



luxS 基因缺失对禽致病性大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 三种血清型分离株的生物学特性影响

吕小龙^{1,2}, 胡剑刚², 陈兆国², 荆雅玮², 米荣升², 黄燕², 王少辉², 韩先干^{2*}, 祁克宗^{1*}

¹安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

²中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要:【目的】LuxS/AI-2 型密度群体感应系统产生的自诱导信号分子 AI-2 (AI-2 的产生需要 *luxS* 基因编码的 LuxS 蛋白参与)参与对细菌众多生理功能的调控。探讨 *luxS* 对不同血清型禽致病性大肠杆菌(Avian Pathogenicity *Escherichia coli*, APEC)生物学特性的影响。【方法】本研究以 APEC 优势血清型 APECO₁ (O₁ 血清型)、DE17 (O₂ 血清型)、E940 (O₇₈ 血清型)及其相应 *luxS* 缺失株为研究对象, 对野生株和缺失株的生长特性、生物被膜形成、rdar (red, dry and rough)形态、运动性和耐药性等特性进行分析。【结果】*luxS* 基因的缺失不影响 APEC 生长特性, 但导致 APEC 不能产生 AI-2; 此外, *luxS* 基因的缺失显著降低 APECO₁ 和 E940 的生物被膜形成($P<0.05$), 而 DE17 的生物被膜形成无显著变化。对各菌株的 rdar 形态和运动性检测结果表明, *luxS* 基因的缺失改变了 APECO₁ 的 rdar 形态, 对 DE17 和 E940 并无影响; 显著降低了 APECO₁ 和 DE17 运动能力, 对 E940 并无影响。荧光定量 PCR 检测结果表明, *luxS* 基因的缺失显著降低 APECO₁、DE17 和 E940 与细菌运动性相关的鞭毛基因 *fliG* 和 *fliI* 的转录水平($P<0.05$)。此外, 对各菌株的耐药性检测结果表明, *luxS* 基因缺失导致 APECO₁ 对头孢吡肟和丁胺卡那由耐药变为高敏, 同时对氯霉素与 E940 相同由高敏变为耐药, 但对 DE17 的耐药性无显著改变。【结论】*luxS* 对 APEC 的生物学特性具有重要的调控作用, 且这种调控具有菌株特异性。

关键词: LuxS/AI-2, 禽致病性大肠杆菌(APEC), 生物被膜, rdar 形态, 运动性, 耐药性

禽致病性大肠杆菌 (Avian Pathogenicity *Escherichia coli*, APEC)临床上能够引起禽类多种疾病, 包括心包炎、肝周炎、腹膜炎、气囊炎、败血症以及其他主要的肠道外疾病^[1-2], APEC 血

基金项目: 国家自然科学基金(31370045, 31372402, 31572546); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2015)第 1-9 号]

*通信作者。祁克宗, Tel: +86-551-65786835, E-mail: qkz@ahau.edu.cn; 韩先干, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-05-04; 网络出版日期: 2017-06-15

清型复杂, 研究表明临床上的主要血清型为 O₁、O₂ 和 O₇₈ 等。禽大肠杆菌病常伴随其他细菌和病毒共感染, 导致由其所引起的发病率和死亡率升高, 严重制约养禽业的健康发展^[3-5]。而抗生素的滥用, 又极易造成广泛的耐药性。因此开展对 APEC 致病性的研究, 寻求新的治疗途径, 对该病的防控具有重要意义。

细菌可通过群体感应(Quorum sensing, QS)调控基因的表达来影响菌体的生理过程。而 QS 对细菌功能的调控是基于其信号分子的产生。LuxS/AI-2 型群体感应系统广泛存在于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中, 可产生通用的信号分子 AI-2, AI-2 作为呋喃酰硼酸二酯类分子由 *luxS* 通过催化核糖高半胱氨酸(SRH)转变为高丝半胱氨酸和 4,5-二羟基-2,3 戊二酮(DPD), DPD 水化后形成 AI-2^[6-8]。在 National Centre for Biotechnology Information (NCBI)数据库已公布的 89 个完整细菌基因组中, 有 39 个包含 *luxS* 基因。含有 *luxS* 基因的细菌在该基因缺失后均消除了 AI-2 的产生^[7]。

LuxS/AI-2 型群体感应系统调控多种细胞反应, 主要包括毒力因子的表达、运动性、细胞生长、生物被膜^[9]等, 从而使得细菌群体更加易于躲避来自宿主的免疫、抗生素以及杀菌剂等不利因素的压力, 使其感染难以清除^[10-13]。因此, 通过调控 LuxS/AI-2 型群体感应系统实现对细菌病的防控, 已成为微生物学研究的新热点。

本研究以 APEC 优势血清型 APECO₁ (O₁ 血清型)、DE17 (O₂ 血清型)、E940 (O₇₈ 血清型)及其相应 *luxS* 缺失株为研究对象, 研究 *luxS* 对其生物特性的影响, 为进一步研究 LuxS/AI-2 群体感应对 APEC 的调控作用以及 APEC 的防控提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂

APEC 优势血清型 APECO₁ (O₁ 血清型)、DE17 (O₂ 血清型)、E940 (O₇₈ 血清型)菌株由本实验室分离鉴定保存^[14]。APECO₁ Δ *luxS*、DE17 Δ *luxS*^[15]和 E940 Δ *luxS* 均由本实验室构建。96 孔聚丙烯细胞培养板(美国 Corning 公司)。药敏纸片(杭州天和公司)。酵母粉(Yeast Extract, OXOID 公司), 蛋白胨(Tryptone, OXOID 公司), M9 培养基(生工生物工程(上海)股份有限公司), 葡萄糖(生工生物工程(上海)股份有限公司), 刚果红(生工生物工程(上海)股份有限公司), 氯化钠(生工生物工程(上海)股份有限公司)。MgSO₄ (AMRESCO), Vitamin-free Casamino Acids (BD), KOU (AMRESCO), L-精氨酸(AMRESCO), 反转录试剂盒(TaKaRa), QuantiNovaTM SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)。

1.2 生长曲线

将 APECO₁、APECO₁ Δ *luxS*、DE17、DE17 Δ *luxS*、E940 和 E940 Δ *luxS* 分别接种于 LB 琼脂平板, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落接种试管中, 培养至对数中期, 调整 OD₆₀₀=1.0, 按 1 : 100 稀释接种于 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至平台期, 间隔等量时间取样测量 OD₆₀₀ 值, 记录并整理数值, 绘制菌株的生长曲线。

1.3 AI-2 活性检测

将上述 6 株菌于 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 2.0, 用新配制的 AB 培养基以 1 : 5000 稀释培养物。将上述超滤液在无菌条件下用 0.22 μ m 的滤器过滤后, 用于 AI-2 活性检测。参照文献[11]并做适当修改, 具体方法如下: 900 μ L 的 AB 培养基, 加入上述无菌的各滤液 100 μ L, 37 °C 培养 5 h 后,

用多功能酶标仪的生物发光模式测定其生物发光。同时以哈维弧菌 BB152 培养上清为阳性对照, AB 培养基为阴性对照, 每组重复 3 次。

1.4 细菌的生物被膜

细菌生物被膜形成实验根据文献[16]方法并做适当改进:将上述 6 株菌分别接种 LB 琼脂平板, 37 °C 培养后, 挑取单菌落接种试管中振荡培养至对数中期, 4 °C、3000×g 离心 10 min 收集菌体。以 M9 洗 2 遍, 再以 M9+0.2% 葡萄糖重悬菌体, 调整 $OD_{600}=0.03$, 加入到 96 孔聚丙烯板中, 每孔 200 μ L, 以无菌培养基作为对照组, 每组 6 个重复, 各重复 3 次。37 °C 培养 24 h, 每孔加入 200 μ L PBS 洗涤 3 遍, 晾干后每孔加入 200 μ L 0.1% 结晶紫溶液, 37 °C 染色 15 min, PBS 洗涤 3 遍, 晾干。每孔加入 200 μ L 95% 乙醇, 充分溶解后, 酶标仪测定每孔样本 OD_{595} 的数值, 并通过 GraphPad Prism 6 paired *t* 检验分析数据。

1.5 细菌的 rdar 形态变化

将上述 6 株菌分别接种 LB 琼脂平板, 挑取单菌落接种试管中振荡培养至对数中期, 4 °C 3000×g 离心 10 min 收集菌体, 以无菌 PBS 洗涤 2 遍调至 $OD_{600}=3$, 配制新鲜的 rdar 培养基^[17](刚

果红 0.008 g, 考马斯亮蓝 0.004 g, 蛋白胨 2.000 g, 酵母粉 1.000 g, 琼脂粉 1.600 g), 高压灭菌后的 rdar 固体培养基中滴加 0.5 μ L 菌体, 37 °C 培养 24 h 后, 拍照记录。

1.6 细菌的运动性

将上述 6 株菌分别接种 LB 琼脂平板, 挑取单菌落于玻璃试管静置培养至对数中期, 4 °C、3000×g 离心 10 min 收集菌体, 以无菌 PBS 洗涤 2 遍调至 $OD_{600}=3$, 配制新鲜的运动性培养基(2.0 g 蛋白胨, 1.0 g 氯化钠, 1.6 g 葡萄糖, 0.5 g 琼脂粉), 高压灭菌后倒入平板, 待冷却后在板的中央加入 2 μ L 菌体, 37 °C 培养 24 h。然后测量拍照^[18]。

1.7 与细菌运动性相关的基因转录水平检测

参照文献[19], 选取与细菌运动性相关的鞭毛基因 *fliG*、*fliI* 和 *fliM*, *dnaE* 作为内参基因, 分别设计引物(表 1), 进行 Real-time PCR, 研究缺失株与野生株鞭毛基因的转录差异。依据文献[11], 并做适当改进。将上述 6 株菌培养至对数中前期, 各取 1 mL 菌液提取 mRNA, 利用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 并以相应的 cDNA 为模板。RT-PCR 总体体系为 20 μ L: SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板为 3 μ L (30 ng),

表 1. 鞭毛基因和内参基因及其引物

Table 1. Flagellin genes and internal reference gene and its respective primers

Gene name	Primary source	Primer	Prime Sequences (5'→3')	Size/bp
<i>dnaE</i>	EG10238	dnaE-F	GATTGAGCGTTATGTCGGAGGC	80
		dnaE-R	GCCCCGCAGCCGTGAT	
<i>fliG</i>	EG11654	fliG-F	CAACTTTATGGAGCCACAGAGCG	225
		fliG-R	CCGTCGAGCAAGCCATTCAGTAC	
<i>fliI</i>	EG20266	fliI-F	GCAACGTACACCGATTGAACATG	381
		fliI-R	TAGCGGGTGAGGGAGTCCATAAT	
<i>fliM</i>	EG10323	fliM-F	GGCACCTGGGCTGGTGGTGTCTC	260
		fliM-R	ATGTCGTTTCGGCGAGGTGGTGAT	

QN ROX Reference Dye 0.1 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak)法分析数据^[20], 计算各缺失株目的基因的转录水平。

1.8 细菌的耐药性

采用圆纸片扩散试验法, 将上述 8 株菌进行头孢吡肟、庆大霉素、卡那霉素、氯霉素、头孢噻吩、环丙沙星、氨苄青霉素、四环素、甲氧苄啶、头孢曲松、丁胺卡那、头孢他啶等 12 种药物的药敏实验。各菌株分别划线培养于 LB 琼脂平板, 将药敏纸片均匀贴于表面。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后, 测量各药敏纸片的抑菌圈直径, 以 mm 计, 参照 CLSI 标准, 判定被检细菌对每种药物的敏感性, 分别为敏感(Susceptible, S)、中(Intermediate, I)或耐药(Resistance, R)菌株。

2 结果和分析

2.1 细菌的生长曲线

对 APECO₁、APECO₁ $\Delta luxS$ 、DE17、DE17 $\Delta luxS$ 、E940 和 E940 $\Delta luxS$ 的生长曲线(图 1)检测, 结果

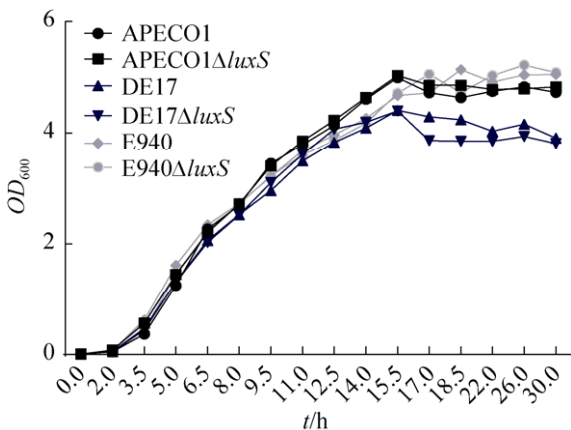


图 1. *luxS* 缺失株与野生株的生长曲线

Figure 1. Growth curve of *luxS* mutants and wild strains.

表明, 各菌株的野生型与缺失型的生长趋势基本保持一致, 无明显差异, 表明缺失 *luxS* 并不影响细菌的生长特性。

2.2 *luxS* 基因缺失影响 AI-2 活性

对 6 株菌产生的 AI-2 活性检测结果表明(图 2), 与阳性对照组 BB152 相比, *luxS* 缺失导致 APECO₁ $\Delta luxS$ 、DE17 $\Delta luxS$ 和 E940 $\Delta luxS$ 不产生 AI-2。

2.3 *luxS* 基因缺失影响细菌的生物被膜

对 6 株菌的生物被膜(图 3)形成检测结果表明, *luxS* 缺失使 APECO₁ 和 E940 的生物被膜形成显著下降($P < 0.05$), 而 DE17 的生物被膜形成无显著变化。

2.4 *luxS* 基因缺失引起细菌的 rdar 形态变化

从对 APEC 的 rdar 形态研究结果表明(图 4), *luxS* 基因的缺失使得 APECO₁ 的菌落颜色由白变为深红, 其形态变小, 且有一层透明圈。而 *luxS* 基因的缺失并不影响 DE17 和 E940 的 rdar 形态。

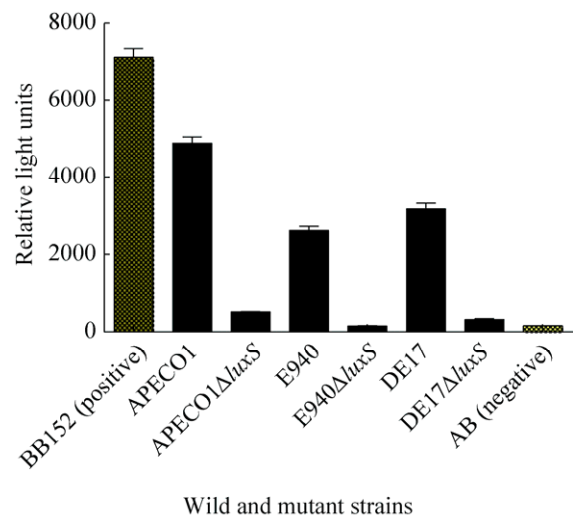


图 2. *luxS* 缺失株与野生株的 AI-2 活性检测

Figure 2. AI-2 activity of *luxS* mutants and wild strains.

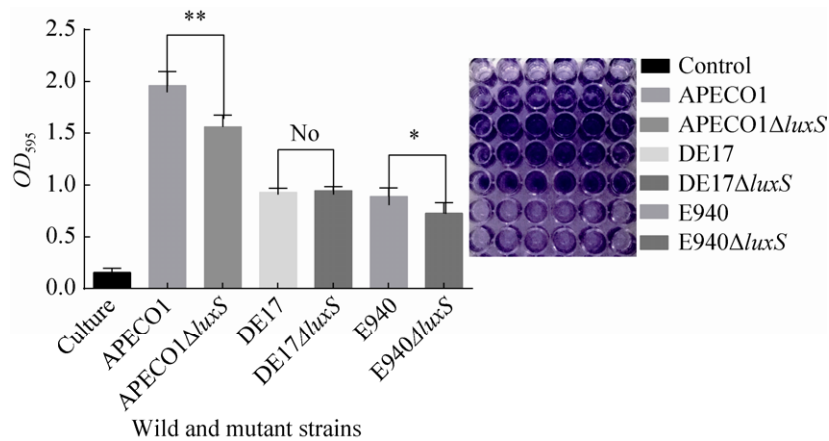


图 3. *luxS* 缺失株与野生株生物被膜形成

Figure 3. Biofilm formation of *luxS* mutants and wild strains. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.

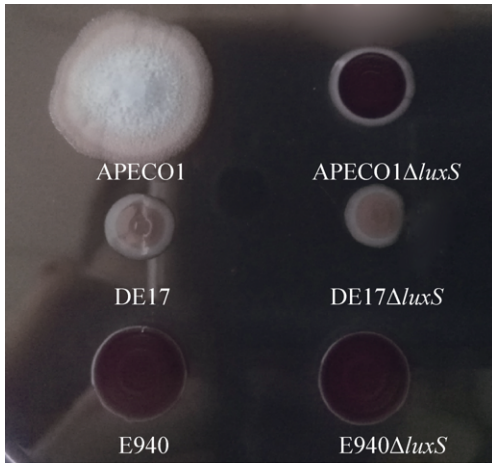


图 4. *luxS* 缺失株与野生株的 rdar 形态

Figure 4. rdar morphotype of *luxS* mutants and wild strains.

2.5 *luxS* 基因缺失对细菌运动性的影响

结合本实验室以往的结果^[11], 从图 5 中可以看出 *luxS* 基因的缺失显著降低了 DE17 和 APECO₁ 的泳动能力, 然而并不影响 BL21 以及 E940 的运动性。

2.6 *luxS* 基因缺失影响鞭毛基因的转录水平

对各缺失株中鞭毛基因 *fliG*、*fliI* 及 *fliM* 的转录水平研究表明, *luxS* 的缺失导致在 APECO₁Δ*luxS* 中 *fliG*、*fliI* 和 *fliM* 的转录水平均显著降低 ($P < 0.05$), 而在 DE17Δ*luxS* 和 E940Δ*luxS* 中, *fliG* 和 *fliI* 的转录水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 6)。

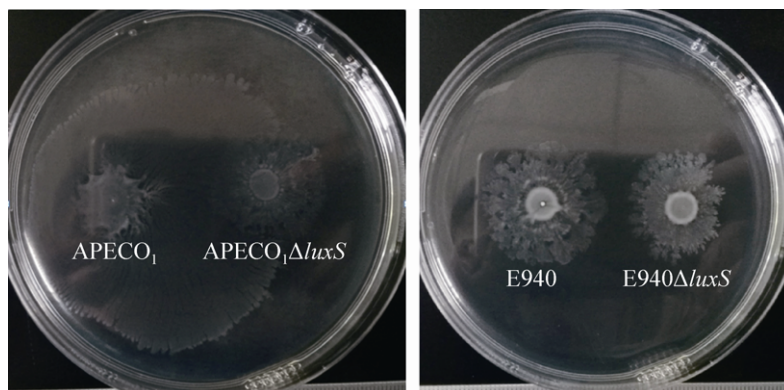


图 5. *luxS* 缺失株与野生株运动性

Figure 5. Motility of *luxS* mutants and wild strains.

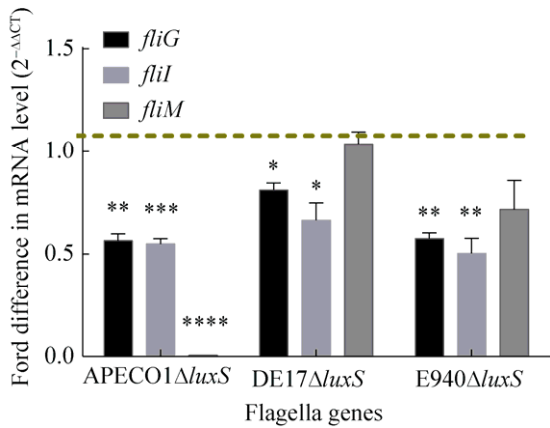


图 6. *luxS* 缺失株鞭毛基因的转录水平

Figure 6. Transcription level of flagellin gene in *luxS* mutants. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

2.7 *luxS* 基因缺失引起细菌的耐药性变化

参照对 8 株细菌的耐药性检测结果(图 7 和表 2)表明 *luxS* 基因的缺失导致 APECO₁ 对头孢吡肟和丁胺卡那由耐药变为高敏, 对氯霉素都由高敏变为耐药。E940 对氯霉素都由高敏变为耐药, 但对 DE17 的耐药性无显著改变。

3 讨论

APEC 可引起禽类大肠杆菌病, 给养禽产业带来严重的经济损失。APEC 血清型众多, 而 O₁、O₂ 和 O₇₈ 是其主要的致病血清型。细菌群体感应系统对细菌的致病性具有重要的调控作用, 群体感应系统调控毒力因子的表达、生物被膜的形成、菌落形态改变和运动性的变化等。此外, 由于生存环境和遗传背景的差异, 导致细菌的致病能力及其生理特性差异显著^[21-22]。

本研究结果表明, *luxS* 基因的缺失并不影响各菌株的生长特性, *luxS* 催化 SRH 生成 AI-2 前体, 参与了细菌的甲硫氨酸(Met)代谢通路, 而 Met 的甲基供应涉及细菌诸多重要的生化反应, 对细菌的生长代谢非常重要。此外, 在一些细菌中, Met 代谢通路由 SahH 催化并不形成 AI-2^[23]。而本研究中缺失 *luxS* 并没有引起生长特性的改变, 推测在 APEC 中可能存在类似 SahH 的替代通路参与其 Met 代谢, 具体机制仍有待进一步研究。

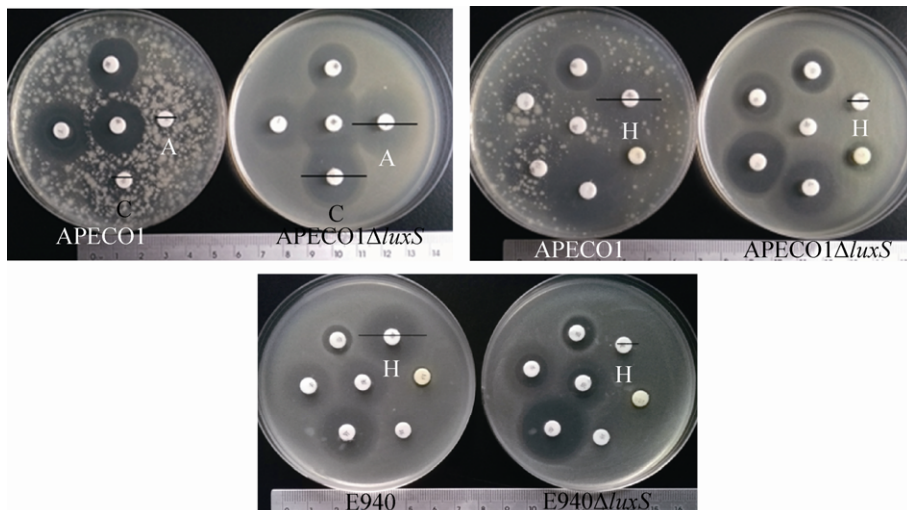


图 7. *luxS* 缺失株与野生株的耐药性

Figure 7. Drug-resistance of *luxS* mutants and wild strains. A: Amikacin; C: Cefepime; H: Chloroamphenicol.

表 2. 相应野生株与缺失株抗菌活性测定

Table 2. Determination of antibacterial activity of respective mutants and wild strains

Antibiotics	Antimicrobial activity (inhibition zone diameters/cm)					
	APECO ₁	APECO ₁ Δ <i>luxS</i>	DE17	DE17 Δ <i>luxS</i>	E940	E940 Δ <i>luxS</i>
Cefuroxime	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Cefepime	<u>R</u>	<u>S</u>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>
Amikacin	<u>R</u>	<u>S</u>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Ampicillin	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Trimethoprim	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Gentamycin	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Kanamycin	I	R	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>S</i>
Cephalothin	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Chloroamphenicol	<u>S</u>	<u>R</u>	<i>S</i>	<i>S</i>	<u>S</u>	<u>R</u>
Tetracycline	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Ciprofloxacin	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Ceftazidime	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>

R: Resistance, I: Medium sensitivity, S: Sensitivity. Compared with the wild and mutant strains, the italics indicate that the sensitization is changed from medium sensitivity to sensitivity, or from sensitivity to medium sensitivity. Underlined means that sensitivity becomes resistant, or the resistance becomes sensitivity. For resistance, or resistance to become sensitive. Bold means from medium resistance into resistance, or from resistance into medium sensitive.

细菌的“rdar” (red, dry and rough)形态是细菌的一种特殊表型,表现出细菌的一种群体行为,它以合成卷曲菌毛和纤维素等胞外基质为特征,这些胞外物质使得细菌通过相互作用抵御外界压力。根据刚果红与纤维素或卷曲菌毛结合后的吸收谱不同,可以通过菌落表型检测出这 2 个组分单独或混合存在。菌株产生纤维素表现出粉红、干燥和粗糙的菌落形态,而卷曲菌毛的产生会形成灰色、干燥以及粗糙的菌落形态,倘若没有胞外基质产生,则菌落表型为光滑和白色。通过对细菌 rdar 形态的研究,可为进一步开展纤维素和卷曲菌毛相关的调控通路提供参考。rdar 形态的出现对环境中致病菌的生存和感染非常重要^[24]。本研究通过对 APEC 的 3 种血清型和相应的 *luxS* 缺失株进行相关的生理学实验,发现 APECO₁ 的菌落形态由干燥的浅色变为较小规则红色菌落,推测 *luxS* 基因的缺失可能导致其纤维素的合成增加^[17],此外从其形态中可以看出其胞外基质成分和细菌的运动能力也发生改变。

此外,本研究结果表明,3 种血清型都呈现一定的运动性,但是在 *luxS* 缺失的情况下,只有 DE17 和 APECO₁ 表现出明显的运动性下降,通过进一步研究与运动性相关的鞭毛基因的转录水平,发现在 3 种血清型菌株中, *fliG* 和 *fliI* 均显著下降($P < 0.05$),而在 APECO₁ 中 *fliM* 基因的转录水平极显著下降($P < 0.0001$),表明 *luxS* 缺失导致 DE17 和 APECO₁ 的运动性降低,可能与其鞭毛基因的转录水平降低有关,但是对 E940 的运动性没有改变,推测在 E940 中,除了上述基因参与对其运动性的调控,也与该菌株的自身遗传背景和对环境具有依赖性有关^[25]。

细菌耐药性的产生受多因素调控,研究表明,细菌的群体感应系统对细菌的耐药性具有重要的调控作用^[26]。在本研究中,敲除 *luxS* 基因引起 APECO₁ 对头孢吡肟和丁胺卡那由耐药变为高敏,对氯霉素都由高敏变为耐药。E940 对氯霉素都由高敏变为耐药。研究表明,头孢吡肟主要抑制细菌细胞壁的形成,而丁胺卡那和氯霉素主要抑制

蛋白质的合成; 耐药性结果表明, 不同血清型 APEC 的耐药性具有菌株特异性。

本研究通过敲除 APEC 不同血清型的 *luxS*, 开展 *luxS* 对不同血清型 APEC 生物学特性的影响研究, 为进一步研究 APEC 的防控提供参考。

参 考 文 献

- [1] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 1999, 30(2/3): 299–316.
- [2] Stathopoulos C, Provence DL, Curtiss III R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin a protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity*, 1999, 67(2): 772–781.
- [3] Dou XH, Gong JS, Han XA, Xu M, Shen HY, Zhang D, Zhuang LL, Liu JS, Zou JM. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. *Gene*, 2016, 576(1): 244–248.
- [4] Guabiraba R, Schouler C. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(15): fnv118.
- [5] Landman WJM, van Eck JHH. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathology*, 2015, 44(5): 370–378.
- [6] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(2): 156–181.
- [7] Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(2): 191–197.
- [8] Zhu JG, Dizin E, Hu XB, Wavreille AS, Park J, Pei DH. S-Ribosylhomocysteinase (LuxS) is a mononuclear iron protein. *Biochemistry*, 2003, 42(16): 4717–4726.
- [9] Bai H, Han XG, Liu L, Shan XQ, Song J, Liu R, Dong HL, Liu HW, Ding C, Yu SQ. The regulation of autoinducer-2 in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(24): 5110–5116. (in Chinese)
白灏, 韩先干, 刘蕾, 单雪芹, 宋军, 刘瑞, 董洪亮, 刘海文, 丁铲, 于圣青. 信号分子 AI-2 对禽致病性大肠杆菌的调控作用. *中国农业科学*, 2012, 45(24): 5110–5116.
- [10] Han XG, Bai H, Liu L, Chen WJ, Ding C, Hu QH, Qi KZ, Yu SQ. Cloning and expression of *luxS* and *pfs* and *in vitro* biosynthesis autoinducer 2 of avian pathogenic *Escherichia coli* from Anhui Province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(9): 1167–1172. (in Chinese)
韩先干, 白灏, 刘蕾, 陈文静, 丁铲, 胡青海, 祁克宗, 于圣青. 禽致病性大肠杆菌安徽分离株 *luxS* 和 *pfs* 基因的克隆、表达与细胞外合成 AI-2 活性检测. *微生物学报*, 2012, 52(9): 1167–1172.
- [11] Han XG, Bai H, Liu L, Dong HL, Liu R, Song J, Ding C, Qi KZ, Liu HW, Yu SQ. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55: 21–27.
- [12] Han XG, Lu CP. Biological activity and identification of a peptide inhibitor of LuxS from *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(1): 16–23.
- [13] Han XG, Lu CP. Detection of autoinducer-2 and analysis of the profile of *luxS* and *pfs* transcription in *Streptococcus suis* serotype 2. *Current Microbiology*, 2009, 58(2): 146–152.
- [14] Chen WJ, Han XG, He L, Hu QH, Yu SQ. 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其生物学特性分析. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(2): 34–40.
- [15] Zhang YX, Han XG, Zuo JK, Gong JS, Han Y, Fan GB, Wang SH, Tian MX, Ding C, Qi KZ, Yu SQ. Distribution of lipopolysaccharide core type in avian pathogenic *Escherichia coli* and its correlation with virulence gene. *Microbiology China*, 2015, 42(8): 1619–1625. (in Chinese)
张宇曦, 韩先干, 左佳坤, 龚建森, 韩月, 范国博, 王少辉, 田明星, 丁铲, 祁克宗, 于圣青. 禽致病性大肠杆菌脂多糖核心型分布与毒力基因的相关性分析. *微生物学通报*, 2015, 42(8): 1619–1625.
- [16] Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3572–3581.
- [17] Römling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(11): 1234–1246.
- [18] Ling H, Kang A, Tan MH, Qi XB, Chang MW. The absence of the *luxS* gene increases swimming motility and flagella synthesis in *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 401(4): 521–526.
- [19] Ni B, Ghosh B, Paldy FS, Colin R, Heimerl T, Sourjik V. Evolutionary remodeling of bacterial motility checkpoint control. *Cell Reports*, 2017, 18(4): 866–877.
- [20] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [21] da Silveira WD, Ferreira A, Brocchi M, de Hollanda LM, de Castro AFP, Yamada AT, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology*, 2002, 85(1): 47–53.
- [22] Paixão AC, Ferreira AC, Fontes M, Themudo P, Albuquerque T, Soares MC, Fevereiro M, Martins L, de Sá MIC. Detection

- of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poultry Science*, 2016, 95(7): 1646–1652.
- [23] Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. Heterologous expression of sahH reveals that biofilm formation is autoinducer-2-independent in *Streptococcus sanguinis* but is associated with an intact activated methionine cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(43): 36111–36122.
- [24] Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou YZ, Pinto R, Belausov E, Chapman MR, Sela S. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1545–1554.
- [25] Nickzad A, Lépine F, Déziel E. Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128509.
- [26] Chait R, Craney A, Kishony R. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*, 2007, 446(7136): 668–671.

Inactive *luxS* influence on biological characteristics of O₁, O₂ and O₇₈ serotypes isolates in avian pathogenicity *Escherichia coli*

Xiaolong Lü^{1,2}, Jiangang Hu², Zhaoguo Chen², Yawei Jing², Rongsheng Mi², Yan Huang², Shaohui Wang², Xianghan Han^{2*}, Kezong Qi^{1*}

¹ College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

² Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Objective] LuxS/AI-2-type quorum sensing participates in regulation of bacterial biological properties by AI-2, which is synthesized by the enzymes LuxS (encoded by *luxS*). The aim of this study is to elucidate *luxS* effects on biological characteristics of different serotypes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). [Methods] The biological characteristics of 3 APEC strains, including APECO₁ (serotype O₁), DE17 (serotype O₂) and E940 (serotype O₇₈) and their *luxS* mutant strains were analysed by growth curve, biofilm-producing, rdar morphology, bacterial motility and sensitivity to antibiotics. [Results] *luxS* knockout, eliminating AI-2 formation, had no influence on bacterial growth, but significantly decreased biofilm-producing in E940 and APECO₁ ($P < 0.05$), without effect on DE17. Results of rdar morphology indicate that the APECO₁ strain showed remarkable change in rdar morphology compared with *luxS* mutant, but no change in DE17 and E940. Moreover, deletion of *luxS* lead to decreasing the motility of APECO₁ and DE17, but no influence on E940 strain. The transcriptional levels of *fliG* and *fliI* were significantly decreased in APECO₁, DE17 and E940 ($P < 0.05$). Furthermore, results of drug-resistance indicate that *luxS* inactivation caused APECO₁ resistant to cefepime, amikacin, and sensitive to chloramphenicol. *luxS* inactivation also caused E940 strain sensitive to chloramphenicol, but no significant effect on drug-resistance of DE17 strain. [Conclusion] LuxS plays a significant role in regulation of biological properties in APEC.

Keywords: LuxS/AI-2, Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), biofilm, rdar morphology, motility, drug-resistance

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370045, 31372402, 31572546) and by the Shanghai Key Project on Agricultural Development Through Science and Technology (2015HNG1-9)

*Corresponding author. Kezong Qi, Tel: +86-551-65786835, E-mail: qkz@ahau.edu.cn; Xianghan Han, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com

Received: 6 March 2017; Revised: 4 May 2017; Published online: 15 June 2017