

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.02

不同动物源生产用多杀性巴氏杆菌 外膜蛋白 H 基因序列分析

李伟杰, 魏财文, 岂晓鑫, 田野, 蒋颖, 蒋桃珍*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-03-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 12-0007-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为了解国内不同动物源生产用多杀性巴氏杆菌外膜蛋白 H 基因的变异情况, 采用 PCR 方法对 16 株不同动物源生产用多杀性巴氏杆菌的 *ompH* 基因进行扩增测序和分析。结果显示: 16 株菌株的 *ompH* 基因开放阅读框在 1002~1056 bp 之间; 信号肽为 N 端 20 个氨基酸残基, 成熟蛋白氨基酸残基数在 313~331 aa 之间, 氨基酸同源性为 82.1%~100%; 基于 OmpH 氨基酸序列的系统发育树中鸡源菌株(荚膜 A 型)、猪源和牛源菌株(荚膜 B 型)分别在不同的分支。序列分析结果表明, *ompH* 基因序列差异与荚膜型之间存在相关性, 而与毒力大小无相关性。

[关键词] 多杀性巴氏杆菌; *ompH* 基因; 序列分析

Sequences Analysis on *ompH* Gene of *Pasteurella multocida* Isolated from Different Animals for Producing Vaccine

LI Wei-jie, WEI Cai-wen, QI Xiao-xin, TIAN Ye, JIANG Ying, JIANG Tao-zhen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: jiangtaozhen@ivdc.org.cn

Abstract: In order to understand the variation of outer membrane protein H gene, the *ompH* gene of 16 *P. multocida* strains were examined and analysed by PCR method. The results showed that the open reading frames of *ompH* gene were from 1002 to 1056 bp. The predicted mature proteins were composed of 313 to 331 amino acids except the signal peptide including 20 amino acid residues in N terminal. The alignment data indicated that the homology of amino acid were from 82.1% to 100%. The phylogenetic tree constructed by the OmpH protein showed that the strains isolated from avian (capsular type A), swine and cattle (capsular type B) were in different branches. The relationship were found between the sequence divergence of *ompH* gene and the capsular type, but not with the virulence.

Key words: *Pasteurella multocida*; *ompH* gene; sequence analysis

基金项目: 国家微生物资源平台(NIMR-5)

作者简介: 李伟杰, 副研究员, 从事兽医微生物与兽用生物制品研究。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: jiangtaozhen@ivdc.org.cn

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)是引起畜禽巴氏杆菌病的病原体,主要使动物发生出血性败血病或传染性肺炎,如牛出血性败血症、猪肺炎、禽霍乱、兔巴氏杆菌病、猪萎缩性鼻炎等^[1]。多杀性巴氏杆菌的外膜蛋白在病原与宿主的互作以及宿主对感染的免疫应答中扮演着重要的角色^[2]。其中 OmpH 是外膜蛋白的主要结构成分,同时也是主要的保护性抗原,属于跨膜非特异性孔蛋白,能诱导机体产生保护性免疫反应^[3]。Lee 将 *ompH* 基因在大肠杆菌 BL21 中进行表达,表达产物用 BALB/c 小鼠进行免疫保护试验,结果表明全长 OmpH 蛋白具有与全菌相当的保护率^[4]。本试验选择我国不同动物源的 16 株生产用多杀性巴氏杆菌的 *ompH* 基因作为研究对象,以期了解其在遗传进化上的关系,为开展基于 OmpH 蛋白的检测与研究新型高效疫苗提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株 多杀性巴氏杆菌 CVCC 428、1765、44401(猪源,荚膜 B 型), CVCC 44801、44802、44808、2082(鸡源,荚膜 A 型), CVCC 44502(黄牛源,荚膜 B 型), 44701、44702、44703(牦牛源,荚膜 B 型), CVCC 44601、44602、44603(水牛源,荚膜 B 型), CVCC 44501、44507(牛源,荚膜 B 型), 以上 16 株生产用菌株均由中国兽医微生物菌种保藏管理中心提供。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取 采用热裂解法^[5]提取细菌基因组 DNA,将冻干菌种用 TSB 肉汤溶解后,划线接种含 5% 马血清的 TSA 琼脂平皿, 37 ℃ 培养 24 h,挑取菌落加入 100 μL 无菌蒸馏水中,沸水浴 10 min,立即冰浴 5 min,12000 r/min 离心 1 min,取上清作为 DNA 扩增模板。

1.3 引物设计与合成 参照文献^[6]的报道,由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成多杀性巴氏杆菌 *ompH* 基因扩增的引物,预期的 PCR 产物包含了 *ompH* 基因完整的开放阅读框,引物信息见表 1。

表 1 引物信息

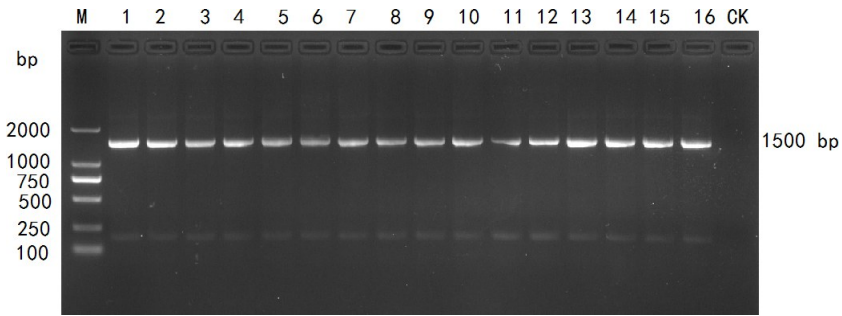
Table 1 The information of primers		
引物 Primers	序列(5'→3') Sequences	大小/bp Size
<i>ompH</i> -F	AAATATAAATAAAATTTGGGTGAAG	1500
<i>ompH</i> -R	GATCCATTCCTTGAACATATT	

1.4 PCR 反应体系及反应条件 PCR 反应体系: 10× Ex Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, *ompH*-F (10 μmol/L) 1 μL, *ompH*-R (10 μmol/L) 1 μL, 模板 2 μL, Ex Taq 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物测序由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成。

1.5 序列分析 应用 Mega7 软件和 Lasergene 7 软件中的 MegAlign 对菌株的 *ompH* 基因序列及其推导的氨基酸序列进行比对,分析各菌株之间的同源性及变异程度,并采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析信号肽。ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸的相对分子质量、等电点、稳定性指数等理化性质。用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白潜在的跨膜域。

2 结果与分析

2.1 多杀性巴氏杆菌外膜蛋白 H 基因的扩增及序列分析 应用特异性引物扩增多杀性巴氏杆菌外膜蛋白 H 基因,经电泳检测,16 株菌株均在 1.5 kb 处有 1 条电泳条带,结果与预期相符(图 1)。利用 Contig CExpress 软件进行序列拼接,然后提交到 GenBank 进行 BLAST 比对,结果发现 16 个菌株的 *ompH* 基因开放阅读框在 1002 bp~1056 bp 之间,其中 CVCC 44801、44802、44808、2082 为 1056 bp, CVCC 428、1765、44401、CVCC 44601、44602、44603、44501、44507 为 1008 bp, CVCC 44701、44702、44703、CVCC 44502 为 1002 bp。16 株菌株 *ompH* 基因核苷酸同源在 83.0%~100% 之间(图 2)。



M:DL2000 DNA Maker;1-16;CVCC 428,1765,44401,44801,44802,44808,2082,44502,44701,44702,44703,44601,44602,44603,44501,44507;CK:阴性对照

M:DL2000 DNA Maker;1-16;CVCC 428,1765,44401,44801,44802,44808,2082,44502,44701,44702,44703,44601,44602,44603,44501,44507;CK: Negative control

图 1 多杀性巴氏杆菌 *ompH* 基因 PCR 产物

Fig 1 PCR products of *ompH* gene of *P.multocida*

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	100.0	100.0	100.0	83.6	83.0	83.6	83.6	83.6	83.6	83.0	83.0	83.0	83.5	83.5	83.5	1	2082
	2	0.0	■	100.0	100.0	83.6	83.0	83.6	83.6	83.6	83.6	83.0	83.0	83.0	83.5	83.5	83.5	2	44801
	3	0.0	0.0	■	100.0	83.6	83.0	83.6	83.6	83.6	83.6	83.0	83.0	83.0	83.5	83.5	83.5	3	44802
	4	0.0	0.0	0.0	■	83.6	83.0	83.6	83.6	83.6	83.6	83.0	83.0	83.0	83.5	83.5	83.5	4	44808
	5	13.7	13.7	13.7	13.7	■	99.2	100.0	100.0	100.0	100.0	99.2	99.2	99.2	99.9	99.9	99.9	5	44501
	6	13.9	13.9	13.9	13.9	0.2	■	99.2	99.2	99.2	99.2	100.0	100.0	100.0	99.3	99.3	99.3	6	44502
	7	13.7	13.7	13.7	13.7	0.0	0.2	■	100.0	100.0	100.0	99.2	99.2	99.2	99.9	99.9	99.9	7	44507
	8	13.7	13.7	13.7	13.7	0.0	0.2	0.0	■	100.0	100.0	99.2	99.2	99.2	99.9	99.9	99.9	8	44601
	9	13.7	13.7	13.7	13.7	0.0	0.2	0.0	0.0	■	100.0	99.2	99.2	99.2	99.9	99.9	99.9	9	44602
	10	13.7	13.7	13.7	13.7	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	■	99.2	99.2	99.2	99.9	99.9	99.9	10	44603
	11	13.9	13.9	13.9	13.9	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	■	100.0	100.0	99.3	99.3	99.3	11	44701
	12	13.9	13.9	13.9	13.9	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	■	100.0	99.3	99.3	99.3	12	44702
	13	13.9	13.9	13.9	13.9	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	■	99.3	99.3	99.3	13	44703
	14	13.8	13.8	13.8	13.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	■	100.0	100.0	14	428
	15	13.8	13.8	13.8	13.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	■	100.0	15	1765
	16	13.8	13.8	13.8	13.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	■	16	44401
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

图 2 多杀性巴氏杆菌 *ompH* 基因同源性

Fig 2 Percent identity based on *ompH* gene of *P.multocida*

2.2 多杀性巴氏杆菌外膜蛋白 H 氨基酸的序列分析 16 株菌株根据 *ompH* 基因推导的氨基酸同源性在 82.1% ~ 100% 之间 (图 3), 比对结果发现 CVCC 44801、44802、44808、2082 (鸡源, 荚膜 A 型) 氨基酸序列完全相同, CVCC 428、1765、44401 (猪源, 荚膜 B 型) 氨基酸序列完全相同, CVCC 44601、44602、44603 (水牛源, 荚膜 B 型) 和 CVCC 44501、44507 (牛源, 荚膜 B 型) 氨基酸序列完全相同,

CVCC 44701、44702、44703 (牦牛源, 荚膜 B 型) 和 CVCC 44502 (黄牛源, 荚膜 B 型) 的氨基酸序列完全相同; 鸡源菌株的氨基酸序列与猪源、牛源菌株的氨基酸序列同源性相对较低, 在 82.1% ~ 83.2% 之间, 在系统发育树上形成一个单独的分支 (图 4); 猪源菌株间、牛源菌株间以及二者之间的氨基酸序列同源性较高, 均在 98% 以上, 在系统发育树上在同一分支 (图 4)。

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	100.0	100.0	100.0	83.2	82.1	83.2	83.2	83.2	82.1	82.1	82.1	82.1	82.9	82.9	82.9	1	2082
	2	0.0	■	100.0	100.0	83.2	82.1	83.2	83.2	83.2	83.2	82.1	82.1	82.1	82.9	82.9	82.9	2	44801
	3	0.0	0.0	■	100.0	83.2	82.1	83.2	83.2	83.2	83.2	82.1	82.1	82.1	82.9	82.9	82.9	3	44802
	4	0.0	0.0	0.0	■	83.2	82.1	83.2	83.2	83.2	83.2	82.1	82.1	82.1	82.9	82.9	82.9	4	44808
	5	19.1	19.1	19.1	19.1	■	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	98.9	98.9	99.7	99.7	99.7	5	44501
	6	20.6	20.6	20.6	20.6	1.1	■	98.9	98.9	98.9	98.9	100.0	100.0	100.0	99.1	99.1	99.1	6	44502
	7	19.1	19.1	19.1	19.1	0.0	1.1	■	100.0	100.0	100.0	98.9	98.9	98.9	99.7	99.7	99.7	7	44507
	8	19.1	19.1	19.1	19.1	0.0	1.1	0.0	■	100.0	100.0	98.9	98.9	98.9	99.7	99.7	99.7	8	44601
	9	19.1	19.1	19.1	19.1	0.0	1.1	0.0	0.0	■	100.0	98.9	98.9	98.9	99.7	99.7	99.7	9	44602
	10	19.1	19.1	19.1	19.1	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	■	98.9	98.9	98.9	99.7	99.7	99.7	10	44603
	11	20.6	20.6	20.6	20.6	1.1	0.0	1.1	1.1	1.1	1.1	■	100.0	100.0	99.1	99.1	99.1	11	44701
	12	20.6	20.6	20.6	20.6	1.1	0.0	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	■	100.0	99.1	99.1	99.1	12	44702
	13	20.6	20.6	20.6	20.6	1.1	0.0	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	■	99.1	99.1	99.1	13	44703
	14	19.5	19.5	19.5	19.5	0.3	0.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.9	0.9	■	100.0	100.0	14	428
	15	19.5	19.5	19.5	19.5	0.3	0.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.9	0.9	0.0	■	100.0	15	1765
	16	19.5	19.5	19.5	19.5	0.3	0.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.9	0.9	0.0	0.0	■	16	44401
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

图 3 多杀性巴氏杆菌 OmpH 蛋白同源性

Fig 3 Percent identity based on OmpH protein of *P.multocida*

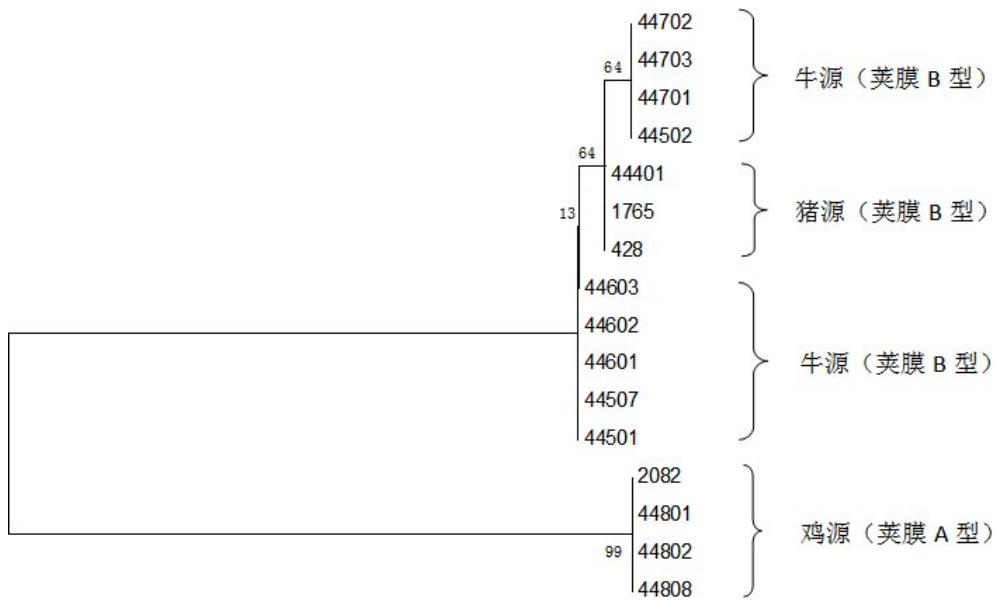


图 4 多杀性巴氏杆菌 OmpH 蛋白系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree based on amino acid of the OmpH protein of *P.multocida*

SignalP 4.1 预测结果发现,16 株菌株的信号肽均为 N 端 20 个氨基酸残基,且序列完全相同,因此推断菌株的成熟蛋白氨基酸残基数量分别为 313、315 和 331。利用 ProtParam 软件对 OmpH 蛋白进行分析,结果显示成熟蛋白理论分子质量在 33.79~36.46 ku 之间,且鸡源(荚膜 A 型)菌株蛋白的分子质量较大;等电点为 6.55~9.12,不稳定系数

为 12.94~14.94,说明蛋白较稳定。TMHMM Server v. 2.0 没有发现潜在的跨膜区域。对鸡源(荚膜 A 型)、猪源(荚膜 B 型)和牛源(荚膜 B 型)菌株的 OmpH 成熟蛋白的氨基酸进行比对分析发现存在缺失和变异,蛋白长度有所差异,在 70~80 和 200~210 处氨基酸属于高变区(图 5)。

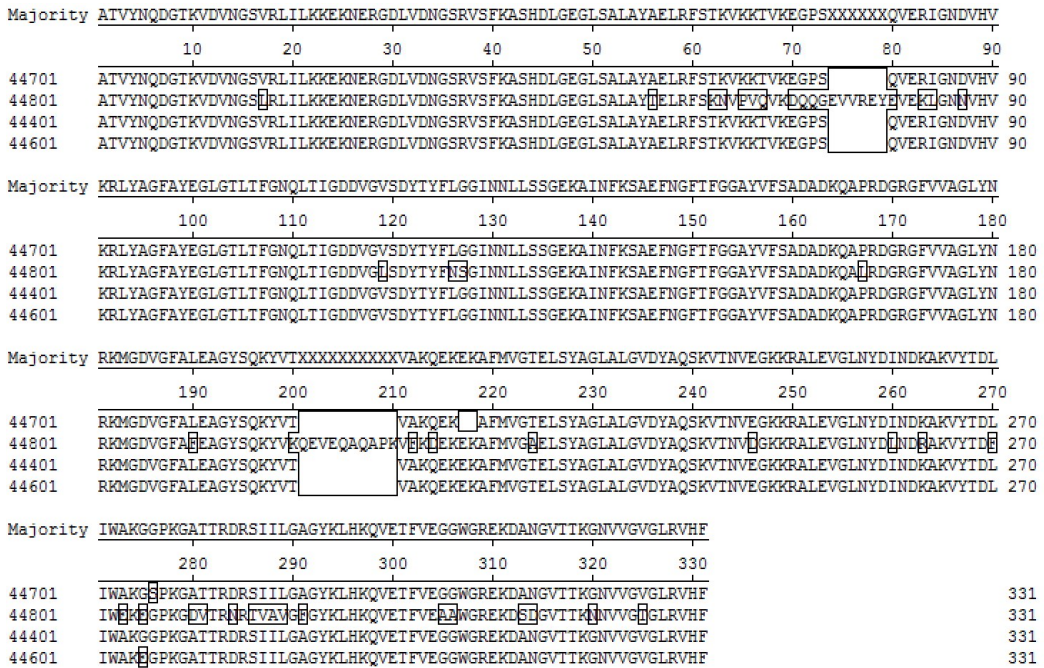


图 5 多杀性巴氏杆菌 OmpH 成熟蛋白氨基酸序列

Fig 5 Sequence alignment of OmpH mature protein of *P. multocida*

3 讨论

已有的研究表明, OmpH 蛋白是致病因子, 在对宿主的感染与致病过程中发挥重要的作用^[7-8]。同时 OmpH 蛋白研究表明也是一种主要的保护性抗原, Tan 在大肠杆菌 M15 中对多杀性巴氏杆菌 1710 的 *ompH* 基因进行克隆和表达, BALB/c 小鼠保护试验表明腹腔免疫、攻毒, 保护率为 100%, 皮下免疫、腹腔攻毒, 保护率为 80%^[9]; 恩特马克·布拉提白对 CVCC458 的 *ompH* 基因进行克隆和表达, 结果显示免疫组小鼠对同源菌株和异源菌株的保护率分别为 100% 和 80%^[10]。基于 *ompH* 基因非常稳定地存在于不同荚膜型的多杀性巴氏杆菌的基因组中, 因此有望成为一种对所有荚膜型产生保护的候选抗原。

本试验对 16 株生产用多杀性巴氏杆菌的 *ompH* 基因进行扩增和序列分析发现, 不同动物源、不同荚膜型的多杀性巴氏杆菌的 *ompH* 基因大小存在差异, 鸡源菌株 (荚膜 A 型) 较猪源、牛源菌株 (荚膜 B 型) 的 *ompH* 基因多 48~54 个碱基; 但不同动物源、不同荚膜型的多杀性巴氏杆菌 *ompH* 基因

推导的氨基酸同源性较高, 在 82.1%~100% 之间。以上结果提示 OmpH 作为亚单位疫苗使用可能提供同源和异源保护, 但还有待于进一步研究。试验中还发现荚膜 A 型与荚膜 B 型菌株在基于 OmpH 蛋白氨基酸序列构建的系统发育树中位于不同的分支, 说明两者之间存在相关性; 分离自猪源的 3 株不同毒力的多杀性巴氏杆菌中, 弱毒株 CVCC 1765、CVCC 428 和强毒株 CVCC 44401, 尽管毒力相差很大, 但它们之间 *ompH* 基因同源性为 100%, 说明 *ompH* 基因与毒力大小无相关性。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2012.

Lu C P. Veterinary microbiology[J]. The fifth edition. Beijing: China Agriculture Press, 2012.

[2] Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce J D, et al. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(1/2):1-17.

[3] Luo Y, Glisson J R, Jackwood M W, et al. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of

- Pasteurella multocida* X-73[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(24): 7856-7864.
- [4] Lee J, Kim Y B, Kwon M. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*[J]. Journal of Microbiology, 2007, 45(2): 179-184.
- [5] 李伟杰, 田野, 岂晓鑫, 等. 禽源多杀性巴氏杆菌多位点序列分型研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 1-6.
- Li W J, Tian Y, Qi X X, et al. Multi-locus sequence typing of *Pasteurella multocida* isolated from avian[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(2): 1-6.
- [6] 李伟杰, 魏财文, 田野, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌荚膜分型及外膜蛋白 H 基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(1): 0032-0037.
- Li W J, Wei C W, Tian Y, et al. Capsular typing and sequences analysis of the *ompH* gene of *Pasteurella multocida* from swine [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(1): 0032-0037.
- [7] Khamesipour F, Momtaz H, Azhdary Mamoreh M. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran[J]. Front Microbio, 2014, 5: 536.
- [8] 韦东, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 段世雄, 等. 禽多杀性巴氏杆菌 C48-3 株外膜蛋白 H 的致病作用[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(6): 31-39.
- Wei D, Wulumuhan N, Duan S X, et al. Role of outer membrane protein in the pathogenesis of avian *Pasteurella multocida* strain C48-3[J]. China Biotechnology, 2014, 34(6): 31-39.
- [9] Tan H Y, Nagoor N H, Sekaran S D. Cloning, expression and protective capacity of 37 kDa outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* serotype B : 2 [J]. Tropical Biomedicine, 2010, 27(3): 430-441.
- [10] 恩特马克·布拉提白, 彭清忠, 严芳, 等. 禽多杀性巴氏杆菌粘附蛋白 Cp39 的交叉免疫保护作用[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 360-366.
- Entomack B, Peng Q Z, Yan F, et al. Cross-protective effect of the Cp39 adhesive proteins against avian *Pasteurella multocida* in mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 360-366.

(编辑: 李文平)