

地方土猪源副猪嗜血杆菌 *Omp P2* 基因的分子鉴定 及遗传演化分析

常洪涛¹, 王新卫¹, 刘慧敏², 赵军¹, 陈陆¹, 杨霞¹, 姚惠霞¹, 王川庆^{1*}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 为研究地方土猪源副猪嗜血杆菌(Hps)的分子遗传演化特性,应用PCR方法扩增淮南猪源河南分离株XY0501的*Omp P2*基因,并进行序列比较和遗传演化分析。结果显示,XY0501的*Omp P2*基因序列全长为1080 bp,编码359 aa;与参考菌株的核苷酸序列同源性为96.7%~99.4%,与4型、5型和12型参考菌株的核苷酸序列同源性分别为96.9%~97.4%、96.7%~99.4%和97.1%~99.1%;基因进化树显示与血清5型参考菌株FJ685760亲缘关系最近,同源性高达99.4%。研究结果证明,该分离菌株属于血清5型;Hps可感染地方猪种并导致发病,但其来源则有待进一步研究;*Omp P2*基因在Hps国内优势流行血清型中高度保守,而且这种高保守性并无明显品种差异;不同地域的Hps分离菌株存在一定的遗传差异。

关键词: 地方土猪;副猪嗜血杆菌;*Omp P2*基因;PCR;分子鉴定;遗传演化分析

中图分类号: S854.43

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)03-0371-04

Identification and genetic evolution analysis on the *Omp P2* gene of haemophilus parasuis from local aardvark

CHANG Hongtao¹, WANG Xinwei¹, LIU Huimin², ZHAO Jun¹,
CHEN Lu¹, YANG Xia¹, YAO Huixia¹, WANG Chuanqing¹

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: In order to study the molecular genetic evolution characterization of *haemophilus parasuis* (Hps) isolated from local aardvark, PCR was used to determine *Omp P2* gene of Hps Henan isolates XY0501. Then we conducted sequence comparison and genetic evolution analysis. The results showed that the whole size of *Omp P2* gene was 1080 bp, coding 359 aa. The nucleotide sequence similarity was 96.7%-99.4% with the reference strain, 96.9%-97.4%, 96.7%-99.4% and 97.1%-99.1% with serotype 4, 5 and 12, respectively. The phylogenetic analysis identified that the isolate was closest with reference strain FJ685760, and homology was 99.4%. The analysis results proved that the isolate belongs to serotype 5. Hps can infect local aardvark and cause disease, but the infection source need to be further investigated. The *Omp P2* gene is highly conserved in prevalence serotype of Hps, no difference between species is observed, but genetic difference of Hps isolates exists in different regions.

Key words: local aardvark; haemophilus parasuis; *Omp P2* gene; molecular identification; genetic evolution analysis

副猪嗜血杆菌病是由副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)引起猪的一种以多发性浆膜炎和关节炎为主要临床特征的一种疾病,其临床症状主要为发热、咳嗽、关节肿胀、呼吸困

难、消瘦、跛行和共济失调等,剖检病理变化表现为胸膜炎、肺炎、心包炎、腹膜炎、关节炎和脑膜炎等^[1-2]。该病于1910年由Glässer首次报道,因此又称革拉斯氏病(Glässer's disease),目前已呈世界

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(31272567)资助。

作者简介: 常洪涛, 博士研究生, 讲师。E-mail: ndcht@163.com

* 通信作者: 王川庆, 教授, 博士生导师。E-mail: wchuanq@163.com

性分布,主要危害断奶及保育阶段仔猪,发病率一般在 10%~15%,严重时死亡率可达 50%^[3]。按 Kieletein-Rapp-Gabrielson(KRG)血清分型方法,Hps 至少可以分为 15 个血清型^[4],但由于一些菌株不表达足够多的型特异性抗原,仍约有 20%的分离菌株血清型不定。各血清型菌株之间致病力存在较大差异,其中血清 1、5、10、12、13 和 14 型毒力最强,其次是 2、4、8、15 型,血清 3、6、7、9、11 型毒力较弱^[1],我国目前流行的血清型则以 4 型、5 型和 12 型为主^[5]。研究表明,Hps 的外膜蛋白(outer membrane proteins, Omp)是潜在的毒力因子,同时也具有良好的免疫原性。目前在 Hps 全基因组中已发现 6 个编码主要外膜蛋白的基因,分别为外膜蛋白 P1 基因、外膜蛋白 P2 基因、表面抗原 D15 基因、外膜蛋白 P26 基因、铁调节外膜蛋白基因和外膜蛋白 P5 基因。其中以 OmpP2 在 Hps 的 Omp 中含量最为丰富,对维持细菌生长、抵抗血清中补体杀菌作用和对宿主细胞的黏附作用中发挥重要作用,也是当前最受关注的免疫保护性外膜蛋白,因此开展针对 *Omp P2* 基因的研究已成为 Hps 研究领域的最大热点之一^[6]。本研究应用 PCR 技术对所分离的河南地方土猪源 Hps 菌株的 *Omp P2* 基因进行序列测定和遗传演化分析,以期在分子水平上对其进行鉴定,并在流行病学体系研究、快速诊断和新型疫苗研制等方面提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2012 年 5 月从河南省信阳市某综合生态养殖场送检的发病淮南猪的关节液中分离到 1 株 Hps 菌株,命名为 XY0501,经形态学观察、生化试验和 KRG 法初步鉴定为血清 5 型 Hps,由河南农业大学动物传染病实验室保存。

1.2 主要试剂

巧克力琼脂平板购自郑州安图绿科生物工程有限公司;细菌 DNA 抽提试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体和胶回收试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司;引物合成和基因测序由上海生工生物工程公司完成。

1.3 引物设计

根据已发表的 Hps 基因组序列(GenBank 登录号为 FJ416466),应用 Primer Premier 5.0 软件设计并合成针对 *Omp P2* 基因的一对特异性引物,预期扩增片段大小为 1080 bp,引物序列如下:

PF1: 5'-TAGCAGTAGCGGCATTTG-3'

PR1: 5'-GAACCACAACCAAATGCA-3'

1.4 菌株复活及 DNA 制备

取 XY0501 菌种接种于巧克力琼脂平板,经 37 24~48 h 培养复活后^[7],用 PBS 液将其菌落洗下置入无菌容器中,并浓缩菌液至 OD 值在 1.0~1.5 之间。用细菌 DNA 抽提试剂盒提取其基因组 DNA, -20 保存待用。

1.5 PCR 及测序

以 XY0501 菌体 DNA 为模板按照以下参数进行 PCR 扩增:94 预变性 5 min;94 变性 30 s,55 退火 30 s,72 延伸 45 s,共 30 个循环;72 后延伸 10 min。PCR 产物胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 *DH5a*^[8-9],筛选阳性克隆经 PCR 鉴定后送至上海生工生物工程公司测序。

1.6 *Omp P2* 基因同源性比较与系统进化分析

运用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 程序,将 XY0501 与 NCBI GenBank 下载的国内血清 4 型(GenBank: FJ685754、FJ685756、FJ685758 和 GQ242021)、血清 5 型(GenBank: FJ685755、FJ685760、GQ242022 和 GQ242023)和血清 12 型(GenBank: GQ242024、GQ242025 和 GQ242026)参考菌株 *Omp P2* 基因的核苷酸序列进行同源性分析,并构建系统进化树。

1.7 *Omp P2* 蛋白特性分析

运用 DNASTar 软件包中的 Protean 程序对 XY0501 *Omp P2* 蛋白的亲水性(Kyte-Doolittle 法预测)、表面可能性(Emimi 法预测)和抗原指数(Jameson-Wolf 法预测)进行分析,并预测其抗原表位。

2 结果与分析

2.1 *Omp P2* 基因 PCR 扩增及 PCR 鉴定

利用所设计引物,应用 PCR 技术扩增出一条长度与预期目的片段大小一致的扩增产物。阳性克隆经 PCR 鉴定后,表明成功获得 XY0501 *Omp P2* 基因的重组质粒(图 1)。

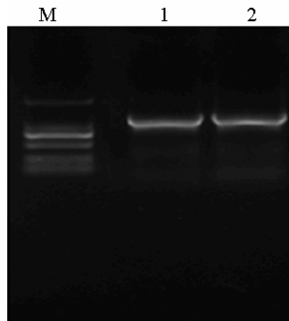
2.2 *Omp P2* 基因序列

对重组质粒中插入的 *Omp P2* 基因目的片段进行测序后,获得 XY0501 *Omp P2* 基因序列,全长为 1080 bp,编码 359 aa,已至在 GenBank 登录(登录号为 KF413896)。

2.3 *Omp P2* 基因同源性分析

将 XY0501 *Omp P2* 基因核苷酸序列与其它参考菌株进行同源性比较,结果见图 2。从图 2 可以

看出, XY0501 与参考菌株的核苷酸序列同源性的 96.7% ~ 99.4%; 与 4 型、5 型和 12 型参考菌株的核苷酸序列同源性分别为 96.9% ~ 97.4%、96.7% ~ 99.4% 和 97.1% ~ 99.1%; 与 5 型 Hps 菌株 FJ685760 的核苷酸序列同源性最高为 99.4%。



M : DNA 标准 DL2000 ; 1 : XY0501 *Omp P2* 基因 PCR 扩增结果 ; 2 : XY0501 *Omp P2* 基因重组质粒 PCR 鉴定结果

M : DNA Marker DL2000 ; 1 : PCR amplification result with *Omp P2* gene of XY0501 ; 2 : Identification results of the recombinant plasmid with *Omp P2* gene of XY0501

图 1 XY0501 *Omp P2* 基因的 PCR 扩增结果和重组质粒 PCR 鉴定结果

Figure 1 PCR amplification and identification results of the recombinant plasmid with *Omp P2* gene of XY0501

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Divergence	1	■	99.1	99.1	95.5	99.1	97.4	99.8	99.9	97.4	97.4	97.4	96.9	1	FJ685754-4	
	2	1.0	■	100.0	96.2	100.0	97.8	98.8	98.9	97.4	97.6	97.6	97.2	2	FJ685756-4	
	3	1.0	0.0	■	96.2	100.0	97.8	98.8	98.9	97.4	97.6	97.6	97.2	3	FJ685758-4	
	4	3.7	3.7	3.7	■	96.4	98.1	95.4	95.5	96.6	97.9	97.8	97.7	4	GQ242021-4	
	5	1.0	0.0	0.0	3.7	■	97.8	98.8	98.9	97.4	97.6	97.6	97.2	5	FJ685755-5	
	6	2.5	2.4	2.4	2.0	2.4	■	97.1	97.2	97.5	99.6	99.5	99.4	6	FJ685760-5	
	7	0.2	1.2	1.2	3.9	1.2	2.7	■	99.7	97.2	97.2	97.2	96.7	7	GQ242022-5	
	8	0.1	1.1	1.1	3.8	1.1	2.6	0.3	■	97.3	97.3	97.3	96.8	8	GQ242023-5	
	9	2.7	2.7	2.7	3.5	2.7	2.6	2.9	2.8	■	97.3	97.3	97.2	97.1	9	GQ242024-12
	10	2.6	2.6	2.6	2.2	2.6	0.4	2.7	2.6	2.8	■	99.9	99.1	10	GQ242025-12	
	11	2.5	2.5	2.5	2.3	2.5	0.5	2.6	2.6	2.7	0.1	■	99.0	11	GQ242026-12	
	12	3.1	2.9	2.9	2.4	2.9	0.6	3.3	3.2	3.0	0.9	1.0	■	12	XY0501	

图 2 XY0501 与参考菌株的同源性比较结果

Figure 2 Homology comparison with reference strains of XY0501

2.4 *Omp P2* 基因系统进化分析

基于 Hps 的 *Omp P2* 基因核苷酸序列, 应用 DNASTar 软件对 XY0501 和 11 个 Hps 参考菌株绘制系统发育进化树, 结果见图 3。由图 3 可见, XY0501 与血清 5 型 Hps 参考株 FJ685760 属于同一分支。

2.5 *Omp P2* 蛋白特性分析及其抗原表位预测

XY0501 的 *Omp P2* 蛋白由 359 aa 组成, 亲水性较高的区域主要在 22 ~ 35、42 ~ 64、71 ~ 106、112 ~ 120、145 ~ 159、161 ~ 170、184 ~ 205、213 ~ 219、227 ~ 247、264 ~ 279、281 ~ 289、291 ~ 312、320 ~ 326、334 ~ 349 位氨基酸区段; 23 ~ 28、42 ~ 53、58 ~ 64、83 ~ 95、101 ~ 105、147 ~ 155、185 ~

195、228 ~ 234、238 ~ 244、269 ~ 276、287 ~ 292、297 ~ 311、336 ~ 349 位氨基酸区段出现在蛋白质表面的可能性比较大, 同样这些区段均位于 VP1 蛋白的亲水区域; *Omp P2* 蛋白大多数区域的抗原性指数都比较高, 其中 23 ~ 36、39 ~ 55、57 ~ 66、72 ~ 80、82 ~ 104、117 ~ 130、143 ~ 157、131 ~ 169、187 ~ 205、212 ~ 218、229 ~ 246、261 ~ 279、281 ~ 294、300 ~ 309、334 ~ 351 位氨基酸区段的抗原指数最为显著。综合其上各参数, 预测 XY0501 *Omp P2* 蛋白有 11 个抗原表位, 分布在 Y₂₃ENE_{GT}、K₄₂QATKE-KGQSS、S₅₈LKNNG、G₈₂RYETRLDSNSKNA、Y₁₄₇SANNTNKK、A₁₈₇NERDKKTG、T₂₂₉HDDYK、V₂₃₈NKKDKD、K₂₆₉TGNVKEK、Y₃₀₀GT_YKDKAYK 和 I₃₃₆KNKDSNNKKVTDQ。

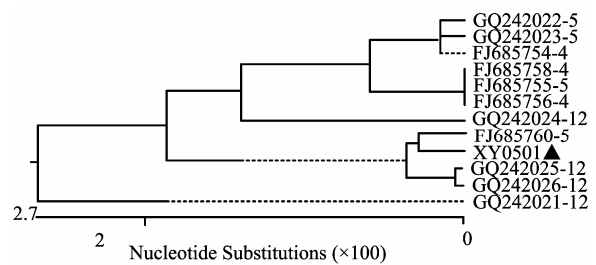


图 3 基于 Hps *Omp P2* 基因核苷酸序列的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on Hps *Omp P2* gene nucleotide sequences

3 讨论

目前国内已分离到大量良种猪源 Hps 流行株, 但有关地方土猪源 Hps 的研究尚未见报道。本研究中, 作者对分离自河南省的淮南猪源 Hps 菌株进行了 *Omp P2* 基因的序列测定和遗传演化分析。结果显示, 淮南猪源 Hps 菌株与血清 4 型、5 型和 12 型等参考菌株的核苷酸序列同源性为 96.7% ~ 99.4%, 提示 *Omp P2* 基因在 Hps 的这些国内优势流行血清型中高度保守^[10], 而且这种高保守性并无明显品种差异。地方土猪源 Hps 经 KRG 法鉴定为血清 5 型 Hps, 基因进化树也显示它和血清 5 型参考菌株 FJ685760 的核苷酸序列同源性高达 99.4%, 可进一步从分子水平上证实该分离菌株属于血清 5 型, 这与当前中国流行的主要血清型相一致; 而其他血清 5 型参考菌株的同源性为 96.7% ~ 97.2%, 进化树上相距也较远, 说明不同地域的分离菌株存在一定的遗传差异。

XY0501 分离自淮南猪, 该猪种为河南省地方优良品种, 主要产区集中在信阳市固始县及其周边地区, 是在艰苦条件下长期驯化、培育而成, 通常

情况下抗病力极强。而本研究证实 Hps 可感染淮南猪并导致发病,在一定程度上改变了“地方猪种抗病性强”的传统认识,但其是来源于本场混养的良好猪或是由于传统饲养模式改变而导致的自身内源感染则有待进一步研究。

外膜蛋白是 Hps 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,而其中的 *Omp P2* 基因含量最为丰富,因此也最具免疫学价值。本研究通过生物信息学分析、处理、模拟,准确预测到 11 个优势抗原表位,从而为基因工程疫苗研发等后续研究提供理论指导。

参考文献:

- [1] 陈溥言. 家畜传染病学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [2] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 1-12.
- [3] 马广鹏. 副猪嗜血杆菌毒力因子研究进展[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(2): 83-88.
- [4] 尹秀凤, 姜平, 邓雨修, 等. 副猪嗜血杆菌的分离与鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2004(7): 6-8.
- [5] Olvera A, Segales J, Aragon V. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods[J]. *Vet J*, 2007, 174(3): 522-529.
- [6] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts[J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(4): 862-865.
- [7] 李鹏, 李军星, 李玉峰, 等. 副猪嗜血杆菌 OMP P2 基因 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(10): 1321-1325.
- [8] 王祝荣, 卢寄军, 张进. 副猪嗜血杆菌 16S rRNA 基因的克隆及序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(3): 92-94.
- [9] Cai X, Chen H, Blackall P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 111(3/4): 231-236.
- [10] 李鹏, 李军星, 曹琚, 等. 副猪嗜血杆菌 OMP P2 基因的克隆与表达[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(2): 215-215.