

综述

毒素源性大肠杆菌致病因子的
分子遗传学进展

军事医学科学院分子遗传室 张林元 黄翠芬

大肠杆菌是人们最熟悉的肠道菌，一般认为不致病，但在十九世纪开始有毒素源性大肠杆菌引起家畜腹泻的报道，尔后发现引起婴儿、成人和旅行者腹泻。这种大肠杆菌致病因子受质粒控制。近几年遗传工程技术的应用，对决定菌毛表面抗原的定居因子及产生毒素的基因都进行了无性繁殖，获得新的进展。本文对毒素源性大肠杆菌定居因子K88，肠毒素，热敏感毒素和霍乱毒素关系等三个方面作些介绍。

定居因子

毒素源性大肠杆菌靠菌毛粘附到哺乳动物小肠上皮细胞，然后进行繁殖引起腹泻。菌毛抗原是由细菌的传递性质粒控制的。此种菌毛抗原对细菌的致病性密切相关。在血清学上类似于K抗原。从猪分离到的毒素源性大肠杆菌带的K抗原称为K88、987p；从牛、羊分离到的菌带K99抗原；从腹泻病人分离到的带CFA1和CFA2抗原。这几种表面抗原（或称吸附素）在免疫学上，理化性质等方面都有区别。吸附素的遗传决定子位于75~135Kb的大质粒上〔1, 2〕，带K88的质粒往往同时带K88基因和发酵棉子糖基因，因此在两种细菌之间进行接合转移或提取质粒DNA进行转化时发酵棉子糖可以作为一种选择标记，只要能发酵棉子糖的细菌一般带K88基因。Mooi〔3〕发现K88和Raf（棉子糖）遗传决定子位于质粒上，两个基因不是紧密连锁的，而是被约20Md的DNA所隔开。Schmitt〔4〕发现K88和RafDNA两侧有直接的重复插入序列ISI，在细菌中依赖recA基因进行转移。并提出这种细菌利用棉子糖产生的细胞壁，能抵抗吞噬细胞的溶解，从而增强细菌适应性。

现在已知K88抗原具有三种血清型，即K88abK88ac和K88ad，已由Mooi〔5〕，Shipley〔6〕，Kehoe〔7〕及Meijerink（未正式发表）进行了K88基因的无性繁殖。他们用多拷贝的大肠杆菌质粒pBR322DNA作

载体，用HindⅢ限制酶消化带K88基因的质粒DNA，形成十三个HindⅢ的酶切DNA片段，再与同种酶消化的pBR322DNA相连接，然后转化到大肠杆菌受体菌C₆₀₀，用下述三种试验分析：K88⁺（与K88的抗血清凝集），Adh⁺（带K88的细菌菌毛强力粘附到离体的猪刷状缘细胞）；MRHA⁺（豚鼠红细胞抗甘露糖血凝）均出现阳性，则认为这种重组体为带K88的转化子。结果发现三种不同的血清型的K88决定子位于约7~8Md的HindⅢ片段上，含K88ac的HindⅢ酶切片段的重组体叫pPSOO2，在微细胞里至少表达六种蛋白，其分子量范围是18,000d到70,000d，检定其中的23,500d多肽具有K88ac亚单位，这一蛋白分子量与提纯K88抗原亚单位完全一样。为了研究K88ac的基因调控和生物合成，构成了各种缺失和插入pPSOO2的突变体，其中一个突变体含K88acDNA的4.2Md的片段，用检定K88重组体的三种试验均出现阳性。不仅制作了pRI8801质粒的限制性酶切图，还研究了K88吸附素系统的四个顺反子，前三个顺反子(adhA、adhB和adhC)位于操纵子I，第四个顺反子adhD位于操纵子II。再用两个不同的共容性质粒分别克隆两个操纵子，发现这两个操纵子对K88基因的表达是互补的。第一个操纵子产生三种多肽17,000d，29,000d和70,000d对第二个操纵子产生的菌毛多肽23500d起正调节作用。

MOOI已无性繁殖了含K88ab决定子的7.7Md的HindⅢ片段，切去该片段中的3.4Md的EcoRI片段，获得更小重组体叫pFM205，仍然能表达K88ab抗原。含4.2Md的重组体在微细胞至少表达六种蛋白，分子量分别为17,000d，26000d，27,000d，27,500d，30,000d和81,000d。其中26,000d多肽为K88ab菌毛亚单位抗原。并且制作了pFM205的物理图。用微细胞抑制蛋白水解的方法确定，K88abDNA被翻译成前体蛋白，这种蛋白比成熟多肽约大2,000d，并指出由信号序列把五种多肽运送到细胞膜外。从菌毛亚单

位前体存在的信号序列能推算出为K88亚单位编码的基因核苷酸序列。现在已测定了K88ab, K88ad的核苷酸序列[8, 9]。为了研究K88ab的生物合成及基因的功能, 构成了pFM205的缺失突变体, 缺失27,000d多肽则K88ab亚单位很快会被蛋白酶水解, 但该多肽在菌毛生物合成的哪个时期发生作用还一无所知。17,000d多肽有可能参与K88ab亚单位形成时的修饰。含缺失27,500d多肽基因质粒的菌株仅产生很少的K88ab吸附素, 但仍然能吸附到刷状缘细胞, 并凝集红细胞。但27,500d多肽是否涉及K88ab菌毛的生物合成至今不明。

虽然上述克隆K88ab和K88ac决定子的结果十分相似, 但是还有一些不同。Kehoe[7]提出17,000d多肽对产生K88亚单位的操纵子起正调作用。而Mooi分离到几株不表达17,000d多肽的pFM205缺失突变体, 仍然表达菌毛抗原亚单位。分析17,000d多肽位于胞质外, 这就排除至少在转录水平上起正调作用的可能性。Kehoe分离到产生插入K88ac吸附素的29,000d多肽的突变体, 表明能吸附到上皮细胞, 可是不能凝集红细胞。这一多肽可能类似于Mooi描述的27,000d多肽。但是缺失27,000d多肽基因的重组体不产生K88ab吸附素。用易位子插入DNA的方法能大大提高K88基因的产量。培养温度对K88基因的表达亦有很大的影响, 所以要获得高产的K88抗原一般以37°C培养为宜。分析了K88基因, 不仅深入了解其基因的结构与功能, 新的重组体比原来带K88基因的质粒要小的多, 产生K88抗原高, 而且已经获得高产突变体, 有可能成为预防毒素源性大肠杆菌新的疫苗菌。K88仅是研究其他定居因子的一个模型, K99基因已进行了无性繁殖。对987P即将有深入的研究。虽然发现CFA1和CFA2的时间不长, 但是它与人类却有着密切的关系, 可能更会引起人们的重视。

肠 毒 素

毒素源性大肠杆菌开始从猪腹泻时分离到以后又从人腹泻时分离到[1, 11]。这种菌一般产生二种肠毒素: 一种叫热敏感毒素(LT), 经60°C, 30分钟处理后被灭活, 有免疫原性, 是分子量较大的蛋白质, 用福尔马林处理成类毒素。另一种叫热稳定毒素(ST), 分子量小, 无免疫原性, 加热100°C, 经10分钟不能灭活。两种毒素都是受质粒(ENT质粒)控制的, 这类质粒长为80~100Kb左右。毒素源性大肠杆菌有的只产生一种LT或ST, 有的菌同时产生两种毒素。有

的质粒还带抗药性基因。这种质粒可以从一种细菌接合转移到另一种细菌, 也可以提取质粒DNA, 转化到其它菌株中去, 此种质粒也叫自身接合转移性质粒。

对肠毒素的分子遗传学研究主要是横田健[12], So[13]和Dallas[14]等。常用的两个质粒是无抗药性标记的ENTp307和带抗药性的pCG86质粒, 用pBR313或pBR322作载体DNA, 克隆LT和ST基因, 发现ST基因是易位子, 而且与LT基因一起构成高频易位子。所以, 这种质粒是不稳定的, 在细菌传代时易发生解离, 由于抗药性基因和肠毒素基因都有易位子的结构。这些基因能从一种细菌质粒上跳到另一种细菌的质粒上, 从而增强了细菌对环境的适应性。对流行病学的预防工作造成新的困难。用重组DNA的方法研究表明LT基因由A和B二个顺反子组成, 这两个顺反子位于1.8Kb的DNA片段内, 该片段的分子量为1.2Md。这样长的DNA片段足以编码600个氨基酸的LT蛋白。并用微细胞系统研究带毒素基因的重组体的表达, 证明LT的亚单位A(eltA)和B(eltB)的顺反子是作为一个单位转录成mRNA。启动子位于A亚单位的氨基端。Dallas[15]和Spicer[16]分别作了eltA和eltB的氨基酸和核苷酸的序列分析, 发现A和B的两个顺反子被200bp的间顺反子隔开。两个顺反子前有一个核糖体结合部位, A亚单位的氨基端有一个18个氨基酸的信号肽序列, 两个顺反子的翻译产物通过细胞膜分泌到胞外, 两个亚单位蛋白再聚合成LT全毒素。并指出亚单位的成分A₁和A₂的排列方式是A₁-A₂。但对LT的产生, 基因的调控机制还了解的不多。Bramucci[17]用亚硝基胍诱变的方法, 获得高产LT的突变株。Wensink[18]发现不同的染色体突变也会影响LT的合成。Maas[1]用易位子3(Tn3)和易位子5(Tn5)插入毒素源性大肠杆菌染色体和产生肠毒素的质粒DNA, 对LT基因产生极性效应从而获得高产LT的突变株。

ST无抗原性, 测定方法困难, 所以这方面的工作进展缓慢。So[19]横田健、竹田美文[20]、Alde-rette[21]等用重组DNA技术无性繁殖了ST基因, 用电镜照相术分析核苷酸的结构, 指出ST基因呈现茎环结构的易位子。ST蛋白耐热, 不能用一般提纯蛋白法精制ST, 曾得到不含类脂多糖和脂质的高纯度ST, 测定其分子量为4,400d的小分子多肽, 用链霉蛋白酶, 胰蛋白酶和蛋白酶K处理均不能失活, 氨基酸分析发

现只含有极少的疏水氨基酸,但胱氨酸的含量很高,对编码ST的易位子Tn1681进行DNA序列分析。也存在易位子结构,在N端有信号肽,使ST能分泌到培养液中去。ST由72个氨基酸组成,能刺激鸟苷酸环化酶而影响寄主细胞,虽然进行了DNA序列分析,可是没有得到ST基因突变体。Silva[22]发现了pCG86的ST基因突变体,制作了质粒的基因物理图。但没有进行DNA的序列分析,所以至今对ST的生物合成,调控机制还一无所知。

肠毒素LT和霍乱毒素CT的关系

肠毒素LT和霍乱毒素(CT)在免疫原性,毒素分子量,发病症状,作用机制,氨基酸和核苷酸序列分析等方面都具有同源性。测定CT的方法也适用于测定LT。LT有A和B二个亚单位组成,分子量分别为28,000d和11,500d,霍乱毒素也由相似的二个亚单位组成,分子量分别为28,000d和16,000d。用胰酶和2-巯基乙醇处理A亚单位可分成分子量为21,000d的A₁和7000的A₂二个亚基。Gyles[25]最早报道CT和LT有相关免疫原性。Yoshifumi[26]从旅行者腹泻的病人分离到毒素源性大肠杆菌,精制毒素,用6M尿素处理可将LT分成A和B两个亚单位,在试管里两个亚单位可重新连接成具有生物活性的毒素,若用LT的亚单位(LTA)和(CTB),或LTB和CTA亚单位分别连接成杂种毒素也具有生物学的活性。Gill[27]证实LT和CT都有一个A亚单位和五个B亚单位包围成的分子结构。用二酰亚胺,能形成A₅B交叉连接的衍生物。霍乱毒素更相似于LT的R型。这些结果都表明两种毒素之间非常相似。

Moseley[28]用编码LTA的1275bp的Hinc II片段,以及编码LTB的590bp的EcoRI-Hind III片段作为DNA的杂交探针,提取古典生物型霍乱弧菌和副霍乱弧菌的染色体DNA,用EcoRI酶完全消化,按Southern[29]的方法,把二个DNA杂交探针和经EcoRI酶消化的霍乱弧菌DNA片段进行杂交,虽然二个探针DNA中的G-C碱基含量不同,获得DNA杂交的放射自显影带的结果相同,不仅揭示LT的两个亚单位的DNA和霍乱毒素的DNA具有同源性,也表明古典生物型的霍乱毒素基因可能存在三个EcoRI酶的切点,使霍乱毒素基因被这种酶消化成四个片段,与探针杂交时则出现四条放射自显DNA带。二个探针与副霍乱毒素基因杂交形成一条放射自显的DNA带,此

基因可能只有一个EcoRI酶切点, DNA杂交结果与至今只得到副霍乱弧菌的无毒突变株,而没有获得古典生物型霍乱弧菌无毒突变株,这一事实似乎相符合。Dallas测定LT-B的核苷酸序列时,同CT-B的氨基酸和核苷酸序列直接进行了比较,表明两个亚单位的核苷酸序列有同源性,两者的氨基酸有79%的同源性。Spicer测定了LT-A的核苷酸序列,这个区段可翻译成氨基端到羧基端的一级结构的LTA亚单位。同CT-A进行比较,表明两种毒素A亚单位有同源性。提出LT和CT可能由一个共同毒素基因进化来的。从带LT-B基因的重组体获得的免疫血清能中和LT和CT,此种重组体可能是理想的疫苗菌。

结 语

1. 毒素源性大肠杆菌的致病因子受质粒控制,有利于分子遗传学方面的研究,还可改变其基因的结构,提高基因表达抗原的产量。增强免疫源性,不仅为毒素源性大肠杆菌,亦为其他肠道菌的研究开辟了新的途径。

2. 由于带抗药性基因的质粒在细菌中传递,产生新的抗药性菌株,对抗菌素的应用出现新的问题。而疫苗菌是人们同病菌作斗争的有力武器,用重组DNA方法把单一或多价定居因子基因以及再与肠毒素基因LTB相结合的工程菌。可能是理想的疫苗菌。

3. 由于LT和CT之间氨基酸及核苷酸序列存在的同源性,有可能构成对两种菌都有效的疫苗菌。

4. 毒素源性大肠杆菌引起腹泻的几个问题应进一步探索。

(1) K88以外其他的定居因子如K99, 987P, CFA等。

(2) K88、LT和ST基因的调控机制。

(3) 用LT基因作探针,进行流行病学方面的调查研究。用LT-B作探针克隆CT-B的基因构建新的预防霍乱弧菌的疫苗菌。

参 考 文 献

1. Mass WK: Genetics as a Tool in Microbiology, Gloven SW and Hopwood DA ed, Symposium 31, p.341, 1981
2. Gastra W et al: Microbiol Rev, 46: 129, 1982
3. Mooi F R et al: Nucleic Acids Res, 6: 849, 1979
4. Schmitt R et al: Plasmid of medical environmental and commercial importance P.199, In K N Timmis and A Puhler (ed), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979

5. Mooi FR et al: J Bact, 150 : 512, 1982
6. Shipley PL: J Bact, 145 : 920, 1981
7. Kehoe M et al: Nature, 291 : 122, 1981
8. Gaastra W et al: FEMS Microbiol Lett, 6 : 15, 1979
9. Gaastra W et al: FEMS Microbiol Lett, 12 : 41, 1981
10. Van Embden J DA et al: Infect Immun, 29 : 1125, 1980
11. Kipstein FA et al: Infect Immun, 32 : 1100, 1981
12. 横田健等: 蛋白质核酸酵素, 26 : 395, 1981
13. So M et al: Nature, 277 : 453, 1977
14. Dallas, WS et al: J Bact, 139 : 850, 1979
15. Dallas WS et al: Nature, 288 : 499, 1980
16. Spicer EK et al: Proc Natn Acad Sci USA, 78 : 50, 1981
17. Rramucci MG et al: In Abstracts of the annual meeting of the American Society of microbiology, p16, Washington DC: American Society of Microbiology, 1979
18. Wensink J et al: Biocheml Biophys Acta, 514 : 128, 1979
19. So M et al: Proc Natn Acad Sci USA, 77 : 4011, 1980
20. 竹田美文: 医学のあゆみ, 111 : 861, 1979
21. Alderete JF et al: Infect Immun, 19 : 1021, 1978
22. Silva ML et al: Proc. Nath Acad Sci USA, 75 : 1364, 1978
23. Lönnroth I et al: Gen Microbiol, 76 : 417, 1973
24. Gill DM et al: J Infect Dis, 141 : 64, 1980
25. Gyles CL.: Infect Immun, 9 : 564, 1974
26. Yoshifumi T et al: Infect Immun, 34 : 341, 1981
27. Gill DM et al: Infect Immun, 33 : 677, 1981
28. Moseley SL et al: J Bact, 144 : 144, 1980
29. Southern E M: J Mol Biol, 98 : 503, 1975

种痘后心肌炎一例报告

河南省驻马店市医院儿科 孙海辰

种痘后心肌炎是罕见而严重的并发症。根据文献统计,自1948年首次报告到1974年共12例,死亡6例,我们遇到一例存活,现报告如下。

患儿金×,男,8个月。1977年4月11日在本市××厂医疗室,用郑州生物制品研究所生产的液体牛痘苗,于左上臂用划痕法初种牛痘两颗。4月19日下午3时半入院。

患儿既往健康,无心脏病及心肌炎史,种痘前无感染、用药史、无种痘禁忌症。种痘后3天开始低烧,曾用庆大霉素、APC,发烧暂时好转。第8天发烧持续不退,烦躁不安,频繁呕吐 急诊入院。

体检: 体温38.8°C 脉搏细,速数不清,呼吸40~50次/分,左上臂种痘两颗,呈脓疱状1.0×1.5厘米²,上有褐色结痂,周围红晕达5×7厘米²。前囟未闭,平坦。两侧瞳孔等大对称。颈软。心率200次/分以上,呈钟摆音,肺(一),腹软,肝肋下3厘米,脾刚扪及,四肢活动自如。

白细胞总数19,000,淋巴69%,中性28%,单核2%,嗜酸1%。二氧化碳结合力33体积%,血清钾12.4毫克%,钠270毫克%。心电图:心房、室率均为316次/分,S-T段:I、II、III、aVF、V₃、V₅均降低。胸透:心脏向双侧扩大,心搏动减弱,肺及膈无异常。

诊断: 种痘后心肌炎,房性心动过速合并心衰,

酸中毒,低血钾。

治疗: 青、链霉素肌注,强的松、维生素B₁、10%氯化钾口服,5%碳酸氢钠静推纠正酸中毒。第一日用毒毛旋花子苷K两次(每次0.07毫克),鲁米那、氯丙嗪镇静,效果不佳。翌日呕吐虽止,仍不吃奶,体温39°C左右,精神萎靡,面色苍白,呼吸急促,心率数不清(心电图证实为370次/分),改用氟美松、(每日6毫克)、三磷酸腺苷、10%氯化钾静滴,肌注一支胎盘球蛋白,配合吸氧、镇静剂,继续纠正水、电解质紊乱。第3日体温下降至37.7°C,精神好转,吃奶增多,呼吸困难减轻,心率140次/分,律正,第一心音低钝,心尖区闻及II°吸风样收缩期杂音,无心包摩擦音,肝肋下1.5厘米。住院第7天体温正常,已能玩耍,心率128次/分,心音仍低钝,胸透心外形仍向双侧扩大,家长要求出院,带药回家治疗。

随访观察: 患儿出院后继续应用强的松、B₁半个月,自动中止治疗。出院后7个月因低烧、轻咳第二次住院。体温38°C,心率140~170次/分,心尖区闻及I~II°收缩期杂音,x线下心影稍扩大,经用地霉素、强的松、解热药住院一周后症状控制出院。出院后2年零2个月来院复查(心率在正常范围),心尖区I~II°收缩期杂音,胸透心外形正常,发育尚好。营养中等。