



## *yeaI* 基因对奶牛源大肠杆菌 NJ17 生物学特性的影响

王旭东<sup>1</sup>, 林鑫广<sup>1</sup>, 左佳坤<sup>2</sup>, 许媛媛<sup>1</sup>, 王志豪<sup>2</sup>, 陈兆国<sup>2</sup>, 韩先干<sup>2\*</sup>, 苗晋锋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

**摘要:** c-di-GMP 是细菌中广泛存在的第二信使, 可通过效应蛋白参与调控细菌的生物被膜形成、运动性和毒力等生物学特性。YeaI 因含有能结合 c-di-GMP 分子的 EGEVF 基序, 可能作为 c-di-GMP 效应蛋白发挥作用。【目的】研究 *yeaI* 基因缺失对奶牛源大肠杆菌临床分离株 NJ17 生物学特性的影响。【方法】构建 NJ17 的 *yeaI* 缺失株(NJ17Δ*yeaI*)及回复株 cNJ17Δ*yeaI*, 分析 *yeaI* 对 NJ17 生物学特性(如生长特性、生物被膜形成能力和对小鼠乳腺上皮细胞(EpH<sub>4</sub>-Ev)的黏附)的影响。【结果】成功构建 NJ17 的 *yeaI* 缺失株(NJ17Δ*yeaI*)及其回复株(cNJ17Δ*yeaI*); 与野生株 NJ17 相比, 缺失株 NJ17Δ*yeaI* 生长特性及耐药性无显著变化, 生物被膜形成能力显著下降, 运动性显著升高( $P<0.05$ ); 透射电镜检测结果表明, *yeaI* 缺失影响 NJ17 菌毛和鞭毛的形成; 实时定量 PCR(qPCR)结果显示, *yeaI* 基因显著抑制 NJ17 鞭毛基因 *filG* 和 *motB* 的转录水平( $P<0.05$ ); 血清杀菌实验表明, *yeaI* 缺失能显著增强其抵抗血清杀菌作用( $P<0.05$ ); 对 EpH<sub>4</sub>-Ev 细胞黏附实验表明, *yeaI* 缺失对 NJ17 黏附性无显著影响( $P>0.05$ )。【结论】*yeaI* 对奶牛源大肠杆菌 NJ17 的生物学特性具有重要的调控作用。

**关键词:** c-di-GMP, *yeaI*, 奶牛源大肠杆菌, 生物学特性

奶牛乳腺炎是奶牛的一种常见病, 由于其降低牛奶产量和品质, 且治愈费用高, 因此严重制约养牛业的发展<sup>[1]</sup>。大肠杆菌是引起急性奶牛乳腺炎的重要环境性病原菌之一<sup>[2]</sup>, 其引起乳腺炎的致病机制仍有待进一步研究。

c-di-GMP 是细菌中广泛存在的第二信使, 参

与调控病原菌的多种生理活动并影响其致病性。细菌通过编码合成酶或降解酶调控胞内 c-di-GMP 浓度的变化, 进而调控其生物学特性<sup>[3-4]</sup>。c-di-GMP 在病原菌体内的浓度受到严格调控, 其代谢依赖于含有 GGDEF、EAL、GGDEF-EAL 或 HD-GYP 结构域的蛋白。具有鸟苷酸环化酶

基金项目: 政府间国际科技创新合作重点项目(2018YFE0102200); 国家自然科学基金(31872483, 31972654); 上海市科学技术标准基金(17140900400); 兵团重点领域科技攻关计划(2020AB025)

\*通信作者。韩先干, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com; 苗晋锋, Tel: +86-25-84398669, E-mail: mjf171647@126.com

收稿日期: 2020-01-03; 修回日期: 2020-06-18; 网络出版日期: 2020-07-11

(diguanylate cyclase, DGC)活性的 GGDEF 结构域蛋白以及具有磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDE)活性的 EAL 或 HD-GYP 结构域蛋白分别负责 c-di-GMP 的合成与降解<sup>[5]</sup>。

*YeaI* 不具备 DGC 或 PDE 活性,但其能够通过特异性结合 c-di-GMP 而发挥重要的调控作用<sup>[6]</sup>。比较分析编码 GGDEF 或者 EAL 结构域基因在 61 株致病性、共生性和益生性大肠杆菌基因组中的分布情况,发现 *yeaI* 在这些大肠杆菌菌株中是完全高度保守的<sup>[7]</sup>。研究表明,*yeaI* 对细菌具有重要调控作用,例如在尿路致病性大肠杆菌 CFT073 中,*yeaI* 能够促进其生物被膜形成<sup>[8]</sup>,在大肠杆菌 K-12 菌株中,*yeaI* 能够促进其生物被膜的形成和提高其运动性。但目前尚未见对奶牛源大肠杆菌 *yeaI* 的调控功能研究,因此,开展奶牛源大肠杆菌 *yeaI* 的生物学特性研究,可为由大肠杆菌引起的奶牛乳腺炎防控提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

小鼠乳腺上皮细胞(EpH<sub>4</sub>-Ev)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。奶牛源大肠杆菌 NJ17 于 2017 年从患奶牛乳腺炎的病牛牛乳中分离,PCR 分群鉴定其为 B1 群肠致病性大肠杆菌(EPEC),本实验室保存。细胞培养相关耗材购自美国 Corning 公司;细胞裂解液胰酶(Trypsin-EDTA solution)、磷酸盐缓冲液(PBS)、高糖 DMEM 购自 Gibco 公司;PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、Premix Taq<sup>™</sup>、DNA Marker 均购自 TaKaRa 生物技术有限公司(中国大连);TIANprep 快速微型质粒试剂盒购自天根生物技术有限公司;GeneJET 凝胶提取试剂盒购

自赛默飞世尔科技公司(中国上海);药敏纸片均购自杭州天河公司;酵母粉、蛋白胨、琼脂粉均购自英国 Oxoid 公司;氨苄西林钠、氯霉素、卡那霉素、考马斯亮蓝、刚果红、葡萄糖、氯化钠均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;MgSO<sub>4</sub> 购自美国 Amresco 公司;无维生素酪蛋白氨基酸购自美国 BD 公司。

### 1.2 奶牛源大肠杆菌 NJ17 缺失株及回复株的构建

根据大肠杆菌基因组序列(NC\_000913.3),运用 Primer Premier 5 软件,设计表 1 引物用于 NJ17 的 *yeaI* 基因缺失株和回复株的构建及鉴定。

参照文献描述的方法<sup>[9]</sup>略有改动,将含有卡那抗性 pKD46 质粒(由本实验室改造)的 NJ17 接种至液体 LB 培养基,制备 NJ17 电转化感受态细胞。

运用引物 *yeaI*-UF/*yeaI*-UR 和 *yeaI*-DF/*yeaI*-DR 分别扩增 *yeaI* 的上、下游同源臂,引物 *yeaI*-CF/*yeaI*-CR 扩增氯霉素抗性基因 *cat*,以上述回收、纯化的 PCR 产物为模板,利用重叠 PCR 构建包含 *yeaI* 上游序列、氯霉素及 *yeaI* 下游序列 3 个部分的缺失打靶片段(大小为 2683 bp)。将扩增纯化的打靶片段电转化(1 mm 电击杯,1.8 kV,脉冲 25 μF,电阻 200 Ω)至 NJ17 感受态中,运用引物 *yeaI*-UF/*yeaI*-CR 筛选、鉴定含有氯霉素抗性基因 *cat* 的 *yeaI* 缺失株,将成功缺失 *yeaI* 并含有氯霉素抗性的菌株命名为 NJ17Δ*yeaI*-Cm。

转化抗性消除质粒 pCP20 (氨苄青霉素抗性)至 NJ17Δ*yeaI*-Cm 后,用 *cat*-IF/*cat*-IR 分别鉴定 NJ17Δ*yeaI*-Cm 和消除 *cat* 基因的缺失株,将不含氯霉素抗性的 *yeaI* 缺失株命名为 NJ17Δ*yeaI*。

以 NJ17 菌株基因组为模板,利用引物 C-*yeaI*-F/C-*yeaI*-R 扩增含有完整 *yeaI* 阅读框的回

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

Primers	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Description	Product size/bp
<i>yeal</i> -UF	AGAACGTATAAGAACGTGGAAGTCG	The upstream sequence of <i>yeal</i>	880
<i>yeal</i> -UR	<u>AACAAAGCCA</u> CAACAACCATCAG		
<i>yeal</i> -CF <sup>a</sup>	<u>TGGCTTTGTTT</u> TGTAGGCTGGAGCTGCTT	Chloramphenicol resistance cassette ( <i>cat</i> )	1015
<i>yeal</i> -CR <sup>a</sup>	<u>ACACCTCACCC</u> ATATGAATATCCTCCTTAG		
<i>yeal</i> -DF	<u>GGTGAGGTGTT</u> TTGGCTTGCT	The downstream sequence of <i>yeal</i>	788
<i>yeal</i> -DR	TCAGTGGATGCGGTTTGTAGTG		
<i>cat</i> -IF	ATTGGGATAAGTTAGAGC	Partial sequence of <i>cat</i>	257
<i>cat</i> -IR	GTAATAATGGGTAGAAGG		
<i>yeal</i> -IF	CATGTTAATGAAATATTTTC	Partial sequence of <i>yeal</i>	213
<i>yeal</i> -IR	AGCGCCAGCGAGGTAAACA		
<i>yeal</i> -OF	GGAACGTCTGCGCAAAGAAAT	Exogenous identification primer of <i>yeal</i>	2604
<i>yeal</i> -OR	GGAGTCTGCTTTCTGCACGAT		
C- <i>yeal</i> -F <sup>b</sup>	CCG <u>GAAATTC</u> AAATTATCTCATTATTACATA	Used for constructing <i>yeal</i> complementary plasmid	1575
C- <i>yeal</i> -R <sup>b</sup>	ACG <u>CGTCGAC</u> TAAATATGATGAATAATCA		
M13-F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Used for identifying complementary plasmids	1675
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC		

<sup>a</sup>: Chloramphenicol resistance gene *cat* was amplified by primers *yeal*-CF/*yeal*-CR and the underlined sequence at the 5' end is homologous to the sequences on both sides of the *yeal* gene; <sup>b</sup>: The restriction sites *Eco*R I and *Sal* I were respectively introduced into the upstream and downstream of primers C-*yeal*-F/C-*yeal*-R.

复片段，克隆至 pSTV28 载体，运用引物 M13-F/M13-R 筛选、鉴定回复质粒 pSTV-*yeal*，并送公司测序，将测序结果正确的回补质粒电转化至 NJ17Δ*yeal* 缺失菌株中，运用引物 *yeal*-IF/*yeal*-IR 和 M13-F/M13-R 筛选、鉴定回复菌株 cNJ17Δ*yeal*。

### 1.3 生长曲线及生物被膜

将 NJ17、NJ17Δ*yeal* 和 cNJ17Δ*yeal* 在 LB 中培养至对数中期后，以 1:100 (V/V) 的比例接种至含 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中，放置于 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养，每 1 h 取样测量 1 次，实验重复 3 次，绘制菌株的生长曲线。

生物被膜的测定方法参照文献[10]进行，将上述 3 株菌在 LB 液体培养基中静置培养过夜后，离心收集菌体，用 LB 培养基稀释调整至  $OD_{600}=0.1$ ，将每种菌株悬液 200 μL 加至 96 孔板，

37 °C 孵育 36 h 后，PBS 洗涤 3 次，用 0.1% 的结晶紫在室温下染色 30 min。PBS 冲洗 3 次后，加入 100 μL 95% 乙醇溶解结晶紫，使用酶标仪测定 595 nm 处的结晶紫溶液光密度( $OD_{595}$ )，每组样品重复 6 次。

### 1.4 透射电镜观察细菌鞭毛、菌毛形态

为了进一步评价 *yeal* 对 NJ17 鞭毛、菌毛形成的影响，参照文献[11]方法将 NJ17、NJ17Δ*yeal* 和 cNJ17Δ*yeal* 接种至液体 LB 中 37 °C 静置培养至  $OD_{600}=1.0$ ，用 0.22 μm 水系滤纸过滤菌液，过滤之后用 PBS 洗去培养基，用镊子将滤纸折叠，放入 5 mL 离心管中，用与过滤菌液等量的 PBS 将菌体从滤纸上冲洗下来。将上述处理的菌体悬液，与负染色剂按比例混合，滴在 2–3 mm 的铜网，吸除多余液体，白炽灯下稍烘干，并用透射电镜 (Tecnai 12, 飞利浦, 阿姆斯特丹, 荷兰) 观察。

### 1.5 细菌 rdar 形态的变化

产生物被膜型肠杆菌(如大肠杆菌)会在刚果红培养基(Congo Red, CR)上形成红色、干燥和粗糙的菌落形态(rdar 形态, red, dry and rough)<sup>[12]</sup>。将 NJ17、NJ17 $\Delta$ yeal 和 cNJ17 $\Delta$ yeal 分别接种 LB 液体培养基中, 37 °C 静置培养过夜, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, PBS 重悬并调整至 OD<sub>600</sub>=3.0。按照文献[13]的方法, 配置新鲜的 200 mL CR 培养基(200 mL: 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), 在高压灭菌后的 CR 固体培养基中央滴加 0.5  $\mu$ L 菌体, 28 °C 培养 48 h 后拍照观察。

### 1.6 细菌的运动性

将 NJ17、NJ17 $\Delta$ yeal 和 cNJ17 $\Delta$ yeal 分别静置培养至 OD<sub>600</sub>=1.0 后, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PBS 洗涤后, 重悬调至 OD<sub>600</sub>=3.0。配置 200 mL 的运动性培养基(200 mL: 2.0 g 蛋白胨, 1.0 g 氯化钠, 1.6 g 葡萄糖和 0.5 g 琼脂粉)<sup>[14]</sup>, 高压灭菌后倒入平皿, 待冷却后在中央部位加入 2  $\mu$ L 菌体, 28 °C 培养 24 h 后拍照、测量。

### 1.7 细菌的耐药性

为了评价 yeal 对 NJ17 耐药性的影响, 参照 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 标准, 采用 K-B 纸片琼脂扩散法, 选择 16 种抗生素对 NJ17、NJ17 $\Delta$ yeal 和 cNJ17 $\Delta$ yeal 的耐药性进行检测。将待检菌株均匀涂布于 LB 固体平板, 贴上药敏纸片, 37 °C 培养 18 h 后, 测量各药敏纸片的抑菌圈直径, 以毫米计, 判定被检细菌对每种药物的敏感性: 敏感 (Susceptible, S)、中敏 (Intermediate, I) 和耐药 (Resistance, R), 实验独立重复 3 次。

### 1.8 细菌黏附试验

参照文献[3]测定野生株 NJ17 对小鼠乳腺上皮细胞 EpH<sub>4</sub>-Ev 的黏附能力。将 EpH<sub>4</sub>-Ev 接种到 24 孔板, 并在 10% 犊牛血清的 DMEM 培养基中培养至细胞密度为  $3 \times 10^5$ 。用不同感染复数梯度 (MOI=400、200、100、50、25 和 12.5) 感染 24 孔板中的细胞, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 2 h。PBS (pH=7.4) 洗涤后, 将 EpH<sub>4</sub>-Ev 用 0.2% Triton X-100 裂解, 裂解液稀释后涂布至 LB 平板, 培养 12 h 后进行细菌菌落计数, 计算细菌的黏附率。

### 1.9 血清杀菌实验

参照文献[9]的方法, 取过夜培养的菌液, 分别按 1:100 (V/V) 接于 5 mL 的新鲜 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 2.5 h 后, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PBS (pH=7.2) 洗涤 3 次后将沉淀物悬浮, 并调节至浓度  $10^9$  CFU/mL。将 5  $\mu$ L 的细菌悬浮液添加到 95  $\mu$ L 不同浓度梯度 (100%、50%、20% 和 10%) 的大鼠血清中, 以 60 °C 灭活 30 min 的大鼠血清 (血清浓度为 100%) 作为阴性对照。将混合物在 37 °C 下孵育 1 h 后, 将反应混合物连续稀释 10 倍, 稀释至合适浓度梯度后采用平板计数法进行细菌计数, 实验重复 3 次。

### 1.10 鞭毛相关基因转录水平检测

参照文献[15–16], 选择与细菌鞭毛合成和运动相关的基因 *motB*、*filG* 和 *filM*, 以 *dnaE* 为内参基因。分别设计引物 (表 2), 进行实时定量 PCR 检测, 研究 yeal 基因缺失对 NJ17 的鞭毛基因转录水平的影响。将 NJ17、NJ17 $\Delta$ yeal 及 cNJ17 $\Delta$ yeal 于 37 °C 静置培养至 OD<sub>600</sub>=1.0, 分别取 4 mL 菌液提取 mRNA 后反转录为 cDNA。

表 2. 实时定量 PCR 检测引物

Table 2. Real time quantitative PCR detection primers

Primers	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Description	Product size/bp
<i>motB</i> -F	CGGCTGCTTATTCACCTCCC	Partial sequence of <i>motB</i>	159
<i>motB</i> -R	ATCTCCAGCCCAAAGAGCT		
<i>fliG</i> -F	CAACTTTATGGAGCCACAGAGCG	Partial sequence of <i>fliG</i>	225
<i>fliG</i> -R	CCGTCGAGCAAGCCATTCAGTAC		
<i>fliM</i> -F	GGCAGTGGGCTGGTGGTGTCTC	Partial sequence of <i>fliM</i>	260
<i>fliM</i> -R	ATGTCGTTCCGGCAGGTGGTGAT		
<i>dnaE</i> -F	GATTGAGCGTTATGTCGGAGGC	Partial sequence of <i>dnaE</i>	80
<i>dnaE</i> -R	GCCCCGCAGCCGTGAT		

以 cDNA 为模板, 实时定量 PCR 检测体系为 20  $\mu$ L: SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.8  $\mu$ L, cDNA 模板为 2  $\mu$ L (25 ng)。使用 Applied Biosystems<sup>®</sup> QuantStudio<sup>®</sup> 5 荧光定量 PCR 仪, 并设置反应参数: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; PCR 反应阶段: 95  $^{\circ}$ C 15 s; 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线绘制阶段: 95  $^{\circ}$ C 1 s; 60  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各菌株基因转录水平差异。

### 1.11 统计与分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行差异性分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SEM)形式表示, 进行

*t* 检验分析,  $P < 0.05$  认为是变化显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 *yeaI* 缺失株及回复株的构建

*yeaI* 测序结果表明, *yeaI* 的 ORF 大小为 1476 bp, 编码 491 个氨基酸的 c-di-GMP 合成酶。运用 *yeaI* 基因内侧鉴定引物 *yeaI*-IF/*yeaI*-IR 可从野生菌株 NJ17 扩增出 213 bp 的产物(图 1-A: 泳道 1), 而从缺失株 NJ17- $\Delta$ *yeaI* 未扩增出条带(图 1-A: 泳道 2-4)。运用外侧鉴定引物 *yeaI*-OF/*yeaI*-OR, 从野生菌株扩增出 2604 bp 的产物(图 1-A: 泳道 5),

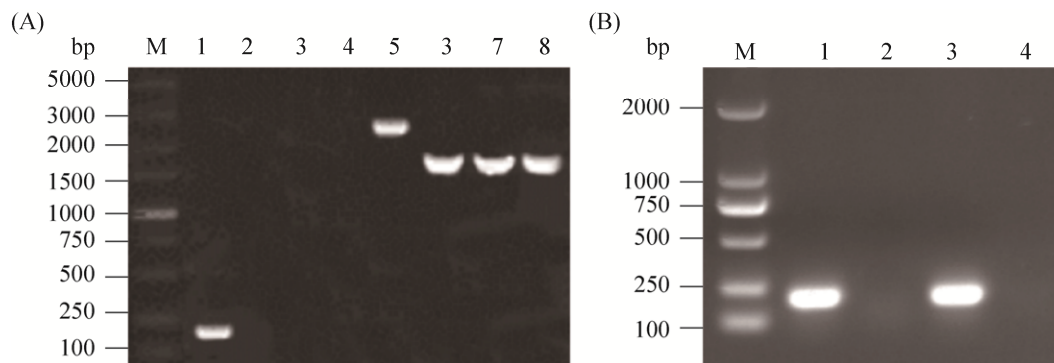
图 1. PCR 鉴定 NJ17 的 *yeaI* 基因缺失株及回复株

Figure 1. Identification of the NJ17 $\Delta$ *yeaI* and cNJ17 $\Delta$ *yeaI* by PCR. A: Identification of *yeaI* deletion strain by PCR. M: DL5000; lane 1: PCR identification of wild strain by primers *yeaI*-IF/*yeaI*-IR; lanes 2-4: PCR identification of strain NJ17 $\Delta$ *yeaI* by primers *yeaI*-IF/*yeaI*-IR; lane 5: PCR identification of strain NJ17 by primers *yeaI*-OF/*yeaI*-OR; lanes 6-8: PCR identification of strain NJ17 $\Delta$ *yeaI* by primers *yeaI*-OF/*yeaI*-OR. B: PCR identification of *yeaI* complementary strain by PCR. M: DL2000; lanes 1-3: PCR identification of strain NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeaI* and cNJ17 $\Delta$ *yeaI* by primers *yeaI*-IF/*yeaI*-IR.

而缺失株 NJ17 $\Delta$ *yeal* 扩增出 1682 bp 的产物(图 1-A: 泳道 6–8); 运用引物 *yeal*-IF/*yeal*-IR 对 NJ17 及其 *yeal* 基因缺失株和回复株进行 PCR 鉴定, 结果显示, 野生株和回复株可以扩增到 213 bp 的条带(图 1-B: 泳道 1、3), 而缺失株未能扩增到相应条带(图 1-B: 泳道 2), 上述 PCR 检测结果表明, NJ17 的 *yeal* 野生株和回复株构建成功, 并分别命名为 NJ17 $\Delta$ *yeal* 和 cNJ17 $\Delta$ *yeal*。

## 2.2 细菌的生长曲线

野生株、缺失株和互补株的生长曲线显示, 缺失 *yeal* 不影响 NJ17 的生长特性( $P>0.05$ )(图 2)。

## 2.3 *yeal* 缺失对 NJ17 生物被膜形成能力的影响

对 *yeal* 缺失株的生物被膜形成能力检测结果显示, 与野生株 NJ17 ( $OD_{595}=0.71$ )相比, 缺失株 NJ17 $\Delta$ *yeal* ( $OD_{595}=0.44$ )生物被膜形成能力显著下降( $P<0.05$ ), 而互补株 c NJ17 $\Delta$ *yeal* ( $OD_{595}=0.61$ )的生物被膜形成能力得到恢复(图 3)。

## 2.4 *yeal* 缺失影响 NJ17 菌毛及鞭毛的形成

电镜结果显示所示, 与野生株 NJ17 相比, NJ17 $\Delta$ *yeal* 的菌毛更多, 但鞭毛长度及数量减少(图 4), 表明缺失 *yeal* 影响菌毛及鞭毛的形成。

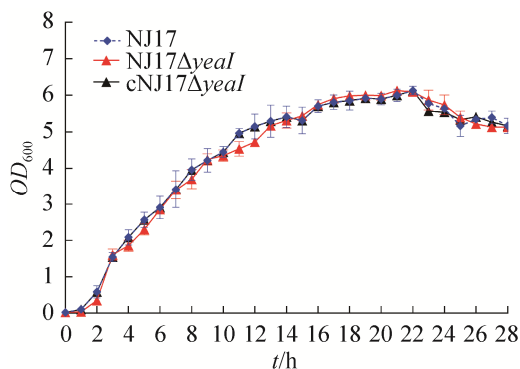
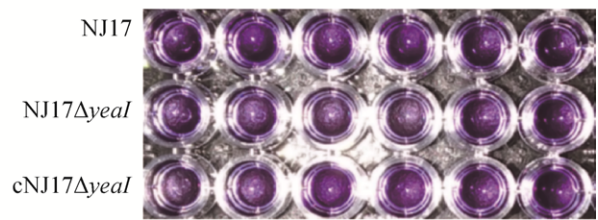


图 2. 各菌株生长曲线测定结果

Figure 2. The growth curves of NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeal* and cNJ17 $\Delta$ *yeal*.

(A)



(B)

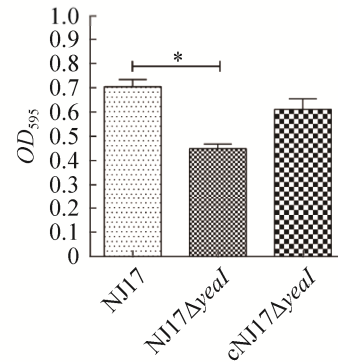


图 3. *yeal* 野生型和缺失株生物被膜形成能力检测  
Figure 3. Biofilm formation of NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeal* and cNJ17 $\Delta$ *yeal*. \*:  $P<0.05$ .

## 2.5 *yeal* 对 NJ17 的 rdar 形态影响

在 CR 平板上, 野生株 NJ17 的菌落形态呈红色、粗糙菌落形态(rdar 形态)。与野生株相比, NJ17 $\Delta$ *yeal* 菌落形态裂纹增多, 而 cNJ17 $\Delta$ *yeal* 的菌落颜色及裂纹无明显变化(图 5)。

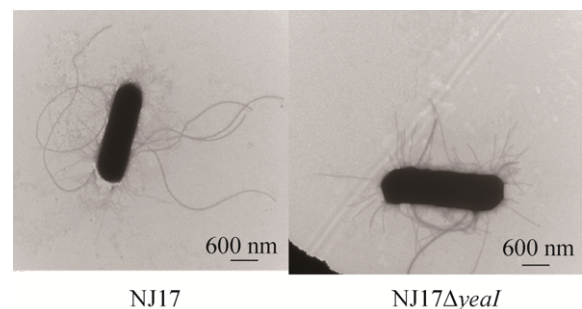


图 4. *yeal* 野生型和缺失株透射电镜图观察

Figure 4. Transmission electron micrographs of NJ17 and NJ17 $\Delta$ *yeal*.



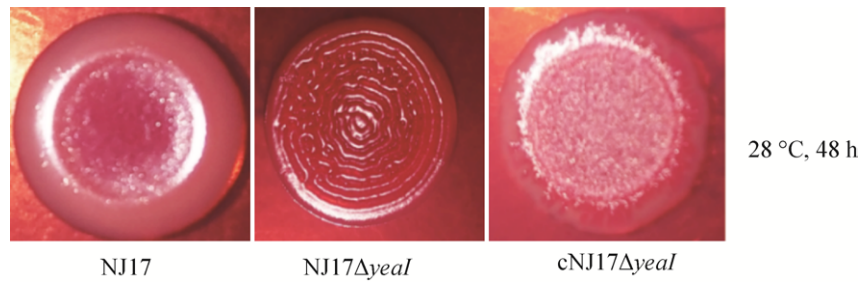


图 5. 野生株、缺失株及回复株 *rdar* 形态观察

Figure 5. Rdar morphotype of NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeal* and cNJ17 $\Delta$ *yeal*.

## 2.6 *yeal* 基因缺失促进 NJ17 的运动性

对野生株、缺失株和回复株的运动性检测结果表明,与野生株 NJ17 和回复株 cNJ17 $\Delta$ *yeal* 相比, NJ17 $\Delta$ *yeal* 运动性显著增加( $P < 0.05$ ) (图 6), 表明 *yeal* 缺失会显著提高其运动性。

## 2.7 *yeal* 基因缺失对大肠杆菌 NJ17 耐药性的影响

根据 NCCLS 判定标准, 头孢曲松对肠杆菌抑菌圈直径  $\leq 13$  mm 为耐药(R)、14–20 mm 为中敏(I)和  $\geq 21$  mm (S)为敏感。通过 3 次试验, 测得 NJ17、NJ17 $\Delta$ *yeal* 和 cNJ17 $\Delta$ *yeal* 抑菌圈直径大小分别为  $(25.86 \pm 0.64)$  mm、 $(18.46 \pm 1.04)$  mm 和  $(24.75 \pm 0.32)$  mm (表 3), 表明 *yeal* 基因缺失使得头孢曲松的耐药性由敏感变为中等敏感, 而其他抗生素的耐药性无显著变化。

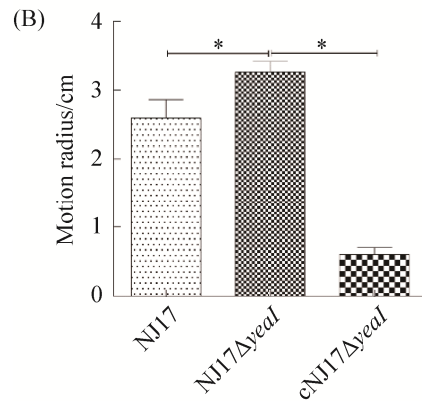
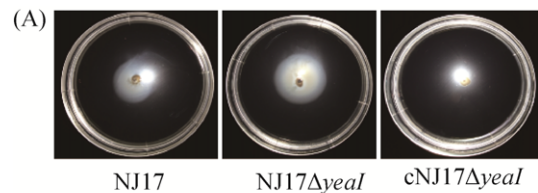


图 6. 各菌株运动性测定结果

Figure 6. Bacterial motility of NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeal* and cNJ17 $\Delta$ *yeal*. \*:  $P < 0.05$ .

表 3. 各菌株抗菌活性测定

Table 3. Determination of antibacterial activity of each strain

Antibacterial drugs	Antibacterial activity (inhibition zone diameter /cm)		
	NJ17	NJ17 $\Delta$ <i>yeal</i>	cNJ17 $\Delta$ <i>yeal</i>
Ceftriaxone	S	I	S
Rifampin	R	R	R
Kanamycin	I	I	I
Neomycin	I	I	I
Enrofloxacin	S	S	S
Ampicillin	I	I	I
Ciprofloxacin	S	S	S
Amoxicillin	I	I	I
Cefradine	R	R	R
Tetracycline	R	R	R
Azithromycin	R	R	R
Erythromycin	R	R	R
Clindamycin	R	R	R
Cefotaxime	R	R	R
Florfenicol	S	S	S
Spectamycin	R	R	R

R: resistance; I: intermediate; S: sensitivity.

**2.8 *yeal* 缺失对 EpH<sub>4</sub>-Ev 的黏附能力的影响**

奶牛源大肠杆菌 NJ17 在 MOI=400、200、100、50、25 和 12.5 时对 EpH<sub>4</sub>-Ev 的黏附率分别为 0.59%、1.22%、3.11%、4.60%、3.73%和 3.66%，结果表明 MOI=50 时，NJ17 对 EpH<sub>4</sub>-Ev 的黏附率最高，为最适感染复数(图 7-A)。

当感染复数 MOI 为 50 时，与野生株相比，*yeal* 基因缺失后对小鼠乳腺上皮细胞的黏附率无

显著性影响( $P>0.05$ )(图 7-B)。

**2.9 *yeal* 缺失对 NJ17 抗血清杀菌作用的影响**

血清杀菌结果表明 NJ17、NJ17Δ*yeal* 和 cNJ17Δ*yeal* 在灭活大鼠血清中的存活能力无显著性差异( $P>0.05$ )。但在浓度为 100%的未灭活的大鼠血清中，*yeal* 基因缺失显著增加 NJ17Δ*yeal* 的抗血清杀菌能力( $P<0.05$ )(图 8)。

cNJ17Δ*yeal* 与 NJ17 和 NJ17Δ*yeal* 相比，其在不

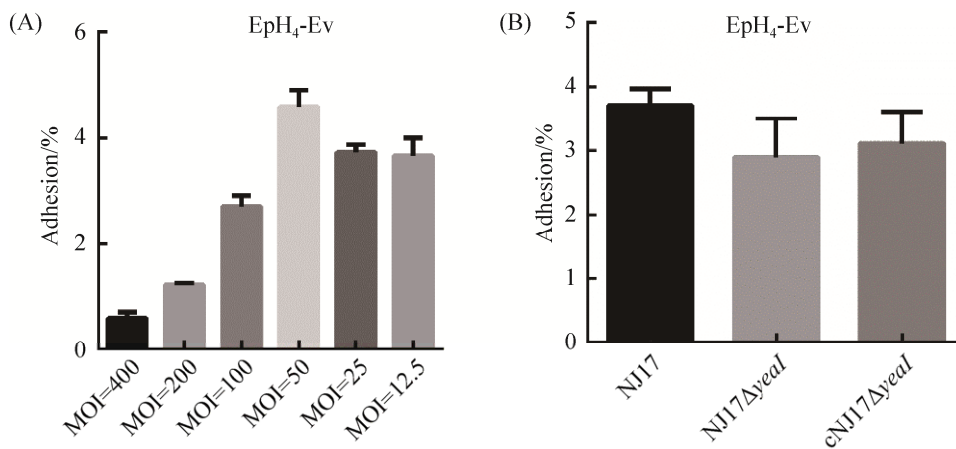


图 7. 各菌株对 EpH<sub>4</sub>-Ev 黏附率的测定结果

Figure 7. Determination of the adhesion rates of NJ17, NJ17Δ*yeal* and cNJ17Δ*yeal* to EpH<sub>4</sub>-Ev.

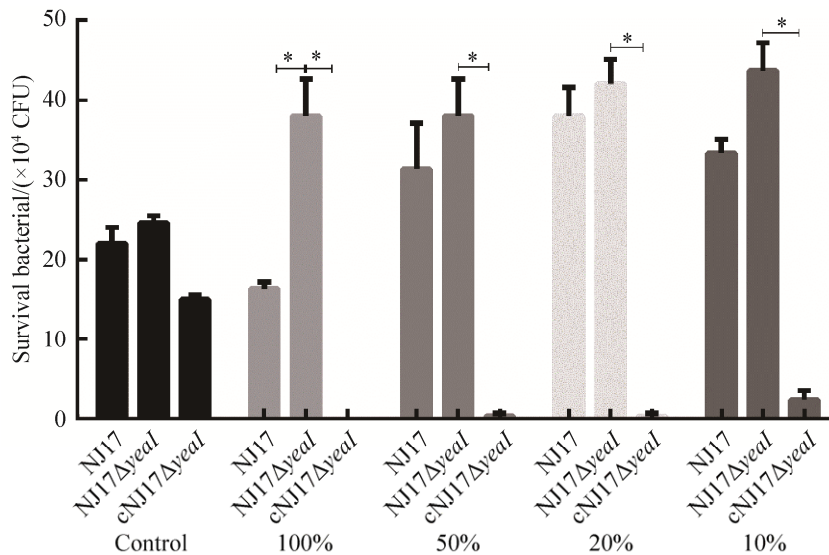


图 8. 各菌株抗大鼠血清杀菌能力的测定结果

Figure 8. Determination of anti-rat serum bactericidal ability of NJ17, NJ17Δ*yeal* and cNJ17Δ*yeal*. \*:  $P<0.05$ .



同浓度大鼠血清中的存活细菌数均显著下降 ( $P < 0.05$ )。

### 2.10 *yeaI* 基因缺失影响鞭毛基因转录水平

选择与细菌鞭毛合成和运动相关的基因

*motB*、*filG* 和 *filM*，进行 Real-time PCR 检测，结果表明，*yeaI* 基因缺失显著提高 NJ17 的 *motB* 和 *filG* 的转录水平 ( $P < 0.05$ )，表明 *yeaI* 缺失影响其鞭毛和运动性基因转录(图 9)。

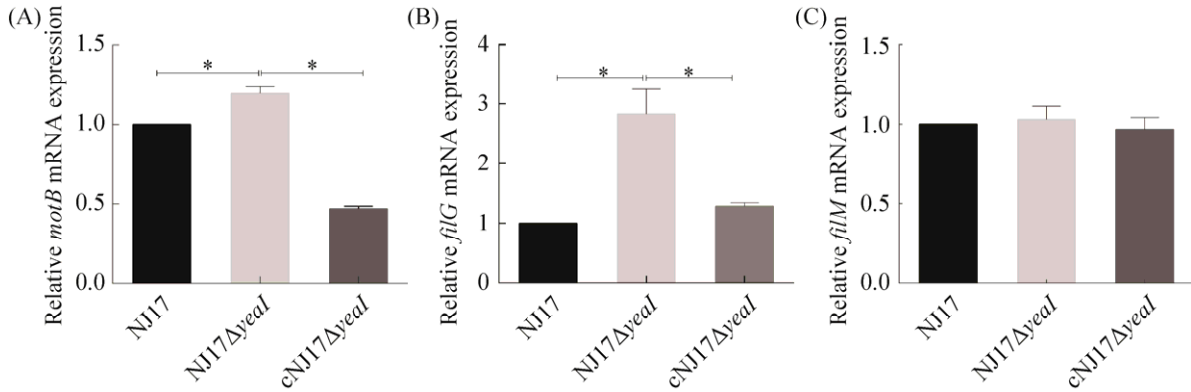


图 9. 鞭毛基因 *motB*、*filG* 和 *filM* 的转录水平的测定

Figure 9. Determination of the transcription levels of flagella-related genes *motB*, *filG* and *filM* in NJ17, NJ17 $\Delta$ *yeaI* and cNJ17 $\Delta$ *yeaI*. \*:  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

引起奶牛乳腺炎的大肠杆菌谱除涉及共生、环境性大肠杆菌外，还包括肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 等类型<sup>[17]</sup>。虽然 ETEC 引起腹泻的致病机制已经得到广泛研究<sup>[18]</sup>，但其作为奶牛乳腺炎致病菌的感染机制却鲜有报道。*yeaI* 编码鸟苷酸环化酶(DGC)，参与调控大肠杆菌的运动性、生物被膜等生物学特性<sup>[6]</sup>，但 *yeaI* 在奶牛源大肠杆菌发挥的调控作用尚不清楚。

本研究结果表明，*yeaI* 缺失对 NJ17 的生长特性和抗菌活性无显著影响，但影响 NJ17 $\Delta$ *yeaI* 的 *rdar* 形态。*rdar* 形态是指形成生物被膜的大肠杆菌在刚果红(CR)琼脂培养基上产生红色、干燥和粗糙的形态。研究表明，*curli* 卷毛阳性的大肠杆菌在 CR 琼脂培养基上呈现特征性红色、粗糙、表面干燥的菌落形态，不产生 *curli* 卷毛的大肠杆菌

呈现白色、光滑的菌落形态<sup>[19]</sup>。本研究结果表明，NJ17 在刚果红平板上呈现红色、干燥和粗糙的形态，推测 NJ17 属于 *curli* 菌毛阳性大肠杆菌。此外，*yeaI* 缺失后，在 CR 培养基上培养 48 h 后菌落裂纹增多可能与纤维素的合成相关<sup>[20]</sup>，而胞内 c-di-GMP 的浓度影响纤维素的合成，因此推测 *yeaI* 基因通过调控 NJ17 胞内 c-di-GMP 水平，进而影响 NJ17 $\Delta$ *yeaI* 的 *rdar* 形态。

与大肠杆菌 K-12 相同<sup>[6]</sup>，NJ17 的 *yeaI* 基因缺失后会显著增加细菌的运动性，本研究通过 Real-time PCR 检测结果表明，*yeaI* 基因抑制鞭毛基因的 *motB* 和 *filG* 的转录水平，推测 *yeaI* 可能通过调节与运动性相关的鞭毛蛋白的表达从而改变细菌运动性。互补株与野生型菌株相比运动性显著降低，可能是由于互补菌株采用的 pSTV28 质粒是低拷贝质粒，与野生型菌株相比，互补菌株的 *yeaI* 表达水平更高所致，具体仍需进一步研

究。在大肠杆菌 CFT073(UPEC)中 *yeaI* 基因缺失会显著降低在 LB 无盐培养基和 M9 甘油培养基中生物被膜的形成, 但是却不影响运动性<sup>[8]</sup>。因此, *yeaI* 在不同类型的大肠杆菌中可能发挥着不同的作用。此外, 本研究结果表明, 通过电镜观察 NJ17 缺失 *yeaI* 后, 其鞭毛和菌毛形成受到影响, 鞭毛和菌毛是影响细菌生物被膜形成的重要因素之一。此外, 包括 c-di-GMP、群体感应信号分子和 LPS 等对细菌生物被膜形成具有重要调控作用, 特别是胞内 c-di-GMP 浓度对生物被膜的形成具有重要调控作用, 在本研究中 *yeaI* 编码 c-di-GMP 合成酶, 推测 *yeaI* 缺失后, 可通过影响胞内 c-di-GMP 水平, 进而调控细菌的生物被膜形成, 具体机制仍有待进一步研究。

血清抵抗能力是大肠杆菌的致病机制之一, 本研究中, 当大鼠血清浓度为 100% 时, *yeaI* 缺失会显著增强 NJ17 的血清抵抗力, 推测 *yeaI* 缺失可能通过影响 NJ17 的抗原表位从而不易被血清中的补体识别并清除<sup>[9]</sup>。此外, 与野生株相比, 互补菌株在血清中的存活能力显著降低, 推测其原因也可能是由于本研究所用 pSTV28 质粒是低拷贝质粒, 在 cNJ17Δ*yeaI* 中 *yeaI* 的表达水平高于 NJ17 所致。

本研究初步探讨了 *yeaI* 对奶牛源大肠杆菌 NJ17 生物学特性的影响, 可为后续开展由大肠杆菌引起的奶牛乳腺炎研究提供参考。

## 参考文献

[1] Petrovski KR, Trajcevic M, Buneski G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2006, 77(2): 52–60.

- [2] Blum SE, Heller ED, Sela S, Elad D, Edery N, Leitner G. Genomic and phenomic study of mammary pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2015, 10(9): e0136387.
- [3] Hu J, Wang BL, Fang X, Means WJ, McCormick RJ, Gomelsky M, Zhu MJ. c-di-GMP signaling regulates *E. coli* O157:H7 adhesion to colonic epithelium. *Veterinary Microbiology*, 2013, 164(3/4): 344–351.
- [4] Raterman EL, Shapiro DD, Stevens DJ, Schwartz KJ, Welch RA. Genetic analysis of the role of *yfiR* in the ability of *Escherichia coli* CFT073 to control cellular cyclic dimeric GMP levels and to persist in the urinary tract. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3089–3098.
- [5] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 1–52.
- [6] Sanchez-Torres V, Hu HB, Wood TK. GGDEF Proteins YeaI, YedQ, and YfiN reduce early biofilm formation and swimming motility in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2): 651–658.
- [7] Povolotsky TL, Hengge R. Genome-based comparison of cyclic di-GMP signaling in pathogenic and commensal *Escherichia coli* Strains. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(1): 111–126.
- [8] Spurbeck RR, Tarrien RJ, Mobley HLT. Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of motility or sessility in *Escherichia coli* CFT073. *mBio*, 2012, 3(5): e00307–12.
- [9] Zuo JK, Tu CT, Wang YL, Qi KZ, Hu JG, Wang ZH, Mi RS, Huang Y, Chen ZG, Han XG. The role of the *wzy* gene in lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 296–303.
- [10] Wu XK, Lv XL, Lu JY, Yu SQ, Jin YW, Hu JG, Zuo JK, Mi RS, Huang Y, Qi KZ, Chen ZG, Han XG. The role of the *ptsI* gene on AI-2 internalization and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2017,

- 113: 321–329.
- [11] Hu JG, Zuo JK, Chen ZG, Fu LX, Lv XL, Hu SJ, Shi XC, Jing YW, Wang YL, Wang ZH, Mi RS, Huang Y, Liu DH, Qi KZ, Han XG. Use of a modified bacterial ghost lysis system for the construction of an inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* vaccine candidate. *Veterinary Microbiology*, 2019, 229: 48–58.
- [12] Cimdins A, Simm R. Semiquantitative analysis of the red, dry, and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* using congo red//Sauer K. c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2017: 225–241.
- [13] Römling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLs*, 2005, 62(11): 1234–1246.
- [14] Dressaire C, Moreira RN, Barahona S, de Matos APA, Arraiano CM. BolA is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development. *mBio*, 2015, 6(1): e02352–14.
- [15] O'Neill J, Roujeinikova A. Cloning, purification and crystallization of MotB, a stator component of the proton-driven bacterial flagellar motor. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 2008, 64: 561–563.
- [16] Croxen MA, Finlay BB. Erratum: molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(2): 141.
- [17] Murinda SE, Ibekwe AM, Rodriguez NG, Quiroz KL, Mujica AP, Osmon K. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in mastitis: an international perspective. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2019, 16(4): 229–243.
- [18] Pearson JS, Giogha C, Lung TWF, Hartland EL. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 493–513.
- [19] Cimdins A, Simm R, Li FY, Lüthje P, Thorell K, Sjöling Å, Brauner A, Römling U. Alterations of c-di-GMP turnover proteins modulate semi-constitutive rdar biofilm formation in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(5): e00508.
- [20] Ahmad I, Cimdins A, Beske T, Römling U. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of csgD expression in *Salmonella typhimurium*. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 27.

# Effect of *yeaI* gene on biological characteristics of *Escherichia coli* of cattle origin

Xudong Wang<sup>1</sup>, Xinguang Lin<sup>1</sup>, Jiakun Zuo<sup>2</sup>, Yuanyuan Xu<sup>1</sup>, Zhihao Wang<sup>2</sup>,  
Zhaoguo Chen<sup>2</sup>, Xianghan Han<sup>2\*</sup>, Jinfeng Miao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

**Abstract:** c-di-GMP is a widespread second messenger in bacteria and regulates many important bacterial biological characteristics (such as biofilm, motility and virulence) by binding effector proteins. YeaI protein containing EGEVF motifs can bind c-di-GMP and may regulate bacterial performance. **[Objective]** To study the roles of *yeaI* in *Escherichia coli* NJ17 strain. **[Methods]** The *yeaI* mutant (NJ17Δ*yeaI*) and complementary strain (cNJ17Δ*yeaI*) were constructed. Growth characteristics, biofilm formation ability, adhesion and other biological characteristics were analyzed in NJ17, NJ17Δ*yeaI* and cNJ17Δ*yeaI*. **[Results]** We successfully constructed NJ17Δ*yeaI* and cNJ17Δ*yeaI*. Compared with NJ17, there was no significant changes in growth characteristics and drug resistance of NJ17Δ*yeaI* ( $P>0.05$ ). However, biofilm formation ability of NJ17Δ*yeaI* significantly decreased and motility of NJ17Δ*yeaI* significantly improved ( $P<0.05$ ). Transmission electron micrographs shows that *yeaI* deletion affected the formation of NJ17 fimbriae and flagella. qPCR results also show that the *yeaI* gene significantly inhibited the transcription level of the flagella-related genes *motB* and *filG* in NJ17. Furthermore, serum survival experiments results show that deletion of *yeaI* significantly enhanced survival abilities of NJ17 in rat serum ( $P<0.05$ ). However, compared with NJ17, there was no significant change in adhesion rate of *yeaI* mutant to EpH<sub>4</sub>-Ev ( $P<0.05$ ). **[Conclusion]** The *yeaI* plays an important role in regulating the biological characteristics of *E. coli* of cattle origin.

**Keywords:** c-di-GMP, *yeaI*, *Escherichia coli*, biological characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Project of Inter-Governmental International Scientific Technological Innovation Cooperation (2018YFE0102200), by the National Natural Science Foundation of China (31872483, 31972654), by the Shanghai Science and Technology Standard Fund (17140900400) and by the Key Scientific Technological Project of XPCC (2020AB025)

\*Corresponding authors. Xianghan Han, Tel: +86-21-54225517, E-mail: hanxgan@163.com; Jinfeng Miao, Tel: +86-25-84398669, E-mail: mjf171647@126.com

Received: 3 January 2020; Revised: 18 June 2020; Published online: 11 July 2020