



# *ygeG* 基因对禽致病性大肠杆菌生物学特性及致病性的影响

姜楠, 郑倩倩, 李倩文, 涂健, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗\*

安徽农业大学动物科技学院兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036

姜楠, 郑倩倩, 李倩文, 涂健, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗. *ygeG* 基因对禽致病性大肠杆菌生物学特性及致病性的影响. 微生物学报, 2022, 62(3): 1020–1032.

Jiang Nan, Zheng Qianqian, Li Qianwen, Tu Jian, Song Xiangjun, Shao Ying, Qi Kezong. Effect of *ygeG* on biological characteristics and the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1020–1032.

**摘要:** 【目的】本研究构建禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) *ygeG* 基因缺失株, 并对其进行生物学特性及致病性分析, 探究 *ygeG* 在 APEC 致病过程中的作用, 为后期深入研究其所在的 III 型分泌系统 2 (type three secretion systems 2, ETT2) 毒力岛的致病机制奠定基础。【方法】利用 Red 同源重组技术构建 *ygeG* 缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$  及其回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$ , 通过运动性、生物被膜形成能力、抗逆性、抗血清杀菌能力等试验分析 *ygeG* 对 APEC 致病性相关的生物学功能的影响, 并通过细胞黏附、侵袭试验及荧光定量 PCR 检测细胞炎症因子转录水平探究 *ygeG* 对 APEC 感染宿主过程的影响。【结果】成功构建了缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$  和回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$ ; 与野生株 APEC81 相比, 缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$  生长特性无显著变化( $P>0.05$ ), 生物被膜形成能力显著降低( $P<0.01$ ), 运动能力极显著升高( $P<0.001$ ), 对酸休克和氧化休克的耐受力极显著降低( $P<0.001$ ), 对碱、渗透压和热休克的耐受力显著降低( $P<0.01$ ); 血清杀菌实验表明, *ygeG* 缺失能显著降低其抗血清杀菌作用( $P<0.01$ ), 血清浓度为 100%、30% 时, 差异极显著( $P<0.001$ ); 与野生株 APEC81 相比, 缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$  对鸡气管粘膜上皮细胞的黏附能力极显著下降( $P<0.001$ ), 侵袭能力显著升高( $P<0.01$ ); 同时, 经 APEC81- $\Delta ygeG$  感染的鸡气管粘膜上皮细胞炎症因子转录水平显著升高( $P<0.01$ )。【结论】*ygeG* 影响 APEC 的生物被膜形成、运动性、抗逆性、黏附侵袭能力、以及对血清的敏感性等, 并可抑制细胞炎症因子表达。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌; ETT2; *ygeG*; 生物学特性; 致病性

**基金项目:** 国家自然科学基金(31772707)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772707)

\*Corresponding author. E-mail: qkz@ahau.edu.cn

Received: 18 June 2021; Revised: 8 August 2021; Published online: 17 August 2021

# Effect of *ygeG* on biological characteristics and the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*

JIANG Nan, ZHENG Qianqian, LI Qianwen, TU Jian, SONG Xiangjun, SHAO Ying, QI Kezong\*

Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] To construct the *ygeG* deletion strain of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), and analyze its biological characteristics and pathogenicity to explore the role of *ygeG* plays on the pathogenesis of APEC, so as to lay a foundation for further research on the pathogenesis of type three secretion system 2 (ETT2), which *ygeG* locates in. [Methods] The *ygeG* deletion strain (APEC81- $\Delta ygeG$ ) and complementary strain (APEC81-C $\Delta ygeG$ ) were constructed by Red homologous recombination technology. Then, the growth curve, motility, biofilm formation, stress resistance, serum resistance among APEC81, APEC81- $\Delta ygeG$  and APEC81-C $\Delta ygeG$  were compared and analyzed. The effect on host infection of *ygeG* was investigated by cell adhesion, invasion test and inflammatory factor expression level detection by fluorescence quantitative PCR. [Results] We successfully constructed APEC81- $\Delta ygeG$  and APEC81-C $\Delta ygeG$ . Compared with APEC81, there was no significant changes in growth characteristics in APEC81-C $\Delta ygeG$  ( $P>0.05$ ). However, biofilm formation ability of APEC81- $\Delta ygeG$  significantly decreased ( $P<0.01$ ), motility of APEC81- $\Delta ygeG$  extremely significantly improved ( $P<0.001$ ). Compared with APEC81, APEC81- $\Delta ygeG$  showed lower tolerance to acid ( $P<0.001$ ) and oxidative shock ( $P<0.001$ ), and higher tolerance to alkali ( $P<0.01$ ), osmotic pressure ( $P<0.01$ ) and heat shock ( $P<0.01$ ). Furthermore, serum survival experiments results showed that deletion of *ygeG* significantly decreased survival abilities of APEC81 in serum ( $P<0.01$ ), and extremely significantly decreased at serum concentrations of 100% and 30% ( $P<0.001$ ); The adhesion of APEC81- $\Delta ygeG$  to epithelial cells of chicken trachea mucosa was extremely significantly decreased ( $P<0.001$ ), and the invasion ability was significantly increased ( $P<0.01$ ). Furthermore, qPCR results also showed that APEC81- $\Delta ygeG$  significantly up-regulated the transcription level of inflammatory factors in chicken tracheal epithelial cells ( $P<0.01$ ). [Conclusion] These data indicated that *ygeG* plays roles in regulation of biofilm formation, motility, stress resistance, adhesion and invasion ability, and serum resistance of APEC, it also can inhibit cell inflammatory factor expression.

**Keywords:** avian pathogenic *E. coli*; ETT2; *ygeG*; biological characteristics; pathogenicity

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 是一种典型的肠道外致病菌, 在禽类中具有广泛的宿主谱, 不仅是严重危害养禽业健康发展的重要病原菌, 而且是人类肠外致病性大肠杆菌毒力基因的潜在储

库, 由于血清型复杂多样, 毒力基因簇突变率高, 其防治仍存在诸多困难<sup>[1]</sup>。

大肠杆菌 III 型分泌系统 2 又称 ETT2 毒力岛<sup>[2]</sup>, 是在 *Escherichia coli* O157:H7 Sakai 菌株的基因组中首次被发现的一种新的大肠杆菌

III型分泌系统<sup>[3]</sup>。ETT2 存在于大多数大肠杆菌基因组中,并且在参与细菌致病性中起重要作用<sup>[4]</sup>。Ideses 等<sup>[5]</sup>、Osawa 等<sup>[6]</sup>及 Kim 等<sup>[7]</sup>先后在败血症、新生儿脑膜炎病和腹泻性大肠杆菌病研究中,分别证实了 ETT2 对于人肠外致病性大肠杆菌感染致病的重要性。同时,ETT2 在 APEC 中广泛存在,并与致病性生物学表型密切相关<sup>[8]</sup>。APEC-ETT2 可协助分泌具有泛素连接酶活性的效应蛋白 EspE3<sup>[9]</sup>,但其具体分泌机制及 EspE3 与宿主互作机制仍未探明。作为主要的毒力基因簇,APEC-ETT2 编码至少 35 个开放阅读框,位于 *yge* (*ecs3707-3712*)开放阅读框内的 *ygeG* (*ecs3708*)编码 YgeG 蛋白,该蛋白为假定的 ETT2 伴侣蛋白<sup>[8]</sup>。在大肠杆菌III型分泌系统中,伴侣蛋白可以辅助效应蛋白正确折叠并易位至宿主细胞,对效应蛋白的分泌及细菌致病作用具有重要意义<sup>[10-11]</sup>。

本实验室曾研究 *ygeG* 在含有不完整 ETT2 基因簇的 APEC40 中的生物学特性及部分致病作用<sup>[8]</sup>,发现 *ygeG* 对部分生物学特性具有重要调控作用,例如 *ygeG* 能够抑制 APEC40 生物被膜的形成、降低细菌运动性等。本研究在 APEC81 上展开,该菌株含有完整的 ETT2 基因簇<sup>[12]</sup>。由于国内外对于 *ygeG* 的研究较少,且目前尚未见对含有完整 ETT2 基因簇的菌株中 *ygeG* 调控功能的研究,因此,本研究的开展可为阐明 ETT2 致病机制提供理论支撑,为 APEC 的防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和细胞株

APEC81<sup>[12]</sup>,质粒 pKD46、pKD3、pCP20、pSTV28,鸡气管粘膜上皮细胞均由兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存。

### 1.2 主要试剂、仪器及培养基

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、LB Broth 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司;SPF (specific pathogen free)级鸡血清购自 Gibco 公司;胎牛血清、细胞培养基购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;荧光定量 PCR 仪购自上海昆士兰生物科技发展有限公司;Gene Pulser Xcell 电穿孔系统(Bio-rad 伯乐)购自北京赛百奥科技有限公司;低温冷冻高速离心机购自北京博雅创新科技发展有限公司。

### 1.3 引物的设计及合成

根据 GenBank 公布的 *Escherichia coli* O157:H7 Sakai 菌株 ETT2 毒力岛中的 *ygeG* 基因序列(NC\_002695.2),使用软件 Primer Premier 5 设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物具体信息见表 1。

### 1.4 基因缺失株和回复株的构建

根据 Red 同源重组系统原理及方法<sup>[13]</sup>,将同源臂片段电转化到含有 pKD46 质粒的 APEC81 感受态细胞中进行敲除。筛选阳性重组子,电转入 pCP20 质粒(氨苄青霉素抗性)42 °C 过夜培养,用 *ygeG*-in-F/R, *ygeG*-out-F/R 引物进行 PCR 验证,筛选消除氯霉素抗性片段的缺失株。经测序验证后的缺失株命名为 APEC81- $\Delta$ *ygeG*。将含有酶切位点的 *ygeG* 基因片段连接到 pSTV28 载体上,转化到 DH5 $\alpha$  中,使用 M13-F/M13-R 引物筛选、鉴定回复质粒 pSTV28-*ygeG*,并电转化至 APEC81- $\Delta$ *ygeG* 感受态细胞中,构建基因的回复株。经测序验证后的回复株命名为 APEC81-C $\Delta$ *ygeG*。引物序列见表 1。

表 1 缺失株及回复株引物设计

Table 1 Primers used in the gene deletion and complementary strains

Primers	Sequences (5'→3')	Usage	Product size/bp
<i>ygeG</i> -in-F	CGCATTATCGAAAGGAG	Endogenous identification primers of <i>ygeG</i>	300
<i>ygeG</i> -in-R	CCAATTTGACATTGACC		
<i>ygeG</i> -out-F	CCTCGTCACCAGACATAA	Exogenous identification primers of <i>ygeG</i>	1 387
<i>ygeG</i> -out-R	CAGGGACTCGTCACTAACAATA		
<i>ygeG</i> -up-F	TCATAAAACTGACCAA	The upstream sequence of <i>ygeG</i>	481
<i>ygeG</i> -lap-cm-up-R	CCAGCCTACATCCATAATATTCCTCTG	The downstream sequence of <i>ygeG</i>	601
<i>ygeG</i> -lap-cm-down-F	TATTCATATGTCAGAAGATAATGGCTAA		
<i>ygeG</i> -down-R	ATGAAGTAGTGAAAGGG	Chloramphenicol resistance cassette	1 013
pkd3-cm-lap- <i>ygeG</i> -F	ATATTATGGATGTAGGCTGGAGCTGCT		
pkd3-cm-lap- <i>ygeG</i> -R	TATCTTCTGACATATGAATATCCTCCTTAGTT	Used for constructing <i>ygeG</i> complementary plasmid	1 087
<i>ygeG</i> -C- <i>EcoR</i> I-F	CCGGAATTCCTCTTGGAGGAAAATACCTAACAC		
<i>ygeG</i> -C-BamH I-R	CGCGGATCCAATGCTTAGTTATTATCTTCT	Used for identifying complementary plasmids	1 197
M13-F	CAGGAAACAGCTATGAC		
M13-R	GTTTTCCCAGTCACGAC		

### 1.5 生长曲线测定

培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期,然后将 3 株菌调整至  $OD_{600}=1.0$ ,按 1:100 比例,将菌液转接至 96 孔板,每隔 1 h 用酶标仪测定  $OD_{620}$ ,根据  $OD_{620}$  数值绘制生长曲线<sup>[14]</sup>。

### 1.6 运动性测定

培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期,无菌 PBS 洗涤、重悬,取 2  $\mu$ L 调整至  $OD_{600}=2.0$  的菌液点样于琼脂粉含量为 2.5 g/L 的半固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 8 h 后观察细菌菌圈直径,比较 3 株菌的运动能力<sup>[14]</sup>。

### 1.7 生物被膜形成能力的测定

根据文献[14]方法采用 10 mL 离心管测定细菌生物被膜形成能力。培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期,无菌 PBS 洗

涤、重悬,然后将 3 株菌调整至  $OD_{600}=0.03$ ,37  $^{\circ}$ C 静置培养 18 h。无菌 PBS 洗涤后加入 0.1% 结晶紫染色 10 min。用 PBS 洗涤并自然风干后,加入 95%乙醇,酶标仪测定  $OD_{595}$  数值。

### 1.8 运动性及生物被膜形成相关基因的转录水平检测

参照文献[8]选取与细菌运动性、生物被膜形成相关的基因,参照 Trizol 法提取细菌的总 mRNA。核酸蛋白浓度测定仪检测 RNA 浓度。采用反转录试剂盒对 RNA 进行反转录。细菌 16S rRNA 作为内部参考基因,通过 qRT-PCR 检测 APEC81、APEC81- $\Delta ygeG$  相关基因转录水平,使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算基因相对表达量。

### 1.9 环境耐受力测定

培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期,无菌 PBS 洗涤、重悬,然后将 3 株菌  $OD_{600}$  调至相同。细菌在 75  $^{\circ}$ C 处理 10 min,通过活菌计数法测定细菌在热休克中的存活率。

将细菌分别重悬于 pH 3.0、pH 10.0、4.8 mol/L 浓度的 NaCl 溶液、10 mmol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中，37 °C 孵育 1 h 后梯度稀释，涂板计数，测定细菌在酸、碱、渗透压和氧化休克中的存活率。

### 1.10 血清杀菌实验

参照文献[14]方法通过测定活菌数分析 3 株菌的血清敏感性。培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期，无菌 PBS 洗涤、重悬，调整细菌数量为  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将 SPF 鸡血清用 PBS 稀释至 10%、30%、50% 3 个梯度，将热灭活的血清设置为阴性对照，取 10  $\mu$ L 菌液至 190  $\mu$ L 不同浓度的血清(100%、50%、30% 和 10%)中，混匀，37 °C 静置 30 min，取处理后菌液梯度稀释，涂板计数。

### 1.11 细胞黏附、侵袭试验

鸡气管粘膜上皮细胞黏附及侵袭试验参考文献[8]方法进行。培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期，无菌 PBS 洗涤后以含 10%胎牛血清的鸡气管粘膜上皮细胞培养基重悬，按 100 个感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染鸡气管粘膜上皮细胞后，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 1 h。无菌 PBS 洗涤细胞后，用预冷的 0.5% TritonX-100 将其裂解，PBS 倍比稀释裂解液后涂板计数。

细胞侵袭试验与细胞粘附试验的感染方式相同，感染细胞 1 h 后用无菌 PBS 洗涤，加入含有 1%庆大霉素的培养基，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续孵育 1 h。无菌 PBS 洗涤细胞后，用预冷的 0.5% Triton X-100 将其裂解，PBS 倍比稀释裂解液后涂板计数。

### 1.12 宿主细胞炎性因子转录水平

培养野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81-

$\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  至对数生长期，无菌 PBS 洗涤后以含 10%胎牛血清的鸡气管粘膜上皮细胞培养基重悬，按 100 个感染复数 MOI 感染鸡气管粘膜上皮细胞后，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 2 h。无菌 PBS 洗涤细胞后，用动物细胞 RNA 提取试剂盒提取总 mRNA，采用反转录试剂盒对 RNA 进行反转录， $\beta$ -actin 作为内部参考基因，参照文献[15]选取部分炎性因子相关的基因，通过 qRT-PCR 检测 APEC81、APEC81- $\Delta ygeG$  感染后鸡气管粘膜上皮细胞的炎性因子基因转录水平，使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算相对表达水平。

### 1.13 数据分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件 Student's *t*-test 方法分析数据并作图 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 和基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$ 的鉴定

对挑取的疑似阳性缺失株进行 PCR 鉴定。以 *ygeG*-in-F/R 进行检测，野生株扩增的片段大小为 300 bp (图 1A: 泳道 1)，缺失株无扩增条带(图 1A: 泳道 3)；用 *ygeG*-out-F/R 鉴定，野生株扩增大小为 1 387 bp (图 1A: 泳道 2)，缺失株扩增大小为 901 bp (图 1A: 泳道 4)，测序表明缺失株构建成功，将缺失成功的菌株命名为 APEC81- $\Delta ygeG$ 。同时，回复株用 M13 引物进行验证，pSTV28 空质粒作为对照，结果显示，pSTV28 空质粒扩增大小为 110 bp (图 1B: 泳道 1)，回复株出现 1 197 bp 条带(图 1B: 泳道 2)，测序显示基因回复株构建成功，将回复株命名为 APEC81-C $\Delta ygeG$ 。

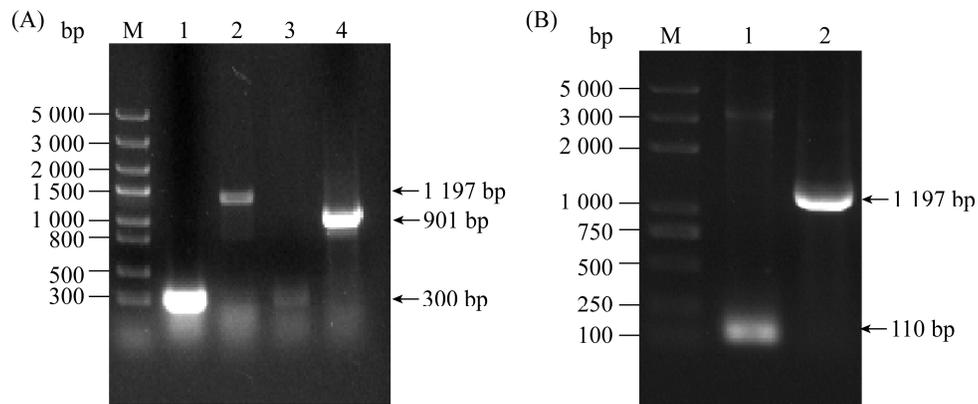


图 1 基因缺失株和基因回复株的 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of the mutant and complementary strains by PCR. A: identification of APEC81- $\Delta ygeG$  by PCR. M: trans 5K DNA marker I; lane 1: wild strain by primers *ygeG*-in-F/R; lane 2: wild strain by primers *ygeG*-out-F/R; lane 3: APEC81- $\Delta ygeG$  by primers *ygeG*-in-F/R; lane 4: APEC81- $\Delta ygeG$  by primers *ygeG*-out-F/R; B: identification of APEC81-C $\Delta ygeG$  by PCR. M: trans 2K DNA ladder; lane 1: pSTV28 empty plasmid; lane 2: APEC81-C $\Delta ygeG$ .

## 2.2 生长曲线测定

野生株 APEC81、基因缺失株 APEC81- $\Delta ygeG$ 、基因回复株 APEC81-C $\Delta ygeG$  在 LB 液体培养基中的生长速度基本一致, 无显著差异(图 2), 表明缺失 *ygeG* 不影响细菌的生长特性( $P > 0.05$ )。

## 2.3 运动性检测

运动性检测结果显示, APEC81- $\Delta ygeG$  运动能力极显著高于野生株( $P < 0.001$ ), 回复株运动能力有所恢复, 见图 3。

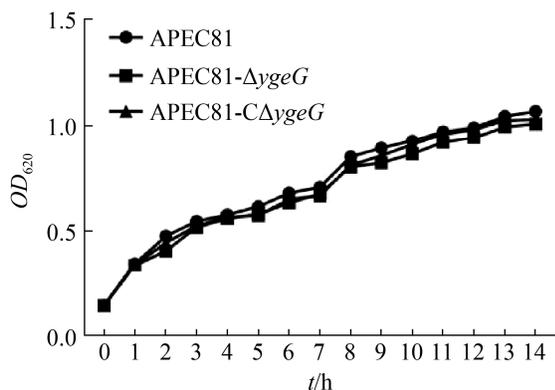


图 2 不同菌株的生长曲线

Figure 2 Bacterial growth kinetics of each strain.

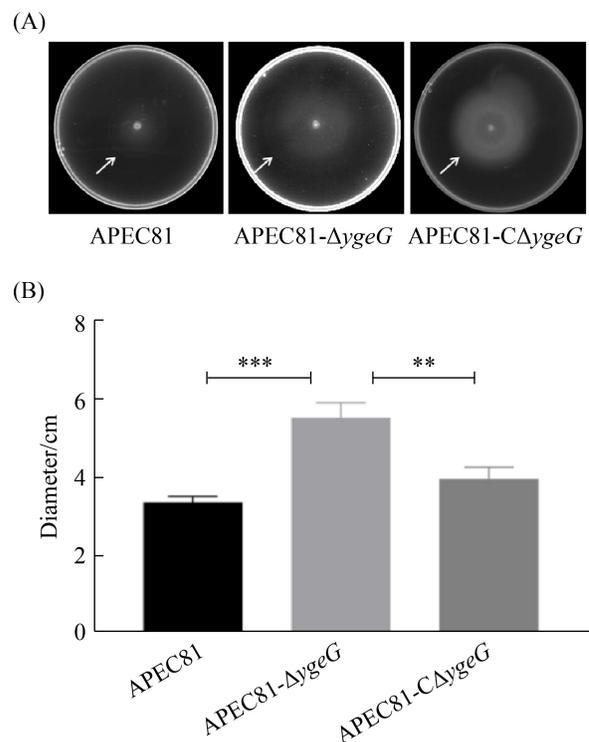


图 3 各菌株运动性测定结果

Figure 3 Bacterial motility of each strain. A: APEC81, APEC81- $\Delta ygeG$  and APEC81-C $\Delta ygeG$ ; B: data analysis of motility diameter. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

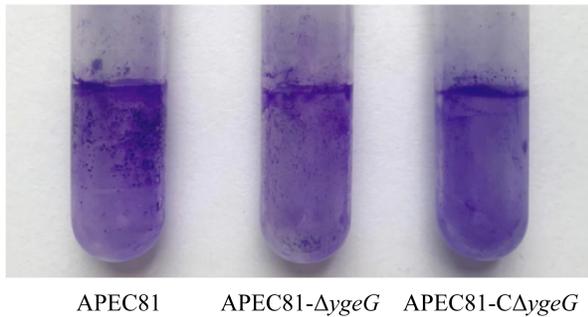
## 2.4 *ygeG* 基因缺失影响生物被膜的形成

生物被膜形成能力检测结果表明, 缺失了 *ygeG* 后, APEC 生物被膜形成能力显著降低 ( $P<0.01$ ), 回复株生物被膜形成能力稍有恢复, 见图 4。

## 2.5 qRT-PCR 验证运动性和生物被膜相关基因的转录水平

与野生株 APEC81 相比, APEC81- $\Delta ygeG$  生物膜相关基因 *adrA*、*mlrA*、*csgD* 转录水平极显著下降 ( $P<0.001$ ), 鞭毛相关基因 *flgC*、*flgM*、*flgL* 转录水平极显著升高 ( $P<0.001$ ), 见图 5。

(A)



(B)

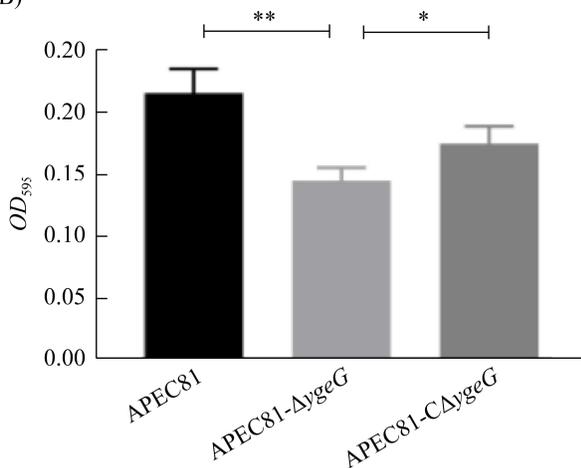


图 4 各菌株生物被膜形成能力测定结果

Figure 4 Biofilm formation of each strain. A: APEC81, APEC81- $\Delta ygeG$  and APEC81-C $\Delta ygeG$ ; B: Biofilm formation ability. \*\*:  $P<0.01$ ; \*:  $P<0.05$ .

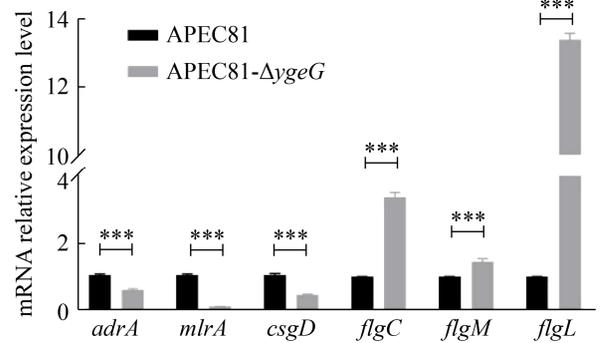


图 5 运动性、生物被膜形成能力相关基因的转录水平

Figure 5 Transcription level of genes related to motility and biofilm formation ability. \*\*\*:  $P<0.001$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

## 2.6 环境耐受力的检测

与野生株 APEC81 相比, APEC81- $\Delta ygeG$  在酸休克(图 6A)、氧化休克(图 6D)应激条件下存活率极显著下降 ( $P<0.001$ ), 在碱休克(图 6B)、渗透压休克(图 6C)、热休克(图 6E)应激条件下存活率显著下降 ( $P<0.01$ ); 在回复株中, 抗酸、抗碱、抗渗透应激、抗氧化应激和抗热应激能力均有所恢复。

## 2.7 抗血清杀菌能力

血清杀菌结果表明, 3 株菌在灭活血清中的存活能力无显著性差异 ( $P>0.05$ ), APEC81- $\Delta ygeG$  在不同浓度的血清中抗血清杀菌能力均低于野生株(100%、50%、30%、10%), APEC81-C $\Delta ygeG$  在不同浓度的血清中抗血清杀菌能力均有所恢复(100%、50%、30%、10%)。当血清含量分别为 100%、30% 时, APEC81- $\Delta ygeG$  的抗血清杀菌能力极显著低于野生株 ( $P<0.001$ ), 见图 7。

## 2.8 细胞黏附侵袭试验

与野生株相比, *ygeG* 的缺失极显著地降低了 APEC 对鸡气管粘膜上皮细胞的黏附能力 ( $P<0.001$ ), 见图 8A, *ygeG* 的缺失显著升高了

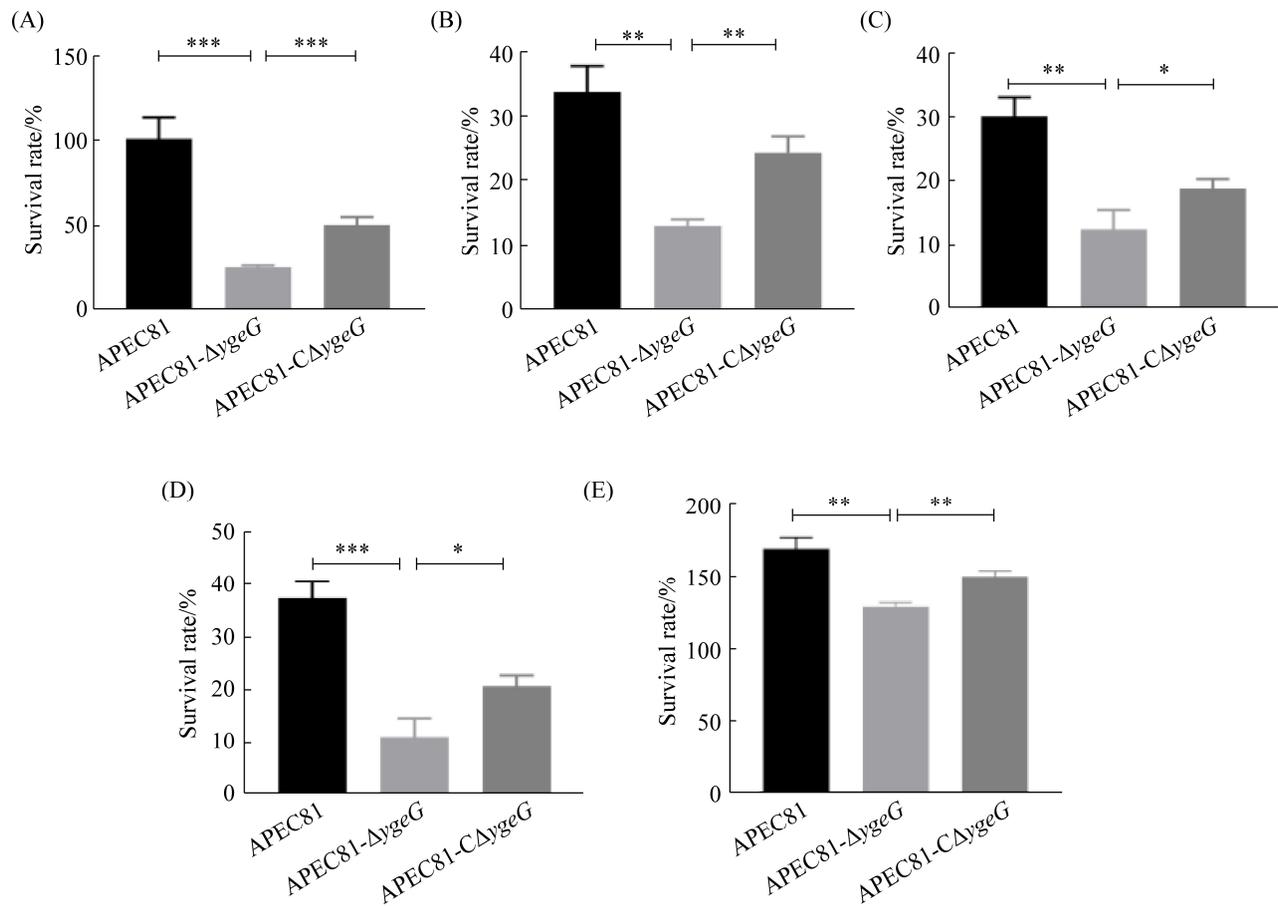


图 6 各菌株在不同环境下的存活率测定

Figure 6 The survival rates of each strain in different environment. A: acid-shock; B: alkaline-shock; C: osmotic-shock; D: oxidative-shock; E: heat-shock. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ .

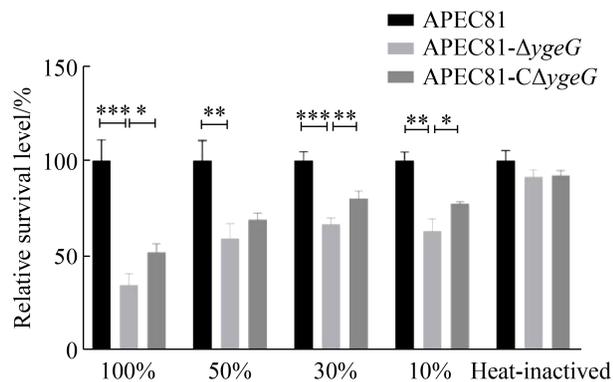


图 7 抗 SPF 鸡血清杀伤能力

Figure 7 Resistance to bactericidal activities of SPE chicken serum. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ .

APEC 对鸡气管粘膜上皮细胞的侵袭能力, 见图 8B。在回复株中黏附、侵袭能力均有所恢复。

### 2.9 qRT-PCR 验证炎症细胞因子转录水平

与野生株相比, *ygeG* 缺失株感染细胞 2 h 后,  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$  的转录水平极显著升高 ( $P < 0.001$ ),  $IL-6$  转录水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),  $IFN-\gamma$  转录水平升高 ( $P < 0.05$ ),  $IL-8$  无明显差异, 见图 9。

## 3 讨论

APEC 是导致家禽死亡的主要病原体之一, 该菌可以感染所有类型 and 所有年龄段的禽类, 给

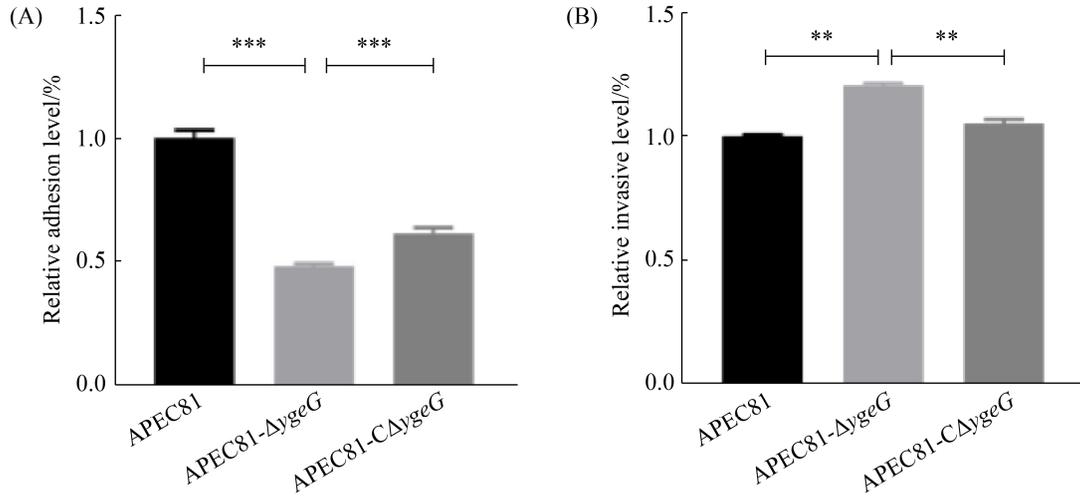


图 8 各菌株对鸡气管粘膜上皮细胞的黏附及侵袭能力

Figure 8 Adhesion and invasion capacity of each strain to chicken tracheal epithelial cells. A: relative adhesion rates; B: relative invasion rates. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

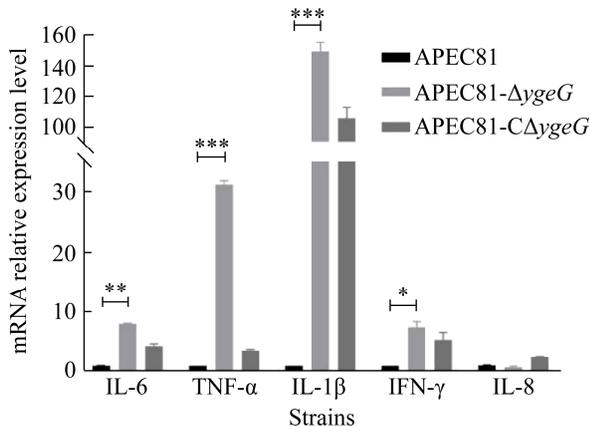


图 9 各菌株感染后对炎症细胞因子转录水平的影响

Figure 9 Effects of each strain infection on transcription levels of inflammatory cytokines. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ .

世界各地养禽行业造成了巨大的经济损失<sup>[16-17]</sup>。APEC 是人肠外致病性大肠杆菌毒力基因和耐药基因的潜在贮库，污染的禽类食品可能是 ExPEC 跨宿主传播的主要来源<sup>[18]</sup>。在感染过程中，APEC 不仅能通过调控毒力因子如 LPS、毒素、荚膜等的表达促进其感染及定殖，还可通过分泌系统释放效应蛋白直接发挥致病作用。

ETT2 毒力岛作为新发现的 III 型分泌系统，已经在多种大肠杆菌中被检测到，但其在 APEC 感染宿主的致病过程中发挥的功能尚不明确<sup>[3,19-20]</sup>。本研究对 APEC-ETT2 毒力岛中假定的伴侣蛋白基因 *ygeG* 进行研究，为探究 ETT2 在 APEC 致病作用中扮演的角色提供理论依据。

本研究结果表明，*ygeG* 基因缺失不影响 APEC81 的生长速度，但可以显著降低细菌的生物被膜形成能力。细菌生物被膜是一种堆砌而成的立体结构，包裹在细胞外基质中，主要由细菌分泌的脂类、多糖、蛋白质等物质构成<sup>[21]</sup>。生物被膜可以增强细菌抵抗宿主免疫系统杀伤和抗生素威胁的能力，同时还能提高细菌在不同环境中的存活率，从而增强细菌的致病性。在本研究中，*ygeG* 基因缺失后，*adrA*、*mlrA*、*csgD* 等生物被膜形成相关的基因转录水平下降，导致 APEC81- $\Delta ygeG$  生物被膜形成能力显著下降，同时可能由于生物被膜减少，导致了其在酸休克、氧化休克中的存活率极显著降低，在碱休克、渗透压休克和热休克中的存活率也显著降低。有研究发现，绝大部分分子伴侣可

在胁迫条件下被诱导生成<sup>[22]</sup>, 对蛋白质结构具有稳定作用, 并能有效地防止变性蛋白的积聚, 加速降解错误合成的中间产物, 使细胞内环境处于稳定水平<sup>[23]</sup>, 因此, 可能由于 *ygeG* 缺失使其生物被膜成分底物稳定性减弱, 导致生物被膜形成能力降低。此外, 本研究结果显示, *ygeG* 基因缺失后细菌的运动性显著增加, Real-time PCR 检测结果表明, *ygeG* 基因抑制鞭毛基因 *flgC*、*flgM* 和 *flgL* 的转录水平, 这可能是 APEC81- $\Delta ygeG$  运动能力显著升高的原因之一。Darwin 等<sup>[24]</sup>发现, 在沙门氏菌 T3SS 中, 伴侣蛋白 SicA 和调节因子 InvF 形成复合物后可激活一系列基因的转录。同时, 本实验室前期研究发现, 转录调节因子 *yqeH* 的转录水平受到 *ygeG* 负反馈调控, 从而影响下游靶基因的表达<sup>[8]</sup>。因此我们推测, ETT2 分子伴侣基因 *ygeG* 可能通过影响某些调控因子的调控作用, 参与生物被膜形成和鞭毛合成, 进而影响 APEC 生物被膜形成能力及运动能力, 贡献于细菌的抗逆性及致病性。此外, 本研究中缺失 *ygeG* 基因 APEC 运动能力升高, 生物被膜形成能力降低, 这种运动性和生物被膜的负调控现象并不特殊。研究发现, 在铜绿假单胞菌生物被膜形成过程中, 运动能力降低可以稳定三维结构的形成<sup>[25]</sup>。Borlee 等<sup>[26]</sup>发现细菌的 c-di-GMP 可以控制细菌运动方式和固着的转变。生物被膜形成和运动性的调控机制庞大而复杂, 其具体机制仍有待进一步研究。

评价 APEC 毒力的参数众多, 其中包含细菌对血清的敏感性。菌体入侵宿主后, 宿主的第一道体液免疫防线是血清补体系统, 细菌想要存活, 必须抵抗血清的杀伤作用<sup>[27-28]</sup>。本研究中, APEC81- $\Delta ygeG$  相较 APEC81 具有更高的血清敏感性, 然而, 在灭活血清中这种敏感性差异消失。血清的温和热灭活破坏了免疫补

体, 对 APEC 产生铁、氧等营养免疫抑制作用, *ygeG* 缺失株与野生株对灭活血清的敏感性并无差异, 表明 *ygeG* 对 APEC 的营养免疫相关通路基因并无影响。这提示 *ygeG* 可能通过影响某些血清抗性基因的表达抵抗宿主血清中补体等天然免疫因子的杀菌作用, 对 APEC 在宿主体内的存活和扩散具有重要辅助作用。血清中含多种免疫因子, 包括补体、溶菌酶、乙型溶素等, 目前研究报道已知补体多作用于革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌<sup>[29]</sup>, 溶菌酶、乙型溶素等一般作用于革兰氏阳性菌<sup>[30]</sup>, 然而血清中免疫成分仍存在很多未知组分, 这也是如今细胞培养仍将血清作为营养补充剂直接添加到培养基中的原因之一。有研究报道使用不同浓度的血清培养动物细胞使细胞分化和发育不同<sup>[31]</sup>, 表明不同浓度血清可能在其成分发挥作用的过程中有一定差异。在血清杀菌实验中, 不同浓度的血清对 APEC81、APEC81- $\Delta ygeG$  和 APEC81-C $\Delta ygeG$  的杀菌效果存在一定差异, 差异都具有显著性, 表明 *ygeG* 影响 APEC81 的血清抗性, 其中 100% 和 30% 浓度血清杀菌都具有极显著性, 我们推测可能是由于这 2 个浓度血清中的免疫因子组分(如补体及其他未知免疫因子)发挥作用的能力强于其他浓度, 但其具体机制尚未可知, 有待探究。

禽致病性大肠杆菌最初通过呼吸道感染家禽, 黏附是其感染宿主细胞的第一步, 侵袭是内化的关键步骤<sup>[32]</sup>, 因此, 禽致病性大肠杆菌对鸡气管粘膜上皮细胞的黏附和侵袭能力对其定殖和抵抗宿主细胞清除至关重要<sup>[33]</sup>。Hartleib 等<sup>[4]</sup>发现, 大肠杆菌分离株的毒素和黏附素可被 ETT2 毒力岛编码的蛋白所影响, 这提示大肠杆菌黏附侵袭宿主细胞的过程中, ETT2 毒力岛发挥着重要的作用。目前, APEC-ETT2 在禽上皮细胞的致病作用研究未见报道。本研究结果

显示 *ygeG* 基因缺失后, APEC81 对鸡气管粘膜上皮细胞的黏附能力显著降低, 侵袭能力显著升高, 推测 *ygeG* 可能通过影响某些黏附因子的转录水平来参与其对宿主细胞的黏附入侵功能。炎症反应的发生依赖于多种效应分子的参与, 并表现出促炎效应或抑炎效应<sup>[34]</sup>。在沙门氏菌中, T3SS 可抑制巨噬细胞中早期促炎细胞因子的表达, 包括 NF- $\kappa$ B 通路和 TLRs 通路下游调控的炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ , 使巨噬细胞向 M2 型极化, 进而降低炎症反应<sup>[35-37]</sup>。王海光等<sup>[38]</sup>发现肠致病大肠杆菌(EHEC、EPEC)感染宿主上皮细胞能够上调 III 型分泌系统的表达。王玉瑞等<sup>[39]</sup>研究发现大肠杆菌可以通过 III 型分泌系统将效应因子注入到宿主细胞内, 破坏宿主细胞内的多种信号通路, 从而有利于细菌的感染及定殖。本研究中, *ygeG* 缺失后 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  等炎性因子转录水平显著升高, 这提示 ETT2-YgeG 可能在感染早期通过促进其特异性底物效应蛋白的折叠及分泌, 抑制宿主细胞的过度炎症反应, 为 APEC 进一步感染提供便利。

本研究通过分析 *ygeG* 对 APEC81 的生物学特性和致病性, 发现 *ygeG* 能够增强 APEC81 的运动能力, 降低生物被膜的形成能力, 并在抑制鸡气管黏膜上皮细胞炎性因子转录中具有重要作用, 为深入了解 ETT2 在禽致病性大肠杆菌中的致病机制及其效应蛋白的寻找提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] Johnson TJ, Wannemuehler Y, Kariyawasam S, Johnson JR, Logue CM, Nolan LK. Prevalence of avian-pathogenic *Escherichia coli* strain O1 genomic islands among extraintestinal and commensal *E. coli* isolates. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(11): 2846–2853.
- [2] Dale C, Plague GR, Wang B, Ochman H, Moran NA. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(19): 12397–12402.
- [3] Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*, 2001, 8(1): 11–22.
- [4] Hartleib S, Prager R, Hedenström I, Löfdahl S, Tschäpe H. Prevalence of the new, SPI<sub>1</sub>-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 292(7/8): 487–493.
- [5] 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.
- [6] Osawa K, Shibata M, Nishiyama Y, Kataoka N, Kurokawa M, Yamamoto G, Kinoshita S. Identification of the ETT2 locus in human diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2006, 12(3): 157–159.
- [7] Yao YF, Xie Y, Perace D, Zhong Y, Lu J, Tao J, Guo XK, Kim KS. The type III secretion system is involved in the invasion and intracellular survival of *Escherichia coli* K1 in human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 300(1): 18–24.
- [8] 尹磊. ETT2 和 *phoP* 在禽致病性大肠杆菌生物被膜形成及致病性研究. 安徽农业大学博士学位论文, 2019.
- [9] 易正飞. III 型分泌系统 2 效应因子及双组分系统 CpxR 对禽致病性大肠杆菌毒力的影响. 中国农业科学院学位论文, 2020.
- [10] Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 771–795.
- [11] De Parsot C, Hamiaux C, Page AL. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(1): 7–14.
- [12] 薛媚. KdpDE 与 YgeK 对禽致病性大肠杆菌致病性的影响及调控机制研究. 安徽农业大学博士学位论文, 2020.

- [13] 白光兴, 孙志伟, 黄莺, 俞炜源. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 35–38.  
Bai GX, Sun ZW, Huang Y, Yu WY. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by Red recombination. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(1): 35–38. (in Chinese)
- [14] 王泽平, 李倩文, 尹磊, 涂健, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗. 大肠杆菌三型分泌系统 2 转录调节子 EtrA 对禽致病性大肠杆菌致病性的影响. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1515–1523.  
Wang ZP, Li QW, Yin L, Tu J, Song XJ, Shao Y, Qi KZ. Effect of ETT2 transcriptional regulator EtrA on the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1515–1523. (in Chinese)
- [15] 熊丹. 肠炎沙门菌新型抑炎效应蛋白 TcpS 逃逸宿主天然免疫的机制研究. 扬州大学博士学位论文, 2020.
- [16] Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carboneille E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 2008, 9: 560.
- [17] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140–3145.
- [18] Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R III, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 1177–1187.
- [19] Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin JY, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409(6819): 529–533.
- [20] Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Akaza H, Hayashi H. Identification of a type III secretion system in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 212(2): 221–228.
- [21] Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 2018, 9(1): 522–554.
- [22] 谷丰. 高温噬菌体 TSP4 分子伴侣 CPN47 对酶热稳定性的影响研究. 昆明理工大学博士学位论文, 2014.
- [23] Lithwick G, Margalit H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Research*, 2003, 13(12): 2665–2673.
- [24] Darwin KH, Miller VL. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO Journal*, 2001, 20(8): 1850–1862.
- [25] Parsek MR. Controlling the connections of cells to the biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 12–14.
- [26] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 827–842.
- [27] 高清清, 夏乐, 刘娟华, 高崧, 刘秀梵. *kpsE* 和 *kpsD* 双基因缺失显著降低肠道外致病性大肠杆菌的毒力. 微生物学报, 2016, 56(10): 1571–1582.  
Gao QQ, Xia L, Liu JH, Gao S, Liu XF. Dual deletion of the *kpsE* and *kpsD* genes reduced the bacterial virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(10): 1571–1582. (in Chinese)
- [28] la Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science*, 2002, 73(1): 27–35.
- [29] Heesterbeek DAC, Muts RM, van Hensbergen VP, De Saint Aulaire P, Wennekes T, Bardoel BW, Van Sorge NM, Rooijackers SHM. Outer membrane permeabilization by the membrane attack complex sensitizes Gram-negative bacteria to antimicrobial proteins in serum and phagocytes. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(1): e1009227.
- [30] Arabski M, Konieczna I, Tusińska E, Wąsik S, Relich I, Zajac K, Kamiński ZJ, Kaca W. The use of lysozyme modified with fluorescein for the detection of Gram-positive bacteria. *Microbiological Research*, 2015, 170: 242–247.

- [31] 张丽娇, 岳丽敏, 马莹聪. 不同血清浓度对小鼠骨髓巨噬细胞原代培养的影响. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(3): 167–168, 208.  
Zhang LJ, Yue LM, Ma YC. Effect of different serum concentrations on primary culture of mouse bone marrow macrophages. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(3): 167–168, 208. (in Chinese)
- [32] 霍静. 7种胞内菌对不同细胞系黏附侵袭及生存能力研究. 河北工程大学博士学位论文, 2020.
- [33] Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(2): 136–169.
- [34] 藺志杰. 肠炎沙门菌效应蛋白 AvrA 参与宿主炎症反应机制. 扬州大学博士学位论文, 2017.
- [35] Pavlova B, Volf J, Ondrackova P, Matiasovic J, Stepanova H, Crhanova M, Karasova D, Faldyna M, Rychlik I. SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Veterinary Research*, 2011, 42(1): 1–7.
- [36] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 2001, 22(2): 153–183.
- [37] Vlahopoulos S, Zoumpourlis VC. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry: Moscow*, 2004, 69(8): 844–854.
- [38] 王海光, 毛旭虎. 肠出血性大肠杆菌III型分泌系统效应因子与宿主细胞相互作用研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2012, 40(2): 53–57.  
Wang HG, Mao XH. Progress of the interactions between type III secretion system effector from enterohemorrhagic *Escherichia coli* and host cells. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, 40(2): 53–57. (in Chinese)
- [39] 王玉瑞, 廖翔, 周围, 戴红梅, 宋婷, 梁龙. 大肠杆菌 O157:H7 III型分泌系统的缺陷突变株对 HeLa 细胞黏附能力的影响. *军事医学*, 2014, 38(10): 795–798.  
Wang YR, Liao X, Zhou W, Dai HM, Song T, Liang L. Effect of type III secretion system deficient mutant of *E. coli* O157:H7 on attachment of HeLa cells. *Military Medical Sciences*, 2014, 38(10): 795–798. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)