

禽大肠杆菌 O₂、O₇₈及其耐药、融合菌株的外膜蛋白免疫研究

陈红英¹, 黄青云², 陈根植³

(1 广东省公安厅 警犬基地, 广东 佛山 528244; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

3 广东省永胜生物制药有限公司, 广东 广州 510630)

摘要: 为了研究大肠杆菌 O₂、O₇₈及其耐药、融合菌株外膜蛋白的免疫原性, 用 Sarkosyl 处理和超速离心技术相结合的方法分别提取禽大肠杆菌强毒株 O₂、O₇₈ 耐药弱毒株 O₂(Nor^rChl^r)、O₇₈(Nor^sChl^r)及其融合双价弱毒株 O_{2.78}(Nor^rChl^r)等 5 个菌株的外膜蛋白(OMPs), 经 SDS-PAGE 结果均出现 1 条相同的相对分子质量在 31 000~43 000 之间的主要 OMPs 条带, 表明 5 个菌株存在相同的 OMPs 成分。将 3 个耐药菌株的 OMPs 分别免疫小白鼠和鸡, 结果均产生对 O₂、O₇₈良好的同源及交叉免疫保护效果。用各耐药菌株的 OMPs 做包被抗原, ELISA 方法都能交叉检测 3 个耐药菌株 OMPs 免疫鸡血清中 IgG 水平, 且各 IgG 的消长曲线基本一致。

关键词: 大肠杆菌; 外膜蛋白; ELISA

中图分类号: S852. 612

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)01-0106-04

Immunogenicity of the outer membrane proteins of poultry-sourced *Escherichia coli* O₂ and O₇₈, their antibiotics-resistant, and fusion strains

CHEN Hong-ying¹, HUANG Qing-yun², CHEN Gen-zhi³

(1 Police Dog Unit of Guangdong Provincial Bureau of Public Security, Foshan 528244, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

3 Guangdong Yongsheng Biologics Co. Ltd., Guangzhou 510630, China)

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the immunogenicity of the outer membrane proteins (OMPs) of virulent strains of *E. coli* O₂ and O₇₈ isolated from poultry and their resistant strains O₂(Nor^rChl^r), O₇₈(Nor^sChl^r), and resistant fusion strain O_{2.78}(Nor^rChl^r). The OMPs of the five strains were extracted by using sarkosyl-treatment plus ultracentrifugation and analyzed with SDS-PAGE. The results showed that the major OMP bands produced by the five strains were similar in size, between 31 000—43 000, indicating that they were of the same composition. The OMPs of three resistance strains could induce strong homologous and cross protective immunity in mice and chickens. Using OMPs extracted from the three resistant strains as coating antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the elicited serum IgG titer against OMPs, it was shown that each of the OMPs could detect IgG against all the three OMPs and that the IgG level was similar.

Key words: *Escherichia coli*; outer membrane proteins; ELISA

收稿日期: 2004-08-23

作者简介: 陈红英(1975-), 女, 硕士。通讯作者: 黄青云(1946-), 男, 教授; E-mail:

huangqingyunte@163.com

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(930413)

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

禽大肠杆菌病是影响全球养禽业发展的一种细菌性传染病, 给养禽业带来严重损失. 对该病的防治除加强管理外, 主要采用药物防治和菌苗预防. 药物易诱导耐药菌株, 并可产生对人类健康具有严重威胁的药物残留. 菌苗则由于禽大肠杆菌的血清型较多, 免疫保护具有 O 抗原特异性^[1], 故给预防工作带来较大的困难. 外膜蛋白 (Outer membrane proteins OMPs) 是革兰氏阴性菌外膜的主要结构成分. 外膜蛋白的免疫作用在脑膜炎奈瑟氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌等细菌中已被证实. 外膜蛋白具有免疫原性, 可以加快巨噬细胞对抗原的摄取^[2], 刺激机体产生体液免疫和细胞免疫^[3], 并可抵抗同源菌和异源菌的攻击^[4]. 人们对禽大肠杆菌各强毒株的 OMPs 型已有研究^[5~7]. 黄青云等^[8,9]以最常见的禽致病性大肠杆菌血清型 O₂、O₇₈培育成耐诺氟沙星 (Nor) 弱毒株 O₂ (Nor^rChl^s) 和耐氯霉素 (Chl) 弱毒株 O₇₈ (Nor^sChl^r), 并以原生质体融合技术融合成双价耐诺氟沙星、氯霉素弱毒株 O_{2,78} (Nor^rChl^r). 本研究以禽大肠杆菌强毒株 O₂、O₇₈ 及上述 3 个耐药弱毒菌株, 分别提取它们的外膜蛋白, 进行电泳, 并对 3 个耐药株 OMPs 的免疫原性进行研究, 旨在了解强毒菌株、耐药菌株及融合双价弱毒株之间是否有共同的 OMPs 的成分及免疫原性, 为研究外膜蛋白疫苗提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 禽大肠杆菌耐药弱毒株 O₂ (Nor^rChl^s) (简称 O₂^r)、O₇₈ (Nor^sChl^r) (简称 O₇₈^r) 及融合双价耐药弱毒株 O_{2,78} (Nor^rChl^r) (简称 O_{2,78}) 由华南农业大学兽医学院微生物教研室保存; 禽大肠杆菌 O₂、O₇₈ 强毒株 (简称 O₂、O₇₈), 购自中国兽药监察所.

1.1.2 试验动物 普通级成年小白鼠 (18~20 g), 70 只雌雄各半; 购自广东省生物药厂.

1 日龄江西土鸡: 购自华南农业大学实验鸡场. 在普通动物室, 严格消毒隔离条件下饲养到 27 日龄开始试验.

1.1.3 主要试剂 十二烷基肌氨酸钠 (Sarkosyl): 购自华美生物工程公司; 标准蛋白: 购自天象人生物工程有限责任公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗鸡 IgG 抗体: 购自晶美生物工程公司; SPF 鸡血清: 华南农业大学动物科学系家禽研究室惠赠; ND、ILT 阳性血清: 广州出入境检验检疫局动检室惠赠.

1.2 试验方法

1.2.1 OMPs 的提取、浓度测定及电泳 参照 Kapur 等^[9]的方法, 略加改进, 分别提取 5 个菌株的 OMPs. 按汪家政^[10]介绍 Bradford 检测法测定蛋白浓度. 按分子克隆实验指南的方法^[11]进行 OMPs 的 SDS-PAGE.

1.2.2 OMPs 对小白鼠的初步免疫试验 分别将 3 个耐药菌株的 OMPs 的油乳剂各肌注小鼠 6 只, 每只 0.2 mL (含 OMPs 50 μg). 首免后第 10 d 分别再次肌注未乳化的 OMPs, 剂量同首免. 二免疫后第 10 d 各组免疫小鼠再分 2 组, 每组 3 只, 分别用强毒菌株 O₂、O₇₈ 攻击, 连续观察 7 d 同时设立非免疫对照组.

1.2.3 OMPs 对鸡的免疫试验 将 3 个耐药株的 OMPs 油乳剂, 各肌注 27 日龄鸡 45 只, 每只 0.5 mL (含 OMPs 200 μg), 同时设非免疫对照组.

免疫后第 19 d, 从各 OMPs 免疫组中随机抽取 30 只, 再分 2 组, 分别用 O₂、O₇₈ 强毒菌肌注攻击, 连续观察 2 周, 同时设空白对照组.

1.2.4 OMPs 免疫鸡血清 IgG 抗体 ELISA 检测 各 OMPs 免疫组及对照组未攻击强毒菌的 15 只鸡, 分别在 OMPs 油乳剂免疫的第 1、7、14、21、35、42 d 采血, 分离血清, 以 O₂^r OMPs、O₇₈^r OMPs 和 O_{2,78}^r OMPs 为包被抗原, 交叉作 ELISA 检测 OMPs IgG.

先以 SPF 鸡血清 (1:100) 和 BSA (100 μg/mL) 直接包被酶标板, 测定酶标记抗体的工作浓度 (体积比) 为 1:8 000. 采用方阵滴定法测定各菌株 OMPs 最适包被质量浓度为 50 μg/mL, 被检血清的最适稀释度为 1:200 (体积比).

再分别以 O₂^r OMPs、O₇₈^r OMPs 及 O_{2,78}^r OMPs 作包被抗原, 重复检测 O₂、O₇₈ 阳性血清、SPF 阴性血清、ND 阳性血清、ILT 阳性血清, 确认间接 ELISA 检测 OMPs IgG 具有良好的特异性、重复性和敏感性.

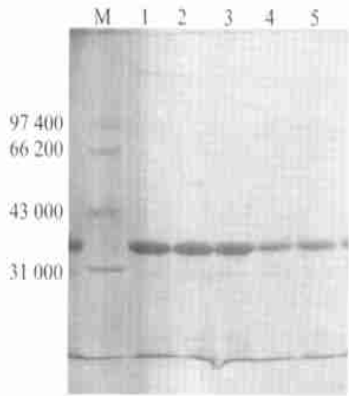
最后对各 OMPs 免疫鸡不同时期血清及对照鸡血清以 3 种 OMPs 包被抗原进行间接 ELISA 交叉检测, 每个血清样品重复 1 孔, 取均值, 计出 P/N 均值.

2 结果与分析

2.1 各菌株 OMPs 电泳

5 个菌株经反复抽提外膜蛋白并做 SDS-PAGE, 均在 31 000~43 000 之间出现 1 条相同的主要 OMPs 带 (图 1). 表明 O₂、O₇₈ 菌株含有相对分子质量大致相同的主要 OMPs, 这与国内外的研究报告基本一致. 而 O₂、O₇₈ 的耐药菌株和融合双价弱毒菌株

的主要 OMPs 看来未见明显改变.



M: 标准蛋白; 1: O_2^r ; 2: O_{78}^r ; 3: $O_{2.78}^r$; 4: O_2 ; 5: O_{78}
M: protein markers; 1: strain O_2^r ; 2: strain O_{78}^r ; 3: strain $O_{2.78}^r$;
4: strain O_2 ; 5: strain O_{78}

图 1 5 个禽大肠杆菌株 OMPs 的 SDS-PAGE 图

Fig. 1 OMPs patterns of five *Escherichia coli* strains from chicken

2.2 3 个耐药菌株 OMPs 的小白鼠和鸡的免疫保护试验

免疫保护试验结果(表 1、2)显示, 分别以 O_2^r OMP_s、 O_{78}^r OMP_s 及 $O_{2.78}^r$ OMP_s 免疫小鼠和鸡, 对 O_2 、 O_{78} 强毒株的攻击均具有良好的近期同 O 血清型和交叉保护效果.

2.3 3 个耐药弱毒菌株 OMPs 免疫鸡血清 IgG 抗体 ELISA 检测结果

表 3 结果表明, 应用 O_2^r OMP_s、 O_{78}^r OMP_s 及 $O_{2.78}^r$ OMP_s 为包被抗原间接 ELISA 交叉检测 3 个耐药菌株 OMP_s 油乳剂苗免疫鸡血清抗 OMP_s IgG 的消长情况基本一致. 在免疫后第 7 d 可检测到 IgG 抗体, 之后逐渐上升, 第 28 d 达到高峰, 随后逐渐下降, 到第 42 d 仍能维持较高水平.

表 1 小鼠 OMPs 免疫保护试验结果

Tab. 1 Results of the protection tests in mice immunized with OMPs

免疫组	小鼠数	攻击菌株	剂量	存活数	存活率
immune groups	no. of mice	challenging virulent strains	dosage	no. of survivors	survival rate
O_2^r OMP _s	3	O_2	3.0 LD ₅₀	3	3/3
	3	O_{78}	2.5 LD ₅₀	3	3/3
O_{78}^r OMP _s	3	O_2	3.0 LD ₅₀	3	3/3
	3	O_{78}	2.5 LD ₅₀	3	3/3
$O_{2.78}^r$ OMP _s	3	O_2	3.0 LD ₅₀	3	3/3
	3	O_{78}	2.5 LD ₅₀	3	3/3
非免疫对照组	6	O_2	3.0 LD ₅₀	0	0
	6	O_{78}	2.5 LD ₅₀	0	0

表 2 3 个耐药弱毒菌株 OMPs 对鸡免疫保护试验结果

Tab. 2 Results of the protection test in chickens immunized with OMPs

免疫组	试验鸡数	攻击菌株	剂量	存活数	存活率/%	保护率 ¹⁾ /%
immune groups	no. of chickens	virulent strains	dosage	no. of survivors	survival rate	protective rate
O_2^r OMP _s	15	O_2	5.0 LD ₅₀	14	93.33	73.33
	15	O_{78}	4.4 LD ₅₀	13	86.67	73.34
O_{78}^r OMP _s	15	O_2	5.0 LD ₅₀	14	93.33	73.33
	15	O_{78}	4.4 LD ₅₀	14	93.33	80.00
$O_{2.78}^r$ OMP _s	15	O_2	5.0 LD ₅₀	13	86.67	66.67
	15	O_{78}	4.4 LD ₅₀	12	80.00	66.67
非免疫对照	15	O_2	5.0 LD ₅₀	3	20.00	
	15	O_{78}	4.4 LD ₅₀	2	13.33	

1) 保护率= 免疫组存活率- 对照组存活率

表 3 ELISA 检测各菌株 OMPs 免疫鸡血清抗 OMPs IgG 效价 (P/ N 值)

Tab. 3 Antibody titers against OMPs of chickens vaccinated with OMPs detected by ELISA

包被抗原	t(免疫后	O ₂ ^r OMP _s 免疫组	O ₇₈ ^r OMP _s 免疫组	O ₂₋₇₈ ^r OMP _s 免疫组	非免疫对照组
coating	post-	group immunized	group immunized	group immunized	control
antigen	immunization)/d	with O ₂ ^r OMP _s	with O ₇₈ ^r OMP _s	with O ₂₋₇₈ ^r OMP _s	group
O ₂ ^r OMP _s	0	1. 176±0. 008	1. 087±0. 006	1. 000±0. 007	1. 102±0. 003
	7	2. 733±0. 102	3. 031±0. 134	2. 900±0. 064	1. 180±0. 021
	14	5. 872±0. 040	4. 691±0. 162	4. 526±0. 108	1. 377±0. 021
	21	8. 342±0. 099	8. 585±0. 027	8. 893±0. 068	0. 704±0. 011
	28	9. 160±0. 043	9. 470±0. 053	8. 974±0. 052	0. 862±0. 015
	35	8. 006±0. 052	8. 557±0. 033	8. 582±0. 045	1. 045±0. 008
	42	6. 670±0. 019	6. 060±0. 016	6. 659±0. 062	1. 227±0. 009
O ₇₈ ^r OMP _s	0	0. 670±0. 009	1. 194±0. 005	0. 934±0. 015	0. 956±0. 020
	7	2. 269±0. 143	3. 215±0. 080	2. 429±0. 215	0. 670±0. 011
	14	4. 878±0. 019	4. 911±0. 020	5. 057±0. 036	1. 034±0. 025
	21	9. 537±0. 043	8. 886±0. 018	9. 449±0. 032	1. 093±0. 013
	28	9. 897±0. 062	9. 507±0. 038	9. 904±0. 068	1. 139±0. 038
	35	7. 524±0. 028	8. 060±0. 015	8. 101±0. 023	0. 939±0. 015
	42	6. 994±0. 055	7. 446±0. 014	5. 252±0. 213	0. 873±0. 023
O ₂₋₇₈ ^r OMP _s	0	1. 042±0. 013	1. 143±0. 008	1. 104±0. 014	0. 104±0. 020
	7	2. 249±0. 043	2. 612±0. 061	2. 856±0. 081	1. 026±0. 014
	14	2. 994±0. 133	4. 704±0. 067	4. 105±0. 106	0. 978±0. 015
	21	6. 078±0. 110	6. 976±0. 050	7. 705±0. 012	1. 331±0. 023
	28	9. 129±0. 047	8. 758±0. 036	8. 355±0. 071	1. 180±0. 004
	35	7. 060±0. 068	7. 840±0. 002	7. 050±0. 046	0. 760±0. 017
	42	6. 393±0. 076	6. 756±0. 038	6. 903±0. 058	1. 061±0. 029

3 结论

本研究结果综合表明: 禽大肠杆菌 O₂、O₇₈ 菌株含有相同的主要 OMP_s 成分, 它们的耐药菌株和融合双价耐药弱毒菌株仍含有相同的主要 OMP_s 成分, 并具有相同的免疫原性和交叉免疫保护效果. 这些结果为进一步研究禽大肠杆菌 O₂、O₇₈血清型通用安全的 OMP_s 疫苗提供了科学依据. 至于 O₂、O₇₈ 灭活菌苗免疫具有明显的 O 血清型特异保护性, 而提取它们的主要 OMP_s 免疫后, 对 2 种血清型的强毒菌攻击则有交叉保护作用, 其机理有待进一步研究.

参考文献:

[1] 刘熙文. 禽大肠杆菌病四种弱毒疫苗免疫原性的研究 [J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(3): 12—14.

[2] KORN A, RAJABI I, WASSUM B, et al. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by the major outer membrane protein ompA of gramnegative bacteria [J]. Infection and Immunity, 1995, 63 (7): 2 697 — 2 705.

[3] 李福胜, 赵凤兰, 胡 军, 等. 鼠伤寒沙门氏杆菌外膜蛋白免疫原性及免疫保护性的研究 [J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1993, 13(3): 156—158.

[4] ROY S, DAS A B, GHOSH A N, et al. Purification pore-forming ability and antigenic relatedness of the major outer membrane protein of *Shigella dysenteriae* type 1 [J]. Infection and Immunity, 1994, 55(5): 1 239—1 242.

[5] KAPUR V, WHITE D G, WILSON R A, et al. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O₂ and O₇₈ strains that cause avian septicemia [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(4): 1 687—1 691.

[6] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 禽大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 的分离株外膜蛋白型的研究 [J]. 微生物学报, 1997, 37 (6): 463—468.

[7] 高 崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 我国部分地区禽源性大肠杆菌的外膜蛋白型 [J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 226—232.

[8] 黄青云, 陈金顶, 任 涛, 等. 禽大肠杆菌耐药标记弱毒株 O₂(Nor^rCh^r), O₇₈(Nor^rCh^r) 的培育 [J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(2): 89—93.

[9] 黄青云, 任 涛, 欧守抒. 禽大肠杆菌 O₂ 与 O₇₈ 的弱毒菌株原生质体融合的研究 [A]. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集 [C]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996. 188—192.

[10] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 77—109.

[11] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999. 332—366.

【责任编辑 柴 焰】