

副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的克隆鉴定及序列分析

贾爱卿, 王贵平*, 黄静琳 (广东现代农业集团研究院, 广东 广州 510630)

摘要:用 PCR 技术对华南地区分离的 17 株不同血清型副猪嗜血杆菌菌株 *ompP2* 基因进行克隆鉴定, 并以 CLUSTALS1 和 PHYLIP-3.68 软件将 *ompP2* 基因序列进行比对和遗传进化分析。17 株副猪嗜血杆菌菌株中均能扩出 *ompP2* 基因, 克隆测序结果发现 *ompP2* 基因大小有所不同, 与参考序列 ABKM01000007 的同源性在 92%~99% 之间。序列比较结果显示, *ompP2* 基因与 GenBank 公布的副猪嗜血杆菌全基因组测序中的 *ompP2* 基因序列具有较高的同源性, 不同菌株 *ompP2* 基因序列大小存在差异, 为进一步验证 *ompP2* 蛋白的功能及相关研究奠定了基础。

关键词:副猪嗜血杆菌; *ompP2* 基因; 序列分析; 进化树

中图分类号: S852.651

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0029-03

Identification and sequence analysis on the *ompP2* gene of *Haemophilus parasuis*

JIA Ai-qing, WANG Gui-ping*, HUANG Jing-lin (Guangdong Institute of Modern Agricultural Group, Guangzhou 510630, China)

Abstract: We clarified the genetic structure and phylogenetic relationship of the *ompP2* gene in *Haemophilus parasuis*, a gene encoding outer membrane protein. PCR was used to determine the *ompP2* gene of 15 *H. parasuis* local isolates and 2 reference strains. Then we sequenced the *ompP2* gene of *H. parasuis*. All *ompP2* gene sequence from *H. parasuis*, were analyzed for phylogenetic relationship. An approximately 1.1 kb fragment was obtained from the genomic DNA of 17 *H. parasuis* strains. Sequence analysis showed that the size of the *ompP2* gene was difference, the nucleotide sequence similarity was 92%-99% between 17 *H. parasuis* isolates and ABKM01000007. No obvious difference was found in the *ompP2* gene sequence of 15 local isolates and 2 reference strains.

Key words: *Haemophilus parasuis*; *ompP2* gene; sequence analysis; phylogenetic tree

* Corresponding author

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 是一种革兰阴性菌, 具有多形性, 主要侵害 4~8 周龄仔猪, 引起纤维素性胸膜炎、腹膜炎、心包炎、关节炎和脑膜脑炎等症状, 是仔猪死亡的主要原因之一^[1-2]。根据表面抗原不同分为 15 个血清型^[3], 各血清型之间毒力有所不同。

外膜蛋白是革兰阴性菌外膜的重要组成成分, 在致病性和免疫原性方面发挥着重要的作用^[4-7]。McVicker 等^[8]在研究流感嗜血杆菌时发现, *ompP2*

蛋白的单抗可与 Hps 的菌体蛋白发生杂交反应, 且不同血清型 Hps 的杂交蛋白大小有所不同, 因此推断 *ompP2* 蛋白可作为区分 Hps 毒力的一个参考指标。目前尚未见针对 Hps 该基因的研究报道, 为了验证该结论, 本试验对广东省临床分离的 15 株不同血清型 Hps 和 2 株国际参考菌株的外膜蛋白编码基因 *ompP2* 进行了克隆测序及序列分析, 旨在探讨不同血清型 Hps 外膜蛋白间的差别, 并为进一步研究其毒力相关性、免疫原性、鉴别诊断方法和研制亚单位疫苗等提供依据。

1 材料与方法

1.1 副猪嗜血杆菌菌株 15 株地方分离副猪嗜血杆菌和 2 株国际参考菌株 HS80、SW124 由本实验

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: 广东省农业攻关项目 (2011B02036002); 广州市科技计划资助项目 (2010Y1-C311)

作者简介: 贾爱卿 (1979-), 女, 助理研究员, 硕士。

* 通讯作者

室保存。

1.2 主要试剂 TSA 和 TSB 购自 BD Difco,使用时添加 10%小牛血清和 0.005%NAD;小牛血清和 NAD 购自北京鼎国生物技术有限公司。dNTPs、rTaq 酶、T 载体、内切酶等购自大连宝生物工程有限公司;基因测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 细菌基因组 DNA 的抽提 所有菌株细菌在 TSA 培养基上过夜培养后,用接种环挑取单一菌落,溶于 40 μL 无菌蒸馏水中,煮沸 5 min 后,冰浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液-20℃保存备用。

1.4 ompP2 基因的克隆测序 参照 GenBank 中序列 ABKM01000007 (*Haemophilus parasuis* H0165)设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为:

P1: 5'-AAAGGATCCATGAAAAAACAC-TAGTAGC-3';

P2: 5'-AAAGTCGACTTACCATAATACAC-GTAAACC-3'。

PCR 采用 25 μL 反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,10 μmol/L 引物各 1.0 μL,模板 1.0 μL(细菌基因组),5 U/μL rTaq 酶 0.5 μL,然后加 ddH₂O 调整终体积至 25 μL。PCR 反应程序为:94℃ 5 min 后,按 94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 1 min 进行 30 个循环,然后在 72℃ 延伸 10 min。最后 PCR 产物克隆至 T 载体后送上海生工测序。

1.5 副猪嗜血杆菌不同血清型菌株 ompP2 基因序列比较 对实验室保存的 15 株不同血清型副猪嗜血杆菌(表 2)的 ompP2 基因序列进行分析,利用 BLAST 和 EXPASY 等生物信息软件进行核酸序列和氨基酸序列比较,鉴定不同副猪嗜血杆菌 ompP2 基因序列和编码产物的差异。利用 CLUSTALS1 和 PHYLIP-3.68 等软件进行核酸序列比较,绘制 ompP2 基因进化树,鉴定副猪嗜血杆菌 ompP2 基因遗传进化关系。

2 结果

2.1 ompP2 基因 PCR 扩增结果 以实验室保存的 15 株副猪嗜血杆菌地方分离株和 2 株参考菌株(表 1)提取的基因组为模板,用 ompP2 引物进行 PCR 扩增,结果均为阳性(图 1)。对其 PCR 产物进行克隆测序,测序结果与 GenBank 中,参考序列

ABKM01000007 的 1 080 bp 基本相符。

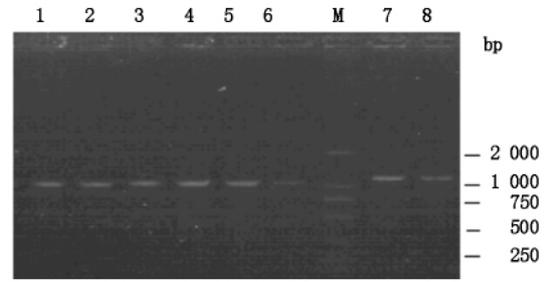


图 1 Hps 菌株 ompP2 基因片段 PCR 扩增结果 1~8. PCR 产物;M:DL2000 DNA Marker

表 1 17 株副猪嗜血杆菌的相关信息

菌株	分离部位	血清型	序列长度/bp	氨基酸/个	同源性/%
H10	脑	4	1 077	359	97
H15	心脏	5	1 092	364	96
H25	腹腔积液	4	1 077	359	97
H43	脑	4	1 092	364	96
sw124*	-	4	1 077	359	98
H37	淋巴结	14	1 188	396	92
H49	胸膜积液	NT	1 188	396	92
HS80*	脑	5	1 080	360	99
H17	肺脏	5	1 092	364	96
H26	心脏	12	1 077	359	98
H27	关节液	12	1 080	360	99
H31	肺脏	12	1 080	360	99
H33	心脏	4	1 086	362	99
H38	肺脏	NT	1 191	397	92
H45	心包积液	5	1 092	364	96
H47	脑	NT	1 083	361	99
H0165	-	5	1 092	364	96

注:1.*示参考菌株;2.NT 示未定型

2.2 副猪嗜血杆菌 ompP2 基因核苷酸及蛋白质氨基酸序列分析 17 株副猪嗜血杆菌 ompP2 基因完整的 ORF 和氨基酸见表 1。菌株 H10、H15、H25、H37、H43、H49、H17、H26、H27、H31、H33、H38、H45、H47、H0165、HS80 和 SW124 的 ompP2 基因序列在 GenBank 上的登陆号分别为 FJ685754、FJ685755、FJ685756、FJ685757、FJ685758、FJ685759、GQ242022、GQ242024、GQ242025、GQ242026、GQ242021、GQ242027、GQ242023、GQ242028、NC_011852、FJ685760 和 FJ685761。

BLAST 结果表明,17 株菌株的 ompP2 基因序列与 ABKM01000007 的同源性均在 92%~99% 之间,证实 PCR 所得片段均为 ompP2 基因。17 株

Hps 的 *ompP2* 片段长度有所差别,其中 H37 和 H49 比其他片段多出 102~117 bp。在 www.expasy.com 上推导出氨基酸序列,用 CLUSTALS1 进行序列比对分析。8 株菌株的氨基酸比较结果发

现,H37、H38 和 H49 在 151~170 位和 256~279 位比 H15、H17、H43、SH0165 和 H45 多出 34 个氨基酸,比其他菌株多 39 个氨基酸(图 2)。

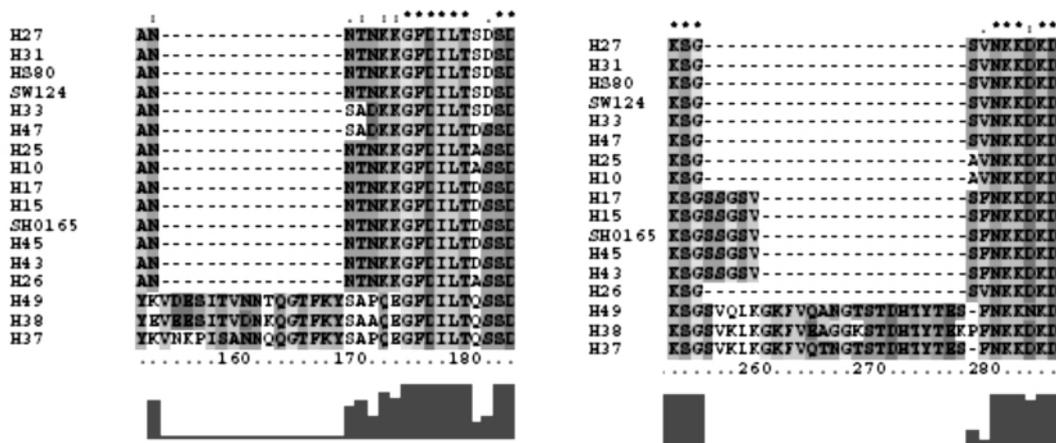


图 2 副猪嗜血杆菌 *ompP2* 蛋白质氨基酸序列的差别

用 CLUSTRAL1 和 PHYLIP-3.68 等软件对 17 株 Hps 菌株的 *ompP2* 基因序列进行遗传进化分析(图 3)。H37、H38 和 H49 3 株含有插入片段的菌株聚为一群,与其他菌株遗传距离相对较远。H15、H17、H45 和参考序列 H0165 聚为一群,4 株菌同为血清 5 型,标准菌株 HS80 也是血清 5 型,却离这个分支较远,可能是因为分离地域不同而形成的遗传上的差异。而同为血清 4 型的 H25、H33、H43 和 SW124 处于不同的分支上,在基因分型中发现血清 4 型菌株的基因型也差异较大^[9]。

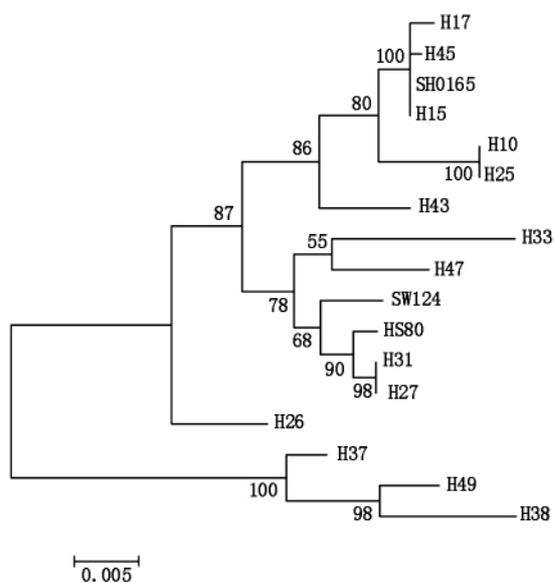


图 3 17 株副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因序列遗传进化树

3 讨论

外膜蛋白是革兰阴性菌外膜的重要组成部分,在致病性和免疫原性方面发挥着重要的作用,一直是国内外科学工作者研究的热点。美国学者 McVicker 等^[8]在进行流感嗜血杆菌的 *ompP2* 蛋白单克隆抗体研究时发现,该单抗可与副猪嗜血杆菌菌体蛋白发生反应,且不同毒力菌株反应蛋白大小有所不同,在有毒力 Hps 菌株中 *ompP2* 蛋白为 48 000,而在非毒力菌株中却为 55 000,并预期 *ompP2* 蛋白可用来区分 Hps 毒力与非毒力菌株。在流感嗜血杆菌中 P2 被认为是与定殖相关且与免疫应答有关,流感嗜血杆菌的 P2 外露表面环能够激活真核生物的 MAP 激酶信号通路,该通路在调控先天免疫和改善免疫应答方面发挥着重要的作用。但在副猪嗜血杆菌中关于该蛋白的功能却研究的较少。

本试验对猪的重要经济性病原副猪嗜血杆菌我国华南地区分离的 Hps 菌株 *ompP2* 基因进行了克隆测序分析,在所有的临床分离菌株中均可以检测到 P2 基因,且存在极高的多样性。特别值得注意的是 H37、H38 和 H49 中 P2 的 2 段保守插入序列,使其比其他 15 株分别多出 34 个和 39 个氨基酸,这构成了进化树发散为 2 个不同谱系的基础,这是否与 Hps 菌株的毒力相关还有待进一步验证。

(下转 93 页)

- (7):859-65.
- [7] 金少琳,关红,何秀玲,等.牛磺鹅去氧胆酸对小鼠不同免疫细胞凋亡的影响[J].动物医学进展,2008,28(6):27-30.
- [8] 朱正美,刘辉.简明免疫学技术[M].北京:科学出版社,2002:216.
- [9] Hylemon P B,Zhou H,Pandak W M,et al. Bile acids as regulatory molecules[J]. *J Lipid Res*,2009,50(8):1509-1520.
- [10] Makishima M,Okamoto A Y,Repa J J,et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. *Science*,1999,284(5418):1362-1365.
- [11] Kawamata Y,Fujii R,Hosoya M,et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids[J]. *J Biol Chem*,2003,278(11):9435-9440.
- [12] Schote A B,Turner J D,Schillz J,et al. Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations[J]. *Mol Immunol*,2007,44:1436-1445.
- [13] Renga B,Migliorati M,Mencarelli A,et al. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon gamma-STAT-1 pathway in macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta*,2009,1792(6):564-573.
- [14] Fiorucci S,Cipriani S,Mencarelli A,et al. Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation[J]. *Curr Mol Med*,2010,10(6):579-595.
- [15] Keitel V,Donner M,Winand S,et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupper cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,372(1):78-84.
- [16] 邹庆伟,蒲燕,蒲敏,等.胆管病发病机制研究进展[J].西南军医,2010,12(5):949-951.
- [17] Zhang Y N,Tadashi I,Du H W,et al. Bile acids enhance proliferation and motility of hepatic stellate cell through regulation of p38/JNK signaling[J]. *临床儿科杂志*,2010,28(4):301-306.
- [18] Keitel V,Kubitz R,Häussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids[J]. *World J Gastroenterol*,2008,14(37):5620-5629.
- [19] Katsuma S,Hirasawa A,Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2005,329(1):386-390.
- [20] Watanabe M,Houten S M,Mataki C,et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation[J]. *Nature*,2006,439(7075):484-489.
- [21] Huang W,Ma K,Zhang J,et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration[J]. *Science*,2006,312(5771):233-236.

(上接 31 页)

参考文献:

- [1] 薛晓晶,徐福洲,史爱华,等.副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因鉴定及遗传进化分析[J].微生物学报,2008,48(8):1100-1103.
- [2] Amano H,Shibata M,Kajio N,et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1,4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method[J]. *J Vet Med Sci*,1994,56:639-644.
- [3] Kielstein P,Rapp-Gabrielson V. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heatstable antigen extracts[J]. *J clin Microbiol*,1992,30(4):862-865.
- [4] 焦炳华.分子内毒素[M].上海:上海科学技术文献出版社,2002.
- [5] 朱德康,程安春,汪铭书,等.鸭疫里默氏杆菌基因组文库的构建及免疫原性基因初步筛选[J].中国兽医学报,2007,27(6):834-837.
- [6] 李鹏,姜平,李军星,等.副猪嗜血杆菌重组 P2 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2011,31(4):480-484.
- [7] 贾爱卿,李春玲,王贵平,等.副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J].中国兽医学报,2011,31(9):1266-1269.
- [8] McVicker J K,Tabatabai L B,Schilfgaarde M. *Haemophilus parasuis*-novel proteins-hopes for vaccine? [A/OL]. [2011-09-11]. http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=185444.
- [9] 贾爱卿,李春玲,王贵平,等.副猪嗜血杆菌 ERIC-PCR 指纹图谱多样性研究[J].中国兽医学报,2010,30(3):337-340.