

鸭源致病性大肠杆菌 I 型菌毛 *pilA* 基因的原核表达及重组蛋白对强毒攻击的免疫保护作用

Prokaryotic Expression of *pilA* Gene of Type I Pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Ducks and the Immunoprotection Effect of Recombinant Expression Protein Challenged with Virulent Strains

程安春^{1,2‡}, 于小娜^{1,3‡}, 汪铭书^{1,2*}, 朱德康^{1,2}, 李玲¹, 孙磊¹, 陈孝跃¹

CHENG An-Chun^{1,2‡}, YU Xiao-Na^{1,3‡}, WANG Ming-Shu^{1,2*}, ZHU De-Kang^{1,2}, LI Ling¹, SUN Lei¹ and CHEN Xiao-Yue¹

1 四川农业大学动物科技学院禽病防治研究中心 雅安 625014

2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014

3 双汇实业集团有限公司技术中心 漯河 462000

1 Avian Disease Research Center, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China

2 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, China

3 Technology Center of Luohe City Shineway Industry Group Co., Ltd., Luohe 462000, China

摘 要 根据 GenBank 中人源大肠杆菌 *pilA* 基因序列,用 OLIGO6.0 设计 PCR 引物,从鸭源致病性大肠杆菌 GH1.2 中扩增到 *pilA* 基因并将其克隆至 pMD18-T 载体。经 PCR、酶切和 DNA 测序鉴定后,将鸭源致病性大肠杆菌 *pilA* 基因正向插入原核表达载体 pET-32a(+) 的 *Bam*H I 和 *Hind*III 位点间,成功构建了重组表达质粒 pET-32a-*pilA*。重组表达质粒 pET-32a-*pilA* 转化表达宿主菌 BL21(DE3),用 IPTG 诱导,表达出了大小约为 36kD 的 *pilA* 重组蛋白。表达产物用镍柱亲和层析纯化,与等量弗氏佐剂混合制备 *pilA* 重组蛋白疫苗,分别在 1 日龄、8 日龄时两次对雏鸭进行免疫。二免后 2 周测定鸭血清中的 ELISA 抗体效价,并以 10^9 PFU 同源菌株 GH1.2 攻毒,根据攻毒后鸭的死亡率、*E. coli* 分离率和各组织器官的病变等级来判定 *pilA* 重组蛋白的免疫保护作用效果。结果 *pilA* 重组蛋白免疫鸭的血清中 ELISA 抗体效价为 1:12800,全菌灭活疫苗免疫组的血清 ELISA 抗体效价为 1:200;同源菌株攻毒后,*pilA* 重组蛋白免疫保护组鸭的死亡率、*E. coli* 分离率和各组织器官的病变程度均比攻毒对照组下降且差异显著或极显著,与全菌灭活疫苗组比较差异不显著。表明 *pilA* 重组蛋白对同源菌株 GH1.2 的感染具有一定的保护效果。

关键词 鸭大肠杆菌, I 型菌毛, *pilA* 基因, 原核表达, 免疫原性

中图分类号 S858.32 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0440-06

Received: October 24, 2006; Accepted: November 20, 2006.

This work was supported by the grants from the Major Programs of National Science and Technique(No. 2004BA901A03), the Program for New Century Excellent Talents in University(No. NCET-04-0906), the Key Basic Research Programs of Sichuan Province(No. 05JY029-109) and the Key Construction Subject Items of Sichuan Province(No. SZD0418).

* Corresponding author. Tel : + 86-835-2885774 ; E-mail : mshwang@163.com

‡ The first two authors contribute equally to this work.

国家科技攻关重大项目(No. 2004BA901A03)、教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(No. NCET-04-0906)、四川省重大基础研究项目(No. 05JY029-109)和四川省重点建设学科项目(No. SZD0418)资助。

Abstract A pair primer was designed by Oligo 6.0 according to the *pilA* gene sequence of *E. coli* isolated from human in GenBank. The *pilA* Gene was obtained by PCR with the enteropathogenic *E. coli* isolated from ducks as template and cloned into pMD18-T vector. It was identified by PCR, restriction endonuclease analysis, DNA sequencing and then subcloned into *Bam*H I / *Hind*III site of prokaryotic expression vector pET-32a(+) and recombinant expression plasmid pET-32a-*pilA* was constructed successfully. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and 36kD *pilA* recombinant protein was expressed and induced with IPTG. The protein was purified by Ni-agarose affinity chromatography and was prepared as vaccine with Freund's adjuvant. The ducklings were immunized with the vaccine at 1 and 8-day-old respectively. Two weeks after last immunized, the antibody titer of duck serum was detected by ELISA and the ducklings were challenged with 10^9 PFU enteropathogenic *E. coli* GH1.2 virulent strain. The immunoprotection effect of *pilA* recombinant protein vaccine was evaluated according to the mortality, re-isolated rate of *E. coli*, and grades of pathological changes. The results show that the antibody titer are 1:12800, but 1:200 were detected from ducklings immunized with homologous whole cells *E. coli* inactivated vaccine. The mortality, re-isolated rate of *E. coli*, degree of pathological changes of immunized ducklings is lower than that of the control ducklings and showed significant or extremely significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), but non-significant difference compared to the ducklings which immunized with homologous whole cells *E. coli* inactivated vaccine ($P > 0.05$). The results show that *pilA* recombinant protein has some immunoprotection effect with the challenging of virulent strains of *E. coli* GH1.2.

Key words *E. coli* isolated from ducks, type I pilus, *pilA* gene, prokaryotic expression, immunoprotection

鸭致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)可侵害各种年龄的鸭而引起鸭大肠杆菌病,表现多种病型,包括大肠杆菌性败血症、大肠杆菌性生殖器官病、肉芽肿、腹膜炎、脐炎、眼炎、脑炎等病型,其中以败血症大肠杆菌病最常见,且常与鸭疫里默氏杆菌病、沙门氏菌病等并发或继发,已成为危害养鸭业的重要疾病之一^[1]。

I 型菌毛在禽大肠杆菌感染过程中,可与禽呼吸道粘膜上皮细胞表面的相应受体以一种“锁-钥匙”的方式特异性结合,结合后 *E. coli* 不易被机体清除,很容易侵入呼吸道深部增殖,从而在致病过程中发挥重要作用^[2-5]。I 型菌毛还具有好的免疫原性,可诱导机体产生抗体,此抗体与入侵细菌菌毛结合,封闭菌毛上受体结合位点,阻断感染的第一个环节,从而防止禽大肠杆菌病的发生^[6,7]。因此对 I 型菌毛的研究对防制禽大肠杆菌病具有重要意义。

大肠杆菌 I 型菌毛的编码基因位于染色体上,由 *pil*(或 *fim*)及相关基因簇编码,其中 *pilA* 基因是编码 I 型菌毛主要结构亚单位(*FimA*)的基因^[8,9]。目前对禽大肠杆菌 I 型菌毛的研究国内外均主要集中在鸡源大肠杆菌上^[3-7,10-13],对鸭源大肠杆菌 I 型菌毛的研究国内外均未见报道,本研究对鸭源致病性大肠杆菌 I 型菌毛主要结构亚单位基因 *pilA* 进行 PCR 扩增、原核表达,并对表达产物的免疫原性进行研究,以期阐明鸭源大肠杆菌 I 型菌毛 *pilA* 基因的功能并利用 I 型菌毛 *pilA* 基因研制鸭大肠杆菌病基因工程疫苗或诊断试剂提供理论依据和

基础素材。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒:鸭源致病性大肠杆菌 GH1.2(血清型 O93)由四川农业大学动物科技学院禽病防治研究中心分离、鉴定和提供;基因工程菌 DH5 α 、BL21(DE3)购自 Promega 公司,表达载体 pET-32a(+)购自 Novagen 公司。

1.1.2 实验动物:1 日龄健康樱桃谷鸭,购自四川农业大学实验鸭场。

1.1.3 主要仪器:PCR 仪(Biometra, T gradient),凝胶成像系统(Bio-Rad, Versa Doc Model 2000),超声波破碎仪(Ultrasonic Processor-500),低压层析仪(Bio-Rad, Biologic LP),小型 PAGE 电泳仪(Bio-Rad)。

1.1.4 主要试剂:PyrobestTM DNA Polymerase、限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Hind*III、T4 DNA 连接酶、pMD-18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司;硅胶膜型TM DNA 纯化试剂盒、硅胶膜型TM 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自北京赛百盛公司;NI-IDA 填料购自 Bio-Rad 公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中人源大肠杆菌 *pilA* 基因序列^[14],用 OLIGO6.0 设计 PCR 引物。上游引物 P1 为 5'-CGCGGATCCAAGGAAAGCAGCATGAA-3'(划线部分为 *Bam*H I 酶切位点);下游引物 P2 为:5'-CCGAAAGCTTGGAAAGCTGCGCTGAAACCTA-3'(划线部分

为 *Hind*Ⅲ 酶切位点), PCR 产物的跨幅为 603bp。

1.3 *pilA* 基因的 PCR 扩增

按常规方法提取鸭源致病性大肠杆菌 GH1.2 基因组 DNA 后, 按下体系进行 *pilA* 基因 PCR 扩增: $10 \times$ buffer 5 μ L, dNTP(10mmol/L)1 μ L, 上下游引物(25 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 5 μ L, Pyrobest™ DNA Polymerase(5u/ μ L)0.5 μ L, 总体积 50 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 然后 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察、照相。

1.4 *pilA* 基因的克隆和鉴定

将扩增的 PCR 产物按试剂盒说明书克隆至 pMD-18-T 中, 转化感受态细胞 JM109, 重组体命名为 pMD-18-T-*pilA*。用硅胶膜型™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒提取 pMD-18-T-*pilA* 质粒 DNA, 以引物 P1、P2 进行 PCR 鉴定, 并用 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ 进行酶切鉴定, 最后送大连宝生物工程公司测序鉴定。

1.5 *pilA* 基因原核表达质粒的构建及鉴定

重组质粒 pMD-18-T-*pilA* 及表达载体 pET-32a(+) 分别用 *Bam*H I / *Hind*Ⅲ 双酶切, 经 8g/L 琼脂糖凝胶电泳; 用硅胶膜型™ DNA 纯化试剂盒分别回收纯化目的基因 *pilA* 片段和线性化的 pET-32a(+), 二者在 T4DNA 连接酶作用下于 16℃ 连接过夜, 转化感受态细胞 DH5 α , 用含 Amp(100 μ g/mL) 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆, 用 *Bam*H I / *Hind*Ⅲ 酶切鉴定, 重组质粒命名为 pET-32-*pilA*。

1.6 *pilA* 基因在大肠杆菌中的表达与重组蛋白的纯化

将重组表达质粒 pET-32-*pilA* 转化感受态细胞 BL21(DE3), 取单个表达菌接种 5mL LB 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL), 37℃ 剧烈振荡培养过夜作种子菌。将种子菌以 1:100 接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 达 0.6 左右时, 加入 IPTG 至终浓度 0.2mmol/L, 继续剧烈振荡培养 4h。离心收集表达菌体, 用 PBS 洗涤、悬浮, 经超声波破碎、溶菌酶裂解等一系列处理后, 用镍柱亲和层析纯化表达的重组蛋白。

1.7 *pilA* 重组蛋白的免疫原性研究

1.7.1 免疫原的制备 将镍柱亲和层析纯化的蛋白与等量弗氏佐剂混合至蛋白终浓度为 500 μ g/mL 制备成为 *pilA* 重组蛋白疫苗; 全菌灭活苗的制备参照文献 [15]。

1.7.2 动物的分组、免疫和攻毒 1 日龄樱桃谷鸭

20 只 随机分为 4 组, 每组 5 只。A 组为 *pilA* 重组蛋白免疫保护组, 分别在 1 日龄和 8 日龄时颈部皮下注射 *pilA* 重组蛋白疫苗 0.2mL/只; B 组为全菌灭活苗免疫保护组, 分别在 1 日龄、8 日龄时注射全菌灭活苗 0.2mL/只; C 组为攻毒对照组, D 组为正常对照组。22 日龄时, A、B、C 组腹腔注射 *E. coli* GH1.2, 10^9 PFU/只。

1.7.3 免疫鸭的 ELISA 血清效价测定 所有实验鸭分别于攻毒前采血分离血清, 以纯化的 *pilA* 重组蛋白作包被抗原, 参照文献 [16] 进行血清 ELISA 抗体效价检测, 结果判定标准为: 阴性对照血清平均 OD 值加 3 倍标准差为临界值, 大于临界值为抗体阳性, 反之为阴性。

1.7.4 免疫鸭发病死亡和病变观察及细菌分离培养 记录攻毒后各组实验鸭的发病死亡情况, 一周后未死亡鸭全部捕杀, 参照文献 [6] 观察记录所有实验鸭在发病死亡或捕杀鸭的肝脏、心包和气囊病变程度, 没有病变记 0 分; 轻度气囊炎、心包炎、肝周炎记 1 分; 浆液性气囊炎、心包炎、肝周炎记 2 分; 纤维性气囊炎、心包炎、肝周炎记 3 分; 严重的纤维性气囊炎、心包炎、肝周炎记 4 分。采取心、肝和脑, 按常规方法进行大肠杆菌的分离培养。

2 结果与分析

2.1 *pilA* 基因的 PCR 扩增

以鸭源致病性大肠杆菌 GH1.2 基因组 DNA 作模板, 用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见一条约 600bp 特异性的 DNA 条带, 扩增片段大小与 *pilA* 基因预期大小相符(图 1)。

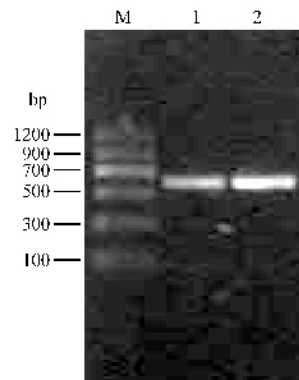


图 1 鸭源致病性大肠杆菌 *pilA* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR products of *pilA* gene from enteropathogenic *E. coli* isolated from ducks

M: DNA markers; 1: GH1-2.

2.2 *pilA* 基因的克隆和鉴定

pilA 基因的 PCR 扩增产物经 T 载体克隆后获得的重组质粒 pMD-18-T-*pilA*, PCR 能扩增到约 600bp 特异性的 DNA 条带; *Bam*H I / *Hind* III 双酶切, 重组质粒中含约 600bp 的插入片段; DNA 序列测定, 表明 pMD-18-T-*pilA* 中含有 603bp 的插入片段, 包含有 *pilA* 基因完整的开放阅读框(ORF), 大小为 549bp, 共编码 182 个氨基酸。

2.3 *pilA* 基因原核表达质粒的构建及鉴定

重组质粒 pMD-18-T-*pilA* 及表达载体 pET-32a (+) 经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切、凝胶电泳回收目的片段、连接、转化感受态细胞 DH5 α , Amp 琼脂平板筛选到命名为 pET-32-*pilA* 的阳性克隆经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切鉴定, 表达载体 pET-32a (+) 中有约 600bp 的片段(即 *pilA* 基因)插入, 表明 *pilA* 基因原核表达质粒构建成功。

2.4 *pilA* 基因在大肠杆菌中的表达与重组蛋白的纯化

重组表达质粒 pET-32-*pilA* 转化表达宿主菌 BL21 后, 用 IPTG 诱导培养, 表达了一 36kD 的特异性蛋白, 与预期 *pilA* 基因重组表达蛋白大小相一致(即 16kD 左右 *pilA* 蛋白 + 20kD 左右硫氧还蛋白); 而空载体 pET-32a (+) 转化菌诱导后是在 20kD 处出现一表达产物为 20kD 左右硫氧还蛋白的特异性条带, 未诱导表达菌株及 BL21 诱导菌株则未出现特异性蛋白条带(图 2)。经薄层扫描分析, 表达的重组 *pilA* 蛋白约占菌体总蛋白的 13%。

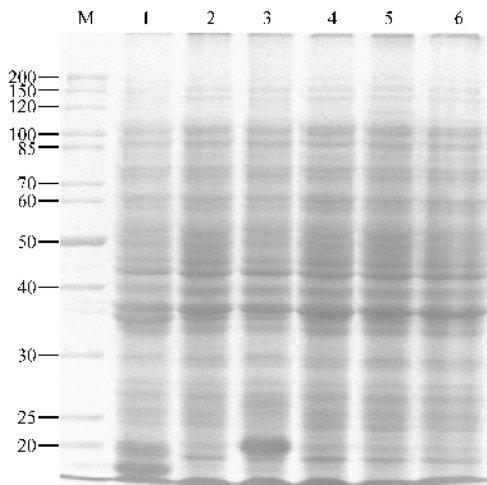


图 2 重组表达质粒 pET-32-*pilA* 在 BL21(DE3) 中的表达

Fig. 2 The expression of recombinant plasmid pET-32-*pilA* in BL21(DE3)

M: protein markers; 1: pET-32-*pilA* induced by IPTG; 2: pET-32-*pilA* uninduced; 3: pET-32a(+) induced by IPTG; 4: pET-32a(+) uninduced; 5: BL21(DE3) induced by IPTG; 6: BL21(DE3) uninduced.

pilA 基因重组表达蛋白经镍柱亲和层析纯化, SDS-PAGE 电泳结果呈单一条带(图 3), 表明得到了较纯的 *pilA* 重组蛋白。纯化后的重组 *pilA* 蛋白经计算其产量约为 2mg/L 菌液。

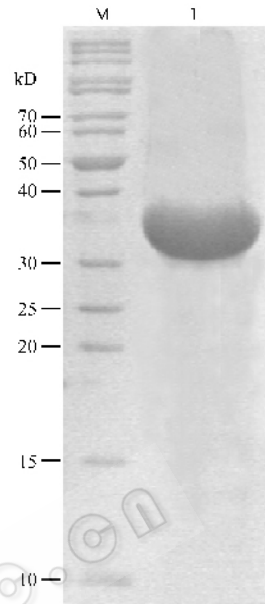


图 3 重组蛋白过柱纯化结果

Fig. 3 The result of the recombinant protein purified by the Ni⁺ NTA agarose gel column

M: protein markers; 1: the recombinant protein purified by the Ni⁺ NTA agarose gel column.

2.5 *pilA* 重组蛋白的免疫原性研究

实验鸭经 *pilA* 重组蛋白和全菌灭活苗免疫后, 以纯化的 *pilA* 重组蛋白作包被抗原检测血清中 ELISA 抗体效价, 测得阴性对照血清平均 OD 值为 0.0978 标准差 *S* 为 0.003421, 根据大于 $X + 3S$ ($X + 3S = 0.108$) 为阳性的判定标准, *pilA* 重组蛋白免疫组的血清 ELISA 抗体效价为 1:12800, 全菌灭活苗免疫组的血清 ELISA 抗体效价为 1:200(表 1)。

经 *pilA* 重组蛋白和全菌灭活苗免疫的鸭, 用同源菌株 GH1.2 进行攻毒, 各组死亡率、*E. coli* 分离情况、平均病变等级见表 2。从表 2 可看出, 用同源菌株攻毒后, *pilA* 重组蛋白免疫保护组和全菌灭活苗免疫保护组的死亡率比攻毒对照组低, 差异极显著 ($P < 0.01$); 而 *pilA* 重组蛋白免疫保护组与全菌灭活苗免疫保护组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。 *pilA* 重组蛋白免疫保护组和全菌灭活苗免疫保护组从心、肝和脑中分离到 *E. coli* 的比例比攻毒对照组低, 与攻毒对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); 而 *pilA* 重组蛋白免疫保护组与全菌灭活苗免疫保护组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。 *pilA* 重组蛋白免疫保护组

和全菌灭活苗免疫保护组的心、肝、脑的平均病变等级也均低于攻毒对照组,与攻毒对照组之间差异显

著 ($P < 0.05$);而 *pilA* 重组蛋白免疫保护组与全菌灭活苗免疫保护组之间差异不显著 ($P < 0.05$)。

表 1 血清 ELISA 抗体效价
Table 1 Antibody titer of duck serum detected by ELISA

Group		Serum dilution								
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600
A	Average OD_{450nm}	0.345	0.317	0.288	0.247	0.216	0.188	0.153	0.112	0.099
	results evaluation	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	Average OD_{450nm}	0.176	0.116	0.102	0.099	0.090	0.071	-	-	-
	results evaluation	+	+	-	-	-	-	-	-	-

表 2 雏鸭免疫保护试验结果
Table 2 The immunoprotection result of duck

Group	Mortality	Re-isolating rate of <i>E. coli</i>			Average grades of pathological changes		
		heart	liver	brain	liver	pericardium	air sac
A	0/5	0/5	0/5	1/5	0.4	0.4	0.2
B	0/5	0/5	0/5	1/5	0.8	0.4	0.4
C	1/5	1/5	1/5	2/5	0.8	1.2	0.6
D	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0	0

3 讨论

鸭源致病性大肠杆菌 *pilA* 基因完整的开放性阅读框 (ORF) 大小 549bp^[17], 编码蛋白分子量较小, 如果进行非融合表达, 则产物可能容易被胞内蛋白酶降解, 如果进行分泌型表达, 则蛋白的表达量可能会低, 且有可能产生信号肽被不完全切割或非特异性切割现象, 因此对鸭源致病性大肠杆菌 *pilA* 基因我们选择了融合表达的形式, 将 *pilA* 基因克隆入融合表达载体 pET-32a(+), 构建重组表达质粒 pET-32-*pilA*, 在 IPTG 的诱导下, *pilA* 基因重组蛋白大量表达, 表达产物为与 20kD 左右的硫氧还蛋白相偶联的融合蛋白, 大小 36kD 左右, 在宿主菌内较稳定, 可避免胞内酶的降解; 且带有 $6 \times \text{His}$ 标签, 可用亲和层析技术对表达产物进行分离纯化。

李尚波等^[10]将鸡致病性大肠杆菌的 *pilA* 基因插入表达载体 pET-28a(+), 转化入受体菌 BL21 (DE3), 重组表达菌株经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测, 结果重组菌株可以良好地表达鸡致病性大肠杆菌 I 型菌毛蛋白, 产物大小为 18kD 左右, 但未对其活性进行研究。高崧^[11]等用 pGEX-6p-1 对 3 株禽源大肠杆菌 *pilA* 基因进行表达, 表达产物与 GST 相偶联, 大小 42kD 左右, 其中 2 株重组菌可与抗禽源性大肠杆菌 I 型菌毛多克隆血清呈现一致的较强反应, 其中 1 株反应较弱, 说明对 *pilA* 基因进行融合表达, 其表达产物具有一定的活性。本研究用 pET-32a(+)对 *pilA* 基因进行融合表达, 表达产物免疫鸭后, 免疫鸭血清中 *pilA* 蛋白的 ELISA 抗体效价达

1:12800, 表明表达产物具有良好的免疫原性。全菌灭活苗免疫组的血清中 *pilA* 蛋白的 ELISA 抗体效价为 1:200, 比 *pilA* 重组蛋白免疫组低, 可能是全菌灭活苗中也含有菌毛, 但菌毛较少, 它们刺激机体产生了少量的菌毛抗体, 此抗体可与表达的重组蛋白相结合; 全菌灭活苗免疫组的血清 ELISA 抗体效价比 *pilA* 重组蛋白免疫组的低, 还有可能因为其免疫程序和测定抗体水平的未到达最佳。根据大多数禽大肠杆菌可表达 I 型菌毛的特点和本研究中 *pilA* 重组蛋白免疫鸭后产生高水平的 ELISA 血清抗体, 提示我们有可能利用原核表达的 *pilA* 重组蛋白检测致病性大肠杆菌感染鸭血清或利用原核表达的 *pilA* 重组蛋白制备高免血清用于检测致病性大肠杆菌, 这尚待实验的进一步研究和证实。

在 *pilA* 重组蛋白对雏鸭免疫保护试验中, 从攻毒后死亡率及心、肝、脑细菌分离情况看, 重组蛋白免疫组及全菌灭活苗组免疫保护效果相同; 从肝、心包、气囊平均病变等级看, 全菌灭活苗免疫组病变程度重于重组蛋白免疫组。表明重组蛋白苗及全菌灭活苗免疫均具有一定的免疫保护效果, 重组蛋白免疫效果优于全菌灭活苗免疫。这进一步证明 I 型菌毛在禽大肠杆菌致病过程中发挥重要作用^[2-5], I 型菌毛的重组蛋白具有良好的免疫原性, 可诱导机体产生抗体, 此抗体与入侵细菌菌毛结合, 封闭菌毛上受体结合位点, 阻断感染的第一个环节, 从而防止禽大肠杆菌病的发生^[6,7]; 而全菌灭活苗免疫鸭可能由于菌体上的菌毛刺激机体产生的抗体水平低于重组蛋白免疫组, 导致其病变程度稍重。可见, 通过 I

型菌毛 *pilA* 基因的表达产物对雏鸭进行免疫,可保护雏鸭抵抗同源菌株的攻击。目前,对 I 型菌毛免疫原性的研究,是对优势血清型的菌株进行体外培养,提取菌毛,制成菌毛油乳苗,对鸡进行免疫,制备的疫苗可不同程度地保护鸡抵抗大肠杆菌的攻击^[6,7,12,13],但因体外培养,I 型菌毛表达与否及产量高低,受多种因素的影响,导致其成本太高,不是制造大肠杆菌疫苗的理想方法;重组蛋白基因工程亚单位苗具有高产量、可稳定表达等优点,因此基因工程亚单位苗在实际生产中具有更广泛的应用前景,对防制禽大肠杆菌病具有重要意义。但从以 *pilA* 重组蛋白作包被抗原检测全菌灭活苗免疫鸭血清的 ELISA 抗体滴度较低和攻毒鸭组织器官中细菌的分离率、接种鸭大肠杆菌病的症状和病变方面也同时说明 I 型菌毛在病原性大肠杆菌对禽致病中的作用是有限的^[19],I 型菌毛在病原性大肠杆菌对致病性大肠杆菌的感染的免疫保护作用也是有限的^[19]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cheng AC (程安春). Breeding of Duck, Prevention and Cure of Disease. Beijing: China Agricultural University Press (中国农业大学出版社), 2003, pp. 187 - 189.
- [2] Beachey EH. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Infectious Disease*, 1981, **143**: 325 - 345.
- [3] Dozois C M, Chanteloup N, Dho-Moulin M, et al. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 1994, **38**: 231 - 239.
- [4] Vidotto MC, Navarro HR, Gaziri LC. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, 1997, **59**: 79 - 87.
- [5] Melha M, Maryvonne DM, Charles MD, et al. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity*, 2003, **71**(1): 494 - 503.
- [6] Grymah JE, Panigrahy B. Immunogenicity of an oil-emulsified *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. *Avian Disease*, 1985, **29**(4): 1078 - 1083.
- [7] Grymah JE, Panigrahy B, Williams JD. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Disease*, 1986, **30**: 687 - 689.
- [8] Klemm P. The *fimA* gene encoding the type 1 fimbrial subunit of *Escherichia coli* nucleotide sequence and primary structure of the protein. *Eur J Biochem*, 1984, **143**(2): 395 - 399.
- [9] Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, et al. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol*, 1995, **45**: 297 - 309.
- [10] Li SB (李尚波), Wang WC (王文成), Zhang GG (张贵刚). Construction of expression vectors and detection of prokaryotic expression products of type 1 pili *pilA* gene of avian pathogenic *Escherichia coli* (serotype O1, O2 and O78). *Liaoning Animal and Veterinary Science* (辽宁畜牧兽医), 2003(1): 3 - 5.
- [11] Gao S (高崧), Peng DX (彭大新), Wu XD (吴晓东), et al. Cloning, sequencing and expression of *fimA* of type 1 pili on avian *Escherichia coli* Isolates. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003, **34**(3): 292 - 298.
- [12] Wang HH (王辉平), Zhang ZZ (张中直), Gan MH (甘孟侯). Studies on the immunogenicity of pili vaccine of *Escherichia coli* (serotype O78) pathogenic to Chicken. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 1994, **25**(2): 174 - 179.
- [13] Sui ZH (隋兆峰), Liu WQ (刘文强), Fan WX (范伟兴), et al. Cross protection of type 1 fimbriae vaccine of Avian pathogenic *E. coli* and nucleotide sequence analysis of *FimA* gene. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报), 2003, **25**(6): 440 - 443.
- [14] Omdorff PE. Nucleotide sequence of *pilA*, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1985, **162**: 454 - 457.
- [15] Jiang P (姜平). *Veterinary Biologology*. Beijing: China Agricultural Press (中国农业出版社), 2003, pp. 187 - 189.
- [16] Mao NY (毛乃颖), Zhang Y (张燕), Zhu Z (朱贞), et al. Establishment of an ELISA assay to detect the IgG antibody of SARS coronavirus and its application. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2004, **20**(1): 73 - 78.
- [17] Yu XN (于小娜), Wang MS (汪铭书), Cheng AC (程安春), et al. PCR amplification and sequence analysis of type 1 pili *pilA* gene of *Escherichia coli* isolated from ducks. *Journal of Sichuan Agricultural University* (四川农业大学学报), 2006, **24**(3): 325 - 330.
- [18] Ackermann MR, Cheville NF. Ultrastructural studies of the lung of turkeys (*Meleagris gallopavo*) inoculated intratracheally with *Escherichia coli*. *Vet Pathol*, 1991, **28**: 183 - 191.
- [19] Marc D, Arne P, Bree A, et al. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*-mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 1998, **149**(7): 473 - 485.