模板,用引物 DE17-*gspL*-UF/DE17-*gspL*-DR 进行 PCR 扩增得到带

有 *gspL* 基因左右同源臂的氯霉素抗性基因片段并回收,用于缺失 *gspL* 基因。

参照文献 [9] 的方法,制备含有 pKD46 的 DE17 菌株感受态细胞。加入 500 ng 的 PCR 产物至 DE17 菌株感受态细胞中,混匀,转入 0.2 cm 电转化杯中,用 Bio-Rad 电转化仪电转。电转条件:电阻 200 Ω,脉冲 25 μF,电压 2.5 kV。加入 1 mL SOC 至电转化产物中,37℃ 培养 1 h,之后涂于氯霉素平板(氯霉素浓度为 34 μg/mL),过夜培养后,用 PCR 鉴定缺失株。

1.5 *gspL* 基因缺失株抗性敲除

将 pCP20 转入带有氯霉素抗性基因的 *gspL* 缺失株,28℃ 培养 8 h 后,42℃ 培养过夜,热诱导 FLP 重组酶表达。挑取在无抗性 LB 培养基生长的单克隆,用鉴定引物 pkD3-SalI-F/pkD3-

SalI-R 筛选氯霉素抗性消失的克隆, 命名为 DE17 Δ *gspL*。

1.6 *gspL* 缺失株生长曲线的测定

DE17 和 DE17-*gspL* 缺失株菌液, 按 1:100 接种于 LB 培养基中, 37℃ 震荡培养, 每隔 1 h 取样测 OD_{600} , 对数生长期时每隔 0.5 h 测一次, 记录并整理数据, 绘制 DE17-*gspL* 缺失株的生长曲线。

1.7 *gspL* 缺失株的黏附和入侵

参考文献 [10] 的方法, 将 *gspL* 缺失株与野生株分别感染 DF-1 细胞, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 200 的 DE17 或 DE17-*gspL* 缺失株感染 DF-1 细胞, 每组重复 3 孔。低速离心以沉降细菌, 置于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 1.5 h。黏附组每孔加入 0.1% 胰酶 200 μ L 室温作用 10 min, 裂解细胞, 平板计数法进行细菌计数; 入侵组每孔加入 100 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 在 37℃ 下作用 1 h, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 用 0.5% Triton X-100 裂解细胞, 同法进行细菌计数。

1.8 *gspL* 缺失株毒力基因转录水平检测

依据参考文献 [9-10] 选取 APEC 的部分毒力基因, 设计引物, 进行 Real-time PCR。研究缺失株和野生株毒力基因的转录差异。参考文献 [10-11] 的方法, 并进行适当修改, 反应体系 20 μ L: SYBR Premix Ex Taq10 μ L, Primer1 (10 p mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Primer2 (10 p mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。扩增条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min; 变性 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 循环次数 40 次。数据分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} (Livak) 法 [11], 计算毒力基因的转录水平。

1.9 半数致死量 (LD₅₀) 测定

将野生株 DE17 和缺失株 DE17 Δ *gspL* 培养至对数生长期, 收集菌体, 以无菌 PBS 洗涤 3 次, 以 PBS 重悬菌液, 用分光光度计测定攻毒菌株的 OD_{600} 值, 确定攻毒菌株的攻毒剂量。

40 羽 7 日龄樱桃谷鸭, 随机分成 5 组, 每组 8 只, 采用腿部肌肉注射的方式, 分别以 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ 和 10⁴ CFU 的攻毒剂量, 以缺失株 DE17 Δ *gspL* 进行攻毒。攻毒后观察 7 日, 记录樱桃谷鸭的死亡情况, 采用改良寇氏法计算缺失株 DE17 Δ *gspL* 的 LD₅₀。同时参照上述方法, 计算野生株 DE17 的 LD₅₀。

2 结果

2.1 *gspL* 缺失鉴定

运用引物 pkD3-SalI-F / pkD3-SalI-R 对 DE17 及其 *gspL* 基因缺失株进行 PCR 鉴定, 结果表明, DE17 野生株未扩增到任何条带 (图 1-泳道 1); 而未消除氯霉素抗性的 *gspL* 基因缺失株 (图 1-泳道 2) 能在 1013 bp 的位置扩增到氯霉素抗性; 消除氯霉素抗性的 *gspL* 基因缺失株 (图 1-泳道 3) 未扩增到任何目的条带。

运用外侧鉴定引物 DE17-*gspL*-IF / DE17-*gspL*-IR 对 DE17 及其 *gspL* 基因缺失株进行 PCR 鉴定, 结果表明 DE17 野生株在 2059 bp 的位置有目的条带 (图 1-泳道 5); DE17 的 *gspL* 缺失株 (含氯霉素抗性) 由于氯霉素抗性片段比被敲除的 *gspL* 片段大约 200 bp, 可见有一条 2293 bp 的条带 (图 1-泳道 6), 而在 DE17 Δ *gspL* 抗性敲除株中, 由于 779 bp 的 *gspL* 片段被完全敲除, 可见在 1280 bp 处有一条明显的条带 (图 1-泳道 7), 而阴性对照 (图 1-泳道 8) 没有条带。

运用内侧鉴定引物 DE17-*gspL*-F1 / DE17-*gspL*-R1 对 DE17 及其 *gspL* 基因缺失株进行 PCR 鉴定, 结果表明 DE17 野生株 (图 1-泳道 9) 在 440 bp 的位置可见有一条明显的条带, DE17 Δ *gspL* 含抗性株 (图 1-泳道 10)、DE17 Δ *gspL* 抗性敲除株 (图 1-泳道 11) 及阴性对照 (图 1-泳道 12) 均没有目的条带。

上述 PCR 鉴定结果表明, 本研究成功构建 DE17 Δ *gspL* 缺失株。

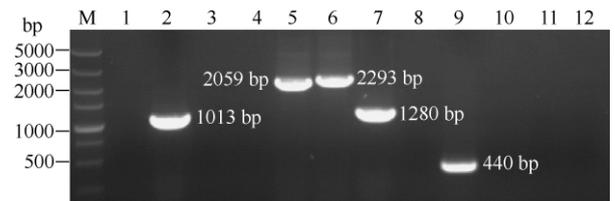


图 1. DE17 *gspL* 缺失株的 PCR 鉴定

Figure 1. Identification of DE17 *gspL* mutant by PCR. M: DL5000 DNA molecular; lane 1: wild type DE17 strain; lane 2: chloramphenicol-resistant clones; lane 3: the DE17 Δ *gspL* without chloramphenicol-resistant; lane 4: negative control; lane 5: wild type DE17 strain; lane 6: chloramphenicol-resistant clones; lane 7: the DE17 Δ *gspL* without chloramphenicol-resistant; lane 8: negative control; lane 9: wild type DE17 strain; lane 10: chloramphenicol-resistant clones; lane 11: the DE17 Δ *gspL* without chloramphenicol-resistant; lane 12: Negative control.

2.2 *gspL* 缺失株生长曲线

对缺失株和野生株的生长曲线分析表明(图2), DE17 Δ *gspL* 与 DE17 的生长趋势基本保持一致, 没有明显差异。

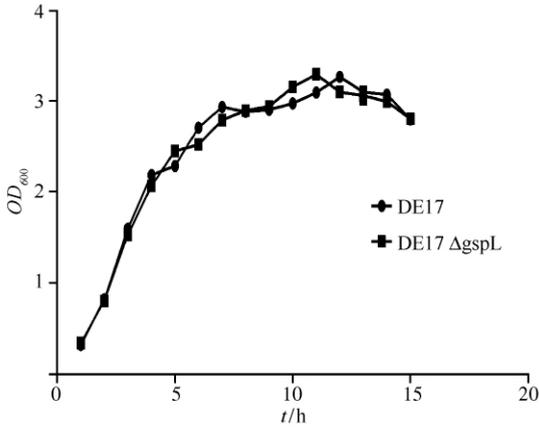


图 2. DE17 与 DE17 Δ *gspL* 缺失株生长曲线

Figure 2. The growth curve of *E. coli* DE17 and *E. coli* DE17 Δ *gspL*.

2.3 *gspL* 缺失株的黏附和入侵

黏附试验的结果显示(图3), 野生株 DE17 的黏附能力为 7.48×10^4 CFU/孔, 而缺失株 Δ *gspL* 为 4.92×10^4 CFU/孔, 与野生株相比黏附能力显著减弱 ($P < 0.01$)。入侵试验的结果表明(图4), 野生株 DE17 的入侵能力为 5.21×10^4 CFU/孔, 而缺失株 Δ *gspL* 的入侵能力为 2.81×10^4 CFU/孔, 亦呈现出显著的下降 ($P < 0.01$)。

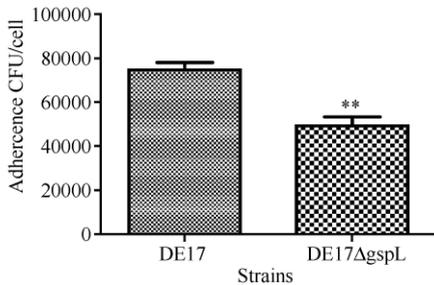


图 3. DE17 和 DE17 Δ *gspL* 对 DF-1 黏附的结果

Figure 3. The results of DE17 and DE17 Δ *gspL* adherence to DF-1.

2.4 毒力相关基因的表达分析

Real-Time PCR 结果显示(图6) DE17 Δ *gspL* 对 *luxS*, *pfs*, *fyuA*, 和 *iss* 4 种基因 mRNA 的水平比 DE17 要明显升高, 且 *pfs* 和 *fyuA* 的转录水平差异极显著 ($P < 0.001$), *luxS* 和 *iss* 转录水平差异显著 ($P < 0.01$), *tsh* 转录显著降低 ($P < 0.01$), 然而

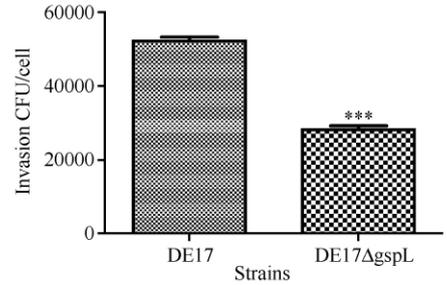


图 4. DE17 和 DE17 Δ *gspL* 对 DF-1 入侵的结果

Figure 4. The results of DE17 and DE17 Δ *gspL* invasion to DF-1.

DE17 Δ *gspL* 中 *ibeA*, *stx2f*, *ompA* 和 *vat* 4 种基因的转录水平与 DE17 相比却无明显变化 ($P > 0.05$)。

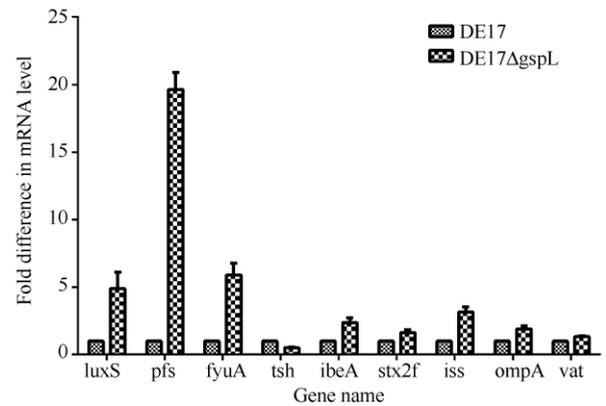


图 5. DE17 和 DE17 Δ *gspL* 对毒力基因转录水平的比较

Figure 5. Changes of virulence genes transcriptional level in mutant strain compared with the wild-type strain.

2.5 半数致死量 (LD₅₀) 测定

对野生株和 DE17 Δ *gspL* 的 LD₅₀ 统计结果表明, 野生株 DE17 的 LD₅₀ 值为 2.91×10^5 CFU, 而缺失株 DE17 Δ *gspL* 的 LD₅₀ 值为 2.46×10^4 CFU, 与野生株 DE17 相比, 缺失株 DE17 Δ *gspL* 的毒力增强了约 12 倍。

3 讨论

Red 重组技术是近年来发展起来的一种新技术, 该方法可以对大肠杆菌的基因组进行修饰^[12], 对细菌人工染色体(BAC)和质粒进行改造^[13]。与传统的基因操作相比具有重组效率高, 同源臂短, 操作简单等特点, 但常规的 Red 重组技术因存在缺失基因的同源序列过短(40–60 bp)等不足, 导致基因的缺失效率低。因此, 本研究通过构建包含长同源序列(1000 bp)的重组质粒, 利用 Red 重组法, 成功

对 APEC 的 DE17 菌株进行 *gspL* 基因敲除, 获得一定基础。
DE17 Δ *gspL* 缺失株, 为进一步研究该基因的功能奠

表 2. 野生株 DE17 和缺失株 DE17 Δ *gspL* LD₅₀测定结果

Table 2. The LD₅₀ of DE17 and DE17 Δ *gspL*

<i>E. coli</i> strains	Challenge dosage	No. of ducks	Mortality	Living No.	Mortality rate	LD ₅₀ (CFU)
DE17	10 ⁸	8	8	0	100	2.91 × 10 ⁵
	10 ⁷	8	8	0	100	
	10 ⁶	8	6	2	75	
	10 ⁵	8	1	7	12.5	
	10 ⁴	8	2	6	25	
Δ <i>gspL</i>	10 ⁸	8	8	0	100	2.46 × 10 ⁴
	10 ⁷	8	7	1	87.5	
	10 ⁶	8	8	0	100	
	10 ⁵	8	6	2	75	
	10 ⁴	8	3	5	37.5	

gspL 基因属于 II 型分泌系统, 而 II 型分泌系统广泛存在于革兰氏阴性细菌中, 是细菌常规的代谢途径之一。II 型分泌途径可以向细胞外分泌胞外酶、毒素、毒力因子等各种蛋白, 这些胞外蛋白通常会破坏宿主细胞, 从而引起组织坏死和病变^[14]。*gspL* 基因属于分泌素家族, 专门负责与底物进行识别组装, 其与 GspF 和 GspM 蛋白位于内膜相邻排列, 在内膜上, GspF, GspL, GspM 以及 GspE 构成一个复合体, 从而作为一个平台组装其它分泌元件^[14]。目前已有报道证实 *gspL* 基因参与 APEC 在宿主体内的感染过程, 在本研究中, 为进一步研究 *gspL* 基因在 APEC 致病过程中的作用, 本研究成功构建 DE17 株的 *gspL* 基因缺失株, 并对缺失株的相关生物学特性进行研究。对 *gspL* 基因缺失株与野生株的生长曲线研究结果表明, *gspL* 缺失株并不影响 DE17 的生长特性, 推测可能是 *gspL* 并不参与细菌的代谢与能量供应, 具体的机制仍有待研究。

本研究证实 *gspL* 基因参与 DE17 入侵、黏附 DF-1 细胞, 与野生株 DE17 相比, 缺失株 Δ *gspL* 的黏附和入侵能力明显下降 ($P < 0.01$), 且减弱入侵能力的作用更强。此外, 毒力基因检测结果表明, 与 DE17 野生株相比, DE17 Δ *gspL* 缺失株的 *tsh* 的表达呈明显减弱趋势, *tsh* 基因与细菌入侵禽呼吸系统有关, 并对气囊炎的发展及大肠杆菌素具有重要作用。因此, *gspL* 基因缺失所引起的 DE17 缺失株黏附入侵能力的减弱推测可能是由于 *tsh* 基因的下调作用所致, 该结果与在致病性大肠杆菌和猪链球菌的研

究结果是一致的^[15-16]。

为进一步研究 *gspL* 对 APEC 毒力的影响, 本研究选取 APEC 9 种毒力基因: 代谢相关基因 (*fyuA*)、粘附和入侵 (*tsh*)、血清存活 (*iss*)、毒素 (*vat*, *stx2f*) 和毒力 (*luxS*, *pfs*, *ibeA*, *ompA*) 等^[17]。运用荧光定量 PCR 研究野生株 DE17 和缺失株 Δ *gspL* 中 9 种基因的转录水平差异, 结果表明, *luxS*, *pfs*, *fyuA* 和 *iss* 4 种基因在缺失株 Δ *gspL* 中的转录水平均显著上升, 而 *ibeA*, *stx2f*, *ompA* 和 *vat* 4 种基因没有显著差异, 本研究结果表明, *gspL* 基因可能参与 APEC 对宿主的致病性。

对缺失株与野生株的 LD₅₀ 检测结果表明, 缺失株比野生株毒力增强了 12 倍, 这与 mRNA 水平上缺失株的 *luxS*, *pfs*, *fyuA* 和 *iss* 等毒力基因的转录水平上调是一致的, 表明在 DE17 中, *gspL* 的缺失导致毒力增强和毒力基因转录水平上调相关。

本研究中, *gspL* 基因缺失导致 DE17 缺失株黏附、入侵 DF-1 细胞能力减弱, 但毒力却增强, 推测可能的原因如下: (1) 细菌对宿主细胞的粘附、入侵并非与细菌的毒力一定成正相关, 因为粘附与入侵只是病原菌感染机体的第一步, 病原菌对机体的致病性是个复杂的、动态的过程, 影响因素众多, 对细胞的入侵、粘附只是其中的一个因素^[18]; (2) *gspL* 基因缺失导致的毒力因子转录水平上升, 在 DE17 致病性增强方面起主导作用, 削弱了因入侵、粘附减低对致病性的影响。具体的机制仍有待进一步的研究。

本研究结果表明,在 APEC 中 *gspL* 基因的缺失对细菌的粘附和入侵以及某些毒力基因的转录具有显著的影响,能增强 APEC 的毒力,本研究为进一步研究 *gspL* 基因的功能提供参考。

参考文献

- [1] Cooke EM. *Escherichia coli*-an overview. *The Journal of Hygiene*, 1985, 95 (3) :523-530.
- [2] Rojas TC, Parizzi LP, Tiba MR, Chen L, Pereira GA, Sangal V, Yang J, Yu J, Dias da Silveira W. 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.
- [3] Navel MW, Zusman T, Skutelsky E, Ron EZ. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity. *Avian Diseases*, 1984, 28 (3) :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 (2-4) :195-213.
- [5] 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.
- [6] Tuntufye HN, Lebeer S, Gwakisa PS, Goddeeris BM. Identification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* genes that are induced in vivo during infection in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (9) : 3343-3351.
- [7] 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*. *Infect Immun*, 2011, 79 (1) :279-87.
- [8] Wang XM, Liao XP, Zhang WJ, Jiang HX, Sun J, Zhang MJ, He XF, Lao DX, Liu YH. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7 (9) :1099-106.
- [9] Han Y, Han X, Bai H, Wang S, Meng Q, Ding C, Yu S. *rmlA* gene deletion affects biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (10) :1056-1062. (in Chinese)
- 韩月,韩先干,白灏,王少辉,孟庆美,丁铲,于圣青. *rmlA* 基因缺失影响禽致病性大肠杆菌的生物被膜形成. *微生物学报*, 2013, 53 (10) :1056-1062.
- [10] Han XG, Bai H, Lei 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*. *Microbiology Pathogenesis*, 2013, 55 :21-27.
- [11] 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 : 402-408.
- [12] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2 (10) :769
- [13] Misulovin Z, Yang XW, Yu W, Heintz N, Meffre E. A rapid method for targeted modification and screening of recombinant bacterial artificial chromosome. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 257 (1-2) : 99-105.
- [14] Chial M de, Ghysels B, Beatson SA, Geoffroy V, Meyer JM, Pattery T, Baysse C, Chablain P, Parsons YN, Winstanley C, Cordwell SJ, Cornelis P. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2003, 149 (4) : 821-831.
- [15] Py B, Losiseau L, Barras F. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Reports*, 2001, 2 (3) :244-248.
- [16] Wang Y, Zhang W, Wu Z, Zhu X, Lu C. Functional analysis of *luxS* in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152 (1) :151-160.
- [17] Zhu C, Feng S, Sperandio V, Yang Z, Thate TE, Kaper JB, Boedeker EC. The possible influence of LuxS in the in vivo virulence of rabbit enterpathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2007, 125 (3) :313-322.
- [18] Chen W, Han X, He L, Hu QH, 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.

Construction and characterization of a *gspL* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli*

Guobo Fan¹, Yue Han¹, Yuxi Zhang^{1,2}, Xianghan Han^{1*}, Shaohui Wang¹, Hao Bai^{1,2}, Qingmei Meng¹, Kezong Qi², Chan Ding¹, Shengqing Yu^{1*}

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

²Anhui Agricultural University, Anhui Province, Hefei 230036, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] To study the role of *gspL* gene in avian pathogenic *Escherichia coli*. [Methods] The *gspL* mutant of Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) was constructed by homologous recombination assay. The growth characteristics, the ability of adhesion and invasion to DF1 cells, the virulence genes transcription level and median lethal dose (LD₅₀) were analyzed between the *gspL* mutant strain and the wild strain. [Results] Compared with the wild strain, the mutant strain had no significant difference in the growth status. However, its ability of adhesion and invasion was significantly lower. The transcription of genes *pfs*, *fyuA*, *iss* and *vat* increased obviously, the *tsh* decreased and the transcription level of *luxS*, *ibeA*, *stx2f* and *ompA* had no significant change. LD₅₀ showed that the *gspL* mutant strain had 12-fold increase in virulence. [Conclusion] The deletion of *gspL* gene could abate the ability of adhesion and invasion, regulate and control some virulence gene transcription level, enhance the virulence of APEC. The results show that the *gspL* gene play roles in pathogenicity of APEC.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, *gspL* gene, mutant, virulence

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370045, 31372402)

* Corresponding author. 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 April 2014/Revised: 5 September 2014

ORCID iD——科学家唯一身份认证标识码

ORCID (Open Research and Contributor ID, 开放研究者和贡献者标识符), 创立于 2010 年, 是一个非盈利的组织, 具有开放性和国际性。ORCID 是一套免费的、全球唯一的 16 位身份识别码, 是研究者的学术身份证。它具有 5 个强大功能: (1) 作者姓名消歧; (2) 准确展示个人研究成果; (3) 避免研究成果归属混乱; (4) 提高数字环境下信息发现准确率; (5) 信息服务效率。

2014 年 10 月 28 日, 中国科学院文献情报中心举办了“ORCID 中国服务签约暨 iAuthor 启动仪式”。iAuthor, 即 ORCID 中国服务平台, 由中国科学院文献情报中心开发, 其核心功能是帮助中国的科研人员获得 ORCID 号, 并创建科研人员的个人学术产出管理空间。iAuthor 平台, 是以研究者为中心的学术社区, 实现姓名不同形式归一、中英文科研产出汇总、个人科研管理、学术影响力展现等功能, 帮助中国科学家快速融入国际科研工作者识别体系。该系统不仅能够管理个人的科研成果、查找同行、发现合作者, 还能够快速浏览到特定研究领域的科研人员、了解机构的科研人员及整体的科研产出情况。

拥有 ORCID iD 之后, 将助推您的学术工作。(1) 拥有专属的国际唯一学术识别符, 获得科研身份证, 让您与全球同行之间“知你、知我”。(2) 满足投稿期刊、基金组织对您的唯一识别要求, 让您的科研工作更加畅通。(3) 及时发现您分布在各处的个人科研产出。

目前 ORCID 的会员包括 120 多家世界上最有影响力的出版社、基金组织以及科研机构。ORCID 和 iAuthor 将极大地方便科研人员, 而且将来的应用范围会越来越广。建议大家尽早注册一个 ORCID iD (<http://iAuthor.cn>), 并完善其中的信息。

ORCID iD, 将是您贴心的学术名片!