

禽大肠杆菌毒力岛主要摄铁基因及生物膜的检测

汪 凯, 王 琦, 潘 玲*, 刘红梅, 周 杰

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: 以临床病禽分离 17 株 *E. coli* 为研究对象, 分别检测分离菌株的毒力岛中 *irp2*、*irp3*、*irp4*、*irp5* 和生物膜形成能力。先用 *irp2* PCR 扩增检出 7 株致病性大肠杆菌, 并对其进行 ERIC-PCR 分型, 结果分为 2 个类型。又对分离株进行 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* 基因检测, 结果分离株中 *irp2*、*irp3*、*irp4* 和 *irp5* 的阳性检出率分别为 41.2%、64.7%、29.4% 和 35.3%; 最后对分离株进行生物膜形成能力的检测, 结果携带 *irp2* 的阳性菌株都有较强的生物膜形成能力。结果提示, 禽致病性大肠杆菌的 HPI 中 *irp2* 与生物膜的形成有一定的关联。

关键词: 致病性大肠杆菌; *irp2*; ERIC-PCR; 生物膜

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0047-04

Detection of main iron-uptake genes of high pathogenicity island and bacterial biofilm among *E. coli*

WANG Kai, WANG Qi, PAN Ling, LIU Hongmei, ZHOU Jie

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Seventeen *E. coli* strains of clinical avian *E. coli* were used to detect *irp2*, *irp3*, *irp4* and *irp5* located in HPI and their biofilm formation ability among *E. coli* strains. Firstly, 7 strains of Avian pathogenic *E. coli* were detected using *irp2* PCR amplification, ERIC-PCR genotyping of the strains was conducted, and the strains were divided into two types; secondly, 17 strains were detected and the results showed that the positive percentages of *irp2*, *irp3*, *irp4* and *irp5* were 41.2%, 64.7%, 29.4% and 35.3%, respectively; finally, the biofilm formation ability of the isolated strains of *E. coli* were determined and the result showed that the positive strains carrying *irp2* have a strong ability of biofilm formation. The results suggested that Avian pathogenic *E. coli* carrying *irp2* have some correlations with biofilm formation.

Key words: pathogenic *E. coli*; *irp2*; ERIC-PCR; biofilm

禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)是一类能引起禽类急性败血症的、慢性炎症的大肠杆菌的总称^[1-2]。随着禽养殖业的集约化, 该病已成为常见多发, 并造成巨大经济损失的重要的细菌性疾病^[3]。

Gophna 等人在禽源大肠杆菌分离株中首次发现毒力岛(HPI)^[4]。毒力岛是通过耶尔森菌素(Ybt)的铁载体夺取宿主中的铁元素, 增强细菌存活率, 进而增强其毒力。*irp2* 和 *fyuA* 基因是 HPI 核心区的

主要结构基因, 其中 *irp2* 作为铁调节基因, 仅存在于强致病株中, 与毒力密切相关。*irp2* 序列具有高度保守性, 判断和检测病原菌是否存在 HPI 的标志基因。有研究表明 HPI 基因在我国养殖场大肠杆菌分离株中普遍存在^[5]。

细菌生物膜(bacterial biofilm, BF)是细菌为了适应生存环境及外界不利条件的一种自我保护所分泌的胞外多聚物^[6]。张明等研究选用多个与生物膜形成相关的基因, 揭示了生物膜的形成是多种基因

收稿日期: 2015-06-04

基金项目: 安徽省现代农业产业体系(11008714)和安徽省地方高水平大学建设—《动物医学》专业建设项目共同资助。

作者简介: 汪 凯, 硕士研究生。E-mail: 1549073241@qq.com

* 通信作者: 潘 玲, 副教授。E-mail: lingpan08@ahau.edu.cn

协同表达调控的结果^[7]。生物膜的形成与禽致病性大肠杆菌的毒力有无相关性值得探究。

从临床病禽分离细菌进行生化反应鉴定,对符合埃希氏菌属者留存。选用 HPI 的 *irp2* 设计引物进行 PCR 检测确定其致病性,并进行了生物膜形成能力的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Taq PCR Master Mix、TBE 等购于上海生工生物工程技术有限公司;其他试剂均由安徽农业大学动物科技学院禽病诊断室提供。

1.1.2 病原菌来源 对临床病禽分离到疑似大肠杆

菌菌株经生化反应,符合埃希氏菌属者留存共 17 株。

1.2 方法

1.2.1 *irp2* PCR 检测 PCR 扩增 *irp2*, 引物设计参考相关文献[8-9],并根据 GenBank 已报道的 *irp2*、ERIC 基因、*irp3*、*irp4* 和 *irp5* 设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

PCR 反应体系为: Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下引物各 1 μ L, 模板菌液 1 μ L, 补 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 PCR 反应所用的各种引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C Anneal temperature	目的片段大小/bp The length of target fragment
<i>irp2</i>	F: AAGGATTCGCTGTACCGGAC R: AAGCTGATACAGGTGGC	55	414
ERIC	F: ATGTA AGCTCCTGGGGATTAC R: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	57	—
<i>irp3</i>	F: ATCGCCTGTATTGTCGTGC R: CGCCTCCTTATCATCATCGT	56	798
<i>irp4</i>	F: AATACTGCGCATCTGGTC R: GGGCGAGTCGTAGTGATA	58	504
<i>irp5</i>	F: GTAATTGTGCAGCTTCCC R: TGTTGCAGGGTACAGTCA	56	758

1.2.2 HPI $irp2$ 禽大肠杆菌分离株 ERIC-PCR PCR 反应体系和循环条件参考上述,退火温度和引物见表 1。对鉴定的禽致病性大肠杆菌进行 ERIC-PCR 分型分析,每组重复 3 次,计算机软件记录下扩增及电泳谱带。每个样品的扩增带存在时赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,用电泳图像分析软件(Gel Image System, Version 4.00)自动生成矩阵图。采用非加权对数算术平均法(UPGMA),利用 NTSYS-pc 2.10e 软件构建聚类树状图。

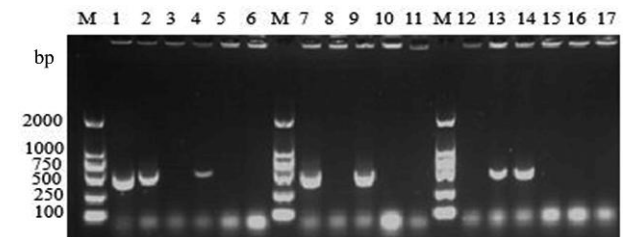
1.2.3 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* 检测 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* 反应体系和反应循环条件参考上述,退火温度和引物见表 1。

1.2.4 生物膜形成检测 对 17 株大肠杆菌参照文献[10]进行生物膜形成能力检测。判定标准: OD \leq OD_c 为不粘附(-), OD_c<OD \leq 2OD_c 为弱粘附(+), 2OD_c<OD \leq 3OD_c 为中等粘附(++), OD>3OD_c 强粘附(+++) [10]。

2 结果与分析

2.1 *irp2* PCR 的扩增结果

经 *irp2* 引物对 17 株禽大肠杆菌进行 PCR 检测。由图 1 可知,有 7 株大肠杆菌被检测有 HPI 核心区基因,表明这些禽大肠杆菌有一定致病性。



1~17 为临床分离禽源大肠杆菌菌株的 PCR 产物; M:2000 bp DNA Marker

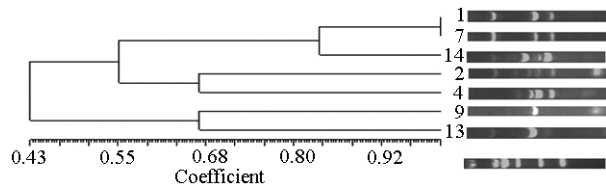
1-17.PCR products of clinical separated *E. coli* from poultry; M: 2000 bp, DNA Marker

图 1 *irp2* PCR 扩增结果

Figure 1 PCR products of *irp2*

2.2 ERIC-PCR 扩增分析

对 7 株携带 HPI *irp2* 致病性大肠杆菌进行 ERIC-PCR 扩增, 获得菌株的指纹聚类分析图谱。如图 2 所示, 1、7、14、2 和 4 号菌株遗传关系相对较近, 聚成一类, 9 和 13 号菌株则聚另一类, 说明 HPI *irp2* 可存在于多个基因型的大肠杆菌中。这 7 株致病性大肠杆菌的基因型之间均存在一定的差异性, 结果显示 7 株菌均为不同菌株。

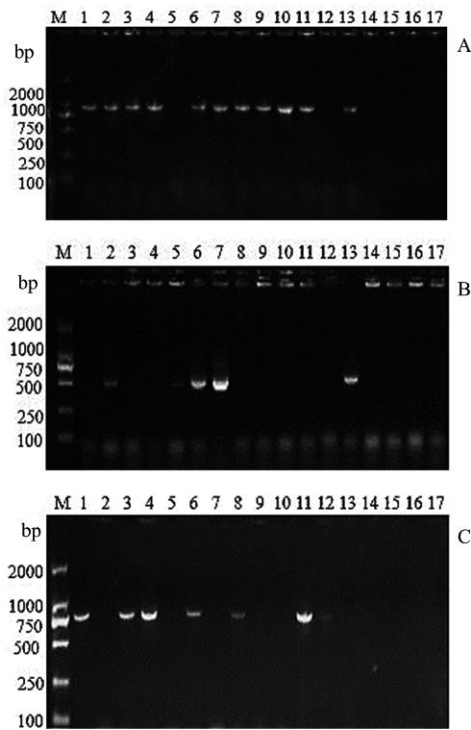


7 株为携带 HPI *irp2* 致病性大肠杆菌菌株; 刻度表示遗传距离; M: 2000 bp DNA Marker

Seven HPI-*irp2* gene clinical pathogenic *E. coli* are isolated. Scales denote genetic distances. M: 2000 DNA Marker;

图 2 7 株禽源大肠杆菌携带 HPI *irp2* 基因的 ERIC-PCR 聚类分析图谱

Figure 2 The dendrogram of seven *E.coli* of HPI-*irp2* gene isolates by ERIC-PCR



1-17.PCR product of clinical separated *E. coli*; M.2000 bp

DNA Marker; A: *irp3*; B: *irp4*; C: *irp5*

表 2 *irp2*、*irp3*、*irp4* 和 *irp5* 及生物膜形成能力的统计

Table 2 The statistics of the distribution of *irp2*, *irp3*, *irp4* and *irp5* and biofilm formation

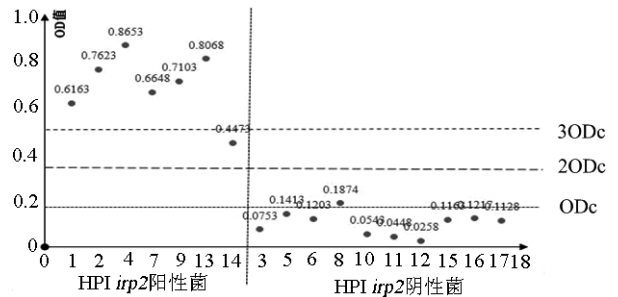
项目 Item	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>irp2</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-

图 3 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* 的 PCR 扩增结果

Figure 3 PCR products of *irp3*, *irp4* and *irp5*

2.3 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* PCR 扩增结果

对 17 分离株分别进行 *irp3*、*irp4* 和 *irp5* PCR 扩增, 见图 3。由图 3 可知 *irp3* 有 11 个菌株为阳性, 阳性率为 64.7%; *irp4* 有 5 个菌株均为阳性, 阳性率为 29.4%; *irp5* 有 6 个菌株为阳性, 阳性率为 35.3%。结果表明, 同一类型的菌株可携带不同的摄铁基因。



1~17 为临床分离菌株 PCR product of clinical separated of *E. coli*

图 4 HPI *irp2* 阳性株和阴性株的生物膜粘附性分析结果

Figure 4 Analysis results of the HPI *irp2* positive and negative bacterial biofilm

2.4 生物膜检测结果及分离株 *irp2*、*irp3*、*irp4* 和 *irp5* 和生物膜形成能力统计分析

根据 D_{600nm} 值判定标准进行数据处理, 绘制分离菌株生物膜的粘附性散点图 (图 4), 并对 17 菌株 *irp2*、*irp3*、*irp4* 和 *irp5* 检出及生物膜形成能力进行统计, 结果见表 2。

由表 2 可知, 1 株检出四重摄取铁基因, 4 株菌检出三重摄取铁基因, 5 株菌检出二重摄取铁基因, 1 株只检出 *irp2*, 其余均为阴性。由图 4 和表 3 可以看出, 1、2、4、7、9 和 13 号菌株均为强粘附性; 14 号菌株为中性粘附性 8 号菌株为弱粘附性, 其余菌株均无粘附性。而 1、2、4、7、9、13 和 14 号菌株均含 HPI *irp2*, 且粘附性很强, 这表明禽致病性大肠杆菌的 HPI *irp2* 与生物膜形成能力存在一定的关联。

<i>irp3</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>irp4</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>irp5</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
粘附性 Adhesion	+++	+++	-	+++	-	-	+++	+	+++	-	-	-	+++	++	-	-	-

注: + 表示检出, - 表示未检出; 粘附性: +++ 代表强, ++ 表示中, + 表示弱。

Note: + represents the positive, - represents the negative; Adhesion: +++ represents the high, ++ represents the medium, + represents the low.

3 讨论

ERIC 序列分散在整个基因组上并具有极强的保守性,用 ERIC-PCR 所得到的 DNA 条带特征能反映出细菌整个基因组结构的差异,能清晰地辨别包含有 ERIC 重复序列的不同细菌种和不同菌株,因此具有很强的鉴别种乃至菌株的能力^[11]。用此方法鉴定 7 株 *irp2* 阳性菌株基因型存在较大的差异,揭示了均为不同菌株,也表明 HPI 可以存在多个基因型中。

根据 PCR 扩增技术对 17 株大肠杆菌株主要摄铁基因 *irp3*、*irp3* 和 *irp5* 进行检测。从检测结果来看,说明了同一类型的菌株可携带不同的毒力岛基因;同时携带 *irp2* 大肠杆菌中 *irp3*、*irp4*、*irp4* 和 *irp5* 携带率不等,这与叶长芸等^[12]、Schubert^[13]等研究结果相似。对 17 株分离株进行生物膜测定结果与 Schubert 等报道结果在部分粘附性大肠杆菌中发现有 *irp2*,比例高达 93% 相符合^[14]。从以上结果揭示了禽致病性大肠杆菌的 HPI 中 *irp2* 与生物膜的形成有一定的关联。试验中 8 号菌株有弱粘附性,其他摄铁基因如 *irp3* 是否与生物膜形成能力有关,还有不同摄铁基因之间是否存在相互协同作用以及对生物膜形成产生不同的影响,这些均有待进一步研究。

参考文献:

- [1] EWERS C, JANSSEN T, WIELER L H. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [J]. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2003, 116(9/10): 381-395.
- [2] RUSSO T A, JOHNSON J R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC[J]. J Infect Dis, 2000, 181(5): 1753-1754.
- [3] 甘孟侯. 家禽细菌性疾病的发生与防治对策[J]. 中国兽医杂志, 1996, 22(7): 40-441.
- [4] GOPHNA U, OELSCHLAEGER T A, HACKER J, et al. Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 196(1): 57-60.
- [5] 马兴树. 禽亲致病性大肠杆菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 171; 169-174.
- [6] CHEN N, CLEMMER K M, BONOMO R A, et al. Isolation and characterization of an Autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii* [J]. Bacteriology, 2008, 190(9): 3386- 3392.
- [7] 张明. 空肠弯曲菌生物膜形成特性及相关基因的初步探析[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [8] 冀辉, 邵长胜, 涂健, 等. 禽源大肠杆菌耶尔森氏菌强毒力岛核心基因的检测及其 *irp2* 和 *int* 同源性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2022-2029.
- [9] 许丽, 祁克宗, 彭开松. 禽致病性大肠杆菌(CVCC1565) 中耶尔森菌强毒力岛核心区的检测[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 49-52.
- [10] SRDJAN S, DRAGANA V, IVANA D, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [J]. Microbiol Meth, 2000, 40: 175-179.
- [11] JURKOVIČ D, KRIŽKOVÁ L, SOJKA M, et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116: 82-87.
- [12] 叶长芸, 徐建国. 部分 ESIEC 菌株存在耶尔森氏菌 HPI 毒力岛[J]. 疾病监测, 2000, 15(2): 48-50.
- [13] SCHUBERT S, RAKIN A, KARCH H, et al. Prevalence of the "high pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to human[J]. Infect Immune, 1998, 66(2): 480-485.
- [14] NIU C, CLEMMER K M, BONOMO R A, et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(9): 3386-3392.