

网络出版时间:2016-10-20 16:36

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.12.002

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161020.1636.004.html>

猪源 Bb SC-SN 株的分离鉴定及其皮肤坏死毒素(DNT)全基因序列分析

肖璐¹, 邬旭龙¹, 王印^{1,2}, 姚学萍^{1,2}, 杨泽晓^{1,2},
胡凌¹, 林星宇¹, 任梅渗¹, 曾相杰¹, 罗忠永¹

(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都, 611130; 2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

[摘要] 【目的】了解当前支气管败血波氏杆菌(Bb)地方菌株皮肤坏死毒素(DNT)基因的变异特点。【方法】利用分离培养、PCR及16S rRNA扩增片段同源性分析,对采自四川遂宁某规模化猪场有明显萎缩性鼻炎症状的鼻拭子进行病原分离鉴定,并对分离株的DNT基因进行克隆和序列分析,对其抗原域、氨基酸二级结构、特定区域位于蛋白质表面可能性等参数进行预测,分析其B细胞抗原表位。【结果】成功分离得到一株支气管败血波氏杆菌,命名为支气管败血波氏杆菌SC-SN株。分离株DNT基因序列全长4 357 bp,与其他11株菌DNT基因的核苷酸序列同源性为93.1%~100.0%,但由于其356位插入碱基A,使得该序列仅编码1 426个氨基酸,与上述11株DNT基因编码的氨基酸序列同源性仅为12.8%~47.0%。遗传进化树显示,SC-SN分离株与S798日本株和未知1株的亲缘关系最近。软件预测结果显示,Bb SC-SN株DNT基因编码氨基酸B细胞抗原表位发生较大变化。【结论】经鉴定,分离株确为支气管败血波氏杆菌,且SC-SN株的DNT基因序列变异较大,第356位插入的碱基A,对其氨基酸序列、ORF及B细胞抗原表位分布产生了较大的影响。

[关键词] 支气管败血波氏杆菌;分离鉴定;皮肤坏死毒素基因;猪

[中图分类号] S855.1⁺2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)12-0009-07

Identification of an Bb SC-SN isolated from Sichuan and sequence analysis of DNT gene

XIAO Lu¹, WU Xulong¹, WANG Yin^{1,2}, YAO Xueping^{1,2}, YANG Zexiao^{1,2},
HU Ling¹, LIN Xingyu¹, REN Meishen¹, ZENG Xiangjie¹, LUO Zhongyong¹

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China;

2 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: 【Objective】This study investigated the variation characteristics of *Bordetella bronchiseptica* DNT gene in Sichuan. 【Method】A *Bordetella bronchiseptica* strain was identified from swine nose swab with respiratory disease from a pig farm in Suining, Sichuan by cultivation, PCR and 16S rRNA homology analysis. Then, DNT of the strain was cloned, the sequence, antigenicity, amino acid secondary structure, certain location surface accessibility in protein and B cell epitopes were analyzed. 【Result】A *Bordetella bronchiseptica* strain was separated successfully and named Bb SC-SN. The sequence analysis showed that the length of DNT was 4 357 bp, and it coded 1 426 amino acids with A inserted in the 356th position. The DNT sequence of SC-SN strain shared 93.1%—100.0% homology with other 11 strains, but the homology

〔收稿日期〕 2015-07-10

〔基金项目〕 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD12B04)

〔作者简介〕 肖璐(1991—),女,四川什邡人,硕士,主要从事预防兽医研究。E-mail: yaanxiaolu@163.com

〔通信作者〕 王印(1968—),男,四川南充人,教授,博士,博士生导师,主要从事预防兽医研究。E-mail: yaanwangyin@tom.com

of amino acid sequences was 12.8%—47.0%. Phylogenetic tree showed that *DNT* of SC-SN strain had closest relationship to S798. The B cell epitopes of Bb SC-SN *DNT* amino acid changed greatly according to model prediction. 【Conclusion】 The isolated SC-SN strain was *Bordetella bronchiseptica*, and its *DNT* varied greatly. The base A at the 356th position had great influence on amino acids, ORFs and B cell epitopes.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*; identification; *DNT*; swine

支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)从首次分离至今,其分类经 4 次更改,最后由 Moreno-Lopez^[1]将其归为波氏菌属。该菌为革兰氏阴性菌,可致犬、猫、兔等数种动物呼吸系统疾病,在猪中主要与多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)混合感染导致猪的萎缩性鼻炎(*Atrophic rhinitis*, AR),好发于仔猪^[2-3]。该菌还能与猪链球菌(*Streptococcus suis*, S. suis)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus suis*, HPS)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)等病原混合感染^[4-6],从而增加呼吸道疾病的发病率,加重病情,诱发猪呼吸道疾病综合症(Porcine respiratory disease complex, PRDC),引起猪只死亡,给养猪业造成巨大危害^[7]。Mattoo 等^[8]和 Brockmeier 等^[9]指出 Bb 的主要毒力因子有粘附素和毒素。粘附素主要包括丝状血凝素(Filamentous hemagglutinin, FHA)、百日咳杆菌粘附素(Pertactin)以及菌毛(Fimbriae),毒素主要包括腺苷环化酶溶血素(Adenylate cyclase-hemolysin, AC-Hly)、气管细胞毒素(Tracheal cytotoxin, TCF)和皮肤坏死毒素(Dermonecrotic toxin, DNT)以及Ⅲ型分泌系统。DNT 是 Bb 导致猪发生鼻甲骨萎缩的重要直接致病因子^[10],也是 Bb 定居于上呼吸道的必备因子。DNT 存在于 Bb 胞浆内,对福尔马林敏感,不耐热,灭活后仍具有抗原性,可刺激机体产生抗毒素中和抗体^[11]。此外 Bb 的免疫原性强弱很有可能与 DNT 有关^[12]。鉴于此,对 *DNT* 基因的研究意义重大。目前在 NCBI 上可查到的 Bb *DNT* 的全基因序列较少,国内对 *DNT* 的研究也相对较少。本试验通过对采集于四川的 Bb *DNT* 基因克隆、测序及拼接,得到其全基因序列,并对其进行分析,以期对支气管败血波氏杆菌病的理论研究、疫苗研制、疫病防控等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pMD19-T 载体、大肠杆菌 DH5a,均购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提

取试剂盒(TIAN amp Bacteria DNA Kit),均购于北京天根生化科技有限公司;SPF 鼠,购于成都达硕实验有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 Bb 菌株的分离鉴定及动物回归试验

2015 年采集四川遂宁某规模化猪场有明显萎缩性鼻炎症状的猪鼻腔拭子,于胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)上进行 Bb 的分离。挑疑似菌落革兰氏染色镜检后,取纯化单一菌落于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)中扩大培养,使用 TIAN amp Bacteria DNA Kit 提取细菌基因组 DNA,−20 ℃ 保存,备用。使用细菌 16S rRNA 通用引物及 *Fla* 基因合成特异性引物^[13](表 1)对分离株进行 PCR 鉴定,引物由 Invitrogen™ 公司合成。PCR 反应体系为 25 μL:2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1.5 μL,模板 2 μL,ddH₂O 补至 25 μL。阴性对照的模板采用 ddH₂O。反应条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,按表 1 温度退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环;72 ℃ 总延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后于紫外凝胶成像系统观察,回收 16S rRNA 扩增产物,送 Invitrogen™ 测序,在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比对。

将分离株接种至 TSB 中扩大培养,用磷酸盐缓冲液(PBS)调整细菌密度为 10⁹ CFU/mL,取菌液腹腔注射 30~40 d SPF 鼠 5 只作试验组,每只 0.2 mL,同时用同批次同日龄健康鼠 5 只腹腔注射等量 PBS 作为对照组。

1.3 DNT 基因的克隆

1.3.1 *DNT* 基因的分段扩增 根据 NCBI 上发布的 *DNT* 基因序列(GenBank 登录号:U59687),使用 Primer 5 设计 3 对特异性引物(表 1),对 *DNT* 基因分 3 段(*DNT*1、*DNT*2、*DNT*3)进行 PCR 扩增(图 1),引物由 Invitrogen™ 公司合成。PCR 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1.5 μL,模板 2 μL,ddH₂O 补至 25 μL。试验设阴性对照,模板采用 ddH₂O。反应条件:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,按表 1 温度退火 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃,10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,于全自动紫外凝胶成像系统观察。

表 1 本试验 PCR 所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	PCR 产物大小/bp PCR products	位置/bp Position	退火温度/℃ Annealing temperature
16S-R	5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'	1 540	—	55
16S-F	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'		—	
FLA-1	5'-TGGCGCCTGCCCTATC-3'	237	61—76	57
FLA-2	5'-AGGCTCCAAGAGAGAAAA-3'		280—297	
DNT1-P1	5'-ACTTGTGACATGGCGCTTGTAGGC-3'	1 603	256—280	60
DNT1-P2	5'-CTGGAACATGGTGAAGACCCGGC-3'		1 834—1 858	
DNT2-P1	5'-CACTACAAGGTGCTGACATCGC-3'	1 139	1 730—1 751	60
DNT2-P2	5'-GCATCCAGATGACTCTGTAGGC-3'		2 846—2 868	
DNT3-P1	5'-GGCAGTTTGAGGGCATCTACAC-3'	1 872	2 765—2 787	61
DNT3-P2	5'-TTCGCGCAATGCGATTAGACC-3'		4 615—4 636	

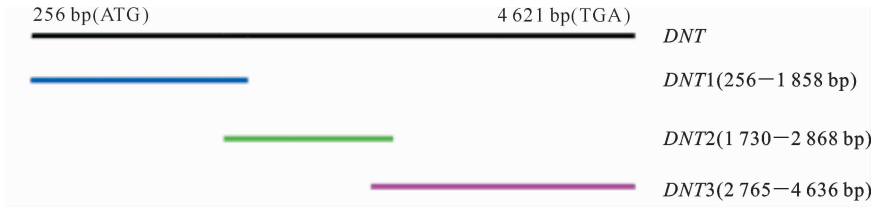


图 1 Bb DNT 基因扩增示意图

Fig. 1 Sketch map for amplification of DNT

1.3.2 DNT 分段克隆及鉴定 纯化回收上述 3 段 PCR 产物,分别与 pMD19-T 16 ℃ 连接过夜,将连接产物转化大肠杆菌 DH5α,均匀涂布于含 0.1 mg/mL 氨苄青霉素 LA 培养基上,37 ℃ 培养 24 h。取单个鉴定为阳性的质粒扩大培养,送 Invitrogen™ 公司测序。

1.4 DNT 基因的序列分析

利用 NCBI 上的 BLAST 及 DNAMAN 对测序结果初步分析,再利用 DNA STAR 中 Seq Man 模块,将所测 3 段序列拼接得分离株 DNT 基因全序列,利用 Meg Align 模块中 Clustal W 对序列同源性及进化关系进行分析,再采用 Protean 模块的

Chou-Fasman 结合 Gamier-Robson 预测分离株 DNT 的 1 426 个氨基酸的二级结构分布情况,再利用 Jameson-Wolf 预测潜在的蛋白抗原决定簇,用 Emini 预测特定区域位于蛋白质表面的可能性,用 Karplus-Schulz 预测蛋白质骨架区的柔韧性,用 Kyte-Doolittle 结合 Hopp-Woods 预测蛋白质的亲水区 and 疏水区。采用 ExPASy Prot Param tool(<http://web.expasy.org/protparam/>) 及 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)在线软件,对克隆 DNT 序列与 NCBI 中已登录的 11 株波氏菌属菌株 DNT 序列进行比对和分析。参比 DNT 序列信息见表 2。

表 2 参比 11 株波氏菌属菌株 DNT 序列的主要信息

Table 2 Main messages of DNT sequences of 11 Bordetella in this study

菌株 Strain	DNT GenBank 登录号 Accession	位置/bp Position	来源 Host	国别 Country	参考文献 References	物种 Species
未知 1 株 Unknown 1	U59687	266—4 621	猪 Swine	未知 Unknown	[14]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
未知 2 株 Unknown 2	AB020025	267—4 622	未知 Unknown	日本 Japan	[15]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
未知 3 株 Unknown 3	E17214	40—4 395	未知 Unknown	日本 Japan	[16]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
253	HE965806.1	4 763 013—4 767 368	狗 Dog	美国 USA	[17]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
MO149	HE965807.1	4 009 610—4 013 968	人 Human	美国 USA	[18]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. Bronchiseptica</i>
S798	AP014582.1	4 090 892—4 095 247	猪 Swine	日本 Japan	[19]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
RB50	BX640449.1	47 140—51 495	兔 Rabbit	美国 USA	[20]	支气管败血波氏杆菌 <i>B. bronchiseptica</i>
CS	CP002695.1	3 686 259—3 690 614	人 Human	中国 China	[21]	百日咳博德特氏菌 <i>B. pertussis</i>

表 2(续) Continued table 2

菌株 Strain	DNT GenBank 登录号 Accession	位置/bp Position	来源 Host	国别 Country	参考文献 References	物种 Species
B1917	CP009751.1	3 419 813—3 424 168	人 Human	荷兰 Netherlands	[22]	百日咳博德特氏菌 <i>B. pertussis</i>
Bpp5	HE965803.1	1 227 676—1 232 029	羊 Sheep	新西兰 New Zealand	[23]	副百日咳博德特氏菌 <i>B. parapertussis</i>
12822	BX640434.1	93—4 448	人 Human	德国 Germany	[20]	副百日咳博德特氏菌 <i>B. parapertussis</i>

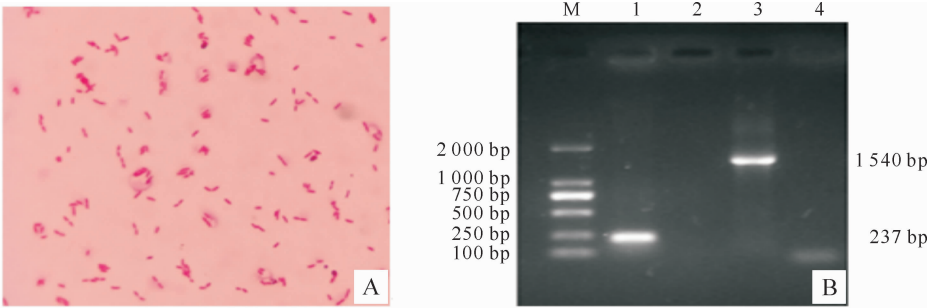
2 结果与分析

2.1 Bb 病原菌的分离鉴定及动物回归试验

分离株在 TSA 上长出圆形隆起、不透明菌落，革兰氏染色镜检可见两极浓染的革兰氏阴性杆菌(图 2-A)。用 FLA-1/FLA-2 及 16S rRNA 通用引物 16S-R/16S-F 的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，分别可见长度约 237,1 540 bp 的条带，阴性对照无条带(图 2-B)。16S rRNA 序列经 BLAST 比

对后结果显示，分离株与未知 1 株、S798 株等序列同源性均达 99%。说明该分离菌株确为支气管败血波氏杆菌，命名为 Bb SC-SN 株。

动物回归试验结果显示，注射菌液的试验组 5 只小鼠在 24~36 h 死亡，对照组未见异常。蘸取死亡小鼠脾脏，于 TSA 上培养分离得到与猪源分离的 Bb 形态一致的细菌，经鉴定证实鼠内脏分离菌确为 Bb，推知分离 Bb 对小鼠具有较强致病性。



A. 革兰氏染色镜检图(1 000×);B. PCR 鉴定,M. DL2000 DNA Marker,1. FLA, 2. FLA 阴性对照,3. 16S rRNA,4. 16S rRNA 阴性对照
A. Gram staining (1 000×);B. PCR identification,M. DL2000 DNA Marker,1. FLA, 2. Negative control of FLA,3. 16S rRNA;4. 16S rRNA negative control

图 2 Bb 的分离与 PCR 鉴定结果

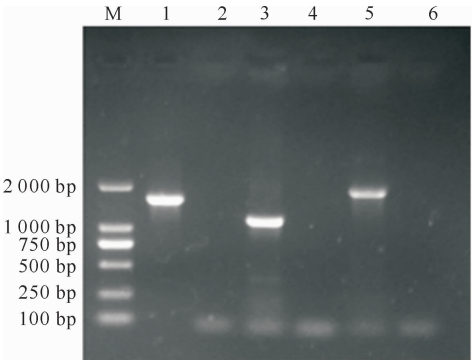
Fig. 2 Bb isolation and PCR identification

2.2 Bb DNT 基因的分段克隆及鉴定

用 3 对特异性引物对 DNT 基因进行 PCR 扩增，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，可见长度约为 1 603,1 139 和 1 872 bp 的条带，阴性对照无条带(图 3)，证明 DNT 的 3 段基因均克隆成功。

2.3 Bb DNT 基因的序列分析

分析显示,Bb SC-SN 株 DNT 基因核苷酸序列与其他 11 个参比序列的同源性为 93.1%~100.0%(表 3),其中 SC-SN 株 DNT 与日本株 S798 同源性高达 100.0%;与美国株 MO149 同源性最低,仅 93.1%。用 DNAMAN 软件对上述 12 个序列进行分析发现,SC-SN 株 DNT 在 356 位插入碱基 A,其对应氨基酸序列与比对序列同源性仅 12.8%~47.0%。由绘制进化树(图 4)可知,SC-SN 株 DNT 基因与日本分离株 S798 及未知 1 株的亲缘关系最近。



M. DL2000 DNA Marker;1. DNT1(1 603 bp); 2. DNT1 阴性对照 Negative control of DNT1;3. DNT2(1 139 bp); 4. DNT2 阴性对照 Negative control of DNT2;5. DNT3(1 872 bp); 6. DNT3 阴性对照 Negative control of DNT3

图 3 Bb DNT 基因的分段扩增结果

Fig. 3 Amplification of Bb DNT subsection by PCR

表 3 Bb SC-SN 株 *DNT* 基因核苷酸序列的同源性分析
Table 3 Nucleotide homology analysis of Bb SC-SN *DNT*

菌株 Strain	SC-SN	未知 2 株 Unknown 2	B1917	Bpp5	CS	未知 3 株 Unknown 3	MO149	RB50	S798	未知 1 株 Unknown 1	253	12822
SC-SN		99.9	99.4	99.7	99.4	99.8	93.1	99.7	100.0	99.9	99.6	99.6
未知 2 株 Unknown 2	0.1		99.4	99.6	99.4	99.9	93.0	99.6	99.8	99.8	99.5	99.5
B1917	0.6	0.6		99.6	100.0	99.3	92.9	99.8	99.5	99.5	99.7	99.7
Bpp5	0.3	0.4	0.4		99.6	99.5	93.1	99.9	99.7	99.7	99.8	99.8
CS	0.6	0.8	0.0	0.4		99.3	92.9	99.8	99.5	99.5	99.7	99.7
未知 3 株 Unknown 3	0.2	0.1	0.7	0.5	0.7		92.9	99.5	99.8	99.7	99.4	99.4
MO149	7.3	7.4	7.5	7.3	7.5	7.5		93.1	93.1	93.1	93.1	93.0
RB50	0.3	0.4	0.2	0.1	0.2	0.5	7.3		99.7	99.7	99.9	99.9
S798	0.0	0.1	0.5	0.3	0.5	0.2	7.3	0.3		100.0	99.6	99.6
未知 1 株 Unknown 1	0.1	0.2	0.5	0.3	0.5	0.3	7.3	0.3	0.0		99.6	99.6
253	0.4	0.5	0.2	0.2	0.3	0.6	7.3	0.1	0.4	0.4		99.9
12822	0.4	0.5	0.3	0.2	0.3	0.8	7.4	0.1	0.4	0.4	0.1	

注:对角线以上表示不同菌株 *DNT* 基因核苷酸序列同源性,对解线以下表示不同菌株 *DNT* 基因核苷酸序列同源性差异。
Note:The right upper showed the homology of *DNT* nucleotide of different strain,the left lower showed the homology divergence of *DNT* nucleotide of different strain.

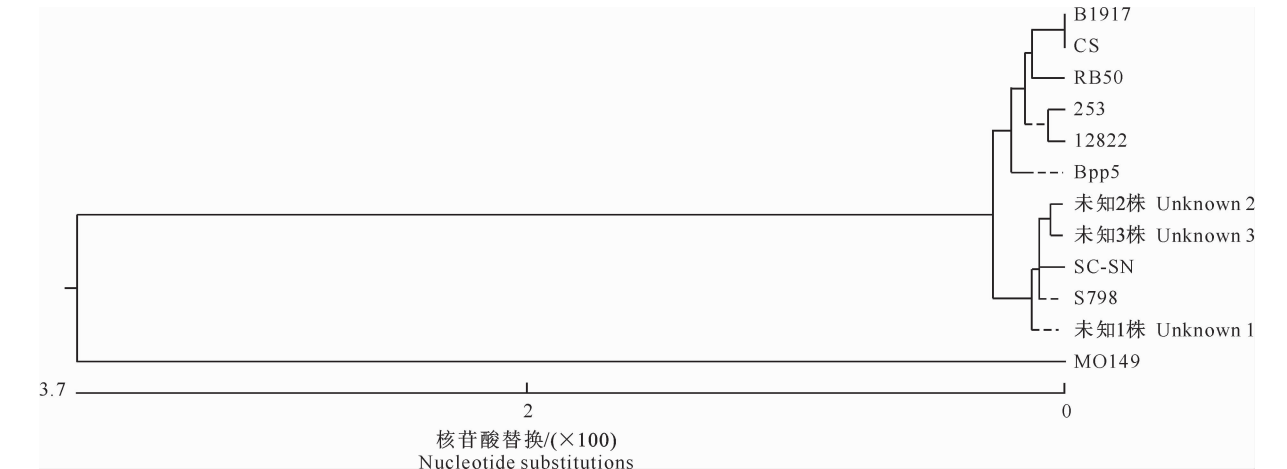


图 4 Bb SC-SN 株 *DNT* 的遗传进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of Bb SC-SN *DNT*

将 SC-SN 株 *DNT* 基因序列与其亲缘性最近的序列分析发现,其与未知 1 株的序列相比,核苷酸一致性达 99.93%,除在 356 位插入碱基 A 外,224 位、554 位及 617 位也发生变异;与 S798 株 *DNT* 序列相比,核苷酸一致性达 99.95%,在第 356 位插入碱基 A,617 位发生变异。但 SC-SN 株 *DNT* 氨基酸序列与未知 1 株及 S798 株氨基酸序列同源性较低,均为 20.5%,使用 ExPASy Prot Param tool 在线软件对上述 3 个氨基酸序列分析得知其理化特性差异较大(表 4)。

表 4 Bb *DNT* 基因编码氨基酸理化性质比对结果
Table 4 Physicochemical properties of amino acid sequence of Bb *DNT*

指标 Index	SC-SN 株 SC-SN strain	S798 株 S798 strain	未知 1 株 Unknown 1
基因长度/bp Length of gene	4 357	4 356	4 356
编码氨基酸数量 Number of amino acids	1 426	1 451	1 451
理论等电点 Theoretical pI	11.65	6.40	6.40
分子质量/u Molecular weight	155 483.8	159 122.9	159 094.9
分子结构式 Formula	C ₆₆₂₉ H ₁₀₇₃₃ N ₂₄₀₇ O ₁₈₃₆ S ₆₁	C ₇₁₂₁ H ₁₁₁₅₀ N ₂₀₂₂ O ₂₀₆₇ S ₃₀	C ₇₁₁₉ H ₁₁₁₄₆ N ₂₀₂₂ O ₂₀₆₇ S ₃₀
不稳定系数 The instability index	59.62	40.71	40.71
脂肪族氨基酸系数 Aliphatic index	64.61	94.80	94.67

使用 NCBI 中 ORF finder 对 SC-SN 株、未知 1 株及 S798 株 *DNT* 基因的开放阅读框(ORF)进行分析,预测结果显示,SC-SN 株、未知 1 株及 S798 株 *DNT* 基因分别有 11,10,9 个 ORF,小于 200 bp 的 ORF 无差异,但 SC-SN 株 *DNT* 序列预测最大 ORF 为 4 008 bp,增加了一个 807 bp 的 ORF。据此可知 SC-SN 株 *DNT* 虽与其余 11 个比对序列的核苷酸同源性较高,但其在第 356 位插入的碱基 A,可能对该核苷酸序列编码的氨基酸序列、ORF 及蛋白质理化性质的预测结果有一定影响。

2.4 SC-SN 株 *DNT* 相关预测

经对 *DNT* 基因编码氨基酸二级结构、潜在蛋白抗原决定簇区、骨架区柔韧性、亲水区和疏水区等因素的综合分析,推测 SC-SN 株 *DNT* 基因编码氨基酸 B 细胞抗原表位最可能位于以下 10 处:15—24,213—226,283—302,353—365,580—610,636—654,745—755,804—837,1 090—1 111,1 186—1 192 氨基酸残基。同法预测未知 1 株和 S798 *DNT* 基因编码氨基酸的 B 细胞抗原表位最可能位于以下 14 处:15—24,106—120,210—217,416—425,515—522,616—623,705—718,839—852,971—986,1 098—1 106,1 169—1 186,1 216—1 221,1 373—1 384,1 401—1 416 氨基酸残基。可知 *DNT* 基因编码氨基酸 B 细胞抗原表位预测差别较大,预测的 SC-SN 株抗原表位主要在 900 位以下,而未知 1 株和 S798 的 900 位以上抗原表位有 6 处。另外,以上 3 个菌株的 *DNT* 序列在第 100—700 位的预测差异也较大,仅第 15—24 位之间的预测结果相同。

将 SC-SN 株、未知 1 株及 S798 株的 *DNT* 氨基酸序列进行比对,从 118 位之后的预测蛋白抗原决定簇区域、特定区域位于蛋白质表面可能性、蛋白质骨架区柔韧性及亲、疏水区均发生较大变化,推测这与 SC-SN 株 *DNT* 基因 356 位插入碱基 A 有较大关联。

3 讨论

Bb 常以直接或间接方式与呼吸道病原协同致病,加重病情,造成损失,其潜在威胁不可小觑。*DNT* 作为 Bb 最重要的致病因子,对 Bb 地方性猪波氏菌病的防治意义重大。

本试验通过细菌分离培养、PCR 鉴定及序列分析,成功分离出一株支气管败血波氏杆菌,并分 3 段对 SC-SN 株 *DNT* 基因进行克隆及序列分析。核

苷酸同源性分析可知,SC-SN 株 *DNT* 基因核苷酸序列与其他 11 株波氏菌属的 *DNT* 序列相似性较高;进化树显示,SC-SN 株 *DNT* 基因与 CS 中国株亲缘性较低,与 S798 日本株及未知 1 株亲缘关系最近。但由于 SC-SN 株 *DNT* 基因在第 356 位插入碱基 A,使得其 118 位后的氨基酸排列发生较大变化,预测蛋白质理化性质也发生较大变化,与 S798 日本株及未知 1 株相比编码氨基酸个数减少 25 个,序列同源性骤降,同时引起 ORF 发生较大变化。鉴于碱基插入引起的改变,对 *DNT* 基因编码氨基酸的 B 细胞抗原表位进行预测,发现 SC-SN 株 *DNT* 基因编码氨基酸相比其他 *DNT* 基因编码氨基酸少了 4 个抗原表位,356 位插入的碱基 A 理论上对应第 118—119 氨基酸残基,通过对预测结果对比,推测该碱基的插入可能仅影响 106 位后的 B 细胞的抗原表位分布预测,对 15—24 位区域的抗原表位预测影响较小。但该碱基的插入是否导致 SC-SN 株 *DNT* 基因编码蛋白质理化性质、ORF 改变及 B 细胞抗原表位的改变,以及该碱基的插入是否会引起该菌的皮肤毒性、致病力等特性的改变,还需要进行进一步研究探讨。另外,关于 *DNT* 序列的生物学信息研究及 *DNT* 编码的蛋白功能域的相关研究目前相对较少,可能是今后 Bb 研究的热点之一。

[参考文献]

- [1] Moreno-Lopez, Pittman M, Wardlaw A C. The genus *Bordetella* [M]. The Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1981: 1075-1085.
- [2] Niels, Taekken, Foged. Pasteurella multocida toxin the characterization of the toxin and its significance in the diagnostic and prevention of PAR in pigs [J]. A PMIS, 1992, 100(25): 51-56.
- [3] 陈溥言. 兽医传染病学 [M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 260-261.
Chen P Y. Veterinary lemmology [M]. 5th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 260-261.
- [4] Vecht U, Wisselink H J, van Dijk J E, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype [J]. Infection and Immunity, 1992, 60: 550-556.
- [5] Brockmeier S L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine [J]. Veterinary Microbiology, 2004, 99(1): 75-78.
- [6] Brockmeier S L, Loving C L, Nicholson T L, et al. Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus and *Bordetella bronchiseptica* [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 128(1/2): 36-47.
- [7] 刘翠权. 广西 395 个规模猪场猪呼吸道疾病综合征的病原学调查及防控措施 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
Liu C Q. Aetiological investigation and control and prevention

- measures of porcine respiratory disease complex in large scale pig farms in Guangxi [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [8] Mattoo S, Cherry J D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella subspecies* [J]. Clinical Microbiology Review, 2005, 18: 326-382.
- [9] Brockmeier S L, Register K B, Magyar T, et al. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine [J]. Infection and immunity, 2002, 70(2): 481-490.
- [10] Zhao Z Q, Xue Y, Pei J, et al. Cloning, expression and characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella bronchiseptica* [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2011, 27(12): 1172-1182.
- [11] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 158-159.
- Lu C P. Veterinary microbiology [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 158-159.
- [12] Woo S H, Moon S Y, Byon Y Y, et al. Evaluation of the immunogenicity of *Bordetella bronchiseptica*, a vaccine antigen [J]. Korean Journal of Veterinary Research, 2014, 54(2): 75-79.
- [13] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica*, by the polymerase chain reaction [J]. Research in Microbiology, 1999, 150(5): 333-341.
- [14] Pullinger G D. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. [J]. Infection & Immunity, 1996, 64(10): 4163-4171.
- [15] Kashimoto T. Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin [J]. Infection & Immunity, 1999, 67(8): 3727-3732.
- [16] Horiguchi Y, Imagawa T. Vaccine and diagnostic agent for porcine atrophic rhinitis; JP 1998251298-A [P]. 1998-09-22.
- [17] Buboltz A M, Nicholson T L, Parette M R, et al. Replacement of adenylate cyclase toxin in a lineage of *Bordetella bronchiseptica* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(15): 5502-5511.
- [18] Diavatopoulos D A, Cummings C A, Schouls L M, et al. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica* [J]. PLoS Pathogens, 2005, 1(4): e45.
- [19] Horiguchi Y, Sugimoto N, Matsuda M. Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin [J]. Infection and Immunity, 1993, 61(9): 3611-3615.
- [20] Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* [J]. Nature Genetics, 2003, 35(1): 32-40.
- [21] Zhang S, Xu Y, Zhou Z, et al. Complete genome sequence of *Bordetella pertussis* CS, a Chinese pertussis vaccine strain [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(15): 4017-4018.
- [22] Bart M J, Van G M, van H G, et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains [J]. BMC Genomics, 2010, 11(20): 736.
- [23] Brinig M M. Genomic features of *Bordetella parapertussis* clades with distinct host species specificity [J]. Genome Biology, 2006, 7(9): 91-96.