

我国部分地区禽源性大肠杆菌的外膜蛋白型^{*}

高 崧 刘秀梵 张如宽 滕 峰^{**} 芦银华^{**}

(扬州大学畜牧兽医学院动物医学系 扬州 225009)

提 要 测定了从我国 18 个省、市、自治区分离到的 204 个禽病原性大肠杆菌优势血清型分离株的外膜蛋白型(Outer Membrane Protein Patterns, OMP 型)。这些分离株共产生了 4 个 OMP 型, 56 个 O₁₈ 分离株可分为 3 个 OMP 型, 54 个 O₇₈ 分离株、28 个 O₂ 分离株、26 个 O₈₈ 分离株、22 个 O₁₁ 分离株和 18 个 O₂₆ 分离株, 分别出现了 4、2、1、3 和 1 个 OMP 型。其中, OMP-1 型为 6 个血清型所共有, OMP-3 型则同时存在于 O₁₈、O₇₈、O₂ 和 O₁₁ 分离株中。结果表明, 优势血清型中, O₁₈、O₇₈、O₂ 和 O₁₁ 分离株具有多样性的 OMP 型, 而 O₈₈、O₂₆ 分离株的 OMP 型则高度一致, 所测 6 个优势血清型的分离株间存在共同的 OMP 型。

关键词 大肠杆菌, 优势血清型, 分离株, 外膜蛋白型

分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0226-33

禽大肠杆菌病是病原性大肠杆菌引起的禽类多种类型疾病的总称。总体而言, 单一或继发性大肠杆菌病给养禽业带来了严重的经济损失。国外发现从禽大肠杆菌病中分离到的大肠杆菌大多属 O₁、O₂、O₃₅ 和 O₇₈, 很少分离到其他血清型^[1]。我们从国内江苏、广东、河南、新疆、四川、北京、黑龙江等 18 个省、市、自治区收集并鉴定出禽源性大肠杆菌 595 株, 以试管凝集试验鉴定出其中 440 个分离株的血清型, 确定 O₁₈、O₇₈、O₂、O₈₈、O₁₁ 和 O₂₆ 等 6 个血清型为优势血清型。

如前所述, 以往国内外对禽源性大肠杆菌主要根据 O 抗原分型^[1], 但有研究结果显示, O₂ 和 O₇₈ 血清型分离株在外膜蛋白型(Outer Membrane Protein Patterns, OMP 型)、菌毛和代谢特性上存在多态性^[2-7]。衡量大肠杆菌分离株的遗传相关性, 可采用 OMP 分型法^[8,9]。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)、热修饰蛋白(omp A proteins)和质粒编码蛋白(Plasmid Encoded Proteins, PCP), 除 PCP 外, 主要 OMPs 为染色体编码。因此, 主要 OMPs 条带的多少及其迁移率的差异, 也间接反映了分离株染色体上外膜蛋白编码基因的差异^[8,9]。为衡量我国不同地区分离到的禽病原性大肠杆菌分离株的遗传相关性, 我们对 204 个优势血清型分离株的 OMP 型进行了研究。

^{*} 国家自然科学基金(No. 39500110)和江苏省教委自然科学基金资助项目部分研究工作

^{**} 本院兽医专业 1997 届毕业生

本文作者还有何叶峰

收稿日期: 1997-10-16, 修回日期: 1998-12-04

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

204 个禽病原性大肠杆菌优势血清型分离株从国内 18 个省、市、自治区有典型大肠杆菌病病变的病鸡中分离,经生化鉴定为大肠杆菌后,在中国兽药监察所以玻板、试管凝集试验鉴定其 O 血清型,它们对 1 日龄 SPF 鸡具有致病性,这些菌株的详细来源见表 1。细菌培养用 LB 培养基^[12]。

表 1 204 个优势血清型分离株的来源
Table 1 Origins of 204 *Escherichia coli* of predominant O serogroups

序号 Order	血清型 Serogroup	分离株数 No. of isolates	占定型菌的比例/% Percentage of 440 serogrouped isolates	地区(株数) Region(No. of isolates)
1	O ₁₈	56	12.72	苏(13)、陕(7)、鲁(3)、粤(4)、疆(1)、川(1)、浙(3)、津(10)、京(1)、皖(4)、蒙(5)、沪(1)、黔(2)、鄂(1)
2	O ₇₈	54	12.27	苏(20)、陕(3)、鲁(11)、粤(4)、豫(5)、疆(6)、津(1)、京(1)、甘(1)、沪(1)、黔(1)
3	O ₂	28	6.36	苏(11)、陕(8)、鲁(3)、豫(1)、疆(1)、京(3)、鄂(1)
4	O ₈₈	26	5.90	苏(7)、陕(7)、鲁(1)、粤(2)、津(1)、京(1)、沪(1)、鄂(6)
5	O ₁₁	22	5.00	苏(11)、鲁(3)、豫(4)、疆(2)、浙(2)
6	O ₂₆	18	4.09	苏(4)、鲁(2)、粤(5)、川(3)、津(2)、晋(2)
Total		204	46.36	

1.2 试剂

OMPs 分离所用 N-十二烷酰肌氨酸(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;标准分子量蛋白为东风丽珠公司产品。

1.3 OMPs 的提取

主要参照以前的报道^[10~12]进行。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 10 mmol/L HEPES(pH7.4)6mL 中,75W 超声波裂解 60s,裂解物于 4℃、7000r/min 离心 10min,收集上清液,加入 8 倍体积 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^[10~12],浓缩胶为 4.8%,分离胶为 10%。从上述所得 OMP 制剂中每个样取 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。电泳所用电源、电泳槽为 Bio-Rad 公司产品。

凝胶的考马斯亮蓝染色参照文献[12]进行。凝胶剥离后,置于经过滤的 0.25% 考马斯亮蓝 R250-10% 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 20% 甘油的水中。

选取不同地区、典型 OMP 型的 12 个 O₁₈分离株、12 个 O₇₈分离株、12 个 O₂分离株、13 个 O₈₈分离株、13 个 O₁₁分离株和 9 个 O₂₆分离株按上述方法再次电泳后,拍照。

2 结果

2.1 56 个禽病原性大肠杆菌 O₁₈分离株的 OMP 型

由图 1 可见,12 个代表性禽病原性大肠杆菌中,8 个菌株的 OMP 型由分子量几乎一致的 2 条带组成,称为 OMP-1 型;第 2 泳道苏 210 株的 OMP 型由 1 条带组成,故可归为 OMP-2 型;第 8 泳道陕 353 株、9 泳道陕 261 株和 10 泳道陕 644 株的 OMP 型由 3 条带组成,故归为 OMP-3 型。因此,56 个 O₁₈分离株共出现了 3 个 OMP 型(OMP1-3 型)。

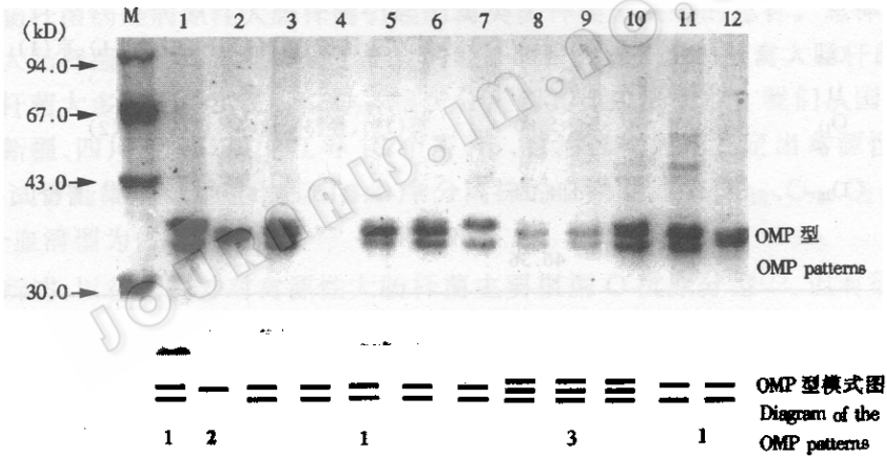


图 1 12 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₁₈分离株的 OMP 型图

Fig. 1 OMP patterns of selective twelve pathogenic *Escherichia coli* O₁₈ isolates of chicken origin
M:Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD); 1. Strain Su-112; 2. Strain Su-210; 3. Strain Su-300; 4. Strain Su-687; 5. Strain Su-066; 6. Strain Lu-078; 7. Strain Lu-088; 8. Strain Shan-353; 9. Strain Shan-361; 10. Strain Shan-644; 11. Strain Yue-655; 12. Strain Jiang-504.

The number 1 to 3 in the diagram of the OMP patterns represented 3 different OMP patterns.

2.2 54 个禽病原性大肠杆菌 O₇₈分离株的 OMP 型

由图 2 可知,12 个代表性禽病原性大肠杆菌中,2 个分离株的 OMP 型由 2 条带组成,归为 OMP-1 型;第 7 泳道鲁 207 株 OMP 型虽然也由 3 条带组成,但其分子量最大的一条带的迁移率明显低于 OMP-3 型相应条带,故归为 OMP-4 型;8 泳道鲁 202 株和 9 泳道鲁 451 株 OMP 型均由一条带组成,属 OMP-2 型;其余属 OMP-3 型。所以,54 个 O₇₈分离株共出现了 4 个 OMP 型(OMP1-4 型)。

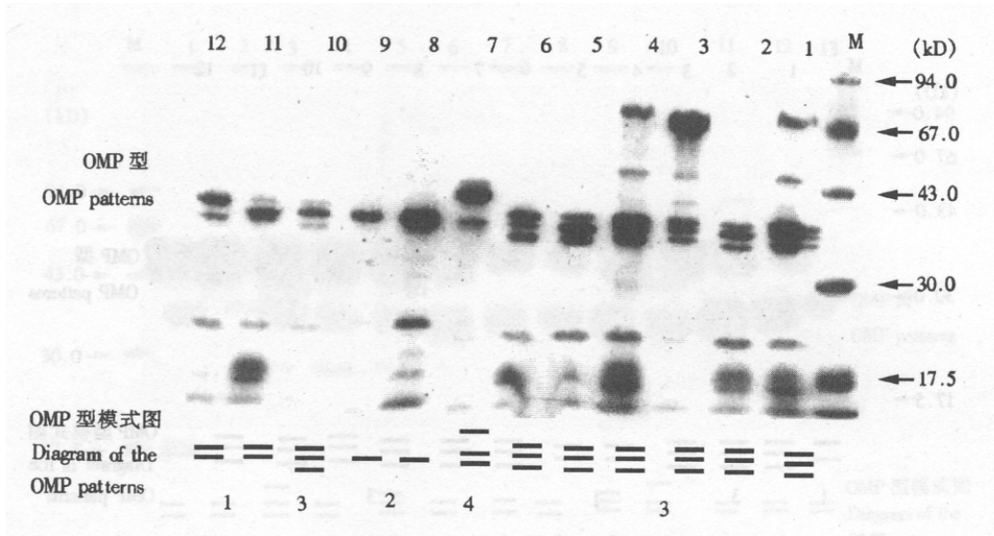


图 2 12 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₇₈ 分离株的 OMP 型图

Fig.2 OMP patterns of selective twelve pathogenic *Escherichia coli* O₇₈ isolates of chicken origin
M: Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 17.5kD); 1. Strain Su-149; 2. Strain Su-166; 3. Strain Shan-522; 4. Strain Lu-158; 5. Strain Lu-202; 6. Strain Lu-204; 7. Strain Lu-207; 8. Strain Lu-448; 9. Strain Lu-451; 10. Strain Yue-650; 11. Strain Yue-645; 12. Strain Yue-653.
The number 1 to 4 in the diagram of the OMP patterns represented 4 different OMP patterns.

2.3 28 个禽病原性大肠杆菌 O₂ 分离株的 OMP 型

图 3 显示了 12 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₂ 分离株的 OMP 型,第 1 泳道豫 058、5 泳道鲁 069 株和 6 泳道鲁 067 株 OMP 型由分子量接近一致的 2 条带组成,可归为 OMP-1 型;其余 9 个分离株由 3 条带组成,归为 OMP-3 型;故 28 个 O₂ 分离株共出现 2 个 OMP 型(OMP1,3 型)。

2.4 26 个禽病原性大肠杆菌 O₈₈ 分离株的 OMP 型

图 4 表明:13 个代表性 O₈₈ 分离株的 OMP 型均由分子量接近一致的 2 条带组成,可将其全部归为 OMP-1 型。由此可知,26 个 O₈₈ 分离株共有 1 个 OMP 型(OMP1 型)。

2.5 22 个禽病原性大肠杆菌 O₁₁ 分离株的 OMP 型

如图 5 所示,13 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₁₁ 分离株的 OMP 型中,第 5 泳道鲁 132 株、9 泳道豫 018 株的 OMP 型由 3 条带组成,归为 OMP3 型;3 泳道苏 258 株、10 泳道疆 226 株的 OMP 型与图 2 中 7 泳道的鲁 207 株的 OMP 型相似,故归为 OMP4 型;其余分离株属 OMP1 型。因此,22 个 O₁₁ 分离株共出现了 3 个 OMP 型(OMP1,3,4 型)。

2.6 18 个禽病原性大肠杆菌 O₂₆ 分离株的 OMP 型

由图 6 看出,9 个代表性 O₂₆ 分离株的 OMP 型由分子量近似一致的 2 条带组成,可归为 OMP1 型。因而,18 个 O₂₆ 分离株拥有一个 OMP 型(OMP1 型)。

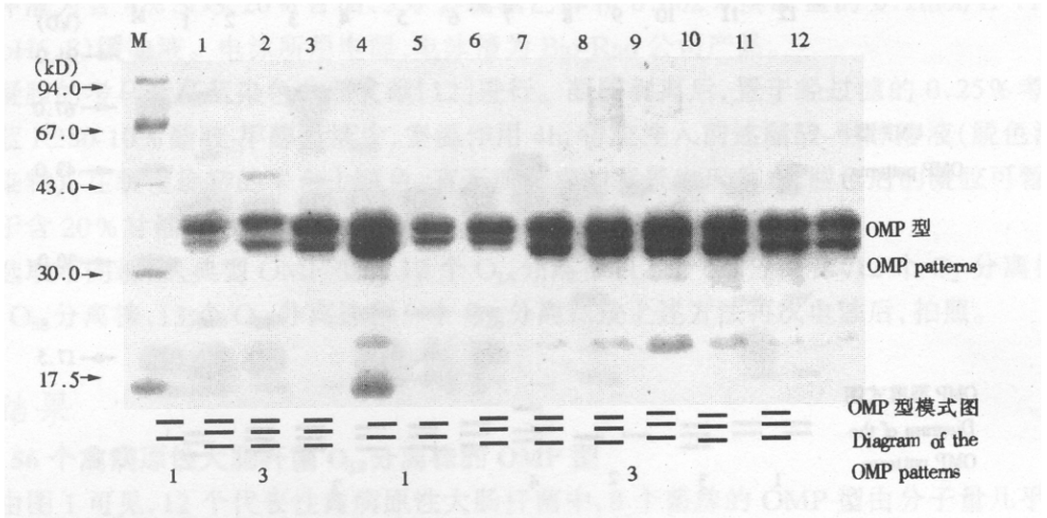


图 3 12 个代表性禽病原性大肠杆菌 O_2 分离株的 OMP 型图

Fig.3 OMP patterns of selective twelve pathogenic *Escherichia coli* O_2 isolates of chicken origin
M: Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 17.5kD); 1. Strain Yu-058; 2. Strain Jiang -267;
3. Strain Shan-562; 4. Strain Shan-523; 5. Strain Lu-069; 6. Strain Lu-067; 7. Strain Jing-614;
8. Strain jing-618; 9. Strain E-029; 10. Strain Shu-126; 11. Strain Shu-302; 12. Strain Shu-682.
The number 1 and 3 in diagram of the OMP patterns represented 2 different OMP patterns.

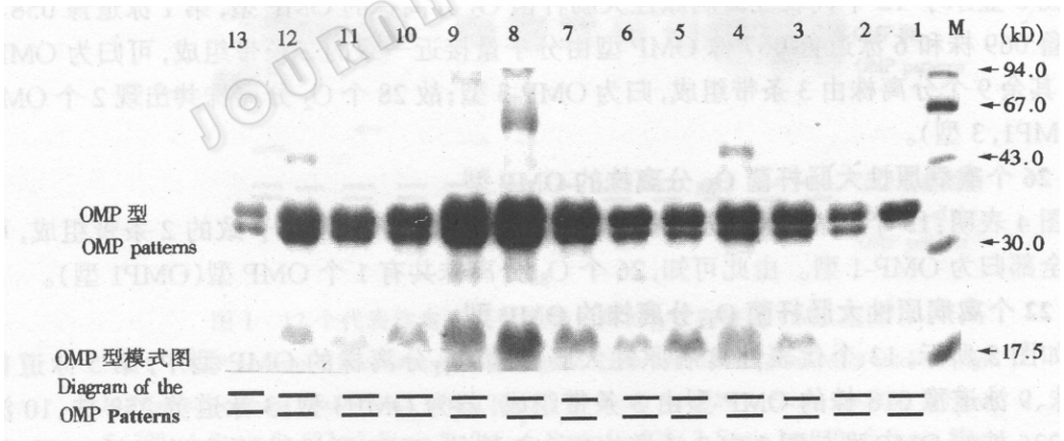


图 4 13 个代表性禽病原性大肠杆菌 O_{88} 分离株的 OMP 型图

Fig.4 OMP patterns of selective thirteen pathogenic *Escherichia coli* O_{88} isolates of chicken origin
M: Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 17.5kD); 1. Strain Su-034; 2. Strain Su-171; 3. Strain Su-437;
4. Strain Shan-536; 5. Strain Shan-546; 6. Strain Lu-263; 7. Strain Yue-654; 8. Strain Jin-585; 9. Strain Yue-658;
10. Strain Jing-629; 11. Strain Hu-493; 12. Strain E-045; 13. Strain E-051.
The number 1 in the diagram of the OMP patterns represented the same OMP pattern 1 mentioned above.

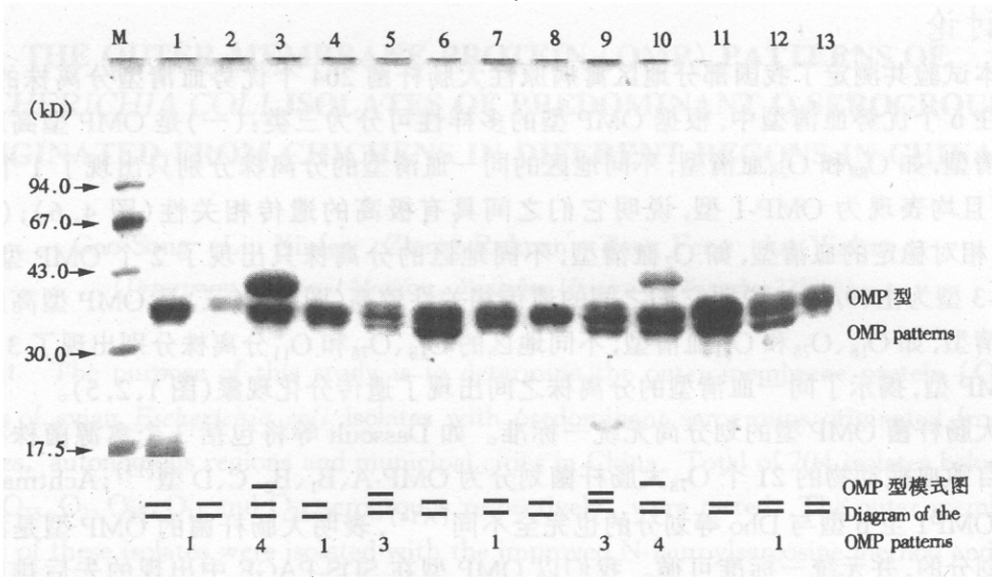


图 5 13 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₁₁ 分离株的 OMP 型图

Fig. 5 OMP patterns of selective thirteen pathogenic *Escherichia coli* O₁₁ isolates of chicken origin
M: Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 17.5kD); 1. Strain Su-036; 2. Strain Su-107; 3. Strain Su-258; 4. Strain Su-597; 5. Strain Lu-132; 6. Strain Lu-208; 7. Strain Lu-229; 8. Strain Yu-002; 9. Strain Yu-018; 10. Strain Jiang-226; 11. Strain Jiang-505; 12. Strain Zhe-413; 13. Strain Zhe-417.
The number 1, 3 and 4 in the diagram of the OMP patterns represented 3 different OMP patterns.

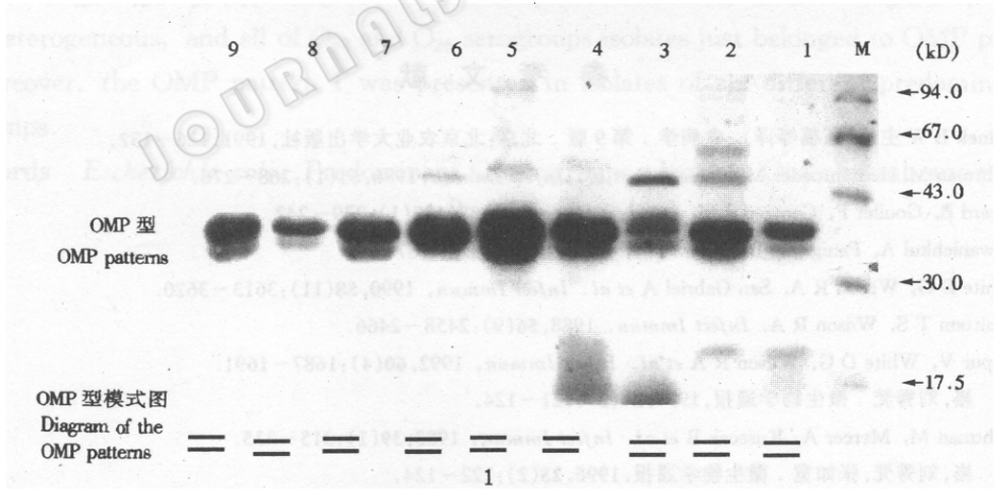


图 6 9 个代表性禽病原性大肠杆菌 O₂₆ 分离株的 OMP 型图

Fig. 6 OMP patterns of selective nine pathogenic *Escherichia coli* O₂₆ isolates of chicken origin
M: Marker proteins(94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 17.5kD); 1. Strain Su-123; 2. Strain Su-185; 3. Strain Lu-071; 4. Strain Yue-633; 5. Strain Yue-638; 6. Strain Yu-249; 7. Strain Chuan-403; 8. 津-563 株 Strain Jin-563; 9. 晋-588 株 Strain Jin-588.
The number 1 in the diagram of OMP patterns represented they are all OMP pattern 1.

3 讨论

本试验共测定了我国部分地区禽病原性大肠杆菌 204 个优势血清型分离株的 OMP 型。在 6 个优势血清型中, 根据 OMP 型的多样性可分为三类: (一) 是 OMP 型高度稳定的血清型, 如 O₈₈ 和 O₂₆ 血清型, 不同地区的同一血清型的分离株分别只出现了 1 个 OMP 型, 而且均表现为 OMP-1 型, 说明它们之间具有极高的遗传相关性(图 4, 6); (二) 是 OMP 相对稳定的血清型, 如 O₂ 血清型, 不同地区的分离株只出现了 2 个 OMP 型, 且以 OMP-3 型为主(9/12), 说明它们之间的遗传相关性较高(图 3); (三) 是 OMP 型高度变化的血清型, 如 O₁₈、O₇₈ 和 O₁₁ 血清型, 不同地区的 O₁₈、O₇₈ 和 O₁₁ 分离株分别出现了 3、4 和 3 个 OMP 型, 揭示了同一血清型的分离株之间出现了遗传分化现象(图 1, 2, 5)。

大肠杆菌 OMP 型的划分尚无统一标准。如 Dassouli 等将包括 3 个禽源菌株在内的分离自败血症动物的 21 个 O₇₈ 大肠杆菌划分为 OMP-A、B₁、B₂、C、D 型^[13]; Achtman 等划分的 OMP1 至 6 型与 Dho 等划分的也完全不同^[9, 14], 表明大肠杆菌的 OMP 型是测定者自行划分的, 并无统一标准可循。我们以 OMP 型在 SDS-PAGE 中出现的先后排序。这似乎不影响该法对大肠杆菌分离株遗传相关性的研究。

本试验结果再次表明, 我国部分地区搜集的禽病原性大肠杆菌优势血清型的分离株中, 同一血清型的分离株, 存在着不同的 OMP 型; 血清学上毫不相关的分离株之间却可具有相同的 OMP 型。表明了同一血清型的分离株之间可发生遗传分化, 而不同血清型的分离株之间也可具有不同程度的遗传相关性, 进一步说明 OMP 型可作禽病原性大肠杆菌的遗传标志, 而常规的 O 血清学分型则不能体现这种遗传相关性。

参 考 文 献

- [1] Calnek B W 主编(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] Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B *et al.* *Infect Immun*, 1986, **51**(1): 268~276.
- [3] Picard B, Goullet P, Contrepos M. *Ann Inst Pasteur*, 1988, **139**(1): 239~242.
- [4] Suwanichkul A, Panigrahy B. *Avian Dis*, 1986, **30**(4): 781~787.
- [5] White D G, Wilson R A, San Gabriel A *et al.* *Infect Immun*, 1990, **58**(11): 3613~3620.
- [6] Whittam T S, Wilson R A. *Infect Immun*, 1988, **56**(9): 2458~2466.
- [7] Kapur V, White D G, Wilson R A *et al.* *Infect Immun*, 1992, **60**(4): 1687~1691.
- [8] 高 崧, 刘秀梵. 微生物学通报, 1997, **24**(2): 121~124.
- [9] Achtman M, Mercer A, Kusecek B *et al.* *Infect Immun*, 1983, **39**(1): 315~335.
- [10] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 微生物学通报, 1996, **23**(2): 122~124.
- [11] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 中国兽医学报, 1996, **16**(3): 239~243.
- [12] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. 微生物学报, 1997, **37**(6): 463~468.
- [13] Dassouli M B A, Contrepos M, Girardeau J P *et al.* *Vet Microbiol*, 1988, **17**: 345~356.
- [14] Dho M M, VAN DEN Bosch J F, Girardeau J P *et al.* *Infect Immun*, 1990, **58**(3): 740~745.

THE OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) PATTERNS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES OF PREDOMINANT O SEROGROUPS ORIGINATED FROM CHICKENS IN DIFERENT REGONS IN CHINA *

Gao Song Liu Xiufan Zhang Rukuan Teng Feng Lu Yinhua

(Department of Animal Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract The purpose of this study is to determine the outer membrane protein (OMP) patterns of avian *Escherichia coli* isolates with predominant serogroups originated from 18 provinces, autonomous regions and municipal cities in China. Total of 204 isolates belonging to O₁₈, O₇₈, O₂, O₈₈, O₁₁ and O₂₆ serogroups respectively, were tested. The outer membrane proteins of these isolates were isolated with the improved N-lauroylsarcosine method and analyzed by SDS-PAGE. 4 different OMP patterns were identified with these isolates of predominant serogroups. 3 different OMP patterns with 56 isolates of O₁₈, 4 with 54 isolates of O₇₈, 2 with 28 isolates O₂, 1 with 26 isolates of O₈₈, 3 with 22 isolates of O₁₁ and 1 with 18 isolates of O₂₆ respectively, were found. Isolates with OMP pattern 1 were discovered in 6 different serogroups, and OMP-3 pattenen was also shared by O₁₈, O₇₈ and O₁₁ serogroups isolates. These results indicated that the OMP patterns of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates of O₁₈, O₇₈, O₂, O₁₁ serogroups which were isolated from different regions in China were heterogeneous, and all of O₈₈ and O₂₆ serogroups isolates just belonged to OMP pattern 1. Moreover, the OMP pattern 1 was presented in isolates of six different predominant O serogroups.

Key words *Escherichia coli*, Predominant O serogroups, Isolate, Outer membrane protein pattern

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39500110)