

学校编码: 10384  
学 号: 200326124

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文

细菌 OmpW 和 OmpV 盐调节功能的研究  
Salt-regulated function of OmpW and OmpV in Bacteria

吴丽娜

指导教师姓名: 彭 宣 宪 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2005 年 5 月 16 日

论文答辩时间: 2005 年 6 月 6 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陈新华

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2005 年 06 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含有其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已经在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

## 目录

摘要.....	II
Abstract .....	IV
前言 .....	1
1.1 革兰氏阴性细菌的危害.....	1
1.2 革兰氏阴性细菌外膜蛋白的研究 .....	3
1.3 革兰氏阴性细菌双成分调节系统 .....	9
1.4 OmpW、OmpV 蛋白的研究.....	16
2 材料与方法 .....	19
2.1 材料 .....	19
2.2 实验方法 .....	26
3、结果 .....	36
3.1 美人鱼发光杆菌的生理 .....	36
3.2 美人鱼发光杆菌外膜盐调节蛋白的研究 .....	39
3.3 OmpW 和 OmpV 基因的克隆、序列分析、原核表达 .....	42
3.4 OmpW 和 OmpV 的抗体制备和 Western blotting 确证 .....	48
3.5 OmpW 和 OmpV 的生物信息分析 .....	51
3.6 OmpW 和 OmpV 功能分析 .....	55
3.7 细菌 OmpW 和 OmpV 基因及其蛋白的分布和表达研究 .....	57
4. 讨论 .....	67
5. 小结 .....	72
6. 展望 .....	73
参考文献 .....	74
致谢 .....	79
攻读硕士期间发表的论文.....	80
附录.....	81

## 摘 要

**研究背景:** 海洋病原菌不仅对水产养殖造成巨大的经济损失还对人类健康形成一定的威胁。对不同的盐度环境的适应能力是海洋病原性微生物的一种基本机能,同时这也与细菌致病能力及繁殖传播能力紧密相关,而外膜蛋白处于细菌的最外层,直接与外界环境(包括海洋环境和宿主体内环境两面)相接触,对其展开深入研究是分析细菌盐度适应机制的一个重要的方面。OmpW 和 OmpV 是细菌外膜蛋白中的重要蛋白,目前国际上对这两个蛋白还缺乏深入的研究,虽然有些证据表明它们可能是属于孔蛋白或通道蛋白,但是对它们具体的结构、功能仍然很不清楚。

**研究目的:** 探讨美人鱼发光杆菌 OmpW 和 OmpV 的存在,研究 OmpW 和 OmpV 在弧菌和杆菌中的分布,揭示其在细菌适应不同渗透压环境的调节规律,阐明这 2 种蛋白在盐调节中的意义。

**研究方法:** 采用比较蛋白质组学、免疫印迹、分子克隆、基因过表达等现代分子生物学技术以及生物信息分析方法,多途径、多层次、比较系统和深入地对细菌 OmpW 和 OmpV 的盐调节功能进行研究。

**研究结果:** 率先发现美人鱼发光杆菌具有 OmpW 和 OmpV,前者随 NaCl 浓度升高而表达量增加,后者随 NaCl 浓度升高而表达量下降。分子克隆和生物信息的研究结果表明,美人鱼发光杆菌与副溶血弧菌和溶藻酸弧菌的 OmpW 基因具有高度同一性,其 identity 依次为 94%和 91%;与副溶血弧菌的 OmpV 基因也具有高度同一性,其 identity 为 99%;而与霍乱弧菌的 2 基因和大肠杆菌的相关家族基因间具有较低和无同一性。进一步通过过表达 OmpW 和 OmpV 基因,证明 OmpW 和 OmpV 可以分别提高和降低细菌对盐浓度的耐受能力。进一步研究了副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、美人鱼发光杆菌、非 O1 霍乱弧菌、弗尼斯弧菌、河弧菌和麦氏弧菌、大肠杆菌 K-12 和嗜水气单胞菌等 11 种细菌 OmpW 和 OmpV 的分布和表达规律。结果表明, OmpW 和 OmpV 较普遍存在于弧菌中,与弧菌盐耐受力有密切关系。

**研究结论:** OmpW 和 OmpV 是一对具有明显生物活性的盐调节蛋白,具有基因多样性和表达多样性的特点,与细菌耐盐能力密切相关。OmpW 和 OmpV

普遍分布于盐耐受能力较高的弧菌中，在美人鱼发光杆菌中出现可能是一特例，提示该菌在分类上回归弧菌科为妥。同时，这是首次发现的一对同时存在弧菌和杆菌中具有相同功能的调节蛋白。

**关键词：**OmpW，OmpV，盐调节蛋白，功能基因组学

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

**Background:** A variety of marine pathogens can cause gastroenteritis, wound infections, and primary septicemia as well as illness among marine organisms. These infectious diseases cause magnitude losing in aquaculture and even a threaten to human being`s health. How to adapt the different  $\text{Na}^+$  concentrations is a basic mechanism for the pathogen. Gram-negative bacteria characteristically are surrounded by an additional membrane layer, the outer membrane. Although outer membrane components often play important roles in the interaction of pathogenic bacteria with their host organisms, the major role of this membrane must usually be to serve as a permeability barrier to prevent the entry of noxious compounds and at the same time to allow the influx of nutrient molecules. So it`s important to have a thorough research for the Omps to analysis the salt-tolerance of bacteria. OmpW and OmpV are important protein among bacteria Omps. Since OmpW and OmpV belong to a new family of outer membrane proteins with unknown functions, it will be interesting to investigate the biological function of OmpW and OmpV for the bacteria.

**Objective:** Probing into the existence of OmpW and OmpV in *Photobacterium damsela*, and in advance investigate the distributing of the two protein among *Vibrio* and *Bacillus* in order to expose the ability of osmoregulation in face the change of osmotic pressure when shift between natural marine water-body and host.

**Methods and results:** Using the method of comparative proteomics, OmpW and OmpV were found to be salt-sensitive proteins in *Photobacterium damsela* for the first time. Expression of the OmpW and OmpV genes coding for major outer membrane proteins OmpW and OmpV is regulated in opposite directions by medium salinity osmolarity. Further study with the method of molecular clone and bioinformatics ,we found that the gene of OmpW has a high homologue with the gene of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*, sharing identities of 94% and 91%. The gene of OmpV of *Photobacterium damsela* has an identity of 99% with *Vibrio parahaemolyticus*. However, no significant similarity was found with *E.coli*. Then we further confirmed that OmpW can improve the salt-tolerance in bacteria and

OmpV can decrease the salt-tolerance in bacteria. Furthermore, the existence and expression regulation of OmpW and OmpV were characterized in *Vibrio fluvialis*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *A. hydrophila* PPD (134/91), *Escherichia coli* K12 *Photobacterium Damsela*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. The two proteins were found in most of *Vibrio*.

**Conclusion:** OmpW and OmpV are a pair of salt-regulated protein, showing characterization with a variety of gene and expression. They were the salt-regulated proteins existed in salt-tolerant *Vibrio* bacteria. Importantly, It's first reported to characterize a pair of salt-regulated proteins sharing the same function both in *Vibrio* and *Bacillus*.

**Keywords:** OmpW, OmpV, salt-regulated protein, functional genomics

## 1 前言

### 1.1 革兰氏阴性细菌的危害性

细菌是与人类生活密切相关的一类微生物，是多种单细胞、结构简单的原核生物的总称。1884年丹麦医师 Gram 创立了革兰氏染色法将所有细菌区分为两大类：革兰氏阳性细菌(用 G<sup>+</sup>表示)和革兰氏阴性细菌(用 G<sup>-</sup>表示)。细菌对于革兰氏染色的不同反应，是由于它们细胞壁的成分和结构不同而造成的。

革兰氏阴性细菌因其独特的细胞壁结构，具有很强的适应性和抗逆性。革兰氏阴性细菌大多数为条件致病菌，当机体免疫力低下时可引起多种感染，人类和牲畜中有很多疾病是由革兰氏阴性细菌引起的。常见的革兰氏阴性菌主要有杆菌和弧菌，其中主要致病性杆菌有痢疾杆菌、伤寒杆菌、大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、百日咳杆菌等，它们产生内毒素，通过内毒素使人致病。1996年在日本发生了一次世界上最大的由 O157:H7 大肠杆菌引起的爆发流行。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在自然界分布很广，是人和动物肠道中的正常菌群。正常情况下一般不致病，但它是条件致病菌。近年来，世界范围的细菌感染类型和感染细菌有着明显变化，原来对人类生命威胁最大的病菌正逐渐被非致病的弱毒菌和条件致病菌所取代。美人鱼发光杆菌就是目前比较重视的这一类细菌。美人鱼发光杆菌是一种革兰氏阴性，可以发光的，兼性厌氧杆菌，它最初是 1981 年，从在温暖海水中生长的鲑鱼的溃疡伤口中分离到的。它是一种具极端破坏性的引起组织坏死传染病的细菌，它不仅会引起假结核病和鱼出血性败血症，导致渔产养殖损失 50%以上；还能通过人的伤口或者是食用未熟海产品而使人致病，在日本就发生过多起渔民感染了美人鱼发光杆菌而严重致病的事件。更可怕的是，越来越多的报道表明美人鱼发光杆菌具有强致死性，能同时以有免疫缺陷或者是健康人为宿主，并诱发快速的，爆发性的传染<sup>[1-2]</sup>。

弧菌(vibrio) 是海洋环境中常见的细菌类群之一，是海水环境的优势种群，尤以溶藻弧菌( *V. alginolyticus*) 、副溶血弧菌( *V. parahaemolyticus*) 、鳃弧菌( *V. anguillarum*) 等占优势，由于它广泛存在于自然海区，故作为致病菌常引发疾病的爆发流行，发病率极高，危害很大，给对虾、鱼类、贝类和其它甲壳类等海水养殖生物造成巨大的影响。溶藻弧菌和副溶血弧菌分别是对虾黑鳃病、褐斑病和对虾红腿病等的病原菌，引起对虾弧菌病爆发流行，同时它们也能感染养殖贝类、鱼类和蟹类，导致养殖动物大量死亡，如导致我国滩涂养殖贝类



蛤仔和文蛤大量死亡的“红肉病”，其病原体就是溶藻弧菌、副溶血弧菌和弗尼斯弧菌（*V. furnissii*）。目前已报导的致病性弧菌达 10 多种。

一些弧菌也是人类的致病菌，它们不仅引起人类胃肠炎，还能引起肠道外感染<sup>[3]</sup>。弧菌引起人类的疾病可分为：霍乱弧菌感染和非霍乱弧菌感染。霍乱弧菌（*V. cholera*）是人类霍乱的病原体，霍乱是一种古老且流行广泛的烈性传染病之一。曾在世界上引起多次大流行，主要表现为剧烈的呕吐，腹泻，失水，死亡率甚高，属于国际检疫传染病。自 1817 年以来，全球共发生了七次世界性大流行。人类在自然情况下是霍乱弧菌的唯一易感者，主要通过污染的水源或饮食物经口传染。在一定条件下，霍乱弧菌进入小肠后，依靠鞭毛的运动，穿过粘膜表面的粘液层，可能藉菌毛作用粘附于肠壁上皮细胞上，在肠粘膜表面迅速繁殖，经过短暂的潜伏期后便急骤发病。非霍乱弧菌有副溶血性弧菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、霍氏弧菌、创伤弧菌和所谓的非凝集性弧菌。副溶血性弧菌是一种嗜盐菌，在日本和美国沿海地区暴发流行的食源性（未烧透的海鲜，通常是虾）腹泻归因于该细菌。这种细菌既不产生肠毒素也不侵入血流，但可损伤肠粘膜。虽然健康人也可发生严重的非凝集性弧菌感染，但该菌的严重感染常发生于有肝病或免疫缺陷的病人。溶藻弧菌和创伤弧菌均不会引起肠炎，但它们可引起海员的伤口感染。创伤弧菌被受损宿主（常为有肝病或免疫缺陷者）摄入后，可通过肠粘膜而不引起肠炎，但可产生具有高死亡率的败血症。由于人们与海洋的接触越来越密切，有必要对海洋中优势菌的致病能力进行深入的研究。

## 1.2 革兰氏阴性细菌外膜蛋白的研究

### 1.2.1 革兰氏阴性细菌外膜蛋白

革兰氏阴性细菌的外壁比革兰氏阳性细菌的外壁复杂得多（如图 1-1），它细胞壁较薄，约 10~15nm，结构比较复杂，除有 1~2 层肽聚糖外（约占细胞壁干重的 5~20%），尚有特殊组份外膜层位于细胞壁肽聚糖层的外侧，包括脂多糖、脂质双层、脂蛋白三部分。

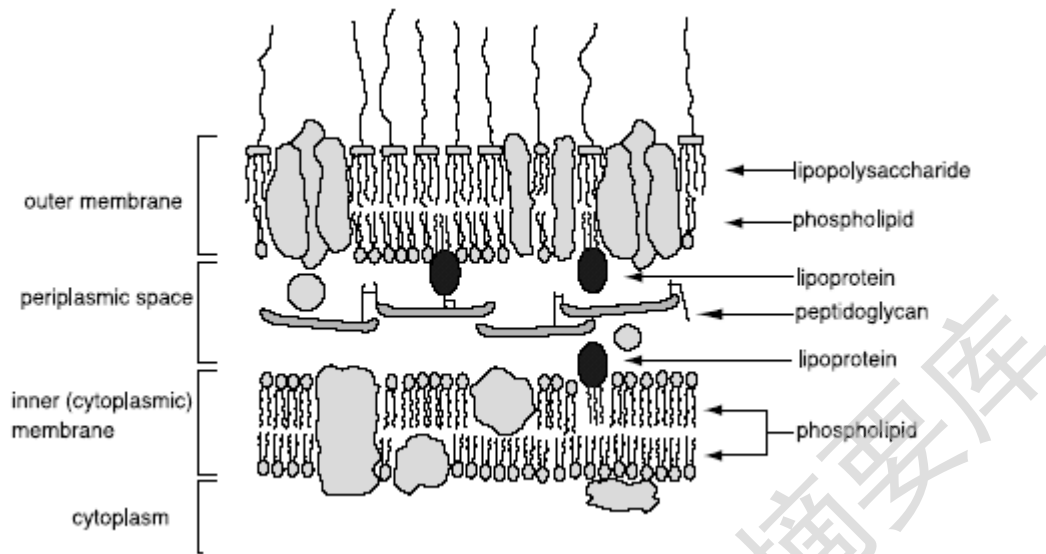


图 1-1 革兰氏阴性细菌的外膜结构图

Fig. 1-1 Schematic representation of the *E. coli* envelope structure. Note that the outer membrane is an asymmetrical bilayer containing LPS in the outer leaflet and phospholipids in the inner leaflet.

革兰氏阴性细菌的外膜在细菌胞浆膜(内膜)和肽聚糖的外侧, 包围整个细菌, 是革兰氏阴性菌细胞壁成分中所特有的结构, 主要成分为磷脂、脂多糖和外膜蛋白等<sup>[5]</sup>。外膜蛋白(outer membrane protein, Omp)是革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 占其全部组成的 1/2, 具有多种生物学功能, 不仅在维持外膜结构, 保证物质运输, 作为大肠菌素、噬菌体受体以及参与 F 因子接合等方面均有重要作用, 而且在细菌与宿主的接触过程中扮演重要的角色, 是一种重要的毒力因子。在大肠杆菌(*E. coli*)的研究中, 通常用外膜蛋白作为分离株遗传相关性分析的依据。近年来, 外膜蛋白与细菌致病和免疫作用机理的相关研究取得了很大进展。因此, 对外膜蛋白的研究, 将有助于揭示外膜蛋白诱发保护反应的机理, 以及外膜蛋白在诱发免疫应答时与免疫细胞的相互作用, 并为确定外膜蛋白的有效最小抗原结构及研制外膜蛋白菌苗奠定基础, 利于对微生物的利用及防治。

### 1.2.2 外膜蛋白的组成、结构及功能

外膜蛋白的种类多种多样, 通过对一些已完成基因全序列测定的菌的研究, 估计其种类可能在 100 种左右。

革兰氏阴性细菌的外膜蛋白如果按其在细胞中的拷贝数高低可区分为主要蛋白和微量蛋白<sup>[6]</sup>。主要蛋白包括外膜 A 蛋白 (outer membrane protein A)、微孔蛋白 (Porin)、脂蛋白 (lipoprotein, LPP) 等, 它们在细胞内一般可以表达 1~2 万个拷贝数; 但外膜蛋白的数量及种类随着不同菌株及不同培养条件而有所变化, 如大肠杆菌在富含麦芽糖培养基中培养时, LamB 蛋白为主要蛋白, 而当细菌在无铁条件下培养时, FepA 蛋白则成为主要蛋白。微量蛋白在细胞内的含量虽然很低, 但却同样具有重要的生理功能。已证明其大部分都参与特异性的扩散过程, 与细胞生长密切相关。如大肠杆菌的 LamB 蛋白参与麦芽糖及多聚麦芽糖透过外膜, Tsx 蛋白或 T6 受体蛋白参与核苷酸的转运, TonA (FluA) 蛋白参与高铁血细素的摄取。FepA 蛋白, Cir 蛋白、Fec 蛋白参与铁色素及含铁复合物的吸收, BtuB 蛋白参与维生素 B12 的吸收等。另外, 还有一些酶定位于外膜上, 这酶类包括磷脂酶 A 及蛋白酶。全面系统地了解外膜微量蛋白将有助于对细菌致病因子的进一步发掘。

### 1.2.3 外膜蛋白与外膜通透性

在革兰氏阴性细菌中, 外膜所扮演的主要角色应该就是对物质的选择通透性, 这与外膜的不对称双层结构和外膜蛋白紧密相关。革兰氏阴性细菌的外膜主要由脂质层、脂蛋白和脂多糖 (LPS) 组成, LPS 是满布于革兰氏阴性细菌表面的特殊物质, 由脂质 A、核心多糖和特异多糖组成, 处于外侧的每个多糖分子上结合有 6~7 个饱和脂肪酸, 相邻的 LPS 间存在较强的相互作用, 这样就形成了一个缺少流动性的高度有序的 LPS 单层结构。这种结构由于含有大量饱和脂肪酸和烃链, 所以对疏水性分子通透性很低, 其通透性仅为磷脂双层的 1/5~1/100。大多数抗生素都具有一定的疏水性, 因而通过外膜就较为困难。

在细胞外膜中还存在着一种被称为孔蛋白 (porin) 的蛋白质, 该蛋白质在维持细胞的通透性方面起着重要作用<sup>[7]</sup>。孔蛋白是存在于细菌质膜的外膜、线粒体和叶绿体的外膜上的通道蛋白, 它们允许较大的分子通过, 其中线粒体孔蛋白可通过的最大分子为 6000 道尔顿, 而叶绿体的孔蛋白则可通过相对分子质量在 10,000 到 13,000 之间的物质。孔蛋白是膜整合蛋白, 它的膜脂结合区与其他的跨膜蛋白不同, 不是  $\alpha$  螺旋, 而是  $\beta$  折叠<sup>[8]</sup>。孔蛋白以三聚体形式镶嵌于细胞外膜的脂质层中并和胞外相通, 建立起胞内胞外物质交换的通道 (图 1-2)。诸如

葡萄糖、氨基酸、离子等分子量小于 600da 的亲水性物质都可经该通道进入胞内。虽然孔蛋白并不表现出结构的选择性，允许所有亲水性小分子物质通过，但其扩散速度却受外来物质理化性质的影响。孔蛋白的通透性可用如下实验证实：用对亲水性小分子物质不具通透性的脂质膜制成的脂质体中，加入用同位素标记的小分子亲水性物质，这些物质并不从脂质体中流出，但当加入纯化的孔蛋白使其结合在脂质膜上，则发现这些小分子物质能流出脂质体外。另外的试验还表明，阳离子的扩散要比阴离子有效 3~5 倍。

最早为大家所了解的经典的孔蛋白（classical porins）是大肠杆菌的 OmpF、OmpC 和 PhoE。它们的性质综合了溶质通过的大小和承载量的一般参数。OmpF 和 OmpC 对阳离子的扩散更为有效，而 PhoE 则更倾向于阴离子<sup>[9-11]</sup>。相对于 OmpC，OmpF 的孔径更大<sup>[12-13]</sup> X-射线检晶仪分析显示，这些孔蛋白是横跨膜的  $\beta$ -桶状结构<sup>[14]</sup>。

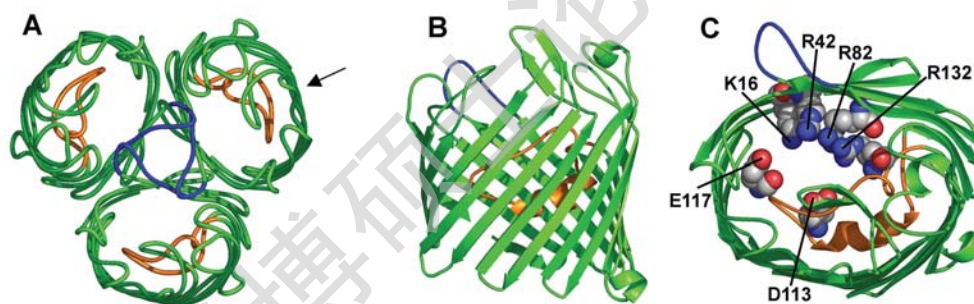


图 1-2: 孔蛋白 OmpF 的结构示意图<sup>[15]</sup>

Fig. 1-2. Structure of the OmpF porin of *E. coli*. (A) View of the trimer from the top, that is, in a direction perpendicular to the plane of the membrane. Loop 2, colored blue, plays a role in interaction of the monomer with its neighboring unit. Loop 3, colored orange, narrows the channel. (B) View of the monomeric unit from the side, roughly in the direction of the arrow in panel A. Loops 2 and 3 are colored as in panel A. (C) View of the monomeric unit from the top, showing the “eyelet” or the constricted region of the channel. The eyelet is formed by Glu117 and Asp113 from the L3 loop, as well as four basic residues from the opposing barrel wall, Lys16, Arg42, Arg82, and Arg132, all shown as spheres. The diagrams are based on PDB file 2OMF. This figure and Fig. 4 and 6 were drawn

by using the program PyMol (Warren L. DeLano, DeLano Scientific LLC, San Carlos, Calif. [<http://www.pymol.org>]).

除了经典的孔蛋白还有一种非常重要的外膜蛋白：慢速孔蛋白（slow porin）。关于慢速孔蛋白的研究有一个非常漫长而又曲折的历史。对它的研究是从铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的主要孔蛋白：OprF 开始的。这个孔蛋白与经典的三聚孔蛋白不同：（1）迄今尚无明显的证据表明它是一个稳定的低聚体；（2）它扩散小分子溶质如单糖的速度是很慢的，（在一个实验中，它扩散树胶醛糖的速度是大肠杆菌 OmpF 通道的 1/50）；但是它却能允许无法穿透 OmpF 通道的大的溶质穿透；存在大孔径与低流速检存的奇怪现象<sup>[16-17]</sup>；（3）当对 OprF 进行序列分析后，发现它是大肠杆菌 OmpA 的一个同源体，并且两者在 SDS-PAGE 电泳中迁移率都存在热修饰性。最近 OmpA-OprF 模型（图 1-3）得到越来越多的实验支持，这个模型假设这类这类蛋白大部分是以不具有高的渗透性的仅 N-末端插入外膜形成包含 8 股  $\beta$ -桶状结构，从而即使是小分子的通道都难以形成；而少部分是 N-、C-末端同时插入外膜形成允许大分子通过的蛋白质结构即完整的 16 股  $\beta$ -桶状结构<sup>[18-19]</sup>。

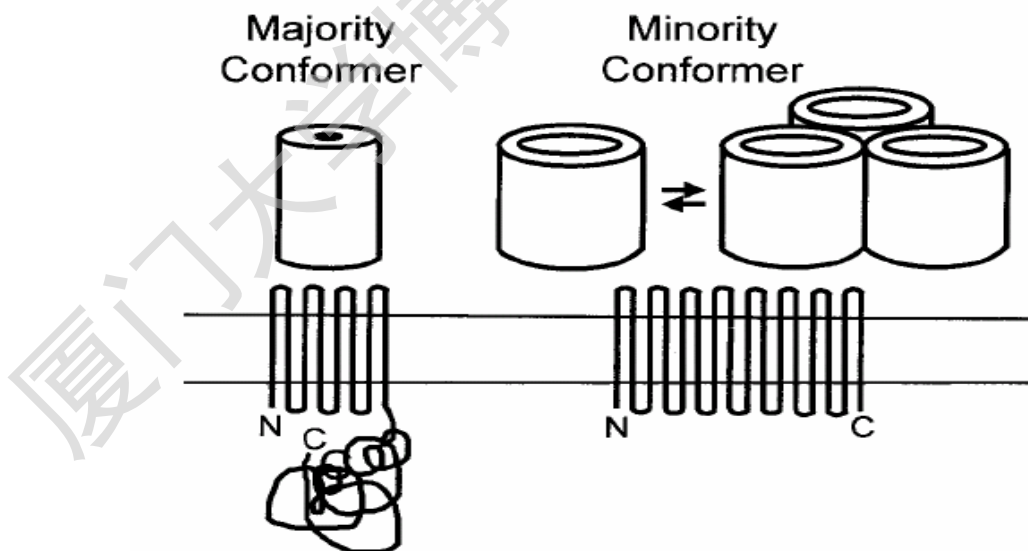


图 1-3：慢速孔蛋白 OmpA-OprF 家族的折叠示意图

fig1-3 Folding model of OmpA-OprF family slow porins. The major fraction of the population folds as a two-domain protein (left) and is important

in binding the OM to the underlying peptidoglycan, since the C-terminal globular domain contains a peptidoglycan-binding motif (165,342). A minor fraction of the population, however, folds differently to produce an open  $\beta$ -barrel (right). In *E. coli*, which produces trimetric, high-permeability porins, the presence of this fraction has no functional consequence. However, in fluorescent pseudomonads, which lack the high-permeability porin, this fraction functions as the major nonspecific porin. This fraction also tends to form a loosely associated oligomeric structure, as shown. The oligomer is shown as a trimer only for illustrative purposes. Modified from reference 455a with permission of the publisher.

#### 1.2.4 革兰氏阴性细菌外膜通透性与耐药性关系

大多数革兰氏阳性细菌具有一层很厚的肽聚糖细胞壁，其机械性强但因其筛子结构粗糙，很难阻止小分子物质如抗生素的扩散，而革兰氏阴性细菌却因外膜的存在而具有非常有效的通透屏障作用。外膜外叶层由脂多糖(LPS)组成，内部流动性极低，但能够通过形成跨膜的非特异亲水性扩散通道的孔道蛋白从外环境中摄取必需的营养。孔道蛋白以几种方式排斥抗生素，如大肠杆菌孔道蛋白通道限制性部分孔径极窄，使多数抗生素内流不可能或极低<sup>[20]</sup>；绿脓杆菌却仅存在有低效率孔道蛋白，因此，绿脓杆菌对各类常用抗生素具有内在耐药性，即不存在染色体突变或者外源性 R 质粒。由于绿脓杆菌必须摄取基本的营养物质，为此该菌外膜具有特异性通道来加速特殊类别化合物的扩散。当一种药物主要通过特异性通道穿透膜屏障时，通道的突变缺陷株可形成有效耐药性，如亚胺培南(imipenem)对绿脓杆菌有例外的高抗菌活性，主要是因为亚胺培南通过特异通道 OprD 扩散。OprD 的生理功能系转运碱性氨基酸，这意味着绿脓杆菌仅仅因为 OprD 通道缺失便会对亚胺培南耐药。现在相当部分从医院中分离得到的绿脓杆菌体现了这种耐药机理。另外革兰氏阴性细菌还通过外膜孔蛋白(porin)组成或数量的变化来改变膜的通透性，产生对抗生素的耐药性。

#### 1.2.5 外膜蛋白的致病作用

研究发现，某些细菌的外膜蛋白具有致病作用，致病奈瑟氏菌的外膜蛋白 PI 对细菌的存活和致病都起着重要的作用。Fantinatti 等发现，无毒力或低毒力菌株的外膜蛋白中缺少 40.7 kDa 和 28.8 kDa 的两条带，它们只出现于有毒力的菌株，在后来的研究发现，这两种蛋白可能在引起禽 *E. coli* 败血症的致病过程中有作用<sup>[21]</sup>。

外膜蛋白的致病作用可能是通过以下几个方面来实现的：首先是吸附作用。在大多数感染中，病原微生物只有吸附在机体组织上才能致病。Moser 等发现，空肠弯曲杆菌外膜蛋白粗提物或纯化的外膜蛋白在体外试验中对人胚小肠上皮细胞系 IN T40 的亲合力远远高于其鞭毛提取物。*E. coli* EPEC 的入侵除与菌毛有关外，其粘附力与外膜蛋白也有关系。其次是外膜蛋白有助于细菌通过防御屏障。在一般情况下，细菌不易透过血脑屏障，但近年来发现引起新生儿期脑炎的

*E. coli* 外膜蛋白在入侵微血管内皮细胞中有作用。OmpA<sup>+</sup> 株的侵袭力比 OmpA<sup>-</sup> 株高 25~50 倍, 微量的多克隆 OmpA 抗体能抑制 OmpA<sup>+</sup> 株 *E. coli* 对血脑屏障的侵袭。第三是有助于逃避免疫防御。将伪结核耶尔森氏菌培养于缺钙条件下, 使其能大量表达 yop H 外膜蛋白, 其抑制吞噬作用增强, 加入 2.5nmol Ca<sup>2+</sup> 或删除 yop H 基因后, 抑制吞噬作用的能力被削弱。禽源鼠败血杆菌的 50 kDa Omp 有抗吞噬作用。针对这种蛋白的抗体能保护火鸡抵抗致死剂量的鼠败血杆菌的攻击。

### 1.3 革兰氏阴性细菌双成分调节系统

生物需要复杂而精密的信号系统感受、传导和响应外界环境的变化。蛋白磷酸化是原核和真核生物进行信号转导的主要机制<sup>[22]</sup>。蛋白磷酸化由激酶催化, 根据对底物专一性的不同, 激酶可分为 Ser/Thr 激酶、Tyr 激酶和 His 激酶等。原核生物由于缺乏大多数丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸蛋白激酶, 所以, 组氨酸蛋白激酶在信号传递的诸多方面, 包括对环境的适应、芽孢的形成、感受趋化性因子、渗透改变和营养缺乏等过程中起着至关重要的作用。该信号系统由两部分组成, 包括感受器和反应调节蛋白, 称为双成分(组分)系统(two-component system)。

双成分系统在自然界中非常普遍, 几乎所有的细菌(支原体细菌除外)都编码各种不同的这种双成分系统来应对种种外界信号变化。长期以来, 组氨酸激酶和双成分信号系统一直被认为局限于原核生物中, 然而, 越来越多的证据表明, 这一系统也存在于许多真核生物中。目前, 在酵母、粘菌(slime mold)、真菌、和高等植物中都已找到了这一信号传递系统。在酵母中, 由一个感受渗透压的双成分系统调节着 MAPK 级联系统, 后者是真核生物特有的一个信号传递系统。高等植物中也已报道了一些感受器激酶基因, 如拟南芥的 ETR1、ERS 和 CKI1, 分别是乙烯和细胞分裂素信号传递途径的组分。到目前为止, 在高等动物中还没有存在组氨酸激酶的报道, 双成分系统是否存在于高等动物中也不清楚。

双成分系统最初是由 Ninfa 和 Magasanik (1986) 在研究大肠杆菌 (*E. coli*) 氮调节蛋白(nitrogen regulatory protein, NR) 系统时发现的; 与此同时, Nixon 等 (1986) 发现细菌中存在许多感应系统(sensory system), 其组分与大肠杆菌的 NR 系统的组分具有相似的氨基酸序列。双成分系统普遍存在于原



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库