



致犊牛脑膜炎大肠杆菌新疆分离株*ibeB*基因的特性分析

凌晨, 蒋建军, 宋康, 张坤, 师燕霞, 冯广余, 倪宏斌, 朱玲, 王鹏雁*, 剡根强*

石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000

摘要: 【目的】分析致犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株*ibeB*基因的分子生物学信息。【方法】以自脑炎死亡犊牛脑组织、肝组织分离鉴定的O161-K99-STa致病性大肠杆菌牛-EN株和牛-EG分离株为材料。根据GenBank中公布的脑膜炎大肠杆菌K1株RS218 *ibeB*基因序列设计1对引物, 采用PCR方法, 从分离株中成功克隆*ibeB*基因, 比较分离株*ibeB*基因与不同来源大肠杆菌*ibeB*基因的部分生物信息学特性。【结果】分离株*ibeB*基因序列全长1500 bp, 包含1371 bp开放阅读框, 共编码457个氨基酸; 生物信息学分析显示, 牛-EN株与致人脑膜炎大肠杆菌K1 RS218的核苷酸和氨基酸同源性分别为90.5%和96.9%, 牛-EG株与大肠杆菌K12的核苷酸和氨基酸同源性分别为99.4%和100.0%; *ibeB*蛋白为亲水性蛋白, 分子质量为50.26 kDa, 理论等电点为6.05; 该蛋白无跨膜区, 但具有信号肽序列; 亚细胞定位显示, 分泌信号通路位点(SP)占比例为0.939, 说明该蛋白属于分泌型蛋白。【结论】从致脑膜炎大肠杆菌分离株中成功克隆*ibeB*基因, 该基因与致人脑膜炎大肠杆菌K1 RS218 *ibeB*基因有较高的同源性, 均有相似的生物学特性, 属肠外致病性大肠杆菌。

关键词: 脑膜炎, 大肠杆菌, *ibeB*, 克隆, 生物信息学分析

细菌性脑膜炎是中枢神经系统(central nerve system, CNS)最常见最严重的感染性疾病, 目前能够引起动物脑膜炎的细菌主要有肺炎链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、产单核细胞增多性李斯特杆菌、昏睡嗜血杆菌、B族链球菌和奈瑟球菌等^[1-3]。肠外致病性大肠杆菌(Extraintestinal Pathogenic *E. coli*, ExPEC)广泛感染人和动物, 如: 新生儿脑膜炎、尿路感染、肺炎、骨髓炎、

败血症、幼畜腹泻及败血症等^[4-6]。据报道, 大肠杆菌是引起新生儿败血症和脑膜炎最常见的革兰氏阴性菌, 以含K1荚膜多糖的K1株占多数, 大肠杆菌K1株脑膜炎由血液循环进入大脑而致病^[7-9]。

研究表明脑膜炎大肠杆菌K1株RS218毒力岛GimA全长20.3 kb, 含有4个操作子(*ptnIPKC*, *cglDTEC*, *gcxKRCI*和*ibeRAT*), 共15个基因^[10]。与侵袭BMEC相关的基因有*ibeA*、*ibeB*、*yi jp (ibeC)*、

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD43B02)

*通信作者。E-mail: 王鹏雁, wwwpy_322@163.com; 剡根强, ygq58@shzu.edu.cn

收稿日期: 2015-09-07; 修回日期: 2015-12-09; 网络出版日期: 2015-12-11

alsA、*ompA*、*cglE*、*ppK1*等^[11-15], 其中对*E. coli*穿越血脑屏障起关键作用的*ibeA*、*ibeB*、*ibeC*基因已成功克隆表达, 并构建*ibeA*、*ibeB*、*ibeC*基因缺失突变株^[16]。目前, 对致犊牛脑膜炎大肠杆菌的GimA中*ibeB*基因研究在国内尚未报道。

据报告, 脑膜炎大肠杆菌K1株RS218 *ibeB*开放阅读框为1383 bp, 共编码460个氨基酸, 蛋白分子质量为50 kDa, 与大肠杆菌K12株p77211核苷酸同源率为97%, 与其他侵袭脑微血管内皮细胞相关基因无同源性, 是一种新型侵袭基因^[10]。*ibeB*基因编码1个50 kDa的前体蛋白, 该前体可自我加工成34 kDa的定位于细菌外膜的成熟蛋白, 而且纯化的34 kDa *ibeB*蛋白的抗体能阻止大肠杆菌K1对BMEC的侵袭, 并呈剂量依赖性^[17]。但目前关于致脑膜炎大肠杆菌如何穿越由脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMEC)等组成的血脑屏障的机制尚不清楚^[18-19]。

2013年入冬以来, 新疆石河子某规模化奶牛场1周龄左右的犊牛群相继出现死亡, 发病犊牛主要呈现典型的高热、嗜睡、步态僵硬、头颈僵直, 甚至出现角弓反张现象, 病死犊牛出现神经症状并死亡, 抗生素治疗效果不佳^[20]。病程3-7 d, 先后死亡犊牛13头, 剖检发现脑膜严重出血, 无菌从病死犊牛脑组织、肝组织中分离培养获得单一的溶血性大肠杆菌, 对分离株*ibeB*基因进行克隆及序列的分析, 以探讨致犊牛脑膜炎大肠杆菌的毒力基因, 为进一步研究大肠杆菌致犊牛脑膜炎的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

分离株(牛-EN株、牛-EG株)由本实验室分别从新疆同一发病奶牛场2头脑膜炎死亡病例的脑、肝组织中同时分离、鉴定并保存, 分离株经扬州大学高崧教授鉴定为O161血清型, PCR鉴定分离

株含有K99-STa、呈 β 溶血, 对小鼠具有高致死率; 大肠杆菌DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂和仪器

DL-2000 DNA Marker、2 \times PCR Mix均购自上海东盛公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒、pMD19-T载体均购自TaKaRa公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自诺维森生物公司; 质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; LB培养基为自配。

生物安全柜(HBC-II-A/B3型)购自Baker公司; CR22E高速冷冻离心机(HITACHI)购自日立公司; PCR扩增仪购自Bio-Rad公司; 电泳凝胶成像仪购自PhotoFilm公司。

1.3 引物

参考GenBank(登录号: AF094824.1)中的大肠杆菌K1 RS218基因序列, 应用Premier 5.0软件设计一对特异性引物扩增*ibeB*基因全长, 上游引物序列*ibeB-F*是5'-ATTTTGTCAATTTTCCTGTCACC-3', 下游引物序列*ibeB-R*是5'-GCTTTTTTCATT-TATTCTCTCCT-3', 预期扩增片段长度大小为1500 bp, 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.4 分离株的培养及基因组DNA的提取

将实验室保存分离株活化2代后接种于LB固体平板上培养过夜, 挑取单个菌落接种于LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C、180r/min摇床培养16-18 h, 用1.5 mL Tube收集菌液, 参考细菌基因组DNA提取试剂盒步骤提取分离株基因组DNA, 标记为牛-EN、牛-EG。提取后的DNA保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

1.5 PCR的扩增

以分离株基因组DNA为模板、*ibeB-F*和*ibeB-R*为上下游引物扩增目的片段。PCR反应体系20 μ L: 2 \times PCR Mix 10 μ L、上下引物各1 μ L、模

板2 μL 、ddH₂O 6 μL 。PCR反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。同时设置空白对照组，PCR完成后，取7 μL 扩增产物于 $\phi=1\%$ 琼脂糖凝胶中电泳。

1.6 目的基因的纯化、克隆及筛选鉴定

PCR扩增产物经琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收后，再经 $\phi=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳鉴定回收阳性条带，连接pMD19-T载体；冷热激法转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，涂布含Amp LB平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单菌落至含Amp LB液体培养基中37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养，通过菌液PCR筛选阳

性克隆菌；鉴定为阳性克隆菌送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.7 *ibeB*基因及其编码蛋白质生物信息学分析

运用DNASar软件对分离株*ibeB*基因序列进行分析，将致犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株与标准株大肠杆菌K1 RS218进行序列比对和同源性分析；应用ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)等在线软件对分离株氨基酸序列和蛋白质特性进行分析。参考菌株信息见表1。

表1. 参考菌株信息表

Table 1. The information of reference strains

Strains	GenBank accession number	Protein accession number
APEC O78	CP004009.1	AGC86020.1
<i>Escherichia coli</i> ACN001	CP007442.1	AKP83286.1
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CP001509.3	ACT42413.1
<i>Escherichia coli</i> K1 RS218	AF094824.1	AAD30205.1
<i>Escherichia coli</i> K12 AG100	LN832404.1	CQR80170.1
<i>Escherichia coli</i> K12 GM1655 p77211	CP009685.1	AIZ92285.1
<i>Escherichia coli</i> O111:H-str. 11128	AP010960.1	BAI34571.1

2 结果和分析

2.1 分离株*ibeB*基因的扩增与克隆

应用*ibeB*-F和*ibeB*-R上下游引物扩增*ibeB*基因，其扩增产物经 $\phi=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测得到约1500 bp的目的片段，与预期片段大小一致(图1)。克隆表达后，随机挑取单菌落，菌液PCR扩增产物后经 $\phi=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳在1500 bp处可见清晰条带，结果显示成功获得阳性转化子。

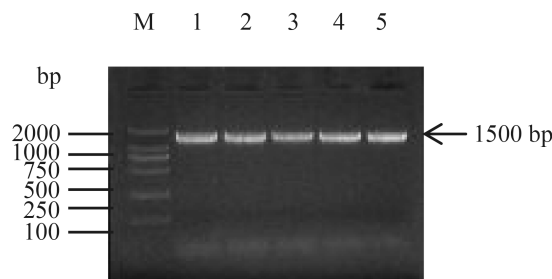


图1. *ibeB*基因的PCR扩增结果

Figure 1. PCR amplification of *ibeB* gene. M: DNA Marker DL-2000; lane 1–3: *ibeB* gene amplification products of E-bovine-N; lane 4–5: *ibeB* gene amplification products of E-bovine-G.

2.2 分离株*ibeB*基因序列测定结果及遗传进化分析

将PCR鉴定为阳性菌送北京六合华大基因科技有限公司测序, 结果显示分离株*ibeB*基因已成功克隆至pMD19-T载体, 分离株*ibeB*基因序列全长均为1500 bp, 包括1371 bp完整CDs区, 该基因共编码457个氨基酸。应用DNASar软件对该分离株*ibeB*基因与GenBank公布的部分菌株*ibeB*基因序列及所编码氨基酸进行同源性比对分析, 并采用

NJ法构建系统进化树。由图2可知, 本试验获得的牛-EN株和牛-EG株与标准株大肠杆菌K1RS218核苷酸和氨基酸同源性分别为90.5%和96.9%与89.9%和97.2%; 分离株牛-EN和牛-EG *ibeB*蛋白与非致病性大肠杆菌BL21、大肠杆菌MG1655菌株*ibeB*蛋白同源性高达99%以上, 故它们在蛋白结构中可能有极相似特性及结构功能, 但其具体功能还需进一步的研究验证。

		Homology/%									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Variation/%	1	■	99.5	97.9	100.0	97.5	95.8	99.9	99.9	97.4	APEC O78
	2	100.0	■	89.6	99.0	96.9	89.9	99.4	99.4	96.8	E-bovis-G
	3	99.8	99.8	■	97.6	98.2	90.5	98.0	98.0	98.3	E-bovis-N
	4	100.0	100.0	99.8	■	97.2	85.8	99.9	99.9	97.1	<i>Escherichia coli</i> ACN001
	5	99.8	99.8	99.6	99.8	■	90.5	97.6	97.6	98.9	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)
	6	97.2	97.2	96.9	97.2	96.9	■	95.7	95.7	90.6	<i>Escherichia coli</i> KI RS218
	7	100.0	100.0	99.8	100.0	99.8	97.2	■	100.0	97.5	<i>Escherichia coli</i> K12 AG100
	8	100.0	100.0	99.8	100.0	99.8	97.2	100.0	■	97.5	<i>Escherichia coli</i> K12 GM1655 p772
	9	99.6	99.6	99.3	99.6	99.8	96.7	99.6	99.6	■	<i>Escherichia coli</i> OIII:H-str.III28

图 2. 分离株*ibeB*基因核苷酸和氨基酸与参考菌株同源性 (%) 比对分析

Figure 2. The sequence homology of nucleotide and amino acid (%) of *ibeB* among different strains. The right corner of *ibeB* nucleotide homology and the left corner of *ibeB* gene amino acid homology.

2.3 分离株*ibeB*基因蛋白结构分析

2.3.1 *ibeB*基因蛋白质理化性质: 应用ExPASy在线软件ProtParam工具对分离株*ibeB*基因编码蛋白的理化性质进行分析, 结果显示*ibeB*蛋白分子质量约为50.26 kDa, 其分子式为C₂₂₀₈H₃₅₀₉N₆₃₁O₆₉₀S₁₀, 含有41个强碱性氨基酸(R、H、K)、40个强酸性氨基酸(D、E)、197个疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、V); 极性氨基酸总数260个: 其中包括179个极性不带电氨基酸(N、C、Q、G、S、T、Y)、41个极性带正电氨基酸(R、H、K)、40个极性带负电氨基酸(D、E); 理论等电点(PI)为6.05; 带负电荷的残基总数为38个, 带正电荷的残基总数为40个; 不稳定指数为45.52, 根据Guruprasad方法表明*ibeB*蛋白不稳定; 脂溶指数为

92.58, 总疏水性平均数为-0.230, 预测该蛋白为亲水性蛋白。ProtScale在线工具进一步预测表明, *ibeB*氨基酸序列中疏水最大值为2.544, 最小值为-2.244, 但大部分氨基酸属于亲水性氨基酸, 可见该蛋白属于亲水性蛋白(图3), 与上述预测结果相一致。该分离株*ibeB*蛋白与致人脑膜炎大肠杆菌K1株RS218及非致病性大肠杆菌BL21、MG1655菌株*ibeB*蛋白理化性质相似, 均属于亲水性蛋白。

2.3.2 跨膜区、信号肽和亚细胞定位: 使用在线工具TMHMM 2.0对*ibeB*氨基酸序列进行跨膜预测分析, 结果显示分离株*ibeB*蛋白无跨膜螺旋, *ibeB*蛋白均处于膜外, 不存在跨膜结构(图4)。SignalP 4.1 Server在线分析该蛋白具有信号肽序

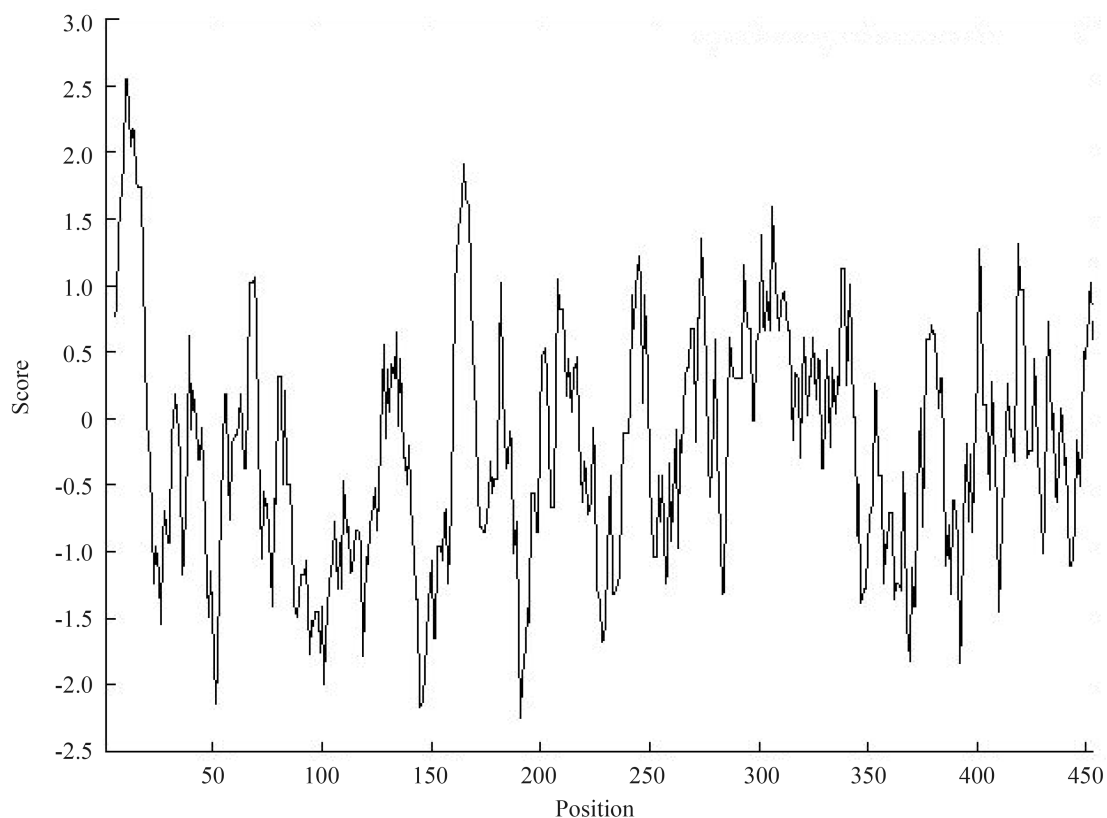


图 3. *ibeB*蛋白疏水性分析

Figure 3. Analysis hydrophobicity of *ibeB* protein. The horizontal axis stands for the position of amino acids in this protein and vertical axis stands for the hydrophobicity. The positive value of vertical axis represent hydrophobicity and the negative value represent hydrophilia.

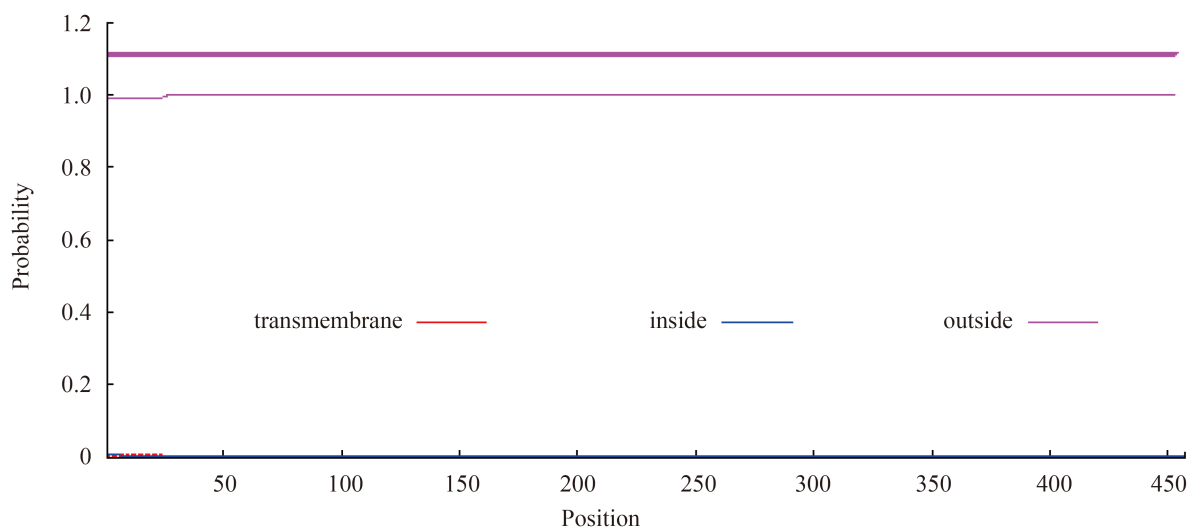


图 4. TMHMM预测*ibeB*蛋白质跨膜分析

Figure 4. Analysis transmembrane region of *ibeB* sequence with TMHMM. The horizontal axis stands for the position of amino acids in this position and vertical axis stands for the probability.

列, 具体序列为MSPCKLLPFCVALALTGCSLA, 说明*ibeB*蛋白可能在跨膜运输中有信号识别作用; 剪切位点位于第21–22位氨基酸, 表明成熟肽始于第21位氨基酸。

应用ExPASy中TargetP程序对*ibeB*蛋白进行亚细胞定位分析, 结果分析, 线粒体作用位点(mTP)所占比例很小, 而分泌信号通路位点(SP)占比为0.939, 说明该蛋白属于分泌型蛋白。

2.3.3 *ibeB*蛋白质二级和三级结构预测: 应用ExPASy中SOPMA程序预测分离株*ibeB*蛋白二级结构表明, α -螺旋占63.46%; β -折叠占9.19%; 无规则卷曲占18.16%。

Swiss-model预测*ibeB*蛋白三级结构表明(图5), 其残基建模范围是从49到457, 以4k34.1.A为模板的序列比对相识度达99.77, 说明二者的空间结构大体一致, 同时也可以看出*ibeB*蛋白具有较多的 α -螺旋, 与ExPASy中SOPMA程序预测结果一致。

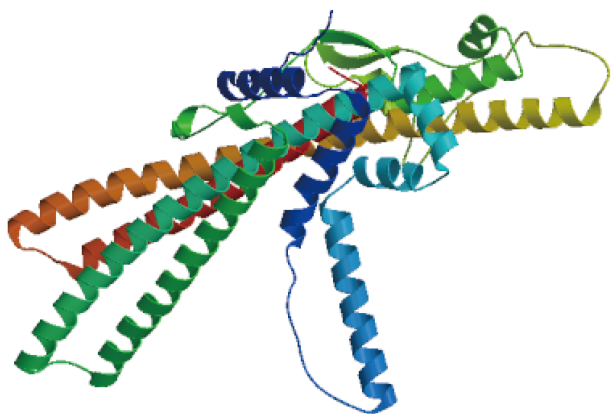


图 5. *ibeB*蛋白三级建模预测

Figure 5. Tertiary structure of *ibeB* protein.

3 讨论

据报道, 细菌通过3种方式穿过血脑屏障: 跨细胞穿越, 细胞间穿越及通过“木马”机制穿越, 其中大肠杆菌引起脑膜炎的方式是跨细胞穿越^[7]。与侵袭BMEC相关的基因有*ibeA*、*ibeB*、*yijp*

(*ibeC*)、*alsA*、*ompA*、*cglE*、*ppK1*等, 而*ibeB*是参与大肠杆菌K1侵袭脑微血管内皮细胞、穿越血脑屏障相关基因^[17]。*E. coli* K1 RS218 (O18:K1:H7) *ibeB*基因开放阅读框(ORF)为1383 bp, 编码50 kDa蛋白, 与大肠杆菌K12株p77211氨基酸同源率为97%^[21]。本研究利用PCR方法, 在国内首次成功克隆了犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株*ibeB*基因, 基因全长1500 bp, 包括1371 bp完整CDs区, 共编码457个氨基酸。牛-EN株与标准株大肠杆菌K1 RS218核苷酸和氨基酸同源率分别为90.5%和96.9%; 牛-EG株与大肠杆菌K12 p77211核苷酸和氨基酸同源率分别为99.4%和100.0%。系统进化树分析表明, 牛-EN株与标准株大肠杆菌K1 RS218亲缘性很近, 牛-EG株与大肠杆菌K12亲缘关系很近。初步揭示致新生儿脑膜炎大肠杆菌K1与致犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株在侵袭BMEC相关*ibeB*基因上密切相关, 但两种不同来源分离株是否存在交叉致病尚不清楚。

应用ExPASy在线软件ProtParam工具预测分离株*ibeB*基因编码蛋白的理化性质, 结果显示*ibeB*蛋白分子质量约为50.26 kDa, 理论等电点(PI)为6.05, 共包含20种氨基酸, 其中丙氨酸和亮氨酸含量最高, 为12.69%, 半胱氨酸、组氨酸和色氨酸含量最低, 为0.66%; 不稳定指数为45.52, 表明*ibeB*蛋白不稳定, 脂溶指数为92.58。疏水性分析显示, 分离株*ibeB*蛋白总疏水性平均数为-0.230, 表明*ibeB*蛋白为亲水性蛋白。蛋白跨膜区和信号肽序列分析发现, *ibeB*蛋白没有跨膜螺旋, 均处于膜外, 不存在跨膜结构; 该蛋白具有信号肽序列, 具体序列为MSPCKLLPFCVALALTGCSLA, 说明*ibeB*蛋白可能在跨膜运输中起信号识别作用。亚细胞定位与蛋白质的功能有着密切联系, 通过氨基酸组成进行亚细胞定位的预测, 其原理为: (1) 不同细胞器多具有不同的理化环境, 它会根据蛋白质的结构及表面理化特性,

选择性容纳蛋白；(2) 蛋白质表面直接暴露于细胞器环境中，它由序列折叠过程决定，而后者取决于氨基酸组成^[22]。亚细胞定位分析显示，线粒体作用位点(mTP)所占比例很小，而分泌信号通路位点(SP)占比例为0.939，说明*ibeB*蛋白属于分泌型蛋白。

致犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株均属于肠外致病性大肠杆菌，ExPEC是一类新的严重致病的大肠杆菌菌群，定殖于宿主肠道外其它组织，主要导致肠道外的感染。能够引起新生儿脑膜炎、尿路感染、肺炎、骨髓炎、败血症、幼畜腹泻及败血症等，ExPEC的发病率与死亡率都较高，且没有特定的血清型^[4-6,23]。2013年以来，新疆多个规模化奶牛场在初生犊牛中暴发1种以神经症状和急性死亡为特征病例，造成近百头犊牛死亡，本实验室从脑膜炎死亡犊牛脑组织中分离到溶血性、致小鼠高死亡率且罕见的O161血清型大肠杆菌，初步揭示由致病性大肠杆菌肠外感染引起的脑膜炎已成为造成犊牛死亡的病因之一，并将引起奶牛业兽医学及医学的关注和重视。

4 展望

有关大肠杆菌引起犊牛脑膜炎暴发的病例很少见，其致病机理尚不清楚。本研究通过对犊牛脑膜炎大肠杆菌分离株*ibeB*基因的克隆和部分生物信息学研究，可为致犊牛脑膜炎大肠杆菌的发病机理提供前期基础，但要确定分离株*ibeB*基因在致犊牛脑膜炎中的作用还需通过构建*ibeB*基因缺失株并进行动物试验和侵染细胞来进一步验证。

参考文献

- [1] Chen LD, Cao H. Research progress in the mechanism of brain barrier for the transmission of the *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2005, 21(5): 426–428. (in Chinese)
陈丽丹, 曹虹. 致脑膜炎大肠杆菌穿透血脑屏障机制的研究进展. *中国人兽共患病杂志*, 2005, 21(5): 426–428.
- [2] 许丹丹. 致犊牛脑膜炎大肠杆菌的分离鉴定及部分生物学特性研究. 石河子大学硕士学位论文, 2015.
- [3] Peng L, Zhao T, Luo WY, Fu MQ, Cao H, Huang SH. *ppkI* gene relates with the pathogenesis of meningitis infected by *E. coli* K1. *Microbiology China*, 2012, 39(2): 219–225. (in Chinese)
彭亮, 赵铁, 罗文英, 付美芹, 曹虹, 黄胜和. 脑膜炎大肠杆菌 K1 株 *ppkI* 基因致病机制初探. *微生物学通报*, 2012, 39(2): 219–225.
- [4] Ewers C, Janssen T, Wieler LH. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 2003, 116(9–10): 381–395.
- [5] Johnson JR, Russo TA. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186(6): 859–864.
- [6] Kim KS. *E. coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis//Oelschlaeger TA, Hacker J. *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells*. US: Springer-Verlag, 2000: 47–59.
- [7] Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 625–634.
- [8] Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 2003, 4(5): 376–385.
- [9] Huang SH, Wass C, Fu Q, Prasadarao NV, Stins M, Kim KS. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene*ibe10*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(11): 4470–4475.
- [10] Huang SH, Chen YH, Kong GY, Chen SH, Besemer J, Borodovsky M, Jong A. A novel genetic island of meningitic *Escherichia coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (GimA): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Functional & Integrative Genomics*, 2001, 1(5): 312–322.
- [11] Wang Y, Huang SH, Wass CA, Stins MF, Kim KS. The gene locus *yijP* contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 1999, 67(9): 4751–4756.

- [12] Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 1996, 64(1): 146–153.
- [13] Wang Y, Kim KS. Role of OmpA and IbeB in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Pediatric Research*, 2002, 51(5): 559–563.
- [14] Hoffman JA, Badger JL, Zhang Y, Huang SH, Kim KS. *Escherichia coli* K1 *aslA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 5062–5067.
- [15] Chen LD, Cao H, Huang SH, Yang J, Zhou H, Gong SJ. Cloning, expression and bioinformatics analysis for the novel gene *cglE* of *Escherichia coli* causing meningitis. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2006, 22(5): 419–422. (in Chinese)
陈丽丹, 曹虹, 黄胜和, 杨军, 周浩, 贡树基. 脑膜炎大肠杆菌新基因*cglE*的克隆、表达及功能分析. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(5): 419–422.
- [16] Chen DS, Fang WG, Chen YH, Song JD. Interaction of *E. coli* invasion gene deletion mutants with human brain microvascular endothelial cell. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, 27(3): 329–333. (in Chinese)
陈冬松, 方文刚, 陈誉华, 宋今丹. 大肠杆菌侵袭基因缺失突变株与人脑微血管内皮细胞的相互作用. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 329–333.
- [17] 赵伟东. 大肠杆菌血脑屏障侵袭基因*ibeB*的功能分析. 中国医科大学博士学位论文, 2004.
- [18] Huang SH, Stins MF, Kim KS. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes and Infection*, 2000, 2(10): 1237–1244.
- [19] Huang SH, Jong AY. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cellular Microbiology*, 2001, 3(5): 277–287.
- [20] 剡根强, 刘贤侠, 齐亚银. 规模化奶牛场兽医保健指南. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [21] Huang SH, Chen YH, Fu Q, Stins M, Wang Y, Wass C, Kim KS. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 1999, 67(5): 2103–2109.
- [22] Zhang S, Huang B, Xia XF, Sun ZR. Bioinformatics research in subcellular localization of protein. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34(6): 573–579. (in Chinese)
张松, 黄波, 夏学峰, 孙之荣. 蛋白质亚细胞定位的生物信息学研究. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6): 573–579.
- [23] Tang ZJ, Huang WX, Dong YS, Zheng XP, Liu CW, Yu DG. The relevance of molecular epidemiological study between extraintestinal pathological *Escherichia coli* infection in the clinic and intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Chongqing Medical University*, 2010, 35(8): 1252–1255. (in Chinese)
唐志君, 黄文祥, 董一山, 郑行萍, 刘成伟, 余登高. 临床分离肠外致病大肠杆菌及其与肠内致病大肠杆菌相关性的分子流行病学研究. 重庆医科大学学报, 2010, 35(8): 1252–1255.

Characterization of *ibeB* gene of meningitic *Escherichia coli* strains in calves from Xinjiang

Chen Ling, Jianjun Jiang, Kang Song, Kun Zhang, Yanxia Shi, Guangyu Feng, Hongbin Ni, Ling Zhu, Pengyan Wang*, Genqiang Yan*

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] To understand the molecular biology information of *ibeB* gene of meningitic *Escherichia coli* isolates in calves. [Methods] The strain used was isolated from the brain and liver tissue of calves died from Meningitis. It was identified to be an O161-K99-STa pathogenic *Escherichia coli* strain and named as bovine-EN and bovine-EG. Based on the sequence of *ibeB* gene of meningitic *Escherichia coli* K1 RS218 strain in GenBank, a pair of primers was designed and the *ibeB* gene was cloned from isolates by PCR. Part molecular biology information of *ibeB* among different strains was compared. [Results] The sequence length of isolates *ibeB* gene was 1500 bp, containing a 1371 bp open reading frame (ORF) encoding 457 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the nucleotide and amino acid homology of *ibeB* gene of bovine-EN strain shared 90.5% and 96.9% identity with *Escherichia coli* K1 RS218 *ibeB* gene, respectively, while bovine-EG strain shared 99.4% and 100.0% identity with *Escherichia coli* K12 respectively. The *ibeB* gene of bovine- E strains encoded water-soluble protein whose molecular weight was 50.26 kDa and isoelectric point was 6.05. This protein contained a signal peptide A but no transmembrane domain. Subcellular localization of *ibeB* belonged to the secreted protein, which secretory signal path site (SP) proportion was 0.939. [Conclusion] The *ibeB* gene was cloned from meningitic *E. coli* isolates and had higher homology and similar biological characteristics with meningitis *E. coli* K1 RS218*ibeB*, which belongs to extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.

Keywords: meningitis, *Escherichia coli*, *ibeB*, cloning, bioinformatics analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China (2012BAD43B02)

*Corresponding author. E-mail: Pengyan Wang, wwwpy_322@163.com; Genqiang Yan, ygq58@shzu.edu.cn

Received: 7 September 2015; Revised: 9 December 2015; Published online: 11 December 2015