

## 禽病原性大肠杆菌 1 型菌毛的分离与鉴定\*

高 崧 姜 焱 刘业兵\*\* 张如宽 刘秀梵

(扬州大学畜牧兽医学院动物医学系 扬州 225009)

**摘 要** 以旋涡混合法使禽病原性大肠杆菌分离株 566、1794 和 TK3 菌毛脱落,经硫酸铵沉淀、透析后进行蔗糖密度梯度离心,收集密度为 1.10 至 1.15g/cm<sup>3</sup> 的蛋白带,经 SDS-PAGE 测定,3 株菌毛蛋白的分子量分别在 17.5、17.0 和 17.0kD;提纯菌毛保留了甘露糖敏感性凝集豚鼠红细胞的能力,证明它们为 1 型菌毛;从 1794 株提取的 1 型菌毛免疫 BALB/C 小鼠产生的高免血清在 Western blot 中与 3 个菌株的相应菌毛蛋白均呈阳性反应。上述结果表明,受检的 3 株禽病原性大肠杆菌均表达了 1 型菌毛,其分子量在 17.5~17.0kD 之间,3 个菌株的 1 型菌毛间具有较强的抗原相关性。

**关键词** 大肠杆菌,1 型菌毛,分离,鉴定,禽源

**分类号** S852.6 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0521-26

禽大肠杆菌败血症或大肠杆菌病在世界范围内给养禽业造成了较大的经济损失<sup>[1-3]</sup>。越来越多的证据表明,禽源大肠杆菌的致病性与其菌毛有关,有毒力菌株比无毒力菌株更容易吸附鸡的气管或咽上皮细胞<sup>[1]</sup>,这种吸附是由菌毛介导的<sup>[2,3]</sup>,大多数分离自败血症鸡的大肠杆菌具有甘露糖敏感性血凝(Mannose Sensitive Hemagglutination, MSHA)特性的菌毛,即 1 型菌毛<sup>[4]</sup>,这些菌毛亚单位的分子量可能会因血清型的不同而有所差异<sup>[5,6]</sup>,但它们对甘露糖敏感的吸附特性却是保守的<sup>[7]</sup>。

除 1 型菌毛外,禽病原性大肠杆菌还表达具甘露糖抵抗血凝(Mannose Resistant Hemagglutination, MRHA)特性的菌毛,如 F<sub>11</sub> 菌毛,鸡大肠杆菌 F<sub>11</sub> 菌毛的表达与其对气管和咽上皮细胞的吸附无关<sup>[8,9]</sup>。

国外对禽大肠杆菌 1 型菌毛的研究限于其常见致病血清型 O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>35</sub> 和 O<sub>78</sub> 菌株<sup>[1-9]</sup>,在确定我国部分地区禽病原性大肠杆菌优势血清型为 O<sub>18</sub>、O<sub>78</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>88</sub>、O<sub>11</sub> 和 O<sub>26</sub> 的基础上,我们对包括 O<sub>18</sub> 在内的 3 个来源不同、血清型不同的分离株的 1 型菌毛进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

禽源性大肠杆菌 566 分离株由本实验室分离和鉴定,其血清型为 O<sub>18</sub>;1794、TK3 分离株由加拿大蒙特利尔大学 Fairbrother J M 博士惠赠,其血清型分别为 O<sub>35</sub> 和 O<sub>1</sub>,细菌培

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770562)

\*\* 西北农业大学 96 级硕士研究生

收稿日期:1998-05-04,修回日期:1998-10-06

养用 LB 培养基<sup>[10]</sup>。

## 1.2 试剂

抗血清制备中所用弗氏完全佐剂为 Sigma 公司产品, SDS-PAGE 中甲叉双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品, Western blot 中兔抗鼠 IgG-碱性磷酸酶标记抗体、底物分别为 Sigma、Boehringer Mannheim 公司产品;其余为国产分析纯试剂,标准分子量蛋白为上海东风丽珠公司产品。

## 1.3 菌毛化大肠杆菌的培养与电镜观察

566、1794 和 TK3 接种于 LB 肉汤, 37℃ 静置培养 48h, 相同条件下连续传代 2 次, 第 3 代培养物于 4℃、5 000 r/min 离心 10 min, 沉淀以 10 mmol/L Tris·Cl 缓冲液 (pH7.5) 悬浮至  $1 \times 10^7$  CFU/mL, 吸 10  $\mu$ L 滴于覆有福尔马膜 (Formovar) 的铜网上, 于 37℃ 完全干燥后, 以 1% 磷钨酸 (pH6.8) 负染 20s, 铜网干后在 H300 透射电镜下观察。

## 1.4 血凝试验

菌毛化大肠杆菌或纯化菌毛的血凝试验参照文献 [11] 进行。大肠杆菌 566、1794 和 TK3 株的 LB 三代培养物, 以 0.85% NaCl 生理盐水悬浮至  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 或以含 0.5% D-甘露糖的生理盐水悬浮至同样浓度, 分别加入 96 孔微量血凝板, 加入等体积 3% 豚鼠红细胞, 4℃ 静置 2h, 观察结果, 纯化菌毛则以 0.6mg/mL 菌毛蛋白代替上述菌体, 其余与全菌血凝试验相同。

## 1.5 菌毛的分离与提纯

基本按文献 [12] 进行, 但稍作改变。受检菌株 566、1794 和 TK3 的第 3 代 LB 培养物各 4000mL, 于 4℃、5 000r/min 离心 10 min, 沉淀悬浮于冰水预冷的 100mL 10 mmol/L Tris·Cl (pH7.5); 该悬浮液置冰上用旋涡混合器震荡 5 min, 28 000 次/min, 所得菌液于 4℃、6 000 r/min 离心 15 min, 收获上清液, 沉淀再用旋涡混合器同法处理 2 次, 30s/次, 收集上清液, 总体积约 300 mL, 向该上清液中加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  达 50% 饱和度, 4℃ 过夜, 于 4℃、14000 r/min 离心 1 h, 收获沉淀, 悬浮于 20mL 预冷的 10 mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 对同样的 Tris·Cl 缓冲液透析 48h, 向透析袋内加入脱氧胆酸钠 (DOC) 至终浓度为 0.5%, 再用含 0.5% DOC 的上述 Tris·Cl 缓冲液透析 48 h, 透析液于 4℃、10 000r/min 离心 10 min, 用聚乙二醇 (PEG, 分子量 20kD) 浓缩至 3mL。上样于上述 DOC-Tris·Cl 缓冲液配制的 10%~60% 的蔗糖密度梯度柱上, 4℃, 27 000 r/min, 超速离心 20 h, 在紫外检测仪上采用 280nm 波长监测, 收集 10%~20% 梯度中的蛋白带, 以上述 Tris·Cl 透析 48 h 后, 测定蛋白浓度, 分装置 4℃ 保存备用。

## 1.6 SDS-PA-GE 与银染

基本按照以前的报道<sup>[10]</sup>进行, 浓缩胶为 4.8%, 分离胶为 10%。向按步骤 1.5 中所得 1 型菌毛蛋白制剂 10  $\mu$ L 中加 10  $\mu$ L 样品缓冲液, 100℃ 水浴 5 min, 加样, 恒压 100V 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 0.1 mol/L Tris·Cl (pH6.8) 缓冲液。凝胶剥离后, 先在甲醇、冰醋酸中固定, 再在 10% 戊二醛溶液中固定, 蒸馏水漂洗后, 浸入 5  $\mu$ g/mL 2-巯基苏糖醇溶液中, 再与 0.1%  $\text{AgNO}_3$  作用, 蒸馏水漂洗后, 凝胶置显影剂 (50  $\mu$ L 37% 甲醛加入 100mL 3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 中显色, 当所要求的显色水平出现时, 直接向显影剂中滴加 2.3mol/L 柠檬酸溶液, 使 pH  $\approx$  7.0。按文献 [13] 方法

消除凝胶表面的银膜。

### 1.7 鼠抗纯化 1 型菌毛血清的制备

以 1794 株提纯的 1 型菌毛与等体积弗氏完全佐剂混合,皮下多点注射 2 月龄 BALB/C 小鼠 3 只,每只小鼠平均注射  $16\mu\text{g}$  1 型菌毛蛋白;3 周后,每只小鼠同剂量、同法强化免疫一次;7d 后,尾静脉注射  $17\mu\text{g}$  1 型菌毛蛋白(不含佐剂);3d 后,测定小鼠抗 1 型菌毛血清的琼扩效价。

### 1.8 Western blot

主要参照文献 [13] 进行。步骤 1.5 中所得 1 型菌毛蛋白制剂,经 SDS-PAGE 后,恒压 80V 2h 转印于硝酸纤维素膜,置含 5% 脱脂奶粉的  $0.05\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.5)中  $4^\circ\text{C}$  过夜封闭,封闭后的膜直接加入以上述封闭液作 1:100 稀释的鼠抗 1 型菌毛高免血清中,  $37^\circ\text{C}$  作用 2 h,  $0.05\text{mol/L}$  PBS(pH7.5)漂洗 3 次,10 min/次,再以  $150\text{mmol/L}$  NaCl,  $50\text{mmol/L}$  Tris·Cl(pH7.5)漂洗 10 min,将膜移于以含 5% 脱脂奶粉的上述 NaCl-Tris·Cl 缓冲液作 1:1000 稀释的兔抗鼠 IgG-碱性磷酸酶标记物中,  $37^\circ\text{C}$  1.5 h,再以上述 NaCl-Tris·Cl 缓冲液漂洗 4 次,10 min/次,以 BCIP/NB 底物溶液显色。

## 2 结果

### 2.1 菌毛化大肠杆菌的电镜观察

电镜下 3 个受试菌株菌体表面均有较多放射状、刚直菌毛,说明它们在 LB 肉汤中连续传代 3 次,能充分表达菌毛(图 1)。

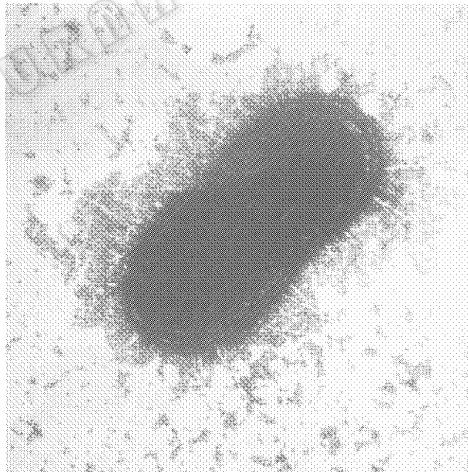


图 1 禽病原性大肠杆菌 566 分离株的电镜观察

Fig. 1 Avian pathogenic *E. coli* 566 isolate after growth for 48h in static aerobic luria broth, abundant pili around the bacteria were presented

### 2.2 血凝试验

菌毛化大肠杆菌或纯化菌毛在给定浓度下,均能完全凝集豚鼠红细胞;当以含 0.5% D-甘露糖生理盐水代替单纯生理盐水悬浮菌体或纯化菌毛时,则血凝被抑制,说明这些菌

株在 LB 肉汤中静置培养条件下,产生的主要是 1 型菌毛,而且纯化的 1 型菌毛保留了对豚鼠红细胞的凝集能力。

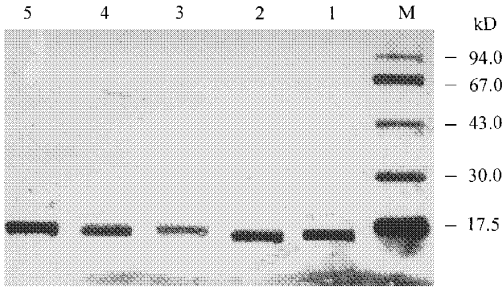


图 2 566、1794、TK3 株纯化的 1 型菌毛的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE profiles of purified type 1 pili

Lane 1 : The purified 1794 pilus preparation 20 $\mu$ g ;Lane 2 : the purified TK3 pilus ,20 $\mu$ g ;Lane 3 ~ 5 :the purified 566 pilus (lane 3 ),10 $\mu$ g ( lane 4 )and 20 $\mu$ g ( lane 5 ). M. Marker proteins , the apparent molecular weights of which are indicated on the right.

与鼠抗 1794 株 1 型菌毛抗体作 Western blot。1794 株菌毛制剂在 17、18kD 处分别产生 1 条带,TK3、566 株则均出现一条带,并且与纯化的 1 型菌毛的分子量接近(图 3)。

### 3 讨论

致禽败血症大肠杆菌 O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub> 和 O<sub>78</sub> 分离株对禽气管上皮细胞的吸附是由菌毛介导的<sup>[1,2]</sup>,针对菌毛的抗体和 D-甘露糖及其衍生物能阻止这种吸附<sup>[2]</sup>,表明 1 型菌毛或类 1 型菌毛是禽病原性大肠杆菌 1 型菌吸附并定居鸡气管上皮的重要结构。

应用旋涡混合、蔗糖密度梯度离心法,有效地提取了禽病原性大肠杆菌 566、1794 和 TK<sub>3</sub> 分离株的菌毛成分,尤其旋涡混合这一步骤使以上菌株菌毛脱落是完全的;血凝试验、SDS-PAGE 和 Western blot 证明它们属 1 型菌毛。提纯的 1 型菌毛抗原免疫 3 只 BALB/C 小鼠,其琼扩效价均在 1 : 8 以上,表明纯化菌毛具有良好的免疫原性。

不同血清型的禽源性大肠杆菌的 1 型菌毛亚单位分子量可能有所差别<sup>[5,6,14]</sup>,本次所测 3 个血清型禽病原性大肠杆菌毛分子量分别为 17.5、17.0 和 17.0kD(图 2),但它们

### 2.3 鼠抗 1 型菌毛高免疫血清

提取自 1794 株的 1 型菌毛抗原免疫小鼠,3 只小鼠血清的琼扩效价均在 1 : 8 以上。表明提纯的 1 型菌毛具有良好的免疫原性。

### 2.4 菌毛的提纯

冰浴条件下,对旋涡混合器震荡前后的全菌所作 SDS-PAGE 显示,3 个菌株在震荡前均有一条约 17kD 的蛋白带,而震荡后的菌体则不含该条带,表明旋涡混合器震荡能使菌毛从菌体上脱落。纯化菌毛的 SDS-PAGE,结果见图 2。566、1794 和 TK3 提纯菌毛的分子量分别为 17.5、17 和 17kD。

### 2.5 Western blot

从 566、1794、TK3、提纯的 1 型菌毛

与鼠抗 1794 株 1 型菌毛抗体作 Western blot。1794 株菌毛制剂在 17、18kD 处分别产生 1

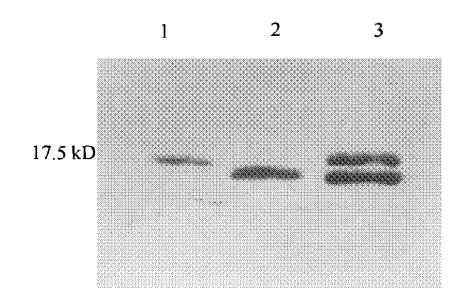


图 3 566、1794 和 TK<sub>3</sub> 株纯化 1 型菌毛的免疫印迹

Fig. 3 Immunoblot of the purified 566, 1794, TK3 pilus preparation revealed with polyclonal antiserum against type 1 pilus from 1794

Lane 1 : 566 ;Lane2 :TK3 ;Line3 :1794

The apparent molecular weight of which is indicated on the left.

保留了对豚鼠红细胞的甘露糖敏感性凝集和对 1 型菌毛多价抗血清在 Western blot 中的反应性,表明了它们在进化过程中的保守性<sup>[7]</sup>。

从 1794 株提纯的 1 型菌毛的 SDS-PAGE 中显示出分子量约 17.0kD 的清晰条带(图 2 lane 1)。此提纯菌毛成分免疫小鼠产生的多价血清,在 Western blot 中与同样菌毛成分反应后产生两条清晰的带(分子量约为 17.0 和 18.0kD)(图 3 lane 3)。Korhonen 报道,在加大上样量(130 $\mu$ g)时,其提纯的 1 型菌毛蛋白在 SDS-PAGE 中,除 17.0kD 条带外,也出现了一条 18.0kD 的条带<sup>[12]</sup>。我们以 20 $\mu$ g 菌毛蛋白上样,尽管在 SDS-PAGE 中未出现该条带,但此后的 Western blot 中证明了该带的存在,其性质可能是另一种菌毛(如 F<sub>11</sub>),也可能是 1 型菌毛蛋白在 SDS 存在时形成的复合结构<sup>[15]</sup>。值得注意的是,不管是何种情形,566 和 TK3 株只有 1 型菌毛与 1794 株间存在抗原相关性,不存在抗原性相关的其他菌毛成分,因为后者制备的抗血清在 Western blot 中与前二者的菌毛抗原间只产生与 1 型菌毛分子量相当的单一条带(图 3 lane 2)。

国外对禽致病性大肠杆菌 1 型菌毛的研究,限于其常见血清型<sup>[1-9]</sup>。我们以分离自败血症病鸡的 566 分离株为代表,与国外分别分离自败血症鸡和火鸡的 1794、TK3 株的 1 型菌毛间的抗原相关性作了比较,发现它们的分子量略有差别,但却具有较强的抗原相关性(图 2,3)。我们同时测定了这 3 个分离株对 1 日龄雏鸡的致病性,它们可使接种鸡全部死亡,因此,均属高致病株<sup>[16]</sup>。对包括 566 在内的我国禽病原性大肠杆菌分离株的 1 型菌毛及其生物学特性进行研究,有助于进一步揭示我国禽大肠杆菌病的致病机理。

## 参 考 文 献

- [1] Dho M, Lafont J P. *Avian Dis*, 1984, **28**(4): 1016~1025.
- [2] Gyimah J E, Panigrahy B. *Avian Dis*, 1988, **32**: 74~78.
- [3] Naveh M W, Zusman T, Skutelsky E *et al.* *Avian Dis*, 1984, **28**(3): 651~661.
- [4] Klemm P. *Rev Infect Dis*, 1985, **13**: 721~735.
- [5] Dozois C M, Fairbrother J M, Harel J *et al.* *Infect Immun*, 1992**60**(7): 2648~2656.
- [6] Suwanichkul A, Panigrahy B. *Avian Dis*, 1986, **30**(4): 781~787.
- [7] Chanteloup N K, Dho-Moulin M, Esnault E *et al.* *Microb Pathogen*, 1991, **10**: 271~280.
- [8] Van den Bosch J F, Hendriks J H I M, Gladigau I *et al.* *Infect Immun*, 1993, **61**(3): 800~806.
- [9] Dozois C M, Chanteloup N, Dho-Moulin M *et al.* *Avian Dis*, 1994, **38**: 231~239.
- [10] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽. *微生物学通报*, 1996, **23**(2): 122~124.
- [11] 董国雄. 大肠埃希氏菌. 见曹澍译等主编. *兽医微生物学及免疫学技术*. 北京: 北京农业大学出版社, 1992, 87~95.
- [12] Korhonen T K, Nurmiaho E L, Renta H *et al.* *Infect Immun*, 1980, **27**(2): 569~575.
- [13] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 MF, 曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁等译). *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 886~898.
- [14] Dho M, Van den Bosch J F, Girardeau J P *et al.* *Infect Immun*, 1990, **58**(3): 740~745.
- [15] Mcmichael J C, Ou J T. *J Bacteriol.*, 1979, **138**: 969~975.
- [16] Rosenberger J K, Fries P A, Cloud S S *et al.* *Avian Dis*, 1985, **29**(4): 1094~1107.

## THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYPE 1 PILI FROM PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* OF CHICKEN ORIGIN\*

Gao Song Jiang Ying Liu Yebing Zhang Rukuan Liu Xiufan

(Department of Veterinary Science, College of Animal Husbandry and Veterinary  
Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract** The pili from pathogenic *Escherichia coli* isolates 566, 1794 and TK3 of chicken and turkey origin were purified. After mechanic detachment from the bacterial cells, the pili were concentrated by precipitation with ammonium sulfate, dialyzed, and solubilized in buffer containing deoxycholate. The fraction containing the pilus was purified further by ultracentrifugation in a sucrose gradient. After ultracentrifugation, the pili at the density of  $1.10$  to  $1.15 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  (between 10% ~ 20% of sucrose gradients) were collected and the purified pili from strain 566, 1794 and TK<sub>3</sub> had an apparent molecular weight of 17 500, 17 000 and 17 000 respectively, which retained their ability to bind the erythrocyte in a mannose-inhibitable fashion. Hyperimmunesera raised in BALB/C mice against the purified pili from strain 1794 reacted positively with type 1 pili from both isolates 566 and TK3 by immuno blot. These results revealed that the three strains either Chinese or north american isolates expressed type 1 pili which had molecular weights from 17 000 to 17 500, and they have common antigenic epitopes.

**Key words** *Escherichia coli*; Type 1 pili; Isolation; Characterization; Chicken origin

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770562)