生物工程学报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2008, September 25; 24(9): 1561-1567
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2008 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

研究报告

致病性鸡大肠杆菌 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因的克隆、表达及其免疫原性

于珊，张倩，水小溪，于宙亮，赵宝华

河北师范大学生命科学学院，石家庄 050016

摘 要： 根据 GenBank 公布的致病性鸡大肠杆菌的 I 型菌毛 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因序列，分别设计了两对引物，并以分离的致病性鸡大肠杆菌基因组为模板，经 PCR 特异性扩增出 *pilA* 基因和 *ompC* 基因，基因产物大小为别为 549 bp 和 1104 bp，与 GenBank 报道的参考菌株的两个基因序列的同源性为高达 98.18%和 97.28%。将扩增得到的两个基因分别定向克隆到原核表达载体 pET-28a 中，得到两个重组质粒 pET*pilA* 和 pET*ompC*，转化大肠杆菌 BL21(DE3)中，得到重组菌株 BL21(pETpilA)和 BL21(pETompC)，经 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 分析分别可见表达的 20 kD 和 40.9 kD 的特异条带；Western blotting 结果表明，两种蛋白可与抗体发生特异性结合，说明其具有良好的免疫原性。将表达的菌毛蛋白和外膜蛋白的菌株分别制成基因工程疫苗，免疫小鼠后，具有很好的保护能力，表明这两株基因工程菌株有望作为鸡致病性大肠杆菌基因工程疫苗的候选生产菌株。

关键词： 鸡致病性大肠杆菌，I 型菌毛，外膜蛋白，克隆，原核表达,免疫原性

Cloning, Expression and Immunity of *pilA* Gene and *ompC* Gene from Avian Pathogenic *Escherichia coli*

Shan Yu, Qian Zhang, Xiaoxi Shui, Zhouliang Yu, and Baohua Zhao

College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, *China*

Abstract: In order to amplify *pilA* gene and *ompC* gene of avian *pathogenic Escherichia coli* (APEC) strain, two pairs of primers were designed according to the GenBank sequences, and a 549 bp *pilA* gene and a 1104 bp *ompC* gene were obtained by PCR separately. Sequence analysis indicated that the homology of the nucleotide sequence of AEPC strain to those other reference strains was 98.18% of the *pilA* gene and 97.28% of the *ompC* gene. Two expression plasmids pET*pilA* and pET*ompC* were constructed by inserting *pilA* gene and *ompC* gene into the prokaryotic expression vector pET-28a. The two plasmids were transformated into *E. coli* BL21 separately and two recombinant strains BL21 (pET*pilA*) and BL21 (pET*ompC*) were obtained. The type 1 fimbraie and the out membrane protein were highly expressed when the recombinant strain BL21 (pET*pilA*) and BL21 (pET*ompC*) were induced by IPTG. Two specific proteins were detected by SDS-PAGE and immunogenicity of the expressed protein was confirmed by Western blotting and ELISA. The expressed fimbraie and OmpC were transformed into vaccine. The protective immune response was proved after the mice were immunized with the two vaccines. The results showed that the recombinant strain BL21 (pET*pilA*) and BL21 (pET*ompC*) could be as candidate vaccine to provide protective immune response against AEPC infection.

Received: February 23, 2008; **Accepted:** April 16, 2008
Supported by: the Natrural Science Fund of Hebei Education Office (No. 2001240) and the Hebei Province Tackle Key Problems in Science and Technology Funds (No. 012201130).
Corresponding author: Baohua Zhao. Tel: + 86-311-86268434; Fax: + 86-311-86268313; E-mail：zhaobaohua86178@sohu.com
河北省教育厅自然科学基金项目(No. 2001240)，河北省科技攻关项目(No. 012201130)资助。

Keywords: APEC, *pilA*, *OmpC*, immunity

鸡大肠杆菌病是一种以由大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)为原发性或继发性病原体引起的一类疾病的总称，各个品种各个日龄的鸡均可发病。JOYA(1991)首次从腹泻病鸡体内分离出产肠毒素大肠杆菌(ETEC)。该病在临床上主要表现为败血症、纤维性气囊炎、肝周炎、心包炎和腹膜炎[1]。随着养禽业的发展，鸡大肠杆菌病发病率趋于增高，在各国的流行日益严重，导致了巨大的经济损失，已成为危害养鸡业的重要疾病之一。因此作为一种潜在的人畜共患病，本病具有重要的流行病学及公共卫生意义。

有研究发现由鸡大肠杆菌质粒编码的外膜蛋白(OmpC)在其致病过程中起重要作用[2]，与大肠杆菌外膜的通透性有关，是重要的毒力因子，位于外膜外侧。肠杆菌外膜蛋白具有良好的免疫原性，不仅可加快巨噬细胞对抗原的提呈作用，刺激机体产生体液和细胞免疫，对不同血清型分离株具有交叉保护作用。近年来国内外学者的研究表明，Ⅰ型菌毛是禽大肠杆菌的重要致病因子。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，从而粘附在宿主的粘膜和上皮表面，借以抵抗机体的机械清除和胃肠粘膜的蠕动作用。结合后的 *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[3−6]。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[7,8]，因此对Ⅰ型菌毛 *pilA* 基因的研究对防制禽大肠杆菌病具有重要意义。

目前控制鸡大肠杆菌病主要是使用抗菌药和疫苗。抗菌药的使用面临着耐药菌株和药物残留的困扰，已研制出的铝胶苗，油乳剂灭活苗，亚单位苗和用非致病性鸡源 *E. coli* 作为活疫苗，安全性低，而且最常用的为当地分离菌株，鸡源 *E. coli* 不同血清型菌株之间缺乏完全交叉保护。因此,到目前为止，仍未找到一种理想的疫苗能保护不同菌株的攻毒。本研究首先对致病性鸡大肠杆菌 O_1 进行了药物敏感实验的研究，然后对鸡源致病性大肠杆菌的 *ompC* 基因和Ⅰ型菌毛主要结构亚单位基因 *pilA* 进行 PCR 扩增、原核表达、进行 Western blotting 检测，并对表达产物的免疫原性进行研究，以期为阐明鸡源大肠杆菌 *ompC* 和 *pilA* 基因的功能并为利用 *ompC* 和 *pilA* 基因研制鸡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，并为进一步研制预防鸡致病性大肠杆菌基因工程疫苗奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

鸡大肠杆菌 O_1，大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α，原核表达载体 pET-28a 由本室保存；克隆载体 pUCm-T 购自上海生工生物技术有限公司。

1.2 酶和试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收纯化 Kit 购自鼎国生物技术有限责任公司。

1.3 Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因的克隆与序列分析

1.3.1 *细菌基因组 DNA 和质粒 DNA 的提取*

参考精编分子生物学实验指南。

1.3.2 *引物的设计与合成*

根据 GenBank 公布的鸡源致病性大肠杆菌 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因全序列设计了两对引物 P1, P2 和 PO1, PO2。 P1 和 P2 的 5′端分别加有 *Nco* I 和 *Bam*H I 的识别序列，上游引物 P1: 5′-CATGCCATGGCGATGAAAATTAAAACTCTGGC-3′，下游引物 P2: 5′-CGCGGATCCTTATTGATACTGAACCTTGA-3′。PO1, PO2 分别引入 *Bam*H I 和 *Hin*d III 的酶切位点，上游引物 PO1: 5′-CGCGGATCCAACATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTC-3′，下游引物 PO2: 5′-CCCAAGCTTTTAGAACTGGTAAACCAGGCC-3′。

1.3.3 *pilA 基因和外膜蛋白 C 基因的克隆*

分别以提取的致病性鸡大肠杆菌 O_1 基因组 DNA 和质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应。反应体系 50 μL，扩增条件为 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 45°C 1 min, 72°C 1 min，共 30 个循环，再 72°C 延伸 10 min。2 个目的基因片段经 1%的琼脂糖凝胶电泳分离、回收，分别连入 pUCm-T，经双酶切鉴

定，得到 2 个重组质粒 pUCmT-pilA 和 pUCmT-OmpC。

1.3.4 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因的序列分析

将克隆的 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因片段送上海生工生物技术服务有限公司进行序列测定，并采用 DNAMAN 软件对基因序列进行同源性分析。

1.4 Ⅰ型菌毛 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因原核表达载体的构建和表达

1.4.1 *pilA 基因和外膜蛋白 C 基因原核表达载体的构建*

将质粒 pUCmT-*pilA* 和 pUCmT-*ompC* 分别用 *Nco* I 和 *Bam*H I; *Bam*H I 和 *Hin*d III 双酶切，回收目的片段分别连接入同样酶切的表达载体 pET-28a，并转化入宿主菌 *E. coli* BL21 中，在含卡那青霉素的选择培养板上 37°C 孵育过夜，酶切鉴定含重组质粒的阳性克隆菌，分别命名为 BL21/pETa-*pilA* 和 BL21/pETa-*OmpC*。

1.4.2 *重组菌株 pilA 基因和外膜蛋白 C 基因的诱导表达*

重组菌株 BL21/pETa-*pilA* 和 BL21/pETa-*ompC* 在含卡那青霉素的 LB 液体培养基中于 37°C 培养过夜，以 1%(*V*/*V*)的接种量转接到新鲜 LB 培养基中，在 37°C 培养至 A_{600} 为 0.4~0.6，加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37°C 诱导目的蛋白表达约 4 h。取 1 mL 菌液离心收集菌体，变性处理后，进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色后观察结果。同时以转入空白质粒的大肠杆菌 BL21/pET-28a 作对照。

菌体重悬于 10 倍体积的 buffer A(50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 5% glycerol, pH 7.5)中，超声破碎菌体后离心，以确定目的蛋白在菌体细胞中的存在形式。

1.4.3 *表达产物的 Western blotting 检测*

将重组菌 BL21(pET-*pilA*)、BL21(pET-*ompC*)和其粗提包涵体分别经 SDS-PAGE 电泳后转印硝酸纤维素膜，以鼠抗α毒素高免血清为一抗，HRP 标记的兔抗鼠 IGg 为二抗进行 Western blotting 分析。

1.5 鸡大肠杆菌基因疫苗的制备和免疫原性的研究

1.5.1 *疫苗的制备*

重组菌株 BL21/ pETa-*pilA* 和 BL21/pETa-*ompC* 经 IPTG 诱导 5 h 后进行活菌计数，采用活菌数达 1×10^{10}CFU/mL 以上的菌液制苗。按菌液总量的 2% 加入甲醛溶液，充分摇匀，37°C 作用 48 h，其间振荡 8~10 次。取灭活菌液接种于普通琼脂平板，37°C 培养 72 h，检验灭活是否完全。8000 r/min 离心 6 min, 0.9%的生理盐水洗涤 3 次，最后生理盐水重悬至菌体浓度为 10^8~10^9CFU，并用 2 mo1/L NaOH 调节 pH 值至 6.8~7.2。然后按 1:1 的比例加入弗氏不完全佐剂，充分振荡。配制的疫苗进行无菌检验：取灭活菌液接种普通琼脂平板上，37°C 培养 16~18 h，检验是否无菌。

1.5.2 *安全性测定*

取两种基因工程疫苗分别接种 5 只小鼠，每只腹腔接种 0.2 mL，对照组腹腔接种 0.2 mL，观察两周，观察小鼠存活情况。

1.5.3 *最小致死剂量(MLD)的确定*

选取小白鼠 20 只，分为 2 组，每组 10 只，1，2 组分别经腹腔注射鸡大肠杆菌强毒株 O_1 活菌 $1.5\times l0^9$ CFU/mL 和 $2\times l0^9$ CFU/mL 的菌液 0.2mL，另设培养基对照组 10 只，接种后观察一周，确定最小致死剂量。

1.5.4 *动物免疫实验*

取 30 只小鼠，随机分为 5 组，每组 6 只，皮下注射。一组作为对照组，注射 200 µL 0.9%的生理盐水；二组注射 200 µL 只含 pET-28a 空载体的菌株；三组注射 200 µL 重组 BL21/pETa-*pilA* 菌株疫苗；四组注射 200 µL 重组 BL21/pETa-*ompC* 菌株疫苗；五组注射 100 µL BL21/pETa-*pilA* 和 100 µL 重组 BL21/pETa-*ompC* 菌株疫苗。间隔 14 d 进行二免，二免 14 d 后尾静脉采血并分离血清，通过间接 ELISA 检测血清样品。免疫抗体的 ELISA 检测：将获取的小鼠血清用间接 ELISA 法进行检测。在 ELISA 检测仪上，于 450 nm 处，以空白对照孔调零后测各孔 *OD* 值。

1.5.5 *攻毒实验*

免疫结束 2 周后，每组同时接种最小致死剂量的鸡大肠杆菌强毒株 O_1。同时进行未免疫小鼠接种作为对照。一周内观察小鼠存活情况，判断疫苗的保护作用。

1.5.6 *石蜡切片*

同时取攻毒后死亡及未死的小鼠，解剖取肝，肾和小肠做 6~10 µm 石蜡切片。

2 结果

2.1 Ⅰ型菌毛 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因的克隆与序列分析

2.1.1 *pilA 基因和外膜蛋白 C 基因的 PCR 扩增结果*

分别以提取的基因组 DNA 和质粒 DNA 为模板，采用 PCR 分别扩增得到 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因。从图 1 和图 2 可以看出，PCR 产物 *pilA* 基因大小为 549 bp，外膜蛋白 C 基因大小为 1104 bp，与实验设计相符。

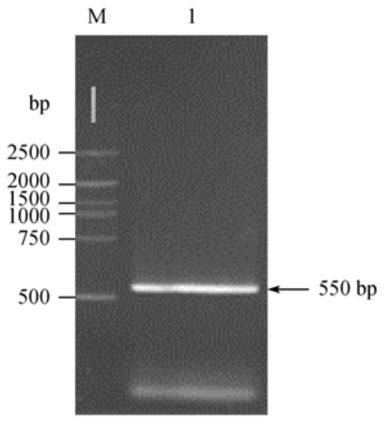

图 1 *pilA* 基因的 PCR 结果

Fig. 1 Amplification of *pilA* gene by PCR

M: DNA marker; 1: amplificated *PilA* gene by PCR

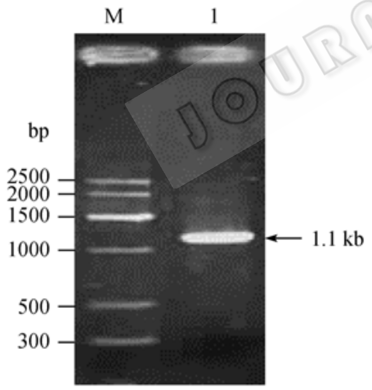

图 2 外膜蛋白 C 基因的 PCR 结果

Fig. 2 Amplification of *ompC* gene by PCR

M: DNA marker; 1: amplificated *OmpC* gene by PCR

2.1.2 *pilA 基因和外膜蛋白 C 基因的克隆*

分别将 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因与 pU 载体连接，构建重组质粒 pUCmT-*pilA* 和 pUCmT-*ompC*，转化受体菌 DH5α后提取质粒进行酶切鉴定，可以看出 2 个质粒双酶切后均得到 2 个片段，即 T 载体质粒的 2773 bp 片段和目的基因片段。

2.1.3 *pilA 基因和外膜蛋白 C 基因的序列测定与同源性比较*

对克隆得到的 *pilA* 基因和外膜蛋白 C 基因分别进行基因测序，结果表明：*pilA* 基因长度为 549 bp，外膜蛋白 C 基因长度为 1104 bp，均含有完整的开放性阅读框(ORF)。利用 DNAMAN 软件将得到的序列与 GenBank 公布的参考基因进行比对，并进行同源性分析，结果表明克隆得到的Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因与参考序列均高度同源，同源性分别为 98.18%和 97.28%，说明这两个基因都是非常保守的。将所得的Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因序列登录 GenBank，获得登录号分别为 EF172449 和 EF122601。

2.2 Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因原核表达载体的构建和表达

2.2.1 *Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因原核表达载体的构建*

为了验证两个基因编码蛋白的功能，分别构建了Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因的原核表达载体。将两个完整的编码区分别用 *Nco* I 和 *Bam*H I，*Bam*H I 和 *Hin*d III 从质粒 pUCmT-*pilA* 和 pUCmT-*ompC* 上切下，连入经同样酶切的表达载体 pET-28a 中，并转化入宿主菌 *E. coli* BL21，在含卡那青霉素的选择培养板上 37ºC 孵育过夜，酶切鉴定含重组质粒的阳性克隆菌，分别命名为 BL21/pETa-*pilA* 和 BL21/pETa-*ompC*。

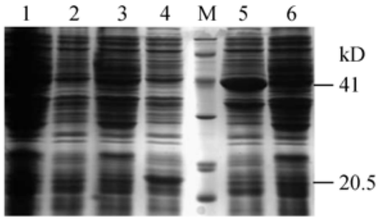

图 3 SDS-PAGE 分析 PilA 蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis the expression of recombinant protein in *E. coli*

M: protein markers, 97.6、66.4、43.3、31、20.1、14.4 kD; 1: the total proteins of BL21/(pET-28a) without induce; 2: the total proteins of BL21/(pET-28a)induced by IPTG; 3: the total proteins of BL21/ pETa-pilA without induce; 4: the total proteins of BL21/ pETa-pilA induced by IPTG; 5: the total proteins of BL21/pETa-OmpC induced by IPTG; 6: the total proteins of BL21/pETa-OmpC without induction

2.2.2 *Ⅰ型菌毛和外膜蛋白 C 基因的原核表达*

将质粒 pETa-*pilA* 和 pETa-*ompC* 转入宿主菌

E. coli BL21, IPTG 诱导 4 h 收集菌体, 同时以转入 pET-28a 空质粒的菌体作为对照。SDS-PAGE 检测显示(图 5), 经 IPTG 诱导的 BL21/ pETa-*pilA* 菌株和 BL21/pETa-*ompC* 菌株分别在分子量约为 20 kD 和 40.9 kD 处有明显表达条带, 与预期的 I 型菌毛和外膜蛋白 C 分子量基本一致。菌体超声破碎离心后, 未见沉淀, 说明重组 I 型菌毛和外膜蛋白 C 均主要以可溶形式存在于细胞中。

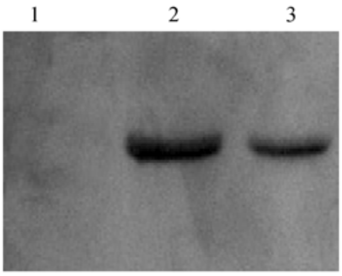

图 4　*pilA* 基因表达产物的 Western blotting 分析
Fig. 4　Western blot analysis of the expressed pilA protein
1: control; 2: inclusion body of pilA protein; 3: expressed pilA protein

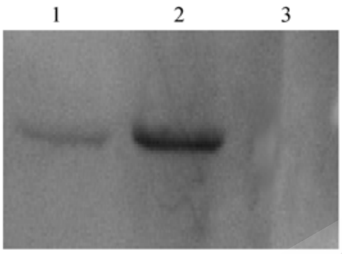

图 5　*OmpC* 基因表达产物的 Western blotting 分析
Fig. 5　Western blotting analysis of the expressed OmpC protein
1: inclusion body of OmpC protein; 2: expressed OmpC protein; 3: control

2.3　表达产物的 Western blotting 检测

DAB 显色后, 分别仅在 20 kD 和 40 kD 左右出现特异性阳性带, 证实其为特异性表达产物并具有反应原性。

2.4　致病性鸡大肠杆菌基因疫苗的制备和免疫原性的研究

2.4.1　*安全性测定*

取两种基因工程疫苗分别接种 5 只小鼠, 每只腹腔接种 0.2 mL, 对照组腹腔接种 0.2 mL, 2 周后全部存活, 每只鼠无临床症状出现, 并且 3 周后剖检无病理变化, 表明该菌株无致病性, 十分安全。

2.4.2　*最小致死剂量(MLD)的确定*

小鼠攻毒后 24 h, 攻毒 $2\times l0^9$CFU/mL 鸡大肠杆菌强毒株 O_1 的 10 只小白鼠全部死亡; 而攻击 $1.5\times l0^9$CFU/mL 鸡大肠杆菌强毒株 O_1的 10 只小白鼠死亡 3 只。故确定对小白鼠的最小攻毒剂量(1MLD)为 $2\times l0^9$CFU/mL。

2.4.3　*间接 ELISA 检测小鼠抗血清结果*

应用间接 ELISA 方法检测小鼠血清, 结果表明免疫过菌毛疫苗和免疫外膜蛋白疫苗的小鼠, 其血清内均含有大量抗体, 发生了明显的抗原抗体反应, 尤其是两种基因工程疫苗混合苗的小鼠, 其抗体内产生了大量的抗致病性鸡大肠杆菌的抗体, 发生了极其明显的抗原抗体反应, 通过酶标检测仪测定各反应孔的 *OD* 值, 结果如下:

表 1　小鼠间接 ELISA 抗体检测结果
Table 1　The indirect ELISA detection of the antibody level

Group	Group 1	Group 1	Group 3	Group 4	Group 5
OD_{450}	0.120 ± 0.007	0.141 ± 0.006	0.579 ± 0.011	0.426 ± 0.004	0.615 ± 0.017

表 2　基因工程菌株的小鼠免疫保护试验(存活小鼠数/试验小鼠总数)
Table 2　The statistics of mice immune experiment

Infection dosage	Immunogen				
	200 μL NS	200 μL BL21 (pET-28a)	Recombinant vaccine		
			200 μL BL21 (pAET-*pilA*)	200 μL BL21 (pAET-*ompC*)	100 μL BL21 (pAET-*pilA*) 100 μL BL21 (pAET-*ompC*)
2×10^9 CFU	0/5	0/5	4/5	3/5	5/5

2.4.4　*基因工程菌株的小鼠免疫保护试验结果*

用基因工程灭活菌株免疫小鼠, 用鸡大肠杆菌强毒株 O_1 攻毒均获得了较好的免疫保护。用 1MLD($2\times l0^9$CFU)攻毒, 对照组全部死亡, 单基因工程疫苗免疫组保护率分别为 80%(4/5)和 60%(3/5), 混合基因工程疫苗免疫组保护率可达 100%(5/5)。攻毒后, 将病死小鼠和健康小鼠解剖, 取小肠和肾制作组织石蜡切片, HE 染色结果见表 2 和图 6。

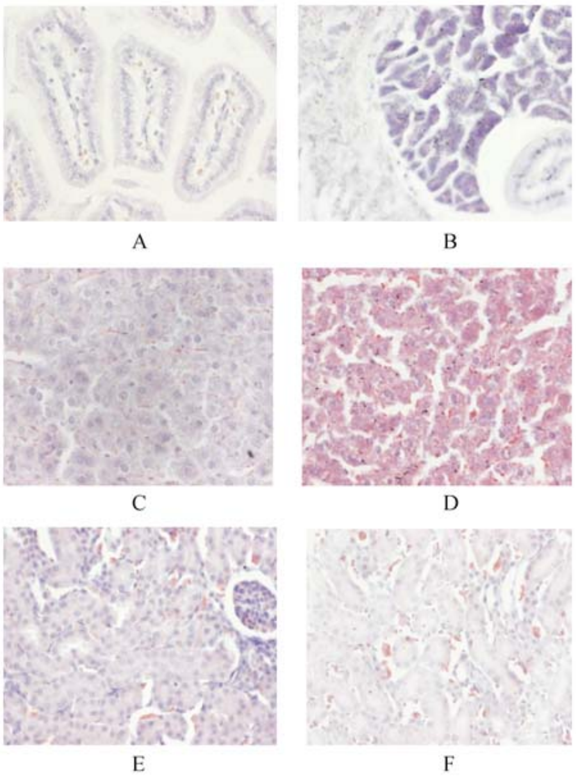

图 6　肝、小肠和肾组织切片结果(100×)

Fig. 6　The observed results with histological technology

A: the Intestine of survived mice; B: the Intestine of died mice; C: the liver of survived mice; D: the liver of died mice; E: the nephridium of survived mice; F: the nephridium of died mice

从图上可以看出，病死小鼠的小肠绒毛上皮细胞松散，基底层排列不紧密，健康小鼠的小肠绒毛上皮细胞排列紧密整齐；病死小鼠肾有出血点，健康小鼠肾正常；病死小鼠肝脏肝细胞严重颗粒变性，充满红细胞或形成红色血栓，健康小鼠肝脏结构清楚，肝细胞结构完整。

3　讨论

鸡大肠杆菌病常引起鸡局部或全身性感染，且能引起继发感染，几乎发生于世界所有养鸡业发达的国家。国内随着集约化养鸡业的发展，尤其是近两年，本病呈现显著上升的趋势，成为养鸡业中最重要的细菌性传染病。其临床症状复杂，给养鸡业造成严重的经济损失。目前主要通过抗生素，抗菌药物，铝胶苗，油乳剂灭活苗，和用非致病性鸡源 *E. coli* 作为活疫苗防治，但药物代价昂贵且常受到细菌耐药性的影响，还会带来药物残留问题，而上述疫苗的安全性又低，因此，解决此问题的关键在于找出禽大肠杆菌共同的保护性抗原，以制备对不同血清型菌株均有保护作用的疫苗，使用基因工程疫苗预防本病具有重要意义[9]。

Ⅰ型菌毛和外膜蛋白是禽大肠杆菌重要的致病因子，Ⅰ型菌毛能使禽致病性 *E. coli* 在局部黏膜吸附并定居繁殖，进而侵入体内，这是细菌发挥其致病作用的关键一步。表达Ⅰ型菌毛的菌株可以吸附于气管上皮，使致病性 *E. coli* 在呼吸道定居。Gyimah 等[10]以提取的不同致病株的菌毛蛋白制备成多价菌毛油乳剂苗免疫易感鸡，免疫后 2 周，分别以致病株经后胸气囊攻毒，结果攻毒对照组有较高死亡率，而免疫鸡攻毒后未发生死亡；免疫鸡病变轻于攻毒对照组鸡，清除细菌的能力也高于后者，表明多价菌毛油乳剂灭活菌能使鸡免受呼吸道感染。根据不同学者研究表明，在不同血清型的致病菌中，菌毛基因存在着高度同源性。这为我们研制广谱性疫苗提供了很好的依据。

外膜蛋白是革兰氏阴性菌细胞壁中所特有的结构，在细菌的物质运输、形态的维持和有关物质合成等方面起着重要的作用，有研究发现由鸡大肠杆菌质粒编码的外膜蛋白在其致病过程中起重要作用[2]，是重要的毒力因子，位于外膜外侧。外膜蛋白(Omp)能客观反映大肠杆菌分离株的遗传相关性，且在大肠杆菌致病机理及免疫机理中具有重要作用。Omp、LPS 在禽大肠杆菌病免疫保护中的作用，国内外报道较少。Bolin[11]等用兔抗禽大肠杆菌铁调节外膜蛋白(Iron-regulated Outer membrane proteins)抗体对鸡被动免疫并攻毒. 结果被动免疫火鸡菌血症的出现率与未免疫组相比显著下降，说明该抗体可对火鸡败血症提供被动免疫力和保护。大肠杆菌外膜蛋白具有良好的免疫原性，不仅可加快巨噬细胞对抗原的提呈作用，刺激机体产生体液和细胞免疫,而且不同血清型分离株具有交叉保护作用。

但是由于大肠杆菌Ⅰ型菌毛和外膜蛋白结构复杂，分离纯化困难。因此，应用遗传工程技术对Ⅰ型菌毛和外膜蛋白进行表达，为防制禽大肠杆菌病提供了新的思路，也为我们研制具有保护性的广谱抗原疫苗提供了很好的依据。

本研究首先对鸡致病性大肠杆菌分离株 O_1 进行了 30 种药物敏感实验的研究，药物敏感实验表明，本实验分离的鸡 *E.coli* 的抗药性广泛存在，很多常用抗菌药已不能有效控制该病，为临床上治疗该病

提供理论依据。又克隆了鸡致病性大肠杆菌分离株 O_1 的 *pilA* 和外膜蛋白 C 基因，并对插入重组质粒的全基因进行了序列分析和同源性比较，然后将扩增得到的 *pilA* 和外膜蛋白 C 基因定向克隆于原核表达载体 pET-28a，并成功地在大肠杆菌 BL21 中进行了表达。在此基础上将表达的产物制成疫苗，免疫小鼠，进行了初步安全性和有效性实验。结果表明，鸡致病性大肠杆菌分离株 O_1 与参考株相比，*pilA* 和外膜蛋白 C 基因的变异率都相当低，这就极大地有利于将来进一步研制基因工程疫苗及建立新型诊断方法。将表达的基因产物制成疫苗免疫小鼠，获得了较高的免疫效果, ELISA 实验结果表明，小鼠体内产生了较高的抗体水平。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，这对鸡大肠杆菌病的防治研究具有重要意义，为研制 I 型菌毛和外膜蛋白基因工程疫苗提供关键性的技术，同时也为进一步的不同菌株抗原蛋白亚单位的交叉保护性实验，奠定了坚实的基础，为进一步研制广谱的鸡致病性大肠杆菌 I 型菌毛和外膜蛋白基因工程疫苗提供了科学依据。鉴于以上实验结果，该重组菌株有希望作为鸡致病性大肠杆菌基因工程疫苗的候选生产菌株。

REFERENCES

[1] Calnek BW. Avian Dis. Beijing: Press of Beijing Agricultural University, 1991, pp. 126–132.

[2] Yu YH, Chen DF, Zhang GR, *et a1*. Preparation and appraisement of the lipid A of Enterobacteriaceae and anti-lipid A antibodies. *Chin J Lab Diagn*, 2004, **8**(5): 503–504.

[3] Beachey EH. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Infect Dis*, 1981, **143**: 325–345.

[4] Dozois CM, 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 coil*. *Avian Dis*, 1994, **38**: 231–239.

[5] Vidotto MC, Navarro HR, Gaziri LC. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbio1*, 1997, **59**: 79–87.

[6] Melha M, Maryvonne DM, Charles MD, *et a1*. Role of avian *pathogenic Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun*, 2003, **71**(1): 494–503.

[7] Khmm 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.

[8] Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, *et al*. Expression of Pandtype I(FI) fimbriae in pathogenic *Escherichia coil* from poultry. *Vet Microbiol*, 1995, **45**: 297–309.

[9] Ded JR, Haq EG. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (078: K80) infection in fowls. *Res Vet Sci*, 1976, **20**: 131–138.

[10] Gyimah JE, Panigrahy B, Williams JD. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Dis*, 1986, **30**(4): 687–689.

[11] Bolin CA, Jensen AE. Passive immunization with antibodies against iron regulated outer membrane proteins turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Infect Immun*, 1987, **55**(5): 1239–1242.

七大专业分区打造实验室领域权威展会——国药励展

“第 59 届中国实验室技术及装备交易会”将于 2009 年 6 月 16~18 日在上海光大会展中心隆重举行。为了更好的服务于广大实验室领域的生产商、经销商及终端用户，实验室会经过近 2 个月的针对展会展商和观众的调研，决定在本届展会开设展品专业分区。根据目前实验室会的展品构成，此次专业分区包括“试剂区”（含高纯试剂）、“实验室家具区”、“测量/计量/光学仪器区”、“药典专用仪器区”、“恒温/加热/制冷/干燥设备”、“分离/萃取设备区” 及“玻璃制品区”7 个专业展示区。

为了配合本次展会专业分区活动，实验室会还推出了一系列宣传活动对进入专业分区的企业进行宣传。除了在展前快报、电子期刊及观众邀请函上进行图文宣传之外，展会现场还将对各个专业分区进行明显的标识，同时引导参观观众到不同的分区进行参观。

展品专业分区将为参展商带来更多专业观众，同时将大大方便专业观众进行参观、采购。

详情可联系：国药励展展览有限责任公司

E-mail: yong.han@reedsinopharm.com

Website: www.Reed-Sinopharm.com

www.expolab.com.cn