

副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因鉴定及遗传进化分析

薛晓晶^{1,2}, 徐福州^{2*}, 史爱华², 张培君², 陈小玲², 杨兵², 王金洛²

¹首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

²北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要:【目的】细菌 *aroA* 基因参与芳香族氨基酸的生物合成, 被成功应用于细菌分类和基因失活致弱突变菌株的构建。副猪嗜血杆菌 (Hps) 是感染猪出现多发性浆膜炎和关节炎的一种病原细菌, 鉴定该菌 *aroA* 全基因序列将有助于鉴定遗传进化关系和突变分析。【方法】利用 PCR 和细菌基因组步移技术鉴定 Hps 的 *aroA* 基因序列, 进而对不同血清型菌株该基因序列进行鉴定, 并与其它革兰氏阴性细菌进行比对和遗传进化分析。【结果】自 Hps 血清 5 型基因组 DNA 中获得包含完整 *aroA* 基因的 3.7 kb 基因片段, 其中 *aroA* 基因全长 1314 bp, 编码产物长度 437 aa, 分子量大小 47.9 kDa, 该基因上游为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因。自本试验选择的 Hps 不同血清型菌株中均可扩增出包含完整 *aroA* 基因的 1476 bp 片段, 且这些不同血清型菌株间核酸序列同源性在 97.7% 以上。Hps 血清 5 型 *aroA* 基因序列与巴氏杆菌科其它成员核酸序列同源性为 70.6%~78.9%, 与 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 的同源性分别为 66.4% 和 67.2%。【结论】本试验首次对 Hps 的 15 个血清型国际参考菌株及地方分离株 *aroA* 全基因序列进行了鉴定, 序列比较结果显示 *aroA* 基因在革兰氏阴性细菌中具有较高的同源性。*aroA* 基因鉴定对构建基因失活突变菌株以研究 Hps 生物学特性奠定了基础。

关键词: 副猪嗜血杆菌; *aroA* 基因; 序列分析; 遗传进化树

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1100-04

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 为巴氏杆菌科嗜血杆菌属中的一种革兰氏阴性球杆菌, 是猪的一种条件性病原菌, 感染后出现浆液纤维素性胸膜炎、腹膜炎、心包炎、关节炎和脑膜炎等炎症表现, 由德国学者 Glasser 首次报道, 故由该菌引起的疾病又称为猪 Glasser's 病^[1]。截至目前根据细菌表面抗原性的差异将 Hps 分为 15 个血清型^[2], 但仍有相当数量的分离株无法定为任一血清型, 目前国内流行的主要血清型为 4 型和 5 型, 同时发现 Hps 与其它病原性细菌共感染现象非常普遍^[3]。

细菌 *aroA* 基因编码产物为 5'-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (5'-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase, EPSPS), 参与芳香族氨基酸的生物合成,

是细菌芳香族氨基酸代谢通路中一个非常重要的酶, 该酶活性的缺失将导致细菌生长迟缓, 毒力降低等生物学变化^[4], 此外该基因还被用于细菌的分类^[5]。本试验对副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因的鉴定和分析, 将有助于研究 *aroA* 基因在副猪嗜血杆菌中的生物学活性, 为构建副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因失活减毒突变菌株奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 副猪嗜血杆菌 1~15 血清型国际参考菌株由澳大利亚昆士兰州动物研究所 PJ Blackall 博士^[6]惠赠; 3 株 Hps 国内地方分离株由江苏省农业科学院周勇歧惠赠。

基金项目: 国家自然科学基金(30600448); 国家“863 计划”(2006AA10A206)

*通讯作者: Tel: +86-10-51503364; Fax: +86-10-51503361; E-mail: fuzhouxu@163.com

作者简介: 薛晓晶(1981-), 女, 北京人, 硕士研究生, 研究方向为动物分子细菌学和免疫学。E-mail: xxjing528@163.com

收稿日期: 2008-01-19; 修回日期: 2008-05-21

1.1.2 主要试剂和仪器:胰酶大豆琼脂 (TSA) 和胰酶大豆肉汤 (TSB) 购自 BD Difco, 配制后添加 5% 小牛血清和 0.005% NAD 用于 Hps 的培养; TaKaRa Genome Walking Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物合成和基因测序由上海英骏生物技术有限公司完成; Eppendorf Mastercycler 梯度 PCR 仪用于 PCR 反应。

1.2 细菌基因组 DNA 抽提

所有菌株于 TSA 平板上培养后挑取单菌落接种于 TSB 中 37 °C 振荡培养过夜, 培养物用于提取基因组 DNA, 在菌液中加入 10 g/L SDS 和 200 µg/mL 蛋

白酶 K 消化后用苯酚 氯仿 异戊醇进行抽提, 加无水乙醇沉淀基因组 DNA, 真空干燥后溶于 TE 中备用。

1.3 扩增 *aroA* 基因片段

参考 Hps 血清 7 型 *aroA* 基因序列 (AY775556) 设计 1 对引物自血清 5 型基因组 DNA 中扩增长度为 958 bp 的 *aroA* 基因片段。引物序列见表 1。PCR 反应按常规方法进行, 扩增片段进行 T 载体克隆和序列测定。

1.4 基因组 DNA 步移

利用 TaKaRa Genome Walking Kit 对 *aroA* 基因获取片段的上游和下游序列分别进行扩增以获取包含

表 1 *aroA* 基因及其上下游片段扩增所用引物序列
Table 1 Primers used for amplifying the *aroA* gene and fragments upstream and downstream

Primers	Sequences (5' 3')	Length /bp	Amplified fragment
AF	ATTCGCCATATGCTCAAT	958	Partial <i>aroA</i> gene
AR	TAAAATCTTCGCCTTCT		
aroAF	AATACGGGGTAGGGGAGT	1476	Whole <i>aroA</i> gene
aroAR	GTACCCGTCTTTTGAATC		
1RSP1	TGGAGACCAACTCACCACAAT	1241	Upstream fragment of <i>aroA</i>
1RSP2	CAATCGGCGGATAGCCTTCATT		
1RSP3	ACCTCAGCCTCTTGCTCACCTT		
2RSP1	TACCTGCCGAATACCTGTG	1591	Upstream fragment of <i>aroA</i>
2RSP2	GCTTGCTCTAAGGCTGGATTTG		
2RSP3	CAGCACGTAAGCGGTGAAGC		
1FSP1	AAGGTGAGCAAGAGGCTGAGGT	652	Downstream fragment of <i>aroA</i>
1FSP2	GGCTATCCGCCGATTGCTATTC		
1FSP3	TGAGATTGTCGGTGAGTTGGTC		
2FSP1	TGATGCGGCAATGACGAT	936	Downstream fragment of <i>aroA</i>
2FSP2	TTGACAGCAATGGCAACAGAGT		
2FSP3	CAGCACGCTGAGATCGAAACCT		

aroA 全基因的片段。根据 *aroA* 基因 958 bp 片段序列设计引物 1RSP1、1RSP2、1RSP3 扩增上游片段, 同时设计引物 1FSP1、1FSP2、1FSP3 扩增下游片段; 根据上游片段序列设计引物 2RSP1、2RSP2、2RSP3 扩增上游片段, 根据下游片段序列设计引物 2FSP1、2FSP2、2FSP3 扩增下游片段。所有操作按照试剂盒说明书进行, 设计引物序列见表 1。最后将所有序列进行比对和拼接以获取包含 *aroA* 全基因的片段, 将基因序列登录 GenBank 获取基因序列号。

1.5 扩增不同血清型 *aroA* 基因

根据基因组 DNA 步移测序结果, 设计引物自参考菌株及国内分离株基因组 DNA 中扩增 1476 bp 的 *aroA* 基因片段, 该片段包含 *aroA* 基因全序列。引物序列见表 1。扩增片段经电泳鉴定后进行序列测定。

1.6 不同血清型 *aroA* 基因序列比较

对本试验选用的 15 个血清型国际参考菌株 (其中血清 1 型和 7 型各 2 株, 其它血清型各 1 株, 共 17 株) 及 3 株国内分离株的 *aroA* 基因扩增片段进行测序和分析, 利用 BLAST 和 DNASTar 等软件进行核酸

序列和氨基酸序列比较, 鉴定 Hps 不同血清型以及同一血清型不同菌株间 *aroA* 基因序列和编码产物的差异。

1.7 不同细菌 *aroA* 基因序列比较

自 GenBank 中获取巴氏杆菌科主要成员及大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 的 *aroA* 基因序列, 利用 DNAMAN (version 5.2.2) 进行核酸序列比较, 绘制 *aroA* 基因遗传进化树, 鉴定巴氏杆菌科内不同成员间及与 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 间 *aroA* 基因遗传进化关系。用于比对的细菌成员、序列号及 *aroA* 基因长度见表 2。

2 结果和分析

2.1 *aroA* 全基因片段的获取及分析

引物 AF/AR 对 Hps 血清 5 型基因组 DNA 进行 PCR 扩增后获得 958 bp 的基因片段, 进而利用基因组 DNA 步移试剂盒对 958 bp 基因片段的上游和下游片段分别进行扩增和序列分析, PCR 扩增片段长度见表 1, 将扩增片段序列进行比对和分析后拼接出一长度为 3842 bp 的包含 *aroA* 全基因的片段。对 3842 bp 的基因片段序列分

表 2 用于 *aroA* 基因比对的细菌成员、序列号及基因长度
Table 2 Organisms, accessions and *aroA* gene length used for *aroA* gene sequence alignment

Organism	Accession No.	Length of <i>aroA</i> gene/bp	Organism	Accession	Length of <i>aroA</i> gene/bp
<i>H. parasuis</i> serovar 5	EU330194	1314	<i>H. influenzae</i> Rd KW20	NC_000907	1299
<i>H. parasuis</i> serovar 7	AY775556	989	<i>H. somnus</i> 129PT	NC_008309	1299
<i>A. equuli</i>	AY775557	894	<i>Histophilus somni</i>	L47538	1299
<i>A. suis</i>	AY775558	857	<i>M. glucosida</i> strain PH240	AY847805	1239
<i>A. ureae</i>	AY775559	1018	<i>M. haemolytica</i> PHL213	DS264641	1299
<i>A. pleuropneumoniae</i> serovar 1	AJ012748	1299	<i>M. succiniciproducens</i> MBEL55E	NC_006300	1302
<i>A. pleuropneumoniae</i> serovar 5b	CP000569	1299	<i>P. haemolytica</i> serotype 2	U89948	1299
<i>H. ducreyi</i> 35000HP	NC_002940	1308	<i>P. multocida</i>	Z14100	1326
<i>H. influenzae</i> 86-028NP	NC_007146	1299	<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	NC_002623	1323
<i>E. coli</i>	X00557	1284	<i>S. typhimurium</i>	Y10355	1284

a) A. = *Actinobacillus*, E. = *Escherichia*, H. = *Haemophilus*, M. = *Mannheimia*, P. = *Pasteurella*, S. = *Salmonella*. b) EU330194 was obtained in this study. c) AY775556, AY775557, AY775558 and AY775559 represent partial sequence of the *aroA* gene.

析显示,该片段中包含长度为 1314 bp 的 *aroA* 全基因序列,与巴氏杆菌科中多数成员 *aroA* 基因的长度(1299 bp)基本一致,该基因编码产物长度 437 aa,分子量大小 47.9 kDa,等电点 5.1。*aroA* 基因上游为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(*phosphoenolpyruvate carboxylase*, *ppc*)部分序列,将该片段序列登录 GenBank 获取基因序列号 EU330194。

2.2 不同血清型间 *aroA* 基因比较结果

利用引物对 *aroAF/aroAR* 自本试验选择的所有血清型菌株中均可扩增出 1476 bp 的基因片段(图 1),所有菌株 *aroA* 基因测序结果显示 *aroA* 基因全长均为 1314 bp,核酸序列同源性在 97.7% 以上,根据核酸序列推导出氨基酸序列,氨基酸序列同源性在 98.4% 以上。

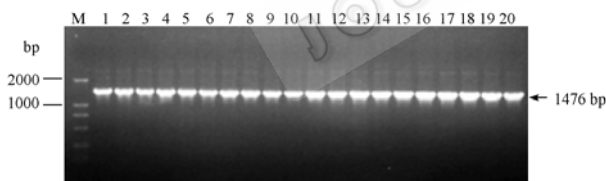


图 1 Hps 不同血清型菌株 *aroA* 基因片段 PCR 扩增结果
Fig. 1 Amplifying the *aroA* gene fragment from reference strains and isolates of *H. parasuis* by PCR. M: DL2000 Marker; 1-17: *H. parasuis* reference strains (containing 15 serovars); 18-20: 3 isolates.

2.3 不同细菌间 *aroA* 基因序列比较结果

巴氏杆菌科不同成员间 *aroA* 基因序列比较结果显示同源性均在 70% 以上,其中本试验测定的 Hps 血清 5 型 *aroA* 基因序列(EU330194)与巴氏杆菌科其它成员同源性为 70.6%~78.9%,与报道的 Hps 血清 7 型 *aroA* 基因部分序列(AY775556)同源性仅为 78.5%,而 AY775556 与胸膜肺炎放线杆菌血清型(AJ012748)同源性为 99.3%。*E. coli*、*S. typhimurium*

与巴氏杆菌科不同成员间 *aroA* 基因同源性分别为 63.4%~67.4% 和 61.8%~67.0%,而 *E. coli* 与 *S. typhimurium* 的同源性为 79.1%。提示 Hps 的 *aroA* 基因序列与巴氏杆菌科内的成员具有更高的同源性,与其它革兰氏阴性细菌的同源性也较高。图 2 为不同革兰氏阴性细菌间 *aroA* 基因序列遗传进化树。

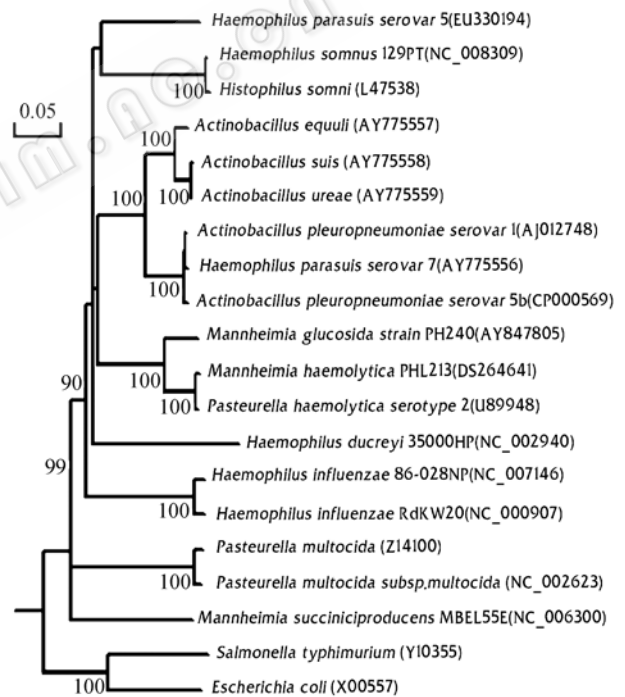


图 2 部分革兰氏阴性细菌 *aroA* 基因序列遗传进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of the *aroA* gene sequences in Gram-negative bacteria. Numbers in parentheses represent sequence accessions in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The bar represents 5% sequence divergence.

3 讨论

在许多革兰氏阴性细菌中,*aroA* 基因与 *serC* 基因在同一个转录操纵子中,*serC* 基因位于 *aroA* 基因的上

游,但在本试验中,*aroA* 基因上游为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因部分序列,说明 Hps 的 *aroA* 基因是独立转录的,与 *serC* 转基因没有关系,此特点与巴氏杆菌科的某些成员如胸膜肺炎放线杆菌等比较类似^[4]。

本试验中 Hps 血清 5 型以及另外两个血清 7 型参考菌株的 *aroA* 基因测序结果显示同源性极高,而与 Rio 等^[7]报道的 Hps 血清 7 型 *aroA* 部分基因序列同源性仅为 78.5%,分别与胸膜肺炎放线杆菌血清 型 *aroA* 基因序列比较结果也显示本试验的序列同源性为 78.2%而报道的序列同源性为 99.3%。Rio 等^[7]利用 PCR 和 RFLP 技术将 Hps 15 个血清型参考菌株 *aroA* 基因片段进行 *RsaI* 和 *Sau3AI* 限制酶谱分析,结果显示血清 3 型和 7 型与其它血清型明显不同,而在本试验测序结果中对所有序列进行 *RsaI* 和 *Sau3AI* 限制酶谱分析却未见血清 3 型和 7 型与其它血清型的差异,出现这种研究结果的差异尚不清楚,需在以后的研究中进一步鉴定。

本试验对 Hps 国际参考菌株及国内分离株的 *aroA* 全基因序列进行了测定,并测定了 Hps 血清 5 型 *aroA* 基因的上下游序列,对 Hps 基因组 DNA 中的 *aroA* 基因进

行了定位,序列测定结果将为构建 *aroA* 基因失活突变菌株进而研究 *aroA* 基因的生物学特性奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 1–12.
- [2] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(4): 862–865.
- [3] Cai X, Chen H, Blackall PJ, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Vet Microbiol*, 2005, 111(3–4): 231–236.
- [4] Garside LH, Collins M, Langford PR, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined *aroA* mutation is fully avirulent in the pig. *Res Vet Sci*, 2002, 72: 163–167.
- [5] Cascon SA, Anguita CJ, Hernanz MC, et al. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 156: 199–204.
- [6] Blackall PJ, Rapp-Gabrielson VJ, Hampson DJ. Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust Vet J*. 1996, 73(3): 93–95.
- [7] del Río ML, Martín CB, Navas J, et al. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. *Res Vet Sci*, 2006, 80: 55–61.

Identification and phylogenetic analysis on the *aroA* gene of *Haemophilus parasuis*

Xiaojing Xue^{1,2}, Fuzhou Xu^{2*}, Aihua Shi², Peijun Zhang²,
Xiaoling Chen², Bing Yang², Jinluo Wang²

⁽¹⁾College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

⁽²⁾Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: [Objective] We clarified the genetic structure and phylogenetic relationship of the *aroA* gene in *Haemophilus parasuis*, a gene encoding 5'-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase. [Methods] We used PCR and bacterial genome walking techniques to determine the *aroA* gene locus in the genome of *H. parasuis* serovar 5. Then we sequenced the *aroA* gene of *H. parasuis* reference strains and local isolates. All *aroA* gene sequences from *H. parasuis*, other members of the family Pasteurellaceae, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* were analyzed for phylogenetic relationship. [Results] An approximately 3.7 kb fragment containing the whole *aroA* gene was obtained from the genomic DNA of *H. parasuis* serovar 5. Sequence analysis showed that the size of the whole *aroA* gene was 1314 bp, encoding a 437 aa product with molecular weight 47.9 kDa. The sequence immediately upstream of the *aroA* gene shared high similarity with phosphoenolpyruvate carboxylase gene. The whole *aroA* gene fragment could be amplified from all strains of *H. parasuis* serovars with a size of 1476 bp. The nucleotide sequence similarity was above 97.7% in *H. parasuis* serovars. The similarity was 70.6%–78.9% between *H. parasuis* serovar 5 and other members of Pasteurellaceae. The similarity between *H. parasuis* serovar 5 and *E. coli* or *S. typhimurium* was 66.4% and 67.2% respectively. [Conclusion] No obvious difference was found in the *aroA* gene sequence of *H. parasuis* reference strains (15 serovars) and 3 local isolates. The nucleotide sequence of the *aroA* gene was well-conserved within Gram-negative organisms.

Keywords: *Haemophilus parasuis*; *aroA* gene; sequence analysis; phylogenetic tree

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600448) and the National Program for High Technology Research and Development of China (2006AA10A206)

*Corresponding author. Tel: +86-10-51503364; Fax: +86-10-51503361; E-mail: fuzhouxu@163.com

Received: 22 January 2008/ Revised: 18 April 2008