

鸡源致病性大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因的 PCR 扩增、克隆及序列分析

叶如俊, 王红宁*, 谭炳乾

(四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

摘要: 研究选择从四川规模化鸡场分离鉴定的 5 株优势血清型鸡源致病性大肠杆菌代表株(O₈₉, O₁₁₉, O₁₄₁, O₁₂₇)的 1 型菌毛 pilA 基因的 PCR 扩增片段分别定向克隆到 pUC18 质粒的多克隆位点, 并转化到 DH5 α 株大肠杆菌载体菌中, 对目的基因的序列测定结果表明: 5 个克隆片段均含有 1 型菌毛 pilA 基因的全序列, 全长 459 bp, 编码信号肽和结构蛋白。用生物软件(DNASTAR)对 9 株大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因序列、氨基酸序列、菌毛蛋白质二级结构预测及抗原性进行了分析比较, 结果显示: 鸡源致病性大肠杆菌 1 型菌毛间具有同源性, 1 型菌毛间存在一定的相同抗原位点。

关键词: 鸡致病性大肠杆菌; 1 型菌毛; pilA 基因; PCR; 克隆; 序列测定

中图分类号: S852.65⁺9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)01-0083-06

鸡大肠杆菌病是由大肠埃希氏菌(*Escherichiacoli*)的某些菌株所致鸡的一类疾病总称。随着集约化养禽业的不断发展, 鸡大肠杆菌病已成为严重威胁养鸡业的传染病之一。有资料表明, 鸡大肠杆菌病居鸡细菌性疾病之首, 占 33%。我国每年因大肠杆菌病死亡鸡约 3 170 万只, 经济损失 3 亿多元^[1]。鸭、鹅、鸽、鹌鹑患大肠杆菌病引起的损失也十分巨大。通过分离鉴定四川规模化鸡场的大肠杆菌, 选择其优势血清型菌株制成疫苗来控制鸡大肠杆菌病已取得较好效果, 但由于鸡大肠杆菌血清型众多, 疫苗的覆盖面有限^[2~5]。

1 型菌毛是鸡源致病性大肠杆菌的重要毒力因子, 在致病过程中介导细菌吸附于鸡呼吸道黏膜上皮细胞完成入侵的第 1 步, 1 型菌毛为一种蛋白质突起, 由结构基因(*pilA*)及相关决定簇基因编码, 具有良好的免疫原性^[6~9], 因此用菌毛疫苗免疫鸡, 产生抗菌毛抗体, 抗体与菌毛结合, 封闭了菌毛上受体结合位点, 从而控制了细菌对宿主黏膜上皮细胞相应受体的粘附, 抗菌毛抗体阻断了大肠杆菌感染寄主的第一个环节, 使鸡获得保护。绝大多数致病性大肠杆菌都表达 1 型菌毛, 研究 *pilA* 基因可以为 1 型菌毛基因工程苗的研究, 制备核酸探针检测 *pr*

1A 基因提供基础材料, 通过对 DNA 核酸序列的分析和比较, 研究鸡源致病性大肠杆菌的分子流行病学, 建立用 PCR 技术检测 1 型菌毛的方法具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 四川优势血清型鸡源致病性大肠杆菌 45 株, 由四川农业大学动物预防医学系生物工程实验室保存, 受体菌株 DH5 α 。

1.1.2 培养基及常规药品和试剂 营养肉汤, LB 肉汤, LB 平板, X-gal 平板, TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH7.6 和 8.0), pUC18 (本实验室保存)。

1.1.3 分子生物学试剂 引物由上海生工合成, DNA 合成酶 Taq 酶, dNTP, T4DNA 连接酶, BamH I, Hind III, X-gal, IPTG 购自宝生物(大连)公司, ATP 购自上海华舜生物有限公司, 溶菌酶(USA 分装), 蛋白酶 K(Amresco 分装), DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

2 试验方法

2.1 菌毛 pilA 基因 PCR 扩增

2.1.1 细菌染色体的提取 参照文献进行^[10]。

2.1.2 引物设计 根据文献^[11]报道的人大肠杆菌 1 型菌毛基因设计一对引物, 对染色体模板 DNA 进行扩增, 引物由上海生工合成。

引物 1: 5' GAAGGATCCGAAACTGCAGTGTGG

收稿日期: 2002-11-04

基金项目: 四川“十五”畜牧重点攻关项目资助(1999-2004)

作者简介: 叶如俊(1972-), 男, 四川西昌人, 助研, 硕士, 主要从事禽病及微生物学研究, 现在北京农林科学院畜牧研究所工作。

* 联系作者

C3'。引物 2: 5' GACAAGCTTTGAACGTCCCTG AACCC3'。

2.1.3 PCR 扩增 在 PCR 反应管中加入模板, 0.5 μ L (约 15 ng); 10 \times buffer, 5 μ L; dNTPmixture, 2 μ L; 引物, 3 μ L \times 2; 25 mmol/L MgCl₂, 4 μ L; Taq 酶, 0.5 μ L (5.0 U); 加入纯水补足 50 μ L, 加入矿物油 40 μ L 防止水分挥发。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 然后进入循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 经过 25 次循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min 结束反应。反应结束后, 尽量吸取矿物油, 取 10 μ L 反应作 2% 琼脂糖电泳分析。

2.2 菌毛 pilA 基因的克隆

2.2.1 质粒(pUC18)的提取 参照文献^[12]的方法进行。

2.2.2 PCR 产物的凝胶电泳回收 参照 DNAQia-gen 公司凝胶回收试剂盒操作手册进行。

2.2.3 插入片段和载体 DNA(pUC18)的双酶切 在微量离心管中加入纯化后的 PCR 产物和 pUC18 10 μ L, Hind III, BamH I 各 2 μ L; 10 \times Kbuffer, 2 μ L; 加入纯水补足 20 μ L, 30 $^{\circ}$ C 作用 3 h 后, 65 $^{\circ}$ C 作用 20 min 使酶灭活。加入 20 μ L 酚/氯仿抽提, 11 000 r/min 离心 5 min, 去水相加入 2 倍量冰冷无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜后, 11 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 不振动情况下弃上清液, 沉淀干燥后, 溶于 20 μ L 去离子水中备用。

2.2.4 连接反应 将插入片段, pUC18 进行双酶切, 反应体系为: 插入片段, 8 μ L; pUC18, 2 μ L; 10 \times buffer, 2 μ L; T4 连接酶, 1 μ L; ATP-H₂O (5 mmol/L), 1 μ L; 加入纯水补足 20 μ L, 同时设插入片段、pUC18 对照。14 $^{\circ}$ C 作用 16 h。

2.2.5 感受态细胞的制备 参照文献的方法进行^[12]。

2.2.6 转化及筛选 参照文献的方法进行^[12], 同时设感受态细胞, pUC18 对照。

2.2.7 重组质粒的酶切鉴定 取筛选出的白色菌落进行质粒的抽提, BamH I, Hind III 双酶切, 1.5% 凝胶电泳分析。同时设立 MarkerDNA, pUC18 质粒双酶切, PCR 扩增产物作对照。

3.1 克隆片段的 DNA 序列测定及分析 将阳性克隆菌株送宝生物工程(大连)有限公司进行克隆片段的 DNA 序列测定; 用生物软件 DNASTAR 对 DNA 序列进行分析。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳分析结果 根据人源大肠杆菌

pSH2.1 型菌毛基因序列分析^[11], 目的片段约 670 bp, PCR 扩增结果表明: 45 个被检样中, 有 43 个样品在 600 bp 附近出现一条清晰亮带, 大小均一, 与预计大小一致。其中, 将用于克隆的 5 个样品扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, EB 染色, 紫外灯检测, 用凝胶成像系统照像, 结果见图 1。

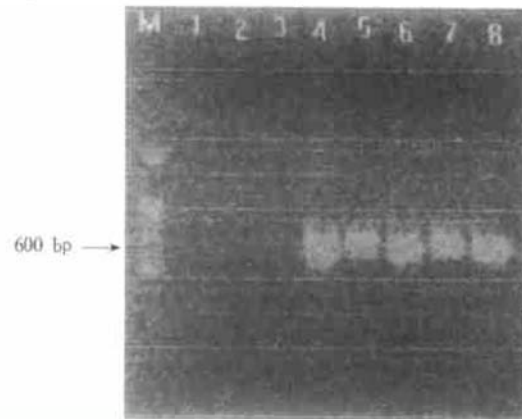


图 1 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Agarose Gel electrophoresis analysis of PCR product analysis of PCR product

M. 100 bp DNA ladder

1. 有引物, 无模板 2. 有模板, 无引物 3. DH5 α
4. MS2-1 5. LS3-1 6. LS2-1 7. HY1-2
8. HY1-1

2.2 菌毛 pilA 基因的克隆

2.2.1 菌毛基因片段的克隆及筛选 经酶切反应、连接反应和转化反应, 从含有 X-gal 和 Amp 的 LB 平板上筛选到了白色菌落。

2.2.2 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒的酶切鉴定结果见图 2。

从电泳图可以看出, 5 株试验菌株 pilA 基因 PCR 扩增产物重组质粒经 Hind III BamH I 双酶切后出现一条与 pUC18 一样大小的条带(2.7 Kb)和一条与 PCR 扩增产物一样大小的条带(673 bp), 表明 5 株试验菌株 pilA 基因的重组克隆成功。

2.3 克隆片段的 DNA 序列测定及分析

2.3.1 克隆片段的 DNA 序列测定 根据测序报告, 克隆片段全长 673 bp, 其中包括 pilA 结构基因全序列 459 bp(从起始密码 ATG 开始, 到终止密码子 TAA 为止)。已将序列登陆 GenBank。序列注册号分别为 MS2-1: AY082805; LS3-1: AY082806; LS2-1: AY082807; HY1-2: AY082808; HY1-1: AY082809。下图为试验所测得到的 5 株鸡源大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因与 Orndorff 所报道的人源

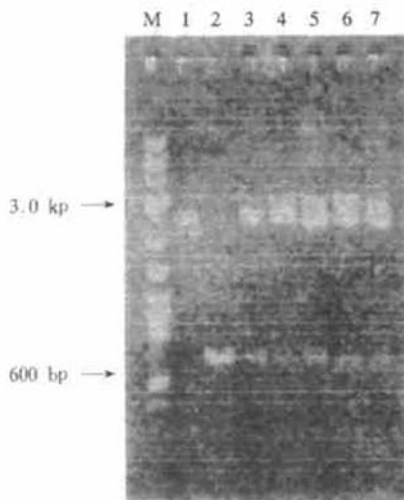


图 2 重组质粒酶切图

Fig.2 Restriction analysis of recombination plasmid

M. 2-Log DNA Ladder

1. pUC18 质粒/Hind III + BamHI

2. PCR 产物

3. MS2-1 重组质粒/Hind III + BamHI

4. LS3-1 重组质粒/Hind III + BamHI

5. LS2-1 重组质粒/Hind III + BamHI

6. HY1-2 重组质粒/Hind III + BamHI

7. HY1-1 重组质粒/Hind III + BamHI

大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因, 戴鼎震报道的 3 株鸡源大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因的序列比较。

从图 3 可以看出, O₈₈ 菌株 pilA 基因比其它菌株多出 6 个碱基, 共 555 bp, 其中 1~ 69 bp 为编码信号肽基因, 69~ 459 bp (O₈₈ 为 555 bp) 为编码结构蛋白基因, TAA 为终止密码子。编码 1 型菌毛的起始密码子区与终止子区的核苷酸序列有一定的同源性, 属于保守区。

2.3.2 pilA 遗传相似性分析 用 DNASTAR 生物软件对本试验经克隆测序的 5 株鸡大肠杆菌 (MS2-1, LS3-1, LS3-2, HY1-2, HY1-1) 与 Orndorff 所报道的人源大肠杆菌 (pSH2) 及戴鼎震报道的鸡源大肠杆菌 (O₁, O₇₈, O₈₈) 的 1 型菌毛 pilA 基因的核苷酸和氨基酸同源性进行分析比较。结果见表。

表中结果表明: 试验菌株的 pilA 基因与人大肠杆菌 1 型菌毛 pilA 基因有很高的同源性, 属于 1 型菌毛; 9 株菌的氨基酸同源率较高, 达 84.6%~ 100%。

2.3.3 蛋白质二级结构的比较分析 用 DNASTAR 软件对本试验菌株的氨基酸序列经进行二级结构预测, 与戴鼎震报道的 O₁, O₇₈, O₈₈ 的 1 型菌毛结构蛋白的 α 螺旋, β 折叠, 疏水性, 抗原性进行分析比较。结果表明, 在 1 型菌毛二级结构方面, 各菌株间存在很

大的相似性, 各个菌株组成 α 螺旋区域的氨基酸占总氨基酸的百分比为 26%~ 34%。 β 折叠区域的氨基酸所占总氨基酸的百分比为 32%~ 53%。在 1 型菌毛蛋白亲水性方面, 各种菌毛蛋白具有一定程度相似性的亲水性图谱。各菌株组成亲水区域的氨基酸占总氨基酸的百分比分别为 24%~ 31%。在 1 型菌毛蛋白抗原性方面, 图谱显示出各实验菌株 1 型菌毛蛋白之间具有一定程度相似的抗原性, 各个菌株间峰形基本一致, 只是在峰高上有一些变化。

3 讨论

3.1 Suwanichkul 等对鸡源大肠杆菌 O₁, O₂ 及 O₇₈ 的菌毛结构蛋白 N 末端部分序列进行测定和分析, 结果发现该部分序列与人源大肠杆菌 1 型菌毛 N 末端氨基酸序列完全相同或基本相似, 由此推测, 鸡源大肠杆菌染色体编码 1 型菌毛的起始密码子区的核苷酸序列也可能与人大肠杆菌相似。因此, 本试验以人大肠杆菌 1 型菌毛结构基因为参考序列, 在其 pilA 基因的起始密码子以前的核苷酸序列及终止后的核苷酸序列选择一对引物, 经 PCR 扩增、克隆及 DNA 序列测定, 证实已克隆到 1 型菌毛结构基因全序列。所测序列经 DNASTAR 软件分析, 本试验选取的 5 株试验菌株 (MS2-1, LS3-1, LS2-1, HY1-2, HY1-1) 1 型菌毛的 pilA 基因与人大肠杆菌 1 型菌毛的 pilA 基因具有很高的同源率, 分别为 90.9%, 90%, 91.1%, 89.8%, 90.7%, 菌毛蛋白氨基酸序列同源率分别为 91.8%, 90.1%, 90.7%, 88.5%, 91.8%, 具有很高的同源性, 并且二者 1 型菌毛之间的阅读框架正确, 信号肽及终止子编码区均基本相同。这一结果证实了 Suwanichkul 关于“人大肠杆菌与鸡大肠杆菌 1 型菌毛源于同一祖先”的假说。

3.2 将各个菌株间 1 型菌毛 pilA 基因经 DNASTAR 软件分析, 结果显示, 试验菌株 MS2-1, LS3-1, LS2-1, HY1-2, HY1-1, 及人大肠杆菌 pSH2, 鸡大肠杆菌 O₁, O₇₈, O₈₈ 的 1 型菌毛 pilA 基因间有很高的同源性, 各个菌株间的同源率为 88.4%~ 99.8%。pilA 基因遗传相似性聚类分析结果显示分离于四川的 5 株大肠杆菌 MS2-1, LS3-1, LS2-1, HY1-2, HY1-1 在遗传相似性上归为一大类, 而由戴鼎震报道的分离于江苏的 O₁, O₇₈, O₈₈ 菌株在遗传相似性上归为一大类, 这说明 1 型菌毛的结构可能与地域有一定的关系; 本试验选取的 5 株鸡源大肠杆菌, 分属于 4 个血清型 (MS2-1 为 O₈₉, LS3-1 为

MS2-1	ATGAAAATTA AAACTCTGGCAATTGTTGTTCTGTCGGCTCTGTCCCTGAGTTCTACAG	58
LS3-1	-----CT-----	58
LS2-1	-----	58
HY1-2	-----C-----	58
HY1-1	-----	58
PSH2	-----C-----GA	58
01	-----C-----CG	58
078	-----C-----C-----CG	58
088	-----	58
MS2-1	CGGCTCTGGCCGCTGTC*****ACGACGGTAAATGGTGGGACAGTTCACTTTAAAGG	110
LS3-1	-----*****-----G	110
LS2-1	-----*****-----	110
HY1-2	-----*****-----	110
HY1-1	-----*****-----	110
pSH2	-----C*****-----T-----C	110
01	-----A-ACT*****-----C	110
078	-----A-ACT*****-----C	110
088	-----T-A-ACTACACCC-----C	116
MS2-1	GGAGGTTGTTAACGCAGCTTGTGCGGTTGATGCCGGCTCTGTTGATCAAACCGTTCAG	168
LS3-1	-----	168
LS2-1	-----	168
HY1-2	-----	168
HY1-1	-----	168
pSH2	-----A-----C-----C-----A-----A-----	168
01	-----A-----C-----C-----A-----A-----	168
078	-----A-----C-----C-----A-----A-----	168
088	-----A-----C-----C-----A-----A-----	174
MS2-1	TTGGGCCAGGTTTCGTACCGCTTCGCTGGACCAGGATGGAGCGACCAGCTCTGCTGTGC	226
LS3-1	-----	226
LS2-1	-----	226
HY1-2	-----T	226
HY1-1	-----	226
pSH2	-----A-----A-----A-----CA-----A-----A-----T-----	226
01	-----AGC-----A-----G-----C-----A-----C-----T-----	226
078	-----AGC-----A-----G-----C-----A-----C-----T-----	226
088	-----A-----A-----CA-----T-----A-----G-----C-----A-----	232
MS2-1	GTTTTAACATTTCAGCTGAATGATTGCGATACCGATGTTGCAAGCAAAGCTGCTGTTGC	284
LS3-1	-----	284
LS2-1	-----CG-----	284
HY1-2	T-----	284
HY1-1	-----	284
pSH2	-----A-----TCT-----C-----	284
01	-----C-----AC-----C-----CA-----C-----	284
078	-----AC-----C-----CA-----C-----	284
088	-----AC-----C-----CA-----C-----	290
MS2-1	CTTCTTAGGTACAACAATTGACACGAATCATACCAACGTACTGGCTCTGCAGAGTTCT	342
LS3-1	-----	342
LS2-1	-----	342
HY1-2	-----C-----	342
HY1-1	-----	342
pSH2	-----T-----GG-G-----TG-GG-----T-----A	342
01	-----GG-----TG-T-CG-----G-I-----A	342
078	-----GG-----TG-T-CG-----G-I-G-----A-----A	342

088	-----G-G-GG-G-----GT-C---C---T-C-----A-----A	348
MS2-1	GCTGCGGGTAGCGCAACAACGTTGGTGTGCAGATCCTGGA TAAACAGGAGCTGCGC	400
LS3-1	CG-----	400
LS2-1	-----	400
HY1-2	-----	400
HY1-1	-----GA-----	400
pSH2	-----C-G-G-T-----	400
01	-----T-----A---C---G-T-----	400
078	-----C-G-G-T-----	400
088	-----C-----T---C-G-----TAA-A-	406
MS2-1	TGGCGCTGGATGGTGCCTCATTTAGTGCACAAACAACCTGAATAACGGAACCAACAC	458
LS3-1	-----	458
LS2-1	-----	458
HY1-2	-----	458
HY1-1	-----	458
pSH2	-----A-----G-----T-	458
01	-----C---A---T-T-A-----	458
078	-----C---A---T-G-----	458
088	-A---C---A-----G-----T-T-----	464
MS2-1	CATTCCGTTCCAGGCGGTTATTATGCAGTTGGTGCCGCAACCCAGGTGCTGCTAAT	516
LS3-1	-----	516
LS2-1	-----	516
HY1-2	-----	516
HY1-1	-----C-----	516
pSH2	-----T---ACC-G-----G-----	516
01	-----T---ACC-----	516
078	-----T---ACC-----C-A	516
088	-----T---ACC---T-----	522
MS2-1	GCGGATGCGACCTTCAAGGTTCAAGTATCAATAA	549
LS3-1	-----	549
LS2-1	-----	549
HY1-2	-----	549
HY1-1	-----C-----	549
pSH2	-----	549
01	-----	549
078	-----	549
088	-----	555

图 3 大肠杆菌 pilA 基因序列的比较

Fig.3 Comparison of *Escherichia coli* pilA gene nucleotide sequence between each strains

表示碱基缺失(means deletion) -表示相同(- means match)

O₈₉, LS2-1 为 O₁₄₁, HY1-2 为 O₁₁₉, HY1-1 为 O₁₂₁)^[1], 来源于 3 个地区, 遗传相似性分析结果显示 1 型菌毛的遗传相似性与血清型并没有太明显的关系。

3.3 菌毛蛋白二级结构的预测与比较对了解菌毛的同源性及其抗原性有重要意义。本试验借助计算机软件 DNASTAR, 使用 Chour-Fasman 法对蛋白质二级结构进行预测。此方法是利用概率统计学的经验参数法而获得对蛋白质二级结构的预测, 在此方法中每个残基被指定为一个构象参数以及生成或破坏

α螺旋或β折叠的能力^[13]。鸡大肠杆菌 1 型菌毛之间存在同源性, 变异的程度较小, 分离于四川的试验株之间氨基酸的变异范围为 0%~4.9%, 文献报道的 O₇, O₇₈, O₈₈ 菌株间变异范围为 2.7%~8.9%, 而二者之间变异范围相对较大, 为 9.3%~15.4%。通过综合分析, 8 株鸡源致病性大肠杆菌 1 型菌毛蛋白在第 1—4 位, 第 49—53 位, 第 82—91 位, 第 126—132 位, 第 145—150 位氨基酸间都有较高的抗原性。鸡源致病性大肠杆菌菌毛蛋白的抗原性变

表 核苷酸/氨基酸的同源性比较
Table The nucleotide/ amino acid comparitivity of different *E. coli* strains

		同 源 率 (%)								
		PSH2	HY1-2	LS2-1	LS3-1	MS2-1	01	078	088	HY1-1
变 异 率 %	PSH2		89.9/88.5	91.1/90.7	90.0/90.1	90.9/91.8	91.5/90.3	92.0/93.4	90.9/90.7	90.7/91.8
	HY1-2	11.0		98.2/96.2	97.6/95.1	98.5/96.7	88.9/87.4	88.7/86.8	87.8/84.6	98.4/96.7
	LS2-1	9.5	1.8		98.7/97.8	99.6/98.9	90.2/91.2	90.0/90.1	89.5/88.5	99.5/98.9
	LS3-1	10.8	2.4	1.3		99.1/98.4	89.1/87.4	88.9/88.5	88.4/86.8	98.9/98.4
	MS2-1	9.7	1.5	0.4	0.9		90.0/90.7	89.8/90.1	89.3/87.9	99.8/100
	01	9.1	12.1	10.6	11.8	10.8		98.2/97.3	92.2/91.8	89.8/90.7
	078	8.5	12.3	10.8	12.1	11.0	1.8		92.7/93.4	89.6/90.1
	088	9.7	13.4	11.4	12.7	11.6	8.3	7.7		89.1/87.9
	HY1-1	10.0	1.7	0.5	1.1	0.2	11.0	11.2	11.8	
		PSH2	HY1-2	LS2-1	LS3-1	MS2-1	01	078	088	HY1-1

化不大,具有一定的相同抗原位点。韦婷,王辉平^[14,15]等研究发现不同菌株间存在一定的交叉保护作用,本试验从分子角度为不同血清型鸡源致病性大肠杆菌 1 型菌毛间存在着交叉保护力的现象提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 陶 勇,王红宁,刘书亮.四川规模化鸡场致病性 *E. coli* 血清型、耐药性和质粒图谱的研究[J].中国兽药杂志,2001,35(4):9~13.
- [2] 何庆兰.鸡大肠杆菌病的防治进展[J].养禽与禽病防治,1997,12:30~31.
- [3] 高 崧,刘秀梵,张如宽.禽大肠杆菌病的研究进展[J].养禽与禽病防治,1999,(9):18~20.
- [4] 化丽珍,赵宇军,任家琰.鸡大肠杆菌病综合分析及防治[J].畜禽业,2001,(8):46~47.
- [5] 李永清,甘孟侯.禽大肠杆菌病防制研究进展[J].中国兽医学报,2000,20(4):414~416.
- [6] Beachey E H. Bacterial adherence: Adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces[J]. Infectious Disease, 1981, 143: 325~345.
- [7] Grymah J E, Panigrahy B. Immunogenicity of an oil-

musified *Escherichia coli* (serotype O₁) pili vaccine in chickens[J]. Avian Disease, 1985, 29(4): 1078~1083.

- [8] Grymah J E, Panigrahy B, Williams J D. Immunogenicity of an *Escherichia coli* Multivalent pilus vaccine in chickens[J]. Avian Disease, 1986, 30: 687~689.
- [9] Naved M W, Znsman T, Skite, et al. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity[J]. Avian Disease, 1984, 28: 651~661.
- [10] F. 奥斯伯,等.颜子颖等译.精编分子生物学实验指南[M].科学出版社,1998.
- [11] Orndorff P E. Nucleotide sequence of pilA, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 1985, 162: 640~645.
- [12] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著.分子克隆实验指南(第2版)[M].金冬雁,黎孟枫等译.北京:科学出版社,1998.
- [13] 沈 同,王镜岩.生物化学[M].高等教育出版社,150~154.
- [14] 韦 婷,李康然.鸡大肠杆菌菌苗免疫原性的研究[J].广西农业大学学报,1994,13(4):301~306.
- [15] 王辉平,张中直,甘孟侯.鸡病原性大肠杆菌(血清型 O₇₈)纤毛亚单位苗免疫原性的研究[J].畜牧兽医学报,1994,25(2):174~179.

The PCR and Sequence Analyse of PilA Gene of Type 1 Pili of Pathogenic *Escherichia Coli* Isolated from Chick

YE Ru-jun, WANG Hong-ning*, TAN Bing-qian

(College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan Sichuan, 625014, China)

Abstract: In this paper, five amplified fragment of dominant serotype strains(O₈₉, O₁₁₉, O₁₄₁, O₁₂₇) in sichuan province of china were cloned and sequenced respectively. The results showed that the coding region is 459 bp in size.

The pilA gene sequence, amino acid sequence, secondry structure and antigen characteristic were analyzed by DNASTAR, a kind of bio-software. The result showed that there had homology in avian pathogenic *E. coli*. There had some common antigen side in type 1 pili of avian pathogenic *E. coli*.

Key words: A avian pathogenic *E. coli*, Type 1 pili; PilA gene; PCR; Sequence analysis

* contact author