

细菌鞭毛研究概况及进展*

李任峰^{1,2} 何启盖^{1**} 周 锐¹ 陈焕春¹

(华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室动物病原分室 武汉 430070)¹

(河南科技学院动物科学学院 新乡 453003)²

摘要: 鞭毛是细菌的一种特殊结构, 约半数的杆菌、极少数球菌和所有的螺旋菌及弧菌都有鞭毛。鞭毛与细菌的运动有关, 并在感染与免疫以及分类鉴定等方面发挥重要的作用, 受到细菌研究者的高度重视。从细菌鞭毛的结构以及它在细菌致病性和免疫中的作用最新研究进展加以概述, 以供细菌研究者参考。

关键词: 细菌, 鞭毛, 运动性, 抗原, 毒力相关因子

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0124-04

The Research Advances on the Bacterial Flagella*

LI Ren-Feng^{1,2} HE Qi-Gai^{1**} ZHOU Rui¹ CHEN Huan-Chun¹

(Division of Animal Infectious Disease, National Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)¹

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and
Technology Xinxiang 453003)²

Abstract: Flagella is an unique structure that presents in appropriate half of bacillus, few coccus, and all of spirilla and vibrio. It is associated with bacterial motility and plays an important role in bacterial infection and immunity as well as classification. This review focused on the research progress on bacterial flagella, including staining methods, the structure and function of flagella gene, as well as immunogenicity of flagellin.

Key words: Bacterium, Flagella, Motility, Antigen, Virulence-associated factor

鞭毛是细菌菌体表面的一种细长、弯曲、呈波浪状的特殊结构, 是细菌的运动器官。它是细菌在进化过程中长期适应的结果, 使细菌更好地适应环境, 有利于细菌的生存。此外, 细菌还可以通过鞭毛的趋化作用寻找营养物质和逃避不利环境。

电镜出现以前, 人们认识鞭毛是通过鞭毛染色法。直到 1951 年, Koffler^[1] 利用电镜观察到了鞭毛。此后, 其它先进的物理化学技术也被应用于鞭毛超微结构及其本质的深入研究中。近几年来随着分子生物学技术的广泛应用, 对细菌鞭毛的研究已经上升到分子水平, 取得了一些新的进展。现将有关细菌鞭毛的研究近况概述如下。

1 基本特征

1.1 化学组成 鞭毛的化学组成主要是蛋白质, 分子量约为 30 ~ 60 kD, 抗原性良好, 可作为细菌的分类依据之一 (H 抗原), 其蛋白质是一种弹力纤维蛋白, 氨基酸的组成与骨骼肌的肌动蛋白相似^[2]。

* 湖北省重点科技攻关资助项目 (No. 2001AA201B020)

** 通讯作者 TEL: 027-87282608, E-mail: heqigai@yahoo.com

收稿日期: 2005-03-04, 修回日期: 2005-04-21

1.2 形态结构 鞭毛长约 5nm ~ 20nm, 直径 12nm ~ 30nm, 须用电子显微镜观察, 或经特殊染色方法使之着色后在光镜下才能观察到。鞭毛由基础小体、钩状体和丝状体等 3 部分组成^[3]。(1) 基础小体 (Basal): 位于鞭毛根部, 嵌在细胞壁和细胞膜中。革兰氏阴性菌 (G^-) 鞭毛的基础小体由 4 个与中央杆相连的环组成, 由内向外分别为 M 环、S 环、P 环和 L 环; 革兰氏阳性菌 (G^+) 的鞭毛只有 M 环和 S 环, 其部位同革兰氏阴性菌。(2) 钩状体 (Hook): 鞭毛伸出细胞壁后的部分称为钩状体, 呈约 90° 钩状弯曲, 并由此伸出丝状体。(3) 丝状体 (Filament): 呈丝状, 伸出于菌体外, 由鞭毛蛋白紧密排列并缠绕而成的中空管状结构。

2 染色方法研究

作为细菌的运动器官, 鞭毛的数量、形态和它在菌体的分布位置是鉴定细菌的重要指标, 但由于它的直径非常纤细, 必须采用特殊的染色方法才能在显微镜下观察到^[4]。尽管目前细菌鞭毛染色方法报告较多, 但基本染色方法可概括为: 赖夫生染色法、西萨-基尔染色法、银盐染色法、柯达卡溶液染色法及负染色, 这些方法中, 以赖夫生染色法最为常用。刘德容等^[5]在赖夫生染色法的基础上, 从细菌鞭毛染色的过程着手, 尽量减少样品处理步骤, 降低鞭毛断脱数目, 并在染色操作的细节上作了进一步改善, 从而大大提高了鞭毛染色效果。郭坚华等^[6]在传统的赖夫生染色法的基础上, 发现了延长赖夫生染剂使用寿命及改进染色效果的方法, 分析了影响染色效果的因素, 包括玻片清洁度、培养基、细菌生长期及操作因素、染剂配制及保存条件等。为进一步改善鞭毛染色效果提供了更好的理论依据。

3 分子生物学研究

3.1 部分细菌的鞭毛编码基因 目前, 研究较为清楚的是沙门氏菌中 H_1 和 H_2 基因、伯氏疏螺旋体和假单胞杆菌的 H 基因, 它们的突变都能导致丝状体形成效率及形态的改变、鞭毛趋向型噬菌体敏感性的改变以及鞭毛抗原的特异性发生改变。除 H 基因外, 还有 *fla*、*mot*、*che* 和 *nml* 等鞭毛编码基因, 其中 *fla* 基因一般被用于突变表型分析; *mot* 基因与鞭毛的运动功能相关; *Che* 基因为趋化紊乱突变株的基因, 是由 *mot* 基因突变而来, 与细菌的趋化性有关, 其基因产物在细菌的信号传导中发挥调节作用; *nml* 基因存在于沙门氏菌的一些血清型中, 它控制着鞭毛氨基酸的甲基化作用^[7]。

为了使鞭毛基因符号更加规范和统一, 1988 年, Tetsuo 等^[8]制订了鞭毛基因命名原则, 内容如下: (1) 鞭毛基因符号以 *fl*-开始, 其中第 3 个字母由鞭毛基因在细菌染色体的位置来决定。在 I 区段的用 *flg* 符号代表; II 区段用 *flh* 代表; III 区段用符号 *fli* 代表; 而沙门氏菌 II 相鞭毛基因用 *flj* 符号代表。(2) 每个区再根据基因组的顺序按英文字母表来扩充, 如 *flgA*、*flgB* 等。(3) 其他建议: ①若再发现其它鞭毛基因时, 应再按基因区段和基因组顺序扩大, 若在一个基因位点上发现几个基因时, 除按上述原则扩大外, 也可以废除原来符号, 重新编排, 但应避免罗马字母扩大。②*fl*-为非表型基因的编写。③从应用原则上, 用 *flg* 代替原符号 *flag*, 用 *flh* 代替原符号 *flah*, 用 *fli* 代替 *fluh*, 用 *fli* 代替原符号 *fly* 和用 *flj* 代替 *flaj*。如涉及大肠杆菌和沙门氏菌的鞭毛基因时, 可用 *E* 或 *S* 作下符标记。现在, 很多细菌鞭毛的基因序列已被收入数据库 (见表 1), 并且还在不断扩充。

3.2 鞭毛蛋白中央区的可变性 鞭毛蛋白有一个明显的特征性结构, 此结构由非常保守的 *N* 末端和 *C* 末端组成, 而且研究发现, 其中央区在氨基酸序列和大小方面差别很大。Wei 等^[9] 曾经报导, 沙门氏菌的鞭毛蛋白基因的末端区域有很高的保守性, 对鞭毛的运动起调节作用, 而中央区的保守性很低, 一般认为它与鞭毛蛋白抗原的可变性有关。1987 年, Homma *et al.*^[10] 提出鞭毛蛋白单体可折叠形成发夹结构模型, 这一结构带有保守的 *N* 末端和 *C* 末端区域, 其功能是负责形成基本的纤维结构, 而中央区是暴露于表面的高度可变区, 大量研究证明, 即使在不受任何不利条件的影响下, 当鞭毛蛋白组装成纤丝时, 中央区也会发生很大的改变。

表 1 部分细菌的鞭毛基因的 GenBank 登录号、基因大小和编码的氨基酸数目

细菌种类	序列登录号	基因大小 (bp)	编码氨基酸数目
大肠杆菌	M14358	1667	498
伤寒沙门氏菌	D13689	1826	495
苏云金芽孢杆菌	U26679	1573	414
枯草芽孢杆菌	X56049	8302	303
空肠弯曲杆菌	J05635	3832	576
伯氏疏螺旋体	X16833	1435	336
齿状粘杆菌	M27219	1544	351
结肠耶耳森氏菌	L33467	1300	358
变形杆菌	L07270	3567	365
猪胸膜肺炎放线杆菌 (<i>fliC1</i>)	AF515472	674	224
猪胸膜肺炎放线杆菌 (<i>fliC2</i>)	AF515473	528	176
李氏杆菌	X65624	1498	287

在进化分析方面, Sean 等^[11] 对所分离到的 15 株致病性大肠杆菌的 *fliC* 基因进行了克隆测序后, 对其中的 H6 和 H7 菌株的 *fliC* 基因比较表明, 它们的等位基因有一个嵌合结构, 这一结构是由不同菌株间 DNA 片段的横向转移所产生的, 这种 H7 基因序列紧密的相似性是由于在 *fliC* 等位基因间发生了交换。系统发生关系分析表明, O157: H7 和 O55: H7 两种血清型菌株的 *fliC* 序列几乎完全相同, 但与那些表达 H6 和 H2 鞭毛抗原的大肠杆菌相比差别很大。他们还发现, 一株山梨醇发酵的非运动型克隆株 O157 能很快产生多个 *fliC* 突变, 推测这可能是鞭毛 *fliC* 基因表达受到抑制的结果。

4 已发现的功能

4.1 与运动相关 鞭毛是细菌的运动器官, 细菌在鞭毛的带动下, 朝着有利于自己生存的地方运动, 这种“有目的”的运动将有助于阐明细菌对细胞的粘附和致病机理。另外, 细菌的运动有化学趋向性, 常向富含营养物质处运动。细菌的运动性可采用悬滴法和暗视野映光法来观察, 此外还可以采用半固体穿刺培养, 从细菌的扩散情况来初步判断细菌是否具有运动能力。

4.2 与毒力相关 现已证明, 鞭毛除了作为细菌的运动器官, 它还在细菌的粘附定居和侵入组织细胞等环节中起重要作用。Chua 等^[12] 对假单胞杆菌强毒株 KHW 的 *fliC* 基因进行了同源基因缺失突变, 从而成功构建 KHW *fliC* 突变株。该突变株无鞭毛, 并且在半固体琼脂培养基上无运动性。实验证明, 与野性型假单胞杆菌相比, 其复制的能力并没有降低, 但经鼻内感染实验发现其丧失了对 Balb/c 小鼠的毒力, 感染后从小鼠

肺和脾脏中几乎分离不到细菌。因此,可以证明,在小鼠的鼻内和腹腔感染假单胞杆菌过程中,鞭毛确实是一种重要而且必需的毒力决定成份。

4.3 与抗原性相关 随着人们对细菌鞭毛蛋白研究的不断深入,目前已经发现很多细菌的鞭毛具有抗原性,它们能产生针对该鞭毛的抗体。吕冰等^[13]对中国莱姆病螺旋体的 *Borrelia garinii* 基因参考菌株 PD91 的鞭毛蛋白的中央区编码基因进行克隆表达,证明重组蛋白具有抗原性,为我国莱姆病血清学诊断研究提供了帮助。孙树汉等^[14]将钩端螺旋体的鞭毛基因 *flaB* 定向克隆至原核表达载体 pGEX-5T,构建重组融合表达质粒 pGF,并在大肠杆菌中实现了高效表达,并且建立了 ELISA 检测方法,从而为钩体病的诊断提供了免疫学方法。

5 分类意义

细菌鞭毛的数目和位置因细菌种类而异,根据鞭毛的数目和着生部位,可将细菌分为 4 类:单毛菌、双毛菌、丛鞭毛菌和周毛菌。此外,人们可以根据菌体抗原(O 抗原)和鞭毛抗原(H 抗原)的种类,对大肠杆菌和沙门氏菌进行血清型的鉴定。现已研究表明,与仔猪黄痢相关的大肠杆菌 O 抗原群主要有 O8、O9、O60、O64、O115、O139、O141、O149、O157 等;与水肿病相关的 O 抗原群主要有 O8、O139、O138、O141、O149 等。沙门氏菌 H 抗原的多样性已经得到充分揭示,迄今 Kauffman 抗原表中 H 抗原有 63 种,它们是沙门氏菌分型的依据之一。

6 展望

本文从细菌鞭毛的结构与功能、染色方法、鞭毛蛋白及其基因、鞭毛的致病性与抗原性等几个方面对其研究历史及最新研究进展进行了综述。虽然鞭毛只是某些细菌的特殊结构,但它在细菌鉴别与分类、致病性、抗原性等方面具有重要意义。例如利用鞭毛蛋白共同抗原表位高度的属特异性,可作为菌属识别标志,用于细菌快速检验和抗原结构研究,还可利用鞭毛蛋白的抗原性和免疫原性开展细菌性疾病疫苗的研究,以及从细菌鞭毛的运动性着手,对细菌感染细胞的机理及免疫机制进行研究。因此,对细菌鞭毛的研究必定会更加深入和细致,这将有助于细菌分类、病原细菌的致病与免疫机制、新型抗菌素及疫苗的设计等领域的研究。

参考文献

- [1] 林万明主编. 医学分子微生物学进展(上册). 北京:中国科学技术出版社, 1991. 311.
- [2] 周正任主编. 病原生物学. 北京:科学出版社, 2004. 22.
- [3] 石佑恩主编. 病原生物学. 北京:人民卫生出版社, 2002. 54.
- [4] 程皆能主编. 微生物生理学. 上海:复旦大学出版社, 1989. 85.
- [5] 刘德容, 李晓虹. 微生物学通报, 1998, **25** (2): 119 ~ 121.
- [6] 郭坚华. 微生物学通报, 2001, **28** (6): 100 ~ 103.
- [7] Lino T, Mitani M. Ann Rev Genet, 1997, **11**: 161 ~ 182.
- [8] Tetsuo IINO, Komeda Y, Kutsukake K, et al. Microbiol Rev, 1988, **52**: 512 ~ 533.
- [9] Wei L N, Joys T M. J Mol Biol, 1985, **186**: 791 ~ 803.
- [10] Homma M, Fujita H, Yamaguchi S, et al. J Bacteriol, 1987, **169**: 291 ~ 296.
- [11] Reid S D, Selander R K, Whittam T S. J Bacteriol, 1999, **181** (1): 153 ~ 160.
- [12] Chua K L, Chan Y Y, Gan Y H. Immune, 2003, **71** (4): 1622 ~ 1629.
- [13] 吕冰, 万康林. 中华微生物与免疫学杂志, 2004, **24** (8): 611 ~ 614.
- [14] 寇志化, 孙树汉. 中国人兽共患病杂志, 2004, **20** (3): 180 ~ 182.