

## 致肾盂肾炎大肠杆菌粘附基因群的克隆 及其抗血清的制备

陈锦英 占丽钦\*\* 苏琦华 任中原

(天津医学院微生物学教研室 天津 300070)

**摘 要** 以柯斯质粒 pHC79 为载体构建致肾盂肾炎大肠杆菌代表株 *E. coli* J96 染色体基因文库, 获得两个能够表达粘附特性的重组柯斯质粒。进一步用鸟枪法亚克隆到载体 pACYC184, 得到三个阳性重组体。其中 pCT10/*E. coli* K-12 p678-54 能够稳定表达 P 菌毛和 MRHA, 分子量为 14.6kb。用该克隆子免疫新西兰白兔, 抗血清用带有载体质粒的受体菌 (pACYC184/*E. coli* K-12 P678-54) 吸收后, 经菌毛粗提物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blotting 和血凝抑制试验检测, 其特异性仅针对致肾盂肾炎大肠杆菌的粘附基因群, 可用于临床菌株的鉴定。

**关键词** 致肾盂肾炎大肠杆菌, 粘附, 克隆, 抗血清

尿路感染是常见病, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是主要的致病菌, 引起上行性尿路感染 (肾盂肾炎) 的大肠杆菌称为致肾盂肾炎大肠杆菌 (uropathogenic *E. coli*, UPEC)。该菌具有 P 菌毛, 特异性地粘附于肾盂部位是致病的基础。编码粘附素 (adhesin) 的基因群位于 UPEC 的染色体上, 其表型可用电镜和对甘露糖具抗性的 P 血型红细胞的血凝试验 (MRHA) 检测, 这是 UPEC 区别于其他大肠杆菌的重要特性<sup>[1]</sup>。目前, 国外对 UPEC 研究得较深入, 国内尚处于空白。本文目的是将 UPEC 染色体上的粘附基因群克隆, 筛选理想的克隆子制备抗血清, 经带有载体质粒的受体菌吸收后获得对粘附基因群特异性的抗血清, 用于临床菌株鉴定和研究工作。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株和培养基

*E. coli* J96 (04:K6:H5) 为 UPEC 代表株, *E. coli* K-12 P678-54 (nonpilated minicell-producing *E. coli* K-12 derivative) 由 Hull, R A. 教授赠送。*E. coli* RR1 (pHC79), pACYC184/*E. coli* K-12 C600 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供。

大肠杆菌培养用 LB 液体和固体培养基。对不同质粒选择所用培养基含抗生素浓度如下: 氨苄青霉素 50μg/ml, 四环素 20μg/ml, 氯霉素 30μg/ml。

#### 1.2 试剂和工具酶

• 国家自然科学基金资助项目。

\*\* 福建医学院基因工程研究室。

本文于 1994 年 1 月 3 日收到。

限制性内切酶 *Sau* 3A、牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 和包装蛋白为 CIBCO BRL 产品。*Eco*RI、*Bam*HI、T4 DNA 连接酶和蛋白酶 K 为华美生物工程公司产品。HRP-SpA 为中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所产品。4-氯-1-萘酚为 Sigma 公司产品。

### 1.3 重组 DNA 方法<sup>[2]</sup>

1.3.1 柯斯质粒载体 pHC79 的制备: pHC79 DNA 经限制性内切酶 *Bam*HI 消化后, 用 CIP 处理脱去 5' 端磷酸以防自身环化。

1.3.2 制备大分子量染色体 DNA: 离心收集 100ml 大肠杆菌过夜培养物中的菌体, 悬浮于 19ml TE 溶液 (10mmol/L Tris, 0.1mol/L EDTA, pH 8.0), 加 4mg 溶菌酶, 置 37℃ 水浴 30 分钟。加 10% SDS 1 ml 和 RNase 500 $\mu$ g, 经 37℃ 水浴 1—2 小时。加蛋白酶 K (终浓度 100 $\mu$ g/ml) 混匀后置 50℃ 水浴保温 3 小时。继而用饱和酚、酚/氯仿/异戊醇和氯仿抽提后加 0.2 体积 10mol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$  和两倍体积乙醇沉淀。用玻棒缠绕 DNA, 溶于适量的 TE 中。

1.3.3 连接与包装: 染色体 DNA 经限制性内切酶 *Sau* 3A 部分酶切后, 取 30—50 kb 范围的 DNA 片段与 CIP 处理的载体 pHC79 连接。连接反应中 DNA 浓度为 4 $\mu$ g/20 $\mu$ l, 加入 T4 DNA 连接酶 6u, 10—12℃ 作用 16—20 小时。包装反应按包装蛋白产品说明书进行。包装 DNA 量为 0.6 $\mu$ g, 室温作用 2 小时后加入 0.5ml SM 液及 20 $\mu$ l 氯仿, 4℃ 保存。然后用包装好的噬菌体颗粒感染 *E. coli* K-12 P678-54。

1.3.4 大量质粒 DNA 的提取和纯化: 用碱变性法<sup>[2]</sup>。克隆子 DNA 的提取用 Kado 法<sup>[3]</sup>。转化试验按文献 [2] 进行。

### 1.4 电泳和血凝试验

电泳检测按文献 [4] 方法, 用 1% 磷钨酸 (pH 6.8) 负染。

血凝试验见前文<sup>[5]</sup>。取 P 血型阳性红细胞经洗涤后, 用 1% 甘露糖-0.05mol/L PBS (pH 7.4) 配成 3% 红细胞悬液。待检菌株接种 LB 平板, 37℃ 过夜培养, 刮取菌苔, 用 0.05mol/L PBS (pH 7.4) 配制菌悬液 ( $10^9$  cfu/ml)。将菌悬液与红细胞悬液等量混合, 立即观察并置 4℃ 过夜观察。以出现  $\geq$  “+” 凝集者为 MRHA 阳性。每次试验以 *E. coli* J96 为阳性对照, *E. coli* K-12 P678-54 为阴性对照。

血凝抑制试验: 待检菌株制备菌悬液 ( $10^9$  cfu/ml), 连续倍比稀释后先加入 1:100 稀释的抗血清, 37℃ 作用 30 分钟。再加入 1% 甘露糖-0.05mol/L PBS-3% 红细胞悬液, 置室温 1 小时后观察, 并置 4℃ 过夜观察。

### 1.5 抗血清的制备

1.5.1 免疫程序: 将带有 UPEC 粘附基因群的克隆子接种 LB 平板, 37℃ 过夜培养, 用 0.05mol/L PBS (pH 7.4) -0.5% 甲醛制备菌悬液, 置 4℃ 48 小时后做无菌试验, 无菌试验阴性时方可使用。选体重为 2 kg 新西兰白兔 (中国药品生物制品检定所实验动物繁殖场提供), 第一次耳静脉注射  $10^7$  cfu/ml 菌液 0.1ml, 此后每隔 3 天静脉注射一次, 第 2—6 次为  $10^8$  cfu/ml 菌悬液 0.2ml, 第 7 次静脉注射  $10^9$  cfu/ml 菌悬液 1ml。再经两周后取血, 用试管凝集法测抗体效价。

1.5.2 抗血清的吸收: 抗血清经 56℃ 30 分钟灭活补体。用 pACYC 184/*E. coli* K-12 P678-54 (本实验构建) 作为抗血清吸收菌。死菌吸收法将吸收菌接种 LB 平板, 刮取菌

苔悬入 0.15mol/L PBS (pH 7.2), 100℃ 加热 1 小时。经 0.15mol/L PBS (pH 7.2) 洗涤三次后, 称其湿重, 按 1 ml 抗血清加入约 0.5g 湿重菌体, 37℃ 作用 4 小时, 置冰箱过夜, 经离心后取上清。活菌吸收法同上, 仅省略菌体加热处理的步骤。

### 1.6 菌毛蛋白的提取

菌毛蛋白的提取参照 Korhonen 等报道的方法<sup>[6]</sup>。待检菌株接种 LB 平板, 37℃ 过夜培养, 刮取菌苔经洗涤后用 10 mmol/L Tris (pH 7.5) 制备 10% (W/V) 菌悬液。置冰浴中经微型多用超速分散器 (上海瑞丽分离仪器厂产品) 间断处理, 共 5 分钟, 达到机械剪切菌毛的作用。离心后取上清, 加 50% 饱和度的硫酸铵沉淀菌毛蛋白, 室温放置 48 小时后离心, 沉淀悬于 10mmol/L Tris (pH 7.5) 中。透析脱盐后用聚乙二醇浓缩, 加入去氧胆酸钠 (终浓度为 5mg/ml), 置 4℃ 48 小时。再离心取上清即为菌毛蛋白粗提物。

### 1.7 SDS-PAGE 和 Western blotting

按文献 [7] 进行。

## 2 结果

### 2.1 UPEC 粘附基因群的克隆



图 1 阳性重组体质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the plasmid DNA from the positive recombinants

1. pCT40; 2. pHC79; 3. R6K (39kb);
4. RP4 (54kb); 5. *E. coli* K-12 P678-54;
6. pCT10; 7. pACYC184; 8. pCT8.

首先以高容量的柯斯质粒 pHC79 为载体构建 UPEC 的基因文库。*E. coli* J96 染色体 DNA 经 Sau 3A 部分酶切获得 30—50 kb 范围的 DNA 片段, 使用酶量以 0.009—0.018u/μg DNA 为佳。在此基础上进行大量部分酶切, 经苯酚/氯仿和氯仿抽提后乙醇沉淀。继而, 将分离到的 30—50kb 染色体片段与经 CIP 处理的 pHC79 连接重组, 通过体外包装后感染 *E. coli* K-12 P678-54, 共获得  $4.17 \times 10^3$  个重组菌落/每微克连接的柯斯质粒-染色体 DNA。其中有两个重组菌落表现 MRHA<sup>+</sup>, 电镜检查有菌毛形成, 定名为 pCT8 和 pCT40, 根据电泳图确定其分子量分别为 47.5kb 和 41.3kb (图 1)。

已知编码粘附基因群的 DNA 序列上没有 EcoRI 的识别位点, 故用鸟枪法进行亚克隆。用碱变性法抽提和纯化两个重组柯斯质粒 DNA, 用 EcoRI 消化, 克隆到载体 pACYC184 上, 转化到 *E. coli* K-12 P678-54。在含有四环素的 LB 平板上得到转化菌

落 153 个, 同样用检测血凝的方法进行筛选。亚克隆后获得 3 个转化菌落表现为



图 2 P 菌毛的电镜图

Fig. 2 Electron micrographs of P pili

1. *pACYC184/E. coli* K-12 P678-54 (×20000);  
2. *pCT10/E. coli* K-12 P678-54 (×20000).

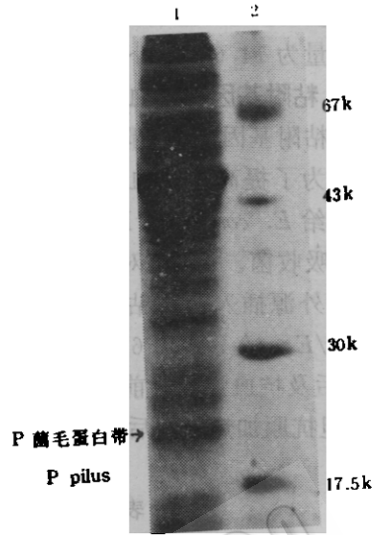


图 3 P 菌毛粗提物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12%胶)

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of P pilus crude extract (12% gel)

1. *pCT10/E. coli* K-12 P678-54;  
2. Molecular weight marker.

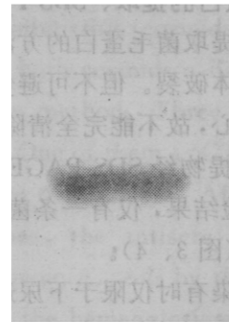


图 4 *pCT10/E. coli* K-12 P678-54 P 菌毛粗提物的 Western blotting

Fig. 4 Western blotting of P pilus crude extract from *pCT10/E. coli* K-12 P678-54

MRHA', 其中之一经连续传代 MRHA 仍为“卅”, 其血凝强度超过亲代菌株 *E. coli* J96, 电镜检查有菌毛形成 (图 2), 定名为 pCT10。用 Kado 方法提取重组质粒 pCT10 DNA, 测定其分子量为 14.6kb, 外源插入片段为 10.7kb (图 1)。

2.2 UPEC 粘附基因群抗血清的制备

用带有粘附基因群的克隆子 pCT10/*E. coli* K-12 P678-54 免疫动物, 测抗体效价为 1:10240。为了提高该抗血清的特异性, 我们提取 pACYC184/*E. coli* K-12 C600 的 DNA, 转化给 *E. coli* K-12 P678-54, 构建了 pACYC 184/*E. coli* K-12 P678-54 菌株作为抗血清的吸收菌。用该菌对上述抗血清进行三次吸收, 即死菌-活菌-活菌吸收, 使抗血清仅保留对外源插入片段粘附基因群的特异性。然后采用试管凝集法对 *E. coli* J96、pACYC 184/*E. coli* K-12 P678-54 和 pCT10/*E. coli* K-12 P678-54 进行加热处理 (100℃ 1 小时) 前后及抗血清吸收前后的效价比较, 结果见表 1。抗血清经吸收后的效价仍为 1:10240, 但抗原加热处理后效价明显降低, 表明菌毛抗原本身不耐热。

表 1 粘附基因群抗血清效价测定结果

Table 1 Titers of antisera against the adherence gene cluster

菌 株 Strain	抗血清吸收前效价 Titers before absorption		抗血清吸收后效价 Titers after absorption	
	加热处理 Heated treatment	未加热处理 Unheated treatment	加热处理 Heated treatment	未加热处理 Unheated treatment
pACYC 184/ <i>E. coli</i> K-12 P678-54	1:80	1:80	<1:20	<1:20
<i>E. coli</i> J96	1:320	1:5120	1:80	1:2560
pCT10/ <i>E. coli</i> K-12 P678-54	1:2560	1:10240	1:2560	1:10240

另外, 我们制备的抗血清经 1:100 稀释后仍可抑制 *E. coli* J96 的血凝作用。

2.3 菌毛蛋白的提取、SDS-PAGE 和 Western blotting

在使用提取菌毛蛋白的方法中菌体经微型超速多用分散器处理 5 分钟, 显微镜下观察未出现菌体破裂。但不可避免地出现外膜蛋白的污染, 经去氧胆酸钠处理后, 没有用密度梯度离心, 故不能完全清除样品中的外膜蛋白成分。pCT10/*E. coli* K-12 P678-54 的菌毛蛋白粗提物经 SDS-PAGE 法分析尚可见到高分子量的外膜蛋白带, 结合 Western blotting 试验结果, 仅有一条菌毛蛋白带显色, 从而确定了菌毛蛋白带的位置, 其分子量为 19.6kD (图 3、4)。

尿路感染有时仅限于下尿道, 导致膀胱炎和尿道炎, 也可累及肾盂, 导致肾盂肾炎。两者在治疗和预后上都有明显区别。肾盂肾炎的病人常常由于治疗不当, 晚期影响肾功能, 危及病人生命。因此, 建立 UPEC 的鉴定方法具有重要意义。

Lindberg 等研究证明编码 P 菌毛的粘附基因群位于 UPEC 的染色体上, 由 11 个功能各异的基因组成。而且, 发现菌毛不能表达时, 细菌仍保留 MRHA 活性; 反之, 菌毛虽存在, 但不一定表达 MRHA 活性<sup>[8]</sup>。基于这种理论, 我们采用分子遗传学和免疫学相结合的手段, 建立 UPEC 粘附基因群的抗血清, 试图用于临床 UPEC 菌株的鉴定和研究工作。这种制备抗血清的方法在国内外尚属首次。

本文结果表明所制备的抗血清具备如下特点: (1) 效价高。克隆株为多拷贝, 高效表达。(2) 特异性强。(3) 抗血清可以抑制 UPEC 的血凝活性, 这是单克隆抗体不能达到的结果。

## 参 考 文 献

- [1] Harber M J. *Eur J Clin Microbiol*, 1985, 4 (3): 257—261.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. U S A : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 33; 1. 82; 3. 27.
- [3] Kado C I, Liu S T. *J Bacteriol*, 1981, 145 (3): 1365—1373.
- [4] Levine M M, Ristaino P, Sack R B *et al.* *Infect Immun*, 1983, 39 (2): 889—897.
- [5] 苏琦华, 陈锦英, 何建民, 等. 天津医药, 1993, 21 (2): 67—70.
- [6] Korhonen T K, Nurmiaho E L, Ranta H *et al.* *Infect Immun*, 1980, 27 (2): 569—575.
- [7] 陈锦英, 刘秉阳, 包幼迪. 微生物学报, 1991, 31 (1): 60—66.
- [8] Lindberg F, Lund B, Johansson L *et al.* *Nature*, 1987, 328 (6125): 84—87.

# MOLECULAR CLONING OF THE ADHERENCE GENE CLUSTER FROM UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* AND PREPARATION OF ITS ANTISERA\*

Chen Jinying Zhan Liqin\*\* Su Qihua Ren Zhongyuan

(Department of Microbiology, Tianjin Medical College, Tianjin 300070)

**Abstract** A genomic library of the uropathogenic *E. coli* J96 was constructed by using cosmid pHC79 as cloning vector. Two positive recombination cosmids which could express the adherence characters were acquired. From both cosmids a EcoRI fragment was subcloned into the vector pACYC184 by shot-gun method. Three colonies were found which exhibited MRHA and production of P Pili. One of them, pCT10/*E. coli* K-12 P678-54, was about 14.6 kb and was used to prepare the antisera. After absorption with pACYC184/*E. coli* K-12 P678-54 for three times, the antisera were revealed specific against the adherence gene cluster of uropathogenic *E. coli* by the SDS-PAGE and Western blotting of the P pilus crude extracts and the hemagglutination inhibition test.

**Key words** Uropathogenic *E. coli*, Adherence, Cloning, Antisera

\* This project supported by National Natural Science Foundation of China.

\*\* Lab. of Genetic Engineering, Fujian Medical College, Fuzhou 350004.