

用抑制性差减杂交筛选鸭疫里氏杆菌 2 型可能毒力基因

吴芳¹, 蔡建平², 陆承平¹, 范红结^{1*}

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;
2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 为寻找鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 可能的毒力基因, 以鸭疫里氏杆菌 2 型 (RA2) 毒力株 RAF2 及弱毒力株 LY-58 为研究对象, 通过抑制性差减杂交 (SSH) 试验, 从 RAF2 株中获得 14 个特异性差异基因片段。经同源性分析, 其中 6 个差异基因片段分别与外膜蛋白、ATP 结合蛋白、转录调节因子、氨基酸通透酶、胞外蛋白编码基因有同源性, 为可能的毒力基因; 4 个差异基因片段与功能未知蛋白或假定蛋白编码基因有关; 另外 4 个差异基因片段未找到同源序列。利用 PCR 对上述 10 个可能与毒力相关的差异基因片段在 13 株分别属于 8 个不同血清型 RA 中的分布进行了检测, 结果表明除 8 型外, 以上差异基因片段在 RA 中分布普遍。

关键词: 鸭疫里氏杆菌; 抑制性差减杂交; 毒力基因

中图分类号: S852.61⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 04-0102-05

Putative virulence associated genes of *Riemerella anatipestifer* type 2 strains screened by suppression subtractive hybridization

WU Fang¹, CAI Jian-ping², LU Cheng-ping¹, FAN Hong-jie^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to find putative virulent genes of *Riemerella anatipestifer*, suppression subtractive hybridization (SSH) was used between virulent *R. anatipestifer* strain RAF2 and avirulent *R. anatipestifer* strain LY-58. Fourteen RAF2 specific genomic fragments were obtained, and the DNA sequences of these fragments were determined. These DNA fragments involved putative virulence associated genes encoded 10 proteins, including outer membrane, extracellular protein, transcriptional regulator, amino acid permease and unknown functions. Primers for 10 specific DNA fragments were designed and used to detect their distributions in 13 *R. anatipestifer* strains belonging to 8 serotypes by PCR. Results showed that these 10 DNA fragments were widely distributed in most *R. anatipestifer* serotype 2 strains, but not in avirulent strain LY-58. In addition, these fragments could be detected in other serotypes *R. anatipestifer* strains with different distribution.

Key words: *Riemerella anatipestifer*; suppression subtractive hybridization (SSH); virulence associated gene

鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是鸭传染性浆膜炎的重要病原, 除直接引起感染鸭出现急性败血症、纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎和脑膜炎外, 还可以引起干酪性输卵管炎、关节炎、结膜炎等^[1]。目前报道共有 21 种血清型^[2-3], 不同血清型之间缺乏交叉保护^[4], 其中鸭疫里氏杆菌 2 型是国内外被频繁分离到的血清型。

目前尚无检测 RA 毒力菌株的快速和特异性方法, 其致病机制亦不明确, 对该菌的毒力因子及相应毒力基因的研究基本上也处于空白。尽管已经报道了 19 型 RA 的可能毒力基因 (*cam*)^[5], 但其在 RA 毒力株与弱毒力株之间没有差异, 因此推测有其他因子导致了其毒力差异。本试验采用抑制性差减杂交 (SSH) 方法, 对该 RA 毒力菌株与弱毒力菌株之间的遗传差异进行研究, 以期发现新的毒力基因。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及试剂

RA2 型毒力菌株 RAF2 由福建省农业科学院兽医研究所程龙飞助理研究员惠赠，弱毒力菌株 LY-58 由吴芳等^[6]2005 年从安徽和县健康鸭的咽部分离，其他 11 株不同血清型 RA 菌株有 9 株分离自国内，有 2 株分离自新加坡。所有 RA 菌株均用血平板或含犊牛血清的胰酪胨大豆肉汤（TSB）培养。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa（大连）公司。

抑制性差减杂交试剂盒、基因组提取试剂盒均购自 Clontech 公司；地高辛探针标记与检测试剂盒购自 Roche 公司；Taq 酶购自 Promega（上海）公司；质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 细菌基因组 DNA 的制备

参照文献 [7] 的方法略有改进。取摇床过夜振荡培养的细菌液 1.5 mL 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min；沉淀用 567 μL PBS（pH 8.0）重悬，加入 30 μL 的 10% SDS 和 3 μL 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶 K，充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h；加入 100 μL 5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl，充分混匀后再加入 80 μL CTAB 与 NaCl 混合液，混匀后置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min；加入等体积的氯仿与异戊醇混合液（体积比为 24:1）混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min；吸取上清液加入等体积的酚、氯仿和异戊醇混合液（体积比为 25:24:1）混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，吸取上清液加入 0.6 倍体积的异戊醇使 DNA 沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min；沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次，然后在室温下干燥，沉淀用 50 μL 的 TE 缓冲液（pH 8.0）溶解。

1.3 抑制性差减杂交（SSH）

按照基因组提取试剂盒说明书提取 RAF2 和 LY-58 菌株 DNA。分别将 RAF2（tester）及 LY-58（driver）的基因组 DNA 用 *Rsa* I 酶消化，RAF2 DNA 被分成两部分，分别与两种不同的接头连接，按照 Clontech 公司差减杂交试剂盒说明书进行连接效率分析。利用接头外侧序列引物、23S RNA 正向引物及 23S RNA 反向引物、23S RNA 正向引物（重复）分别对大肠杆菌 23S RNA 进行 PCR 扩增。确定连接效率后，进行差减杂交。2 次杂交温度均为 63 $^{\circ}\text{C}$ 。在第 1 次杂交中，过量酶切后的 LY-58 DNA 被分别加入到两种接头连接后的 RAF2 DNA 样品中，样品被变性后开始杂交。在第 2 次杂交中，将以上 2 个杂交样品混合，加入新变性的 LY-58 DNA，63 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。杂交后的产物进行 2 轮 PCR 扩增后所得基因即为 RAF2 株特异性基因序列。PCR 产物纯化后与载体 pMD18-T simple vector 连接，转化于 DH5 α 感受态细胞中，用含有 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆，建立差减文库。

1.4 斑点杂交

分别对 RAF2 及 LY-58 基因组 DNA *Rsa* I 酶切产物进行地高辛标记，对差减杂交的 PCR 产物进行杂交筛选，以鉴定差异片段的特异性。探针标记按地高辛试剂盒说明书进行。

1.5 测序

将鉴定为阳性的克隆重组质粒纯化，送上海博星公司完成测序工作。DNA 同源性分析通过美国 NCBI（National Center for Biotechnology Information）的 BLAST 工具进行。

1.6 差异基因的检测

根据 SSH 后得到的 RA 差异基因片段的序列设计引物，采用常规 PCR 方法分别检测以上差异基因片段在鸭疫里氏杆菌不同血清型菌株中的分布。引物由 TaKaRa（大连）公司合成。

2 结果与分析

2.1 抑制性差减杂交结果分析

将接头效率分析扩增的 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示，两组扩增产物浓度相当，接头连接效率大于 25%（图 1）。

以 RAF2 作为 tester，LY-58 作为 driver，将其基因组 DNA 经 *Rsa* I 酶消化后进行抑制性差减杂交，差减后的 PCR 产物大小为 100 ~ 1 000 bp。差减杂交后的 PCR 产物经纯化后与 pMD18-T simple vector 载体连接，转化感受态大肠杆菌 DH5 α ，扩增后获得 483 个克隆。用 SSH 试剂盒中的巢式引物对随机挑取的 120 个克隆进行菌落 PCR 扩增，经斑点杂交分析后获得 14 个阳性克隆（图 2），在这些阳性

克隆中 DNA 插入片段的大小为 100 ~ 800 bp, 这些插入片段可能代表差异的片段。

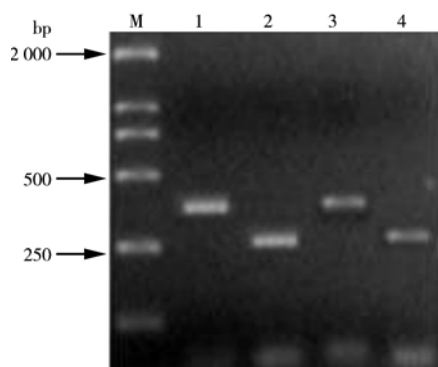


图 1 接头连接效率分析电泳图

Fig. 1 Analysis of ligation efficiency of adaptors

M. DNA marker; 1~2. 以接头 1 连接的大肠杆菌为模板: 1 为外测引物 1 和 23S RNA 正向引物的 PCR 扩增产物, 2 为 23S RNA 正向引物和反向引物 PCR 扩增产物 PCR products using tester 2-1 (adaptor 1R-ligated) as the template, 1 using the PCR primer 1 and 23S RNA forward primer, and 2 using the 23S RNA forward and reverse primer; 3~4. 以接头 2 连接的大肠杆菌为模板: 3 为外测引物 1 和 23S RNA 正向引物的 PCR 扩增产物, 4 为 23S RNA 正向引物和反向引物的 PCR 扩增产物 PCR products using tester 2-2 (adaptor 2R-ligated) as the template, and 3 using the PCR primer 1 and 23S RNA forward primer, and 4 using the 23S RNA forward and reverse primer

2.2 差异基因片段的同源性分析

将获得的 14 个阳性克隆进行测序并将测序结果递交 GenBank 进行同源性分析。在 14 个差异片段中, 有 6 个差异基因片段分别与外膜蛋白、ATP 结合蛋白、转录调节因子、氨基酸通透酶、胞外蛋白编码基因有同源性, 为可能的毒力基因; 4 个差异基因片段与功能未知蛋白或假定蛋白编码基因有关, 其余 4 个片段未发现相应的同源序列。在以上 10 个可能的毒力相关基因片段中, 3[#] 与外膜蛋白有同源性, 51[#] 与氨基酸通透酶具有同源性, 30[#] 与转录调节因子有同源性 (表 1)。

表 1 鸭疫里氏杆菌 RAF2 株基因组差异片段

Table 1 Summary of homology search of *Riemerella anatipestifer* strain RAF2 specific fragment

编号 No.	SSH 片段 SSH fragment	大小/bp Insert size	同源序列 Sequence homology	E 值 E value	登陆号 GenBank accession No.
1	3 [#]	692	预计外膜蛋白 Predicted outer membrane	5e-13	DQ508421
2	49 [#]	662	未知蛋白 Function unknown protein	4e-09	DQ508422
3	50 [#]	609	胞外蛋白 Extracellular protein	4e-08	DQ508423
4	51 [#]	525	氨基酸通透酶 Amino acid permease	2e-15	DQ508425
5	57 [#]	423	假设蛋白 Hypothetical protein	2e-13	DQ508426
6	45 [#]	394	假设蛋白 Hypothetical protein	1e-07	DQ508428
7	56 [#]	345	可能的 ATP 结合蛋白 Putative ATP-binding protein	1e-07	DQ508429
8	43 [#]	307	胞外蛋白 Extracellular protein	e-121	DQ508430
9	6 [#]	302	未知蛋白 Function unknown protein	e-134	DQ508431
10	30 [#]	235	转录调节因子 Transcriptional regulator	8e-56	DQ508432

Note: SSH = Suppression subtractive hybridization

2.3 差异基因片段的分布

根据基因测序结果分别设计 3[#]、49[#]、50[#]、51[#]、57[#]、45[#]、56[#]、43[#]、6[#]、30[#] 差异基因片段的引物, 采用 PCR 方法检测以上基因在 RA 1、2、5、8、10、11、21 等不同血清型中菌株的分布。结果表明, 在待测的 13 株细菌中, 除 2 型 LY-58 株为弱毒株外, 其余的均为 RA 毒力菌株。此结果显示, 以上基因在 RA 不同血清型菌株中分布广泛, 但在 RA8 型分离株中未检测到 3[#]、49[#]、50[#]、57[#] 号基因片段 (表 2)。

3 讨论

鉴定及检测微生物的毒力基因对于了解细菌的致病机制甚为重要。比较毒力株与弱毒力株或无毒力株之间的基因组, 无疑对鉴定那些只在毒力株中存在的可能与毒力相关的基因区域有很大帮助。芯片技

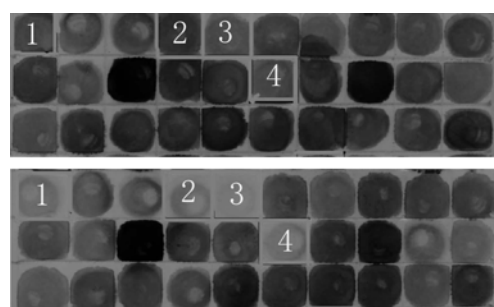


图 2 差减片段斑点杂交分析

Fig. 2 Dot-blot hybridization analysis of subtracted fragments

以 tester (上) 和 driver (下) 基因组 DNA 为探针进行杂交筛选, 数字显示的是 tester 特异克隆。Membranes were screened by hybridization with genomic DNA from tester (up) and driver (down). Number markers showed true tester-specific clones.

表2 差异基因片段在 RA 不同血清型菌株中的分布

Table 2 The prevalence of specific gene fragments in different serotypes RA strains

菌株 Strains	血清型 Serotype	来源 Source	SSH 差减出的基因片段 SSH fragment										
			3 [#]	49 [#]	50 [#]	51 [#]	57 [#]	45 [#]	56 [#]	43 [#]	6 [#]	30 [#]	
RAF2	2	福州 Fuzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY-58	2	和县 Hexian	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BjR1	1	北京 Beijing	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZjR1	1	杭州 Hangzhou	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GdR1	1	广州 Guangzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZjR2	2	杭州 Hangzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GdR21	21	广州 Guangzhou	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GdR21	21	广州 Guangzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GdR5	5	广州 Guangzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FR5	5	福州 Fuzhou	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GdR 8	8	广州 Guangzhou	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
R10	10	新加坡 Singapore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R11	11	新加坡 Singapore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示 PCR 检测阳性,“-”表示检测阴性。“+” means positive results,“-” means negative results.

术及蛋白质组技术对于此类研究有很大的应用价值,但目前获得的细菌性病原的全序列仍是少数,故芯片技术的应用仍然受到很大的限制。抑制性差减杂交技术是 Diatchenko 等^[8]在 1996 年发明的一项新基因克隆技术。该技术是抑制 PCR 与消减杂交技术相结合的,简单、快速地分离差异基因的方法,可对 2 份 cDNA 样品进行比较。通过连接接头、消减杂交和两轮抑制性 PCR,可以特异性扩增那些有差别表达的 cDNA 片段。1998 年 Akopyants 等^[9]对 SSH 技术进行改良,用于细菌基因组比较分析,为病原体中未知基因的筛选和微生物基因组差异、分子进化的研究提供了重要的技术手段^[10-11]。SSH 技术目前已应用于鉴定细菌^[12]、毒力岛^[13],发现插入序列^[14]及构建检测探针^[15]等多方面。

外膜蛋白是革兰氏阴性菌细胞壁的特有成分,镶嵌于细菌外膜的中间,在维持外膜结构、物质转运等方面发挥着重要作用,通常还是一种保护性抗原^[16]。研究证实,多种病原菌能在缺铁条件下表达一种铁调控外膜蛋白,以便在缺铁条件下从宿主体内竞争摄取铁离子^[17]。经同源性查找,本研究发现的 3[#]片段与外膜蛋白具有同源性,推测其与 RA 的毒力相关。氨基酸通透酶在金黄色葡萄球菌的致病过程中起重要作用,通过突变其脯氨酸通透酶基因 (*putP*),发现其在致传染性心内膜炎的模型中毒力显著减弱^[18]。本研究发现的 51[#]片段与氨基酸通透酶有同源性,推测其与 RA 的毒力相关。在铜绿假单胞菌和肺炎链球菌的感染过程中,转录调节因子对于其在感染模型中保持完整毒力是必须的^[19]。这些转录调节因子可以调节组织特异性毒力因子的表达。*rtrA* 是肺炎链球菌的一个调节子,其对肺炎链球菌在鼻咽部的定植及肺部的感染是必不可少的。本试验中发现的 RA 可能的转录子是否与 *rtrA* 的功能相关还有待进一步研究。试验中还发现几种功能未知的蛋白,但目前鸭疫里氏杆菌的全基因组测序工作尚没有开始,需通过基因步移或借助 RA 基因文库才能获得以上蛋白的完整基因,从而开展其功能研究。

本试验采用 SSH 技术成功构建了高特异性的 DNA 差减文库,这必将减少克隆和筛选鸭疫里氏杆菌毒力相关基因的盲目性。目前鸭疫里氏杆菌毒力因子的研究不够深入,没有发现明确区分鸭疫里氏杆菌毒力和非毒力菌株的标志基因,本研究发现的 10 个 RA 基因片段,将为 RA2 不同毒力菌株的 PCR 检测方法的建立奠定良好基础,并可借助基因步移等技术来发现完整的毒力基因,以便开展 RA 致病机制研究。

参考文献:

- [1] Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, et al. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudative, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophga* rRNA homology group [J]. *Inter J System Bacteriol*, 1993, 43: 768-776
- [2] Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand [J]. *Avian Pathol*, 1995, 24: 195-199
- [3] Sandhu T S, Leister M L. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from poultry in different countries [J]. *Avian Pathol*, 1991, 20: 233-239
- [4] Sandhu T S. Immunization of white Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection [J]. *Avian Dis*, 1979, 23: 662-669

- [5] Crasta K C, Chua K L, Subramaniam S, et al. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer* [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 1932-1939
- [6] 吴芳, 周红, 蔡建平, 等. 一株无致病力的鸭疫里氏杆菌的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2007, 41(9): 54-57
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- [8] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030
- [9] Akopyants N S, Fradkov A, Diatchenko L, et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13108-13113
- [10] Tinsley C R, Nassif X. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 11109-11114
- [11] Winstanley C. Spot the difference: applications of subtractive hybridization to the study of bacterial pathogens [J]. J Med Microbiol, 2004, 51: 459-467
- [12] Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready P M, et al. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3759-3762
- [13] Janke B, Dobrindt U, Hacker J, et al. A subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655 [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199: 61-66
- [14] Sawada K, Kokeguchi S, Hongyo H, et al. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis* [J]. Infect Immun, 1999, 67: 5621-5625
- [15] Parsons Y N, Panagea S, Smart C H M, et al. Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4607-4611
- [16] Korn A, Rajabi Z, Wassum B, et al. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by of major outer membrane protein OmpA of gram negative bacteria [J]. Infect Immun, 1995, 63: 2697-2705
- [17] Ikeda J S, Hirsh D C. Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida* [J]. Infect Immun, 1988, 56: 2499-2502
- [18] Bayer A S, Coulter S N, Stover C K. Impact of the high-affinity proline permease gene(*putP*) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis [J]. Infect Immun, 1999, 67: 740-744
- [19] Hava D L, Hemsley C J, Camilli A. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae rlrA* pathogenicity islet by *RlrA* [J]. J Bacteriol, 2003, 185: 413-421

责任编辑: 周广礼