

冯寒霜, 薛媚, 卢会奇, 等. 组氨酸激酶基因 *envZ* 调控禽致病性大肠埃希菌生物被膜的机制研究 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(1): 26-33.
FENG Hanshuang, XUE Mei, LU Huiqi, et al. Mechanism of histidine kinase gene *envZ* regulating biofilm of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(1): 26-33.

组氨酸激酶基因 *envZ* 调控禽致病性大肠埃希菌生物被膜的机制研究

冯寒霜, 薛媚, 卢会奇, 谷一, 邵颖, 宋祥军, 涂健, 祁克宗
(安徽农业大学 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)

摘要:【目的】研究双组分系统 *ompR/envZ* 中的组氨酸激酶基因 *envZ* 对禽致病性大肠埃希菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 生物被膜形成能力的影响, 了解该双组分系统在 APEC 中对生物被膜的调控机制, 为探索生物被膜影响禽致病性大肠埃希菌耐药性的途径提供参考。【方法】采用 Red 同源重组的方法构建 *envZ* 基因缺失株, 比较野生株和 *envZ* 基因缺失株生长特性、生物被膜形成能力的差异。利用转录组学方法分析 *envZ* 在转录调控网络中对其生物被膜形成相关基因的调控机制。【结果】成功构建 *envZ* 基因缺失株 AE17Δ*envZ*; *envZ* 基因缺失对 APEC 的生长速度无明显影响, 但使 APEC 生物被膜的成膜能力减弱。与野生株 AE17 相比, *envZ* 基因缺失株有 711 个基因发生差异表达, 与生物被膜形成相关的基因显著下调。【结论】*envZ* 基因除了响应环境渗透压, 还参与调控 APEC 生物被膜的形成。

关键词: 禽致病性大肠埃希菌; *envZ* 基因; 生物被膜; 转录组分析

中图分类号: S852.61⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)01-0026-08

Mechanism of histidine kinase gene *envZ* regulating biofilm of avian pathogenic *Escherichia coli*

FENG Hanshuang, XUE Mei, LU Huiqi, GU Yi, SHAO Ying, SONG Xiangjun, TU Jian, QI Kezong
(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control,
Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of histidine kinase gene *envZ* in two-component system *ompR/envZ* on biofilm formation ability of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), understand the regulation mechanism of the two-component system on biofilm of APEC, and provide a reference for investigating the ways of biofilms affecting APEC antibiotic resistance. 【Method】The red homologous recombination method was used to construct the *envZ*-gene-deleted strain, and the differences in growth characteristics and biofilm formation abilities between wild strain and the *envZ*-gene-deleted strain were compared. The mechanism of *envZ* regulating biofilm formation related genes in transcriptional regulatory network was analyzed by transcriptomics. 【Result】The *envZ*-gene-deleted strain AE17Δ*envZ* was successfully constructed. The *envZ* gene deletion had no significant effect on growth rate of APEC, but weakened the APEC biofilm formation ability. Compared with wild strain AE17, AE17Δ*envZ* had 711 differentially expressed genes, and the genes related to biofilm formation

收稿日期: 2020-01-15 网络首发时间: 2020-12-01 14:06:31

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20201201.1337.006.html>

作者简介: 冯寒霜 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1532683115@qq.com; 通信作者: 祁克宗 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: qkz@ahau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31772707)

were significant down regulation. 【Conclusion】 In addition to responding to environmental osmotic pressure, *envZ* gene is also involved in regulating the formation of APEC biofilm.

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*; *envZ* gene; biofilm; transcriptome analysis

禽致病性大肠埃希菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 作为禽类疾病重要的病原菌之一^[1], 常引起禽类呼吸道感染、心包炎、败血症、腹膜炎、肝周炎和气囊炎等^[2], 给家禽业造成巨大的经济损失^[3-4]。二元调控系统是细菌感知和响应环境的主要手段^[5-7], 通常包含接收外部输入信号的传感器——组氨酸激酶和传递细菌细胞生理学变化的响应调节剂^[8-11]。

envZ 是构成 *ompR/envZ* 系统的组氨酸激酶基因^[12-15]。在鼠伤寒沙门氏菌中 *envZ* 参与调控数百种与毒力、孔蛋白形成和鞭毛组装等相关的基因的表达^[16]。在肺炎克雷伯菌中 *ompR/envZ* 是调节 c-di-GMP 信号通路、3 型菌毛表达以及在渗透压应激下产生的生物被膜量的关键因素^[17]。生物被膜通常由胞外多糖、蛋白质和核酸组成^[18], 可以使内部细菌逃避抗生素或机体免疫系统的作用, 造成机体持续性感染或免疫性疾病。细菌从游离状态到聚集形成成熟生物被膜牵涉到复杂的调控机制^[19], 例如在放线杆菌中组氨酸激酶基因 *arcB* 可以感知氧化还原的生长条件并调节生物被膜的形成^[20], 但在 APEC 中 *envZ* 与生物被膜形成之间可能存在的调控联系尚不明确。本研究用 Red 同源重组方法构建 *envZ*

基因缺失株, 对其生物被膜形成特性以及可能参与的调控通路进行研究分析, 为探索 APEC 的生理学功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

APEC 菌株 AE17 由安徽省兽医病理生物学与疫病防控省重点实验室保存。质粒 pKD3(氯霉素抗性)、pCP20(氯霉素和氨苄青霉素抗性) 和 pKD46(氨苄青霉素抗性) 均购自 Takara 公司。

1.2 主要试剂和仪器

2×PCR Mix、DL2000 DNA marker、高保真 PCR 酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司, PCR 扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统购自北京新技术公司, 电转化仪购自美国 BTX 公司。

1.3 引物设计

根据 NCBI 公布的 *envZ* 基因序列, 利用 Primer 5.0 软件并结合 Red 同源重组原理设计 *envZ* 基因缺失引物和缺失鉴定引物 (表 1), 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

表 1 *envZ* 基因缺失和缺失鉴定引物
Table 1 Primers used for construction and identification of *envZ* gene deletion

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	产物大小/bp Product size
<i>envZ</i> -U-F	GCGGGCCACGCAACGAAAGTTAT	810
<i>envZ</i> -U-R	CCAGCCTACAACCATTAGCGGCACGGGATTAGGGC	
<i>envZ</i> -cm-F	CGCTAATGGTTGTAGGCTGGAGCTGCTT	1 013
<i>envZ</i> -cm-R	TGAACTTCGCCATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>envZ</i> -D-F	TATTCATATGGCGAAGTTCAGCACCACCAGATA	736
<i>envZ</i> -D-R	CGAAGCGTCGCTAATGCAGAACA	
<i>envZ</i> -out-F	ATCAAACCCAGTACCACTTCCTCT	2 102
<i>envZ</i> -out-R	GCTCTCCCGCGATAAGCT	
<i>envZ</i> -in-F	TCCCGCTCATAGCCACTT	499
<i>envZ</i> -in-R	TTCATCAGGGCGATTTCTC	
<i>pKD46</i> -F	GATACCGTCCGTTCTTTCCTT	888
<i>pKD46</i> -R	TGATGATACCGCTGCCTTACT	
<i>pCP20</i> -F	TTAGTGGTTGTAAAAACACCTGACC	409
<i>pCP20</i> -R	GTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCC	

1.4 *envZ* 基因缺失株的构建

根据 Red 同源重组系统原理及方法^[21], 将扩增的含氯霉素抗性片段的 *envZ* 基因同源臂电转化入 AE17-pKD46 感受态细胞中, 涂布氯霉素抗性平板筛选基因缺失株。挑取单克隆菌落, PCR 鉴定 *envZ* 基因是否缺失成功, 若成功, 则利用 pCP20 质粒在 42 ℃ 环境中诱导消除 pKD46, 缺失成功的菌株命名为 AE17Δ*envZ*。

1.5 生长曲线的测定

野生株 AE17 和缺失株 AE17Δ*envZ* 培养至对数生长期, 调整 $D_{600\text{ nm}}=1.0$, 按体积比 1:100 接种于 LB 培养基, 37 ℃、200 r/min 条件下振荡培养, 每隔 1 h 取样并测定菌液的 $D_{600\text{ nm}}$, 记录并绘制细菌生长曲线。

1.6 *envZ* 缺失对生物被膜形成的影响

1.6.1 生物被膜形成能力观察 野生株 AE17 和缺失株 AE17Δ*envZ* 培养至对数生长期, 用经高压灭菌的 LB 液体培养基按体积比 1:50 稀释菌液, 加入到 96 孔聚丙烯板中, 每孔 200 μL, 每组 3 次重复。28 ℃ 条件下培养 48 h 后, 吸出菌液, 每孔加 200 μL PBS 缓冲液洗涤 3 遍, 晾干后每孔加入 200 μL 0.1%(φ) 结晶紫溶液, 37 ℃ 条件下染色 20 min 后用 PBS 缓冲液洗涤 3 遍, 晾干。拍照留图后, 每孔加入 200 μL 33%(φ) 乙酸溶解 10 min, 然后使用酶标仪测定 $D_{620\text{ nm}}$ 。

1.6.2 扫描电镜观察细菌生物被膜 在 6 孔细胞板中放入细胞爬片, 加入 2 mL 菌液 (1×10^8 CFU), 在 28 ℃ 培养箱中静置培养 48 h。扫描电镜观察前处理方法如下。

- 1) 样本制备: 将培养的细胞爬片取出, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 晾干。
- 2) 固定: 用 2.5%(φ) 戊二醛溶液固定 2 h, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 尽快将样本放入 3%(φ) 戊二醛溶液中, 置于 4 ℃ 条件下固定 6 h, 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 20 min。
- 3) 梯度脱水: 使用体积分数分别为 50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇溶液依次处理 20 min; 弃去乙醇溶液后, 用丙酮处理 20 min, 重复 2 次。
- 4) 干燥: 将处理好的样本浸泡在丙酮中送至安徽农业大学生物科技楼公共平台中心进行真空冷冻干燥。
- 5) 黏台: 用导电胶将干燥后的样品固定于样品台上。
- 6) 喷金: 在不导电的样品表面喷镀一层约 10 nm 厚的贵金属。
- 7) 进样观察。

1.7 基于 RNA-Seq 技术筛选 *envZ* 缺失株差异表达基因

分别提取 AE17 和 AE17Δ*envZ* 菌株的总 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染, 采用 Nanodrop 检测 RNA 的纯度 ($D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$), 采用 Qubit 对 RNA 浓度进行精确定量并采用 Agilent 2100 精确检测 RNA 完整性的方法对总 RNA 样品进行检测。样品检测合格后, 进行文库构建, 之后库检以保证文库质量。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求汇集后进行 HiSeq/MiSeq 测序。下机数据的处理由北京诺和致源科技股份有限公司完成, 参照文献 [17] 进行数据处理分析。以 $\log_2 F$ 的绝对值大于 1 且 q 小于 0.005 为标准筛选差异基因, 其中, F 是样本间表达量差异倍数, q 为校正后的 P 值。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测部分基因转录水平

参照文献 [22-23], 分别提取野生株 AE17 和缺失株 AE17Δ*envZ* 的 RNA, 利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 检测, 反应体系为 20 μL: SYBRGreen PCR Master Mix 10 μL, 上下游引物 (表 2) 各 1 μL, cDNA 模板 2 μL, 补足双蒸水至 20 μL。反应条件: 95 ℃ 2 min; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 10 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[24] 分析基因转录水平, 并利用 SPSS 软件对 RNA-Seq 和实时荧光定量 PCR 2 种方法的结果进行相关性分析。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物
Table 2 Primers used in real time fluorogenic quantitative PCR

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence
<i>dnaERT</i> -F	GATTGAGCGTTATGTCGGAGGC
<i>dnaERT</i> -R	GCCCCGACCCGTGAT
<i>fhlART</i> -F	GAAGTGGTGGTCGTTGCCGATAAA
<i>fhlART</i> -R	GCTGGAGTTGAAGATAATGGGGG
<i>fhlDRT</i> -F	AGAGTAATCGTCTGGTGGCTGTC
<i>fhlDRT</i> -R	CGACAACATTAGCGGCACTG
<i>fhlCRT</i> -F	GGCTGGTGAGCGTGGGTAATA
<i>fhlCRT</i> -R	AGTGCCCCGAAGCAGAAGAAG
<i>fimDRT</i> -F	CACCTTTGTCATCTGCCGAACTCTA
<i>fimDRT</i> -R	GTCCCTGGCGGTAATTCTTGC
<i>fimHRT</i> -F	GCTATCCATTTCGACCACCA
<i>fimHRT</i> -R	GCACTGCTCACAGGCGTCAAA
<i>mlrART</i> -F	TTAGTTCACCGTTACGAATCGC
<i>mlrART</i> -R	AAACAACAGCCTCCACCAGC
<i>mcbRRT</i> -F	CTGTTGAAAACCTCACCCCG
<i>mcbRRT</i> -R	TTAATGATTGTTCATGTCGCC

2 结果与分析

2.1 *envZ* 基因缺失株的构建和鉴定

对 AE17 和 AE17Δ*envZ* 进行 PCR 鉴定, 结果显示, 野生株可以扩增到 499 bp 的内侧条带和 2 012 bp 的外侧条带, 而 *envZ* 缺失株不能扩增到相应的内侧条带, 且外侧扩增到的条带为 976 bp(图 1), 表明 *envZ* 的缺失株构建成功。

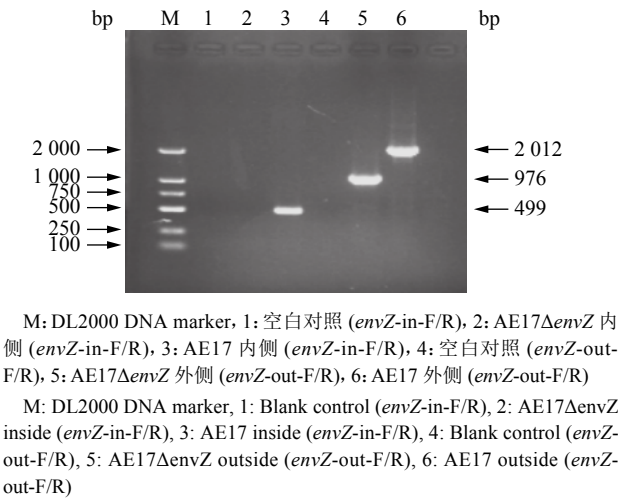


图 1 *envZ* 基因缺失株 AE17Δ*envZ* 的鉴定

Fig. 1 Identification of *envZ* deletion strain AE17Δ*envZ*

2.2 生长曲线的测定

野生株 AE17 和缺失株 AE17Δ*envZ* 的生长曲线(图 2)表明, *envZ* 基因缺失对 AE17 菌株在 LB 液体培养基中的生长性能无明显影响($P>0.05$)。

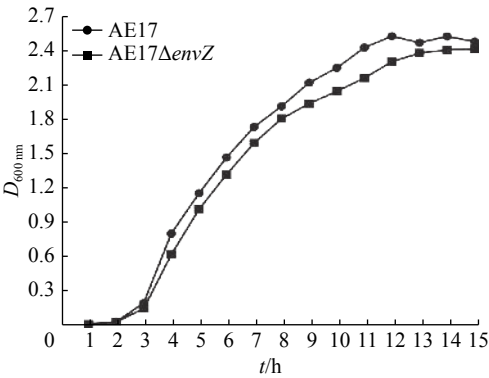
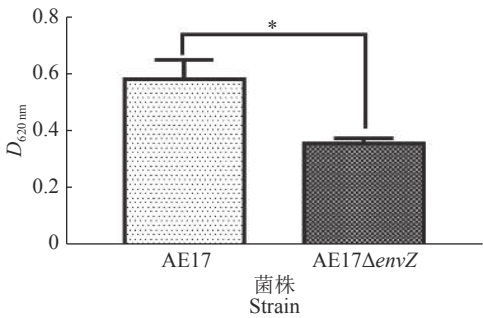


图 2 AE17 和 AE17Δ*envZ* 的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of AE17 and AE17Δ*envZ*

2.3 生物被膜形成能力检测

AE17 和 AE17Δ*envZ* 在 96 孔板中培养 48 h 后, 利用酶标仪检测其生物被膜形成能力, 结果如图 3 所示, *envZ* 缺失使 AE17 生物被膜形成能力显著减弱($P<0.05$)。结晶紫染色观察生物被膜结果如图 4 所示, 培养 48 h 后, AE17Δ*envZ* 的生物被膜生成量比 AE17 显著减少($P<0.05$)。



“*” 代表不同菌株间差异显著 ($P<0.05$, t 检验)

“*” indicates significant difference between different strains ($P<0.05$, t test)

图 3 酶标仪测定 AE17 和 AE17Δ*envZ* 生物被膜形成能力

Fig. 3 Biofilm formation abilities of AE17 and AE17Δ*envZ* detected by microplate reader



图 4 培养 48 h 后结晶紫染色观察 AE17 和 AE17Δ*envZ* 生物被膜生成量

Fig. 4 Biofilm formation amounts of AE17 和 AE17Δ*envZ* observed by crystal violet staining after 48 hours' cultivation

2.4 扫描电镜观察 AE17Δ*envZ* 生物被膜

在 6 孔板中放入细胞爬片, 分边加入 AE17 和 AE17Δ*envZ* 在 6 孔板中培养, 经过处理后进行扫描电镜观察, 结果如图 5 所示。相对于野生株 AE17 形成的较厚的生物被膜以及菌与菌之间的紧密连接, AE17Δ*envZ* 生成的生物被膜比较薄且菌体之间的分布相对松散, 说明缺失株 AE17Δ*envZ* 形成生物被膜的能力减弱。

2.5 RNA-Seq 测序数据分析

2.5.1 差异基因 GO 功能分类 共筛选到 711 个差异表达基因, 其中, 表达上调基因 303 个, 表达下调基因 408 个(图 6)。筛选出的差异基因 GO 功能分类结果(图 7)显示, 注释到 GO 数据库的差异基因共有 269 个, 得到 1 163 个 GO 功能注释, 涉及分子功能、细胞组分及生物学过程 3 大功能。在生物学过程方面, 共发现 664 个功能注释, 占 57.1%; 细胞组分方面, 共发现 71 个功能注释, 占 6.1%; 在分子功能方面, 共发现 428 个功能注释, 占 36.8%。差异表达基因在生物学过程、细胞成分、分子功能中涉及的显著性 GO 功能分析以及差异基因参与情况见图 7。

2.5.2 生物被膜差异表达基因调控通路 大肠埃希菌中与生物被膜形成有关的基因有鞭毛蛋白合

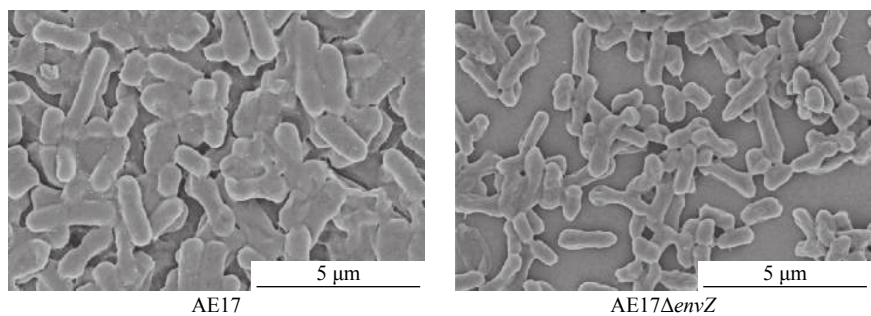


图 5 扫描电镜观察 AE17 和 AE17ΔenvZ 生物被膜

Fig. 5 Biofilms of AE17 and AE17ΔenvZ observed by scanning electron microscope

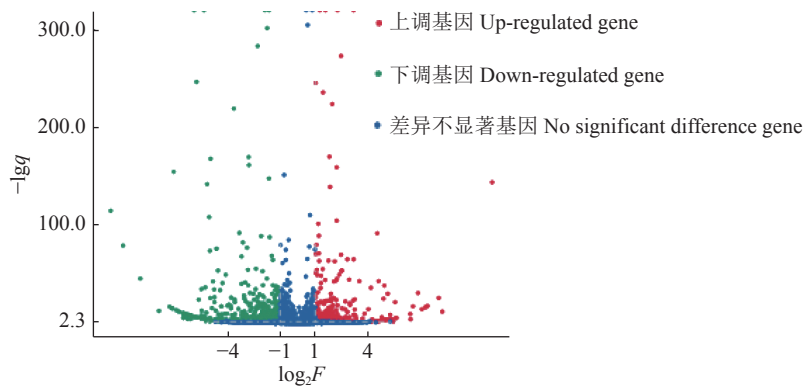


图 6 AE17ΔenvZ 差异表达基因火山图

Fig. 6 Volcano map of AE17ΔenvZ differentially expressed genes

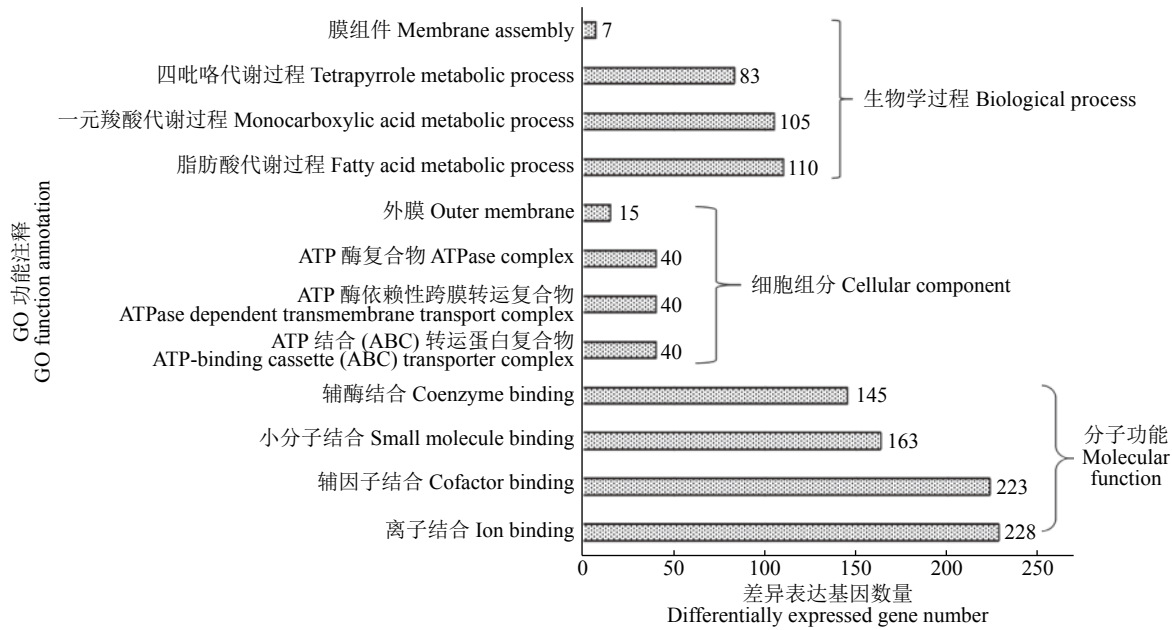


图 7 差异表达基因的 GO 功能分类

Fig. 7 GO functional classification of differentially expressed genes

成基因、抗原 43 合成基因等。鞭毛相关基因如 *flhD*、*flhC*、*fliA* 和 *fliZ* 等表达下调并间接参与生物被膜形成的调控。转录组数据中参与生物被膜调控的基因变化如表 3 所示。

2.5.3 差异表达基因的 KEGG 信号通路功能分类

KEGG 信号通路结果显示, 被注释的 661 个差

异表达基因共涉及 78 个信号通路, 主要涉及氮代谢、β-内酰胺抗性、精氨酸和脯氨酸代谢、缬氨酸和亮氨酸以及异亮氨酸的降解、乙醛酸和二羧酸酯代谢等通路。其中有 6 个基因参加生物被膜调控通路。差异表达基因富集 KEGG 功能分类以及差异基因参与情况见图 8。

表 3 生物被膜相关的差异表达基因

Table 3 Differentially expressed genes associated with biofilm

基因	基因描述	log ₂ F
Gene	Gene description	
<i>tabA</i>	编码含DUF386结构域的毒素-抗毒素生物被膜蛋白 Encoding toxin-antitox biofilm protein that contains DUF386 domain	-7.086 6
<i>lsrR</i>	大肠埃希菌群体感应的主要调节器 Main regulator of <i>Escherichia coli</i> quorum sensing	-5.905 8
<i>mcbR</i>	编码GntR家族转录调节剂 Encoding GntR family transcription regulator	-4.944 8
<i>bdcA</i>	编码c-di-GMP结合生物被膜弥散介质 Encoding c-di-GMP binding biofilm dispersion medium	-4.598 6
<i>mlrA</i>	编码MerR家族转录调节剂, <i>csg</i> 基因激活剂, 调控 <i>csgD</i> 基因表达, 是生物被膜形成的关键调节因子 Encoding MerR family transcription regulator, <i>csg</i> gene activator, regulating <i>csgD</i> gene expression, a key regulator of biofilm formation	-3.587 1
<i>flhD</i>	编码1类启动子, 与 <i>flhC</i> 形成转录激活物复合物FlhD4C2, 决定细菌是运动还是非运动 Encoding a type of promoter, forming transcriptional activator complex FlhD4C2 with <i>flhC</i> , determining bacterium moving or not	-1.900 9
<i>flhC</i>	编码1类启动子, 与 <i>flhD</i> 形成转录激活物复合物FlhD4C2, 决定细菌是运动还是非运动 Encoding a type of promoter, forming transcriptional activator complex FlhD4C2 with <i>flhD</i> , determining bacterium moving or not	-1.313 0
<i>flhA</i>	鞭毛特异性转录σ因子(σ28), 负责所有3类启动子的激活, 3类启动子控制形成细丝、运动蛋白以及趋化蛋白的蛋白表达 A flagella-specific transcription σ factor (σ28), responsible for the activation of all three types of promoters which control the protein expression of filaments, motor proteins and chemotactic proteins	-1.197 1
<i>fliZ</i>	所有鞭毛基因有效表达所必需 Necessary for effective expression of all flagellar genes	-1.274 4

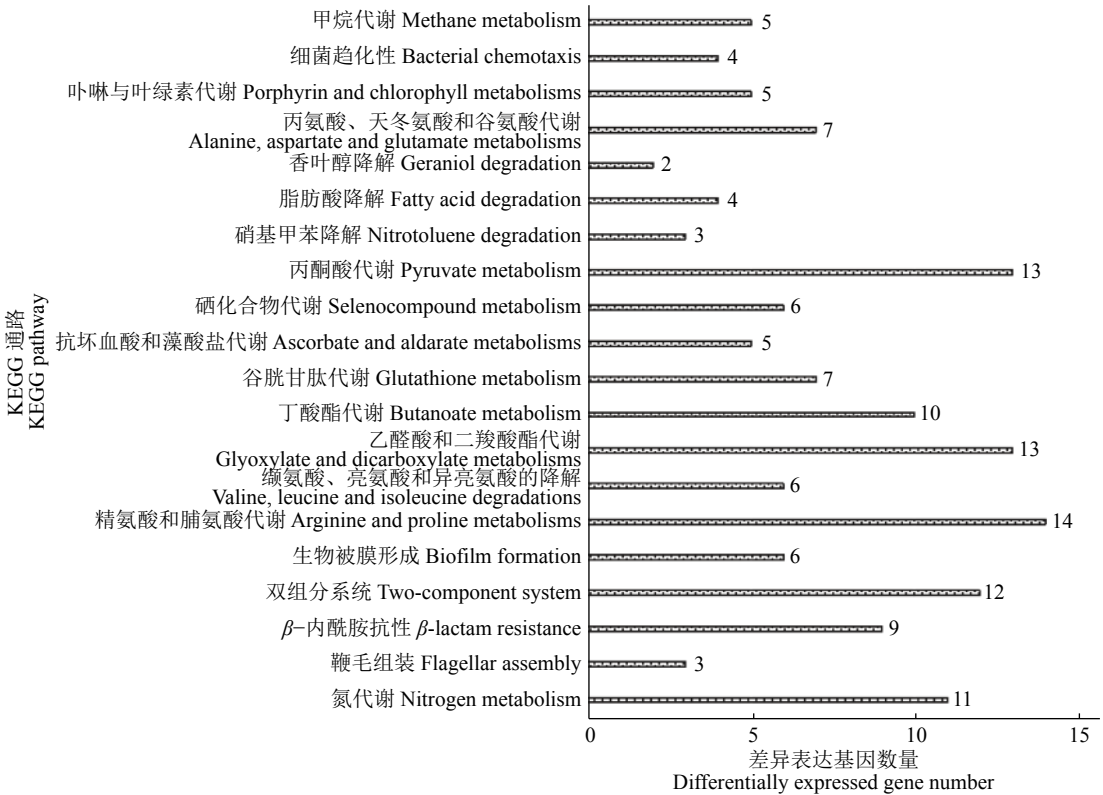


图 8 差异表达基因的 KEGG 功能分类

Fig. 8 KEGG functional classification of differentially expressed genes

2.6 实时荧光定量 PCR 验证部分基因转录水平

实时荧光定量 PCR 验证鞭毛基因 *flhA*、*flhD*、*flhC* 与生物被膜基因 *mlrA*、*mcbR* 的转录水平与转录组学差异倍数的相关系数为 0.82, 是正相关关系(图 9), 说明转录组测序数据结果可靠, 进一步证实 *envZ* 缺失在转录水平上调控与生物被膜相关的基因的表达。

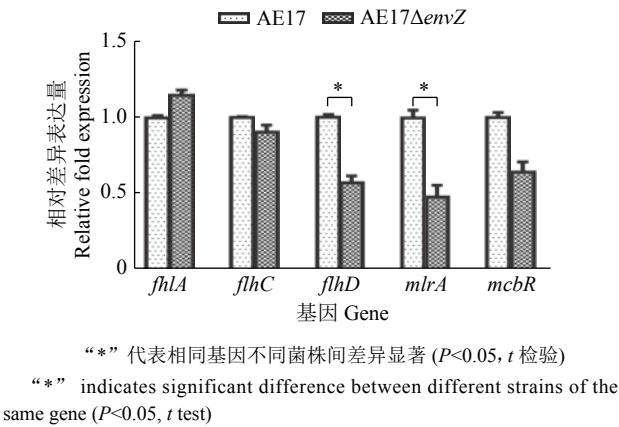


图 9 差异表达基因的验证

Fig. 9 Verification of differentially expressed genes

3 讨论与结论

感应环境渗透压的大肠埃希菌 *ompR/envZ* 双组分调节系统由组氨酸激酶基因 *envZ* 和响应调节剂基因 *ompR* 组成^[25]。其中 *envZ* 有 2 个跨膜螺旋, 一个为周质结构域, 另一个是在 His-243 处经历自磷酸化的细胞质结构域, *envZ* 就是通过细胞质结构域感知渗透压的变化。转录组学是研究转录组的学科, 广泛用于各物种生理生化特征以及分子调控机制的研究, 可用于解析基因组与表型之间的关系^[26]。本研究利用这一组学技术挖掘了 *envZ* 与生物被膜形成特性之间可能存在的调控关系, 为进一步研究该基因在禽致病性大肠埃希菌中的作用^[27] 提供参考。

envZ 基因缺失后, 生物被膜形成能力减弱。结合转录组数据分析可知这一结果可能是调控生物被膜形成的基因表达下调导致的。*flhD* 编码 1 类启动子, 其与 *flhC* 形成转录激活物复合物 FlhD4C2, 决定细菌是运动还是非运动, 其在帮助大肠埃希菌在较长时间内维持生物被膜的生物量方面发挥重要作用^[28]。*mlrA* 参与编码形成 *MerR* 家族转录调节剂, 是 *csg* 基因激活剂, 与 *ydaM* 互作, 调控 *csgD* 基因表达, *csgD* 编码 *LuxR* 家族转录调节剂, 是生物被膜形成的关键调节因子。*lsrR* 是大肠埃希菌群体感应的主要调节器, 大肠埃希菌中生物被膜的数量和结构均受此独特机制调控^[29]。*mcbR* 是荚膜异多

糖和生物被膜基因的转录调节因子, 可通过下调生物膜相关基因 *bcsA*、*fliC*、*wcaF* 和 *fimA* 的转录而减少生物被膜的形成^[30-31]。*bdcA* 可降低 c-di-GMP 的浓度, 进而通过降低鞭毛旋转、卷曲纤维素合成使生物被膜形成量减少^[32]。*tabA* 编码含 DUF386 结构域的毒素-抗毒素生物被膜蛋白, 可通过抑制 1 型菌毛使生物被膜形成量减少^[33]。

envZ 不仅对 APEC 的生物被膜有调控作用, 且更广泛地参与调控其他特殊基因及信号通路, 如已知的其他的二元调控系统的组氨酸激酶基因 *evgS*、*barA*, 如调控新陈代谢基因, 尤其是碳代谢和氮代谢。碳、氮是生物体生长的基本元素, *envZ* 缺失后大量的代谢基因发生显著变化。本研究推测 *envZ* 可能还参与细菌能量代谢基因的调控。

本论文研究了组氨酸激酶基因 *envZ* 对 APEC 生物被膜形成能力的影响, 并采用转录组学方法研究了 *envZ* 对生物被膜可能的调控机制, 发现 *envZ* 缺失可减弱细菌成膜能力, 与生物被膜形成相关的基因表达显著下调。

参考文献:

[1] 刘新. 禽致病性大肠杆菌VI型分泌系统 2 核心组分 VgrG 致病作用及调控研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.

[2] 胡会杰, 张琪, 周明旭, 等. 不同禽源致病性大肠杆菌毒力基因分布规律研究[J]. 中国家禽, 2015, 37(10): 34-37.

[3] 马兴树, 范翠蝶, 夏玉龙. 禽致病性大肠杆菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 169-174.

[4] 许漩, 王少辉, 刘新. 禽致病性大肠杆菌III型分泌系统 2 EivC 点突变的构建及其 ATPase 活性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(3): 47-53.

[5] CAPRA E J, LAUB M T. Evolution of two-component signal transduction systems[J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66: 325-347.

[6] 薛媚, 祁克宗, 薛挺, 等. 利用基因芯片筛选禽致病性大肠杆菌中与 *phoP/Q* 二元调控系统相关的耐药基因[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(8): 672-674.

[7] MATTOS-GRANER R O, DUNCAN M J. Two-component signal transduction systems in oral bacteria[J]. Journal of Oral Microbiology, 2017, 9: 1400858. doi: 10.1080/20002297.2017.1400858.

[8] SKERKER J M, PRASOL M S, PERCHUK B S, et al. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: A system-level analysis[J]. PLoS Biology, 2005, 3(10): 1770-1788.

[9] ZSCHIEDRICH C P, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(19): 3752-3775.

[10] BOTT M, BROCKER M. Two-component signal trans-

- duction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: On the way towards stimuli and targets[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(5): 1131-1150.
- [11] DAI Q, XU L, XIAO L, et al. RovM and CsrA negatively regulate urease expression in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 348.
- [12] GRABOWICZ M, SILHAVY T J. Envelope stress responses: An interconnected safety net[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(3): 232.
- [13] REBOUL A, LEMAITRE N, TITECAT M, et al. *Yersinia pestis* requires the 2-component regulatory system ompR-EnvZ to resist innate immunity during the early and late stages of plague[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(9): 1367-1375.
- [14] TIPTON K A, RATHER P N. An *ompR/envZ* two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(3): UNSP e00705.
- [15] TANG T, ZUO H, WANG C, et al. The effect of OmpR-EnvZ on metabolite profile of *Salmonella typhimurium*: A preliminary investigation[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 11(8): 8075.
- [16] LIN T H, CHEN Y, KUO J T, et al. Phosphorylated OmpR is required for type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* under hypertonic conditions[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2405. doi: 10.3389/fmicb.2018.02405.
- [17] WANG S, NIU C, SHI Z, et al. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1): 279-287.
- [18] 唐俊妮, 史贤明, 王红宁, 等. 细菌生物膜的形成与调控机制[J]. *生物学杂志*, 2009, 26(2): 48-50.
- [19] LONGO P L, OTA-TSUZUKI C, NUNES A C R, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans arcB influences hydrophobic properties, biofilm formation and adhesion to hydroxyapatite[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, 40(3): 550-562.
- [20] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [21] TJADEN B. De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 1. doi: 10.1186/s13059-014-0572-2.
- [22] HAN X, BAI H, LIU L, et al. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55: 21-27.
- [23] QUINN H J, CAMERON A D S, DORMAN C J. Bacterial regulon evolution: Distinct responses and roles for the identical OmpR proteins of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* in the acid stress response[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(3): e1004215.
- [24] KENNEY L J, LIM J, VAN NOORT D. Bistability in the EnvZ/OmpR operon controls osmotic signaling in *E. coli*[J]. *Biophysical Journal*, 2011. doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.251.
- [25] 安春霞. 禽致病性大肠杆菌 *ArcA* 基因的缺失及其致病机理的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [26] 韩月, 韩先干, 白灏, 等. *rmlA* 基因缺失影响禽致病性大肠杆菌的生物被膜形成[J]. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1056-1062.
- [27] YU L, LI W, QI K, et al. McbR is involved in biofilm formation and H₂O₂ stress response in avian pathogenic *Escherichia coli* X40[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(9): 4094-4103.
- [28] SAMANTA P, CLARK E R, KNUTSON K, et al. OmpR and RcsB abolish temporal and spatial changes in expression of *flhD* in *Escherichia coli* Biofilm[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13. doi: 10.1186/1471-2180-13-182.
- [29] LI J, ATTILA C, WANG L, et al. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: Effects on small RNA and biofilm architecture[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(16): 6011-6020.
- [30] YANG W S, HONG Y, ZHANG Y, et al. A potential substrate binding pocket of BdcA plays a critical role in NADPH recognition and biofilm dispersal[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 497(3): 863-868.
- [31] MA Q, YANG Z, PU M, et al. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 631-642.
- [32] ADAMS B L, CARTER K K, GUO M, et al. Evolved quorum sensing regulator, LsrR, for altered switching functions[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 3(4): 210-219.
- [33] KIM Y, WANG X, MA Q, et al. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(4): 1258-1267.