中国科学: 生命科学 2010 年 第 40 卷 第 6 期: 522 ~ 532
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的结构特征及其与毒力的联系

赵倩[①], 汤承[①], 杨发龙[①], 邵国青[②], 岳华[①*]

① 西南民族大学生命科学与技术学院, 动物医学四川省高校重点实验室, 成都 610041;
② 江苏省农业科学研究院, 南京 210014
* 联系人, E-mail: yhua900@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-09; 接受日期: 2010-05-12
国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD06A08)资助项目

摘要 副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因存在两种结构类型, 但其生物学意义人们还不清楚. 本实验旨在进一步分析副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的结构特征并研究其与毒力的联系. 测序结果表明, 与参考菌株血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型相比, 19 株临床分离株及血清型 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 的参考菌株的 *ompP2* 基因存在两处连续碱基缺失, 分别位于 450~524 和 770~844 bp 范围内, 共计 100 bp 左右, 对 81 株临床分离株的 PCR 检测进一步证实此结果. 序列分析发现, 由于碱基的连续缺失导致 *ompP2* 基因表面暴露环减少一个, 但却使暴露于膜外的抗原决定簇个数增加, 并且临床分离株和所有毒力参考菌株中均有一个相同的、无毒菌株所没有的膜表面抗原决定簇 VTDQ(K)ALGVGL, 提示暴露于膜外的抗原决定簇可能与毒力相关. 构建两种基因结构类型的真核表达载体转染 Marc145 细胞, 结果显示碱基缺失的血清 5 型 *ompP2* 基因编码蛋白的细胞毒性显著强于血清 11 型, 首次证明 *ompP2* 基因结构特征与毒力的关系.

关键词
副猪嗜血杆菌
ompP2 基因
结构特征
碱基缺失
细胞毒性

副猪嗜血杆菌病给全球养猪业造成了巨大的损失, 其病原为巴斯德菌科嗜血杆菌属的副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)[1]. 副猪嗜血杆菌除已定型的 15 个血清型外, 还存在相当一部分不能定型的菌株[2,3], 各血清型之间的致病力存在极大的差异. 一般认为, 血清 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14 和 15 型为毒力血清型, 而血清 3, 6, 7, 9 和 11 型为非毒力血清型[4,5]. 由于副猪嗜血杆菌存在血清型复杂、各血清型间交叉保护性差等特点, 给副猪嗜血杆菌病的血清学诊断和防治带来了困难[6].

虽然副猪嗜血杆菌的基因组已经公布(GenBank: Acc. CP001321, ABKM00000000[7,8]), 但是关于副猪嗜血杆菌的毒力因子目前还知之甚少[7,8]. Ruiz 等人[9]比较了健康猪鼻腔中和副猪嗜血杆菌病猪中分离的副猪嗜血杆菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图, 推测一个 36.6~38.5 kD 范围内的外膜蛋白可能与毒力存在联系, 但未对编码该蛋白的基因及该蛋白的特性做进一步研究. 对副猪嗜血杆菌基因组序列分析发现, 只有 *ompP2* 和 *ompP5* 基因编码的外膜蛋白 P2 和 P5 的大小正好在此范围内. 对副猪嗜血杆菌 *ompP5* 基因结构特点的研究表明, 该基因编码的蛋白分子量虽然在不同菌株间可能存在一定差异, 但这种差异却

引用格式: 赵倩, 汤承, 杨发龙, 等. 副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的结构特征及其与毒力的联系. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: 522—532, doi: 10.1360/052010-230

不足以造成在 SDS-PAGE 上的明显变化, 同时也没有发现该蛋白与副猪嗜血杆菌的毒力存在联系[10,11]. 因此, 外膜蛋白 P2 更可能是 Ruiz 等人[9]推测的毒力因子. Mullins 等人[7]对副猪嗜血杆菌的 15 个血清型的参考菌株和 20 株田间分离株的 *ompP2* 基因结构的分析发现, 该基因在副猪嗜血杆菌中具有丰富的遗传多样性且可以分为两种结构类型, 即以参考菌株 29755 为参照, 血清 1, 3, 4, 6, 8, 11 型的 *ompP2* 基因存在连续的碱基插入, 但对于 *ompP2* 基因结构变化的生物学意义并不清楚. 与副猪嗜血杆菌同属的流感嗜血杆菌的 P2 蛋白是含量最为丰富的外膜蛋白, 是流感嗜血杆菌的一个毒力因子[12], 也是杀菌性抗体的主要结合位点[13~16], 在感染和刺激机体产生免疫应答的过程中发挥着重要的作用[17]. 流感嗜血杆菌的 *ompP2* 基因具有丰富的遗传多样性, 主要表现为碱基的插入和缺失, 导致其编码的 P2 蛋白表面暴露环区域氨基酸的突变[18,19], 使得杀菌性抗体不能和 P2 蛋白结合从而逃避机体的免疫杀灭[20]. 但副猪嗜血杆菌的 *ompP2* 基因是否与流感嗜血杆菌的 *ompP2* 基因同样是一个毒力因子, 有待进一步研究.

本实验旨在进一步对副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的结构特点进行分析, 并比较两种结构特点的 *ompP2* 基因对 Marc145 细胞的毒性.

1 材料与方法

1.1 菌株及细胞

本研究使用的 96 株副猪嗜血杆菌, 包括 15 株参考菌株(*H. parasuis* 参考血清型 1~15: HS82, HS83, HS81, SW124, Nagasaki, HS1072, HS197, HS1065, HS50, HS1076, HS1077, HS1075, HS1079, HS1080, HS1081, 由澳大利亚昆士兰动物研究所惠赠)和 81 株临床分离株. 临床分离株均分离自副猪嗜血杆菌病临床病例(以纤维素性浆膜炎和多发性关节炎为突出病变)的心包积液、心血、脑、胸腔积液、肺、关节、颌下淋巴结等, 其中血清 4 型 7 株、5 型 22 株、12 型 3 株、13 型 11 株、14 型 12 株、未定型 26 株, 由西南民族大学预防兽医实验室分离保存. 所有分离株均用 Oliveira 等人[21]的 PCR 方法鉴定, 并用 Tadjine 等人[22]的间接血凝实验进行血清分型.

Marc145 细胞和大肠杆菌 JM109 感受态细胞由西南民族大学预防兽医实验室保存.

1.2 副猪嗜血杆菌的培养及 DNA 的提取

副猪嗜血杆菌的参考菌株和临床分离株均培养于预先加入 5%小牛血清和 0.02%NAD 的 TSA 培养基中, 置于 37℃, 5%CO_2 培养箱中培养 16 h. 采用酚-氯仿法提取 DNA, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间, 调整核酸浓度为 100 ng/μL, –20℃保存备用.

1.3 *ompP2* 基因的克隆

为了获得完整的 *ompP2* 基因的完整可读框(ORF), 根据 *H. parasuis* 29755(ACC. ABKM 00000000)设计了一对可以扩增大约 1200 bp 片段(包含 *omp*P2 基因的完整可读框)的引物, 对 15 株参考菌株和 19 株临床分离株 *ompP2* 基因克隆. 正向引物 F1 (5′-GGCAGATATGGATCGGTTAC-3′)、反向引物 R1 (5′-AAGTACTCGCTAAAGCAGAA-3′), 由上海 Invitrogen 公司合成. PCR 总反应体系为 25 μL, *Taq* 酶: 0.25 μL; $MgCl_2$ 缓冲液: 2.5 μL; $MgCl_2$: 2.5 μL ; dNTP: 2 μL; F1: 1 μL; R1: 1 μL; ddH_2O: 13.75 μL; DNA 模板 2 μL. 94℃, 预变性 3 min, 35 个循环, 94℃变性 40 s, 51℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min 20 s, 72℃终延伸 10 min, 16℃终止反应, PCR 产物于 1%的琼脂糖凝胶电泳. 产物回收后, 按照 pMD18-T vector(大连宝生物有限公司, TaKaRa Code: D101A)连接试剂盒说明书进行连接、克隆, 挑取阳性克隆送上海英骏公司测序.

1.4 *ompP2* 基因的序列分析

基因序列用 DNA Star Lasergene 软件分析同源性, MEGA 4.1 软件并用邻近法(NJ 法)建立系统进化树, 采用自举分析(bootstraps)进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次. 使用 PRED-TMBB 软件(http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/)分析蛋白的结构, 用 http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl 预测其抗原性和抗原决定簇.

1.5 PCR 检测临床分离株 *ompP2* 基因连续碱基缺失的分布频率

根据副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因表现出的两种类型的结构特点, 以参考菌株血清 5(Nagasaki)和 8(HS1065)型 *ompP2* 基因为模板设计一对引物, 检查临床分离株中连续碱基缺失现象的频率, 正向引物 F2 (5′-GTAATCGGTGATAGCATTGG-3′)、反向引物 R2 (5′-GTTTCCATACACGCCAGATT-3′). 由上海 Invitrogen

公司合成. 该引物对血清5型参考菌株*ompP2*基因的扩增区域为369~897 bp, 在血清8型参考菌株的扩增区域为369~1014 bp. 81株来自实质器官的临床分离株和15个血清型参考菌株用于检测. PCR总反应体系为25 μL, *Taq*酶: 0.25 μL; $MgCl_2$缓冲液: 2.5 μL; $MgCl_2$: 1.5 μL; dNTP: 2 μL; F2: 1 μL; R2: 1 μL; ddH_2O: 14.75 μL; DNA模板2 μL. 94℃, 预变性3 min, 35个循环, 94℃变性30 s, 51℃退火40 min, 72℃延伸50 s, 72℃终延伸10 min, 16℃终止反应, PCR产物于1%的琼脂糖凝胶电泳. 随即抽取电泳条带不同的菌株各10株, 将其PCR产物回收后, 按照pMD18-T vector (大连宝生物有限公司, TaKaRa Code: D101A)连接试剂盒说明书进行连接、克隆, 挑取阳性克隆送上海英骏公司测序.

1.6 比较两种结构类型的 *ompP2* 基因对 Marc145 细胞的细胞毒性

鉴于副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因存在两种结构类型, 本实验选取血清 5(Nagasaki)型参考菌株 *ompP2* 基因作为碱基缺失类型的代表, 而血清 11(HS1077)型参考菌株 *ompP2* 基因作为非缺失型代表, 比较两种结构类型的 *ompP2* 基因编码的蛋白对 Marc145 细胞的毒性.

(1) 副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因真核表达载体的构建及鉴定. 用带有酶切位点的引物扩增血清5, 11型的*ompP2*基因. 正向引物F3为5′-CGCGGATCCATGAAAAAAACACTAGTAG-3′; 反向引物R3为5′-CCGCTCGAGTTACCATAATACACGTAAAC-3′; 正向引物含有 *Bam*HⅠ酶切位点, 反向引物含有 *Xho*Ⅰ酶切位点, 均由上海 Invitrogen 公司合成. PCR总反应体系为25 μL, *Taq*酶: 0.25 μL; $MgCl_2$缓冲液: 2.5 μL; $MgCl_2$: 1.5 μL; dNTP: 2 μL; 引物F: 1 μL; 引物R: 1 μL; ddH_2O: 14.75 μL; DNA模板2 μL. 94℃, 预变性3 min, 35个循环, 94℃变性40 s, 50℃退火1 min, 72℃延伸1 min 20 s, 72℃终延伸10 min, 16℃终止反应, 取5 μL PCR产物以1%琼脂糖电泳检测. 产物回收后, 按照pMD18-T vector(大连宝生物有限公司, TaKaRa Code: D101A)连接试剂盒说明书进行连接、克隆, 挑取阳性克隆送上海英骏公司测序, 并将两种质粒分别命名为pMD-18T/*omp*2-5和pMD-18T/*omp*2-11. 连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受细胞, 菌液 PCR 检测为阳性的菌液送上海英骏公司测序. 将 pMD-18T/*omp*2-5, pMD-18T/*omp*2-5-11 及 pcDNA3 分别转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 挑取阳性克隆接种于 5 mL 含氨苄青霉素(终浓度 50 μg/mL)LB 液体培养基中, 37℃振荡培养16 h提取质粒. 将3种质粒分别经*Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ(TaKaRa)双酶切, 37℃过夜, 胶回收*ompP2*-5, *ompP2*-11及pcDNA3片段. 按照T4 DNA连接酶(TaKaRa)说明书将*ompP2*-5, *ompP2*-11片段分别与pcDNA3片段连接, 连接产物转化*E. coli* JM109宿主菌. 在 PCR 检测为阳性的菌液中提取质粒. 质粒经 *Bam*HⅠ和 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ进行单、双酶切鉴定, 在 0.8%琼脂糖凝胶电泳中观察所切片段的大小, 同时送上海英骏公司测序.

(2) *ompP2* 基因重组质粒转染 Marc145 后对细胞形态的影响. 本实验独立重复3次. 将Marc145细胞以1×10^5的密度接种于24孔细胞培养板, 当细胞密度长到50%~80%时, 将转染试剂Transfast™ Transfection Reagent(Promega)与质粒(pcDNA3-*ompP2*-5, pcDNA3-*ompP2*-11, pcDNA3 空载体)分别以 1.2∶1, 1.2∶1.5, 1.2∶2的比例(μL/μg)转染Marc145细胞, 事先将质粒浓度调整为 1 μg/μL. 将脂质体、质粒和无血清无双抗的DMEM培养基按表1所示比例混合, 并立即涡旋10 s, 室温孵育10~15 min, 将混合液以每孔200 μL加

表 1 重组真核质粒转染实验的设置

组名	脂质体∶质粒/μL∶μg	脂质体/μL	质粒/μg	DMEM/μL	混合液总体积/μL
pcDNA3-*ompP2*-5	1.2∶1	1.2	1	197.8	200
	1.2∶1.5	1.2	1.5	197.3	200
	1.2∶2	1.2	2	196.8	200
pcDNA3-*ompP2*-11	1.2∶1	1.2	1	197.8	200
	1.2∶1.5	1.2	1.5	197.3	200
	1.2∶2	1.2	2	196.8	200
pcDNA3 空载体	1.2∶1	1.2	1	197.8	200
	1.2∶1.5	1.2	1.5	197.3	200
	1.2∶2	1.2	2	196.8	200

入细胞培养板中, 每个样品 3 个平行孔, 加好后迅速放入 37℃, 5%CO_2 培养箱中培养, 1 h 后每孔加入 200 μL DMEM 完全培养基终止反应. 从转染后 1 h 开始, 每隔 1 h 用倒置显微镜观察各转染剂量组细胞形态.

(3) RT-PCR 鉴定 *ompP2* 基因在 Marc145 细胞中的表达. 观察转染后细胞的生长情况, 当实验组细胞出现明显病变后, 用 Trizol(Invitrogen)(100 μL/孔)将细胞培养板上的细胞消化下来与孔中的培养基一并进行总 RNA 提取. cDNA 的合成均按大连宝生物有限公司 RNA Kit 试剂盒说明书进行. 以反转录好的 cDNA 为模板, 用(1)小节中的引物序列进行 PCR 鉴定. 反应体系和反应时间同(1)小节方法.

1.7 基于 *16SrRNA* 基因和 *ompP2* 基因的双重 PCR 检测副猪嗜血杆菌临床分离株

为建立一种检测副猪嗜血杆菌毒力菌株的方法, 以本实验设计的可区分副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因是否缺失的 PCR 引物(同 1.5 小节中的 F2R2), 联合使用 Oliveira 等人[11]设计的基于 *16SrRNA* 基因的副猪嗜血杆菌的鉴定 PCR 引物(正向引物 F3, 5′-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3′; 反向引物 R3, 5′-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3′), 并对其浓度和反应条件进行优化. 用该方法对副猪嗜血杆菌的 15 株参考菌株和 81 株临床分离株进行检测, 验证了基于 *16S rRNA* 和 *ompP2* 基因的双重 PCR 方法的可行性.

1.8 GenBank 登录号

本实验克隆的副猪嗜血杆菌 15 个血清型参考菌株的 15 条 *ompP2* 基因序列和 19 条临床分离株 *ompP2* 基因序列已经上传 GenBank, 登录号为: FJ715475~FJ715488, GU460185~GU460203, HM012802.

2 结果

2.1 *ompP2* 基因的序列分析

测序结果显示, 副猪嗜血杆菌 15 个参考菌株的 *ompP2* 基因长度为 1077~1203 bp, 编码氨基酸长度为 358~400 个氨基酸残基, 编码蛋白大小为 38.49~43.35 kD, 信号肽序列长为 23 个氨基酸残基, 编码的成熟蛋白长度为 36.23~40.93 kD, 氨基酸同源性为 83.9%~99.4%. 19 株临床分离株中, *ompP2* 基因的长度为 1080~1086 bp, 预测编码的氨基酸长度为 358~361 个氨基酸残基, 编码蛋白大小 38.38~38.91 kD, 除去 23 个氨基酸残基的信号肽序列, 其编码的成熟蛋白大小为 36.11~36.71 kD, 氨基酸同源性为 90.3%~99.7%. 与血清型 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 参考菌株相比, 19 株临床分离株及血清型 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 参考菌株的 *ompP2* 基因都存在两段连续碱基缺失, 这两段碱基缺失分别存在于 450~524 和 770~844 bp 范围内, 共计 100 bp 左右. 同时, 该基因在不同血清型中还存在较多的点突变.

对副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因所编码蛋白的跨膜结构以及表面暴露环的特点进行分析, 发现 19 株临床分离株以及血清型 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 参考菌株都具有 8 个表面暴露环, 而血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型则具有 9 个表面暴露环, 前者在 Loop4 和 Loop5 之间缺失了一个 Loop9. 进一步分析发现, 该蛋白的高变区主要集中在表面暴露环中, 这种高突变主要表现为两处连续缺失, 缺失区域分别位于 Loop3 和 Loop5; 同时, 氨基酸的点突变也集中存在于表面暴露环的 Loop3 和 Loop5 中.

分析所有菌株的 *ompP2* 基因, 发现它们都具有很好的抗原性. 用 PRED-TMBB 软件与 http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl 相结合分析 19 株临床分离株及 15 株参考菌株 *ompP2* 基因编码的抗原决定簇, 发现在 19 株临床分离株中分别为 12(n=12), 13(n=1) 或 14 个(n=6), 参考菌株中血清 1, 2, 6, 7, 8, 9, 11 具有 14 个, 血清 3 型具有 16 个, 血清 4, 10, 12 型具有 13 个, 血清 5, 13, 14, 15 型具有 12 个. 进一步对暴露于膜外的抗原决定簇分析发现, 在 19 株临床分离株中为 5 个. 参考菌株中血清 1, 5, 8, 13, 14, 15 型为 5 个; 2 型为 7 个; 3, 4, 10, 12 型为 6 个; 6, 7, 9 型为 4 个; 11 型为 3 个. 有趣的是, *ompP2* 基因两处碱基的连续缺失反而会使其暴露于膜外抗原决定簇个数的增加. 虽然血清 1, 8 型参考株 *ompP2* 基因为不缺失型, 但其暴露于膜外抗原决定簇个数为 5 个. 公认的毒力血清型 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15 中 *ompP2* 基因暴露在膜外的抗原决定簇个数(5~7), 多于非毒力血清型 6, 7, 9, 11 的暴露在膜外的抗原决定簇(3~4). 在 19 株临床分离株和所有的毒力参考菌株中均存在一个非毒力菌株所没有的膜表面抗原决定簇 VTDQ(K)ALGVGL, 位于 Loop8 中. 此外, 除血清 1, 8 型参考菌株外, 所有的临床分离株和毒力参考菌株均存在一个表面抗原决定簇 EKIDFVRT, 位于 Loop4 中. 在

19 株临床分离株和 15 个血清型参考菌株中均具有两个相似的暴露在膜表面的抗原决定簇, 其分别为 119~126 和 133~139 位氨基酸残基, 氨基酸序列为 FKQA(V)VIG 和 GFDKVYG(GFDKVYDVGS/GFDKVYGVGT). 无毒的血清 3 型参考菌株暴露在膜表面的抗原决定簇较为特殊, 除有上述的 FKQAVIG, GFDKVYG 和 ADVKVDS 外, 其他的 3 个膜表面抗原决定簇在其他菌株中均没有出现.

2.2 系统发育分析

34 株副猪嗜血杆菌的 *ompP2* 基因的系统进化树见图 1. 34 株副猪嗜血杆菌分别聚为 2 支, 其中 19 株副猪嗜血杆菌的临床分离株和参考菌株血清 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 型, 即表现为基因结构存在碱基缺失区域的菌株聚为一支(Cluster 1), 这一分支中的所有血清型的参考菌株均为公认的毒力菌株. 血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型参考菌株即碱基不缺失的聚为另一支(Cluster 2), 除参考血清型 1, 8 型菌株外, 这一分支中的其余血清型菌株均为公认的无毒血清型菌株.

2.3 PCR 检测临床分离株 *ompP2* 基因的连续碱基缺失的分布频率

检测了 15 个参考菌株和 81 株临床分离菌株(血清 4 型 7 株、5 型 22 株、12 型 3 株、13 型 11 株、14 型 12 株、未定型的 26 株). PCR 显示, 81 株临床分离株和血清 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 型参考菌株均在 500 bp 左右出现大小一致的目的条带, 而血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型参考菌株均在 600 bp 左右出现目的条带. 如图 2 所示, PCR 检测 81 株临床分离株的 *ompP2* 基因缺失区域, 结果都在 500 bp 左右出现一致的电泳

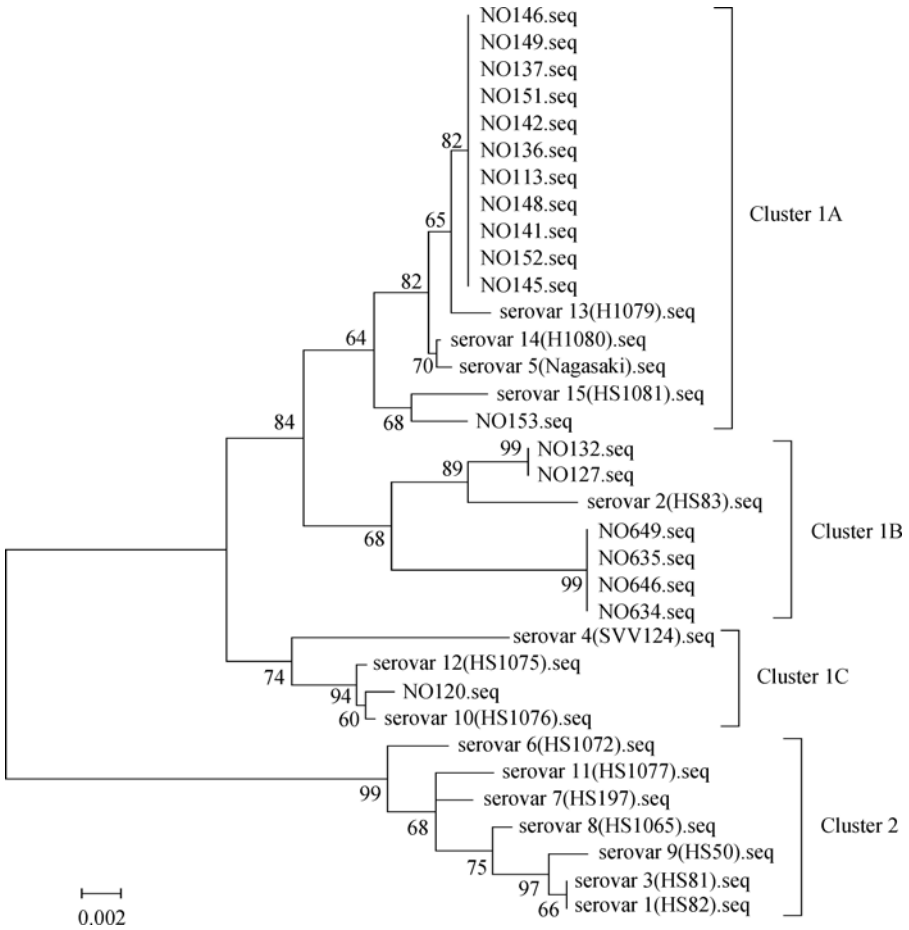

图 1　34 株副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的 NJ 法遗传进化树

servoar: 血清型

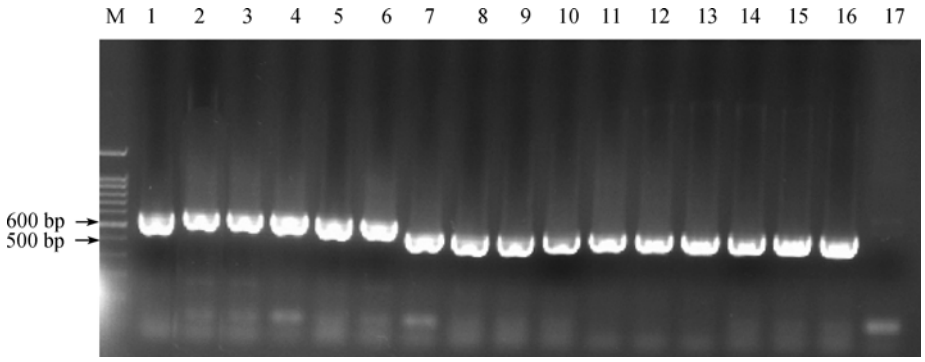

图 2　*ompP2* 基因电泳图

泳道 1~6: 碱基不缺失的血清 1, 6, 11, 8, 9, 7 型参考菌株; 泳道 7~16: 碱基缺失的临床分离株; 泳道 17: 阴性对照

条带. 随机抽取了 10 株临床分离株和血清 1, 6, 7, 8, 9, 11 型参考菌株的扩增产物克隆测序, 结果显示本实验室设计的 PCR 引物在临床分离株中扩增片段为 522~528 bp, 在参考菌株血清 1, 6, 7, 8, 9, 11 型中扩增片段长度为 618~645 bp.

2.4　*ompP2* 基因的真核表达重组质粒的鉴定

pcDNA3 空载体, pcDNA3-*ompP2*-5, pcDNA3-*ompP2*-11 质粒经 *Bam*HⅠ和 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ进行单、双酶切鉴定, 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳, pcDNA3 空载体经单酶切后为 5446 bp, 双酶切后为 5400 bp 左右; pcDNA3-*ompP2*-5 单酶切后为 6526 bp, 双酶切后为 5400 和 1080 bp; pcDNA3-*ompP2*-11 单酶切后为 6613 bp, 双酶切后为 5400 和 1167 bp(图 3). 随后将质粒进行测序. 结果显示, 重组质粒中目的基因连接正确.

2.5　重组载体转染 Marc145 细胞后的形态学观察

3 次重复实验结果一致. 图 4 为 3 次实验中的一次结果, 可以看出, 血清 5 型 *ompP2* 基因对 Marc145 细胞有明显的细胞毒性作用且随着转染中质粒剂量的增加, 对细胞的毒性作用也随之增加, 表现出明显的量效关系; 而血清 11 型的 *ompP2* 基因在相同剂量和转染条件下对 Marc145 细胞没有明显的细胞毒性作用.结果表明, 不同结构的 *ompP2* 基因对 Marc145 细胞的细胞毒性存在明显差异.

2.6　PCR 检测 *ompP2* 基因的表达

将收集的 pcDNA3-*ompP2*-5, pcDNA3-*ompP2*-11, pcDNA3 各个转染剂量组的细胞提取总 RNA, 反转录后进行 PCR. pcDNA3-*ompP2*-5 和 pcDNA3-*ompP2*-11 各个剂量组均在 1000~1200 bp 之间出现条带, 与预期的目的条带大小相符(图 5). pcDNA3-ompP2-5, pcDNA3-ompP2-11, pcDNA3 空载 3 组细胞提总 RNA 反转录后 PCR, pcDNA3-ompP2-5 和 pcDNA3-ompP2-11 各个剂量组均在 1000~1200 bp 之间出现条带, 测序结果证实为目的基因 *ompP2*. 表明血清 5 和 11 型 *ompP2* 基因均在 Marc145 细胞中得到了表达.

2.7　*ompP2*-16SrRNA 双重 PCR 法检测副猪嗜血杆菌

(1) 优化的反应条件.　PCR 总反应体系为 25 μL, *Taq* 酶(TaKaRa): 0.25 μL; $MgCl_2$ 缓冲液: 2.5 μL; $MgCl_2$: 1.5 μL; dNTP(TaKaRa): 2 μL; 引物 F3: 1 μL; 引物 R3: 1 μL; 引物 F4: 1 μL; 引物 R4: 1 μL; ddH_2O:

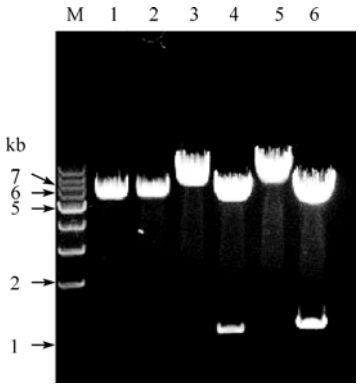

图 3　pcDNA3 空载体, pcDNA3-*ompP2*-5, pcDNA3-*ompP2*-11 质粒单、双酶切电泳图

泳道 1: pcDNA3 空载体 *Bam*HⅠ单酶切; 泳道 2: pcDNA3 空载体 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切; 泳道 3: pcDNA3-*ompP2*-5 *Bam*HⅠ单酶切; 泳道 4: pcDNA3-*ompP2*-5 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切; 泳道 5: pcDNA3-*ompP2*-11 *Bam*HⅠ单酶切; 泳道 6: pcDNA3-*ompP2*-11*Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切

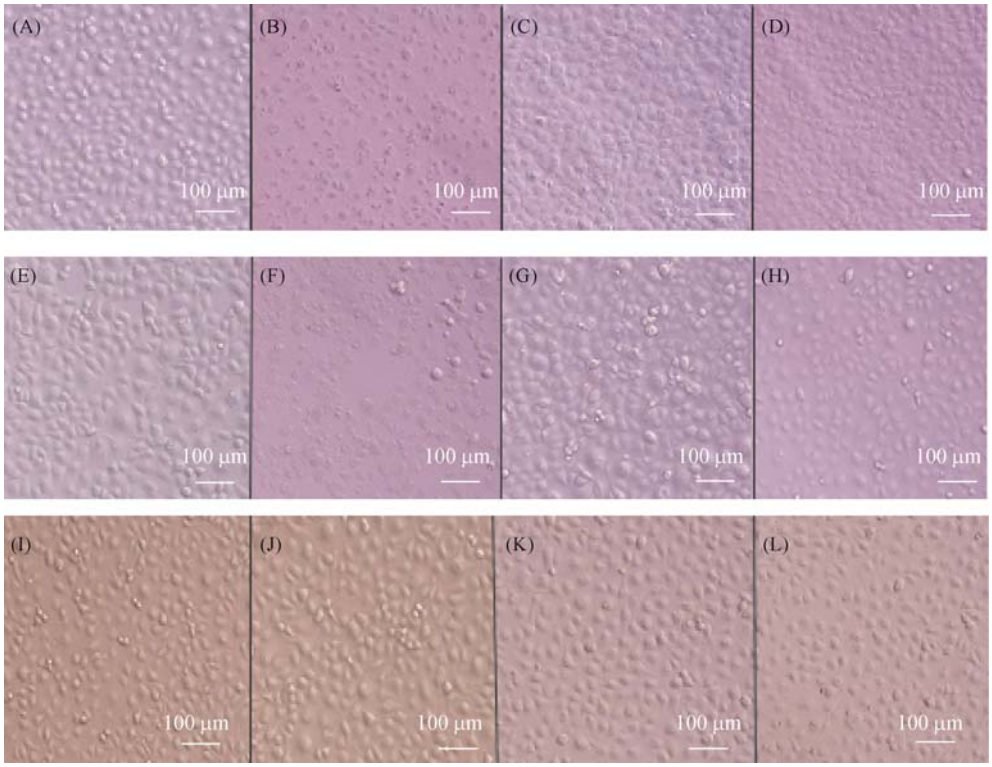

图 4　真核重组质粒转染 Marc145 细胞后 1 h 细胞形态

(A)~(D) 脂质体与质粒为 1.2∶2 的组. (A) 空白细胞对照, 形态正常; (B) pcDNA3-*ompP2*-5 组, 细胞出现圆缩、破裂和脱落等细胞病变; (C) pcDNA3-*ompP2*-11 组; (D) pcDNA3 空载体组, 这 2 组细胞未观察到明显形态变化; (E)~(H)为 1.2∶1.5 组. (E) 空白细胞对照, 形态正常; (F) pcDNA3-*ompP2*-5 组, 细胞出现圆缩脱落等病变; (G) pcDNA3-*ompP2*-11 组; (H) pcDNA3 空载体组, 这两组细胞形态正常; (I)~(L): 1.2∶1 组, 其中 I 为空白细胞对照. (J) pcDNA3-*ompP2*-5 组; (K) pcDNA3-*ompP2*-11 组; (L) pcDNA3 空载体组, 均未观察到明显的细胞形态变化

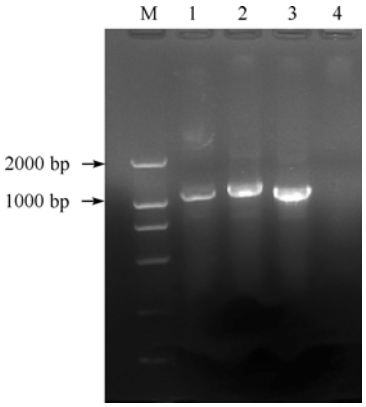

图 5　血清 5 和 11 型参考菌株 *ompP2* 基因的 cDNA 电泳图

泳道 1: pcDNA3- *ompP2*-5 组; 泳道 2: pcDNA3-*ompP2*-11 组; 泳道 3: 血清 5 型阳性对照; 泳道 4: pcDNA3 空载体

12.75 μL; DNA 模板 2 μL. 94℃, 预变性 3 min, 35 个循环, 94℃变性 30 s, 52℃退火 40 s, 72℃延伸 50 s, 72℃终延伸 10 min, 16℃终止反应.

(2) 对 15 株参考菌株和 81 株临床分离株的检测. 结果显示, 所有 96 株菌株均出现 2 条预期的目的条带. 820 bp 左右为 16SrRNA, 在血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型参考菌株中, 630 bp 左右出现 *ompP2* 基因目的条带, 而 81 株临床分离株和血清 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 型参考菌株则在 520 bp 左右出现 *ompP2* 基因的目的条带(图 6).

3　讨论

3.1　副猪嗜血杆菌临床分离株中 *ompP2* 基因的结构特点

Mullins 等人[7]对副猪嗜血杆菌 15 株参考菌株和 20 株田间分离株 *ompP2* 基因的结构特点进行了分析, 发现 *ompP2* 基因存在两种结构类型, 即与菌株 29755 相比, 部分菌株中 *ompP2* 基因分别在 48~60 和 67~70

bp 存在一段连续的碱基插入, 使得在 Loop4 与 Loop5 间增加了一个 Loop9. 由于在 Mullins 等人的实验中, 部分田间分离株血清型和分离部位等背景不清, 无法分析 *ompP2* 基因结构与毒力的联系. 本结果表明, 在参考菌株中 *ompP2* 基因存在 2 种结构类型, 即血清 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 型, *ompP2* 基因在 450~524 和 770~844 bp 范围内, 存在共计 100 bp 左右的碱基缺失, 而血清 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11 型参考菌株 *ompP2* 基因不存在缺失, 并且这些发生碱基连续缺失的参考血清型菌株均为公认的毒力菌株. 其中血清 4, 7, 9 型参考菌株中, *ompP2* 基因结构类型与 Mullins 等人报道的结果存在差异, 经过多次重复克隆测序, 证明本实验序列结果准确, 推测可能是使用的参考菌株存在差异所致. 对来自临床病例实质器官的 81 株副猪嗜血杆菌分离株 *ompP2* 基因的结构特点进行分析, 发现临床分离株中 *ompP2* 基因并没有像参考菌株一样存在 2 种结构类型, 而是表现出单一的结构特征, 即全部存在 2 处碱基连续缺失. 碱基的连续缺失引起了 *ompP2* 基因所编码蛋白的结构变化, 主要发生在表面暴露环区域. 由于存在碱基连续缺失, *ompP2* 基因与其他不缺失型菌株相比少了一个 Loop9. Ruiz 等人[8]对 28 株副猪嗜血杆菌的外膜蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果显示, 从副猪嗜血杆菌病临床病猪中分离的菌株电泳条带表现出一致性, 而分离自健康猪呼吸道的菌株电泳条带则表现为异质性, 据此推测一个大小在 36.6~38.5 kD 范围内的外膜蛋白可能与毒力相关. 对本实验所有临床分离株 *ompP2* 基因的分析发现, *ompP2* 基因编码的成熟蛋白大小均在 36.11~36.71 kD 范围内, 而在 15 个血清型参考菌株中 P2 蛋白的分子量差异较大, 毒力血清型菌株(除 1, 8 型)所编码的蛋白大小为 36.23~36.69 kD, 非毒力血清型为 39.72~40.93 kD. 该结果可以很好地解释 Ruiz 等人的结果. 据此, 推断副猪嗜血杆菌临床分离株的 *ompP2* 基因可能与毒力存在联系. 在进化关系上, 所有的临床分离株和参考菌株中的毒力菌株聚为一支(血清 1, 8 型参考菌株除外), 这种进化的趋同可能是由于存在特定的选择压力或者是 *ompP2* 基因在这些菌株中的特定功能, 使它们沿着一定的方向进化[7].

关于病原微生物由于表面暴露环以及暴露于膜外的抗原决定簇氨基酸序列的改变而导致其致病性改变的报道已有很多[23]. 未定型的流感嗜血杆菌临床分离株外膜蛋白 P2 的膜表面暴露环 Loop4, Loop5, Loop8 氨基酸极易突变, 而 Loop6 在部分分离株中也存在较高的突变[19]; 流感嗜血杆菌全菌刺激机体产生的功能性抗体的结合位点几乎都在 P2 蛋白 Loop5 上[15], Loop6 是杀菌性抗体的主要结合位点[20]. 推测 Loop5 和 Loop6 的突变可能是流感嗜血杆菌逃避宿主的免疫杀灭机制[20]. 副猪嗜血杆菌 P2 蛋白的 Loop3 和 Loop5 在毒力菌株和非毒力菌株中存在明显的不同, 主要表现在两段氨基酸的连续缺失, 这与流感嗜血杆菌中 P2 蛋白膜表面暴露环主要表现为氨基酸点突变存在差异. 副猪嗜血杆菌 P2 蛋白各表面暴露环的功能尚不清楚, 表面暴露环氨基酸变异对蛋白功能的影响还有待进一步研究. 在解脲支原体中 MB 抗原是暴露于细胞外表面的膜蛋白, 是感染中被识别的主要抗原, Waston 等人[24]对解脲支原体不同临床分离株的 MB 抗原分析发现, 该抗原在不同侵袭力菌株中存在大小差异, 并且包含种特异性的抗原决定簇. 对柯萨奇 B3 病毒抗原决定簇的多态性和致病性研究发现, 由于该病毒各分离株中抗原决定簇有

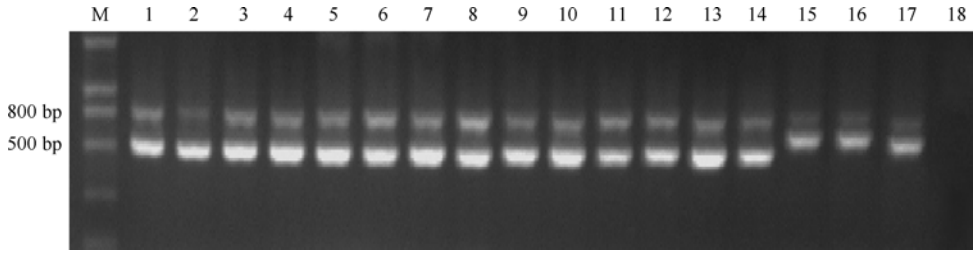

图 6　双重 PCR 检测电泳图

81 株临床分离株和 15 株参考菌株, 所有菌株均出现两条带. 其中一条统一在 800 bp 左右, 另外一条临床分离株和毒力血清型参考菌株(除 1, 8 型)为 500 bp 左右, 而非毒力血清型以及血清 1, 8 型参考菌株为 600 bp 左右. 泳道 1~11: 临床分离株; 泳道 12~14: 血清 4, 5, 10 型参考菌株; 泳道 15~17: 血清 6, 7, 8 型参考菌株; 泳道 18: 阴性对照

差异, 使得该病毒各分离株的致病性也有很大的不同[25]. 关于副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的抗原决定簇分析还未见报道. 本实验对副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的抗原决定簇分析发现, 所有的临床分离株和血清 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 型参考菌株都由于碱基的缺失使其暴露于膜外的抗原决定簇的个数增多(5~7), 多于血清 6, 7, 9, 11 型的参考菌株(3~4). 虽然公认的毒力血清 1, 8 型的 *ompP2* 基因不存在碱基的连续缺失, 但是这两种血清型暴露于膜外的抗原决定簇个数却为 5. 值得关注的是, 在 19 株副猪嗜血杆菌临床分离菌株和所有的毒力参考菌株中均有一个相同的膜表面抗原决定簇 VTDQ(K) ALGVGL, 而其在非毒力参考菌株中却没有被发现. 此外, 除血清 1, 8 型参考菌株外, 在 19 株副猪嗜血杆菌临床分离菌株和所有的毒力参考菌株中均有一个相同的膜表面抗原决定簇 EKIDFVRT, 而该抗原决定簇在非毒力参考菌株中却没有被发现. 因此, 推测这两个膜表面抗原决定簇与副猪嗜血杆菌的毒力有关.

由于副猪嗜血杆菌血清型复杂、各血清型菌株间缺乏交叉保护性, 给疫苗的开发带来了很大的困难[6]. Zhou 等人报道[26], 副猪嗜血杆菌血清 5 型菌株 *ompP2* 基因所编码的重组蛋白免疫小鼠后具有良好的保护力. 本结果表明, 副猪嗜血杆菌临床分离株和毒力参考菌株 *ompP2* 基因结构非常相似, 暴露于膜外的抗原决定簇个数较多, 且具有毒力菌株所特有的结构一致的膜表面抗原决定簇. 有望据此开发一种具交叉保护性的 *ompP2* 基因的重组亚单位疫苗或多肽疫苗.

3.2 碱基缺失导致 *ompP2* 基因的毒力显著增强

目前, 关于副猪嗜血杆菌的毒力因子还知之甚少. 本实验表明, 存在连续碱基缺失的血清 5 型菌株的 *ompP2* 基因对 Marc145 细胞的毒性作用很大, 且存在明显的量效关系, 表明该类型的 *ompP2* 基因是副猪嗜血杆菌的毒力基因之一, 而血清 11 型菌株碱基不缺失的 *ompP2* 基因在相同剂量下却不具有细胞毒性. 本实验首次证明副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因结构特征与毒力的关系. 与血清 11 型 *ompP2* 基因相比, 血清 5 型 *ompP2* 基因在 450~507 和 770~844 bp 范围内存在两处连续碱基缺失, 共计 131 bp, 使得 P2 蛋白缺失 Loop9, 但却增加了膜表面抗原决定簇 VTDQALGVGL 和 EKIDFVRT. 这一蛋白结构的变化可能是造成 P2 蛋白细胞毒性差异的原因. 副猪嗜血杆菌血清型众多, 不同血清型菌株间毒力差异很大[6], 本实验证实副猪嗜血杆菌存在两种结构类型的 *ompP2* 基因, 碱基连续缺失的 *ompP2* 基因是副猪嗜血杆菌的一个毒力基因. 因此, P2 蛋白的结构差异可能是造成副猪嗜血杆菌不同血清型菌株间毒力差异的原因之一.

3.3 *ompP2*-16SrRNA 双重 PCR 方法

副猪嗜血杆菌血清型众多, 且各血清型间毒力差异较大, 给副猪嗜血杆菌病的临床诊断带了困难. 目前已有检测副猪嗜血杆菌的 PCR 方法, 巢式 PCR、荧光定量 PCR 方法[21,27,28], 但是这些方法均不能区分副猪嗜血杆菌的毒力. 由于副猪嗜血杆菌可作为正常菌群定殖在临床健康猪的鼻腔和呼吸道中, 因此这些部位收集的样本不能用于副猪嗜血杆菌病的诊断[21]. 建立一种可以区分副猪嗜血杆菌常在菌与致病菌的方法对该病的临床诊断有很大的帮助[1]. 本实验设计的检测 *ompP2* 基因碱基缺失的引物可以很好地与 Oliveira 等人[21]的 16SrRNA 引物联合使用建立双重 PCR. 由于 Oliver 等人的 16SrRNA 引物可以特异性地鉴定副猪嗜血杆菌, 而本实验引物可以区分 *ompP2* 基因是否缺失, 因此这两种引物的联合使用有望建立一种靶向 *ompP2* 和 *16SrRNA* 基因的双重 PCR 方法, 用以区分毒力和无毒的副猪嗜血杆菌分离株(血清 1, 8 型除外).

参考文献

1 Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet Microbiol, 2004, 99: 1—12

2 Kielstein P, Rosner H, Muller W. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot-blot procedure. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 1991, 38: 315—320

3 Rapp-Gabrielson V J, Gabrielson D A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am J Vet Res, 1992, 53: 659—664

4 Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. J Clin Microbiol, 1992, 30: 826—865

5 Turni C, Blackall P J. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol, 2005, 106: 145—151

6 Miniats O P, Smart N L, Rosendal S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. Can J Vet Res, 1991, 55: 37—41

7 Mullins M A, Register K B, Bayles D O, et al. Characterization and comparative analysis of the genes encoding *Haemophilus parasuis* outer membrane proteins P2 and P5. J Bacteriol, 2009, 191: 5988—6002

8 Yue M, Yang F, Yang J, et al. Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. J Bacteriol, 2009, 191: 1359—1360

9 Ruiz A, Oliveira S, Torremorell M, et al. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. J Clin Microbiol, 2001, 39: 1757—1762

10 Zhang B, Tang C, Yang F L, et al. Molecular cloing, sequencing and expression the Outer membrance protein A gene from *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol, 2009, 136: 408—410

11 Tang C, Zhang B, Yue H, et al. Characteristics of molecular diversity in the outer membrane protein a gene from *Haemophilus parasuis*. Can J Vet Res, in press

12 Cope L D, Pelzel S E, Latimer J L, et al. Characterization of a mutant of *Haemophilus influenzae* type b lacking the P2 major outer membrane protein. Infect Immun, 1990, 58: 3312—3318

13 Haase E M, Campagnari A A, Sarwar J, et al. Strain-specific and immunodominant surface epitopes of the P2 porin protein of nontypeable Haemophilus influenzae. Infect Immun, 1991, 59: 1278—1284

14 Haase E M, Yi K, Morse G D, et al. Mapping of bactericidal epitopes on the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun, 1994, 62: 3712—3722

15 Yi K, Murphy T F. Importance of an immunodominant surface-exposed loop on outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun, 1997, 65: 150—155

16 Neary J M, Yi K, Karalus R J, et al. Antibodies to loop 6 of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* are bactericidal against multiple strains. Infect Immun, 2001, 69: 773—778

17 Galdiero S, Vitiello M, Amodeo P, et al. Structural requirements for proinflammatory activity of porin P2 Loop 7 from *Haemophilus influenzae*. Biochemistry, 2006, 45: 4491—4501

18 Sikkema D J, Murphy T F. Molecular analysis of the P2 porin of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun, 1992, 60: 5204—5211

19 Duim B, Dankert J, Jansen H M, et al. Genetic analysis of the diversity in outer membrane protein P2 of non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. Microb Pathog, 1993, 14: 451—462

20 Hiltke T J, Sethi S, Murphy T F. Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. Infectious Diseases, 2002, 185: 627—631

21 Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn Invest, 2001, 13: 495—501

22 Tadjine M, Mittal K R, Bourdon S, et al. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. J Clin Microbiol, 2004, 42: 839—840

23 Brunham R C, Plummer F A, Stephens R S. Bacterial antigenic variation host immmune response and patheogen-host co-evolution. Infect Immun, 1993, 61: 2273—2276

24 Watson H L, Blalock D K, Cassell G H. Variable antigens of *Ureaplasma urealyticum* containing both serovar-specific and serovar-cross-reactive epitopes. Infect Immun, 1990, 58: 3679—3688

25 Zhu D S, Li H, Xiang R E, et al. Diversity and pathogenicity of coxsackie b3 viral antigenic determinant. Journal of the Fourth Militry Medical University, 2002, 23: 1081—1084

26 Zhou M, Guo Y, Zhao J, et al. Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5. Vaccine, 2009, 27: 5271—5277

27 Angen O, Oliveira S, Ahrens P, et al. Development of an improved species specific PCR test fordetection of *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol, 2007, 119: 266—276

28 Turni C, Pyke M, Blackall P J. Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. J Appl Microbiol, 2010, 108: 1323—1331

The correlation between structural characterization of *ompP2* gene and virulence of *Haemophilus parasuis*

ZHAO Qian[1], TANG Cheng[1], YANG FaLong[1], SHAO GuoQing[2] & YUE Hua[1]

[1] *Key Laboratory of Veterinary Medicine in Sichuan Province, College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;*
[2] *Jiang Su Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*

Two structural types have been found in *ompP2* genes of *Haemophilus parasuis*, but the biological significance of this difference is still unknown. The aim of this study is to clarify the structural characterization of *ompP2* and analyze the relationship between *ompP2* gene structure and virulence of the bacteria. Sequencing results reveal that, compared with the *omp*P2 of reference strains representing serotypes 1, 3, 6, 7, 8, 9 and 11, the *omp*P2 of reference strains representing serotypes 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 and 19 isolates show 2 continuous deletion at positions 450−524 and 770−844 bp, involving a total of 100 base pairs. This finding is further confirmed by PCR detection of 81 isolates. Sequence analysis reveal that the continuous deletion in *omp*P2 gene lead to lose one surface loop, but could increase the number of the antigenic determinants which exposed to the membrane. It is also found that all clinical isolates and virulent reference strains, but not avirulent strains, possess a similar surface epitope, VTDQ(K) ALGVGL, suggesting that epitopes on the surface of membrane would possibly be related to the virulence of the *Haemophilus parasuis*. To further investigation, two eukaryotic expression vectors containing either of structural types of *ompP2* gene are constructed and transfected into Marc-145 cells. The results show that protein encoded by *ompP2* with base deletion (from serotype 5) presents a much higher cytotoxicity than protein encoded by *ompP2* without deletion (from serotype 11). This is the first report concerning the relationship between *ompP2* gene structure and the virulence of *Haemophilus parasuis*.

***Haemophilus parasuis*, P2 gene, structural characterization, base deletion, cytotoxicity**

doi: 10.1360/052010-230