

大肠杆菌 K99 菌毛 *fan* 操纵子的克隆、表达及活性

羊扬¹, 厚华艳¹, 郁磊^{1,2}, 朱国强^{1*}

¹扬州大学兽医学院, 禽类预防医学教育部重点实验室, 扬州 225009

²南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要: 【目的】在体外克隆和表达猪产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) K99 菌毛操纵子 *fan* 结构基因, 并检测重组菌毛的相关生物学活性。【方法】以猪源分离的表达 K99 菌毛 ETEC C83907 株制取模板, 成功 PCR 扩增出编码 K99 菌毛的 *fan* 操纵子, 约 5.7 kb。将 *fan* 操纵子克隆入表达质粒载体 pBR322, 筛选出含正确阳性质粒的重组菌。进一步将上述的重组质粒 DNA 转化至不含任何菌毛的大肠杆菌 SE5000 株, 同时将空载体 pBR322 质粒转化入 SE5000 构建阴性对照菌株。【结果】该重组菌能与鼠抗 K99 菌毛单克隆抗体发生明显的凝集反应, 与新生仔猪小肠上皮细胞刷状缘 BBV 分子有强烈凝集反应。电镜观察到上述重组菌表面大量表达 K99 菌毛, 用热抽提法提纯其表达的 K99 菌毛, 并经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色, 可以得到分子量约为 18.5 kDa 的主要蛋白条带。纯化菌毛免疫小鼠后制备出高效价的鼠抗血清, 能与携带 K99 菌毛的 C83907、C83914、C83260 野生株发生强烈的凝集反应, 而与携带其他菌毛的 ETEC 不反应。玻板凝集试验和 Western blot 结果表明: 体外表达的 K99 菌毛具有和野生 K99 菌毛相同的抗原性。用表达 K99 菌毛的重组菌进行 HeLa 细胞体外黏附试验和黏附抑制实验, 结果表明: 重组菌和野生菌株一样具有较强的粘附性, 而且用重组菌毛制备的鼠抗血清能有效地抑制上述重组菌或野生菌株对细胞系的黏附结合。【讨论】本研究为进一步研究 K99 菌毛生物学作用建立了良好的实验平台。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌, K99 菌毛, *fan* 操纵子

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1524-07

由产肠毒素大肠杆菌 ETEC 引起的新生仔猪或断奶仔猪腹泻, 在养猪产业中, 以其较高的发病率和致死率, 造成了严重的经济损失^[1]。ETEC 在猪小肠中的定殖主要由菌毛介导, 使得 ETEC 具有粘附于肠细胞受体, 从而进一步定殖于肠道中的能力。ETEC 可以产生一种或多种肠毒素, 包括热敏肠毒

素和耐热肠毒素, 通过影响肠细胞的功能, 诱导类似霍乱的水样腹泻。在引起仔猪腹泻的 ETEC 中, 常见的菌毛粘附素包括 K88、K99^[2]、987P、F18 及 F41。其中携带 K99 菌毛的 ETEC 在我国广大地区均有流行和传播。

已知编码 K99 的基因簇位于 75 kb 大小的接合

基金项目: 国家自然科学基金 (30571374, 30771603, 31072136, 31270171); 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目 (08KJA230002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 教育部创新团队; 科技部转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08006-004B)

* 通信作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

作者简介: 羊扬 (1984–), 男, 江苏扬州人, 博士, 主要从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。E-mail: doubleyang360@gmail.com

收稿日期: 2012-06-30; **修回日期:** 2012-10-12

性质粒, 或 87.8 kb 分子量的非接合性质粒上。据报道^[3], K99 菌毛基因簇共有 8 个基因(图 1), 可编码产生 8 种多肽, 其生物学功能基本明确, 均与 K99 菌毛的生物合成装配相关。FanA 参与调节编码主要菌毛亚单位 FanC 的 *fanC* 基因表达, FanB 则参与调节其他五种结构基因(*fanD* 至 *fanH*) 表达。FanC 不仅是 K99 的主要菌毛亚单位, 而且是细菌与猪肠道上皮细胞糖脂受体相结合所需的成分。FanD 作为一种外膜蛋白, 与菌毛亚单位成分的输

出、装配和(或)锚定作用有关。FanE 多肽是一种周质蛋白, 在菌毛亚单位从胞浆转运至外膜过程中起着一种载体蛋白的功能, 还能保护 FanC、FanF、FanG 和 FanH 不受蛋白酶的降解。FanF 是 K99 菌毛的一种次要结构亚单位, 存在于该菌毛结构顶部和内部或沿菌毛轴分布, 在 K99 菌毛形成的开始和延伸过程中起作用。FanG 和 FanH 都是 K99 菌毛的次要成分, 它们与 FanF 有关, 并且参与菌毛的初始化和延伸^[4]。

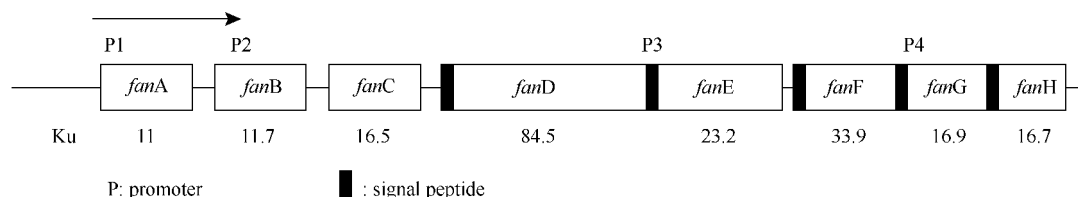


图 1 K99 菌毛的 *fan* 操纵子基因结构图

Fig. 1 Gene map of *fan* operon of K99 fimbriae.

多种物质通过对 *fanA*、*fanB* 基因的调控, 实现对 K99 菌毛表达的抑制, 故而本研究试图从猪源携带 K99 菌毛 ETEC 的基因组中克隆 K99 菌毛除 *fanA*、*fanB* 之外的全部操纵子基因(从 *fanC* 至 *fanH*), 利用 pBR322 表达质粒, 实现 K99 菌毛蛋白在非致病大肠杆菌中的非诱导性高效表达, 并对其表达的重组菌毛进行生物活性和免疫活性初步研究, 为 K99 ETEC 致病机理机制研究、制备 ETEC 的亚单位疫苗和免疫诊断以及治疗提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

E. coli K99 分离株 C83907、C83914、C83260、表达载体质粒 pBR322、*E. coli* SE5000, 均由本实验室保存; *E. coli* K99 菌毛单克隆抗体由扬州大学兽医学院微生物组董国雄老师惠赠; 鼠源 K88ac 多克隆抗体、F18ab 多克隆抗体、F18ac 多克隆抗体均由本实验室保存。

Agarose Gel DNA Extraction Kit、Ampicillin、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、 λ Hind III DNA Marker 均购自 Takara 公司; Expand Long Template PCR Kit 购自 Roche 公司; 标准低分子量蛋白、羊抗兔 IgG-HRP 购自上海华美生物工程公司、DAB (3'-3'-diamino benzidine)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、二巯基

苏糖醇 (DTT)、丙烯酰胺、N', N'-亚甲基双丙烯酰胺、PMSF、胶体金标记的羊抗小鼠 IgG 均为 Sigma 公司产品。Triton X-100、N, N, N, N-四甲基乙二胺 (TEMED) 为上海生物工程公司产品。其它常规试剂均为国产分析纯级产品。五周龄 ICR 小白鼠购自扬州大学实验动物房。

1.2 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 中 *fan* 操纵子各片段序列信息进行拼接, 并设计了扩增除 *fanA*、*fanB* 外全部 *fan* 操纵子的一对引物。上下游引物上分别插入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点, 引物由上海基康生物工程公司合成。以全菌裂解法处理本实验室保存的猪源 K99 野生株 C83907, 制备模板 DNA。根据改良长 PCR 方法设计 PCR 路线^[5], 进行扩增。扩增产物利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定, 与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5a 后, 筛选氨苄青霉素抗性克隆, 测序鉴定。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切消化凝胶回收试剂盒回收的 PCR 产物, 与 pBR322 质粒用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜, 并转化大肠杆菌 SE5000。碱裂解法小量抽提质粒鉴定, 随后利用单酶切和双酶切法, 以进一步确认重组质粒的构建正确与否。重组质粒命名为 pk99。同时, 将 pBR322 空质粒转化入 SE5000, 构建阴性对照菌 p322。

1.3 K99 菌毛单克隆抗体凝集反应

将 C83907 于 Minimal^[6] 培养基中、重组菌

pk99、p322 于 LB 培养基中培养过夜, PBS 清洗 2 遍, 重悬于适量 PBS。取 5 μ L 样品, 与不同稀释度的 K88ac 多克隆抗体、F18ab 多克隆抗体、F18ac 多克隆抗体、K99 单克隆抗体血清, 于玻板表面混匀, 室温孵育 2 min, 灯光下观察凝集反应结果。

1.4 鼠抗重组 K99 菌毛高免血清的制备

热抽提法^[7]从 pK99 重组菌中提取纯化重组 K99 菌毛, 与弗氏完全佐剂完全乳化, 经皮下多点注射免疫 3 只五周龄 ICR 小鼠, 50 μ g/只。3 周后二免, 与弗氏不完全佐剂完全乳化, 皮下注射 50 μ g/只。两周后, 取纯化重组菌毛 100 μ g 进行第三次免疫, 10 d 后眼球采血分离血清备用。

1.5 重组 K99 蛋白多克隆抗体凝集反应

将表达 K99 菌毛的野生株 C83907、C83914、C83260, 以及本实验室保存的分别携带 K88ab、K88ac、K88ad、F18ab、F18ac、987P 菌毛的 6 株野生 ETEC, 分别于适当培养基培养过夜, PBS 缓冲液清洗数次后重悬。各取 5 μ L 样品, 与不同稀释度的重组 K99 菌毛多抗血清, 于玻板表面混匀, 室温孵育 2 min, 灯光下观察凝集反应结果。

1.6 透射电镜观察

将 C83907、pK99 重组菌、p322 阴性对照菌分别用适当培养基培养 16 h 后, PBS 缓冲液洗涤数次重悬。随后吸取适量菌液, 悬浮于铜网, 并用磷钨酸负染 5 min。用 Philips Tecnai12-twin 透射电镜观察细菌菌毛。

1.7 免疫电镜观察

将含支持膜的铜网漂浮于重组菌 pK99、野生菌 C83907 和阴性对照菌 p322 菌液液滴的表面, 室温静置 15 min; 吸尽铜网上残余菌液, 用 1% 脱脂奶粉室温封闭 10 min; 吸尽残余液体后, 先用抗 K99 菌毛单克隆抗体 (1:400 稀释) 室温孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次, 再用金标羊抗小鼠 IgG (1:50 稀释) 室温孵育 60 min, PBST 洗涤 3 次; 吸尽残余液体, 用 2% 磷钨酸负染 3 min, 待干后透射电镜观察。

1.8 重组菌菌毛的提取和分析鉴定

重组菌 pK99 于 LB 中培养过夜, 用热抽提法 60℃30 分钟分离菌毛蛋白和进一步纯化, 按文献进行 12% SDS-PAGE^[7], 考马斯亮蓝 R250 染色, 观察表达菌毛主要蛋白条带和纯度。以 C83907 作为阳性对照, p322 作为阴性对照。

1.9 Western blot

取纯化 pK99 菌毛按文献以 BIO-RAD 转印系统, 将蛋白条带转移到 NC 膜上, 10% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜。PBST 洗涤 NC 膜 5 次, 依次加入 1:500 稀释的鼠源 k99 菌毛单克隆抗体, 1:50 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 孵育, DAB 底物显色。同时设 C83907 菌毛为阳性对照, p322 热抽提产物为阴性对照。抗重组菌毛多克隆抗体为一抗, 重复 Western blot。

1.10 体外细胞粘附实验

选择 HeLa 细胞^[8], 作为 K99 菌毛体外粘附实验细胞模型。培养 HeLa 细胞, 胰酶消化后于 96 孔板中, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液, 约含 10^5 个细胞, 细胞培养箱静置培养。MOI 为 100, 将含等量 10^7 CPU 对数期细菌的 C83907、pk99、p322 细菌培养液加入 96 孔板中, 感染细胞。细胞和细菌共孵育半小时。当细菌和细胞孵育 0.5 h 后, 用 PBS 轻轻冲洗被细菌感染的单层细胞, 洗去未粘附的游离细胞, 洗涤 3 次, 用 200 μ L 的 0.5–1% 的 Triton X-100 裂解细胞, 作用 10–15 min, 对细菌不会造成伤害, 但能裂解细胞; 细胞被裂解后, 粘附于其上的细菌也会脱落下来, 用移液器轻轻吹打, 收集细菌悬液, 进行倍比稀释后, 涂麦康凯平板进行细菌计数^[9]。每组试验重复 3 次。

1.11 体外细胞黏附抑制实验

过夜培养的野生菌 C83907、重组菌 pk99、阴性对照菌 p322 用 PBS 清洗数次, 加入重组菌毛免疫小鼠制备的鼠抗 K99 菌毛血清, 37℃ 孵育 30 min 后, 再与准备好的单层 HeLa 细胞作用^[8]。实验步骤与上一步细胞粘附实验相同。每组实验重复 3 次。

1.12 刷状缘大分子 (brush border vesicles, BBV) 凝集实验

从断奶仔猪身上取得取约 20 cm 小肠, 放置于冰预冷、含 0.05% 叠氮钠、0.2 mmol/L PMSF 的 PBS 溶液中; 按文献流程, 提取 BBV 大分子, 并将得到的 BBV 大分子储存于 -80℃ 待用^[10]。C83907、pk99、p322 过夜培养, PBS 清洗数次, 取适量菌液, 与等体积 BBV 溶液混合, 涂于玻板表面, 室温孵育 2 min, 灯光下观察凝集反应结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物电泳结果以及重组质粒的酶切鉴定

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳分析, 结果显示,

利用设计的引物,以 C83907 株 DNA 为模板,成功地扩增出了特异性的目的条带,其大小约为 5.7 kb,与预计的大小一致。将回收片段与 pMD-18T 载体连接,得到的疑似阳性质粒经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切,产物由琼脂糖凝胶电泳验证。以 T7 启动子通用引物测序,证明连接于 pMD18T 载体的片段为 *fanA*、*fanB* 以外的 *fan* 操纵子结构基因。

将上述 *fan* 基因利用双酶切,插入到 pBR322 表达载体。通过氨苄青霉素抗性筛选、双酶切鉴定及测序,证明插入的 *fan* 基因阅读框架完全正确,序列与已发表的 *fan* 操纵子各基因序列基本一致。

2.2 K99 *fan* 基因的表达

2.2.1 玻板凝集反应:将阳性质粒转化不表达任何粘附素的大肠杆菌 SE5000,培养过夜的菌液,可以与鼠抗 K99 菌毛单克隆抗体发生明显的玻板凝集反应,而不能与本实验室保存的 K88ac、F18ab、F18ac 多克隆抗体产生凝集反应。

利用热抽提法^[7],从大量培养的 pK99 菌种获得纯化的重组 K99 菌毛,并由 ICR 小鼠制备多克隆

抗体血清。利用此多抗血清,将本实验室储存的携带 K88ab、K88ac、K88ad、F18ab、F18ac、987P 菌毛的 6 株野生 ETEC 菌,与表达 K99 菌毛的野生株 C83907、C83914、C83260 一起,进行平板凝集实验。证明除 C83907 具有良好的凝集现象外,表达其他主要流行粘附素的 ETEC 菌株均不能与重组菌毛多克隆抗体血清发生反应。

2.2.2 电镜观察:将重组菌 pK99、野生菌 C83907 和转入 pBR322 质粒的阴性对照菌 p322,负染后用透射电镜观察,重组菌细胞表面布满菌毛,菌毛形态比野生型 C83907 更加致密,表明重组菌菌毛表达较好,而仅含 pBR322 质粒的重组 p322 菌无任何菌毛于体表表达。图略。

2.2.3 免疫电镜观察:在直接电镜观察的基础上,用抗 K99 菌毛单克隆抗体和金标羊抗小鼠 IgG 分别孵育后进行免疫电镜观察,结果显示野生菌和重组菌菌毛表面吸附有胶体金颗粒,阴性对照菌 p322 则未观察到上述现象,由此可初步断定表达的菌毛为 K99 菌毛。如图 2 所示。

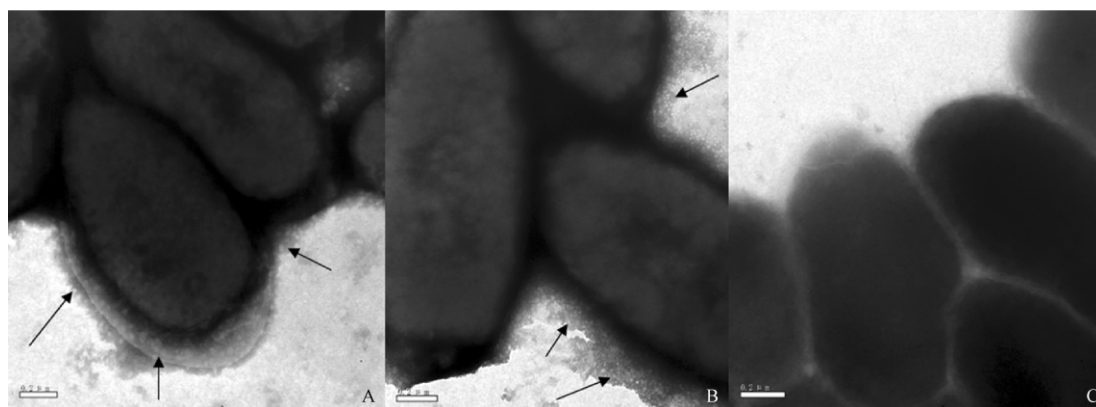


图 2 菌毛免疫电镜负染图(35000 ×)

Fig. 2 Immuno gold electron microscopy (35000 ×). A: C83907; B: pK99; C: p322.

2.3 重组菌毛的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

SDS-PAGE 结果显示,热抽提分离纯化的重组菌毛主要为一条蛋白条带,相对分子质量约为 18.5×10^3 ,与 *fanC* 表达的主要 K99 菌毛结构蛋白亚单位基本一致,与野生菌 C83907 热抽提分离纯化的菌毛主要条带大小一致,而阴性对照株 p322 的热抽提产物,经 SDS-PAGE 鉴定在 18.5 kDa 处并没有条带,证明重组菌毛由插入 pBR322 质粒的 *fan* 基因片段成功表达。免疫印迹法证明,利用 K99 菌毛单克隆抗体,经 1:500 稀释,能够特异识别野生株和重组

菌表达的菌毛条带,如图 3 所示。而鼠抗重组 K99 菌毛多克隆抗体,同样能够准确识别野生株和重组菌表达的菌毛主要亚单位条带(图略)。

2.4 体外细胞粘附实验及粘附抑制试验

根据文献报道,选择 HeLa 细胞系作为 K99 菌毛体外粘附实验的细胞模型。实验表明,野生株 C83907 和重组菌 pK99 都能够很好的粘附 HeLa 单层细胞,而阴性对照株 p322 几乎没有粘附 HeLa 细胞的能力。如果将制备的重组菌毛多抗血清分别与野生菌和重组菌 37℃ 孵育 0.5 h,则发现野生菌和

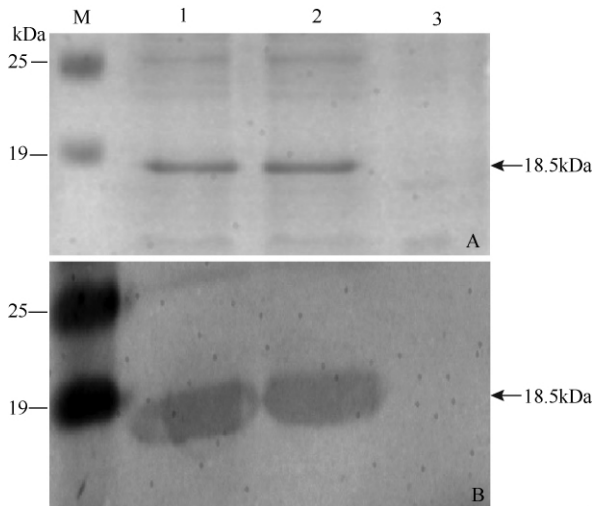


图3 菌毛抽提物 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) Fig. 3 SDS-PAGE analysis (A) and western-blotting analysis (B) for K99 fimbriae. M. Marker; 1. C83907; 2. pK99; 3. p322.

重组菌粘附细胞的能力受到极大削弱,如图4所示;而利用 K99 菌毛单克隆抗体进行的粘附抑制实验,得到了相同结果(图略)。

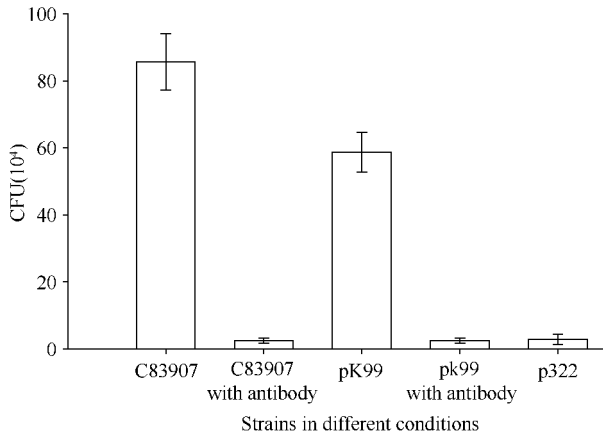


图4 表达 K99 菌毛蛋白大肠杆菌的黏附特性 Fig. 4 Adherence properties of *E. coli* expressing K99 fimbriae.

2.5 刷状缘大分子凝集试验

由仔猪肠道提取的刷状缘大分子,能够与表达 K99 菌毛的野生菌和重组菌发生极其强烈的玻板凝集现象,而不表达 K99 菌毛的 p322 株,则无法与 BBV 大分子菌毛发生凝集反应。

3 讨论

K99 菌毛的表达受葡萄糖、丙酮酸盐、阿拉伯

糖、乳糖、醋酸盐等物质的抑制及代谢产物的负调控,病原中分离的表达 K99 的 ETEC 菌株,在体外环境中,需要在 Minimal 培养基等复杂条件下才能表达 K99 菌毛。而本研究建立的 pK99 重组菌,在除去了调节基因 *fanA*、*fanB* 后,排除了丙氨酸、亮氨酸、分解代谢产物等通过 Lrp (亮氨酸相关调控蛋白) 介导以抑制 K99 转录的可能;同时利用 pBR322 的高效启动子,非诱导、高效、专一的表达 K99 菌毛 *fanC* 结构蛋白,使得重组 K99 菌毛可以在 LB 培养基等简易培养条件中大量表达。通过玻板凝集反应、热抽提法提取重组菌毛和免疫电镜,证明重组蛋白表达于细菌体表,并且表达的重组菌毛具有与野生 K99 菌毛相同的生物学特性和免疫学特性;通过重组质粒在不表达任何粘附素和毒力因子的 SE5000 菌株中的大量复制,构建了 K99 单一毒力因子平台,为不受其他黏附素和毒力因子干扰下进一步研究 K99 菌毛生物学作用建立了良好的实验平台。

研究人员正着力于构建携带各种毒力因子的益生菌口服疫苗^[11],其中,携带 ETEC 粘附素的益生菌^[12],能够由粘附素介导,更长时间的停留定植于宿主肠道中,有着广泛而深刻的用途^[13-14]。本研究中,表达除 *fanA*、*fanB* 外全部完整操纵子的非诱导性菌毛高效表达质粒的建立,为表达 ETEC 粘附素的益生菌产品的研发奠定了基础。

对猪致病性大肠杆菌致病机制的研究主要集中在动物感染上,而很少进行猪小肠源细胞系细胞体外感染试验。研究人员已经尝试寻找各种合适的细胞模型对猪源 ETEC 的粘附能力进行实验,包括红细胞模型^[15]、人肠道细胞模型^[16]、BBV 分子模型^[17]、人肿瘤细胞系模型^[18]等。针对产 K88 菌毛和 F18 菌毛的 ETEC,立足于猪小肠上皮细胞 IPEC-J1 和 IPEC-J2 基础上的体外细胞感染模型可以满足大部分菌株的需要^[9],但这种细胞模型对 K99 菌毛并不适用。我们采用 HeLa 细胞^[8]进行 K99 菌毛体外粘附和粘附抑制实验,证明在阴性对照菌 p322 无法粘附细胞的同时,表达 K99 的野生株和重组菌都能表现出较强粘附能力,并且这种粘附能力能够被鼠抗 K99 血清有效抑制。我们发现重组菌的粘附能力要稍弱于野生菌 C83907。在本实验室之前的试验中,证明了 C83907 表达鞭毛,在泳动平板上具有运行性;而本实验室已证明了细菌鞭毛同样具有体外粘附细胞、介导细菌定殖肠道的能力^[19, 20],故

而重组菌和野生菌之间的黏附力差异有可能是由其他粘附因子介导的,由此也证明了此 K99 单毒力因子平台建立的重要性。为了进一步研究细菌粘附素与猪小肠上皮细胞受体间更直接的联系,本研究继续用 BBV 分子凝集实验,验证了野生菌和重组菌与仔猪肠道受体的直接反应。ETEC K99 感染易感仔猪的第一步也是最重要的一步,就是黏附素和宿主细胞表面相应的大分子受体特异性结合。HeLa 细胞粘附模型和 BBV 分子模型凝集的建立,有助于对 ETEC K99 的黏附、侵入、增殖及宿主的应答等进行多方面的深入研究。

参考文献

- [1] Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 2005, 6 (1) : 17-39.
- [2] Moon HW, Nagy B, Isaacson RE, Orskov I. Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 + enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infection And Immunity*, 1977, 15 (2) : 614-620.
- [3] Braaten BA, Platko JV, van der Woude MW, Simons BH, de Graaf FK, Calvo JM, Low DA. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (10) : 4250-4254.
- [4] Jacobs AA, van den Berg PA, Bak HJ, de Graaf F K. Localization of lysine residues in the binding domain of the K99 fibrillar subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 872 (1 - 2) : 92-97.
- [5] Nelson WS, Prodohl PA, Avise JC. Development and application of long-PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. 1996, 5 (6) : 807-810.
- [6] Guinee PA, Jansen WH, Agterberg CM. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infection And Immunity*, 1976, 13 (5) : 1369-1377.
- [7] Khan AS, Schifferli DM. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesion. *Infection And Immunity*, 1994, 62 (10) : 4233-4243.
- [8] Jay CM, Bhaskaran S, Rathore KS, Waghela SD. Enterotoxigenic K99 + *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Veterinary Microbiology*, 2004, 101 (3) : 153-160.
- [9] Koh SY, George S, Brozel V, Moxley R, Francis D, Kaushik RS. Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130 (1 - 2) : 191-197.
- [10] Khan AS, Schifferli DM. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesion. *Infection And Immunity*, 1994, 62 (10) : 4233-4243.
- [11] Wang Z, Yu Q, Gao J, Yang Q. Mucosal and systemic immune responses induced by recombinant *Lactobacillus* spp. expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus H5N1. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012, 19 (2) : 174-179.
- [12] Wei CH, Liu JK, Hou XL, Yu LY, He XJ. Protection of mice immunized orally with recombinant *Lactobacillus casei* against *E. coli* K99. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009 (10) : 794-799. (in Chinese) 魏春华, 刘建奎, 侯喜林, 余丽芸, 何晓杰. 表达大肠杆菌 K99 重组干酪乳杆菌口服免疫小鼠的免疫保护性研究. *中国预防兽医学报*, 2009 (10) : 794-799.
- [13] Wei CH, Liu JK, Hou XL, Yu LY, Lee JS, Kim CJ. Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99. *Vaccine*. 2010, 28 (24) : 4113-4118.
- [14] Hou XL, Yu LY, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123 (1 - 3) : 86-92.
- [15] Evans DJ, Evans DG, Dupont HL. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infection And Immunity*. 1979, 23 (2) : 336-346.
- [16] Knutton S, Lloyd DR, Candy DC, Meneish AS. In vitro adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells from mucosal biopsies. *Infection And Immunity*. 1984, 44 (2) : 514-518.
- [17] Baker DR, Billey LO, Francis DH. Distribution of K88 *Escherichia coli*-adhesive and nonadhesive phenotypes

- among pigs of four breeds. *Veterinary Microbiology*, 1997, 54 (2) : 123-132.
- [18] Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri E. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95 (6) : 1177-1184.
- [19] Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 2012.
- [20] Duan Q, Zhou M, Zhu X, Bao W, Wu S, Ruan X, Zhang W, Yang Y, Zhu J, Zhu G. The flagella of F18ab *Escherichia coli* is a virulence factor that contributes to infection in a IPEC-J2 cell model in vitro. *Veterinary Microbiology*, 2012.

Cloning, expression and activity of K99 fimbrial operon gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*

Yang Yang^{1, 2}, Huayan Hou^{1, 2}, Lei Yu^{1, 3}, Guoqiang Zhu^{1, 2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

² Ministry of Education Key Lab for Avian Preventive Medicine, Yangzhou 225009, China

³ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China

Abstract: [Objective] To clone and express *fan* operon gene clusters of K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in vitro, and study the activity of the recombinant *E. coli* expressing K99 fimbriae. [Methods] K99 fimbriae gene clusters were amplified by long-PCR method, using the genomic DNA of K99-fimbriae *E. coli* C8307 as the DNA template. The 5.7Kb PCR products were inserted into expressing vector pBR322 with restriction endonuclease, then positive clones were screened. The positive recombinant plasmid was transformed into non-fimbriae *E. coli* SE5000 strains, and pBR322 plasmid was also transformed into SE5000 for negative control strain. [Results] The recombination *E. coli* expressing K99 fimbriae was tested with agglutination assay, using monoclonal antibody serum and brush border vesicles from the piglet small intestinal epithelia cells. The expressed fimbriae on the surface of the recombinant *E. coli* SE5000 were observed by transmissible electromicroscope. Heat extraction method was employed to isolate and purify K99 fimbriae, which was exerted SDS-PAGE, and 18.5 kDa protein band was detected. The mouse sera produced from recombinant fimbriae was used to test K99-fimbriae strains C83907, C83914, C83260 with positive agglutination results, while negative results were found with *E. coli* contain other kinds of fimbriae. The assays of SDS-PAGE, Western blot, agglutination assay were used to evaluate antigenicity and biologic activity between C83907 and recombinant strain. Adhesion test with HeLa cell line demonstrated the recombinant strain and wild type have the similar adherence ability, and this adhesion can be inhibited with mouse serum containing polyclonal antibody against recombinant K99 fimbriae. [Conclusion] This study has laid a good foundation for further study on bioactivity of K99.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*, K99 fimbriae, *fan* operon

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571374, 31072136, 30771603, 31270171), by the Jiangsu High Education Key Basic Science Foundation (08KJA230002), by the Genetically Modified Organisms Technology Major Project of China (2009ZX08006-004B), by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University "PCSIRT": IRT0978 and by the Priority Academic Program of Development Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

Received: 30 June 2012 / Revised: 12 October 2012