

林万明 主编

医学分子微生物学进展

YI XUE FEN ZI

WEI SHENG WU XUE JIN ZHAN



第一集（上册）

1991

中国科学技术出版社

92
R37
5
1991/2:1(1)

医学分子微生物学进展

第一集（上册）

1991

林万明 主编

X4P49/14

中国科学技术出版社

内 容 简 介

本书主要反映了目前国内外医学分子微生物学研究的最新进展。全书分上、下两册,内容主要包括细菌、病毒、立克次体、真菌等病原体的结构功能、营养代谢、遗传变异、致病力、抵抗力、毒素和耐药性等分子微生物学、分子免疫学、分子流行病学、临床检验和快速诊断、疾病防治以及开展医学分子微生物学研究所建立和使用的新技术、新方法等。

本书可供医学院校、综合性大专院校生物学和微生物学专业的师生及研究人员参考,也可供分子生物学工作者、临床医师、卫生防疫和检验人员参考。

编写者(按文章先后为序)

戚中田 吴卫星 王用祥 秦鄂德 张振生 盛小玲 金 灵 李德荣 石成华
曹 诚 赵锦铭 曾凡济 秦克锋 汪美先 陈治文 赵学海 杜金林 王之梁
任中原 余 虹 戴 斌 李元浩 李钟铎 黄祥瑞 李凤知 俞炜源 董自正
谢 维 郭兆彪 王中五 林万明 李银太 黄耀煌 赵 虎 姜 峥 卜海之
熊春生 李振甲 陈泮藻 杨志刚 张京生 徐明波 姚志建

(京)新登字 175 号

医学分子微生物学进展

第一集(上、下册)

林万明 主编

责任编辑 王文武

中国科学技术出版社出版(北京海淀区白石桥路32号)

新华书店总店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京四环科技印刷厂印刷

开本: 787×1092毫米 1/16 印张: 27 字数: 1282千字

1992年3月第1版 1992年3月第1次印刷

印数: 1500册 定价: 36.00元(上、下册)

ISBN 7-5046-0702-9/Q·25

92
R37
5
1991/ 2(2)

医学分子微生物学进展

第一集（下册）

1991

林万明 主编

XH/R37/114

中国科学技术出版社

内 容 简 介

本书主要反映了目前国内外医学分子微生物学研究的最新进展。全书分上、下两册,内容主要包括细菌、病毒、立克次体、真菌等病原体的结构功能、营养代谢、遗传变异、致病力、抵抗力、毒素和耐药性等的分子微生物学、分子免疫学、分子流行病学、临床检验和快速诊断、疾病防治以及开展医学分子微生物学研究所建立和使用的新技术、新方法等。

本书可供医学院校、综合性大专院校生物学和微生物学专业的师生及研究人员参考,也可供分子生物学工作者、临床医师、卫生防疫和检验人员参考。

编写者(按文章先后为序)

刘汉明	徐建国	何晓青	刘廷清	祁国明	刘传霞	耿 峪	庄汉澜	俞东征
史书文	何永山	公 允	尚德秋	郝宗宇	刘少有	胡绪敬	郭永乐	李成文
邱明庆	徐雪元	秦巨生	舒 泉	于学杰	范明远	职 宁	俞树荣	吴绍熙
郭宁如	雷祚荣	谢念铭	刘荫武	林特夫	黄谷良	韦 韬	王 苏	杨瑞霞
王 津	杨明久	汪恩涛	王教全	巩 方				

序

为交流我国医学分子微生物学的新进展,促进该学科在我国更快发展,中华医学会微生物学学会委托军事医学科学院微生物学流行病学研究所筹办“首届全国医学分子微生物学进展”学术讨论会,会议于1990年9月4~9日在庐山召开。会议共收到来自全国各地的综述和论文235篇,为供国内同行参考,会后经筹委会精选出代表作71篇,由林万明同志主编,中国科学技术出版社出版。希望本书的出版发行,能为促进我国医学分子微生物学的研究贡献微薄力量。

朱 关 福

1991年1月16日

前 言

分子生物学是从分子水平研究和解释一切生物现象,并在分子水平上改造和利用生物的一门新兴学科。分子生物学的兴起是整个自然科学的一件大事,它使整个生命科学的研究上升到一个全新的阶段,尤其是近十几年,随着基因工程技术的迅猛发展,使医学分子微生物学得到了突破性进展,并在我国现代化建设中发挥着越来越大的作用。为了展示近几年医学分子微生物学研究的新进展,促进我国医学分子微生物学的迅速发展,受中华医学会微生物学和免疫学学会的委托,由中国人民解放军预防医学中心和军事医学科学院微生物学流行病学研究所具体筹办的“首届全国医学分子微生物学进展”学术讨论会于1990年9月4~9日在庐山召开。

根据会前征稿和会上报告的专题,从中选出71个专题汇编成“医学分子微生物学进展”一书,分上、下两册出版。该书主要包括细菌、病毒、立克次体、真菌等病原体的结构功能、营养代谢、遗传变异、致病力、抵抗力、毒素和耐药性等分子微生物学、分子免疫学、分子流行病学、临床检验和快速诊断、疾病防治以及开展医学分子微生物学研究所建立和使用的新技术、新方法等。

经过诸位编写者的共同努力,一本反映当今国内外医学分子微生物学研究最新进展的书将问世。该书的出版希望能引起分子生物学工作者对医学分子微生物学的注意,并在这一领域中积极开展更多的工作。

由于本人水平所限和时间仓促,在编写中错漏之处在所难免,敬望读者给予批评指正。

林 万 明

1991年10月14日

目 录

上 册

致病菌粘附力的遗传学基础	(1)
肠致泻性大肠埃希菌的毒力因子及遗传控制	(17)
志贺菌属毒力的分子遗传学基础	(26)
沙门菌和肠杆菌科及其它细菌细胞壁多糖的分子生物学	(37)
霍乱弧菌分子生物学研究进展	(54)
霍乱弧菌保护性抗原的分子遗传学研究进展	(65)
霍乱毒素对粘膜免疫反应的佐剂和记忆作用	(77)
炭疽杆菌的分子生物学进展	(82)
耶尔森菌毒力的研究进展	(93)
耶尔森菌属毒力的机制	(105)
鼠疫菌质粒	(113)
布氏菌属细菌的分子生物学研究进展	(128)
布氏菌脂多糖抗原的研究进展	(142)
军团菌属分子生物学研究 10 年回顾	(150)
致病奈瑟菌抗原分子生物学研究进展	(164)
淋球菌的分子生物学	(173)
淋球菌抗原分子及其致病关系的研究	(184)
莫拉菌的分子生物学进展	(196)
空肠弯曲菌鞭毛的致病作用及其遗传调控	(206)
噬菌蛭弧菌分子生物学特性的研究	(216)
立克次体分子生物学研究进展	(231)
Q 热立克次体相变异的分子生物学	(238)
医学真菌分子生物学	(245)
细菌毒素的分子生物学研究进展	(260)
金黄色葡萄球菌肠毒素分子遗传学研究进展	(270)
医学细菌的超微结构	(285)
细胞的芽孢及其分子生物学进展	(296)
细菌的鞭毛与运动	(311)
我国细菌 L 型研究的现状与展望	(328)
细胞质粒三种构型的鉴定概况	(337)
质粒复制调节机制和不相溶性	(341)
大肠杆菌中的 rRNA 基因	(354)
rRNA 基因(rDNA)探针及其应用	(361)
微生物 RNA 的分子生物学新进展	(373)

rRNA-DNA 分子杂交与细菌分类	(383)
细菌转座子在分子微生物学中的应用	(398)
细菌分子流行病学进展	(412)
DNA 探针技术在食品检验中的应用	(419)

下 册

艾滋病毒的分子生物学进展	(424)
人类免疫缺陷病毒的膜基因研究进展	(432)
研究中的艾滋病疫苗	(440)
登革病毒的分子生物学	(448)
肝炎病毒分子生物学的研究进展	(460)
丁型肝炎病毒的分子生物学	(472)
肾综合征出血热病毒的分子生物学研究进展	(479)
软状病毒的分子生物学与疫苗的研究进展	(490)
人软状病毒感染的分子流行病学研究	(504)
痘病毒酶研究进展	(522)
单纯疱疹病毒 I 型基因组的全序列及其编码蛋白	(529)
单纯疱疹病毒 II 型的分子生物学研究进展	(535)
呼吸道合胞病毒抗原变异的研究进展	(545)
抗病毒的新途径——基因表达封条	(555)
核酸杂交技术在疱疹病毒检测中的应用	(563)
病毒病的分子生物学诊断技术	(578)
病毒纯化及理化性质研究	(583)
RNA 病毒和真核 cDNA 克隆的总体战略及方法途径	(596)
聚合酶链反应原理及其应用	(612)
聚合酶链反应技术的应用	(622)
聚合酶链反应技术的新进展及在临床微生物学中的应用	(637)
非放射性基因诊断技术的进展	(666)
核酸杂交类型和标记检测技术的新进展	(670)
微生物蛋白分泌研究的进展	(684)
细胞脂多糖分子衍生物——单磷酸脂 A 的抗种肿瘤作用	(696)
脉冲电场凝胶电泳及其在医学微生物分子遗传学研究中的应用	(707)
生物传感器的最新研究进展	(714)
生物传感器的原理及其在微生物学和医学中的应用	(726)
放射免疫分析及放射示踪技术在分子微生物学中的应用	(750)
APAAP 桥联酶标技术及其在微生物学免疫学中的应用	(765)
DNA 的化学合成及其应用	(773)
DNA 序列分析方法的进展	(782)
生物工程下游处理的纯化工艺	(797)

致病菌粘附力的遗传学基础

细菌毒力是多种因素构成的，其遗传背景是多基因性的。本文主要介绍关于粘附力的遗传学基础。粘附现象是一切生物生命活动，特别是寄生现象的基础和前提条件。没有粘附就无法定居，更谈不上生命活动和繁殖等高级现象。细菌侵入有机体，首先要粘附在特定的靶器官或靶细胞上，然后才谈得上其他致病因素。兹举几种主要致病菌的粘附力分述如下：

一、肠毒素性大肠杆菌（ETEC）

它的粘附力主要靠它们的菌毛分泌的粘附素（adhesin）^[1]。到目前为止，比较清楚的ETEC的粘附性菌毛有6种：即K88、K99、987P、F41、CFA / I、CFA / II。6种菌毛的遗传背景各有不同。K88、K99、CFA / I和CFA / II是质粒编码的。987P是染色体编码的。F41的基因还没有最后搞清楚，可能受染色体控制^[2,3]。ETEC除能粘附在人或动物的肠上皮细胞外，还能分别凝集不同种（人、牛、绵羊、鸡、马、猪、豚鼠等）的红细胞。这种血凝现象有两大特点，一是甘露糖抗性，简称MRHA，有别于甘露糖敏感血凝（MSHA）。另一特点是温度依赖性。18~25℃培养的ETEC产生菌毛甚少，血凝能力也很弱。37℃的培养物才能产生正常量的菌毛，具有正常的MRHA。利用上述两个特点，不但可以对不同的ETEC进行鉴定，还能制备单纯抗菌毛的因子血清。从进化生态学观点看，上述菌毛基因表达的温度依赖性符合菌细胞能量节省原则的。在温血动物宿主内，基因表达是其生命活动的需要。在宿主体外，在外环境中，一般温度远远低于37℃，菌毛基因不表达，细菌可以节省能量^[4]。

CFA / I菌毛是由一组密切相关的质粒编码，其分子量约89kb。这类质粒同时还携带耐热肠毒素（ST）基因^[5]。CFA / I来源于人的ETEC，能凝集人、牛和鸡的红细胞。用转座子致突变试验证明，编码CFA / I的基因位于该质粒的两个区，其间隔着37kb片段。两个区已克隆成功，其中第一区与ST基因连锁，该区在6kb片段内。第二区只有2kb。仅含第一区的细菌的提取液能与CFA / I抗体起反应，提示该菌毛的亚单位基因位于第一区内。第二区与第一区相隔较远。可能二区不仅涉及CFA / I的产生，还可能编码其他粘附素。

CFA / II最初发现于ETEC血清型06和08。后来知道它含有三个不同的成分，即CS1、CS2和CS3。三者抗原性不同，分子量不同，血凝模式也不同，CS1凝集牛、鸡和人红细胞。CS2凝集牛、鸡和白来亨母鸡红细胞。CS3则只凝集牛红细胞。CS1、CS2和CS3基因都在同一个质粒上，质粒分子量约89kb，一般还携带LT和ST基因^[6]。有些菌株的CFA / II质粒只编码CS1和CS3或CS2和CS3成分；有些菌株则仅有CS2或CS3。CS1或CS2的产生决定于宿主菌的遗传特性。CS1仅产生于生物型A（鼠李糖阴性）血清型06：H16的菌株；CS2则仅产生于同一血清型而生物型为B、C和F（鼠李糖阳性）的菌株；CS3则与血清型和生物型无关。若把CFA / II质粒转移至大肠杆菌K12株，后者只能产生CS3，其中机制尚未搞清楚。

K99由分子量约为75kb的接合性质粒编码，它的基因已克隆成功。重组质粒pFK99，含有8个结构基因，其中至少7个与K99的生物合成有关，见图1。

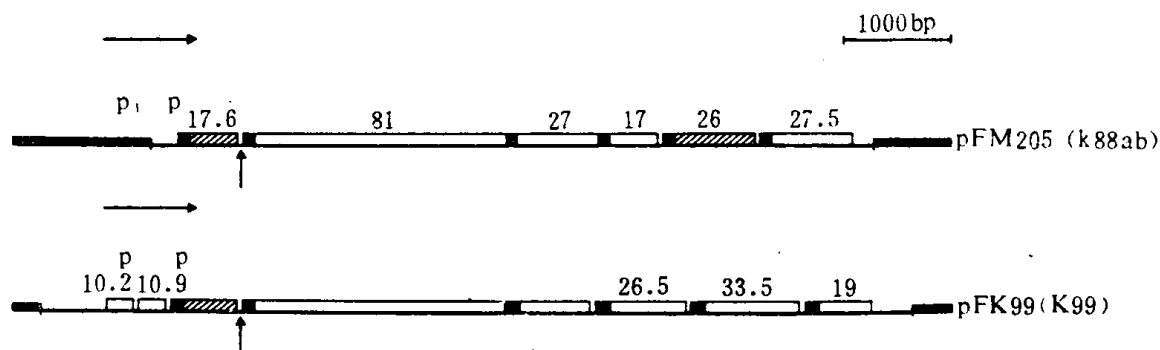


图1 K88ab 和 K99 基因图

两端粗黑线代表载体 pBR322；中间细线代表被克隆的 DNA；不同结构基因的定位用长方形表示；长方形的黑色末端表示信号肽基因；长方形上面的数字表示相应多肽分子量 ($\times 10^3$)；菌毛亚单位以阴影形表示；水平箭头指转录方向；垂直箭头指二重对称性的区域；P 为启动子序列；P1 为 pBR322 的启动子^[7]

对 pFK99 DNA 进行序列分析证明，在 p10.9 基因近端和菌毛亚单位近端各有一个启动子，尤其是 p10.9 近端的启动子与大肠杆菌强启动子的全部序列极其相似，故 pFK99 的 K99 基因很可能从这个启动子开始转录。实验还证明，不论被克隆的 DNA 在载体内方向如何，都不影响 K99 基因的表达。K99 野生型培养在 30℃ 以下或有 L-缬氨酸存在的条件下，产生菌毛的能力受到抑制，这种现象在 pFK99 中仍然保留，说明这种调节机制的基因在 pFK99 保持不变。

K99 操纵子含有一个小的顺反子内区，在菌毛亚单位和 p76 基因之间，表现为二重对称性^[8]。如图 2 所示，K99 转录物 (mRNA) 形成的茎状和环状结构也许能起到 rho 依赖性的终止子作用，从而在 K99 操纵子中导入了自然极性。在这个可能的终止子上游的产物是菌毛亚单位，下游是 p76。p76 基因的起始密码，可能也位于这个茎状和环状结构内。因此，该区可能与 K99 的温度依赖性有关。低温可以稳定茎状结构，从而阻止 p76 的翻译。

K88 质粒大多数也编码棉子糖发酵能力。但 K88 基因与棉子糖基因 (Raf) 不是连锁的，而是相隔 30kb。K88 ETEC 是猪源菌。猪肠道内有丰富的棉子糖和其他类糖，它们还会与菌毛争夺肠上皮细胞的受体，故 K88 基因与 Raf 基因在同一质粒上对该菌的生存很有利。K88 起码有三类变异型，即 K88ab、K88ac 和 K88ad。三者血清学上互不相同，K88ab 和 K88ac 已克隆成功^[9]。二者唯一的区别点可能在菌毛亚单位基因上，K88ab 的克隆子之一叫 pFM205 (图 2)，有 6 个结构基因，起码有 5 个是在同一的转录单位内 (即 p17.6、p81、p27、p17 和 p26)。K88ac 的情况与此相类似。K88ab 有两个菌毛亚单位，即 p17.6 和 p26，而 p26 为主要的。p17.6 产量很小甚至不能检出，只有在 K88ab 的某些突变型中才能发现。重组质粒 pFM205 表达 K88ab 主要靠载体 pBR322 的启动子 P1。如 P1 缺失，K88ab 的产量只有正常的 1/10 甚至 1/20，这时可能是靠 p17.6 近端的弱启动子起作用^[10]。与 K99 相似，K88ab 操纵子也有一个二重对称区，但其 mRNA 的茎状和环状结构没有 K99 的那么稳定。K88ab 菌毛的大亚单位在二重对称区的下游，所以茎状和环状结构不大可能起终止子作用，但它都是 p81 的起始密码区，因此，有可能存在类似 K99 那样的温度依赖机制。

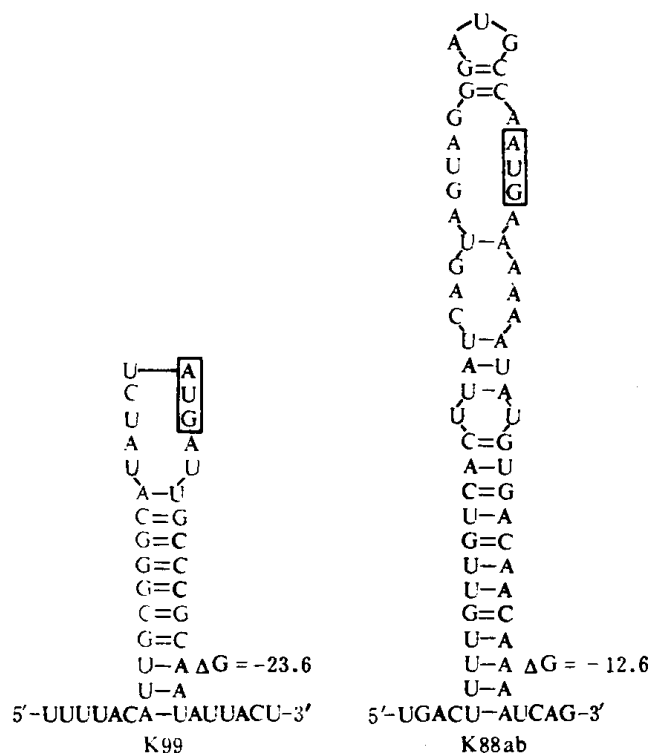


图2 K99和K88ab mRNA可能的二级结构

本图相当于图1中垂直箭头所指区域，p81和p76基因在本图中是阻断态； ΔG 按Tinoco (1973)发表的方法计算

综上所述，K99和K88ab的操纵子有许多相似之处，两者都有一个弱的启动子，跟着就是菌毛亚单位，然后就是一个大的多肽基因。其间都有一个小的顺反子内二重对称区。K99和K88ab之间的共同特点也发现于泌尿系致病性大肠杆菌的pap和F7₂菌毛中^[11]。这些操纵子编码的菌毛亚单位都具有同源性，说明它们在进化上关系密切，有可能来源于同一个祖先。

二、泌尿系致病性大肠杆菌 (UPEC)

该类细菌也能凝集某些动物或人的红细胞，大多数表现为MRHA，只有极少数是MSHA。肾盂肾炎大肠杆菌凝集人的P群红细胞，后者的受体是红细胞糖苷脂类。后者含有双半乳糖苷成分，即 α -D-Galp-(1→4) β -D-Galp。用人工合成这个双半乳糖苷可以抑制该大肠杆菌与泌尿系上皮的结合，大多数UPEC具有这种双半乳糖苷结合特异性，其菌毛可能是介导粘附的器官^[12]。提纯的菌毛可以结合挂在乳胶颗粒上的双半乳糖苷，这类菌毛叫P菌毛（简称pap）；该类粘附素叫P粘附素。UPEC另一类不结合双半乳糖苷的MRHA粘附素在受体没有搞清楚之前叫X粘附素^[13]。表1综合了UPEC的P粘附素近年来的研究结果。

过去以为结合受体的特异性一定在菌毛上，其实不完全如此，因为在大肠杆菌中还有非菌毛性的粘附素存在。

与K88或K99受质粒控制不同，UPEC的菌毛及其粘附素是由染色体编码的。图3显示J96株菌毛——粘附素的基因分布^[15]。

表 1 UPEC 的 P 粘附素性质^[14]

UPEC 菌株	菌毛血清型	菌毛素分子量	血 凝	糖受体特异性	文 献
J96	F13	19.5K	人、猴 MRHA	Gal-Gal	Normark (1983)
IA2	未定	17.0K	人 MRHA	红细胞糖苷脂	Clegg 和 Pierce(1983)
C1212	F7	22.0K	人、猴 MRHA	Gal-Gal	Low (1984)
AD110	F7 ₂	17.0K	人、猴 MRHA	红细胞糖苷脂	VanDie (1983)
KS71	"KS71A"	22.0K	人 MRHA	红细胞糖苷脂	Rhen (1983)
KS71	"KS71B"	19.0K	人 MRHA	红细胞糖苷脂	Rhen (1983)
536	未定	16.5K	牛 MRHA	X 型	Berger (1982)
J96	FIA	17.0K	MSHA [*]	D-甘露糖苷	O'Hanley (1983)
KS71	FIC	17.3K	未发现		Rhen (1983)

* 凝集人、豚鼠、马、绵羊红细胞，能结合 Tamm-Horsfall 泌尿系类粘蛋白

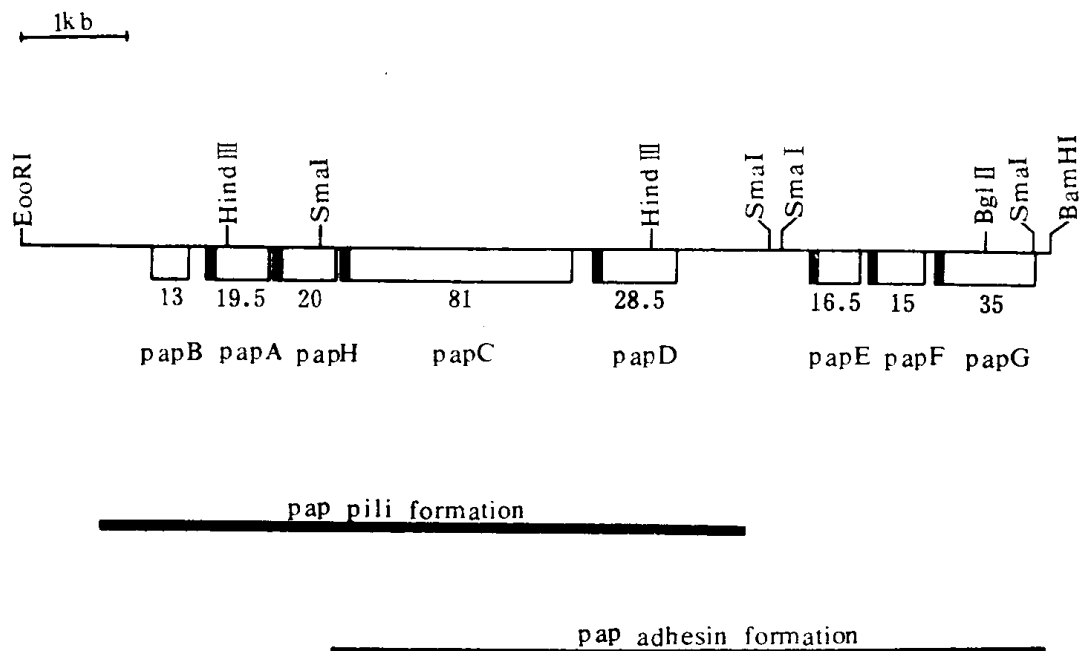


图 3 重组质粒 pPAP5 携带的 pap 基因结构

用 pBR322 为载体克隆 UPEC J96 株; 长方形表示 pap 基因(A~H)的位置及其产物的分子量 (kDa); 左端粗竖线是信号肽; 基因图下两条粗黑横线表示 pap 菌毛和 pap 粘附素最小的 DNA 片段

直到目前为止, 已搞清楚的 pap 基因至少有 8 个, 总长度约 8.5kb。papA 基因编码 pap 菌毛素亚单位蛋白, 把 UPEC J96 的克隆 pPAP5 和表 1 中 IA2 和 AD110 株的克隆 pDC5 和 pPIL110-35 进行比较, 发现许多相似之处。pDC5 起码有四个顺反子与粘附素有关, 同样 pPIL110-35 起码携带 5 个与 MRHA 和菌毛形成有关的基因。酶切图谱和 DNA 杂交试验证明, 上述三种克隆在 papC-D 的区域内大部分是同源的。pPIL110-35 的菌毛素亚单位与 pPAP5 的 papA 位置相类似, 尽管酶切图谱有些区别, 但杂交试验证明是同源的。pDC5 不携带相当于 papB-A 的区带^[16], 见图 4。

pap DNA 探针与大肠杆菌 K-12 无反应, 说明表现 MRHA 的 UPEC 比一般的粪便大肠杆菌多了一段 DNA 序列。

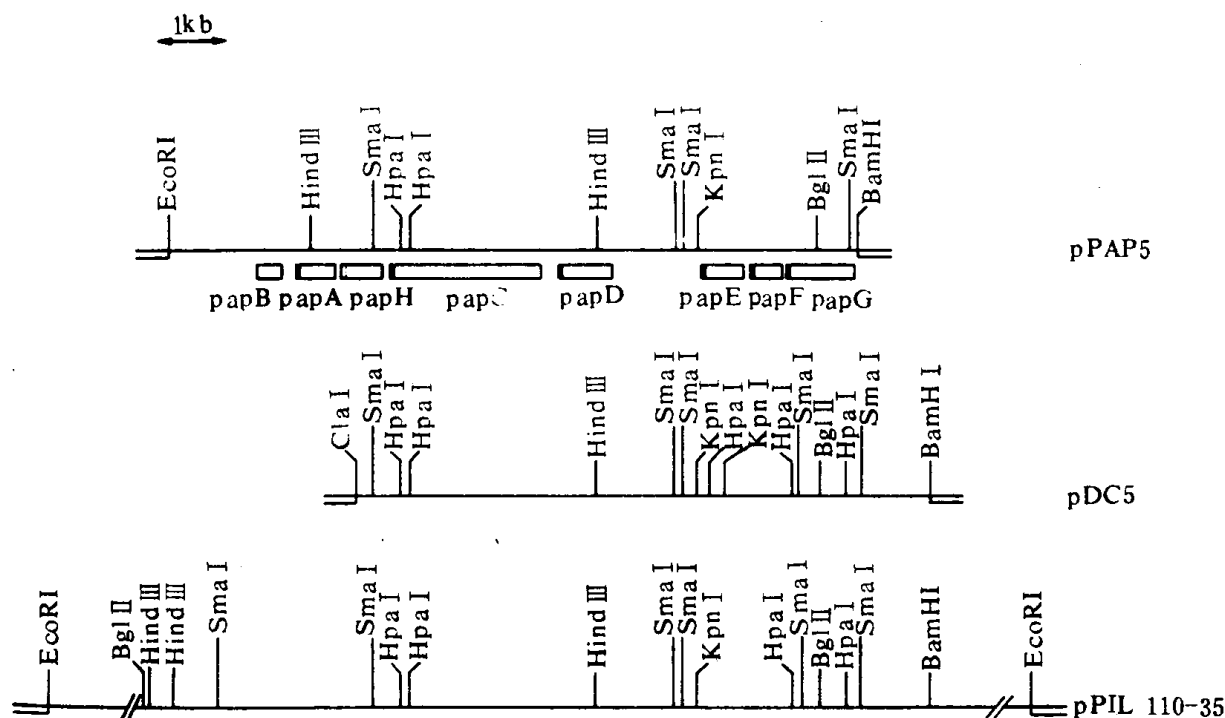


图4 3种UPEC菌株的菌毛——粘附素基因克隆的结构比较

参考 Hull RA 等

过去认为，粘附素与菌毛的基因是一回事，实则不然。用 Tn5 插入 papE-G 区，结果菌毛虽然仍能生成，但与受体的结合能力消失了。相反，Tn5 插入 pap 菌毛素亚单位结构基因，菌毛消失了，都不影响 MRHA 的表达。另外，用 DNA 接头 (Linker) 插入 papA 基因引起移码突变的方法和造成 papA 完全缺失的方法，都证明 UPEC 的受体特异性结合不需要 Pap 菌毛的存在。从表 2 可见，用 DNA 接头插入 papF 和 papG 顺反子，结果与 Tn5 致突变的结果是一致的，即菌毛保留而 MRHA 消失，提纯的菌毛也无受体特异性血凝能力，说明菌毛基因和 pap 粘附素基因是可以分开的。实际上 Berger 等于 1982 年已报告一株 UPEC536，它完全没有菌毛，都呈 MRHA^[16]。

表2 UPEC J96pap 基因群突变分析

方 法	突 变	MRHA	菌 毛
转位子插入	papB : : Tn5	-	+
	papA : : Tn5	+	-
	papC : : Tn5	-	-
	papD : : Tn5	-	-
	papF : : Tn5	-	+
	papG : : Tn5	-	+
DNA 接头插入	papA1	+	-
	papE1	+	+
	papF1	-	+
	papG1	-	+
	papA1,papE1	-	-

引自文献 Norgren (1984); Lindberg (1984)

表 3 pap 缺失突变株的表型^[17]

尚存的 pap 基因	粘附力	菌毛	pap 抗原相对量
BAHCDEFG	+	+	1.0
BAHCD	-	+	0.9
HCDEFG	-	-	0.3
EFG	-	-	0.1
全 无	-	-	<0.02

从表 2 和表 3 初步看出, papF 和 papG 两基因是表达双半乳糖苷结合能力所必须的。因其中任何一个基因灭活, 都会导致粘附能力的消失, 尽管菌毛仍然可以形成。对菌毛来说, 这两基因的作用也有些不同。papG 突变时, 菌毛量正常, 但 papF 突变时, 菌毛量显著减少。

从携带野生型 pap 克隆的细菌中, 提取纯化的菌毛具有结合双半乳糖苷的能力, 于是有人认为, 有可能从菌毛制剂中提取粘附素的成分。但聚丙烯酰胺凝胶电泳, 不能找到不同于 papA 蛋白的其他多肽。不过血清学反应证明, 与 papA 蛋白组成多聚体的还有一些小成分蛋白。用提纯的 pap 菌毛免疫动物所产生的抗血清, 能与携带 papC-D 基因、MRHA 阳性但 papA 基因缺失的细菌起反应, 此外用 ¹²⁵I 标记 pap 菌毛制剂后, 再进行电泳分析, 证明 papE 基因产物是其中的小成分。papE 蛋白不可能是实际的粘附素, 因经移码突变后的 papE1 对细菌的血凝能力不变。然而, papE1 突变型的提纯菌毛本身都不能凝集红细胞, papA1 和 papE1 双重突变则不能表达对双半乳糖苷的结合性。也许 papE 蛋白在一定的作用阶段能决定粘附素出现在菌细胞的表面, 从核苷酸序列分析推算出来的 papE 和 papF 的基因产物, 在结构上与 papA 蛋白和其他菌毛素相似。可能这两种基因虽然本身不能生成菌毛, 但都是菌毛素多聚体的一个小成分。papH 在大肠杆菌 K-12 中表达非常微弱, 通过插入和缺失突变试验证明, 它在菌毛形成和粘附素产生中没有重要作用, 可能是菌毛素的“假基因”。papG 蛋白在二级结构上与菌毛素蛋白毫无相似之处, 它先形成前体蛋白, 然后移位至周胞浆或外膜成为成熟型。

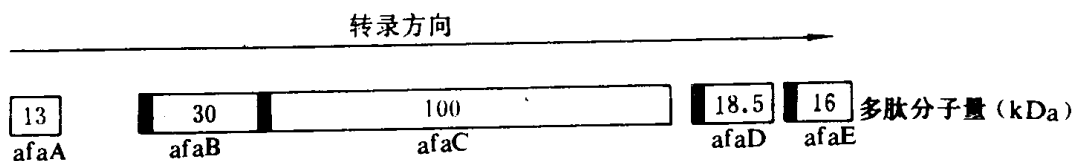
与 pPAP5 一样, pDC5 和 pPIL110-35 表达 MRHA 的基因也在 papE-G 片段内。但 pPAP5 的 papG 基因探针不能与其他两个克隆杂交。pDC5 缺失 papG 时, MRHA 的能力也消失, 但能被 pPAP5 的 papE、F、G 片段对位 (in trans) 互补。这可能是因为某一基因群的 papE、papF 和 papG 蛋白在粘附素的生物合成过程中能相互作用, 而不同基因群的 papG 蛋白则不能与另一基因群的 papE 和 papF 起协同作用。

在所有大肠杆菌的菌毛——粘附素基因群中, 皆含有一个编码约 80K 蛋白的顺反子^[18]。如图 3 所示, 在 UPEC J96 中, papC 基因编码一个 81K 的蛋白。papC 一旦失活, pap 菌毛和 pap 粘附素都随即消失。但 papC 突变型仍含有相当高的 papA 蛋白量。papD 基因编码一个 28.5K 的蛋白, 该基因一旦失活, 其后果与 papC 一样。papC 和 papD 突变表型的区别, 只有用测定菌细胞内积累的菌毛素量才能测定出来。papD 突变型的 papA 蛋白含量显著减少, papE 和 papF 蛋白量也大大下降。可见 papD 蛋白也是菌毛-粘附素亚单位在菌细胞表面定位所不可缺少的, 它似乎起到使这些亚单位稳定而不降解的作用。也许有这种可能性: papD 蛋白与其他亚单位 (如 papA) 结合成复合物, 定位于周胞浆间隙。这样的复合物再与 papC 相互作用促进了在外膜的定位和聚合化。此外, 粘附素的

生物合成需要 papD 和 papE 或 papF 之间形成复合物, papE 蛋白在菌毛制剂中可以被检出, 说明它是结合到 papA 多聚体中的一个小成分。同样, papF 蛋白也可能是整合到菌毛中的一部分。

关于 pap 基因的遗传调控机制相当复杂^[11], 可能至少有 4 个启动子。用大肠杆菌 lacZ 基因作操纵子融合试验, 证明图 4 中的携带 papB 和部分 papA 的 EcoRI-HindIII 片段; 携带 papC 和部分 papD 的 HindIII 片段或携带 papE、papF 和部分 papG 的 Sma I-Bg/II 片段, 皆能启动转录。RNA 印迹杂交的结果揭示, 从 papB-papA 区可产生两种不同的转录物。papA 编码的序列能与 0.8kb 和 1.3kb 的两种转录物杂交, 而 papB 内的序列仅与 1.3kb 的杂交。可见这里 2kb 长的 EcoRI-HindIII 片段含有两个启动子, 接 papA 之后, 就是 papA 与 papH 片段; 它也许是终止转录的片段。终止子的位置和转录物的长度说明, 在 papB 和 papA 之间有一个启动子, 而 papB 的上游还有另一个启动子。此外 0.8kb 长的转录物比 pPAP5 其任作一 pap 基因的转录物都丰富。papB 基因被认为是具有某些调节作用, 因 Tn5 的插入可导致 pap 菌毛表达的减弱, 其调节作用的另一个证据就是葡萄糖对 pap 表达的负效应。培养基中有葡萄糖存在时, 菌毛和粘附素的表达量下降, 用大肠杆菌的 cya 的 crp 突变型作试验证明, pap 受到代谢性阻遏。从 papA-lacZ 转录的融合质粒所表达的 β -半乳糖苷酶产量, 在 crp 或 cya 株中仅有野生型的 1/20~1/10。若把 cAMP 加到培养基中, cya⁻和 cya⁺菌株的 β -半乳糖苷的活性都是一样的。papB-papA 区的 DNA 序列分析有力地说明, 在 papB 启动子附近有一个 CAP-cAMP 结合点。papB 基因可能编码一个影响 papA 基因表达的激活子, pap 的代谢性阻遏可能发生在 papB 表达的水平上。至于 papB 影响其他基因的表达, 是否以反式 (in trans) 出现, 有待进一步验证。

上述 UPEC 的粘附素, 都是菌毛产生的 P 粘附素, 约有 90% 的 UPEC 属于此类。此外还有 10% 的 UPEC 产生另外一类粘附素, 能凝集人的 M 群红细胞。其受体与 P 粘附素不同, 因而不能被双半乳糖苷抑制。还有一个显著的特点, 就是这 10% 的 UPEC 的粘附能力与菌毛无关, 经电子显微镜观察, 未发现可见的菌毛。所以这种粘附素叫非菌毛性粘附素 (afimbrial adhesin) 简称 AFA。大概由于 AFA 还有许多问题没有搞清楚, 所以最早的发现者称之为 X 粘附素^[19]。这种粘附素不仅能在活菌细胞中存在, 而且 L 肉汤培养物的上清液也有活性。Agnes 等 (1984 年) 报道, 对携带 X 粘附素的菌株-大肠杆菌 KS52 进行基因克隆, 证明 X 粘附素的基因也在染色体上, 而且成功地把 6.7kb 的有效染色体片段克隆出来。证明该片段能表达对泌尿系上皮细胞的粘附力和 16kDa 的 MRHA 血凝素。Southern 杂交证明, 这个 6.7kb 染色体片段与 pap 操纵子之间没有同源性。Labigne-Roussel 以后对 6.7kb 片段进一步分析, 证明它编码五个多肽如下:



上图方块表示 6.7kb 编码的多肽, 每一方格左端的粗黑线表示信号肽, 可见 6.7kb 片段编码 afaA (13k)、afaB (30k)、afaC (100k)、afaD (18.5k) 和 afaE (16k) 五个多肽, 它们被证明属于同一个转录单位。afaB、afaC 和 afaE 对血凝的表达是必需的, 而 afaA 或

afaD 的突变或缺失都不会改变血凝能力。afaE 被鉴定为血凝素的结构基因，其 DNA 序列已被测出来，共 456bp。编码 152 个残基的肽链，其中 21 个残基是信号肽，131 个残基是成熟肽，即 AFA 粘附素。

总结 UPEC 两种粘附素的区别如表 4。

表 4 P 粘附素与 X 粘附素的区别

种 类	凝集细胞	菌 毛	识别点	特异性	受体性质
P 粘附素	P 群	+	糖残基	糖鞘脂类	双半乳糖苷
X 粘附素	M 群	-	氨基酸残基	糖蛋白类	唾液酸糖蛋白

三、致病性大肠杆菌和其他大肠杆菌的粘附力

致病性大肠杆菌的概念有广义和狭义、传统意义和现代意义的区别。传统的广义概念包括全部能引起各种疾病的大肠杆菌，即包括 ETEC、EIEC、UPEC、EHEC、EAEC 和狭义的 EPEC。现在谈到的致病性大肠杆菌（EPEC），是专门指某些特定血清型的菌株，它们构成一组独立的菌群，在粘附上皮细胞引起组织病变和遗传学等方面都独具一格，它是婴儿腹泻的主要病原之一。EPEC 没有明确的定居因子，与 ETEC 有特异性的血凝谱不同，EPEC 没有这种血凝谱，故学者们转而寻找其他方法来描述 EPEC 的粘附力。1975 年 McNeish^[20] 等人研究 EPEC026：H11 菌株，指出它能粘附人胎肠组织碎片，这种能力不受甘露糖的影响。后来 Williams 等人证明，这一粘附力与 56MDa 的接合性大肠杆菌素质粒有关^[21]。他们把该质粒命名为 pLG101。Candy 等还观察到，该菌也能很强地粘附到健康成人颊部上皮细胞上，但把这一模型用于其他菌株尚未见报道。1979 年 Cravioto 等报道，属于 EPEC 血清型的 51 株菌中，有 41 株（80%）能粘附到 HEP-2 细胞上，其他大肠杆菌和非致病株仅有 19%（12/62）具备此功能。Baldini 采用该模型研究 EPEC 粘附力的遗传学基础，发现 32 株 EPEC 中，31 株皆携带一个 50~70MDa 的大质粒，其中有一株 E2348/69（0127：H6）的质粒分子量为 55MDa。一旦消除该质粒，便失去粘附力。若重新获得该质粒，粘附力便会恢复。E2348/69 能在体内粘附到断喂初乳的小猪肠上皮上，并能引起成人志愿者发生腹泻。Levine 等把这种粘附因子称为 EAF^[22]（即 EPEC 粘附因子）。其本质尚未明了，但已知道 55MDa 大质粒与一个 94Da 的外膜蛋白有关。Scaletsky 等人把有粘附力的大肠杆菌对 HEP-2 和 HL 细胞的结合能力分为两大类——局限性粘附和广泛性粘附^[23]。前者只能粘附在细胞表面的一个或几个位点；后者能随机地粘附到细胞上。Nataro 等从 E2348/68 的 55MkDa 大质粒中分离出一个 1kb 的片段制成探针，该探针能与局限性粘附的大肠杆菌发生高度敏感的特异性的杂交。而广泛性粘附的大肠杆菌则否。于是 Nataro 把 EPEC 分成两类。第一类与 1kb 探针杂交者呈局限性粘附，包括 055、0111、0119、0127、0128 和 0142 等。第二类与 1kb 探针反应阴性，或呈广泛性粘附、或对 HEP-2 与 HL 细胞根本不粘附。该类有 044、086 和 0114。尽管有此区别，但这两类 EPEC 也会有致病性。

Mathewson 曾对到墨西哥旅游的成人的腹泻进行了研究，发现被分离出的 28 株大肠杆菌中有 17 株呈局限性粘附，这 17 株中仅有两株属 EPEC 血清型。所以他把这类有粘附能力的大肠杆菌统称为粘附性大肠杆菌（EAEC），这些 EAEC 能否与 Nataro 探针杂交有待