

禽源性大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 分离株 外膜蛋白型的研究*

高 崧 刘秀梵 张如宽

(扬州大学农学院动物医学系 扬州 225009)

摘 要 对江苏省 25 个禽源性大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 分离株的外膜蛋白型进行了测定。用改良的 N-十二烷基肌氨酸法提取其外膜蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后,用考马斯亮蓝法进行染色。结果,8 个 O₁ 分离株,9 个 O₂ 分离株分属 2 个 OMP 型,其中的 1 个为二者所共有;而 8 个 O₇₈ 分离株的 OMP 型也与该型相同。表明从江苏省分离到的禽源性大肠杆菌具有多样性的 OMP 型,而且这 3 个血清型的分离株中存在着共同的 OMP 型。

关键词 大肠杆菌,外膜蛋白型,SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色法

大肠杆菌是家禽最常见的病原菌之一,可引起家禽胚胎死亡、脐炎、败血症、肉芽肿、卵黄性腹膜炎和全眼球炎等一系列疾病,给养禽业带来重大损失。禽源大肠杆菌大部分属 O₁:K₁、O₂:K₁ 和 O₇₈:K₈₀^[1]。以往国内外对禽源大肠杆菌主要根据 O 抗原分型^[1~3]。但最近的研究结果显示,O₂ 和 O₇₈ 血清型的分离株在外膜蛋白型(outer membrane protein patterns, OMP 型)、菌毛和代谢特性上也存在多态性^[4~9]。衡量大肠杆菌分离株的遗传相关性,通常采用两种方法:一是用多位点酶电泳法(multilocus enzyme electrophoresis),直接检测分离株酶位点上等位基因的多样性,这些酶的编码基因均在染色体上^[7~10];二是 OMP 型的测定,测定主要外膜蛋白及其差异,确定 OMP 型。多位点酶电泳法中,每一电泳型(ET),即为 1 个克隆;而 OMP 型测定中,每一 OMP 型也称 1 个克隆,每一克隆的分离株,都是同一祖代菌的后代^[11]。而上述两种方法对分离株进行遗传学分型多能取得一致的结果^[4,9],表明 ET 和 OMP 型均能客观地反映大肠杆菌分离株的遗传相关性,也即可作其克隆标志。

OMP 型是由主要 OMPs 及其差异决定的。主要 OMPs 的亚单位在 SDS-PAGE 中的分子量大约在 30 000~40 000 之间。分子量由大到小的顺序是微孔蛋白(porins)、K 蛋白(K proteins)、omp A 蛋白(omp A proteins)和质粒编码蛋白(plasmid encoded proteins, PCP),除 PCP 外,主要 OMPs 也为染色体编码。因此,主要 OMPs 及其迁移率的差异,也间接反映了分离株染色体上外膜蛋白编码基因的差异^[11]。

由于从禽大肠杆菌败血症病例中分离到的病原性大肠杆菌的血清型比较一致,即 O₂、O₇₈ 的出现率是其他血清型的 2 倍(52% 比 21%)^[12]。因此,目前国内外对禽病原性大肠杆

* 国家自然科学基金(39500110)和江苏省教委自然科学基金资助项目部分研究工作。

本文于 1996 年 7 月 15 日收到。

菌的 OMP 型的研究多限于这 2 个血清型。而对 O_1 分离株的研究几乎未见报道,我们对江苏省 25 个禽源性大肠杆菌 O_1 、 O_2 和 O_{78} 分离株的外膜蛋白型进行了初步研究,现将结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

大肠杆菌 O_1 -c、 O_2 -e、 O_2 -h 及 O_{78} -m 分离株由本院微生物教研室郑玉美惠赠; O_1 -d、 O_1 -g、 O_2 -a、 O_2 -g、 O_{78} -j 和 O_{78} -n 菌株由江苏省家禽研究所丁铲和于圣清惠赠;其余分离株由本室分离。细菌培养用 LB 培养基^[11]。

1.2 试剂

OMPs 分离所用 N-十二烷基肌氨酸 (Sarkosyl) 和 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) 分别为 Sigma 公司和 Merck 公司产品;SDS-PAGE 中除甲叉双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品外,其余均为国产试剂;染色方法中,考马斯亮蓝 R-250 为进口分装;标准分子量为东风丽珠公司产品。

1.3 OMPs 的提取

主要参照以前的报道^[13,14]进行。大致步骤如下:斜面保存的各分离株划线接种 LB 平板,37℃ 培养 18h,挑取单个典型菌落,接种 3ml LB 肉汤,37℃ 振荡培养 15h,取该培养物 2ml 接种于 200ml LB 肉汤,37℃ 振荡培养 15h;培养物于 4℃、5000r/min 离心 10min,沉淀悬浮于 10mmol/L HEPES (pH7.4) 6ml 中,75W 输出功率超声波裂解 60s,裂解物于 4℃、7000r/min 离心 10min,收集上清液,加入约 8 倍体积的 2% Sarkosyl,室温作用 20min 后,于 10℃、35000r/min 离心 1h,沉淀悬浮于 10mmol/L HEPES (pH7.4),置 -20℃ 备用。

1.4 SDS-PAGE

制胶基本按以前的报道^[13,14],浓缩胶为 4.8%,分离胶为 10%。步骤 1.3 中所得 OMPs 制剂每个样取 15μl,加 15μl 样品缓冲液,100℃ 水浴 7min,加样,恒流 20mA 电泳。样品缓冲液为含 4% SDS、20% 甘油、5% 2-巯基乙醇和 0.002% 溴酚蓝的 0.1mol/L Tris·HCl (pH6.8) 缓冲液。

凝胶的考马斯亮蓝染色参照文献 [15] 进行。凝胶剥离后,置于经过滤的 0.25% 考马斯亮蓝 R-250-10% 醋酸-甲醇溶液中,室温作用 4h,将胶浸入前述醋酸-甲醇溶液 (脱色液,不含染料),在缓慢旋转的平台上脱色,直至所要求的背景出现为止,脱色后的凝胶可暂时保存于含有 20% 甘油的水中。

2 结果

2.1 8 个禽源大肠杆菌 O_1 分离株的 OMP 型

由图 1 可见,在 8 个禽大肠杆菌 O_1 分离株中, O_1 -a、 O_1 -f 等 2 个分离株的 OMP 型由分子量接近一致的两条带组成 (OMP-1 型);其余 6 个 O_1 分离株的 OMP 型由分子量几乎相等的 3 条带组成 (OMP-2 型)。所以,8 个 O_1 分离株共出现了 2 个 OMP 型。

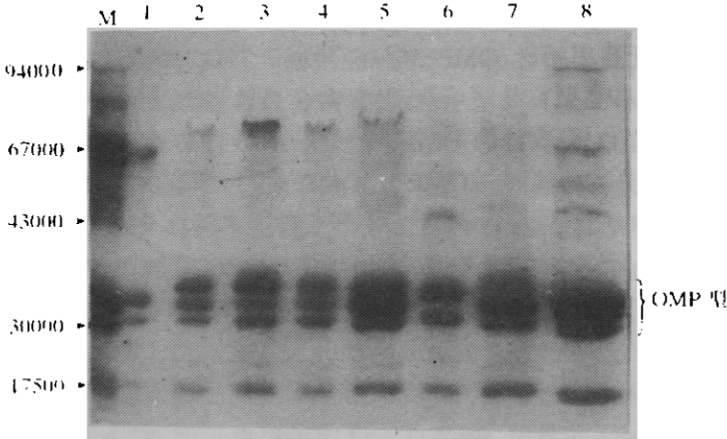


图1 8株禽大肠杆菌O₁分离株OMP型图

M: 低分子量标准蛋白, 左边所示数字为标准蛋白分子量; 1道: O₁-a菌株; 2道: O₁-b菌株; 3道: O₁-c菌株; 4道: O₁-d菌株; 5道: O₁-e菌株; 6道: O₁-f菌株; 7道: O₁-g菌株; 8道: O₁-h菌株。

Fig.1 OMP patterns of eight *Escherichia coli* O₁ isolates of chicken origin

M. Marker proteins, the apparent molecular weights of which are indicated on the left; 1. Strain O₁-a; 2. Strain O₁-b; 3. Strain O₁-c; 4. Strain O₁-d; 5. Strain O₁-e; 6. Strain O₁-f; 7. Strain O₁-g; 8. Strain O₁-h.

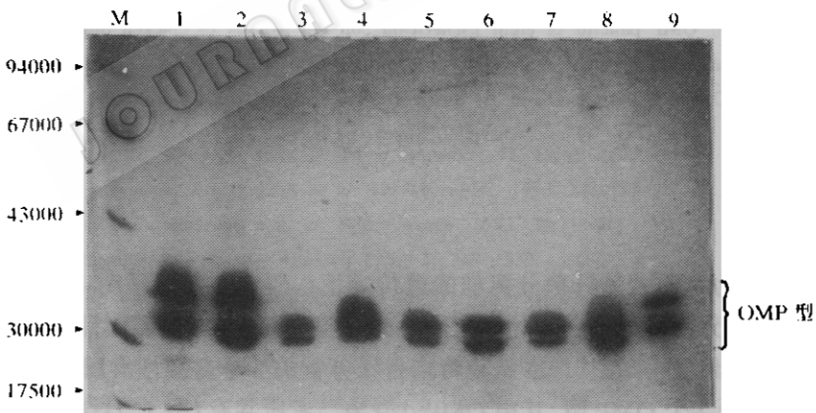


图2 9株禽大肠杆菌O₂分离株OMP型图

M: 低分子量标准蛋白, 左边所示数字为标准蛋白分子量; 1道: O₂-a菌株; 2道: O₂-b菌株; 3道: O₂-c菌株; 4道: O₂-d菌株; 5道: O₂-e菌株; 6道: O₂-f菌株; 7道: O₂-g菌株; 8道: O₂-h菌株; 9道: O₂-i菌株。

Fig.2 OMP patterns of nine *Escherichia coli* O₂ isolates of chicken origin

M. Marker proteins, the apparent molecular weights of which are indicated on the left; 1. Strain O₂-a; 2. Strain O₂-b; 3. Strain O₂-c; 4. Strain O₂-d; 5. Strain O₂-e; 6. Strain O₂-f; 7. Strain O₂-g; 8. Strain O₂-h; 9. Strain O₂-i.

2.2 9个禽源大肠杆菌 O₂分离株的 OMP 型

由图 2 可知,9 个 O₂分离株中,O₂-a 和 O₂-b 等 2 个分离株的 OMP 型由 4 条带组成,2 个分离株间 4 条带的迁移率相当(OMP-3 型);其余 7 个 O₂分离株的 OMP 型则由分子量相近的 2 条带组成(OMP-1 型)。

2.3 8 个禽源大肠杆菌 O₇₈分离株的 OMP 型

图 3 表明,8 个 O₇₈分离株属同一 OMP 型(OMP-1 型),该型由 2 条带组成,而且,8 个分离株间两条带的迁移率一致。

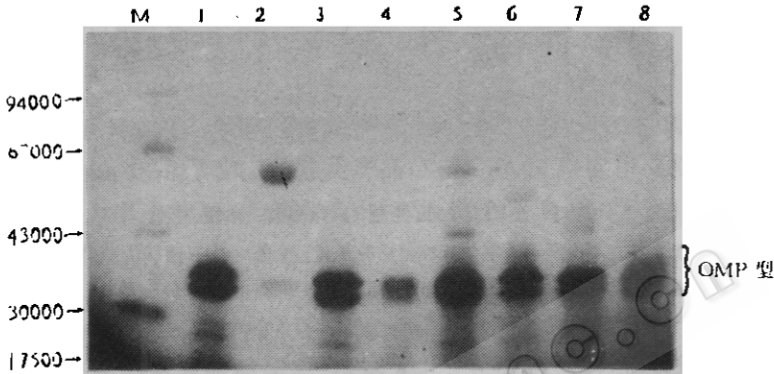


图 3 8 株禽大肠杆菌 O₇₈分离株 OMP 型图

M: 低分子量标准蛋白, 左边所示数字为标准蛋白分子量; 1 道: O₇₈-a 菌株; 2 道: O₇₈-b 菌株; 3 道: O₇₈-c 菌株; 4 道: O₇₈-d 菌株; 5 道: O₇₈-e 菌株; 6 道: O₇₈-f 菌株; 7 道: O₇₈-g 菌株; 8 道: O₇₈-h 菌株。

Fig. 3 OMP patterns of eight *Escherichia coli* O₇₈ isolates of chicken origin

M. Marker proteins, the apparent molecular weights of which are indicated on the left; 1. Strain O₇₈-a; 2. Strain O₇₈-b; 3. Strain O₇₈-c; 4. Strain O₇₈-d; 5. Strain O₇₈-e; 6. Strain O₇₈-f; 7. Strain O₇₈-g; 8. Strain O₇₈-h.

3 讨论

OMP 型可作为禽源大肠杆菌分离株的遗传标记。研究结果已证明,常规在 O 血清学分型法并不能作为分离株的遗传标记^[4-14],而 OMP 型分析,是对禽源大肠杆菌进行遗传相关性分析的有力工具之一^[4,9-14]。本试验将来自江苏省的 8 个禽源性大肠杆菌 O₁分离株、9 个 O₂分离株各分为 2 个 OMP 型,其中 OMP-1 型为二者所共有(图 1, 2);而 8 个 O₇₈分离株则均属 OMP-1 型(图 3)。因此,本试验结果再次表明,同一 O 血清型的分离株可具有完全不同的 OMP 型,而血清学上毫不相关的 O₁、O₂和 O₇₈分离株之间具有同一 OMP 型。

主要 OMPs 决定的 OMP 型可用来衡量禽源大肠杆菌的遗传相关性,有些 OMPs 本身就涉及禽大肠杆菌病的致病机理和免疫机理。Weiser 等^[16]发现,主要 OMPs 中的 ompA 可增强 K₁大肠杆菌对鸡胚的毒力; Fantinatti 等^[17]则发现,无毒力或低毒力菌株的 OMPs 中缺少 40 700 和 28 800 的 2 条带,它们只出现于有毒力的菌株; Nolan 等^[18]通过对 1 株禽病原大肠杆菌分离株及其转座子插入突变体的 OMP 型分析,认为某一大于 16 200 的 OMP 与该分离株的抗补体结合作用和毒力有关; Bolin 等^[19]则证实,针对大肠杆菌铁调节 OMPs

的抗体可对火鸡大肠杆菌败血症提供被动免疫力和保护。

因为从禽大肠杆菌败血症中所分离到的大肠杆菌的血清型比较一致,即O₂、O₇₈血清型的出现率是其他血清型的2倍^[12],故以前对禽大肠杆菌O₂、O₇₈分离株的OMP型研究较多^[4,9,11-14],而对禽源性大肠杆菌O₁分离株的OMP型的研究几乎未见报道。Achtman对61个人源大肠杆菌O₁分离株的OMP型的研究结果表明,50%属OMP-9型(由4条带组成),另外的50%属OMP-5型(由3条带组成),未发现由2条带组成的OMP型^[11],而我们在8个禽源大肠杆菌O₁分离株中发现2个分离株的OMP型由2条带组成(图1第1、6道),还有6株的OMP型与其OMP-5型相似,未发现相当于其OMP-9型的菌株。这种差异是否具有流行病学意义,即与宿主特异性的关系值得进一步研究。

目前,禽大肠杆菌病的控制途径之一是使用疫苗。现行疫苗的研制是建立在血清学分型的基础上,即由不同血清型的代表株相加而成。由于血清学分型并不能反映禽大肠杆菌分离株的遗传多态性,同一血清型的O₁、O₂或O₇₈菌株的OMP型可能完全不同,而OMPs又与禽大肠杆菌病的致病机理和免疫机理紧密相关^[16-20]。因此,以OMP型为依据,研制出OMP型多价苗,必将能更有效地控制禽大肠杆菌病。

参 考 文 献

- [1] Calnek B W (高福等译). 禽病学. 第9版. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 126~132.
- [2] 崔保安, 卢中华, 毛春生, 等. 中国兽医科技, 1993, 23(8): 7~9.
- [3] 韦 平, 李康然. 广西农学院学报, 1989, 8(2): 35~38.
- [4] Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B et al. *Infect Immun*, 1986, 51(1): 268~276.
- [5] Picard B, Goullet P, Contrepos M. *Ann Inst Pasteur*, 1988, 139(1): 239~242.
- [6] Suwanichkul A, Panigrahy B. *Avian Dis*, 1986, 30(4): 781~787.
- [7] White D G, Wilson R A, San Gabriel A et al. *Infect Immun*, 1990, 58(11): 3613~3620.
- [8] Whittam T S, Wilson R A. *Infect Immun*, 1988, 56(9): 2458~2466.
- [9] Kapur V, White D G, Wilson R A et al. *Infect Immun*, 1992, 60(4): 1687~1691.
- [10] White D G, Wilson R A, Emery D A et al. *Vet Microbiol*, 1993, 34: 19~34.
- [11] Achtman M, Mercer A, Kusecek B et al. *Infect Immun*, 1983, 39(1): 315~335.
- [12] Sojka W J, Carnaghan R B A. *Res Vet Sci*, 1961, 2: 340~352.
- [13] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 微生物学通报, 1996, 23(2): 122~124.
- [14] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 中国兽医学报, 1996, 16(3): 239~243.
- [15] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 江苏农学院学报, 1995, 16(2): 30.
- [16] Weiser J N, Gotschlich E. C. *Infect Immun*, 1991, 59(7): 2252~2258.
- [17] Fantinati F, Silveira W D, Castro A F P. *Vet Microbiol*, 1994, 41: 75~86.
- [18] Nolan L K, Wooley R E, Giddings C W et al. *Avian Dis*, 1994, 38: 146~150.
- [19] Bolin C A, Jensen A E. *Infect Immun*, 1987, 55(5): 1239~1242.

PRELIMINARY STUDIES ON OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) PATTERNS OF *ESCHERICHIA COLI* O₁, O₂ AND O₇₈ ISOLATES OF CHICKEN ORIGIN

Gao Song Liu Xiufan Zhang Rukuan

(Department of Animal medicine, Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract Omp patterns of twenty-five isolates of *Escherichia coli* serotype O₁, O₂ and O₇₈ of chicken origin from Jiangsu area were determined. The outer membrane proteins of these isolates were isolated with the improved N-lauroylsarcosine method and analyzed by SDS-PAGE. Major outer membrane proteins bands contributed for OMP patterns were visualized with Coomassie brilliant blue staining. Two OMP patterns were divided in eight of O₁ isolates and nine O₂ isolates respectively. Among these OMP patterns, 1 OMP pattern was shared by these 2 different O serotypes isolates, and eight of O₇₈ isolates also shared this OMP pattern. These results indicated that the OMP patterns of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates of O₁, O₂ and O₇₈ from this area were heterogeneous, and the same OMP patterns was presented in these 3 serotypes.

Key words *Escherichia coli*, Outer membrane protein pattern, SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue staining