

猪产肠毒素大肠杆菌 987P 蛋白受体的鉴定

朱国强¹, 王建业¹, 朱晓芳²

1 扬州大学兽医学院, 扬州 225009

2 江苏省苏北人民医院, 扬州 225001

摘要: 产肠毒素大肠杆菌(ETEC)定植于仔猪肠道的第一步是通过 987P 菌毛与小肠上皮细胞表面刷状缘大分子(BBV)结合。对分离的 BBV 进行 SDS-PAGE 和 Ligand blot 分析表明, 在 32~35kDa 区域内有一条带能被 987P 菌毛探针所识别和结合, 所结合的条带经胰蛋白酶消化后, 通过微内径反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离出多条主要峰带蛋白峰带, 采用衬质辅助激光解吸与电离质谱法(MALDI-MS)对主要峰带进行分析, 结合多肽氨基酸测序和 Blast 同源性比较, 得到 3 个氨基酸基序(AETAP、ALAAAGYDVEK 和 LGLK), 其序列与人和鼠源的组蛋白 H₁ 高度同源; 来源于仔猪小肠上皮细胞 BBV 的 H₁ 蛋白与 BBV 一样都能特异性结合纯化的 987P 菌毛蛋白。上述结果表明, 仔猪小肠上皮细胞 BBV 的组蛋白 H₁ 是 987P 菌毛蛋白的受体。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌, 987P, BBV, 组蛋白 H₁, 受体

Identification of the 987P Protein Receptors for Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Guoqiang Zhu¹, Jianye Wang¹, and Xiaofang Zhu²

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 2250091, China

2 Northern Jiangsu People Hospital, Yangzhou 225001, China

Abstract: The 987P fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates adhesive interactions with brush border vesicle (BBV) of the intestinal epithelial cells from the neonatal piglets. By adhering to intestinal epithelial cells, producing localized multiplication, the 987P ETEC can progress to mucosal surface colonization and concomitant effective enterotoxin delivery. To identify the receptors for the 987P, BBV proteins from piglet intestinal villous epithelial cells were separated by SDS-PAGE and analyzed by Ligand blot, protein bands with a set of 32~35 kD recognized by the 987P fimbriae were subjected to in gel proteolysis with trypsin. The tryptic fragments were separated by microbore reversed phase HPLC(RP-HPLC), samples shown to contain one major peak by MALDI-MS were submitted to Edman sequencing, three peptides were sequenced successfully and the all of three peptides matched the sequences of human or porcine histone H₁ proteins. Porcine histone H₁ proteins isolated from both piglet intestinal epithelial cells and BBV demonstrated the same SDS-PAGE migration pattern and 987P-binding properties as the 987P-specific protein receptors from piglet intestinal brush border did. The above results indicated that the 987P protein receptors are piglet BBV-derived Histone H₁ proteins.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*, 987P, BBV, Histone H1 proteins, receptor

Received: May 16, 2007; **Accepted:** August 8, 2007

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30571374), Jiangsu National Science Foundation (No. BK2005049), the projects-sponsored by SRF for ROCS, SEM and USDA project (No. 2002-35204-12216).

Corresponding author: Guoqiang Zhu. +86-514-87972590; Fax: 86-514-87972218; E-mail: yzqzhu@hotmail.com, yzqzhu@yzu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30571374); 江苏省自然科学基金(No. BK2005049); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。部分工作在美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室完成和美国农业部 USDA 高新技术 2002-35204-12216 部分资助。

在国内, 987P 产肠毒素大肠杆菌(ETEC)所致仔猪黄痢的严重性及多种疾病(如猪瘟、猪繁殖障碍综合征等)与 ETEC 混合、并发感染的复杂性一直困扰着养猪业^[1,2]。ETEC 与共生非致病性大肠杆菌不同, 其致病性决定于它们在宿主上皮细胞上的定居能力和产生肠毒素的能力, 两者缺一不可。ETEC 定居在小肠上皮细胞的能力是由菌体表面的宿主特异性肠吸附菌毛(粘附素)介导的。病原菌感染机体的第一步也是最重要的一步就是粘附素和宿主细胞表面相应的特异性受体结合, 而介导细菌的定居、宿主细胞信号传递和适当途径的毒素传递, 从而引发机体一系列的病理过程, 直至细胞、组织器官死亡。因此, 从分子水平上研究病原菌粘附素与宿主细胞表面受体相互作用的精确机制, 才能最直接、最有效地阻止病原菌侵入机体细胞, 这是当前病原菌预防和控制研究的最活跃领域^[7]。大多数菌毛能作为凝集素(lectin)介导与不同种类动物红细胞相互作用, 结合于宿主细胞表面糖蛋白或糖脂受体的糖基部位上。与大多数 ETEC 菌毛不同, 987P 不能凝集哺乳动物红细胞或需用化学法处理红细胞后才能获得凝集性^[8], 它仅能与易感仔猪小肠上皮细胞或肠上皮细胞刷状缘大分子(BBV)结合, 但小肠上皮细胞 BBV 大分子上存在何种蛋白质(受体)与 987P 粘附素结合? 多年来兽医界和生物学界试图寻找 987P 蛋白的受体而未果。本文对 987P 蛋白质受体的分离和鉴定方法作如下研究。

1 材料与方法

1.1 动物

1 日龄未吮乳健康仔猪。

1.2 细菌、抗体、酶和试剂

野生型 987P 大肠杆菌、人源 CS18 大肠杆菌和鼠抗 987P 菌毛四级结构特异性单克隆抗体 E₁₁ 来自美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室^[10]。胰蛋白酶、辣根过氧化物酶 HRP 标记的抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司, 增强化学发光 ECL 试剂盒、生物素标记的抗辣根过氧化物酶 HRP、硝酸纤维素膜购自 Bio-Rad 公司, 细菌用 MME 和 LB 培养基来自 Difco 公司。

1.3 987P 菌毛和 BBV 制备

将野生型 987P 和人源 CS18 大肠杆菌(作对照用)接种于含维生素 B₁、B₂ 和甘油的 MME 培养基中, 采用热抽提法制备 987P 和 CS18 菌毛, 经 20%饱和硫酸铵法浓缩后透析^[3]。按 Khan 等(1994)叙述的方

法^[9]制备 BBV, 经显微镜观察后, 用分光光度计测定蛋白质浓度, 小量分装保存于-70°C。

1.4 BBV 的 SDS-PAGE 和 Ligand blot 分析

按 Choi 等(1999)介绍的方法进行^[4]。取分离制备好的 BBV 样品 30 μg 在无还原剂条件下 100°C 处理 5 min 后, 经 SDS-PAGE 分离 BBV 蛋白条带, 以 BIO-RAD 转印系统将凝胶中蛋白条带电转移至硝酸纤维素膜(NC)上, 用 3% BSA 4°C 过夜封闭后, 加纯化的 987P 菌毛(10 μg/mL)室温作用 1 h 后, 加抗 987P 单克隆抗体 E₁₁ 和辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG, 充分漂洗后, 用增强化学发光测定法(ECL)显色。

1.5 氨基酸测序

通过 Ligand blot 分析得知, BBV 样品中 32~35 kD 区域内一条带可被 987P 菌毛识别。将此位置的主要条带回收, 加入胰蛋白酶于 37°C 充分消化, 通过 RP-HPLC 分离, 用 MALDI-MS 对获得的主要峰带进行进一步分析(由宾夕法尼亚大学 Wistar 研究所蛋白质组学仪器室提供测试), 采用 Edman 降解法对获得的单一峰带进行氨基酸序列测序。

1.6 组蛋白 H₁ 分离和 Ligand blot

组蛋白 H₁ 的分离样品来自小肠上皮细胞 BBV, 按 Brix 等(1998)介绍的标准程序进行^[3]: 用高氯酸溶解组织细胞后, 溶解物经 20%三氯醋酸沉淀, 用超纯水溶解后, 用 SDS-PAGE 检测纯度, 收集非溶解抽提物, 同前述进行 987P 菌毛介导的 Ligand blot 分析。

1.7 987P 生物素标记和微量板受体结合试验

将 2 μL 10 mg/mL 的 NHS-LC-LC-Biotin(Pierce 公司)溶液与纯化的 987P 菌毛(1 mg/mL)充分混匀, 室温作用 2 h 后终止, 在 pH 7.2 溶液中充分透析去掉未结合的生物素。受体结合试验按 Khan 等(1994)介绍的方法进行^[9], 即在 PVC 酶标板上包被 H₁ 蛋白或大分子多聚赖氨酸(0.5 μg/孔), 用 5% BSA 封闭后, 洗涤, 然后加生物素标记的 987P 菌毛和抗生物素标记的 HRP, 最后用 OPD 显色。

2 结果

2.1 987P 菌毛结合 BBV 蛋白质

制备的 BBV 经 SDS-PAGE 分离出多种蛋白组分(图 1)和 Ligand blot 后, 在 32~35 kD 区域内有一条带, 能被纯化的 987P 菌毛识别(图 1)。进一步分析得知, 该条带能被蛋白酶 K 和胰蛋白酶消化, 属于蛋白质(图略)。

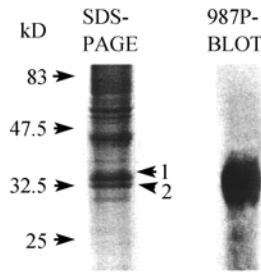


图 1 仔猪小肠上皮细胞 BBV 经 SDS-PAGE 和 987P 菌毛识别 32-35 kD 蛋白条带的 Ligand blot

Fig. 1 Piglet intestinal brush border vesicle proteins separated by SDS-PAGE and recognized by 987P in Ligand blot

2.2 987P 蛋白受体的分子鉴定

RP-HPLC 分离后多条主要峰带经质谱进一步分离、分析后对获得的主要峰带多肽测序结果为 AETAP、ALAAAGYDVEK 和 LGLK 三个小肽。BLAST 搜索表明, 这 3 个基序与人和小鼠、大鼠组蛋白 H₁ 蛋白序列完全一致(图 2), 也与猪 H₁ 变异株

(猪睾丸特异性 H₁ 蛋白)和在 ESTs 数据库中猪的两个 H₁ 蛋白序列高度同源。

2.3 987P 结合纯化的猪 H₁ 蛋白

来自仔猪小肠上皮细胞 BBV 的纯化 H₁ 蛋白(图 3 泳道 3 和 6), 经 SDS-PAGE 分离后, 与 BBV(图 3 泳道 4 和 6)或大鼠 H₁ 蛋白一样(图 3 第 1 泳道), 出现 32~35 kD 左右的蛋白条带, 而 BBV 蛋白的高氯酸非溶解抽提物(图 3 泳道第 2 和 5 泳道), 似乎不存在此条带, 987P 菌毛 Ligand blot 分析未见任何印迹条带(图 3 第 5 泳道), 而 BBV 蛋白的高氯酸溶解物纯化 H₁ 蛋白(图 3 第 6 泳道)和 BBV(图 3 第 7 泳道)都能被 987P 识别。微量板受体结合试验表明, 987P 能很好地结合游离的纯化 H₁ 蛋白, 人源 987P 样菌毛(CS18)虽然能结合上一些, 但不显著, 而 BSA 几乎不能结合 H₁ 蛋白(图 4)。同时用等量大分子多聚赖氨酸包被 PVC 酶标板, 987P 几乎不能结合碱性大分子多聚赖氨酸。



图 2 三个小肽氨基酸序列与人和小鼠、大鼠组蛋白 H₁ 蛋白序列同源性比较
Fig. 2 The 3 sequenced motifs aligned to 3 human, 2 murine and 1 rat histone H1 proteins

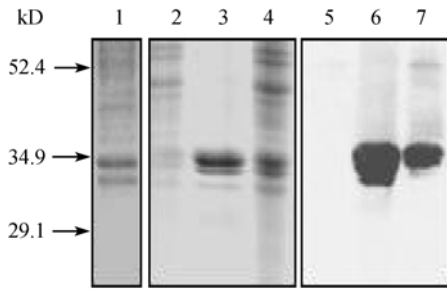


图3 组蛋白 H₁ 和 BBV 源 H₁ 蛋白 SDS-PAGE(第 1~4 泳道)和 987P 菌毛介导识别的 Ligand blot(第 5~7 泳道)
Fig. 3 Histone H1 proteins and the BBV receptor proteins for 987P

Coomassie blue stained gels (lanes 1~4), and Ligand blot (lanes 5~7) of BBV or purified histone H1 proteins. Rat histone H1 proteins (lane 1), porcine histone H1-depleted BBV extract (lanes 2 and 5), porcine histone H1 proteins purified from BBV (lanes 3 and 6) and total piglet BBV proteins (lanes 4 and 7)

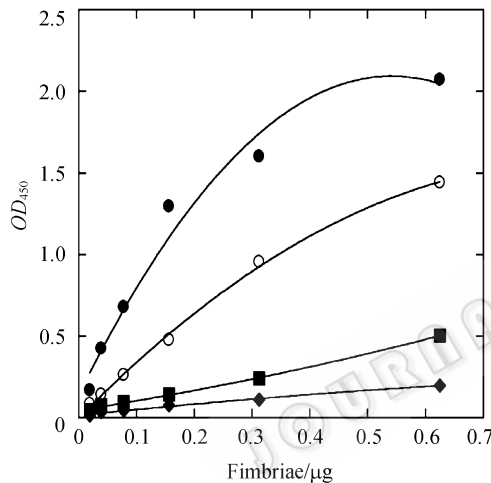


图4 生物素标记 987P 和纯化 H₁ 蛋白或碱性大分子多聚赖氨酸微量板受体结合试验

Fig. 4 Binding of biotinylated 987P fimbriae (●), 987P-like CS18 fimbriae (○) or BSA (◆) to microtiter wells coated with purified piglet histone H1

Binding of the 987P fimbriae was also tested with coated poly-L-lysine (■)

3 讨论

Dean 等(1990)从仔猪小肠上皮细胞分离制备出 BBV 大分子, 经 SDS-PAGE 和 Ligand blot 后, 结果显示 32~35 kD 蛋白条带能被纯化的 987P 菌毛探针特异性标识^[6], 该组蛋白能被胰蛋白酶和蛋白酶 K 消化。Khan 等(1994)证明 987P 菌毛次要结构亚单位 FasG 可能为该蛋白受体的特异性结合配体^[9]。Choi 等(2001)进一步证明了 FasG 结构亚单位上至少两个连续结合区域与该蛋白受体结合^[5]。本研究中, 32~35 kD 结合蛋白条带经胰蛋白酶处理消化, 用

RP-HPLC 结合 MALDI-MS 分离后, 采用 Edman 降解法测序, 获得 AETAP, ALAAAGYDVEK 和 LGLK3 个基序列, 与人和小鼠、大鼠组蛋白 H₁ 蛋白序列完全一致(图 2), 也与猪 H₁ 变异株(猪睾丸特异性 H₁ 蛋白)和在 ESTs 数据库中猪的两个 H₁ 蛋白片段同源。所获上述结果为仔猪小肠上皮细胞组蛋白 H₁ 基因的克隆表达和功能活性深入研究(另文报道)提供关键信息。

从 BBV 中提纯的天然 H₁ 蛋白, 为无半胱氨酸和非糖基化蛋白质。上述特性与该蛋白质经二巯苏糖醇(DTT)或 N 糖苷酶 F 处理后而不影响与 987P 结合特性完全符合^[11]。H₁ 蛋白实际分子大小为 22 kD 左右, 但由于其带多个碱性氨基酸, 其 SDS-PAGE 泳带大小为一组分子基为 32~35 kD 大小的同分异构体蛋白, 与 BBV 经 Ligand blot 后, 被 987P 识别蛋白条带大小相一致。通过与生物素标记的 987P 结合试验表明, 其特异性结合 987P 呈剂量依赖性(图 4), 这种特异性结合受体与未标记 987P 剂量和浓度成正相关抑制。BBV 中提取的 H₁ 蛋白与 987P 特异性结合, 而不含 H₁ 蛋白的 BBV 残余物不能与 987P 结合, 上述结果进一步证明 H₁ 蛋白为存在于 BBV 中唯一的 987P 蛋白受体。

本研究鉴定出小肠上皮细胞 BBV 上存在的 987P 蛋白受体, 对于进一步研究 987P 结合域和抗菌粘附素定居提供了预防和治疗的线索。鉴于人和动物病原菌在肠道感染中的重要地位, 有望在不远的将来对肠道上皮细胞和特定病原菌相互作用分子机制有着更为深入了解。

REFERENCES

- [1] Bertschinger HU, Nief V, Tschape H. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Veterinary Microbiology*, 2000, 71: 255-267.
- [2] Barnhart MM, Saruer FG, Pinkner JS, et al. Chaperone-subunit-usher interactions required for donor strand exchange during bacterial pilus assembly. *J Bacteriol*, 2003, 185: 2723-2730.
- [3] Brix K, Summa W, Lottspeich F, et al. Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J Clin Investig*, 1998, 102: 283-293.
- [4] Choi BK, Schifferli DM. Lysine residue 117 of the FasG adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* is essential for binding of 987P fimbriae to sulfatide. *Infect Immun*, 1999,

- 67(11): 5755–5761.
- [5] Choi BK, Schifferli DM. Characterization of FasG segments required for 987P fimbria-mediated binding to piglet glycoprotein receptors. *Infect Immun*, 2001, **69**(11): 6625–6632.
- [6] Dean EA. Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestines of neonatal and older pig. *Infect Immun*, 1990, **58**(12): 4030–4035.
- [7] Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol*, 1998, **6**: 282–287.
- [8] Ike K, Nakazawa M, Tsuchimoto M, *et al.* Hemagglutination by pilus antigen 987P of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology & Immunology*, 1987, **31**: 1255–1258.
- [9] Khan AS, Schifferli DM. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the ashesin. *Infect Immun*, 1994, **62**: 4233–4243.
- [10] Schifferli DM, Abraham SN, Beachey EH. Use of monoclonal antibodies to probe subunit-and polymer-specific epitopes of 987P fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1987, **55**: 923–930.
- [11] Zhu GQ, Chen H, Choi BK, *et al.* Histone H1 proteins act as receptors for the 987P fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(24): 23057–23065.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

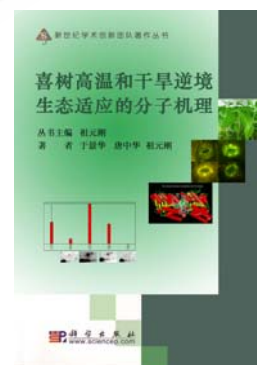
喜树高温和干旱逆境生态适应的分子机理

于景华 唐中华 祖元刚 著

978-7-03-020718-0 ¥46.00 2008年1月10日出版

以功能蛋白质组为特征的分子生态适应研究是当前分子生态学领域的前沿。本书基于对喜树(*Camptotheca acuminata* Decne)幼苗在人工培养条件下进行的高温 and 干旱胁迫处理, 对其生理代谢差异、次生代谢产物含量动态、蛋白质电泳图谱变化特性及有明确鉴定结果的差异蛋白质斑点功能加以分析, 对高温和干旱逆境胁迫下喜树幼苗的生理生态适应、喜树碱等生物小分子的生态适应及功能蛋白质等生物大分子的生态适应功能进行了研究。全书共分7章。阐述了不同逆境条件下喜树碱类次生代谢物质的动态及其生理机理, 以及喜树幼苗应对高温和干旱逆境的功能蛋白质基础, 为喜树野生种群的保护、人工种群的培植提供理论基础。

本书可供植物学、生态学及林学等领域的科研、教学人员和研究生参考。



北京市预防接种工作技术规范

贺雄 孙美平 主编

978-7-03-020030-3 ¥60.00 2007年12月17日出版

本书是一本全面系统地介绍北京市预防接种工作技术规范的专著。全书共分24章, 详细阐述了脊髓灰质炎、麻疹、风疹、流行性腮腺炎、白喉、百日咳、新生儿破伤风、流行性脑脊髓膜炎、流行性乙型脑炎、人狂犬病、水痘和乙型病毒性肝炎等12种疫苗针对传染病的监测技术与方法; 介绍了疫苗、冷链系统、常规免疫接种、预防接种不良反应、免疫效果与疫苗滴度等诸方面的管理规范、监测技术或监测方法; 论述了预防接种规范化门诊标准; 同时还对预防接种工作管理制度和免疫预防监测检验工作管理规范作了介绍。

本书供从事免疫预防工作的预防保健人员、疾病预防控制人员和卫生行政人员使用, 也可供临床医务人员和其他公共卫生工作者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目