

一株能表达 987P 和 F₄₁两种粘附素的猪源性大肠杆菌的研究

高 崧 刘秀梵 张如宽

(江苏农学院畜牧兽医系 扬州 225001)

摘要 通过直接凝集试验、免疫荧光试验、SDS-PAGE 和 Western 印迹,对一株猪源性大肠杆菌的粘附素进行了研究。结果表明,该菌株是一株同时表达 987P 和 F₄₁两种粘附素抗原的猪源性大肠杆菌。

关键词 大肠杆菌,粘附素,987P,F₄₁

引起幼畜腹泻的产肠毒素性大肠埃希氏菌(ETEC)通常都能产生两类主要的致病因子,即寄主特异性的粘附素和肠毒素。因此,在诊断 ETEC 性幼畜下痢时,粘附素和肠毒素是两项主要的鉴定内容。

1991 年,在鉴定外地送检的数株来源于腹泻仔猪的大肠杆菌时,其中有一株既能与针对 987P 粘附素的单克隆抗体 EPN3 反应,也可与 F₄₁特异的单克隆抗体 L₁₀₋₅反应。为了进一步弄清这两种粘附素是来源于不同菌体,还是由同一菌体产生(即两种粘附素兼生),作者应用直接凝集试验、免疫荧光试验、SDS-PAGE 和 Western 印迹等试验对该菌株进行了研究,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:本试验共用以下 3 株大肠杆菌。待检菌株来源于腹泻仔猪,试验所用标准菌株有 C₈₃₇₀₇(O₁₀₁:F₄₁)和 C₈₃₇₁₀(O₂₀:987P),均获自中国兽药监察所。

1.1.2 单克隆抗体:本试验选用 2 株单克隆抗体:L₁₀₋₅(针对 F₄₁粘附素抗原),由杨亮等研制^[1];EPN3(针对 987P 粘附素抗原),由董国雄等研制^[2]。

1.1.3 987P 和 F₄₁粘附素抗原和抗血清:标准菌株和待检菌株 987P 和 F₄₁粘附素抗原的制备、纯化,参照文献[3,4]进行。987P 和 F₄₁粘附素抗原的高免血清的制备按 Vaitukaitis 皮内多点法进行^[5],琼脂扩散效价均在 1:32 以上,抗血清 IgG 的提纯按 Goding 等的方法^[6]。

1.1.4 试剂和培养基:HRP-羊抗兔 IgG 结合物、FITC-羊抗鼠 IgG 结合物及 HRP-羊抗鼠 IgG 结合物购自美国 Sigma 公司。SDS-PAGE 和 Western 印迹试验所用试剂除 SDS

获自 Serva 公司, DTT 获自华美公司, 标准分子量蛋白获自 Pharmacia 公司外, 其余均为国产试剂。987P 菌用 Slanetz 培养基^[7], F_{41} 菌用 Minca 培养基^[8]。

1.2 方法

1.2.1 直接凝集试验:待检菌株首先在 Slanetz 培养基上划线, 37℃ 培养 18 小时后, 单个菌落划线接种于同样培养基, 同上述条件培养后, 以倍比稀释的 EPN3、 L_{10-5} 作直接凝集试验, 同样程序可获得待检菌株在 Minca 培养基上的单个菌落, 然后以倍比稀释的 L_{10-5} 和 EPN3 作直接凝集试验。

1.2.2 免疫荧光试验:Slanetz 和 Minca 培养基上强阳性表达的菌落, 用铂耳分别钩取后悬于 0.01mol/L pH7.4 PBS 中, 使成 10^8 细胞/ml, 涂布于盖玻片上, 室温自然干燥。将获自 Slanetz 培养基上菌体和 Minca 培养基上菌体, 分别与适量 1:500 稀释的 EPN3 和 1:100 稀释的 L_{10-5} 于 37℃ 作用 2 小时后, 以上述 PBS 漂洗 15 分钟, 然后加适量工作浓度的 FITC 标记羊抗鼠 IgG 结合物, 37℃ 作用 0.5 小时, 再以上述 PBS 漂洗 15 分钟, 晾干后, 置荧光镜下观察, 同时设阳性、阴性对照。

1.2.3 SDS-PAGE 和 Western 印迹:将 Slanetz 和 Minca 培养基上强阳性表达菌落分别在各自培养基上扩大培养后, Slanetz 培养基扩大培养物按 987P 粘附素抗原的提纯方法提纯, 所得蛋白样品简称抽提物 S; Minca 培养基扩大培养物按 F_{41} 粘附素抗原的提纯方法进行提纯, 所得蛋白样品简称抽提物 M。测定蛋白含量后, 即可用作 SDS-PAGE 和 Western 印迹的样品。

SDS-PAGE 基本参照文献[9,10]进行。浓缩胶和分离胶浓度分别是 5% 和 15%, 抽提物 S 和抽提物 M (50—100 μ g/梳孔) 等体积混合于 1 \times SDS 样品缓冲液, 沸水浴煮沸 3 分钟进行降解后上样, 电泳开始后加上 60V 电压, 当染料进入分离胶时, 升高电压到 120V, 当染料前沿迁移到距离凝胶底端 3—4cm 时停止。

Western 印迹转移条件:100V, 2 小时。

转移结束后, 将硝酸纤维素膜切下, 并把抽提物 S 和抽提物 M 电泳后所转移成的膜分别作记号。然后, 将膜置封闭液中 4℃ 过夜。封闭液为含 5% 脱脂乳、0.02% 叠氮钠的 0.01mol/L pH 7.4 PBS。为识别转移到硝酸纤维素膜上的靶蛋白, 可以采用单克隆抗体和常规血清作第一抗体, 即探针。因此, 将封闭结束的硝酸纤维素膜(抽提物 S 和抽提物 M, 经 SDS-PAGE 电泳后转移成的膜各一片)直接移入下列探针溶液:

①以封闭液稀释提纯兔抗 987P IgG 和提纯兔抗 F_{41} IgG 至终浓度为 25 μ g/ml 混合液。

②以封闭液稀释提纯兔抗 987P IgG 至 25 μ g/ml。

③组成同①, 但其终浓度为 1 μ g/ml。

④以封闭液将腹水单抗 L_{10-5} 作 1:100 稀释。

⑤以封闭液将腹水单抗 EPN3 作 1:100 稀释。

硝酸纤维素膜在上述溶液中, 室温(18—21℃)作用 10 小时后, 膜以 PBS 洗 10 分钟 \times 3 次后, 再以含 150mmol/L NaCl、0.05 mol/L Tris·Cl(pH7.5)洗 10 分钟。膜即可与酶标记第二抗体作用。其中, 与第①、②、③组探针作用的膜, 置工作浓度的 HRP-羊抗兔 IgG 结合物中室温作用 0.5 小时(①、②、③组探针是兔抗血清 IgG), 而与④、⑤组探针作

用的膜,则置工作浓度的 HRP-羊抗鼠 IgG 结合物中室温培养同样时间(④、⑤组探针是鼠源单克隆抗体)。作用结束,以上述 Tris · Cl 缓冲液荡洗 10 分钟×6 次,即可显色。

显色:将 6 mg DAB 溶于 9ml 0.01 mol/L Tris · Cl (pH 7.6),滤去沉淀,滤液加 10 μ l 30% H₂O₂,膜移入此底物溶液,置 37℃,避光作用,待膜上有明显带形成,立即以蒸馏水漂洗,终止反应。

2 结果

2.1 直接凝集试验

待检样品在 Slanetz 培养基上的单一菌落可与 EPN3 及 L₁₀₋₅ 发生强凝集,其直接凝集价分别为 1:2¹⁰ 和 1:2⁸,待检样品在 Minca 培养基上的单一菌落与 L₁₀₋₅ 及 EPN3 发生强凝集,其直接凝集价分别为 1:2⁸ 和 1:2¹⁰。两种单抗在任一情形下的凝集价相当于其与柔毛化标准菌株 C₈₃₇₁₀ 和 C₈₃₇₀₇ 作直接凝集反应的凝集价。

2.2 免疫荧光试验

来自 Slanetz 和 Minca 培养基上凝集试验呈强阳性的单一菌落的菌体,第一抗体无论是 EPN3,还是 L₁₀₋₅,均显示出较强的特异性荧光。其荧光强度不亚于柔毛化 C₈₃₇₁₀ 与 EPN3 和柔毛化 C₈₃₇₀₇ 与 L₁₀₋₅ 作用组,而 C₈₃₇₁₀ 与 L₁₀₋₅、C₈₃₇₀₇ 与 EPN3 作用组在显微镜下则无荧光出现。

2.3 SDS-PAGE

电泳结束后,凝胶经考马斯亮蓝染色,并用脱色液脱去底色后观察。图 1 结果表明,抽提物 M,出现两条明显蛋白带,其分子量分别近似于 30kD 和 20kD,且与标准菌株的粘附素抗原所在位置基本一致。抽提物 S,出现了一条分子量约为 20kD 的蛋白带,而在分子量大约为 30kD 处,只出现了一条较微弱的带。

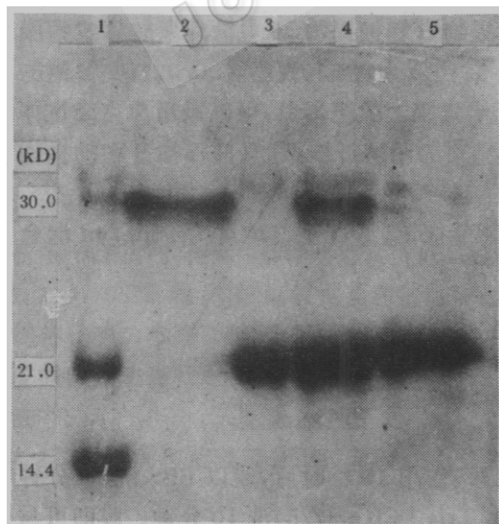


图 1 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 Results of SDS-PAGE

1. 标准分子量蛋白,左侧为其近似分子量;
 2. 自 C₈₃₇₀₇ 提纯的 F₄₁ 抗原蛋白;
 3. 自 C₈₃₇₁₀ 提纯的 987P 抗原蛋白;
 4. 抽提物 M, 出现两条带;
 5. 抽提物 S, 一条明显带, 一条较弱的带。
1. Marker proteins, the apparent molecular weights of which are indicated on the left;
 2. Purified F₄₁ antigen from reference strain C₈₃₇₀₇;
 3. Purified 987P antigen from reference strain C₈₃₇₁₀;
 4. Extract M, purified fimbrial antigens from *E. coli*, which were isolated from the piglet with diarrhea, grown on Minca medium;
 5. Extract S, purified fimbrial antigens from *E. coli*, which were isolated from the piglet with diarrhea, grown on Slanetz medium.

2.4 Western 印迹

Western 印迹结果(图 2)表明,除 1、5 道各出现两条带外,其余各道均出现一条带。

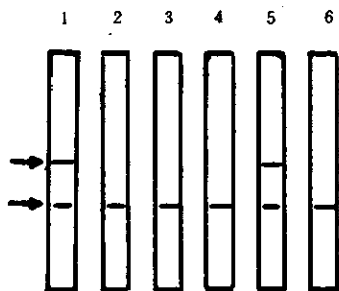


图 2 抽提物 M 和抽提物 S 在 Western 印迹中与提纯兔抗血清 IgG 的反应

Fig. 2 extract M and extract S reacted with the purified rabbit anti-fimbriae Serum IgG in Western blots

1. 抽提物 M 与各 25 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 和提纯兔抗 F₄₁ IgG 的反应;
 2. 抽提物 S 与各 25 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 和提纯兔抗 F₄₁ IgG 的反应;
 3. 抽提物 M 与 25 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 的反应;
 4. 抽提物 S 与 25 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 的反应;
 5. 抽提物 M 与各 1 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 和提纯兔抗 F₄₁ IgG 的反应;
 6. 抽提物 S 与各 1 μ g/ml 的提纯兔抗 987P IgG 和提纯兔抗 F₄₁ IgG 的反应。
1. Extract M, reacted with the mixed probes which contained the purified rabbit anti-987P serum IgG and the purified rabbit anti-F₄₁ serum IgG, 25 μ g/ml respectively;
 2. Extract S, reacted with the same probes used in lane 1;
 3. Extract M, reacted with the probe which contained 25 μ g/ml purified rabbit anti-987P serum IgG;
 4. Extract S, reacted with the same probe used in lane 3;
 5. Extract M, reacted with the mixed probes which contained the purified rabbit anti-987P serum IgG and the purified rabbit anti-F₄₁ serum IgG, 1 μ g/ml respectively;
 6. Extract S, reacted with the same probes used in lane 5.

3 讨论

在猪源 ETEC 中,同一菌株表达 F₄₁和 K₉₉,K₉₉和 987P,K₈₈和 K₉₉,或 K₈₈和 987P 都有报道^[11],但 F₄₁和 987P 同时出现在一菌株中,尚未见报道。因此,这一菌株的首次发现,对进一步研究编码这两种粘附素的染色体和质粒间的关系,尤其是这两种粘附素的编码基因的表达与调控,将会起推动作用。

标准 ETEC 菌株如 C₈₃₇₀₇和 C₈₃₇₁₀,既使在最有利于其柔毛化的 Minca 和 Slanetz 培养基上,也常因相变而导致非柔毛化菌体的产生。而作者所分离到的 F₄₁987P⁺菌株,无论在 Slanetz 培养基,还是在 Minca 培养基上,两种粘附素的表达均显示出极其明显的正相关,即一种粘附素强阳性表达,则同一菌落的另一种粘附素也呈强阳性。这表明,两种粘附素在该菌株中的表达具协同作用,而与董国雄等报道的 FC 株(O₁₀₁:K₉₉:F₄₁)可能存在着 F₄₁的优势表达的情形有所不同^[12]。

抽提物 S 在 SDS-PAGE 及 Western 印迹中,只出现了 987P 单体所形成的带,而 F_{41} 单体则未形成带(Western 印迹)或形成的带很弱(SDS-PAGE)。而直接凝集试验及免疫荧光试验结果表明:两种粘附素在 Slanetz 培养基上的表达水平,均与 Minca 培养基上的相当,比较抽提物 S 和抽提物 M,不同之处是前者采用了 987P 粘附素抗原的提取方法,而后者采用了 F_{41} 粘附素的提纯方法。因此,二者在上述试验结果中的差异,很可能是由于 987P 粘附素提纯过程中 F_{41} 粘附素的大量丢失所致。

Western 印迹反应中,1、2、3、4 道染色条带清晰,5、6 道条带不如 1、2 道清晰,显然与探针的浓度有关。分子量较大的一条带(1、5 道可见,上方箭头所指)经计算对应于 SDS-PAGE 凝胶中分子量为 30kD 的蛋白带;而分子量较小的一条带(1—6 道均可见,下方箭头所指)则对应于后者分子量为 20kD 的蛋白带,且它们能为相应的探针所识别。因此,这两种分子量的染色带显然分别是由 F_{41} 和 987P 抗原的蛋白单体形成。从 1、5 道的反应结果可知,抽提物 M,含有 F_{41} 和 987P 两种抗原成分,而抽提物 M 是待检菌株的单个菌落在 Minca 培养基上扩大培养后,按 F_{41} 粘附素的提纯方法提取的。因此,进一步证实了待检菌株是一株同时表达 987P 和 F_{41} 两种粘附素的猪源性大肠杆菌。

单克隆抗体 EPN3、 L_{10-5} 作探针,在 Western 印迹中,间接法或直接法染色,均不能与相应的 987P 和 F_{41} 单体亚单位反应。Schifferli 把抗 987P 的单克隆抗体划分为针对完整菌毛上 4 级结构的抗原决定簇和经盐酸胍离解的 987P 菌毛单体亚单位上的抗原决定簇等两类,依据之一就是它们作探针在 Western 印迹中反应性的差别^[13]。由此,作者认为 EPN3 属两类单克隆抗体中的前者。而 Van Zijderveld 作 Western 印迹试验时,用其所研制的抗 F_{41} 单克隆抗体作探针,也不能与 F_{41} 抗原单体发生反应。因此,他们认为其所研制的单克隆抗体只能与具有完整的三级结构的柔毛结合,并得到验证^[14]。作者所选用的单克隆抗体 L_{10-5} 可能也属此类。由于未得到可作探针的单克隆抗体,改用常规血清作探针,为尽量限制其非特异性反应,用作探针的抗血清作了提纯,并确定了 IgG 的工作浓度为 25 μ g/ml 左右。

据文献[15]报道,迄今为止具有 F_{41} 的 ETEC 仅与 9 和 101 两个 O 抗原型相关。因暂缺这两种 O 因子血清,故 O 抗原的鉴定有待今后完成。

参 考 文 献

- [1] 杨亮,刘秀梵.微生物学报,1990,30(4):305—311.
- [2] 董国雄,秦爱建,江美娟.微生物学报,1990,30(1):41—47.
- [3] Douglas D C, Eisenstein B I. *Infect Immun*, 1982, 36(2):764—773.
- [4] de Graff F K, Klerm P, Gastra W. *Infect Immun*, 1980, 33(3):877—883.
- [5] Vaitukaitis J L. *Methods in Enzymology*. London, Academic Press Inc London Ltd. 1981. 46—52.
- [6] Goding J W. *Monoclonal Antibodies*. London, Academic Press Inc London Ltd. 1983. 114—115.
- [7] de Leeuw P W, Guinee P A M. *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhea*. London: Martinus Nijhoff Publishers. 1980. 174.
- [8] de Graff F K, Roords I. *Infect Immun*, 1982, 36:751—758.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. In: Nancy F et al ed. *A laboratory Manual*, Book 3, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 1847—1875.
- [10] 冯万祥,赵伯龙.生化技术,长沙:湖南科学技术出版社. 1989. 278—281.

- [11] Fairbrother J M, Lariviere S, Johnson W M. *Am J Vet Res*, 1988, **49**(8):1325-1328.
- [12] 董国雄, 张英, 江美娟. 江苏农学院学报, 1986, **7**(3):1-6.
- [13] Schifferli D M, Abraham S N, Beachey E H. *Infect Immun*, 1987, **55**:923-930.
- [14] Van Zijderveld F G, Westenbrink F, Anakotta J *et al.* *Infect Immun*, 1989, **57**:1192-1199.
- [15] Gaastra W, de Graff F K. *Microbiol Rev*, 1982, **46**(2):129-161.

BOTH 987P AND F₄₁ FIMBRIAE PRODUCED BY THE SAME ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI STRAIN ISOLATED FROM A PIGLET WITH DIARRHEA

Gao Song Liu Xiufan Zhang Rukuan

(Department of Veterinary Science, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225001)

Abstract An enterotoxigenic *Escherichia coli* strain isolated from a piglet with diarrhea was examined for the presence of fimbriae 987P and F₄₁ by a direct agglutination (with MAbs), an indirect immunofluorescence technique (MAbs as first antibodies), SDS-PAGE and Western blots (antisera IgG as probes). Results of these techniques revealed that both 987P and F₄₁ fimbrial adhesins were produced by the same strain, not by separate ones.

Key words *Escherichia coli*, Adhesin, 987P, F₄₁