

# 鸡致病性大肠杆菌菌毛 *fimC* 基因的表达及重组 *fimC* 蛋白卵黄抗体的免疫保护效力

王亚君<sup>1\*</sup>, 李一经<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学, 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 在表达鸡致病性大肠杆菌菌毛 *fimC* 基因的基础上, 对 *fimC* 蛋白卵黄抗体的免疫保护效力进行测定。对鸡致病性大肠杆菌 O2 血清型菌株 *fimC* 基因序列进行扩增, 扩增产物克隆至 pMD18-T 载体并测序。测序结果显示, *fimC* 基因全长 657 bp, 编码 218 个氨基酸, 与人源大肠杆菌 *fimC* 基因进行同源性比较, 核苷酸序列同源性达 97.9%, 氨基酸序同源性为 96%。从重组质粒 pMD18-T-*fimC* 上将 *fimC* 基因亚克隆到表达载体质粒 pET-30c 上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 表达出预期的 25 ku 融合蛋白, 采用 Western Blot 对表达产物进行反应原性分析, 结果显示 *fimC* 融合蛋白具有较好的抗原反应特异性。用表达的 *fimC* 蛋白免疫产蛋母鸡, 制备 *fimC* 高免卵黄抗体。用制备的 *fimC* 高免卵黄抗体免疫 1 日龄健康雏鸡, 1 d 后注射鸡致病性大肠杆菌进行攻毒, 结果显示, *fimC* 卵黄抗体免疫组死亡率为 40%, 对照组分别为 60%、70%, 证明所制备的 *fimC* 蛋白卵黄抗体能在一定程度上抵抗鸡致病性大肠杆菌的攻击。

**关键词:** 致病性鸡大肠杆菌; *fimC* 基因; 克隆; 表达; 保护力

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0738-05

## Expression of *fimC* Gene from Pili of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and Immunity Protection Effectiveness of *fimC* Protein Yolk Antibody

WANG Ya-jun<sup>1\*</sup>, LI Yi-jing<sup>2</sup>

(1. North-East Forestry University, Harbin 150040, China;

2. North-East Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to determine immunity protection effectiveness of *fimC* protein from Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) after *fimC* protein was expressed. *fimC* gene was amplified from APEC O2, and then was cloned into pMD18-T vector and sequenced. The results showed that *fimC* gene was 657 bp and encoded 218 amino acids. The sequence of *fimC* gene was analyzed by homology comparing with that of human, they shared 97.9% homology in nucleotide and 96% in amino acid. The *fimC* gene was sub-cloned from pMD18-T vector into the plasmid vector pET-30c to construct a recombinant expression plasmid pET-30c-*fimC*, which was transformed into *E. coli* BL21. Then a fusion protein about 25 kDa was expressed by inducing with IPTG, and the expressed protien was proved to be antigenic by Western Blot analysis. The laying hens were immunized with the expressed *fimC* protein to prepare high yolk antibodies of *fimC*. One-day-old healthy chickens were immunized with the yolk antibodies of *fimC*, and injected with APEC next day, results showed that the mortality of immunized group and the control group was 60% and 70% respectively. The results indicated that *fimC* yolk antibodies could provide protection to some extent against the attacks of APEC.

收稿日期: 2008-12-24

基金项目: 黑龙江省“十五”攻关项目(G99B8-1-1)

作者简介: 王亚君(1974-), 女, 哈尔滨人, 讲师, 博士, 主要从事野生动物疾病的研究, E-mail: yajunwang416@163.com; Tel: 15804501379

\* 通讯作者: 王亚君

**Key words:** APEC; *fimC* gene; cloning; expression; immunity protection

鸡大肠杆菌病是由大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 的某些鸡致病性菌株所致的一类疾病的总称。随着养禽业的发展, 该病在各国的流行日益严重, 并导致巨大的经济损失。大肠杆菌病的多发性和多血清型性及耐药菌株的不断出现是造成该病难以有效预防和治疗的主要原因。大肠杆菌致病因子很多, 在诸多致病因子中, 由于 *type1* 菌毛兼具毒力因子和免疫原的特点, 在致病性大肠杆菌侵入机体, 并在体内定居、增殖、释放毒力因子的过程中起着重要的作用<sup>[1]</sup>, 成为目前国内外研究的热点。在致病过程中, 大肠杆菌首先通过菌毛黏附在宿主的黏膜表面, 借以抵抗机体的机械清除和胃肠黏膜的蠕动作用。禽源大肠杆菌与黏附有关的菌毛包括 *type1* 菌毛、P 菌毛和卷曲菌毛<sup>[2]</sup>。*type1* 菌毛主要在大肠杆菌致病的第一阶段起作用, 而大肠杆菌鞭毛和卷曲菌毛辅助于 *type1* 菌毛的定居, P 菌毛则是在细菌的进一步致病过程中起作用<sup>[3-5]</sup>。编码 *type1* 菌毛的 9 个基因已经确定, 分别是 *fimB*、*fimE*、*fimA*、*fimI*、*fimC*、*fimD*、*fimF*、*fimG* 和 *fimH*, *fimC* 与 *fimA* 的合成有关, 基因 *fimC* 的变异可导致菌毛合成功能的丧失, 且 *fimC* 和 *fimD* 协同在菌毛的装配及细菌的致病过程中起作用<sup>[6]</sup>。*fimC* 基因是 *type1* 菌毛的重要组成部分, 缺少 *fimC* 基因会造成 *type1* 菌毛的缺失, 造成 *E. coli* 黏附作用下降和毒力改变<sup>[7]</sup>。在此基础上, 作者拟通过 *fimC* 基因的原核表达获得 *fimC* 蛋白, 然后制备 *fimC* 蛋白的高免卵黄抗体并探讨其对鸡致性大肠杆菌的被动免疫保护效果, 以为 *type1* 菌毛的进一步研究及禽大肠杆菌病的诊断和预防提供理论依据和物质基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株及其来源

致病性鸡大肠杆菌 O<sub>2</sub> 菌株由作者教研室从黑龙江省一发病鸡场死亡的雏鸡分离<sup>[7]</sup>; 非致病性鸡大肠杆菌 E1 从雏鸡粪便中分离鉴定获得, 未鉴定血清型, 17% 甘油 -70 °C 保存。

### 1.2 实验动物

BALB/c 小鼠购自哈尔滨兽医研究所; 1 日龄健康公鸡购自东北农业大学孵化厂; 健康产蛋母鸡购自呼兰宏伟鸡厂。

### 1.3 试剂

蛋白酶 K、RNaseA、*rTaq* 酶, T<sub>4</sub> DNA 连接酶、pMD18-T 克隆载体及相关试剂购自宝泰克生物工程公司; *fimC* 蛋白鼠高免血清自制; 羊抗鼠 IgG 酶标二抗购自 Sigma 公司。

### 1.4 *fimC* 基因的 PCR 扩增及鉴定

常规提取细菌基因组 DNA<sup>[8]</sup>; 引物设计参考 GenBank 已发表的人致病性大肠杆菌 *fimC* 基因序列设计<sup>[9]</sup>, 在上游引物加 *Bam*H I 酶切位点, 在下引物中加 *Hind*III 酶切位点, *fimCU*: 5'-TTCTGCT-TGCTGGCAGGGATCCTG-3'; *fimCL*: 3'-ATT-GCGTCCCCCTAAAAATTCGAAGGG-5'; 质粒提取按碱裂解法进行<sup>[10]</sup>; 扩增条件: *fimCU* 1 μL (50 pmol · μL<sup>-1</sup>); *fimCL* 1 μL (50 pmol · μL<sup>-1</sup>); dNTPs 4 μL; 10 × PCR buffer 5 μL; *rTaq* 酶 0.5 μL; 模板 5 μL; 灭菌三蒸水 33.5 μL。将样品混合均匀后, 于 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 58.6 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物纯化并与 pMD18-T 载体连接后转化<sup>[8,10]</sup>, 通过酶切和序列测定鉴定阳性重组质粒。

### 1.5 *fimC* 基因在大肠杆菌中的表达

构建 pET-30c-*fimC* 重组质粒, 单、双酶切鉴定后转化 BL21(DE3) 感受态菌。挑取重组菌落及空载体菌落分别接于含 Kan 50 μg · mL<sup>-1</sup> 的 LB 液体培养基, 37 °C 摇床培养 12 h。取 0.2 mL 菌液 (1 : 100) 接种 20 mL LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 达 0.3~0.6 时, 各取 2 mL 菌液作诱导前对照, 剩余菌加 IPTG 到终浓度为 0.2 mmol · L<sup>-1</sup>, 37 °C 继续振荡培养 4 h 后取样测 OD<sub>600 nm</sub>, 将诱导后样品与诱导前样品处理后用于 SDS-PAGE<sup>[9]</sup>。

### 1.6 表达产物的 Western Blot 检测

将禽非致病性大肠杆菌 E1 自然菌体裂解物和禽致病性大肠杆菌 O<sub>2</sub> 自然菌体裂解物进行 SDS-PAGE 电泳后, 300 mA 电转印 2.5 h, 丽春红染色, 水洗脱色后放入含 5% 脱脂乳 PBS 中 4 °C 封闭过夜, 弃封闭液, 加入 *fimC* 蛋白鼠高免血清 (200 倍稀释), 37 °C 作用 2 h, 洗涤后; 加入羊抗鼠 IgG (1 000 倍稀释), 37 °C 作用 2 h, 洗涤后, 4-氯-1-萘酚显色。

### 1.7 表达产物 *fimC* 蛋白的免疫保护作用试验

1.7.1 *fimC* 卵黄抗体的制备 将提取的 *fimC* 包

涵体进行 SDS-PAGE 电泳后,切取目的片段,将胶条冻干溶于适量 pH7.4 PBS,作为抗原用于免疫产蛋母鸡。免疫前先收集 10 枚待免疫母鸡所产卵用作对照。三免 10 d 后,收集免疫母鸡卵黄抗体<sup>[10-12]</sup>。用同样方法提取免疫前 10 枚卵的卵黄抗体。

### 1.7.2 大肠杆菌 O<sub>2</sub> 半数致死量(LD<sub>50</sub>)的确定

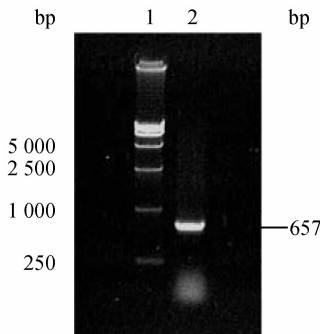
将 70 只 1 日龄健康雏鸡分成 7 组,每组 10 只,每组依次接种倍比稀释(10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup>)的 O<sub>2</sub> 菌液 0.2 mL,观察各组鸡只死亡情况,计算死亡比率及 LD<sub>50</sub>。

1.7.3 fimC 蛋白的免疫保护作用检测 将 60 只 1 日龄健康雏鸡分成 3 组,每组 20 只,第 1 组注射 fimC 蛋白制备的卵黄抗体,第 2 组注射 fimC 蛋白免疫前卵黄抗体,第 3 组注射等量生理盐水。1 d 后攻毒,每组分别以 LD<sub>50</sub>量注射 O<sub>2</sub> 菌液 0.2 mL,1 周内观察每组鸡只死亡情况,计算死亡率。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物电泳分析

1%琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 250 和 1 000 bp 之间出现一条清晰条带,大小约为 700 bp,与预期的片段大小相近,见图 1。



1. DNA 标准分子质量 DL 15000; 2. PCR 产物

1. DNA marker DL15000; 2. Product of PCR

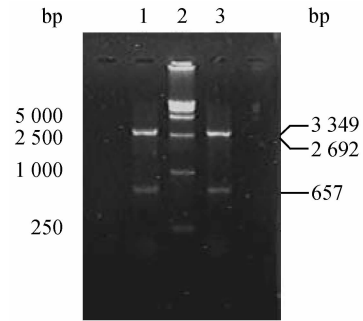
图 1 禽大肠杆菌 O<sub>2</sub> 1 型菌毛 *fimC* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of avian *E. coli* type 1 pili *fimC* gene

### 2.2 阳性重组质粒的筛选和序列测定

挑取转化大肠杆菌 TG-1 的菌落摇菌提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,电泳结果显示 2 条带,一条约 700 bp,另一条约 2 700 bp,见图 2。测序显示,该 DNA 片段与人大肠杆菌 type1 菌毛 *fimC* 基因序列同源性达 97.9%,氨基酸序同源性

为 96%,由此可见,所克隆的外源 DNA 即为鸡大肠杆菌 type1 菌毛 *fimC* 基因。



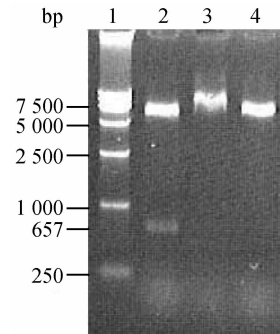
1,3. 重组质粒双酶切结果; 2. DNA 标准分子质量 DL15000

1, 3. *Bam*H I/*Hind* III digested recombinant plasmid; 2. DNA markers DL15000

图 2 重组质粒 *Bam*H I/*Hind* III 酶切鉴定结果  
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease cleavage

### 2.3 重组原核表达载体 pET-30c-*fimC* 的鉴定

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET-30c-*fimC* 得到约为 5 400 和 700 bp 左右的片段,证明重组质粒 pET-30c-*fimC* 构建成功,见图 3。



1. DNA 标准分子质量 DL15000; 2. 重组质粒 pET-30c-*fimC* *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切; 3. 重组质粒 pET-30c-*fimC* *Bam*H I 单酶切; 4. 质粒 pET-30c *Bam*H I 单酶切

1. DNA marker DL15000; 2. Recombinant plasmid pET-30c-*fimC* digested by *Bam*H I/*Hind* III; 3. Recombinant plasmid pET-30c-*fimC* digested by *Bam*H I; 4. Plasmid pET-30c digested by *Bam*H I

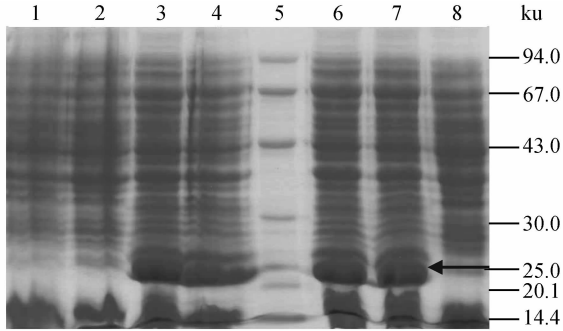
图 3 重组质粒 pET-30c-*fimC* 的酶切鉴定

Fig. 3 Electrophoresis of recombinant plasmid pET-30c-*fimC* digested by restriction enzyme

### 2.4 *fimC* 基因在大肠杆菌中的表达

结果表明,IPTG 诱导后重组菌在 25 ku 左右出

现一条蛋白带,而对照菌在相应位置上无此带,见图 4。



1. IPTG 诱导前含空载体的菌体裂解物;2. IPTG 诱导后含空载体的菌体裂解物;3、4、6、7. IPTG 诱导后 1、2、3、4 h 重组菌菌体裂解物;8. 未经 IPTG 诱导重组菌菌体裂解物;5 蛋白质相对分子质量标准

1. Whole cell protein from non-induced cells containing pET-30c; 2. Whole cell protein from IPTG-induced cells containing pET-30c; 3, 4, 6, 7. Whole cell protein from IPTG-induced cells containing pET-30c-*fimC* after 1, 2, 3, 4 h; 8. Whole cell protein from non-induced cells containing pET-30c-*fimC*; 5. Protein molecular weight markers

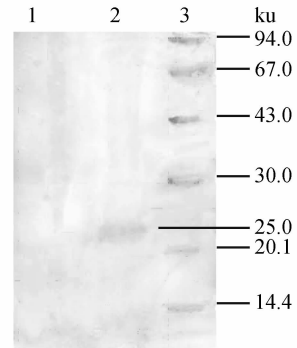
图 4 BL21 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed protein in BL21

## 2.5 表达产物的 Western Blot 检测

将禽非致病性大肠杆菌 E1 自然菌体裂解物和禽致病性大肠杆菌 O<sub>2</sub> 自然菌体裂解物进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测。由图 5 可见,在约 25

ku 处出现特异性条带,说明表达的 *fimC* 蛋白抗体与自然菌体中的 *fimC* 蛋白发生了特异性反应,表明重组 *fimC* 蛋白具有与天然 *fimC* 蛋白一样的反应原性。



1. 禽非致病性大肠杆菌 E1 自然菌体裂解物;2. 禽致病性大肠杆菌 O<sub>2</sub> 自然菌体裂解物

1. Whole cell protein from avian non-pathogenic *E. coli* E1; 2. Whole cell protein from avian pathogenic *E. coli* O<sub>2</sub>

图 5 *fimC* 融合蛋白的 Western Blot 分析

Fig. 5 Western Blot analysis of *fimC* fusion protein

## 2.6 *fimC* 卵黄抗体的免疫保护作用

经计算,致病性鸡大肠杆菌 O<sub>2</sub> 的半数致死量(LD<sub>50</sub>)是稀释 10<sup>-6</sup> 倍的菌液 0.2 mL,约 1.2×10<sup>3</sup> 个大肠杆菌。以半数致死量对 3 组免疫鸡只攻毒,*fimC* 卵黄抗体免疫组死亡率为 40%,两对照组为 60%、70%,攻毒试验结果如表 1 所示。

表 1 *fimC* 蛋白免疫保护作用试验结果

Table 1 Results of immunity protection of *fimC* protein

组别	死亡数	存活数	死亡率/%
Group	Dead	Survival	Dead rate
<i>fimC</i> 蛋白卵黄抗体免疫组 Group injected with <i>fimC</i> yolk antibody	8	12	40
对照卵黄抗体免疫组 Group injected with control yolk antibody	12	8	60
生理盐水对照组 Group injected with 0.9% salt water	14	6	70

## 3 讨论

在对畜禽大肠杆菌毒力因子的检测中常常偏重于对各种黏附性抗原和肠毒素的检测,还没有一种特异、敏感、简便、快速的检测方法。本实验室研究发现,*fimC* 基因在致病性鸡大肠杆菌菌株中扩增频率可达 95%<sup>[13]</sup>,这与国外报道的 92.7% 是相符

的<sup>[14]</sup>。因此可将 *fimC* 基因作为高致病力大肠杆菌的标志基因,在鸡致病性大肠杆菌病的检测中发挥重要作用。

在禽大肠杆菌病的免疫预防中,除了减毒活疫苗和灭活苗外,研究较多的就是菌毛亚单位疫苗,而基因工程苗尚未见报道。由于 type1 菌毛能提高致病性大肠杆菌的致病力,因此,它在制备阻止菌毛装

配和细菌黏附的抗生素方面有重要价值,已有试验证明 fimC-fimH 复合物在防止大肠杆菌的黏膜感染中的作用,提示其是一种有广阔应用前景的疫苗<sup>[15]</sup>。

*E. coli* 基因组结构相当复杂,相应的毒力因子也很多,较为重要、研究较多的主要有黏附素(主要是 type1 菌毛)、外膜蛋白、毒素、铁转运系统、质粒,因此,单独一毒力因子的某个基因所起的作用是非常有限的<sup>[7]</sup>。如果能将不同毒力因子的主要基因克隆到同一个非致病性 *E. coli* 株,制成基因工程活载体苗,将会对绝大多数鸡源致病性大肠杆菌具有免疫保护作用。例如以 tsh/fim/icuD 或 tsh/pap/icuD 制成的基因工程活载体苗可能是控制鸡致病性 *E. coli* 感染的有效途径<sup>[16]</sup>。在本试验中, fimC 蛋白高免卵黄抗体免疫组死亡率有所下降,但与两对照组差异并不显著,考虑到 fimC 蛋白只是在 type1 菌毛的装配过程中起重要作用的外周伴侣蛋白,它只是 type1 菌毛基因组中的一小段基因,要在众多毒力因子的协同下完成大肠杆菌的致病作用,因此, fimC 蛋白在致病过程中所起作用是其有限的,且试验中受到环境、温度、抗体滴度等因素的影响,结果可能不很精确,但从死亡率上看, fimC 蛋白对致病性大肠杆菌的攻击确有一定的抵抗力,这与资料中显示的 fimC 蛋白的重要性是一致的,因此,尽管 fimC 蛋白的免疫保护作用并不显著,但不能否认 fimC 蛋白的重要性。因此,本试验可为 fimC 蛋白功能的进一步研究和基因工程苗的研制提供理论依据。但由于目前 fimC 伴侣蛋白运载亚单位的机制、在细胞外停留时间还不十分清楚,因此, fimC 蛋白的保护作用机理还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈雷. 鸡大肠杆菌 I 型菌毛单克隆抗体的研制 [J]. 扬州大学学报, 2002, 3: 8-11.
- [2] COOLEY W A, WOODWARD M J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants [J]. *Med Microbiol*, 2000, 49: 327-338.
- [3] LAFONT J P. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks [J]. *Avian Dis*, 1984, 38: 231-239.
- [4] DOZOIS C M, CHANTELOUP N, MOULIN M, et al. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Avian Dis*, 1994, 38: 231-239.
- [5] NAVEH M W, ZUSMN T, SKUTELSKY E, et al. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli* effect on pathogenicity [J]. *Avian Dis*, 1984, 28: 651-661.
- [6] HELIO-NAVARRO R, MARILDA-VIDOTTO C, LUIS-GAZIRI C. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 59: 79-87.
- [7] 孙庆杰, 刘雪威, 李一经. 鸡致病性大肠杆菌 *fimC* 基因缺失菌株的构建及生物学特性鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(5): 730-737.
- [8] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 金冬雁, 等校译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 谢秀气, 王中来, 魏岩梅, 等. 鸡传染性法氏囊病卵黄抗体制备工艺中最佳沉降脱脂条件的确定 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(2): 25-26.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 欧阳琴, 王中来, 周建武, 等. 鸡传染性法氏囊病卵黄抗体制备 [J]. 福州大学学报, 2002, 30(2): 254-257.
- [12] 胡子信, 袁新, 张岐蜀, 等. 鸡抗猪大肠杆菌卵黄抗体的研制 [J]. 中国畜禽传染病, 1994, 2: 26-28.
- [13] 王亚君, 樊琛, 李一经. FimC 基因与鸡源大肠杆菌致病性的相关 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 6: 680-684.
- [14] JANBEN T, SCHWARZ C, PREIKSCHAT P, et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis [J]. *Int J Med Microbiol*, 2001, 291: 371-378.
- [15] SAULINO E, BULITT E, HULTGREN S. Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9240-9245.
- [16] NGELEKA M, BRERETON L, BROWUN G, et al. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(1): 143-152.