

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1208 – 1214; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150001

空泡形成毒素影响禽致病性大肠杆菌的生物学特性及致病性

赵益超^{1,2}, 王少辉², 杨登辉², 刘新^{1,2}, 韩先干², 田明星², 丁铲², 刘宗平^{*}, 于圣青^{2*}

¹扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

²中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要: 【目的】构建禽致病性大肠杆菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 菌株 APEC-O1 空泡形成毒素 (Vacuolating autotransporter toxin, Vat) 基因缺失株, 研究该基因对 APEC-O1 生物学特性及致病性的影响。【方法】采用 Red 同源重组的方法构建 *vat* 缺失株, 并利用低拷贝质粒 pSTV28 构建互补株, 然后比较野生株、*vat* 缺失株与互补株在生长特性、运动性、凝集沉淀能力、生物被膜、致病性等生物学特性的差异。【结果】*vat* 基因缺失不影响 APEC-O1 的生长速度及抗环境压力能力, 但缺失 *vat* 导致 APEC-O1 运动能力增强, 而使生物被膜形成能力、凝集沉淀能力、致病力、体内存活能力均显著性减弱。【结论】Vat 缺失影响 APEC-O1 运动能力、凝集沉淀能力、生物被膜形成能力及致病力, 为全面了解 Vat 的致病作用提供参考。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 空泡转运毒素, 基因缺失, 生物学特性, 致病性

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1208-07

禽致病性大肠杆菌 (APEC) 属于肠道外致病性大肠杆菌, 由其引起的鸡、火鸡及其他禽类的急、慢性传染病统称为禽大肠杆菌病, 其临床症状主要包括大肠杆菌性败血症、大肠杆菌性肉芽肿等, 该病同时可以造成多种器官病变, 包括气囊炎、滑膜炎、心包炎、全眼炎等^[1]。随着近年来我国养禽业的迅速发展, 该病已给我国养禽业造成了巨大的经济损失^[2]。

目前公认的 APEC 的毒力因子主要包括黏附素、侵袭素、抗血清存活因子、铁摄取系统、溶血素、分泌系统等^[2]。分泌系统与 APEC 致病性密切相关, 其中 V 型分泌系统 (Type V secretory system,

T5SS) 由一个蛋白组成, 属于两步式分泌系统。T5SS 分泌需要 Sec 转位酶将其转入内外膜间 (周质), 然后 T5SS 蛋白的 C 端序列在外膜上形成一个 β 折叠桶从而将 T5SS 蛋白转运到胞外, 整个过程中不消耗能量^[3]。空泡形成毒素 (Vacuolating autotransporter toxin, Vat) 属于 T5SS, 其编码 148.3 kDa 的肠杆菌丝氨酸蛋白酶, Parreira 等^[4]报道该蛋白酶具有细胞毒性作用。然而 Vat 对 APEC 运动性、凝集及生物被膜形成能力的影响尚不清楚。因此本研究通过构建 APEC-O1 Δvat 缺失株和互补株, 分析 Vat 对 APEC 生物学特性的影响, 为进一步了解 APEC Vat 的功能提供参考。

基金项目: 公益性农业 (科研) 专项 (201303044); 国家自然科学基金 (81201266, 31370045); 中央级科研院所基本科研业务费项目 (2015JB08); 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。于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; 刘宗平, Tel: +86-514-87991448, E-mail: liuzongping@yzu.edu.cn

作者简介: 赵益超 (1989-), 男, 江苏扬州人, 硕士研究生, 从事兽医微生物方面的研究。E-mail: ssyszyc@126.com

收稿日期: 2015-01-03; **修回日期:** 2015-03-02

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 菌株 APEC-O1 由本实验室 2010 年分离自安徽巢湖某养鸡场病鸡, 经鉴定为 O1 血清型, 对禽(鸡、鸭)具有致病性; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒 pKD46、pKD3、pCP20 由本实验室保存; 质粒 pSTV28 购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 2 \times PCR Mix、DNA marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 质粒小量提

取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 购自大连 TaKaRa 公司。PCR 仪、低温冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; 分光光度计购自 Bio-Rad 公司; 电泳仪及全自动凝胶成像处理系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 公布的基因组序列 (CP000468.1), 分别设计用于扩增 *vat* 基因上、下游同源臂序列的引物: *vat-up-F/vat-up-R* 和 *vat-down-F/vat-down-R*; 根据 pKD3 序列设计用于扩增抗性片段引物: *vat-pKD-F/vat-pKD-R* (表 1)。

表 1. 本研究中使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp	Usage
<i>vat-up-F</i>	TTCCCGACAGGCTCATCATT	1041	Upstream gene amplification
<i>vat-up-R</i>	GAAGCAGCTCCAGCCTACACCATAGTAAATGATTCGGAA		
<i>vat-down-F</i>	CTAAGGAGGATATTCATATGTGTAGTGTGCAGCAAAGGGA	1028	Downstream gene amplification
<i>vat-down-R</i>	GCTTCCGATAATCAGTATGAGA		
<i>vat-pKD-F</i>	TTCCGGAATCATTTACTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1014	Cmresistance cassette amplification
<i>vat-pKD-R</i>	TCCCTTTGCTGCACAGCATCACATATGAATATCCTCCTTAG		
<i>vat-out-F</i>	CGTTCAATACGTTGCGTGAAG	596	Identification of <i>vat</i> mutant
<i>vat-out-R</i>	TGATGGAAGTGAAGCGAGAGG		
<i>vat-in-F</i>	CTCTGGCACTATCTGCATTACTC	596	Identification of <i>vat</i> mutant
<i>vat-in-R</i>	ACAGCTGAATGCCGTCTGAGCCG		
C Δ <i>vat-F</i>	ACTGAATGCCATCGACTAAATCCGTTAG	4961	Complementation gene amplification
C Δ <i>vat-R</i>	TCAGGATCCCACCATAAATGTTGAAGTG		

The restriction sites are underlined.

1.3 缺失株及互补株构建

分别用引物 *vat-up-F/vat-up-R*、*vat-down-F/vat-down-R* 和 *vat-pKD-F/vat-pKD-R* 扩增 *vat* 基因的上、下游同源臂及氯霉素抗性片段, 再通过融合 PCR 扩增出含有 *vat* 基因上下游同源臂的氯霉素抗性片段。根据 Wanner 等^[5]的方法, 将氯霉素抗性片段电转化入含有 pKD46 的 APEC-O1 感受态细胞中, 利用 Red 同源重组酶构建 *vat* 基因缺失株, 挑取单克隆后通过 PCR 方法鉴定基因缺失株。

以 APEC-O1 基因组为模板, 用引物 C Δ *vat-F/C Δ vat-R* 扩增 *vat* 的互补片段, 经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后克隆至 pSTV28 载体, 构建互补质粒 pSTV28-C Δ *vat*。然后电转化至缺失株中, 构建互补株。

1.4 生长曲线及运动性测定

参考 Chatterjee 等^[6]的方法测定各菌的生长速

度。将菌液按 1:100 接种于 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养, 每小时取样并测定菌液的 OD_{600} , 记录并绘制生长曲线图。

根据 Chatterjee 等^[6]的方法测定各菌的运动性。将 10 μ L 培养至 $OD_{600} = 1$ 的菌液分别点样于 0.3% 琼脂 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 测定菌圈直径。

1.5 生物被膜形成能力测定

根据 Kim 等^[7]方法, 采用 96 孔微孔板法定量各菌株的生物被膜形成能力。将各个细菌在相同条件下培养, 然后加入 96 孔聚苯乙烯微孔板, 每孔 200 μ L, 每株菌 8 个重复, 置 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。弃去培养液, 无菌的 PBS 洗涤 3 次后加入 200 μ L 结晶紫染色 30 min。然后用 PBS 洗涤 5 次, 自然风干后加入 200 μ L 95% 乙醇, 作用 5-10 min, 测定 OD_{595} , 每次试验以无菌培养基作为阴性对照。

1.6 凝集试验

参考 Sherlock 等^[8-9]方法,测定野生株、缺失株及互补株的沉降速度及凝集能力。将新鲜菌液培养至 OD_{600} 约为 1.5,以此作为标准,涡旋 15 s 后静置于室温,每隔 30 min 从菌液上层取样 100 μ L,测定 OD_{600} ,记录读数并绘制各菌株的凝集沉降曲线。

1.7 细胞黏附及侵袭试验

将新鲜菌液用 PBS 洗涤 2 次后重悬,按 100 MOI 感染鸡成纤维细胞 DF-1,以 DMEM 作为阴性对照,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱中作用 2 h。无菌 PBS 洗涤 5 次后,用 Triton-X 100 裂解细胞并倍比稀释,涂 LB 平板,统计结果。

对于细胞侵袭试验,细菌感染 DF-1 细胞 2 h 后用无菌 PBS 洗涤 3 次,用含有卡那霉素的 DMEM 作用 1 h 杀死细胞外细菌。PBS 洗涤 3 次后用 Triton-X 100 裂解细胞并倍比稀释,涂 LB 平板,统计结果。

1.8 动物致病性测定

将细菌培养液用无菌 PBS 洗涤 3 次,重悬后以不同剂量感染樱桃谷鸭,每组 8 只,连续观察 7 d,记录发病死亡情况并采用改良寇氏法计算半数致死量 (LD_{50})。

测定不同菌株在樱桃谷鸭肺、肝、脾、血中的定殖能力,通过气管注射方式攻毒,攻毒剂量为 1×10^8 CFU/只,每组感染 8 只雏鸭。感染 24 h 后分别无菌取血、肺、肝、脾称重后加入 PBS 匀浆,倍比稀释,涂平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后进行细菌计数。

2 结果和分析

2.1 *vat* 基因缺失株、互补株的构建及鉴定

利用 Red 同源重组系统构建基因缺失株,对挑取的疑似基因缺失株单菌落用引物 *vat-out-F*/*vat-out-R* 和 *vat-in-F*/*vat-in-R* 进行鉴定,结果表明假定缺失株无法检测出 *vat* 基因,外侧鉴定引物可以扩增出替换 *vat* 基因的氯霉素抗性片段 (3364 bp)。然后利用辅助质粒 pCP20 将氯霉素抗性基因去除,PCR 结果显示氯霉素抗性基因成功去除 (2350 bp),表明 APEC-O1- Δ *vat* 构建成功 (图 1-A)。

以 APEC-O1 基因组为模板,利用互补引物克隆 *vat* 的互补片段并克隆至空载质粒 pSTV28 多克隆区域,互补质粒经双酶切及测序鉴定,表明 pSTV28-

C Δ *vat* 互补质粒构建成功且无碱基突变 (图 1-B)。将互补质粒电转化入缺失株,构建互补株。

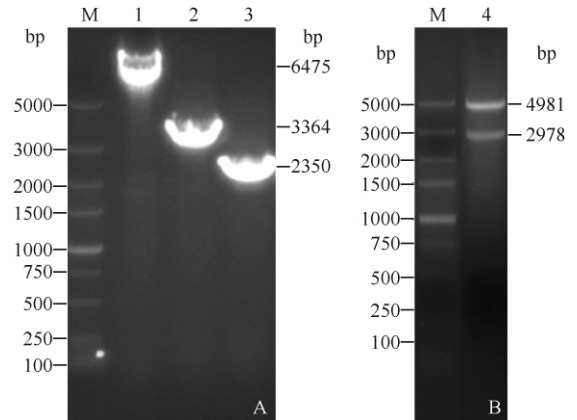


图 1. *vat* 基因缺失株及互补质粒 pSTV28-C Δ *vat* 鉴定

Figure 1. Identification of APEC-O1- Δ *vat* mutant and plasmid pSTV28-C Δ *vat*. A: Identification of APEC-O1- Δ *vat* mutant by PCR. M, DNA Marker; lane 1, wild type strain APEC-O1; lane 2, *vat* mutant strain with Cm resistance cassette; lane 3, *vat* mutant strain without Cm resistance cassette. B: Identification of plasmid pSTV28-C Δ *vat* by restriction endonuclease digestion. M, DNA Marker; lane 4: pSTV28-C Δ *vat*.

2.2 生长曲线及运动性测定

生长曲线结果显示 *vat* 基因缺失后菌株的生长速度无显著变化,表明 *vat* 基因不影响 APEC-O1 的生长速度 (图 2-A)。运动性结果显示,*vat* 缺失株在 0.3% 的琼脂 LB 平板上泳动能力显著高于野生株和互补株 ($P < 0.001$),表明 Vat 蛋白能够抑制 APEC-O1 在 0.3% 琼脂 LB 平板上的泳动 (图 2-B)。

2.3 生物被膜测定

生物被膜形成能力结果表明 *vat* 基因缺失后其生物被膜形成能力显著下降 ($P < 0.05$),互补株的生物被膜形成能力部分恢复到野生株的水平 (图 3)。

2.4 凝集能力测定

野生株、缺失株和互补株的凝集沉降速度未见明显的差别 (结果未展示)。因此,我们将互补质粒 pSTV28-C Δ *vat* 转化入 MG1655 和 AAEC189 菌株,测定 Vat 蛋白对 MG1655 和 AAEC189 凝集沉降能力的影响,结果显示 AAEC189-C Δ *vat* 和 AAEC189-pSTV28 的凝集能力没有差异,而 MG1655-C Δ *vat* 的凝集能力低于 MG1655-pSTV28 (图 4)。

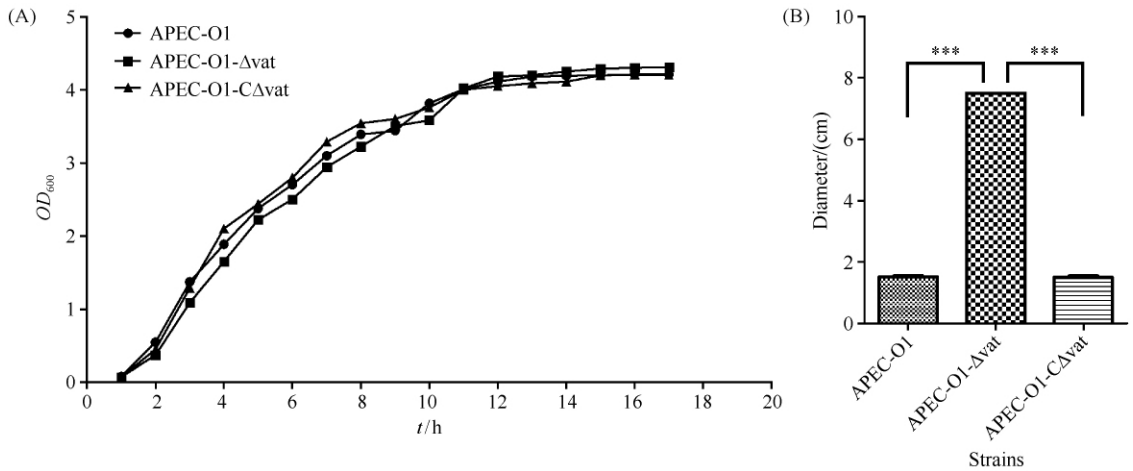


图 2. 细菌生长速度及运动能力检测

Figure 2. Bacterial growth kinetics and motility assays. A: Growth curves; B: Motilities on 0.3% LB agar.

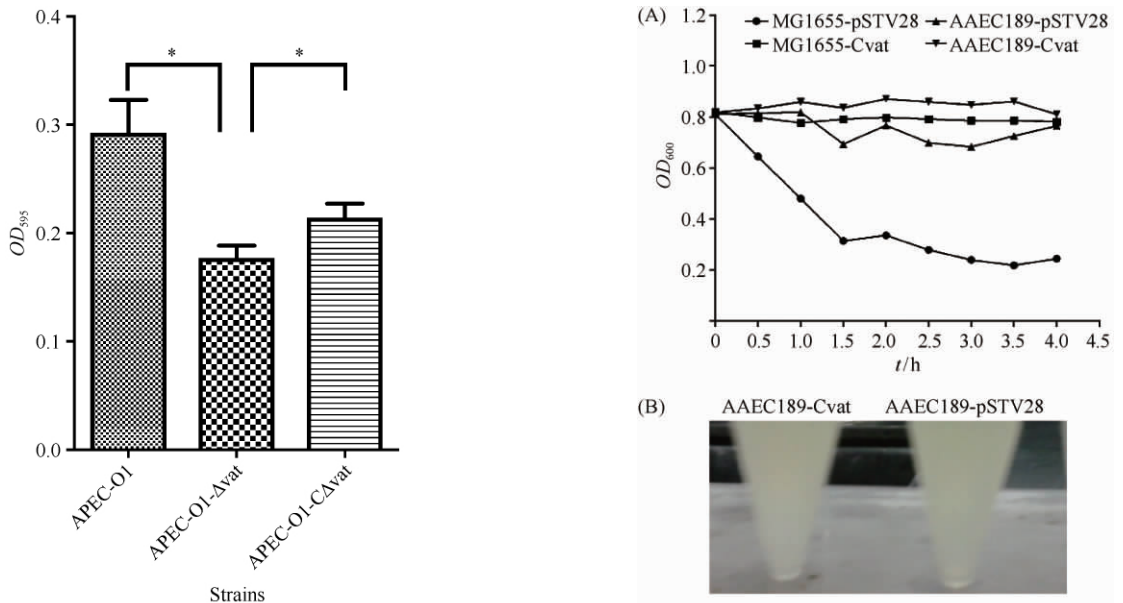


图 3. 生物被膜形成能力测定

Figure 3. Determination of the bacterial biofilm formation.

2.5 黏附侵袭能力测定

黏附侵袭试验结果显示 *vat* 基因缺失株对细胞的黏附侵袭能力略低于野生株, 但是差异不显著, 表明 *vat* 基因缺失对 APEC-O1 黏附侵袭 DF-1 细胞没有显著性影响 (结果未展示)。

2.6 半数致死量 (LD_{50}) 测定

动物感染试验结果显示 APEC-O1、APEC-O1- Δvat 、APEC-O1-C Δvat 对雏鸭的 LD_{50} 分别为 1.54×10^6 CFU、 4.22×10^6 CFU 和 3.16×10^6 CFU, 表明 *vat* 基因缺失导致 APEC-O1 对樱桃谷

图 4. 凝集实验结果

Figure 4. Aggregation assay. A: The settling profiles of liquid suspensions of APEC strains MG1655-Cvat, MG1655-pSTV28, AAEC189-Cvat and AAEC189-pSTV28; B: Settling from static liquid suspensions of each *E. coli* strain.

鸭的致病力减弱 2.7 倍, 互补株的致病力部分恢复 (表 2)。

2.7 体内感染能力测定

体内感染试验结果显示缺失株 APEC-O1- Δ vat 在肝、脾、肺中的存活能力均显著性下降 ($P < 0.05$), APEC-O1-C Δ vat 在肝、脾、肺中的载菌量均高于缺失株但差异不显著 ($P > 0.05$)。血液载菌量结果显示血液中几乎分离不到缺失株 (结果未展示)。体内感染结果表明缺失 *vat* 基因导致 APEC-O1 在雏鸭肝、脾、肺、血中的存活能力显著性下降 (图 5)。

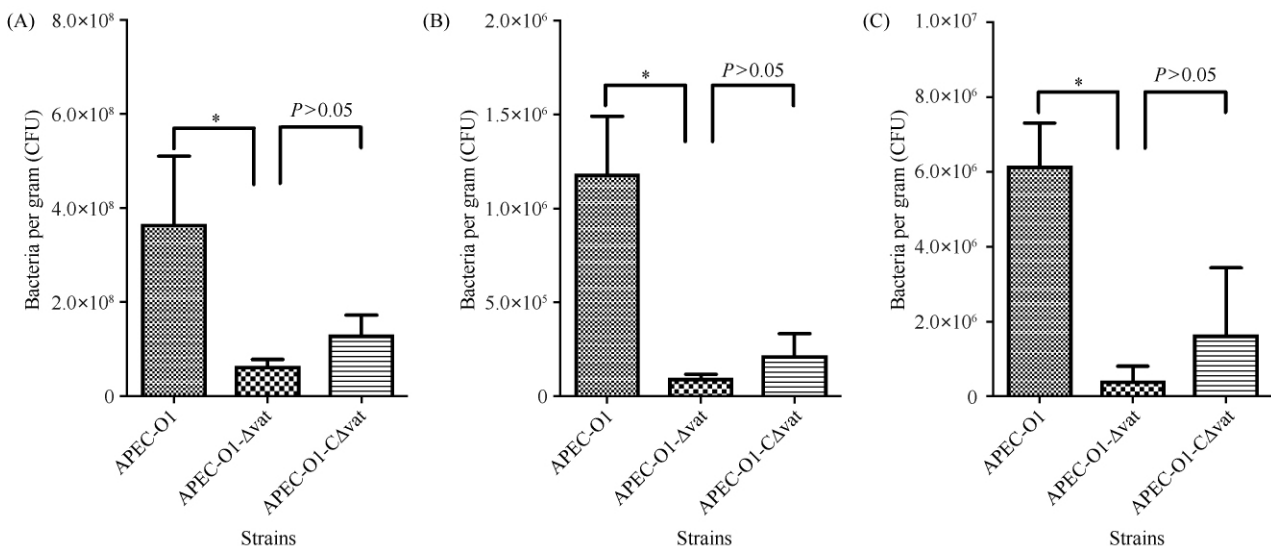


图 5. 组织载菌量测定

Figure 5. Bacterial loads in lung (A), liver (B) and spleen (C) of infected ducks at 24 h post-infection.

3 讨论

革兰氏阴性菌的 T5SS 仅由一个蛋白组成,分泌蛋白经切割加工后形成孔道使自身穿出膜外,该转运过程中不需要能量和辅助因子(蛋白)参与,又被称为自主转运蛋白系统^[3]。T5SS 在细菌间的抗性基因水平转移以及毒力因子向宿主细胞的呈递上均有重要的临床意义^[8]。Vat 最先由 Parreira 等^[4]发现并报道,其存在于毒力岛上并编码 148.3 kDa 的自主转运蛋白(T5SS)。虽然国外研究表明 Vat 是 APEC 致病性的重要组成部分并具有细胞空泡化的细胞毒性活性作用^[4]。然而 Vat 对 APEC 运动性、凝集及生物被膜形成能力等生物学特性的影响尚不清楚。因此,本研究利用 Red 同源重组系统构建 APEC-O1 的 *vat* 基因缺失株,并利用 pSTV28 低拷贝质粒构建互补株,且具有较好的遗传稳定性。通过比较 APEC-O1、APEC-O1- Δ vat 及 APEC-O1-

表 2. 不同菌株的半数致死量结果

Table 2. Calculations of LD_{50} for different strains

Dose of challenge (CFU)	No. of dead ducks		
	APEC-O1	APEC-O1- Δ vat	APEC-O1-C Δ vat
1×10^8	8/8	8/8	8/8
1×10^7	8/8	7/8	8/8
1×10^6	2/8	0/8	0/8
1×10^5	0/8	0/8	0/8
LD_{50} value	1.54×10^6	4.22×10^6	3.16×10^6

C Δ vat 的生物学特性更深入了解 Vat 对 APEC 的生物学特性及致病性的影响。

生长曲线结果表明 *vat* 基因缺失并不影响 APEC-O1 的生长速度,但可以导致细菌运动性增强。凝集试验显示 APEC-O1- Δ vat 和 APEC-O1 的凝集及沉降速度无明显差别。为了进一步检测 Vat 对大肠杆菌凝集沉淀能力的影响,构建 MG1655 及其菌毛缺失株 AAEC189 的 *vat* 基因互补株。凝集沉降结果表明 AAEC189 不具有凝集沉降能力,然而 Vat 能够抑制 MG1655 的凝集沉降,其可能因为 Vat 能够抑制细菌表面其他蛋白相互作用,在一定程度上抑制细菌之间的相互聚集。生物被膜是细菌为适应自然环境、有利于生存而形成的一种膜样物,生物被膜状态细菌对抗生素及宿主的免疫反应是不敏感的,因此有利于细菌的致病性及存活。形成生物被膜的第一步是细菌吸附于活组织或无活力的组织表面,而缺失 *vat* 后菌株的运动性增强,使细菌吸附于组织表面的能力下降,从而导致 APEC-O1 的生物被

膜形成能力显著性降低。然而 Vat 对 APEC-O1 的抗环境耐受力(酸、碱、 H_2O_2)无明显影响(结果未展示)。

细菌黏附于宿主细胞或其他机体表面对细菌的定殖、感染至关重要^[9-10]。黏附素是病原菌重要的毒力因子,其位于细菌的表面,通过结合宿主细胞表面受体避免被宿主清除到体外,且细菌具有多种不同的黏附素^[11-13]。自然感染条件下 APEC 一般先定殖于宿主的呼吸道,首先感染肺部,然后进入血液并进行扩散,从而导致组织脏器发生病变。体内感染试验结果显示 Vat 缺失致使 APEC 在肝、脾以及肺中的存活能力显著性降低。剖检实验动物发现 APEC-O1 感染的樱桃谷鸭发生严重的气囊炎、腹膜炎及心包炎,而 *vat* 基因缺失株未发现相应炎症或者仅有轻微病变。另外,缺失株感染雏鸭 24 h 后血液中大部分病原菌被清除(结果未展示),这与 Welch^[14] 推测的该基因为进入血液所存活的关键因子结果一致。体内感染实验表明 Vat 在 APEC-O1 致病过程中发挥作用,然而细胞黏附入侵结果显示 Vat 对 APEC-O1 侵袭和黏附 DF-1 细胞的能力并无显著性影响,这与 Parreira VR 在 Ec222 菌中缺失 *vat* 细胞感染结果一致^[4]。推测其原因之一是 APEC-O1 拥有许多黏附入侵相关基因,缺失 Vat 不足以使 APEC-O1 对 DF-1 黏附侵袭能力发生显著性变化。另外,*vat* 基因缺失还可能使细菌胞膜外被 Vat 蛋白抑制的其他黏附素及侵袭素的作用增强,导致细胞黏附侵袭能力变化不明显。

本文对 APEC-O1 的 *vat* 基因缺失株的生物学特性进行了分析,发现 Vat 能够抑制大肠杆菌的凝集以及运动能力,并能够促进 APEC-O1 生物被膜的形成及在体内感染定殖过程中发挥作用,为深入了解 Vat 对 APEC 的致病作用提供参考。

参考文献

[1] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 1999, 30 (2/3): 299-316.

[2] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(1): 26-38.

[3] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala-Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 (4): 692-744.

[4] Parreira VR, Gyles CL. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (9): 5087-5096.

[5] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12): 6640-6645.

[6] Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9: 34.

[7] Kim Y, Oh S, Ahn EY, Imm JY, Park S, Kim SH. Proteome analysis of virulence factor regulated by autoinducer-2-like activity in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(2): 300-307.

[8] Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297 (3): 163-176.

[9] Proft T, Baker EN. Pili in gram-negative and gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66 (4): 613-635.

[10] Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(6): 580-592.

[11] Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 2009, 1(1): 22.

[12] Antao EM, Ewers C, Gurlebeck D, Preisinger R, Homeier T, Li G, Wieler LH. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7796.

- [13] Itzhak Ofek NSaSNA. Bacterial adhesion. *Prokaryotes*, 2006, 2: 16-31.
- [14] Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz

DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(26): 17020-17024.

Vacuolating autotransporter toxin affects biological characteristics and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*

Yichao Zhao^{1,2}, Shaohui Wang², Denghui Yang², Xin Liu^{1,2}, Xianghan Han², Mingxing Tian², Chan Ding², Zongping Liu^{1*}, Shengqing Yu^{2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

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

Abstract: [Objective] To determine the role of vacuolating autotransporter toxin (*vat*) gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), we detected the biological characteristics and pathogenicity of *vat* gene mutant strain of APEC-01. [Methods] We constructed the *vat* mutant and complementary strain of APEC-01 by the Red recombination system and plasmid pSTV28. Then we compared the growth curve, motility, agglutination, biofilm formation and pathogenicity of mutant strain, wild-type strain and complementary strain. [Results] The *vat* mutant did not affect the growth and resistance to environment stress of APEC. However, inactivation of APEC-01 *vat* gene resulted in enhanced motility, diminished agglutination, decreased biofilm formation and attenuated virulence in ducks. [Conclusion] These data indicated that *Vat* affect the motility, agglutination, biofilm formation and virulence of APEC-01, which help us to understand the role of the *Vat* in the APEC pathogenicity.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*, vacuolating autotransporter toxin, gene mutant, biological characteristics, pathogenicity

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the Funds of Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303044), by the National Natural Science Foundation of China (81201266, 31370045) and by the National Basic Fund for Institutes, which is supported by Shanghai Veterinary Research Institute (2015JB08), and by the Shanghai Key Project on Agricultural Development through Science and Technology (2015HNG1-9)

* Corresponding author. Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; Zongping Liu, Tel: +86-514-87991448, E-mail: liuzongping@yzu.edu.cn

Received: 3 January 2015 / Revised: 2 March 2015