

# K88抗原基因的克隆与表达

## I. K88抗原工程菌的研制

洪孟民 张景六 蔡瑞珠

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

樊英远 余鸣 吴本燮

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海)

肖俊发

(上海市嘉定县畜牧兽医站, 上海)

由产肠毒素大肠杆菌引起的仔猪黄痢病是在世界各地广泛流行的一种仔猪急性腹泻病。已经表明 K88伞毛抗原在这类致病菌定居在仔猪小肠上起着重要的作用。

质粒 pTK82 是从国内流行的仔猪黄痢病致病菌——大肠杆菌青 3 菌株中分离出来的。它是一个分子量约为  $50 \times 10^6$  道尔顿的非接合型质粒, 并含有 K88<sub>a</sub> 抗原基因的决子。在电子显微镜下可以观察到带有 pTK82 的大肠杆菌 C<sub>600</sub> 的细胞表面存在有 K88 伞毛。此质粒 DNA 经限制性内切酶 Hind III 酶解后, 使 DNA 片段连接到同样经内切酶酶解过的 pBR322 DNA 上, 得到了一株能产生 K88 抗原的转化子, 经鉴定后, 此重组质粒定名为 pTK63。pTK63 DNA 经 EcoRI 部分酶解, 然后重新连接起来, 得到分子量较小但仍含 K88 基因的重组质粒 pTK90。免疫学分析的结果表明, 带有重组质粒 pTK90 的大肠杆菌 C<sub>600</sub> 所产生的伞毛抗原的性质, 与带有 pTK82 质粒的大肠杆菌 C<sub>600</sub> 菌株或大肠杆菌青 3 菌株所产生的伞毛是相同的, 大肠杆菌 C<sub>600</sub>/pTK82 和大肠杆菌 C600/pTK90 菌株都是不带肠毒素基因的菌株, 初步试验表明用它们制成的菌苗可以有效地预防仔猪黄痢病的发生。

**关键词:** 抗原; 基因克隆和表达; 大肠杆菌

仔猪黄痢病是由猪源性产肠毒素大肠杆菌引起的一种急性腹泻传染病。猪源性产肠毒素大肠杆菌一般产生三种致病因子, 即热不稳定肠毒素 (以下简称 LT), 热稳定肠毒素 (以下简称 ST) 与伞毛抗原。LT 是高分子量的抗原蛋白, 对热不稳定, 当被加热到 60°C, 10min 毒力大都被破坏。LT 由 A、B 两个亚基组成, 在药理与免疫两方面都与霍乱毒素相似, B 亚

基能附着在小肠上皮细胞膜的神经节苷酯上, 让 A 亚基进入细胞内激活与膜结合的腺苷酸环化酶, 使 cAMP 增高而引起水分的大量排出造成病猪的急性腹泻。ST 是低分子量的多肽, 无抗原性, 对热稳定, 它有激活鸟苷酸环化酶的作用, 也促使肠腔积水而发生腹泻。伞毛抗原是细菌细胞

膜上长出的伞毛状结构, 它们是由蛋白亚基经装配而成, 不同的菌株产生不同的伞毛抗原。已知的伞毛抗原有 K88、K99 与 987P 等几种, 可能还有一些未知的伞毛抗原型, 但从分离到的菌株来看, 以产 K88 伞毛抗原型的为多。细菌感染仔猪以后, 藉伞毛的作用使细菌附着在仔猪的小肠上皮细胞上, 在那里大量繁殖, 并产生大量肠毒素。仔猪在出生的三天内, 最易受到这类产肠毒素大肠杆菌的感染而发病<sup>1)</sup>, 据国内外资料统计, 新生仔猪因患黄痢病而死亡的死亡率在 10~30% 左右<sup>2-4)</sup>, 流行面广, 死亡率高, 不但经济损失严重, 也影响苗猪供应, 对养猪业危害甚大。因此, 如果能通过免疫怀孕母猪的方法使新生仔猪从初乳中获得对病原菌的免疫力, 从而避免黄痢病的发生及由此造成的仔猪死亡, 这对于养猪业来讲无疑是具有重大意义的。

国外许多实验室与基因工程公司都开展了预防仔猪黄痢病疫苗的研究, 荷兰首先用基因工程方法制成了 K88-LT 疫苗投放市场, 成为世界上第一个用基因工程方法制成的商品, 英、美等国也正在试制中。加拿大最近也刊登了经政府批准的 K88-K99-987P 疫苗的广告。我国目前也有好几个单位在进行研究, 并取得了不同程度的进展。本文报道我们用国内流行的猪源性产肠毒素大肠杆菌为材料, 用基因工程方法研制能预防仔猪黄痢病试验疫苗的情况。

## 材料与方 法

### (一) 细菌菌株与质粒

见表 1

### (二) 培养基

1. 肉汤培养基: 牛肉浸膏 1%; 多

表 1 细菌菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株或质粒 Strain or plasmid	性 状 Phenotype	来 源 Source
<i>E. coli</i> 青 3	K88 <sup>+</sup> , LT <sup>+</sup> , ST <sup>+</sup>	青海省畜牧兽 医所从黄痢病 病猪中分离
<i>E. coli</i> C600	leu <sup>-</sup> , thr <sup>-</sup> , B <sub>1</sub> <sup>-</sup> , F <sup>-</sup>	Cohen 等 <sup>[1]</sup>
<i>E. coli</i> 02 <sup>NaI</sup>	met <sup>+</sup> , att <sup>+</sup> , r <sup>+</sup> m <sup>+</sup> , Sup I <sup>+</sup> , NaI <sup>r</sup>	中科院遗传所 赠
<i>E. coli</i> T36	K88 <sup>+</sup>	本文工作
<i>E. coli</i> T82	<i>E. coli</i> C600/pTK82	本文工作
<i>E. coli</i> T63	<i>E. coli</i> C600/pTK63	本文工作
<i>E. coli</i> T90	<i>E. coli</i> C600/pTK90	本文工作
pBR322	Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	
pTK63	Ap <sup>r</sup> , K88 <sup>+</sup>	
pTK90	Ap <sup>r</sup> , K88 <sup>+</sup>	

胨 1%; NaCl 0.5%; pH 7.2。

2. M9 培养基组成 (%): NH<sub>4</sub>Cl 0.1; NaCl 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01; 葡萄糖 0.4; 根据实验需要另行添加氨基酸及维生素, 或用棉子糖代替葡萄糖。

3. M9-多胨培养基: M9 培养基中加多胨 0.5%。

### (三) 细菌的接合

按 Grinsted 方法<sup>[5]</sup>, 选择培养基中含菸啶酸的浓度为 100 μg/ml; 棉子糖浓度为 0.4%。

### (四) 质粒 DNA 的抽提

参考 Meyers 方法<sup>[6]</sup>并加以改进: 带有质粒的细菌接种在 M9-多胨培养基中, 37°C, 振荡培养 17h, 离心收集菌体后, 混悬在 25% 蔗糖 -50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 在 4°C 先后用溶菌酶和 Brij 58 裂解液温和地处理菌体, 高速离心, 收集清亮裂解液, 用 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl-1mM EDTA pH8.0) 饱和

过的苯酚除去蛋白, 然后对 TE 缓冲液透析, 浓缩后经 Sepharose 2B 柱除去 RNA 分子, 得到的 DNA 溶液一般地可用于电泳分析及 DNA 转化。

### (五) 质粒 DNA 的超离心纯化

实验需要时, 我们采用超离心方法纯化质粒 DNA, 按上节所述得到清亮裂解液后, 用聚乙二醇-6000 使蛋白与 DNA 沉淀, 将沉淀物溶解于少量 TE 缓冲液后, 加入氯化铯及溴化乙锭溶液, 使最后溶液的折光率为 1.3950, 溴化乙锭浓度为 10mg/ml, 溶液在 MSE-50 离心机上, 水平转头, 20°C, 150000×g 离心 40h, 收集 DNA 带, 用 TE 缓冲液饱和的异戊醇抽去溴化乙锭, DNA 液经对 TE 缓冲液透析并浓缩后, 冰箱贮藏备用。

### (六) DNA 的限制性内切酶消化及 DNA 片段的连接

内切酶 *EcoR* I 按 Greene 等方法制备<sup>71</sup>, *Hind* III, *Bam*HI, T4 DNA 连接酶等为 Boehringer 公司产品。

酶解反应液含 Tris 缓冲液 (pH7.5) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 50mM, DTT 2mM。反应混合物在 37°C 保温 1 h, 再在 65°C 加热 10min 中止反应。

DNA 片段连接条件为: 二种需连接的 DNA 各 1.5μg 左右, 混合后经内切酶消化, 冷却到 8°C 左右, 加入 DTT 和 ATP, 使它们的最终浓度分别达到 10mM 和 1mM, 再加入 T4 DNA 连接酶 2 单位, 反应混合物 8°C 左右放置 18h, 再用于细菌转化。

### (七) 细菌的转化

按 Norgard<sup>81</sup> 方法制备胜任态的受体细胞, 大肠杆菌 C<sub>600</sub> 悬浮在 CaCl<sub>2</sub> 缓冲液中 (CaCl<sub>2</sub> 100mM, KCl 250ml, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tris·HCl 5mM, pH7.6), 然后同 DNA 溶液混合, 4°C 保持 1 h, 将菌液涂

布在适当的选择培养基上以得到所需的转化子。

### (八) 琼脂糖凝胶电泳分析

采用水平电泳装置, 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳; 电泳时使用 Loening 缓冲液 (Tris-HCl 0.036M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03M, EDTA 0.001M pH7.8) 电泳电压 80V, 时间 5h, 电泳结束后凝胶板在 0.4 μg/ml 溴化乙锭液中染色 15min, 在紫外灯光下摄影。

### (九) K88 抗原的纯化及抗 K88 血清的制备

K88 抗原的纯化: 将大肠杆菌青 3 菌株接种在 M9-多肽培养基中, 37°C 振荡培养 5h, 取出, 培养液冷却至 10°C 以下, 离心收集菌体, 将菌体混悬在 100mM Tris-HCl-1M NaCl 缓冲液 (pH7.4) 中, 在 4°C 置组织捣碎器中进行脱伞毛处理, 然后 6500rpm × 15min 离心, 取上清液, 加入硫酸铵至 60% 饱和度, 4°C 放置 16h, 离心, 沉淀物溶解于少量缓冲液中, 对 2M 尿素-100mM Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液透析, 样品经 Sepharose 4B 柱纯化后, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度分析。

K88 抗血清制备: 将 1mg 左右纯化后的 K88 抗原与佐剂 (羊毛脂: 石蜡 = 1:5), 青霉素、链霉素 (最终浓度均为 1mg/ml) 混合后制成乳剂, 注射经卡介苗致敏的家兔, 二周后再注射一次 (不加佐剂), 再过一周抽血测定 K88 抗体效价, 如达 1:32 即放血, 否则进行第三次注射。

### (十) K88 抗原的测定

1. 抗甘露糖豚鼠红血球凝集反应法测定<sup>91</sup>。

2. 反向间接红血球凝集法<sup>101</sup>:

(1) 血球制备: 用戊二醛活化已脱纤维的绵羊红细胞, 然后用 K88 抗血清致

敏醛化红细胞，用 1% 正常兔血清-生理盐水处理后备用。

(2) 测定方法：在多孔平板中逐倍稀释待测抗原，然后加入等体积 K88 抗血清致敏的绵羊红细胞，室温放置 2 h 以上，有凝集反应者为 K88 阳性。

## 结 果

### (一) 猪源性产肠毒素大肠杆菌青

#### 3 菌株致病性的检测

产肠毒素大肠杆菌青 3 是青海畜牧所从黄痢病仔猪腹泻物中分离得到的，经小猪肠结扎试验证明它产生热不稳定性肠毒素(图 1)。用豚鼠红血球凝集法、电镜观察与 K88 免疫试验均证明它产生 K88 抗原(结果另行报道)。

### (二) 大肠杆菌青 3 菌株中质粒的

#### 检测

为了弄清青 3 菌株中 K88 抗原基因是否位于质粒上，我们进行了下列几项试验：(1) 首先用质粒消除药物溴化乙锭处理大肠杆菌青 3，然后将处理过与未处

理的细菌分别稀释后，涂在肉汤平板上使长成单菌落，再测定其中失去合成 K88 抗原能力的菌落的比例，结果表明，未经处理的细菌长成的菌落 100% 都有产生 K88 伞毛的能力，而在经溴化乙锭处理过的细菌长成的菌落中，有高达 15% 左右的菌落不再能合成 K88 抗原，这表明这些不能合成 K88 抗原菌落的出现不是由于染色体上发

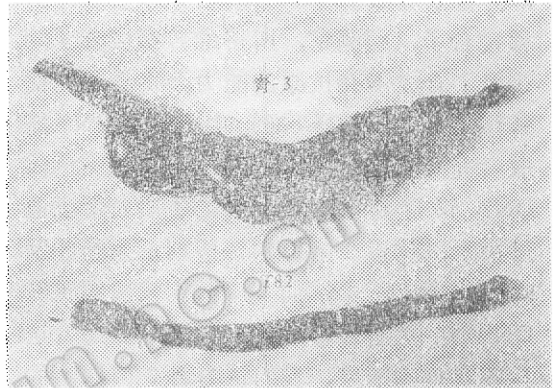


图 1 小猪肠结扎试验照片  
Fig.1 An photograph of piglet interstitial ligature test

上部：E.coli 青 3  
下部：E.coli T82 (E.coli C600/pTK82)  
upper: E.coli Q3  
lower: E.coli T82 (E.coli C600/pTK82)

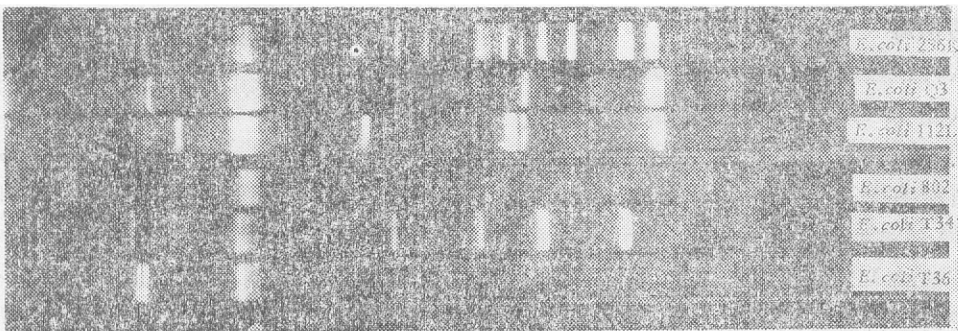


图 2 从不同大肠杆菌菌株中分离的质粒在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳  
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from different E.coli strains

E.coli 256K; Q3 (即青 3); 112L——产肠毒素菌株的野生型  
802——受体菌株; T34——从 256K × 802 接合而得到的转移接合子  
T36——从青 3 × 802 接合而得到的转移接合子

1% agarose gel was used  
E.coli 256K; Q3; 112L——wild type of enterotoxigenic strain  
802——recipient strain; T34——transconjugant from 256K × 802  
T36——transconjugant from Q3 × 802

生了突变,而可能是由于细菌经溴化乙锭处理后引起质粒的脱落所造成的;(2)从青3菌株细胞中抽提质粒DNA,并在1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析,结果见图2,从图中可以看出除了染色体DNA碎片外还有数条比染色体碎片泳动得快与泳动得慢的质粒带;(3)将青3菌株与大肠杆菌802 $\text{Nal}^r$ 配对,在以棉子糖为碳源并含菸啶酸的M9合成培养基上选择转移接合子,经测定,所得的转移接合子均获得了合成K88抗原的能力。将其中一株转移接合子(编号T36)中的质粒DNA提取后进行电泳分析,结果表明,比染色体DNA碎片泳动得较慢的二条质粒带已通过接合,从青3菌株中转移到了大肠杆菌802 $\text{Nal}^r$ 细胞中,而泳动得较快的质粒DNA则没有转移过来(图2)。综合这几项实验的结果,我们认为青3菌株中的K88抗原基因是位于分子量很大的一个质粒上面。112L与256K是另二株在国内流行的猪源性产肠毒素大肠杆菌(K88伞毛型),从图2中可以看出,它们所带的质粒数目与种类与青3不完全相同。

### (三) K88质粒DNA的提取与单质粒菌株的构建

从转移接合子T36菌株的质粒DNA电泳图(图2)知道,T36细胞中含有一种以上的大质粒,为了得到只含有K88质粒的单质粒菌株,我们从T36菌株中提出质粒DNA并对大肠杆菌C600进行转化,在含棉子糖的M9合成培养基上选择转化子,经检定,所得到的转化子均能合成K88抗原,将其中一株转化子(编号T82)中的DNA按材料与方法一节所述步骤抽提出来,并进行超离心分离,将离心后的离心管在紫外灯下观察,除了蛋白质与RNA分子外还可看出二条清晰的DNA带(图3)。分别取出这二条带中的DNA样

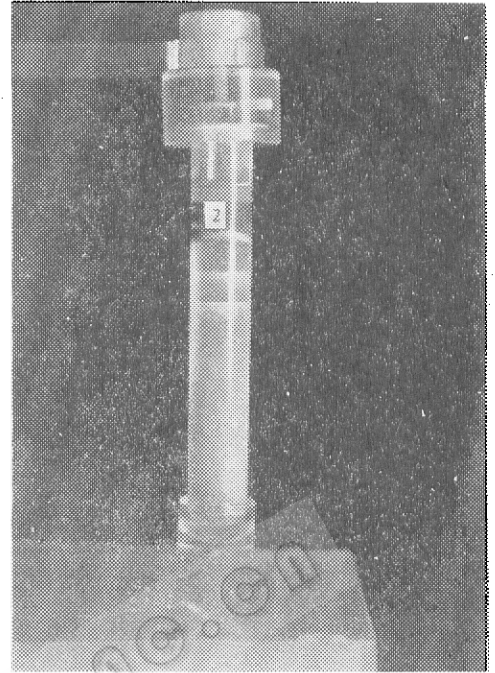


图3 pTK82质粒DNA在氯化铯-溴化乙锭梯度中超离心达到平衡后在紫外光下的吸收照片

Fig.3 An ultraviolet absorption photograph of pTK82 plasmid DNA after ultracentrifugation to equilibrium in cesium chloride-ethidium bromide gradient.

20°C, 150000 × g离心40小时

Centrifuge at 150000 × g for 40h at 20°C.

品,经用透析法去除氯化铯与用异戊醇法抽去溴化乙锭后,分别将来自这两条带的DNA分子进行限制性内切酶HindⅢ消化,并在1%琼脂糖凝胶上进行电泳,结果表明,它们均被HindⅢ切割成相同的14条限制片段(图4),这表明在超离心管中出现的两条DNA带是一种质粒的不同构型的分子。下面一条是超螺旋DNA,上面一条是质粒DNA直线与开环型分子及染色体碎片的混合物,也即表明T82菌株中只含有一种质粒分子(称为pTK82),从质粒的HindⅢ限制类型与分子量计算(约50Md)均与Mooi等<sup>[11]</sup>报道的pRI8801质粒的分子特性相似。

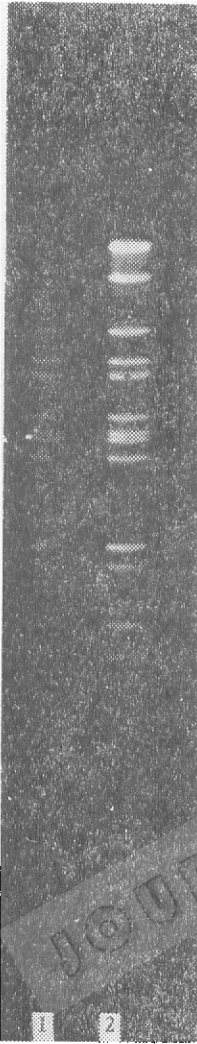


图 4 pTK82质粒DNA经Hind III切割后的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of Hind III-cleaved pTK82 DNA

1. 超离心管中第1条带
2. 超离心管中第2条带
1. The first DNA band in ultracentrifuge tube
2. The second DNA band in ultracentrifuge tube

#### (四) K88抗原基因的克隆

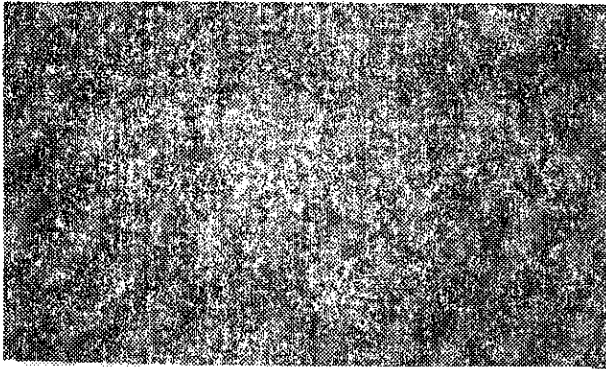
经超离心分离纯化的 K88 质粒 DNA (pTK82 DNA) 与经Sepharose 2B 柱层析纯化的pBR322质粒DNA分别被 Hind III 消化, 然后将酶反应液混合在一起, 经

T4 DNA 连接酶连接, 反应后, DNA 对大肠杆菌 C600 进行转化, 在含氨基青霉素 (Ap) 50 $\mu$ g/ml 的肉汤平板上共选得 Ap<sup>r</sup> 转化子 1715 个, 经药物抗性测定, 其中有 208 个转化子对四环素敏感, 这表明这些转化子细胞中所含的 pBR322 的四环素抗性基因上已连接了外源 DNA 片段。对此 208 个转化子进行 K88 伞毛抗原测定, 其中有 12 个转化子具有合成 K88 抗原的能力。我们将其中一个转化子 (编号为 T63) 进行单菌落纯化, 并从中分离出重组质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳分析表明它只含有一种重组质粒分子 (称为 pTK63), 经 Hind III 酶切后, 产生二条 DNA 带, 一条与 pBR322 相当, 另一条与 pTK82 质粒经 Hind III 切割后产生的第二条限制片段相当, 这结果与荷兰的 Mooi 等<sup>11)</sup> 以及英国的 Shipley 等<sup>12)</sup> 的结果相同。图 5 是此重组质粒经 Hind III、EcoR I 与 BamH I 限制性内切酶酶解后产生的片段的电泳照片; 图 6 是根据此结果绘制的 pTK63 的限制图。

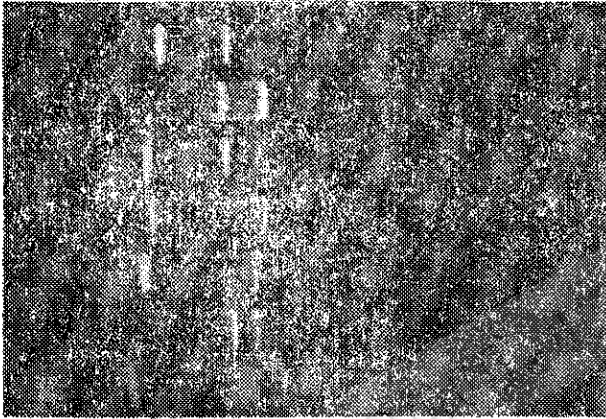
#### (五) 重组质粒 pTK90 的构建

根据资料<sup>13)</sup>, K88 基因只位于 H2 片段中的一部分区段中, H2 片段的其余部分中没有 K88 基因的有关顺序。为了除去与 K88 基因无关的 DNA 顺序, 我们将 pTK63 DNA 经 EcoR I 部分酶解, 然后再用 T4 DNA 连接酶使之连接, 再对大肠杆菌 C600 进行转化, 从中选得仍有合成 K88 抗原能力但所含质粒 DNA 分子量已变小了的转化子 T90, 质粒 DNA 经内切酶消化并在 1% 琼脂糖凝胶上电泳后表明, T90 的质粒 (编号 pTK90) DNA 比 pTK63 DNA 缺失了一个 3.4Md 的 E2 片段 (图 7)。图 8 是 pTK90 质粒的限制图。

#### (六) 青3、T82、T63 与 T90 菌株的性质比较



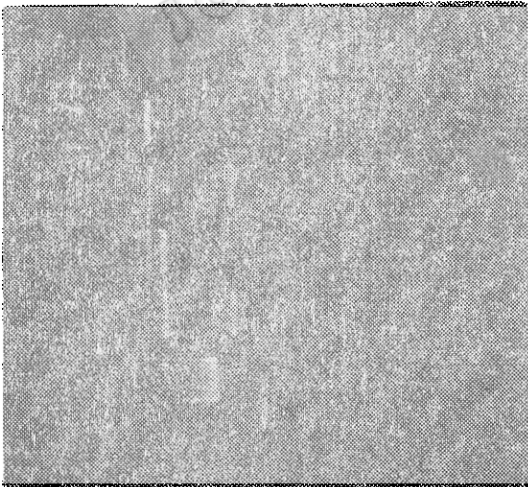
$\lambda$ DNA + *Eco*RI + *Bam*HI  
 pBR322 + *Hind* III  
 pTK63 + *Hind* III  
 pTK82 + *Hind* III  
 pBR322  
 pTK63



pTK63 + *Eco*RI  
 pTK63 + *Eco*RI + *Bam*HI  
 pTK63 + *Bam*HI  
 pTK63 + *Bam*HI + *Hind* III  
 pTK63 + *Hind* III  
 pTK63 + *Hind* III + *Eco*RI  
 $\lambda$ DNA + *Eco*RI + *Bam*HI

图 5 pTK63质粒经限制性内切酶切割后的琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-cleaved pTK63 plasmids



$\lambda$ DNA + *Eco*RI + *Bam*HI  
 pTK90 + *Bam*HI  
 pTK63 + *Bam*HI  
 pTK90 + *Eco*RI  
 pTK63 + *Eco*RI  
 pTK90  
 pTK63

图 7 pTK90与pTK63质粒DNA经限制性内切酶切割后的琼脂糖凝胶电泳

Fig.7 Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-cleaved pTK90 and pTK63 plasmid DNA.

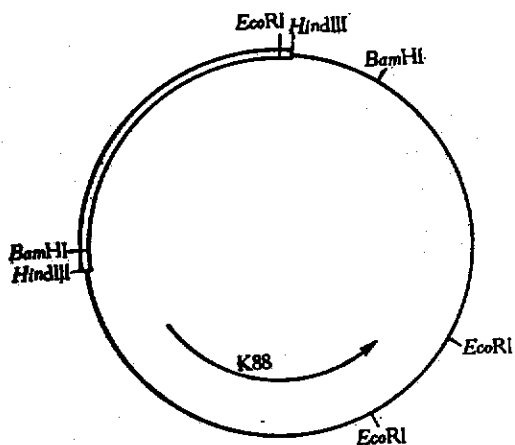


图 6 pTK63质粒DNA的限制图  
Fig.6 Restriction map of the recombinant plasmid pTK63  
双线代表pBR322载体DNA  
The double line represents the pBR322 vector DNA

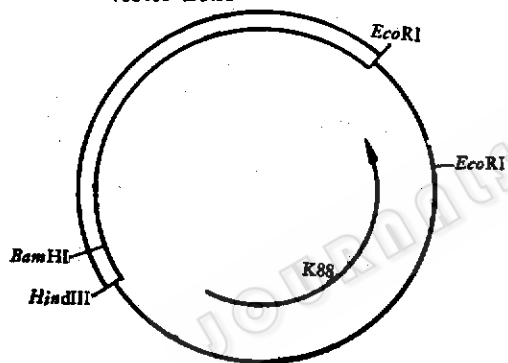


图 8 pTK90质粒DNA的限制图  
Fig.8 Restriction map of the recombinant plasmid pTK90  
双线代表载体pBR322 DNA  
The double line represents the pBR322 vector DNA

1. 用小猪肠结扎试验证明青3菌株是一株产毒很强的菌株，建成T82菌株后，我们也进行了同样试验，结果表明，T82菌株不产生热不稳定性肠毒素(图,1) T63与T90是从T82衍生而来，所以也是不产毒的菌株。

2. 用电子显微镜观察，含有pTK82质粒的大肠杆菌C600与不含任何质粒的C600菌株均能产生形态相似的伞毛(图9)。有人指出，大肝杆菌K12及其衍生菌株所产的伞毛为I型伞毛，形态与K88伞毛没有区别，但是在有甘露糖存在时，I型伞毛不能凝集豚鼠红血球，而K88伞毛则能凝集<sup>14,15</sup>，为此我们也将含pTK82质粒的大肠杆菌C600(即T82菌株)与不含pTK82质粒的C600细胞进行了豚鼠血凝比较，在无甘露糖存在时，两者均能凝集豚鼠红血球，当有甘露糖存在时，前者能而后者不能发生凝集。这表明T82所合成的是K88伞毛。

3. 用反向间接红细胞凝集法及豚鼠红血球凝集法分别对此四株菌株进行了K88抗原测定，结果表明它们在形成K88伞毛抗原的能力上没有明显差别(表2)。

表 2 不同菌株合成K88抗原的水平\*  
Table 2. Levels of K88 antigen synthesized by different strains

菌株 Strain	37℃生长 Growth at 37℃				28℃生长 Growth at 28℃			
	15小时 15 h	18小时 18 h	21小时 21 h	24小时 24 h	15小时 15 h	18小时 18 h	21小时 21 h	24小时 24 h
<i>E. coli</i> 青3	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> T82	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i> T62	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> T90	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>

\* K88伞毛抗原量用豚鼠红血球凝集法测定

Pili antigen of K88 was assayed by agglutination of guinea pig erythrocytes method



## 讨 论

产肠毒素大肠杆菌青 3 是从国内分离出的仔猪黄痢病原菌, 它除了含有 K88 质粒外, 还含有其它几种分子量大小不同的质粒。我们曾将青 3 菌株所含的质粒与其它几种也是从国内分离出的产肠毒素大肠杆菌所含的质粒相比较, 结果表明它们之间质粒种类与质粒分子大小均不完全相同, 在检测过的菌株中质粒种类最多的是菌株 256K (图 2)。在这许多种质粒中, 除了 K88 质粒与肠毒素质粒外, 其它的质粒特别是分子量较小的质粒是由上述质粒解离而成的还是一些有其它功能的质粒, 这一点尚不清楚, 有待进一步研究。

青 3 菌株中 K88 质粒 pTK82 的分子量在 50Md 左右, 它在每个细胞中的拷贝数是不会很高的, 当 pTK82 上的 K88 基因被克隆到 pBR322 多拷贝质粒上后, 由于拷贝数的增多, K88 抗原的产量按理也应当增加, 但实验结果表明, 菌株 T63 (即大肠杆菌 C600/pTK63) 与菌株 T90 (即大肠杆菌 C600/pTK90) 所产生的 K88 抗原量并不比菌株青 3 与菌株 T82 (即大肠杆菌 C600/pTK82) 为多, 这表明 K88 抗原基因的表达或 K88 伞毛的装配上存在着某种调控机制, 目前我们正在将  $\lambda P_L$  启动子连接在 K88 基因的上游, 看是否能增加 K88 抗原的产量, 以研究这个问题。

## 参 考 文 献

- [1] Gastra, W. et al.: *Microb. Rev.*, 46:129-161, 1982.
- [2] Foster, J.: *Pig Farming*, 1982 p.92.
- [3] 骆春阳等: 仔猪大肠杆菌研究文集, 江苏农学院出版, 1982, p.21
- [4] 郭景煜等: 中国兽医杂志, 1980年12期
- [5] Grinsted, J. et al.: *J. Bact.*, 110(2):529, 1972.
- [6] Meyers, J.A. et al.: *J. Bact.*, 127(3); 1529, 1976

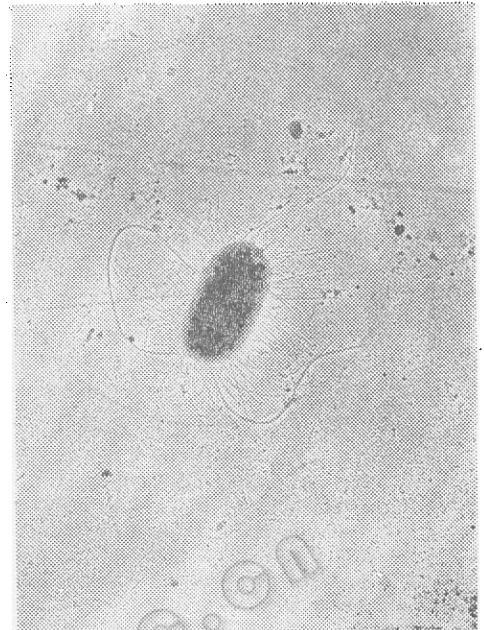


图 9 大肠杆菌 T82 菌株 (*E. coli* C600/pTK82) 细胞上伞毛的电镜照片

Fig. 9 Electron micrograph of K88 pili on cell of *E. coli* strain T82 (*E. coli* C600/pTK82).

放大  $2 \times 5000$  倍, 铂-钨投影, 大的丝状物是鞭毛, 较细的是 K88 伞毛

Magnification  $2 \times 5000$ , shadowed with platinum-palladium.

The large filaments are flagella and the smaller are K88 pili.

- [7] Greene, P.J. et al.: *DNA Replication* (Ed Wickner R.B.), Merce! Dekker, Inc, New York, p87
- [8] Norgard, M.V. et al.: *Gene*, 3(4):279, 1978.
- [9] 崔治中等: 1958~1982 仔猪大肠杆菌研究文集, (江苏农学院) p.40
- [10] 北京医学院微生物学教研组, 《实验免疫学》, 人民出版社出版 p.412
- [11] Mooi, F.R. et al.: *Nucl. Acid Research*, 6:849, 1979.
- [12] Shipley, P. L. et al.: *J. Bact.*, 145:920, 1981.
- [13] Mooi, F.R. et al.: *J. Bact.*, 150:512, 1982.
- [14] Evans, D.G. et al.: *Infect. Immunol.*, 18:330, 1977.
- [15] Evans, D.G. et al.: *ibid*, 19:727, 1978.

# CLOWING AND EXPRESSION OF GENETIC DETERMINANTS FOR K88 ANTIGEN

Hong Mengmin Zhang Jingliu Cai Ruizhu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica)

Fan Yingyuan Yu Ming Wu Benxie

(The Institute of Animal and Veterinary Sciences, Shanghai Academy of  
Agricultural Sciences)

Xiao Junfa

(Jiading County Veterinary Station)

Acute diarrheal disease in piglets caused by enterotoxigenic strains of *E. coli* is prevalent globally in animal husbandary. Antigen K88 has been shown to play an essential role in the colonization of these pathogens to the small intestine of the piglets.

The plasmid pTK82 was isolated from an local enterotoxigenic *E. coli* strain Q3 which caused diarrheal disease in piglets. It was characterized as a  $\approx 50 \times 10^6$  daltons non-conjugative plasmid containing genetic determinants for the K88ac antigen. The electron micrographs of *E. coli* C600 harboring pTK82 showed the presence of K88 pili on the bacterial cell surface. This plasmid DNA was cleaved with the *Hind* III restriction endonuclease, and the fragments were ligated to similarly cleaved DNA of pBR322. The recombi-

nant plasmid DNA pTK63 which produced K88 antigen was isolated in *E. coli* C600. The pTK63 DNA was partially digested with *Eco*RI and re-ligated to form plasmid pTK90, reduced in size but still containing K88 gene. Based on the results of immunological analysis, the nature of pilus antigen expressed by recombinant plasmid pTK90, was identical to K88 antigen encoded by the wild type plasmid pTK82 either in *E. coli* C600 or in *E. coli* Q3. Both *E. coli* C600/pTK82 and *E. coli* C600/pTK90 are non-enterotoxigenic strains. Preliminary tests showed that they are effective in preventing diarrheal disease in piglets.

## Key words

Antigen; cloning and expression of gene; *E. coli*