

鸭疫里氏杆菌吉林分离株 16S rRNA 系统分析及其 OmpA 基因克隆

高云航¹, 刘佳丽¹, 王巍¹, 徐凤宇¹, 张福君², 马红霞^{1*}

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118; 2. 吉林正方农牧股份有限公司, 吉林梅河 135000)

[收稿日期] 2013-01-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0009-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究鸭疫里氏杆菌(RA) 16S rRNA 变异与 OmpA 基因之间的关系, 提取了 RA 吉林分离株 JL-RA1 和 JL-RA3 总 DNA, 并设计特异性引物扩增两株 RA 保护性抗原 OmpA 全基因序列。结果显示, 扩增出的 16S rRNA 序列大小均为 1478 bp, OmpA 片段序列大小均为 1164 bp, 与预期结果一致。扩增的 16S rRNA 与 GenBank 中已知的 RA 16S rRNA 序列同源性高达 99.0% ~ 99.9%, 扩增的 OmpA 序列与 GenBank 中已知的 RA OmpA 序列同源性达 93.3% ~ 100%, 编码蛋白质的氨基酸序列同源性为 96% ~ 100%。

[关键词] 鸭疫里氏杆菌; 16S rRNA 基因; OmpA 基因; 系统进化分析

Systematic Analysis of 16S rRNA and Cloning of OmpA Gene of the *Riemerella anatipestifer* Isolated from Jilin

GAO Yun-hang¹, LIU Jia-li¹, WANG Wei¹, XU Feng-yu¹, ZHANG Fu-jun², MA Hong-xia^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Jilin Zhengfang Agriculture and Animal Husbandry Co. Ltd, Meihe, Jilin 135000, China)

Abstract: For future study of the relationship between the variation of 16S rRNA with the OmpA gene of *Riemerella anatipestifer* (RA), the total DNA of the RA that were isolated from Jilin which named JL-RA1 and JL-RA3 was extracted, the 16S rRNA sequence was amplified by bacterial universal primers, and both of the RA protective antigen OmpA gene were amplified by the specific primers. Results showed that the 16S rRNA sequences were 1478 bp, and the OmpA sequences were 1164 bp. The homology of the RA 16S rRNA sequences with those in GenBank was from 99.0% to 99.9%, the homology of OmpA sequences was from 93.3% to 100%, and the homology of amino acid sequence that encoding proteins was from 96% to 100%.

Key words: *Riemerella anatipestifer*; 16S rRNA gene; OmpA gene; phylogenetic analysis

鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种能够引起家鸭、鹅、火鸡等禽类高发病率和高死亡率的传染性疾病^[1-2]。该病雏鸭较为敏感,对养鸭业造成严重经济损失^[3-4]。OmpA 蛋白族是革

兰氏阴性菌外膜中的主要成分,其主要作用是维持外膜的完整。缺少 OmpA 和胞壁脂蛋白的细菌变异株其形态为球形,细胞膜也不稳定^[5]。众多试验研究证明,提纯的外膜蛋白和表达的外膜蛋白具有

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20110221); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-43)

作者简介: 高云航, 副教授, 从事动物疾病防控研究。

通讯作者: 马红霞。E-mail: hongxia0731001@yahoo.com.cn

良好的抗原性^[6],能刺激机体产生细胞免疫和体液免疫。OmpA 是各血清型 RA 所共有的外膜蛋白,具有种内相对保守性,但在不同的血清型之间存在着差异。曾有研究认为这种差异不足以影响蛋白质的抗原特性,因此可以作为保护多种血清型 RA 的亚单位疫苗的候选^[7]。而 16S rRNA 在原核生物的细胞中普遍存在^[8],其在常见细菌的鉴别中发挥着不可忽视的作用。另外,16S rRNA 在鉴别难于区分的细菌、生长速度缓慢的分支杆菌及微环境中广泛存在的细菌等方面均具有十分重要的意义^[9]。

因此,本文对从吉林省某鸭场分离出的两株 RA,对其 16S rRNA 基因的序列进行系统进化分析,设计特异性引物 PCR 扩增出两株菌各自 OmpA 基因进行了序列测定与分析,以寻求 RA 16S rRNA 变异与 OmpA 基因之间的关系,为进一步研究 RA 的变异及其亚单位疫苗提供一定参考依据。

1 材料

1.1 菌种 RA 吉林分离株 JL-RA1、JL-RA3,本实验室分离并保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,北京全式金生物公司。

1.2 主要分子生物学试剂 EB、Amp,北京鼎国生物工程有限公司;ExTaq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、DNA Marker、dNTP、pMD-18T Simple Vector、限制性内切酶,日本 TaKaRa 公司;质粒小提试剂盒,天根生物公司;胶回收试剂盒,杭州维特洁生化技术有限公司。

1.3 引物设计 RA 16S rRNA 基因序列的扩增采用细菌 16S 通用引物^[10]:

TY-P1:5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3';

TY-P2:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。

根据已发表的不同血清型 RA 的 OmpA 全基因组序列(JQ083167、JN871507、JN871505 等)利用 DNASTar 软件进行对比分析,并根据其保守区域设计特异性引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成:

OmpA-P3:5'-GCCATGGRYAARGAATTTATG-3';

OmpA-P4:5'-GCGTTATTTTCTTTTCTTTTTFAC-3'。

2 方法

2.1 RA 基因组总 DNA 提取 用碱裂解法^[11]提取分离株 JL-RA1、JL-RA3 基因组总 DNA。

2.2 分离株 16S rRNA 序列扩增与测定

2.2.1 分离株 16S rRNA 序列扩增 PCR 反应体

系:模板总 DNA 0.5 μ L, TY-P1 0.5 μ L, TY-P2 0.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs Mixture 2.0 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 18.7 μ L, 总体积 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

2.2.2 分离株 16S rRNA 序列测定与分析 将两株菌 16S rRNA PCR 产物均送往上海生工生物科技公司进行双向测序。测序结果利用 NCBI BLAST 软件于 GenBank 中同源性较高的菌株序列进行比对分析,选取 RA 各血清型代表菌株及高同源性菌株,并用 DNASTar 中 Meg Align 软件分析构建系统进化树,确定该菌株的分类学地位。

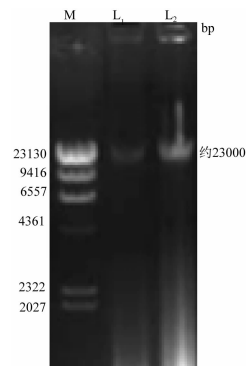
2.3 分离株 OmpA 序列扩增与测定

2.3.1 分离株 OmpA 序列扩增 PCR 反应体系:模板总 DNA 0.5 μ L, OmpA-P3 0.5 μ L, OmpA-P4 0.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs Mixture 2.0 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 18.7 μ L, 总体积 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 51 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

2.3.2 分离株 OmpA 序列测定与分析 将两株菌 OmpA PCR 产物均送往上海生工生物科技公司测序。测序结果利用 NCBI BLAST 软件于 GenBank 中同源性较高的菌株序列进行比对分析,并用 DNASTar 中 MegAlign 软件分析构建系统进化树,确定该菌株的分类学地位。

3 结果

3.1 分离株总 DNA 的提取结果 由图 1 电泳结果可知,两株分离株 JL-RA1、JL-RA3 总 DNA,其核苷酸片段大小约为 23000 bp,与预期结果相符。



L₁:JL-RA1 总 DNA;L₂:JL-RA3;M:DNA 分子质量标准(λ Hind III)

图 1 RA 总 DNA 电泳结果

3.2 分离株 16S rRNA 序列扩增结果与分析

3.2.1 分离株 16S rRNA 序列扩增结果 两株分离株 JL-RA1 和 JL-RA3 16S rRNA 序列扩增结果见图 2,得到约为 1478 bp 的核苷酸片段,其片段大小与预期结果相符。

3.2.2 分离株 16S rRNA 序列测定结果与同源性分析 JL-RA1、JL-RA3 16S rRNA PCR 扩增产物的测得序列大小均为 1478bp,并将测序结果登陆到 GenBank 中,获得登录号分别为 HQ392516 和 HQ707076(登录序列为已去掉引物部分)。JL-RA1、JL-RA3 16S 与 GenBank 中已知的 RA16S rRNA 序列相似性较高(图 3)。鸭疫里默氏杆菌分离株系统进化分析结果如图 4 所示。

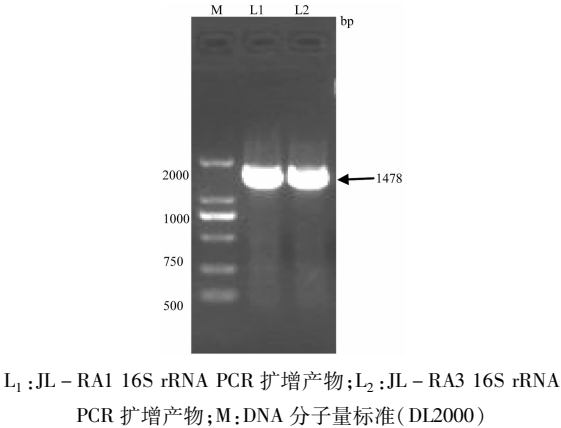
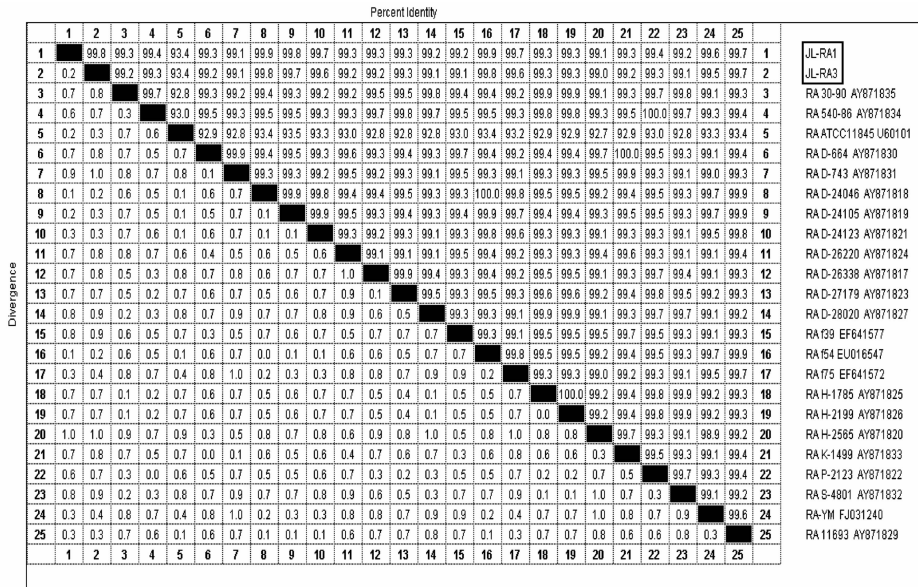


图 2 16S rRNA PCR 扩增结果



注:方框内为分离菌株 JL-RA1、JL-RA3 16S rRNA 序列。序号 1~25 对应的菌株基因的登录号为 HQ392516、HQ707076、AY871835、AY871834、U60101、AY871830、AY871831、AY871818、AY871819、AY871821、AY871824、AY871817、AY871823、AY871827、EF641577、EU016547、EF641572、AY871825、AY871826、AY871820、AY871833、AY871822、AY871833、FJ031240、AY871829

图 3 分离株 JL-RA1、JL-RA3 16S rRNA 矩形图

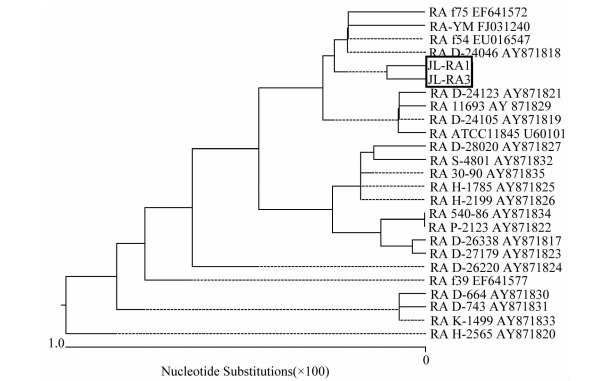
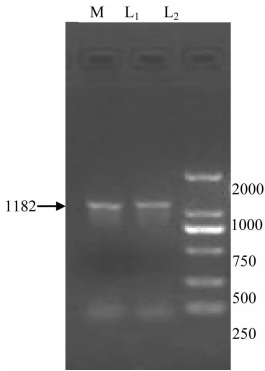


图 4 分离株 JL-RA1、JL-RA3 16S rRNA 系统进化树

3.3 分离株 OmpA PCR 序列扩增结果与分析

3.3.1 分离株 OmpA 序列扩增结果 JL-RA1、JL-RA3 OmpA 基因 PCR 扩增结果显示,仅有一条目的条带,大小约为 1182 bp,PCR 扩增产物大小与预计目的片段大小相符,见图 5。

3.3.2 分离株 JL-RA1 OmpA 序列测定及同源性分析 将 JL-RA1、JL-RA3 OmpA 基因 PCR 产物测得序列大小为 1182 bp,并将测序结果登陆到 GenBank 中,获得登录号分别为 HQ707077 和 HQ707078。



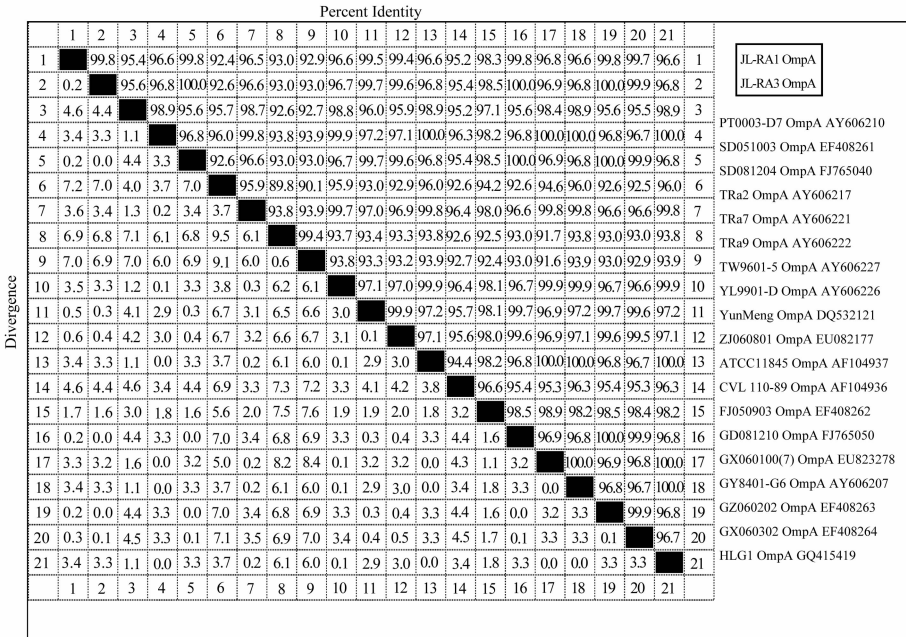
M: DNA 分子量标准 (DL2000); L₁: JL - RA1 OmpA PCR 扩增产物;
L₂: JL - RA3 OmpA PCR 扩增产物

图 5 JL - RA1 OmpA、JL - RA3 OmpA 扩增结果

JL - RA1 和 JL - RA3 OmpA 测得长度为 1164 个核苷酸的序列组成的 ORF, 编码 387 个氨基酸组成的蛋白质, 起始密码子均为 ATG, 终止密码子均为 TAA, 其核苷酸序列非常保守。利用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的鸭疫里默氏杆菌 OmpA 序列进行同源性对比, JL - RA1、JL - RA3 与已报道的鸭疫里默氏杆菌株 OmpA 基因序列相似性较高 (图 6)。鸭疫里默氏杆菌分离株 OmpA 系统进化分析表明结果如图 7 所示。

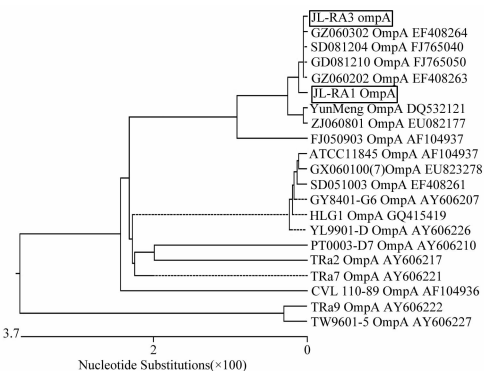
4 讨论

细菌的 16S rRNA 基因分子结构是保守区和特异性区域交替出现, 因此针对保守区设计细菌通用



注: 方框内为分离菌株 JL - RA1、JL - RA3 OmpA 序列。序号 1 ~ 21 对应的菌株基因的登录号为 HQ707077、HQ707078、AY606210、EF408261、FJ765040、AY606217、AY606221、AY606222、AY606227、AY606226、DQ532121、EU082177、AF104937、AF104936、EF408262、FJ765050、EU823278、AY606207、EF408263、EF408264、GQ415419

图 6 分离株 JL - RA1 OmpA 矩形图



注: 方框内为分离菌株 JL - RA1、JL - RA3 OmpA 序列
图 7 分离株 JL - RA1 OmpA 系统进化树

引物, 将所得的序列与 GenBank 中已知序列比对, 此方法常用于对细菌的种属鉴定^[12], 比常规细菌生化鉴定更准确快速。李永峰等^[13] 根据 Matsuki 的研究, 认为 16S rRNA 序列的同源性大于 97% 便可认为是同一种细菌。本试验分离株 JL - RA1、JL - RA3 与 RA 标准株 ATCC11845 (登录号 U60101) 序列同源性高达 99.6% 和 99.5%, 进一步说明两株分离株均为 RA。这种方法可以更加快捷准确的确定细菌的种属及其分类地位。程龙飞等^[14] 对 29 株 1 型和 2 型 RA 16S rRNA 和 16S - 23S rRNA 间隔区的核苷酸序列, 亲缘关系比较以

及针对各菌灭活苗进行交叉攻菌保护试验,证明 2 型 RA 菌株中的 RA fl1 并不处在 2 型菌株的分支中,与 1 型菌株非常接近,其对 1 型菌株的攻击可产生较高的交叉保护率达 53.8%。本试验分离株属于 RA 1 型,但与 RA 2 型较 1 型更近,推测分离株 JL-RA1 和 JL-RA3 是否具有 1 型和 2 型的交叉保护力,将对此进行进一步验证。

OmpA 是革兰氏阴性菌外膜的主要组成成分,具有免疫原性和相对保守性,不仅可激发机体产生体液免疫,而且还可引起细胞免疫,常被用于试剂疫苗的研究,如多杀性巴氏杆菌、流感嗜血杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌等的外膜蛋白,展现出良好的应用前景^[15-16]。目前,已有不少学者对 RA 的表面免疫蛋白进行了研究,并认为 OmpA 基因是所有血清型的 RA 所共有的结构基因,尽管其机理尚未完全清楚,但周祖涛^[17]等用 PCR 方法扩增了血清 1 型 RA-YM 株的主要外膜蛋白 OmpA 基因,并构建了原核表达载体 pKG-OmpA,在大肠杆菌中进行了高效表达,融合蛋白大小约为 68 kD,Western-blot 结果表明该表达蛋白具有良好的免疫原性。本研究成功的扩增了 JL-RA1 和 JL-RA3 的 OmpA 基因,与 GenBank 中已报道的 RA OmpA(1 型)的序列同源性较高。从 JL-RA1 16S 和 OmpA 系统进化分析可以看出,该分离株 16S 和 OmpA 均与血清型 1 型亲缘关系较近,与本试验结果一致。

本试验两株分离株 JL-RA1、JL-RA3 分离自同一发病养鸭场,JL-RA1 为该鸭场初次发病时分离得到,病情得以控制后,再次发病时分离得到 JL-RA3,与 RA 易反复爆发形成地方性疾病这一特征相符^[18]。两株菌从 16S rRNA 基因和 OmpA 基因同源性均为 99.8%,由此可以看出,RA 的 16S rRNA 基因和 OmpA 保护性基因有微小变异,但其毒力基因是否发生变异,需进行进一步验证。

参考文献:

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社. 400-401.
- [2] 李春业. 鸭疫里氏杆菌病原的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(9):95-97.

- [3] 黄承洪,李继祥,黄伟,等. 重庆和四川地区鸭疫里默氏杆菌流行动态研究[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(1):67-70.
- [4] [美]B. W. 卡尔尼松. 禽病学[M]. 高福,刘大军,主译. 第9版. 北京:中国农业出版社,1998:195-200.
- [5] Weiser J N, Gotschlich E C. Outer membrane protein A(ompA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* k-1[J]. Infect Immune, 1991,59(7):2252-2258.
- [6] 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.
- [7] Sumathi Subramaniam, Huang B, Loh H, et al. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*[J]. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 2000,7(2):168-174.
- [8] 周琳,张杰. 群落分析中的 16S rRNA 及其基因 16S rDNA 优化扩增[J]. 微生物学报,2010,50(1):7-14.
- [9] 杨霞,陈陆,王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(2):55-60.
- [10] 汪春蕾. 具细菌漆酶活性的芽孢外壁蛋白 CotA 基因克隆及异源表达研究[D]. 黑龙江:东北林业大学,2011.
- [11] 李淑梅,汪铭书,程安春,等. 鸭沙门氏菌的随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 中国兽医科技,2004,34(4):40-44.
- [12] 陈泽祥,潘艳,谢永平,等. 鸭疫里氏杆菌广西分离株 16SrRNA 基因序列的测定和系统进化分析[J]. 广西农业科学,2007,38(2):205-208.
- [13] 李永峰,任南琪,杨传平,等. 16S rDNA 测序快速鉴定废水生物处理系统目标细菌[J]. 哈尔滨工程大学学报,2005,26(6):806-810.
- [14] 程龙飞,傅光华,彭春香,等. 1 型和 2 型鸭疫里默氏菌的交叉保护[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2009,38(5):521-525.
- [15] Cheema P S, Srivastava S K, Chaudhuri P, et al. Cloning and sequencing of a 21kDa outer membrane protein gene of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV[J]. Vet Res Commun,2007,31(5):521-527.
- [16] Gebriel A M, Subramaniam G, Sekaran S D. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens[J]. Trop Biomed, 2006,23(2):194-207.
- [17] 周祖涛,陈芬芬,李自力,等. 鸭疫里默氏杆菌 OmpA 基因的克隆与表达[J]. 中国兽医学报,2008,28(1):20-23.
- [18] 刘佳丽. 鸭疫里默氏杆菌 OmpA 与鸭 IL-2 融合基因的克隆与原核表达[D]. 吉林:吉林农业大学,2011.

(责任编辑:李文平)