

临床分离鸡毒支原体粘附素蛋白编码基因 *pvpA* 的分子特征

陈继荣, 曾振灵, 邓碧琴, 阎化领, 李旭宁, 蒋红霞

(华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642)

摘要: 【目的】探讨中国临床分离鸡毒支原体粘附素蛋白 (PvpA) 编码基因 *pvpA* 的分子特征, 为进一步了解鸡毒支原体致病机制、建立新的鉴别诊断方法奠定基础。【方法】利用巢式 PCR 法对 41 株广东、四川和北京地区临床分离的鸡毒支原体和 3 株参考株的 *pvpA* 基因进行扩增并测序, 分析中国临床分离株 *pvpA* 的基因变异特征。

【结果】所有临床分离株 *pvpA* 基因分子特征与强毒株 S₆, BG_{44T} 一致, 与疫苗株 F₃₆ 完全不同。临床分离株 *pvpA* 基因 C-末端 DR-1、DR-2 区域 (第 670 位~第 1 056 位) GC 的含量为 53.52%, 明显高于鸡毒支原体的平均 GC 含量; 所有临床分离株及 S₆、BG_{44T} 在 DR-1 和 DR-2 之间丢失 60 个碱基。推测该区域编码的氨基酸序列富含脯氨酸, 高达 30.27%; 重复四肽 Pro-Arg-Pro-X 共出现 10 次, X 为甲硫氨酸 6 次、甘氨酸 1 次、天冬酰胺 1 次、谷氨酰胺 2 次。而疫苗株 F₃₆ PvpA 只有 DR-1 区域, 与 R 株相比间隔 25 肽缺失了 24 个肽, DR-2 区域全部丢失。【结论】临床分离株 *pvpA* 基因变异特征与强毒株 S₆ 一致, 与疫苗株 F₃₆ 的变异特征有显著差异, 可以把 *pvpA* 基因作为靶标以建立临床鸡毒支原体流行病学调查和诊断的新方法。

关键词: 鸡毒支原体; *pvpA* 基因; 粘附蛋白; 变异

Molecular Characterization of Adhesin-Encoding Gene *pvpA* Among Isolated *Mycoplasma gallisepticum* from Guangdong, Sichuan and Beijing

CHEN Ji-rong, ZENG Zhen-ling, DENG Bi-qin, YAN Hua-ling, LI Xu-ning, JIANG Hong-xia

(College of Veterinary Medicine, Guangdong Key Laboratory for Veterinary Drug Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】The molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum pvpA* gene which encodes a putative cytoadhesin protein was investigated, which would be helpful for developing a new detection and diagnosis methods by using the variable *pvpA* gene as the target as well as better understanding the pathogenic mechanism of *M. gallisepticum*. 【Method】The *pvpA* genes of both 41 isolated *M.gallisepticum* from Guangdong, Sichuan and Beijing and 3 references *M. gallisepticum* (S₆, BG_{44T}, and F₃₆) were obtained by nest-PCR, and sequenced. 【Result】It showed that the *pvpA* genes of 41 *M. gallisepticum* isolates shared the identical variation with S₆, BG_{44T}, and showed significant differences with live *M. gallisepticum* vaccine, F₃₆. The G+C content between DR-1 and DR-2 of *pvpA* gene C-terminal of all isolates was 53.52%, apparently higher than the average G+C content for the *M. gallisepticum* genome. 60 bases were deleted within DR-1 and DR-2 among 41 isolates as well as S₆, BG_{44T}. Besides, PvpA molecule in this region possesses a proline-rich carboxyotide motif (Pro-Arg-Pro-X) which repeated 10 times, X is Met, Gly, Asn, Glu for 6, 1, 1, 2 times, respectively. However the PvpA molecule of live vaccine F₃₆ was only left DR-1. 24 of 25 peptides linked between DR-1 and DR-2 were missed. The whole DR-2 was disappeared. 【Conclusion】Molecular variability of the *pvpA* gene was obviously different among isolated *M.gallisepticum* and live vaccine F₃₆ suggesting that the *pvpA* gene can be used as a target for diagnosis and epidemiology of *M.gallisepticum*.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*; *pvpA* gene; Adhesin cytoadhesin protein; Variability

收稿日期: 2007-10-04; 接受日期: 2008-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300261, U0631006) 和教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目 (IRT0723)

作者简介: 陈继荣 (1982-), 男, 广东海丰人, 硕士研究生, 研究方向为动物细菌耐药性。通讯作者蒋红霞 (1968-), 女, 新疆库尔勒人, 副教授, 博士, 研究方向为兽医药理学、兽药安全评价。Tel: 020-85280237-806; Fax: 020-85284896; E-mail: hxjiang@scau.edu.cn

0 引言

【研究意义】鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 是众所周知危害养禽业发展的重要病原, 能够引起鸡的慢性呼吸道病 (chronic respiratory disease, CRD), 并能与大肠杆菌和/或病毒合并继发感染, 给养禽业造成重大经济损失^[1,2]。国内外学者对 MG 的研究超过 60 年, 但支原体病, 尤其 MG 感染, 至今仍然是现代集约化养禽业的防控重点。MG 细胞膜表面存在多种粘附有关蛋白, 参与支原体定植和侵袭宿主细胞, 其中 PvpA 蛋白是存在于 MG 细胞膜表面、能够被鸡的免疫系统识别的高频变异蛋白, 其通过变异使病原逃避宿主的免疫防御而持续存在于感染鸡群^[3,4]。因此, 探讨中国临床分离 MG PvpA 蛋白变异特征可为建立新的 MG 检测、诊断和分型技术奠定理论基础, 同时也对深入研究病原致病机制、寻找防治策略具有重要意义。【前人研究进展】支原体 (*Mycoplasma*) 是目前所知能独立生活、自行繁殖的最小微生物, 形态上缺乏细胞壁而仅有 3 层单位膜, 大多呈细颈瓶状, 有一个突出的顶端, 富含粘附蛋白, 能顽固地粘附在呼吸道或泌尿道上皮细胞上^[5,6]。支原体粘附于宿主细胞是成功定植和确保致病的前提条件。大量研究表明这种粘附过程是由主要的粘附分子 (P1 和 P30) 和几种高分子量的粘附有关膜蛋白相互作用的多因子过程。这些膜蛋白是细胞的结构蛋白, 有利于支原体的横向运动和粘附蛋白在顶端部位聚集^[7]。目前在 MG 已鉴定了 3 种粘附蛋白 (MGC1、MGC2 和 GapA), 其中 MGC2 聚集在顶端部位, 功能上参与粘附过程。比较 *M. gallisepticum* (MGC1、MGC2 和 GapA)、*M. pneumoniae* (P30) 和 *M. genitalium* (P32) 粘附有关蛋白, 发现均有富含脯氨酸的 C 末端, C 末端包含重复编码序列, 氨基酸序列具有相似性。表明这些致病性支原体都含有一族用于广泛定植不同宿主的保守粘附蛋白^[8-11]。Boguslavsky 近来又鉴定了 *M. gallisepticum* 的一种粘附蛋白 PvpA, PvpA 有以下几点特征: ①PvpA 是一个完整的膜表面蛋白, 有一个游离的 C-末端; ②PvpA 拥有一个能被 3 个截然不同 *M. bovis* 的表面脂蛋白识别的抗原表位; ③PvpA 表达时能自发高频变异; ④PvpA 在不同菌株间表现出大小差异; ⑤PvpA 不是脂蛋白。PvpA 大小在 48~55 kD 之间, 并且推测 *pvpA* 表达与否或者表达的差异都会引起 MG 的抗原性差异。与其它粘附蛋白一样, PvpA 蛋白位于细胞膜表面,

很容易被抗粘附素蛋白识别^[2,3], 在鉴别诊断上具有潜在的应用价值。【本研究切入点】PvpA 是能够被鸡免疫系统识别的相变异蛋白, 在免疫电子显微镜下观察到 PvpA 蛋白位于细胞膜表面, 尤其位于支原体细胞的顶端结构, 说明 PvpA 蛋白参与支原体的粘附过程, 而且 PvpA 和特异性免疫原蛋白 p67a 在 MG 感染期不同时间内可发生表达转换, 使支原体能够逃避宿主的免疫防御而适应不同感染阶段宿主内环境的改变。笔者以前的研究 (资料未发表) 发现, 所有临床分离 MG 经 SDS-PAGE 后在约 55 kD 处均发现有高表达的蛋白条带, 推测 PvpA 蛋白可能广泛存在于中国兽医临床野生型 MG 中。目前国内尚未有 PvpA 蛋白的研究报道, 虽然国外有几篇相关报道, 但由于 PvpA 是相变异蛋白, 不同环境下变异特征有所区别, 因此本研究试图以 PvpA 粘附蛋白为切入点, 探讨中国临床分离 MG 编码 PvpA 蛋白基因的变异特征。【拟解决的关键问题】由于 MG PvpA 蛋白是相变异蛋白, 而且不同 MG 之间存在大小的差异, 因此本研究的关键问题是建立高效率、特异性强的 *pvpA* 基因片段扩增方法, 进而探讨兽医临床分离株 *pvpA* 基因变异特征。

1 材料与方法

1.1 菌株

41 株, 分离自 2004 年 6 月至 2005 年 2 月广东、四川和北京等地区疑似 *M. gallisepticum* 感染鸡, 经菌落形态观察、血凝抑制试验和分子生物学鉴定后, 由本研究室冻干保存; 强毒株 S₆、北京分离株 BG_{44T} 由本实验室保存, 疫苗 F₃₆ 株购自青岛易邦生物工程有限公司, 批号 2007005。

1.2 试剂

水解乳蛋白 (lactalbumin hydrolysate): 购自英国 Oxoid 公司; 醋酸铊: 购自美国 Sigma 公司; 琼脂粉: 购自英国 Difco 公司; 氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、七水硫酸镁、氢氧化钠、酚红、葡萄糖均为国产试剂; PremixTaq 购自 TaKaLa 大连宝生物有限公司。

1.3 菌株的培养及 DNA 模板的制备

参考文献[5]的方法将保存的菌种用 FM-4 液体培养基复苏并传代培养。菌体 DNA 模板制备如下: 12 000 r/min 离心收集 20 ml 菌体, 弃其上清液, 用 30 μ l 去离子水重悬菌体, 100℃煮沸 10 min, 再冰浴 5 min, 然后 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清于新的 Eppendorf 管中, -20℃保存备用。

1.4 引物设计

巢式 PCR 第一对引物根据 GenBank 收录的 MGR 株 *pvpA* 基因序列, 用 Primer 5.0 设计: P1F: 5'GAAAA TGTTGAAGCCACT3', P1R: 5'GGATTATTTGGTGTT GGA3'; 第二对引物参考文献[7]: P2F: 5'GGTAGTCCT AAGTTATTAGGTC3', P2R: 5'GGACGTSGTCCTGG CTGGTTAGC3'。扩增产物涵盖了 *pvpA* 基因 C-末端的 DR-1、DR-2 重复序列区域, 扩增片段大小约 497 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成 (图 1)。



图 1 *pvpA* 基因巢式 PCR 引物位置

Fig. 1 Schematic diagram of *pvpA* indicating the location of primers for nest-PCR

1.5 *pvpA* 基因的 PCR 及序列测定

先用第一对引物对模板 DNA 进行扩增, 反应体系为 25 μ l, 其中 DNA 模板 2.0 μ l, P1F、P1R 各 0.5 μ l, Premix Taq 12.5 μ l, 用纯净水补足体积。PCR 运行参数: (94 $^{\circ}$ C, 5 min) \times 1 + [(94 $^{\circ}$ C, 30 s) (55 $^{\circ}$ C, 30 s) (72 $^{\circ}$ C, 30 s)] \times 30 + (72 $^{\circ}$ C, 5 min) \times 1; 以上述 PCR 产物为模板, 用第二对引物再扩增, 反应体系为 50 μ l, 其中 DNA 模板 3.0 μ l, P2F、P2R 各 1 μ l, Premix Taq 25 μ l, 用纯净水补足体积。PCR 运行参数:

(94 $^{\circ}$ C, 5 min) \times 1 + [(94 $^{\circ}$ C, 30 s) (55 $^{\circ}$ C, 30 s) (72 $^{\circ}$ C, 30 s)] \times 30 + (72 $^{\circ}$ C, 5 min) \times 1; PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, PCR 产物直接送往英骏公司测序。

1.6 序列比对分析

41 株临床分离株和 3 株参考株 *pvpA* 基因的测序结果用 DNA START 软件进行分析比较。

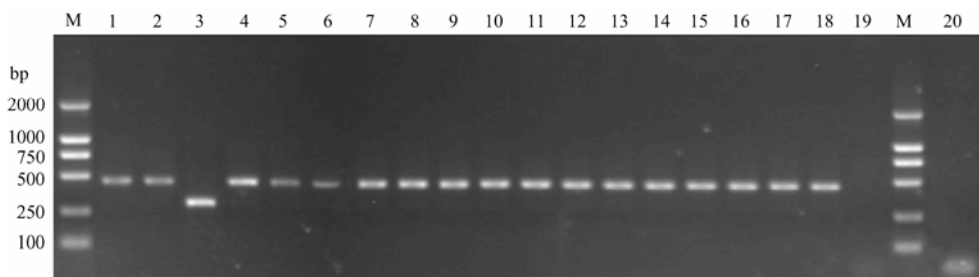
2 结果与分析

2.1 DNA 模板的制备和 *pvpA* 基因的扩增

采用水煮法提取鸡毒支原体 DNA, 经 0.8% 凝胶电泳观察, 电泳条带清晰无拖尾现象, 说明水煮法制备的鸡毒支原体 DNA 模板能用于进一步的扩增。用巢式 PCR 的方法对 S₆、BG_{44T} 和临床分离株的 *pvpA* 基因进行扩增, 结果均在约 500 bp 处可见清晰的条带; 疫苗株 F₃₆ 在约 250 bp 处扩增出一清晰的条带; 大肠杆菌和空白对照均无条带出现 (图 2)。

2.2 *pvpA* 基因 DR-1、DR-2 区域分析

根据 GenBank 登录的鸡毒支原体 R 株序列设计引物扩增 S₆、BG_{44T} 和临床分离株 *pvpA* 基因的部分序列, 发现扩增产物大小为 437 bp, 比预期的片段大小少了 60 个碱基; 疫苗株 F₃₆ 扩增产物大小约 263 bp, 比预期大小少 234 bp。图 3 列出了本研究 3 株参考株和临床分离株及国外报道的疫苗株 TS-11、分离自美国、土耳其、伊朗的 MG 在 *pvpA* 基因 C-末端 DR-1、DR-2 区域核苷酸缺失的类型; 所有不同来源的临床分离株 (广东、四川和北京) 之间 *pvpA* 基因部分核苷酸序列的同源性在 99.4%~100%, 推测的氨基酸序列同源性的 97.2%~100%; 与国外报道的 R 株比较, 同源性

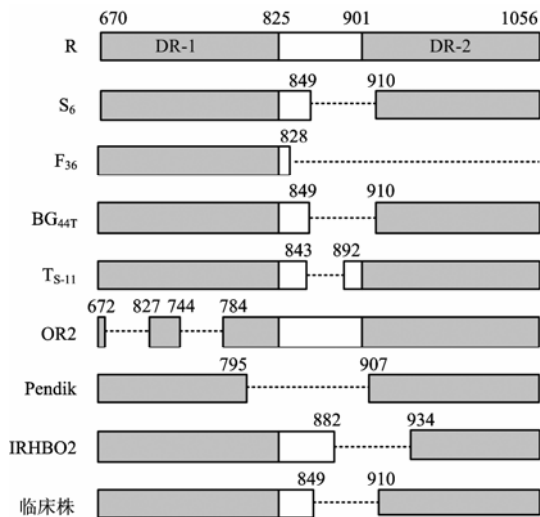


1: BG_{44T}; 2: S₆; 3: F₃₆; 4~18: 分离自广东、四川、北京地区的鸡毒支原体 (BJ2, BJ7, BJ14, DY2, GM4, TS4, TS5, TS6, TS8, TS10, TS26, TS32, NEI2, NEI4, SU15); 19: 大肠杆菌; 20: 空白对照; M: DL2000 marker

1: BG_{44T}; 2: S₆; 3: F₃₆; 4-18: Isolated *M. gallisepticum* from Guangdong, Sichuan and Beijing (BJ2, BJ7, BJ14, DY2, GM4, TS4, TS5, TS6, TS8, TS10, TS26, TS32, NEI2, NEI4, SU15); 19: *E. coli*; 20: Negative control; M: DL2000 marker

图 2 参考株和部分临床分离鸡毒支原体 *pvpA* 基因 PCR 产物电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of partial *pvpA* gene from reference strains and isolated strains of *M. gallisepticum*



TS-11 为疫苗株(参考文献[2]); OR2、Pendik 和 IRHB02 分别为 GenBank 上登录的分离自美国(序列号: AY556373)、土耳其(序列号: DQ989519)和伊朗(序列号: EF188261)的鸡毒支原体; 临床株是分离自中国广东、四川、北京等地的临床分离株
TS-11, a vaccine strain (published in reference [2]); OR2, Pendik, IRHB02 were isolated *M. gallisepticum* from American, Turkey and Iran submitted to GenBank, accession number were AY556373, DQ989519, EF188261, respectively; isolated strains in present study were obtained from Guangdong, Sichuan and Beijing in China

图 3 与 R 株相比不同来源鸡毒支原体 *pvpA* 基因 C-末端 DR-1 和 DR-2 区域间碱基缺失
Fig. 3 Deletion within DR-1, DR-2 of the *pvpA* gene C-terminal region of different origin *M. gallisepticum* compared with R strain

为 78.6%~79.1%，推测的氨基酸同源性为 74.4%~75.2%；与模式株 S₆ 相比，核苷酸序列同源性达 99.4%~100%，氨基酸同源性达 99.1%~100%；与 F₃₆ 疫苗株相比，核苷酸序列同源性为 89.9%~90.6%，氨

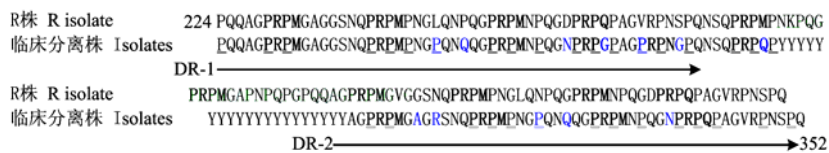
基酸同源性为 84.9%~86.8%。进一步分析 *pvpA* 基因 C-末端 DR-1、DR-2 区域，即 *pvpA* 基因的第 670 位~第 1 056 位，发现该区域 GC 的含量为 53.52%，明显高于 MG 的平均 GC 含量；与 R 株相比，所有临床分离株、S₆、BG_{44T} 在 DR-1 和 DR-2 之间丢失 60 个碱基，*pvpA* 基因 C-末端 DR-1、DR-2 区域富含脯氨酸，高达 30.27%；重复四肽 Pro-Arg-Pro-X 共出现 10 次，X 为甲硫氨酸 6 次、甘氨酸 1 次、天冬酰胺 1 次、谷氨酰胺 2 次。而疫苗株 F₃₆ 只有 DR-1 区域，间隔 25 肽缺失 24 肽，DR-2 区域全部丢失(图 4)。

另外，与 R 株 *pvpA* 基因的 DR-1、DR-2 区域比较，几乎所有临床分离株在这个区域均发生 12 处氨基酸改变，60 个碱基缺失导致 20 个氨基酸丢失(表)，氨基酸的丢失大部分发生在 DR-1、DR-2 两个区域之间的 25 肽。

3 讨论

已有大量研究证实支原体具有显著改变抗原成分以逃避宿主免疫反应的能力，使致病支原体在感染期间得以持续存活于鸡群^[12-14]。因此调查宿主体内病原抗原变异就非常有意义。已报道了几种种特异性免疫原蛋白，如 p82、p67、p64、p56、p54、p35、p26、p24，其中有一些在宿主体内外能够发生表型变异，如 PvpA 和 p67a 在 MG 感染期不同时间内可发生表达转换，使支原体能够逃避宿主的免疫防御而适应不同感染阶段宿主体内环境的改变^[14]。GapA 和 CrmA 共同表达是 MG 黏附和毒力所必须^[15]。

PvpA 是能够被鸡的免疫系统识别相变异蛋白，随环境改变主要表现在分子量大小的差异，以此逃避宿主的免疫系统而得以在宿主体内定植，同时 PvpA 蛋



带箭头的线标示的是 DR-1 和 DR-2 区域的位置和氨基酸序列，重复 10 次的四肽 PRPX (X 为 Met, Gln, Asn, 或 Gly) 用黑体字标示，脯氨酸残基用双下划线标示，临床分离株 DR-1 和 DR-2 间缺失的氨基酸残基用 Y 代替
Labeled arrows show the position and amino acid sequences of DR-1, DR-2. A repeated motif consisting of four amino acids, PRPX (X is Met, Gln, Asn, or Gly), which appears 10 times is highlighted by boldface. The repeated proline residues are marked by double line. Y stands for the deletion amino acid residues within DR-1 and DR-2 in PvpA of isolated *M. gallisepticum* in China

图 4 与 R 株相比中国临床分离鸡毒支原体 PvpA 蛋白 C-末端 DR-1、DR-2 区域氨基酸序列和结构特征
Fig. 4 Amino acid sequence and structural features of the DR-1, DR-2 region of the PvpA protein from isolated *M. gallisepticum* in China compared with R strain

表 与 R 株相比 41 株临床分离鸡毒支原体 *pvpA* 基因 C-末端 DR-1 和 DR-2 区域间发生的碱基缺失

Table Amino acid alteration within DR-1, DR-2 of *pvpA* gene C-terminal among 41 isolated *M. gallisepticum* compared with R strain

突变位置 Mutation position	碱基的改变 Base mutation	推测的氨基酸的改变 Putative amino acid alteration	突变菌株数 No. of strain
740	CTA→CCA	L→P	41
749	CCA→CAA	P→Q	41
781	GAT→AAT	D→N	41
793、794	CAA→GGA	Q→G	41
805、806、807	TGT→CCA	V→P	41
817	AGC→GGC	S→G	41
844、845、846	ATG→CAA	M→Q	41
850~909	缺失 Deletion	缺失 20 个氨基酸 20 amino acid deleted	41
932	GTT→GCT	V→A	41
937	GGA→AGA	G→R	40
971	CTA→CCA	L→P	41
980	CCA→CAA	P→Q	41
1012	GAT→AAT	D→N	41

白表达与否或表达变异也可导致抗原性的改变。Boguslavsky 报道 PvpA 蛋白是一个 C-末端富含脯氨酸 (28%) 的粘附有关蛋白, C-末端有两个 (DR-1、DR-2) 各含有 52 个氨基酸的直接重复序列, 中间间隔 25 肽, 还有一个重复 14 次的四肽模式 (Pro-Arg-Pro-X)。PvpA 蛋白变异主要发生在这个特征区域, 导致 PvpA 蛋白分子量存在 45~55 kD 大小的差别^[3]。

目前, 国内尚无有关 PvpA 蛋白的研究报道, 对于中国兽医临床 MG PvpA 蛋白如何发生变异及由此对病原定植和致病机制的影响尚不清楚。本研究建立了利用巢式 PCR 的方法扩增编码 MG 粘附素蛋白 *pvpA* 基因的特异性方法, 结果表明该法重复性好, 对所有临床分离株均能扩增出约 500 bp 的目的条带, 并且无非特异性条带出现。对所有临床分离株 *pvpA* 基因 DR-1、DR-2 区域进行分析发现, 在 DR-1~DR-2 区域间 GC 的含量为 53.52%, 明显高于 MG 的平均 GC 含量; 在 DR-1、DR-2 两个重复序列间及 DR-2 区域内缺失 20 个氨基酸, 而 Pillai 调查了 55 株家禽分离的 MG *pvpA* 基因的变异, 发现分别存在 DR-1、DR-2 之间缺失 20 个氨基酸和 C-末端缺失 76 个氨基酸的两种变异类型, 导致 55 株菌 *pvpA* 基因 PCR 结果存在大小差异^[16]。Liu 还报道由于 DR-1、DR-2 区域

碱基缺失不同导致产生 497 bp、410 bp 和 267 bp 的 *pvpA* 基因大小的差异^[7]。因此 PvpA 蛋白大小的改变是由于 C-末端富含脯氨酸及两个直接重复序列内氨基酸丢失所致^[15]。另外本研究发现这个区域富含脯氨酸的四肽 Pro-Arg-Pro-X 重复出现 10 次, X 分别为甲硫氨酸 (8 次)、甘氨酸 (1 次)、天冬酰胺 (1 次)、Q 谷氨酰胺 (1 次), 与 S₆ 株、BG_{44T} 变异特征完全一致。而 Boguslavsky 报道的 R 株在重复出现 10 次的 4 肽中, 甲硫氨酸 8 次、Q 谷氨酰胺 (2 次)。值得注意的是, 虽然临床分离株在 DR-1 和 DR-2 区域之间丢失了 60 个碱基, 但通过碱基突变仍然使编码蛋白保持 4 肽 Pro-Arg-Pro-X 重复出现 10 次。这些含有脯氨酸重复单元的蛋白作为主要免疫原的表面抗原, 能增加原核和真核病原的识别, 大多数的这些重复氨基酸序列可与宿主细胞相互作用, 还可结合特异性配体, 可以说每个蛋白都可与原核细胞表面相互作用, 并在支原体的致病性方面具有重要作用^[3]。因此本研究结果表明, 中国临床分离 MG PvpA 蛋白虽然发生变异, 但作为粘附素蛋白仍然可被宿主细胞识别, 并且在致病性方面可能起重要作用。

Boguslavsky 还发现, 尽管 K5969 与 R 株 *pvpA* 基因大小一致, 但由于 A5969 的 DR-1 区的 793 位发生无意义突变引起 PvpA 翻译提前终止, 导致 A5969 株不表达 PvpA 蛋白, R 株则表达了 55 kD 的产物^[2]。而本研究中在 793 位发生有意义的氨基酸突变, 是否因此引起 PvpA 翻译的停止还不很清楚, 但结果都造成 PvpA 大小改变。

MG 是众所周知危害养禽业发展的重要病原, 国内外学者对 MG 的研究超过 60 年, 但支原体病, 尤其 MG 感染, 至今仍然是现代集约化养禽业的防控重点。在中国鸡群实现 MG 净化十分困难, 因此临床上控制 MG 感染的主要措施是接种疫苗和使用抗菌药物。长期大量使用抗菌药物, 一方面筛选了耐药菌株使得治疗效果下降甚至失效^[17-20], 另一方面尽管用药后从气管棉拭中分离不出 MG, 但 MG 并未根除, 感染鸡群中仍可持续存在, 当鸡群病毒再感染或者接种病毒疫苗时可再次激发 MG 感染^[5]。免疫接种弱毒苗或活疫苗一直作为控制 MG 感染的重要措施, 中国兽医临床常用的 MG 疫苗为 F₃₆。但广泛使用疫苗具有毒力回复导致非支原体鸡群感染 MG 的危险。因此, 需要建立一种很好的检测和分型方法来评价散布于野毒株中疫苗的效力, 并作为一种诊断方法用于 MG 流行病学调查。Boguslavsky 对 MG 疫苗株、模式株及临

床分离株的 *pvpA* 基因进行了研究, 结果表明不同 MG 株间 *pvpA* 大小存在差异, 揭示 *pvpA* 基因可以作为病原分型及诊断的依据^[3]。Naola 利用 *pvpA*、*mgC2*、*gapA*、*MGA_0319* 作为靶标序列对分离自美国、澳大利亚、英国的 MG 分离株进行分型, 证实上述 4 种基因都是 MG 保守膜表面蛋白^[11]。

4 结 论

从广东、四川及北京临床分离到的 41 株致病性支原体 *pvpA* 基因与强毒株 S₆、BG_{44T} 存在完全一致的变异模式, 而与疫苗株 F₃₆ 的变异模式完全不同, 推测目前中国临床散发或爆发的 MG 可能是 S₆ 强毒株型。巢式 PCR 法对扩增 *pvpA* 基因具有很好的特异性, 可以以 *pvpA* 基因为靶标建立鸡毒支原体流行病学调查和临床诊断的新方法。

References

- [1] 宁宜宝. 鸡群健康的潜在杀手——鸡毒支原体病的防制. 中国兽医杂志, 2003, 39(10): 44-46.
Ning Y B. Potential threat to the health of chicken herd—prevention and control of *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Journal of Chinese Veterinary Medicine*, 2003, 39(10): 44-46. (in Chinese)
- [2] Hudson P, Gorton T S, Papazisi L, Cecchini K, Frasca S, Geary S J. Identification of a virulence-associated determinant, dihydroliipoamide dehydrogenase (*lpd*), in *Mycoplasma gallisepticum* through *in vivo* screening of transposon mutants. *Infection and Immunity*, 2006, 74: 931-939.
- [3] Boguslavsky S, Menaker D, Lysnyansky I, Liu T, Levisohn S, Rosengarten R, Garcia M, Yogev D. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum pvpA* gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infection and Immunity*, 2000, 68(7): 3956-3964.
- [4] Yogev D, Menaker D, Strutzberg K, Levisohn S, Kirchhoff H, Hinz KH, Rosengarten R. A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infection and Immunity*, 1994, 62: 4962-4968.
- [5] 蒋红霞, 陈杖榴, 邓旭明, 曾振灵, 雷连成, 孙风霞, 郝丽梅, 邹啸环. MG 敏感株与耐药株超微结构的比较. 中国预防兽医学报, 2004, 26(6): 439-442.
Jiang H X, Chen Z L, Deng X M, Zeng Z L, Lei L C, Sun F X, Hao L M, Zou X H. Ultrastructural comparison on sensitive and resistance strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2004, 26(6): 439-442. (in Chinese)
- [6] Athamna A, Rosengarten R, Levisohn S, Kahane I, Yogev D. Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infection and Immunity*, 1997, 65: 2468-2471.
- [7] Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S H. Molecular variability of the adhesin-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(5): 1882-1888.
- [8] Goh M S, Gorton T S, Forsythe M H, Troy K E, Geary S J. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (*GapA*). *Microbiology*, 1998, 144: 2971-2978.
- [9] Hnataw L L, Keeler C L, Jr Tesser L L, Czymmek K, Dohms J E. Characterization of *MGC2*, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infection and Immunity*, 1998, 66: 3436-3442.
- [10] Keeler CL, Jr Hnataw L L, Whetzel P L, Dohms J E. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (*mgc1*) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 1996, 64: 1541-1547.
- [11] Ferguson N M, Hepp D, Sun S L, Ikuta N, Levisohn S, Kleven S H, Garcia M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology*, 2005, 151: 1883-1893.
- [12] Reinhardt A K, Gautier-Bouchardon A V, Gicquel-Bruneau M, Kobisch M, Kempf I. Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Veterinary Microbiology*, 1998, 106(20): 129-137.
- [13] Jan G, Brenner C, Wroblewski H. Purification of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins p52, p67 (pMGA), and p77 by high-performance liquid chromatography. *Protein Expression and Purification*, 1996, 7: 160-166.
- [14] Levisohn S, Rosengarten R, Yogev D. *In vivo* variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Veterinary Microbiology*, 1995, 45: 219-231.
- [15] Papazisi L, Frasca S, Gladd M, Liao X, Yogev D, Geary S J. *GapA* and *CrmA* coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infection and Immunity*, 2002, 70: 6839-6845.
- [16] Pillai S R, Mays H L, Ley D H, Luttrell P, Panangala V S, Farmer K L, Roberts S R. Molecular variability of house finch *Mycoplasma gallisepticum* isolates as revealed by sequencing and restriction fragment length polymorphism analysis of the *pvpA* gene. *Avian*

- Diseases*, 2003, 47: 640-648.
- [17] Gautier-Bouchardon A V, Reinhardt A K, Kobich M, Kempf I. *In vitro* development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology*, 2002, 88(1): 47-58.
- [18] Wu C M, Wu H, Ning Y, Wang J, Du X, Shen J. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum in vitro* and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letter*, 2005, 15; 247(2): 199-205.
- [19] 蒋红霞, 陈杖榴, 曾振灵, 邓旭明, 欧阳红生, 梁焕春. 体外耐氟喹诺酮类鸡毒霉形体 *gyrA* 基因的突变特征分析. 中国兽医科技, 2004, 34(8): 17-22.
- Jiang H X, Chen Z L, Zeng Z L, Deng X M, Ouyang H S, Liang H C. Characterization of mutations in *gyrA* gene associated with fluoroquinolones-resistant *Mycoplasma gallisepticum* selected *in vitro*. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(8): 17-22. (in Chinese)
- [20] Reinhardt A K, Kempf I, Kobich M. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 50: 589-592.

(责任编辑 张云霞, 林鉴非)