

## 大肠杆菌 F18 菌毛操纵子全基因克隆、表达及生物学活性

张建军, 朱国强\*

(扬州大学兽医学院 扬州 225009)

**摘 要** 利用 PCR 技术以猪产肠毒素大肠杆菌 F18 标准菌株 107/86 和 2134P 基因组 DNA 为模板成功地扩增出编码 F18ab 和 F18ac 完整菌毛操纵子 *fed* 基因。将它们分别克隆入表达质粒载体 pET-22K(+) 结合酶切和核苷酸序列分析证明了 PCR 预期扩增产物的正确性。然后将克隆的重组载体 DNA 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 构建和筛选出分别含 F18ab 和 F18ac 完整 *fed* 基因的重组菌, 经过 IPTG 诱导表达, 在电镜下观察到上述两种重组菌能分别大量表达 F18ab 和 F18ac 菌毛。用热抽提法提纯其诱导表达的 F18ab 和 F18ac 菌毛, 经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色发现提纯后菌毛获单一分子量约为 15kDa 蛋白条带, 免疫家兔后制备出高效价的兔抗血清, 玻板凝集试验和 Western blot 结果表明: 体外诱导表达的 F18ab 和 F18ac 菌毛具有和野生 F18 菌毛相同的抗原性。用表达 F18ab 和 F18ac 菌毛的上述 2 株重组菌分别进行小肠上皮细胞体外吸附试验和吸附抑制试验, 结果表明 2 株重组菌和野生菌株一样具有较强的粘附易感仔猪小肠上皮细胞的能力, 而用表达 F18ab 和 F18ac 重组菌提纯的菌毛制备出兔抗血清都能有效地抑制上述重组菌或野生菌株对易感仔猪小肠上皮细胞的吸附结合。

**关键词**: 产肠毒素大肠杆菌; F18 菌毛; *fed* 基因表达; 生物活性

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)05-0790-05

断奶仔猪腹泻 (porcine post-weaning diarrhea, PWD) 和仔猪水肿病 (porcine edema disease, ED) 是 2 种导致仔猪发病死亡的重要传染病, 是全球范围内造成养猪业经济损失的重要因素<sup>[1,2]</sup>。腹泻的主要病原菌是 K88(F4) 和 F18 大肠杆菌, 前者仅能引起腹泻, 而 F18 大肠杆菌不仅能引起腹泻, 而且与仔猪水肿病密切相关。据 F18 菌毛的抗原性, Rippinger 等<sup>[3]</sup>将其分为 F18ab 和 F18ac 2 个血清型抗原变种, 其中 F18ab 大肠杆菌包括产肠毒素大肠杆菌 (F18ETEC) 和产志贺氏样毒素 (或 Vero 细胞毒素) 大肠杆菌 (F18 SLTEC), 而 F18ac 则常出现在产肠毒素大肠杆菌 (F18ETEC) 中。F18ETEC 与断奶仔猪腹泻密切相关, F18SLTEC 则与断奶仔猪水肿病密切相关<sup>[4-6]</sup>。ETEC 致病性决定于它们在易感宿主上皮细胞上的定居能力和毒素产生能力, 两者缺一不可。ETEC 定居在小肠上皮细胞的能力是由菌体表面的宿主特异性肠吸附菌毛介导的。这种 ETEC 特异性菌毛通称定居因子抗原 (Colonization factor antigen, CFA) 或粘附素 (adhesin), 确切地说, 粘附素存在于菌毛顶端, 有了粘附素, ETEC 才能特异性吸附在肠上皮细胞表面, 抵御肠道蠕动和肠液冲洗作用, 使

ETEC 定居于特定段小肠并局灶性大量繁殖。F18ab 和 F18ac 菌毛在体内外均可粘附小肠上皮细胞微绒毛和刷状缘, 值得注意的是, 仔猪断奶后, 由于饲料改变造成的应激, 消化道内各种消化酶的影响、母源抗体丧失和环境等因素, 导致机体抵抗力下降。在这种条件下, 产 F18 菌毛的大肠杆菌可利用 F18 菌毛介导的细菌在肠道内定居而大量繁殖, 产生肠毒素和志贺氏样毒素, 从而出现腹泻、水肿和神经症状。

国内外对 F18 大肠杆菌所致的 ED 和 PWD 免疫预防进行了较为广泛的研究, 尤其对常见血清型菌体/外膜抗原、肠毒素/志贺氏样毒素 *stx2e* 和菌毛抗原进行了深入研究<sup>[7,8]</sup>, 但迄今为止, 在全球范围内无任何商品化疫苗。虽然 F18 菌毛可作为防制 ED 和 PWD 的保护性抗原, 但面临着如何大量获得菌毛的难题。菌毛在体外的表达受外界因素的影响很大, 目前尚未筛选到理想的体外培养基用于 F18 菌毛的充分表达, 大多 F18ab 大肠杆菌菌株在体外无论是 37℃ 或是 18℃ 均不能正常表达 F18 菌毛。

迄今为止, 如何有效预防 PWD 和 ED 仍然是个有待解决的问题。本研究成功地扩增出编码 F18ab

基金项目: 江苏省六大人才高峰项目 (2006) 美国农业部 USDA 高新技术资助项目 (2002-35204-12216)

\* 通讯作者。Tel 86-514-7972590 Fax 86-514-7972218 E-mail: yzgzqzhu@hotmail.com yzgzqzhu@yzu.edu.cn

作者简介: 张建军 (1976-) 男, 江苏丹阳县人, 硕士研究生, 从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。

收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-03-30 修回日期: 2007-07-09

和 F18ac 完整菌毛操纵子 *fed* 基因,并在体外充分高效表达 F18ab 和 F18ac 两种功能性粘附素,为有效预防 PWD 和 ED 基因工程疫苗的研制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和载体

产 F18ab 菌毛大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli* 菌株 107/86(O139 :K12 :H1)和产 F18ac 菌毛 *E. coli* 2134P(O157 :H19)均由美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室惠赠。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)和质粒 pET-22b(+ )购自 Novagen 公司, *E. coli* DH5 $\alpha$  本室保存。

### 1.2 酶、试剂、实验动物和血清抗体

Gel DNA Extraction Kit、Ampicillin、IPTG、X-gal、Expand Long Template PCR System、T4DNA 连接酶均购自 Roche 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司,  $\lambda$ HindIII、DNA Marker 为 TakaRa 公司。标准低分子量蛋白购自华美生物公司。新西兰青壮年大白兔,购自扬州大学医学院实验动物中心。35 日龄二元杂交猪长白(♂)×约克(♀)由江苏泰兴某猪场提供。其 FUT1 基因 M307 位点多态性为 AG 型或 GG 型(*E. coli* F18 受体易感猪),采用 PCR-RFLP 技术检测获得<sup>[5]</sup>。兔抗 F18ab FedE 亚单位高免血清或 IgG,兔抗 F18ac FedA 亚单位高免血清或 IgG,兔抗 F18acFedE 亚单位高免血清或 IgG,由扬州大学兽医学院成大荣博士惠赠。兔抗 107/86 18ab 菌毛的 IgG,兔抗 2134P F18ac 菌毛的 IgG,由美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室惠赠。

### 1.3 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 基因的克隆和鉴定

根据已发表的 F18ab 和 F18acFedA 序列和 GenBank 中 *fedF18ab* 的部分片段序列信息,用 DNASTAR 软件分析设计出扩增 *fedF18ab* 或 *fedF18ac* 全长的一对引物,并在各自的 5' 末端分别加上酶切位点。模板 DNA 来自菌株 107/86 或 2134P 染色体 DNA,PCR 反应条件:94℃ 5min,94℃ 1min,56℃ 1min,68℃ 6min,30 个循环,68℃ 10min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后,酶切消化 PCR 产物与质粒载体 pET-22b(+),用 T4 DNA 连接酶连接,并转化 DH5 $\alpha$ 。通过氨苄抗性 LB 平板筛选结合限制性内切酶酶切分析鉴定出假定阳性重组子 p1522 和 p1534(分别含 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 基因),进一步用 T7 启动子通用引物测序证明。

### 1.4 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 基因的表达

重组质粒 p1522 和 p1534DNA 分别转化大肠杆

菌 BL21(DE3),接种于含氨苄的 LB 中,37℃ 振荡培养使细菌处于对数生长期( $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ )时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.2mmol/L,继续培养 2.5h 后终止。

### 1.5 表达产物的鉴定

**1.5.1 表达重组菌的玻璃板凝集:**取诱导表达的 p1522 和 p1534 株重组菌液分别与上述兔抗 F18ab 和 F18ac 亚单位 IgG、兔抗 F18ab 和 F18ac 粘附素 IgG 于玻璃板上混匀,室温孵育 2min 内观察凝集。

**1.5.2 电镜观察:**诱导 2 株重组菌菌液用 PBS 溶液洗涤 2 次后,吸取少量菌液浮于铜网,磷钨酸负染 5min,Philips Tecnai12-twin 透射电镜下观察并拍照。

**1.5.3 F18 菌毛的提取和分析鉴定:**诱导表达重组菌按文献[11]进行 12% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝 R250 染色,观察表达菌毛主要蛋白条带。重组菌表达菌毛用热抽提法分离和饱和硫酸铵沉淀提纯后<sup>[10]</sup>,SDS-PAGE 电泳鉴定 F18ab 和 F18ac 菌毛纯度,紫外分析仪检测纯化菌毛蛋白的含量。

### 1.6 表达产物的免疫原性鉴定

**1.6.1 兔抗 F18ab 和 F18ac 菌毛高免血清的制备:**提纯的 F18ab 和 F18ac 菌毛,分别与弗氏完全佐剂完全乳化,经皮内多点注射各免疫 1 只新西兰青壮年大白兔 100 $\mu$ g。3 周后二免,各与弗氏不完全佐剂完全乳化,皮下注射 100 $\mu$ g。2 周后,各取纯化菌毛 200 $\mu$ g 进行第三次静脉注射免疫,3d 后心脏采血分离血清备用。

**1.6.2 SDS-PAGE 和 Western blot:**取纯化菌毛按文献[11]以 BIO-RAD 转印系统将凝胶中蛋白条带电转移到 NC 膜上,5% BSA 4℃ 封闭过夜。PBST 洗涤 NC 膜后依次加入 1:100 稀释的兔抗 F18ab 或 F18ac 菌毛高免血清,1:50 羊抗兔 IgG-HRP 孵育,DAB 底物显色。

### 1.7 小肠上皮细胞吸附和吸附抑制试验

**1.7.1 仔猪小肠上皮细胞制备:**35 日龄 F18 受体易感仔猪放血处死后,各取 15cm 回肠、空肠段立即放入预冷的 IPBR 缓冲液(1 升溶液中含 1g 葡萄糖,0.42g KCl,9g NaCl,0.25g CaCl<sub>2</sub>,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,5 $\mu$ g Trypsin inhibitor)中,在轻缓洗涤肠内容物 2 遍后,将肠道外翻,于 4℃ 在磁力搅拌器上轻缓搅拌(100r/min 10min)后,4℃ 下约 1000r/min 离心 10min。用预冷的 MEM 悬浮细胞浓度至 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> cell/mL。

**1.7.2 上皮细胞吸附试验:**分别取诱导表达 p1522、p1534 重组菌和上述制备好的小肠上皮细胞各

0.5mL 混和,于 37℃ 孵育 30min,1000r/min 离心 5min,用 1mL IPBR 悬浮后取 1 滴涂匀于玻璃片上,自然干燥,美蓝染色 5min 后置显微镜下观察细胞吸附情况。

**1.7.3 上皮细胞吸附抑制试验:**兔抗 F18ab 或 F18ac 菌毛高免血清各 0.5mL,分别和诱导表达重组菌等量混和,37℃ 孵育 30min 后,再与制备好的肠上皮细胞作细胞吸附试验。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增和电泳检测

PCR 产物电泳结果显示,利用设计的引物分别以标准菌株 107/86 和 2134P 基因组 DNA 为模板各自均成功地扩增出含 F18ab 和 F18ac 完整菌毛操纵子 *fed* 基因目的条带,其大小分别约为 5.6kb,与预计设计的大小一致(图略)。

### 2.2 *fedF18ab*、*fedF18ac* 基因的克隆和 p1522、p1534 重组质粒的鉴定

通过氨苄抗性 LB 平板筛选假定阳性重组子 p1522 和 1534(分别含 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 基因)纯化的重组质粒酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,初步证明为含有目的基因插入的重组质粒(图略)。进一步用 T7 启动子通用引物分别对重组质粒 DNA 测序:重组质粒中正确插入了 F18ab 菌毛和 F18ac 的 *fed* 基因。p1522 和 1534 的 *FedA* 序列主要区别在 364~366 位处,1534(*fedF18ac*)比 p1522(*fedF18ab*)多出 3 个碱基即 CCG,这是 F18ab 和 F18ac 2 个血清型抗原变种的重要区别特征,该结果与 Bosworth 等<sup>[4]</sup>的报道完全一致。

### 2.3 凝集反应

诱导表达 F18ab 或 F18ac 菌毛的重组菌均能与兔抗 F18ab *FedE* 亚单位血清和 IgG,兔抗 F18ac *FedE* 亚单位血清和 IgG,兔抗 F18ac *FedA* 亚单位血清和 IgG,兔抗 F18ab 菌毛 IgG,兔抗 F18ac 菌毛 IgG 产生明显的凝集反应,且 2 重组菌交叉凝集反应明显。3 次免疫制备的兔抗 F18ab 和 F18ac 菌毛高免血清抗体玻板凝集价在 200 以上。两种不同血清型抗体均能与产生菌毛的标准株 107/86 和 2134P 产生明显的凝集反应。

### 2.4 电镜观察

诱导表达 F18ab 或 F18ac 菌毛的 2 株重组菌,负染后透射电镜观察可见菌细胞表面布满许多菌毛(图 1 和图 2),形态比野生菌株产生的菌毛粗壮(图略),确认重组菌中菌毛诱导表达较好,而仅含 pET-22k(+)质粒的重组菌无任何菌毛产生。

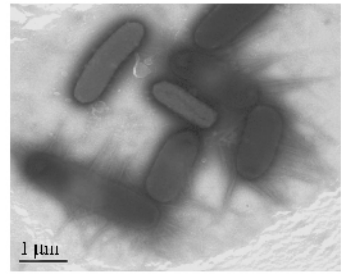


图 1 p1522 重组菌表达 F18ab 菌毛负染图(13500×)

Fig.1 Negative stained fimbriae from p1522 recombinant *E. coli* BL21 (DE3) expressing F18ab by EM(13500×).

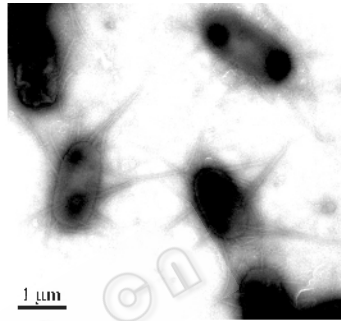


图 2 p1534 重组菌表达 F18ac 菌毛负染图(13500×)

Fig.2 Negative stained fimbriae from p1534 recombinant *E. coli* BL21 (DE3) expressing F18ac by EM(13500×).

### 2.5 诱导表达 F18 菌毛的提纯、检测和 SDS-PAGE/Western blot 分析

重组菌菌体的裂解物明显多出一条分子量约为 15kDa 的条带。纯化后的菌毛经 SDS-PAGE 电泳显示 F18ab 或 F18ac 菌毛主要结构蛋白条带分子量与标准株 107/86 大小一致,约为 15kDa(*fedA* 亚单位),经 Western blot 分析,用兔抗 F18ab 和 F18ac 高免血清经 1:100 稀释后都能特异性识别该主要结构蛋白条带(图 3)。

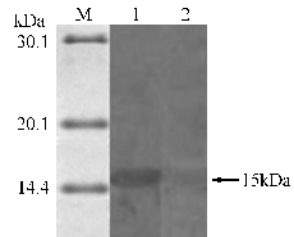


图 3 纯化菌毛 F18ab 和 F18ac 的 Western blot 检测

Fig.3 Western blot analysis of the expression of F18ab and F18ac fimbriae from the recombinant *E. coli* BL21( DE3 ) p1522 and p1534, respectively. M. Low molecular mass protein marker; 1. F18ab fimbriae from the recombinant p1522; 2. F18ac fimbriae from the recombinant p1534.

### 2.6 仔猪小肠上皮细胞吸附试验和吸附抑制试验

显微镜下观察表明:诱导表达 F18ab 的 p1522 重组菌或诱导表达 F18ac 的 p1534 重组菌,和标准

株 107/86、2134P 一样,均能明显地吸附于易感仔猪小肠上皮细胞(图 4,仅显示诱导表达 F18ac 的 p1534 重组菌与小肠上皮细胞的黏附作用)。

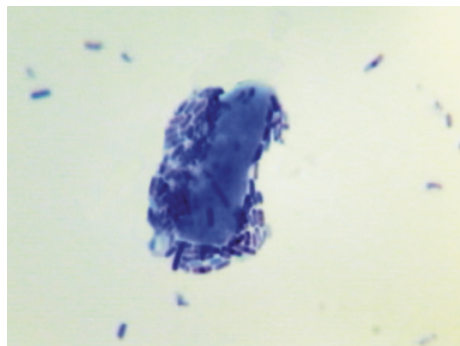


图 4 表达 F18ac 菌毛重组菌 p1534 吸附易感仔猪小肠上皮细胞

Fig.4 Adherence of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) p1534 expressing F18ac fimbriae to the jejunal epithelial cells from the post-weaning piglets.

和表达 F18ab 和 F18ac 的野生型 *E. coli* 标准株 107/86、2134P 一样,诱导表达菌毛的 p1522 或 p1534 重组菌分别与 1:100 稀释兔抗 F18ab 或 F18ac 菌毛高免血清作用 30min 后,几乎丧失吸附易感仔猪小肠上皮细胞的能力(图 5,仅显示诱导表达 F18ac 的 p1534 重组菌经相应 F18ac 菌毛高免血清作用后不能吸附易感仔猪小肠上皮细胞)。

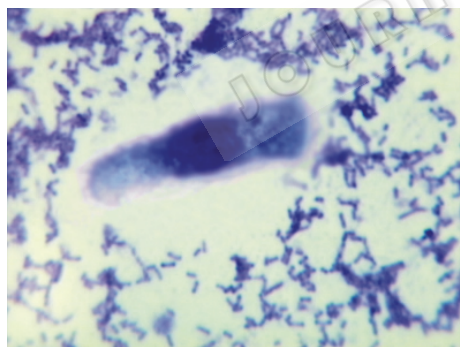


图 5 表达 F18ac 菌毛重组菌 p1534 经 F18ac 菌毛高免血清作用后不能黏附易感仔猪小肠上皮细胞

Fig.5 Adhesion inhibition of the jejunal epithelial cells from the post-weaning piglets to the recombinant *E. coli* BL21(DE3) p1534 expressing F18ac fimbriae after preincubation with anti-sera against F18ac fimbriae.

### 3 讨论

利用 PCR 技术以产肠毒素 F18 *E. coli* 标准菌株 107/86 和 2134P 基因组 DNA 为模板成功地扩增出猪 F18 大肠杆菌两种不同血清型 F18ab 和 F18ac 菌毛完整操纵子 *fed* 基因,这是首次研究报道。在 *fedF18ab* 基因和 *fedF18ac* 基因扩增、分离的基础上,将其分别克隆入表达载体 pET-22b(+),经限制性

酶内切酶酶切鉴定和核酸序列测定证明插入的克隆基因完全正确,分别各自编码 F18ab 和 F18ac 菌毛操纵子基因。将上述两重组质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3)表达系统,电镜观察表明:在 IPTG 诱导下两重组菌分别能高效表达 F18ab 菌毛和 F18ac 菌毛。SDS-PAGE 电泳显示重组菌诱导表达的 F18ab 或 F18ac 菌毛蛋白主要条带均为一条,是 *fedA* 主要亚单位,分子量均约为 15kDa。制备的兔抗 F18ab 和 F18ac 菌毛高免血清抗体,在 Western blot 反应中都能识别 *fedA* 主要亚单位多肽。

仔猪对该病原的易感性取决于小肠粘膜上皮细胞上是否存在 F18 菌毛的受体以及是否具有显性遗传特性<sup>[12]</sup>。Vogeli P 等<sup>[13]</sup>认为引起 PWD 和 ED 的 *E. coli* F18 菌毛受体(ECF18R)基因位于猪的第 6 号染色体上,仔猪对该病的敏感性取决于 ECF18R 位点的显性等位基因(B),抵抗力则决定于隐性等位基因(b)。我们实验室和有关研究表明,猪 α(1,2)岩藻糖转移酶基因(FUT1)可作为 ECF18 受体蛋白的候选基因,对该基因进行 PCR-RFLP 分析发现该基因 307 位点存在多态性,该处碱基由 G 突变为 A,从而失去一个 *Hin*6 I 酶切位点,这个突变也使得苏氨酸代替了丙氨酸,从而改变了蛋白质的构象和功能,导致了猪对 ECF18 的抗性和敏感性,AA 型为对 ECF18 抗性猪,CG 型、AG 型为敏感猪<sup>[13-15]</sup>。构建的重组菌经诱导表达的 F18ab 和 F18ac 菌毛均能明显地吸附于易感仔猪小肠上皮细胞,且该菌毛都能作为良好免疫原免疫家兔后产生高效价抗体,并能有效地抑制诱导表达 F18ab 或 F18ac 菌毛的重组菌和野生标准株 107/86 或 2134P 与易感仔猪小肠上皮细胞的结合。综合上述结果表明,诱导表达的 F18ab 或 F18ac 菌毛和野生标准株 107/86 和 2134P 产生的菌毛一样,具有较好的免疫原性和相同的抗原性。

对 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 菌毛完整操纵子 *fed* 基因的克隆、鉴定,并在体外充分高效表达 F18ab 和 F18ac 两种功能性粘附素,而且构建的表达菌毛粘附素重组菌能较好地吸附于易感仔猪小肠上皮细胞,诱导表达的 F18ab 和 F18ac 菌毛粘附素免疫家兔后产生高效价抗体并有效地抑制野生标准株 107/86 或 2134P 与易感仔猪小肠上皮细胞的吸附结合。上述研究结果,为有效地研制出预防 PWD 和 ED 的基因工程苗奠定了良好的基础。

致谢 本项目得到美国宾夕法尼亚大学 Dieter M Schiffer 教授的大力资助!

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bertschinger HU ,Gyles CL. Oedema disease of pigs. In : Gyles CL (ed. ). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International ,Oxon ,United Kingdom ,1994 ,193 – 219.
- [ 2 ] Hampson DJ. Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs .In : CL Gyles (ed. ). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International ,Oxon ,United Kingdom ,1994 ,171 – 191.
- [ 3 ] Rippinger P ,Bertschinger HU ,Imberechts H , *et al.* Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107 ,2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhea and from oedema disease. *Vet Microbiol* ,1995 **45** :281 – 295.
- [ 4 ] Bosworth BT ,Dean-Nystrom EA ,Casey TA , *et al.* Differentiation of F18ab + from F18ac + *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis of the major fimbrial subunit gene ( *fedA* ). *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* ,1998 **5** :299 – 302.
- [ 5 ] Kwon D ,Choi C ,Jung T , *et al.* Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins ( F4 ,F5 ,F6 ,F41 and F18 ) and toxins ( LT ,STa ,STb and STx2e ) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhea or edema disease in Korea. *Vet Rec* 2002 **150** ( 2 ) :35 – 37.
- [ 6 ] Salajka E ,Salajkova Z ,Alexa P , *et al.* Colonization factor different from K88 ,K99 ,F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol* , 1992 **31** :163 – 175.
- [ 7 ] Johansen M ,Andresen LO ,Jorsal SE , *et al.* Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid. *Can J Vet Res* ,1997 **61** ( 4 ) :280 – 285.
- [ 8 ] Johansen M ,Andresen LO ,Thomsen LK , *et al.* Prevention of edema disease in pigs by passive immunization. *Can J Vet Res* ,2000 **64** ( 1 ) :9 – 14.
- [ 9 ] Makino S ,Watarai M ,Tabuchi H , *et al.* Genetically modified Shiga toxin 2e ( Stx2e ) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. *Microb Pathog* 2001 **31** ( 1 ) :1 – 8.
- [ 10 ] Khan AS ,Schifferli DM. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infect Immun* ,1994 **62** ( 10 ) :4233 – 4243.
- [ 11 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd. New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press ,1989.
- [ 12 ] Moxley RA. Edema disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* , 2000 **16** ( 1 ) :175 – 185.
- [ 13 ] Vogeli P ,Bertschinger HU ,Stamm M , *et al.* Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli* causing oedema disease and postweaning diarrhea in pigs ,map to chromosome 6. *Anim Genet* ,1996 **27** ( 5 ) :321 – 328.
- [ 14 ] Vogeli P ,Meijerink E ,Fries R , *et al.* A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors : a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine. *Schweiz Arch Tierheilkd* ,1997 **139** ( 11 ) :479 – 484.
- [ 15 ] 吴圣龙 原志伟 鞠慧萍 等. 致病性 F18 大肠杆菌黏附素受体仔猪体外鉴定研究. *中国兽医学报* 2006 **26** ( 6 ) :622 – 625.

## Cloning and expression of F18 fimbrial operon gene clusters from enterotoxigenic *Escherichia coli* and their bioactivity

ZHANG Jian-jun ZHU Guo-qiang\*

( College of Veterinary Medicine ,Yangzhou University ,Yangzhou 225009 ,China )

**Abstract** :The *fed* operon gene clusters with each size of 5.6kb ,encoding the F18ab or F18ac fimbriae ,was amplified respectively by high fidelity PCR using the genomic DNA templates from F18 fimbriae *E. coli* strains 107/86 or 2134P. The PCR products with the restriction enzyme sites at each end were digested and then cloned into the vector pET-22b ( + ) ,the recombinant plasmids with the inserts of both type of *fed* gene clusters were constructed and screened ,further confirmed by the means of combination with restriction endonuclease analysis and sequencing. The both types of fimbriae F18ab and F18ac were expressed efficiently in the *E. coli* BL21( DE3 ) after proper concentration of IPTG induction. Expressed fimbriae were revealed and confirmed by transmissible electromicroscope observation. The both fimbriae F18ab and F18ac were isolated and purified from the recombinant *E. coli* ,and only a single major band of protein with size of approximately 15kDa was visualized in Coomassie blue-stained gels after SDS-PAGE. The rabbits sera with high titer of anti-F18 fimbriae were detected after being immunized with the purified F18ab or F18ac fimbriae. The results of combination of agglutination assay with Western blotting showed that the sera directed against both fimbriae F18ab and F18ac reacted positively with the F18 fimbriae from both wild *E. coli* 107/86 and 2134P.

Small intestine epithelial cells with F18 fimbriae receptors ,which were from post-weaning piglets with the genotypes of FUT1 gene both M307<sup>GC</sup> and M307<sup>AG</sup> ,were prepared and tested for the adherence of *E. coli* expressing F18 fimbriae under the microscopic examination. Adhesion and adhesion inhibition test showed both of the recombinant *E. coli* expressing F18ab or F18ac fimbriae respectively could adhere to the jejunal epithelial cells in vitro as *E. coli* 107/86 and 2134p did. The both of anti-sera directed against fimbriae F18ab or F18ac respectively can efficiently inhibit the fimbriae-mediated post-weaning piglet jejunal epithelial cells adherence to both the recombinant *E. coli* ( expressing F18ab or F18ac fimbriae ) and wild type *E. coli* ( 107/86 and 2134P ).

**Keywords** : *Enterotoxigenic Escherichia coli* ; F18ab and F18ac fimbriae ; *fed* operon gene cluster expression ; biological activity

Foundation items : Grant from Jiangsu Talent Project 2006 ; USDA Project ( 2002-35204-12216 )

\* Corresponding author. Tel : 86-514-7972590 ; Fax : 86-514-7972218 ; E-mail : yzgzqzhu@hotmail.com yzgzqzhu@yzu.edu.cn

Received : 23 January 2007 / Accepted : 30 March 2007 / Revised : 9 July 2007