

## 大肠杆菌 K1 致病株外膜蛋白 T 体外功能

惠长野<sup>1</sup>, 郭妍<sup>2</sup>, 吴书驰<sup>1</sup>, 彭亮<sup>1</sup>, 曹虹<sup>1\*</sup>, 黄胜和<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系, 广州 510515)

(<sup>2</sup> 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518054)

**摘要:** 纤溶酶原激活及水解抗菌肽利于致病菌侵袭及体内存活。【目的】构建大肠杆菌 K1 致病株 E44 的 *ompT* 基因缺失突变株, 证实 E44 外膜蛋白 T(OmpT) 体外激活纤溶酶原及水解抗菌肽鱼精蛋白的活性。【方法】采用基因同源重组技术敲除大肠杆菌 K1 株 E44 中的 *ompT* 基因, 构建 *ompT* 缺失突变株; 二步柱层析纯化 E44 外膜组分, S-2251 发色底物法测定其纤溶酶原激活活性; 考察野生株 E44、*ompT* 基因敲除株 E44*ompT* 及转化带有 *ompT* 完整阅读框的质粒 pUCT 的 E44*ompT*/pUCT 三者对 0.1 mg/mL 阳离子抗菌肽鱼精蛋白的敏感程度。【结果】利用自杀性载体 pCVD442 和同源重组的原理构建 E44 的 *ompT* 基因敲除株 E44*ompT*; 纯化得到约 37 kDa 的 E44 外膜组分, S-2251 发色底物法证实其具有纤溶酶原激活活性, 纤溶酶原激活与膜组分的加入量呈一定量效关系; 与野生株 E44 相比, *ompT* 敲除株 E44*ompT* 对 0.1 mg/mL 鱼精蛋白敏感, 转化入带有 *ompT* 完整序列的质粒 pUCT 有一定的回补作用, E44*ompT* 部分恢复抗鱼精蛋白能力。【结论】外膜蛋白 T 在致病株 E44 中有表达, 并具有激活纤溶酶原及水解鱼精蛋白的活性。

**关键词:** 外膜蛋白 T; 纤溶酶原; 激活; 鱼精蛋白; 水解

**中图分类号:** Q816      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0048-06

肠外致病性大肠杆菌 (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) 是可以导致泌尿道感染、败血症和新生儿脑膜炎等大肠杆菌的一个亚类。虽然这类病原体被认为起源于肠道, 但它们在肠道内并不导致显著的病征, 这与它们具有独特的致病因子有关<sup>[1-2]</sup>。外膜蛋白 T (outer membrane protease T, OmpT, YP\_539597.1) 是一种蛋白酶, 大多数粪源大肠杆菌都带有该基因, 但在尿路致病性大肠杆菌 (uropathogenic *E. coli*, UPEC) 中检出率更高, 是假定的泌尿道感染毒力因子, 但却一直未得到实验直接证实与泌尿道感染发病机制相关<sup>[3]</sup>。另有研究表明高达 96% 的脑膜炎致病株带有 *ompT* 基因, 远远高于其它典型的脑膜炎致病毒力基因<sup>[4]</sup>。

OmpT 定位于大肠杆菌外膜, 可导致重组蛋白的降解而引起人们的关注, 甚至是在 4 mol/L 尿素极端变性的情况下依旧保持活性, 目前商品化的大肠杆菌表达宿主都是 *ompT* 缺陷型<sup>[5]</sup>。OmpT 具有很强的底物专一性, 主要识别成对的碱性氨基酸残基, 研究者很早就已将 OmpT 进行柱层析纯化, 并对其基因进行克隆测序<sup>[6]</sup>, 但对其在体内的功能知之甚少。

鱼精蛋白是一种存在于各类动物精巢组织中的多聚阳离子肽, 其抗菌性很早就为人所知, 被研究者广泛用作宿主细胞所分泌防御素的模式复合物。纤溶酶在体内具有溶血及降解细胞外基质的活性, 许多致病菌都可以产生纤溶酶原激活剂, 这

基金项目: 国家自然科学基金 (30972637)

\* 通信作者。Tel/Fax: + 86-20-61648723; E-mail: gzhecao@fimmu.com; shhuang18@hotmail.com

作者简介: 惠长野 (1979-) 男, 黑龙江密山人, 博士研究生, 研究方向为泌尿道感染。E-mail: hcy\_sypu@163.com

收稿日期: 2009-03-24; 修回日期: 2009-10-28

种纤溶酶原激活活性有利于菌体侵袭并在组织中存活,也可引起败血症患者纤溶系统的激活,进而造成严重的系统损伤。

近年越来越多的研究表明, OmpT 可能与细菌感染直接相关<sup>[1,8-9]</sup>。本研究利用同源重组技术构建了脑膜炎大肠杆菌 K1 株 E44 的 *ompT* 基因缺失突变株,证实了 OmpT 在 E44 中有表达,并可体外激活人血纤溶酶原和水解鱼精蛋白,为进一步揭示其致病相关机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K1

致病株 E44 和 SM10*pir* 及自杀质粒 pCVD442 由本室保存; T 载体购自大连 TaKaRa 公司; BL21 (DE3)、JM109、DH5 $\alpha$  和 pUC13 由本室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 表 1 为本研究使用的寡核苷酸引物,由 TaKaRa 公司合成; *Taq* 酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; Benzamidine Sepharose Fast Flow、SOURCE 30Q 购自 Amersham 公司; 鱼精蛋白 (protamine) 为 Sigma 产品; 人血纤溶酶原 (plasminogen, Plg)、纤溶酶 (plasmin)、发色底物 S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) 为意大利 Chromogenix 公司产品; HD-21C-B 型紫外检测器、LM17-1A 台式记录仪为上海康华生化仪器厂提供; 680 型全自动酶标仪为 BIO-RAD 公司产品。

表 1 本研究所使用的寡核苷酸引物

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Primer	Strand	Sequence (5'→3')	Restriction site
OMT-S1	+	TT GTCGACACTGCTTTTGCTCAGC	Sal I
OMT-B1	-	CAG GAT CCAATAGGGGTGTCAGGAC	BamH I
OMT-B2	+	TT GGA TCCCGGTGATTTGTATAGC	BamH I
OMT-X2	-	CC TCT AGATATTCGGCTGGCTT CG	Xba I
OMT5	+	GAGGATCCATCGGGCGAAACTTCTG	BamH I
OMT3	-	CGGAATTCCTAAAAGGTGTAAGACC	EcoR I

### 1.2 突变株的构建

根据已测定的 E44 染色体上的 *ompT* 基因及其两侧的 DNA 序列,设计合成了 2 对引物(表 1),以 E44 染色体为模板,用 PCR 扩增 *ompT* 基因两端 1.57 kb (OMT-S1 和 OMT-B1 为引物)和 1.27 kb (OMT-B2 和 OMT-X2 为引物)的片段,两段 DNA 片段以 *BamH* I 连接构建 2.84 kb 的  $\Delta ompT$  片段,中间缺失了完整的 *ompT* 编码序列。将扩增后的  $\Delta ompT$  片段克隆到 pGEM-T 载体上,挑选重组子并进行 PCR 及测序鉴定。利用 *Sal* I 和 *Sac* I 位点将  $\Delta ompT$  片段亚克隆至自杀载体 pCVD442,构建重组质粒 pCVT,转化到 SM10*pir*,并通过接合性转导的方法将自杀质粒 pCVT 从 SM10*pir* 转到 E44 中,通过氨苄敏感性及 PCR 方法筛选出 *ompT* 基因缺失株并命名为 E44*ompT*。

### 1.3 回补质粒的构建

以 E44 基因组为模板,上游引物为 OMT5,下游引物为 OMT3 扩增 *ompT*。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。扩增条带进行 T/A 克隆后,利用 *EcoR* I 和 *BamH* I 位点接入 pUC13 构建回补实验用载体 pUCT。

### 1.4 E44 外膜组分纯化

离心收集静置培养至稳定期的 E44 菌体,缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 清洗一次,加入 10 mL 含 1 mg/mL 溶菌酶的缓冲液 A, 4 $^{\circ}$ C 搅拌 1 h, 离心收集沉淀 (36000  $\times$  g, 30 min), 加入 10 mL 含 0.5 mg/mL 溶菌酶的缓冲液 A 再次重悬沉淀, 4 $^{\circ}$ C 搅拌 2 h, 离心收集沉淀得膜粗组分 (36000  $\times$  g, 30 min)。膜粗组分用含 0.1% sarcosyl 的缓冲液 A 重悬, 4 $^{\circ}$ C 搅拌 1 h, 离心收集沉淀 (36000  $\times$  g, 40 min)。膜沉淀加提取缓冲液 B (含 0.1% Triton X-100, 5 mmol/L EDTA 的缓冲液 A) 4 $^{\circ}$ C 振荡 1 h, 离心收集上清液并进行两步柱层析纯化, 色谱条件参考文献<sup>[5-6]</sup>。

### 1.5 膜组分纤溶酶原激活活性测定

纤溶酶测活采用 S-2251 发色底物法<sup>[7]</sup>。改进方法如下,配制测活用缓冲液 C (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH7.5), 纯化后的 E44 膜组分对缓冲液 C 透析并浓缩定量; 人纤溶酶 plasmin 用缓冲液 C 配制成 0.1 CU/mL 储液冻存, 纤溶酶原 Plg 用缓冲液 C 配制成 0.6 CU/mL 储液冻存, 临用前缓冲液 C 50 倍稀释, S-2251 底物用纯水配成浓度 1.5 mg/mL 溶液。按如下配方移入 96 孔板, 每组 5

个复孔。plasmin 对照组:水 150  $\mu\text{L}$ 、plasmin 和 S-2251 各 50  $\mu\text{L}$ ;Plg 对照组:水 150  $\mu\text{L}$ 、Plg 和 S-2251 各 50  $\mu\text{L}$ ;实验组:1、2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  E44 膜组分 150  $\mu\text{L}$ 、Plg 和 S-2251 各 50  $\mu\text{L}$ 。置于 37 $^{\circ}\text{C}$  酶标仪中,405 nm 每间隔 5 min 读数一次,共读 20 次,每组读数取平均值,以  $OD_{405}$  为 Y 轴,时间为 X 轴作图分析 Plg 激活效应。

### 1.6 *E. coli* 菌株对鱼精蛋白敏感性测定

BL21(DE3)、JM109、DH5 $\alpha$ 、E44、E44 $ompT$  及转化了质粒 pUCT 的 E44 $ompT$ /pUCT 静置培养过夜,1% 接种量接入新鲜 LB 液体培养基,摇床转速 220 r/min,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 3 h 进入对数生长期, $OD_{600}$  约 0.4,加入终浓度 0.1 mg/mL 鱼精蛋白,每隔 0.5 h 取样,测  $OD_{600}$ ,绘制菌体生长曲线。

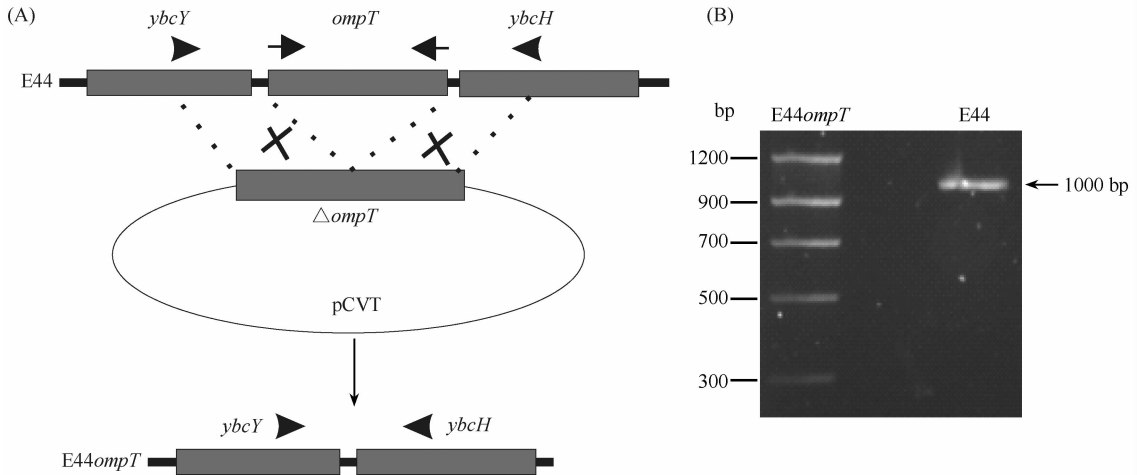


图 1  $ompT$  基因缺失株的构建

Fig. 1 Generation of the  $ompT$  deletion mutant from *E. coli* K1 pathogenic strain E44. A: Strategy of isogenic deletion of  $ompT$ . The arrowheads indicate primer locations. B: Verification of  $ompT$  deletion. The parent strain E44 and  $ompT$  deletion mutant E44 $ompT$  were verified through whole cell PCR.

扩增条带经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点接入质粒 pUC13 得到重组质粒 pUCT,图 2 为 pUCT 双酶切

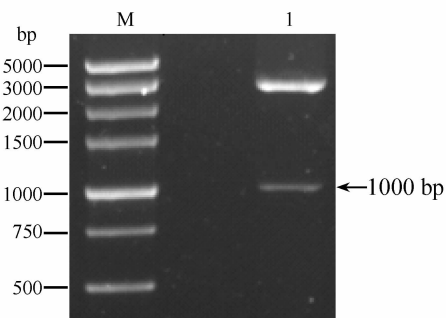


图 2 重组质粒 pUCT 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pUCT by restriction enzymes digestion. M: DNA Marker; 1: pUCT digested by *EcoR* I and *Bam*H I.

## 2 结果

### 2.1 $ompT$ 缺失株及回补质粒构建

$ompT$  基因缺失株 E44 $ompT$  的构建示意图如图 1-A,首先扩增产生  $ompT$  基因两侧的片段,2 个片段连接后构建中间缺失  $ompT$  基因的  $\Delta ompT$  片段,并克隆至 pCVD442,构建重组质粒 pCVT,接合性转导将 pCVT 转至 E44,通过同源重组及自杀质粒的缺失来获得 E44 $ompT$ 。以 E44 及 E44 $ompT$  基因组 DNA 为模板进行菌落 PCR (OMT5 和 OMT3 为引物),扩增结果如图 1-B,E44 $ompT$  基因组为模板无扩增条带,E44 基因组为模板扩增条带大小约 1000 bp。

验证图谱。质粒 pUCT 带有  $ompT$  完整阅读框,经测序验证用作回补实验载体。

### 2.2 E44 外膜蛋白纯化

OmpT 属于丝氨酸蛋白酶类,因而我们选用 Benzamidine 丝氨酸蛋白酶抑制剂亲和层析。E44 菌体外膜经反复抽提粗纯化后上样至 Benzamidine Sepharose FF,NaCl 梯度洗脱,分段收集并电泳检测,按分子量判断外膜组分集中在 200 mmol/L NaCl 洗脱(图 3-A),纯度分析(图 3-C Lane 2),与抽提液(Lane 1)相比,此步亲和层析去掉绝大部分杂蛋白;再经 SOURCE 30Q 强阴离子交换层析进一步精纯,收集约 180 mmol/L NaCl 洗脱组分(图 3-B),得到较纯的外膜成分(图 3-C Lane3)主要由 2 个条带组成,分子量集中在 37 kDa,与文献[5]报道相符。制

备的膜组分用作下步 Plg 激活活性测定。

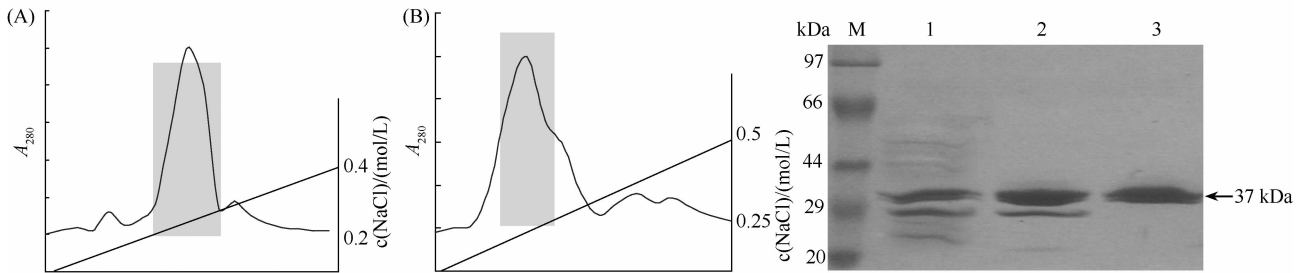


图3 E44 膜组分纯化及电泳分析

Fig. 3 Purification and SDS-PAGE analysis of E44 membrane extract. A: Benzamidine Sepharose FF chromatography; B: SOURCE 30Q chromatography; C: 10% SDS-PAGE purity analysis. M. Marker; 1. Membrane extract from E44; 2. Benzamidine Sepharose FF fraction; 3. SOURCE 30Q fraction.

### 2.3 血纤蛋白溶酶原激活剂活性测定

S-2251 是纤溶酶高度敏感的专一性底物, 激活的纤溶酶水解 S-2251 释放对硝基苯胺 (pNA), pNA 在 405 nm 处有强吸收, pNA 显色的深浅与激活剂的活性成正比。由于商品化 Plg 中, 残存少量纤溶酶, 所以对照组 Plg 的  $OD_{405}$  也呈上升趋势 (图 4)。实验组加入高低两个浓度的 E44 膜组分, Plg 被激活, 曲线斜率呈上升趋势, 表明 Plg 不断被激活, 且与膜组分的加入量呈一定量效关系。

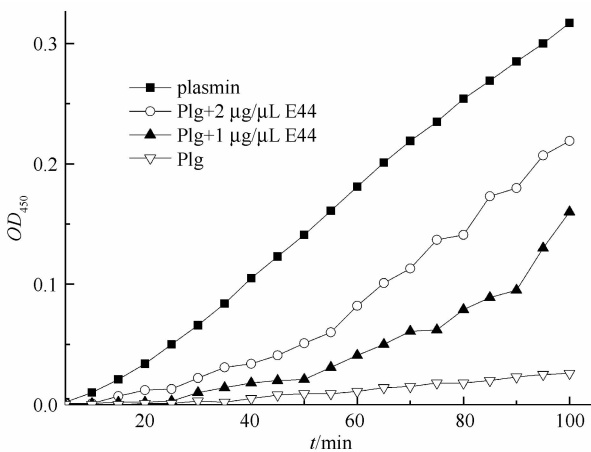


图4 E44 膜组分激活纤溶酶原

Fig. 4 The activation of Plasminogen by E44 membrane extract.

### 2.4 ompT 基因对 E. coli 鱼精蛋白易感性的影响

首先我们测定了 E44 及突变株 E44ompT 的生长曲线, 两者生长能力无显著差异。同时我们也考察了基因工程常用菌株 BL21 (DE3) (*ompT* 突变株) 和 JM109、DH5 $\alpha$  (*ompT*<sup>+</sup>) 的鱼精蛋白易感性。将各菌株培养 3 h 进入对数生长前期时, 加入终浓度为 0.1 mg/mL 的鱼精蛋白, 如图 5, E44、JM109 及 DH5 $\alpha$  在 2 h 内恢复生长, 而 E44ompT 及 BL21 (DE3) 对鱼精蛋白敏感, 8 h 内都未恢复生长, 携带

有 *ompT* 阅读框的质粒 pUCT 对 E44ompT 有回补效应, 对鱼精蛋白表现出一定抵抗。可能由于 pUCT 在菌体内稳定性不好, 随菌体生长丢失; 或者 pUCT 的回补, *OmpT* 的表达不能恢复到野生株 E44 的水平, 因而 pUCT 的回补, 突变株并未完全恢复野生株 E44 的表型。根据文献 [8] 报道, *OmpT* 可以体外水解鱼精蛋白, 因而各 *ompT*<sup>+</sup> 菌株都表现出了对鱼精蛋白的抵抗。

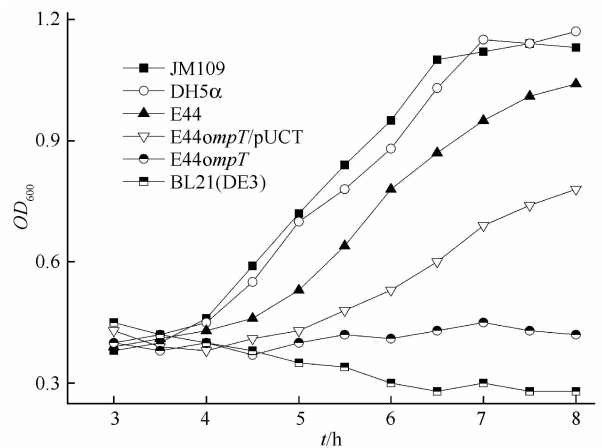


图5 *ompT* 基因对菌株鱼精蛋白易感性的影响

Fig. 5 Effect of *ompT* gene on protamine susceptibility of strains.

## 3 讨论

OmpTins 蛋白家族是在革兰氏阴性菌中发现的一类外膜蛋白酶。包括大肠杆菌 *OmpT*, 沙门氏菌 *PgtE* (成熟肽与 *OmpT* 49% 同源), 鼠疫耶尔森菌 *Pla* (50% 同源), 福氏志贺菌 *SopA* (60% 同源) 和大肠杆菌 *OmpP* (72% 同源)。许多研究表明 *OmpTins* 家族可能与致病性相关。*OmpT* 是假定的泌尿道感染毒力因子, 在尿路致病性大肠杆菌中有高的检出率<sup>[3]</sup>。*ompT* 基因敲除可显著降低致病株对脑微血

管内皮细胞的黏附能力,关于它在脑膜炎发病机制中的作用还不清楚<sup>[9]</sup>。推测 OmpT 可能从多个方面参与致病。以下从蛋白酶活性和纤溶酶原激活两个方面对其致病相关功能进行讨论。

虽然没有 OmpT 的天然底物被鉴定,但可以从大肠杆菌表达的重组蛋白降解情况来推测其在体内的生理功能。例如,携带有  $\alpha$ -溶血素 A 信号肽的融合蛋白通过外膜分泌时被 OmpT 加工为成熟肽<sup>[10]</sup>。OmpT 与霍乱弧菌毒素 B 亚基的胞外分泌有关<sup>[11]</sup>。这些都表明 OmpT 可能与一些毒力因子前体分泌过程中的加工相关。有研究表明 OmpT 对多种抗菌肽有降解活性<sup>[8,12]</sup>。鱼精蛋白是多种阳离子抗菌肽的混合物,被研究者广泛用作宿主细胞所分泌防御素的模式复合物。本研究也证实,与野生株 E44 相比,E44ompT 对 0.1 mg/mL 的鱼精蛋白敏感,引起生长抑制及菌体死亡。同样的结果也在基因工程常用菌株 BL21(DE3)、JM109 及 DH5 $\alpha$  中得到证实。宿主分泌的 OmpT 天然底物抗菌肽还有待发现,泌尿道上皮细胞也分泌一些阳离子抗菌肽,这些提示 OmpT 对其降解活性可能与菌体在尿路中存活有关。

纤溶酶在体内具有溶血及降解细胞外基质的活性,许多致病菌都可以产生纤溶酶原激活剂。很早人们就发现大肠杆菌外膜组分具有激活纤溶酶原的活性,OmpT 与耶尔森菌的纤溶酶原激活剂序列上 47% 同源,提示 OmpT 可能具有激活纤溶酶原的活性<sup>[13]</sup>。John D 等人<sup>[14]</sup>对 OmpT 的底物专一性进行了研究,利用噬菌体展示肽库研究 OmpT 识别位点氨基酸的分布机率,其中就包括天然纤溶酶原激活位点,但切割效率非常低。我们利用 S-2251 发色底物法,对纤溶酶的检测限低于  $10^{-11}$  mol/L,比其它方法更加灵敏<sup>[7]</sup>。E44 菌体及膜粗提物都测不到纤溶酶原激活活性,可能 OmpT 在 E44 中表达水平很低,或存在某种酶抑制剂,对膜组分进行精细纯化后,见图 3,按文献报道<sup>[5]</sup>应该主要是 OmpT, OmpF, OmpC 外膜组分,我们检测到较低水平的激活剂活性。

本研究表明 OmpT 在致病株 E44 中有表达,可体外水解抗菌肽鱼精蛋白及激活纤溶酶原,这些都与菌体存活及侵袭相关。E44ompT 突变株的构建,可以进一步在细胞及动物模型上研究 OmpT 与菌体黏附、侵袭、体内存活等致病能力是否直接相关,为最终阐明 OmpT 致病相关机制奠定基础。

## 参考文献

- [1] Marrs CF, Zhang L, Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252:183-190.
- [2] Huan HX, Zhou Q, Zhao LX, et al. Comparison of virulence-associated traits between a UPEC strain HEC4 and a APEC strain E058. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5):918-922.
- [3] Foxman B, Zhang L, Palin P, et al. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first time urinary tract infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 1995, 171(6):1514-1521.
- [4] Johnson JR, Oswald E, O'bryen TT, et al. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in The Netherlands. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185:774-784.
- [5] White CB, Chen Q, Kenyon GL, et al. A novel activity of OmpT. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270:12990-12994.
- [6] Sugimura K, Higashi N. Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues; identity of protease VII and OmpT. *The Journal of bacteriology*, 1988, 170:3650-3654.
- [7] Friberger P, Knos M, Gustavsson S, et al. Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. *Haemostasis*, 1978, 7:138-145.
- [8] Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, et al. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *The Journal of bacteriology*, 1998, 180(15):4002-4006.
- [9] Xie Y, Parthasarathy G, Di CF, et al. Transcriptome of *Escherichia coli* K1 bound to human brain microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 365(1):201-206.
- [10] Hanke C, Hess J, Schumacher G, et al. Processing by OmpT of fusion proteins carrying the HlyA transport signal during secretion by the *Escherichia coli* hemolysin transport system. *Molecular Genetics and Genomics*, 1992, 233:42-48.
- [11] Klausner T, Pohlner J, Meyer TF. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* IgA $\beta$ -mediated outer membrane transport. *The EMBO Journal*, 1992, 11:2327-2335.

- [12] Guina T, Yi EC, Wang H, et al. A PhoP regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *The Journal of bacteriology*, 2000, 182:4077-4086.
- [13] Sodeinde OA, Goguen JD. Nucleotide sequence of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis*: relationship to *ompT* of *Escherichia coli* and gene E of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, 1989, 57:1517-1523.
- [14] McCarter JD, Stephens D, Shoemaker K, et al. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *The Journal of bacteriology*, 2004, 186(17):5919-5925.

## *In vitro* function of outer membrane protease T of *Escherichia coli* K1 pathogenic strain

Changye Hui<sup>1</sup>, Yan Guo<sup>2</sup>, Shuchi Wu<sup>1</sup>, Liang Peng<sup>1</sup>, Hong Cao<sup>1\*</sup>, Shenghe Huang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

(<sup>2</sup>Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518054, China)

**Abstract:** Plasminogen activation and antimicrobial peptide hydrolysis contribute to pathogens invasion and survival *in vivo*. [**Objective**] To demonstrate the expression of outer membrane protease T in *E. coli* K1 pathogenic strain E44, its activity of plasminogen activator and protamine hydrolysis. [**Methods**] After Benzamidine Sepharose Fast Flow and SOURCE 30Q chromatography, we got E44 outer membrane mixed fraction, and examined its activity of plasminogen activation with chromogenic substrate S-2251 method. An *ompT* deletion mutant of E44 was constructed by using the suicide vector pCVD442, termed as E44*ompT*. We examined 0.1 mg/mL cationic antimicrobial peptide protamine susceptibility of E44, *ompT* mutant strain E44*ompT* and E44*ompT* harboring pUCT, which was constructed by inserting complete *ompT* open reading frame into pUC13. [**Results**] We got about 37 kDa E44 membrane extract, which could activate plasminogen, and activation was membrane extract dose dependent. This confirmed the expression of outer membrane protease T in the outer membrane of E44. E44*ompT* was more susceptible to 0.1 mg/mL protamine than E44, and E44*ompT* was partially complemented by pUCT. [**Conclusion**] Outer membrane protease T is expressed in *E. coli* K1 pathogenic strain E44, and can activate plasminogen and hydrolyze protamine.

**Keywords:** outer membrane protease T (OmpT); plasminogen; activation; protamine; hydrolysis

(本文责编:王晋芳)