

禽大肠杆菌 O₂、O₇₈菌株外膜蛋白 A 基因扩增及序列分析

曹素芳, 黄青云, 温纳相, 陈红英

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据 Genbank 中大肠杆菌 K-12 外膜蛋白 A 基因的核苷酸序列设计引物, 从禽大肠杆菌 O₂、O₇₈及它们的融合株 O_{2,78}(ChI^r Nor^r)中分别扩增得到外膜蛋白 A 基因(ompA), 进行序列测定及分析发现 3 个菌株的 ompA 均由 2 276 nt 组成, 核苷酸序列完全相同, 只有一个大的开放性阅读框(ORF), 长 1 041 bp, 编码由 346 个氨基酸组成的前外膜蛋白 A(pro-OmpA), 前 21 个氨基酸残基组成信号肽, 成熟的 OmpA 由 325 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 37 000. 其氨基酸序列也完全相同. 从基因水平上证明了禽大肠杆菌 O₂ 和 O₇₈菌株存在相同的外膜蛋白 A 抗原.

关键词:禽大肠杆菌; 外膜蛋白 A 基因; 核苷酸序列分析; 氨基酸序列分析

中图分类号: S852. 61

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)01-0099-04

Amplified and sequence analysis of the outer membrane protein A gene of avian *Escherichia coli* O₂, O₇₈

CAO Su-fang, HUANG Qing-yun, WEN Na-xiang, CHEN Hong-ying

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A pair of primers were designed based on the DNA sequence of the outer membrane protein A gene (ompA) in Genbank. With the special primers, ompA of *E. coli* O₂, O₇₈ and their fusion bivalent attenuated strain O_{2,78}(ChI^r Nor^r) were amplified by PCR. After sequencing, all of the three ompA were shown to contain 2 276 nt. Starting at nucleotide 1 037 and ending at nucleotide 2 077, an open reading frame(ORF) of 1 041 bp encodes the pro-OmpA protein consisting of 346 amino acid residues. Hydrophobicity analysis suggested that the preceeding 21 amino acid constitute a typical signal sequence, and that the mature form of OmpA is 325 amino acid long with a relative molecular mass of 37 000. Analysis of the nucleotide sequences of the three ompA genes of avian *Escherichia coli* showed that they were all identical. These results indicated that O₂ and O₇₈ have the same outer membrane protein A antigen.

Key words: avian *Escherichia coli*; outer membrane protein A gene; nucleotide sequence analysis; amino acid sequence analysis

禽大肠杆菌病是全球家禽最常见的一种重要的细菌病. 它是由禽大肠杆菌引起的家禽胚胎死亡、脐炎、败血症、肉芽肿、卵黄性腹膜炎和全眼球炎等一系列疾病^[1], 且能引起继发感染, 给世界养禽业带来了巨大的经济损失. 由于耐药菌株尤其是多重耐药菌株的日益增多、灭活苗具有明显的菌体(O)血清

型, 限制了抗菌药和灭活苗的使用. 解决此问题的关键在于找出禽大肠杆菌共同的保护性抗原, 以制备对不同血清型菌株均有保护作用的疫苗. 陈红英^[2]研究发现, 禽 O₂、O₇₈和它们的融合双价弱毒菌株 O_{2,78}(ChI^r Nor^r)的主要外膜蛋白电泳条带相同, 且具有良好的免疫原性及交叉免疫保护性, 为制备具有

保护性的广谱抗原疫苗提示了可能. 为从基因水平上证实上述研究结果, 我们进一步对上述3株禽大肠杆菌外膜蛋白A(outer membrane protein A, OmpA)进行基因扩增、序列测定与比较分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 禽大肠杆菌标准强毒菌株 O₂、O₇₈由中国兽药监督所提供, 融合双价弱毒菌株 O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r) 由华南农业大学兽医学院微生物教研室培育^[3,4]保存.

1.1.2 试剂 LA *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, dNTP、PCR 片段回收试剂盒购自上海生物工程有限公司, LB 培养基购自 Oxoid Ltd.

1.1.3 引物 根据 Genbank 中大肠杆菌 K-12 株的 ompA 基因核苷酸序列设计 1 对特异性引物, 跨幅约 2.3 kb, 引物由上海博亚生物工程有限公司合成, 其序列分别为: 上游引物 (P1): 5'-GATCCGTTAACTAC-GAAAATAG-3'; 下游引物 (P2): 5'-GCG-GTAAAACGCTTTCTGAAA-3'.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的制备与纯化 禽大肠杆菌 O₂、O₇₈及 O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r) DNA 的制备、纯化参照周天鸿等(周天鸿, 李月琴. 基因工程技术实验. 暨南大学生物系遗传室, 2001, 16~17)介绍的方法进行.

1.2.2 ompA 基因的 PCR 扩增 于 25 μL 体系中分别加入以下成分: 10× LA *Taq* DNA 聚合酶 Buffer 2.5 μL、4 dNTP 混合物 1 μL、20 pmol 的上、下游引物各 1 μL、模板 DNA 1 μL、LA *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL 及 ddH₂O 18.25 μL, 混匀, 表面覆盖石蜡油, 进行 PCR 扩增. 扩增条件为: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 1 min, 51 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min. 扩增产物经 0.009 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 PCR 产物纯化及序列测定 按照 PCR 片段回收试剂盒使用说明书进行. 纯化后的 PCR 产物序列测定由日本宝生物工程(大连)公司完成.

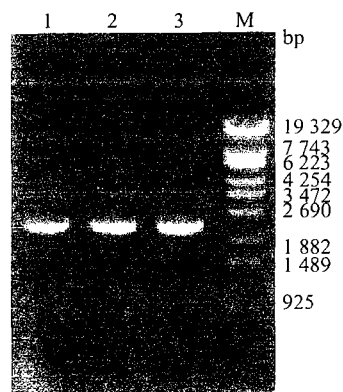
1.2.4 ompA 基因及其推导的氨基酸序列分析 用 DNAsis 2.5 分子生物学软件对禽大肠杆菌-O₂、O₇₈及 O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r) 的 ompA (命名为 ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃) 的测序结果及其推导的氨基酸 (命名为 OmpA₁、OmpA₂ 及 OmpA₃) 序列进行比较、分析.

1.2.5 疏水性分析 用 Antheprot 4.0 分析软件对 ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃ 所推导的氨基酸序列的疏水性进行分析.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

用合成的特异引物分别对 3 株禽大肠杆菌总 DNA 进行扩增, 电泳结果表明均得到了约 2.3 kb 的片段, 见图 1.



1: O₂ 菌株的 ompA₁; 2: O₇₈ 菌株的 ompA₂;

3: O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r) 融合菌株的 ompA₃;

1: ompA₁ of O₂; 2: ompA₂ of O₇₈;

3: ompA₃ of O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r); M: EcoT141 Marker

图 1 禽大肠杆菌 O₂、O₇₈ 及 O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r) ompA 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of ompA genes of avian *E. coli* O₂, O₇₈ and O₂,₇₈ (Chl^r Nor^r)

2.2 序列分析

PCR 产物测序结果表明, ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃ 的核苷酸序列均由 2 276 nt 组成, 均只有 1 个大的开放性阅读框 (ORF), 起于 1 037 位核苷酸, 止于 2 077 位核苷酸, 长 1 041 bp, 编码 1 个由 346 个氨基酸组成的前外膜蛋白 A (pro-OmpA). 对 ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃ 的核苷酸序列进行比较, 结果见图 2. 从比较结果可看出, 它们的核苷酸组成完全相同, 因此氨基酸组成亦相同 (图略).

```
ompA1 1 GATCCGTTAACTACGAAAAATAGGCAACTTATCTTAAGGG GCAAGATTAA
ompA2 1 *****
ompA3 1 *****
ompA1 51 TTTATGTTTCCCGTCACCAACGACAAAATTTCGAGGCTCTTTCCGAAA
ompA2 51 *****
ompA3 51 *****
ompA1 101 ATAGAGTGTATCTTTGTCGTCACCTGGATGTACTGTACATC CATACAGTAA
ompA2 101 *****
ompA3 101 *****
ompA1 151 CTCACAGGGG CTGGATTGATTATGTACACTGCAGGCTATGCACATCGTGA
ompA2 151 *****
ompA3 151 *****
ompA1 201 TTCGTCGTCTCTATCCACAGCAAGTAAATTCGCG GTGTCTCTACGGAAA
ompA2 201 *****
ompA3 201 *****
ompA1 251 ACACACTACAGCCGGGCTTATCAGTGAAGTTGTCTATCGCGAAGATCAGCCC
```

ompA₂ 25 | *****
ompA₂ 25 | *****
ompA₁ 301ATGATGACGCAACTTCTACT GTTGCCATTGTTACAGCAACTCGGTGACGA
ompA₂ 30 | *****
ompA₂ 30 | *****
ompA₁ 351ATCGCGCTGGCAACTCTGGTAAACACCGCA AAAAAAATTGAGTCGCGAAT
ompA₂ 35 | *****
ompA₂ 35 | *****
ompA₁ 401 GGGTTCAGGCATCTGGGCTACCCCTAACGAAAGTAATGCAGATTAGCCAG
ompA₂ 40 | *****
ompA₂ 40 | *****
ompA₁ 451CTCTCCCCTTGCCACACCGTGAGTCAATGGTTCGCGCTTTACGCACGGG
ompA₂ 45 | *****
ompA₂ 45 | *****
ompA₁ 501 CAATTACAGCGTGGTATCGGTTGGTTGGCAGATGATTGACTGAAGAAG
ompA₂ 50 | *****
ompA₂ 50 | *****
ompA₁ 551AGCATGCTGAACCTGTGTGATGCGGCAAAATGAAGGTAACGCTATGGGGTTT
ompA₂ 55 | *****
ompA₂ 55 | *****
ompA₁ 601ATTATGCGTCCGGTAAGCGCATCCTCTCACGCAACGAGACAACCTTTCCG
ompA₂ 60 | *****
ompA₂ 60 | *****
ompA₁ 651GGCTAAAAATTCACCTCTAATTTGTATCATTAAAGTAAATTTAGGATTAATC
ompA₂ 65 | *****
ompA₂ 65 | *****
ompA₁ 701CTGGAACCTTTTTTGTGCGCCAGCCAAATGCTTCAGTCGTGACTAATTTT
ompA₂ 70 | *****
ompA₂ 70 | *****
ompA₁ 751CCTTGCGGAGGCTTGTCTGAAGCGGTTCCGCGATTTTCTTCTGTAATTT
ompA₂ 75 | *****
ompA₂ 75 | *****
ompA₁ 801GTGCGTGACAAAAAGATTAAACGTACCTTATACAAGACTTTTTTTTCAT
ompA₂ 80 | *****
ompA₂ 80 | *****
ompA₁ 851ATGCTGACGGAGTTACACCTTGTAAGTTTCAACTACGTTGTAGACTTT
ompA₂ 85 | *****
ompA₂ 85 | *****
ompA₁ 901ACATCGCCAGGGGTGCTCGG CATAAGCCGAAGATATCGGTAGAGTTAATA
ompA₂ 90 | *****
ompA₂ 90 | *****
ompA₁ 951TTGAGCAGATCCCC-GGTGAAGGATTTAACCGTGTATCTCGTTGGAGAT
ompA₂ 95 | *****
ompA₂ 95 | *****
ompA₁ 1001ATTGATGGCGTATTTTGGATGATAACGAGGCGCAAAAAATGAAAAAGACA
ompA₂ 100 | *****
ompA₂ 100 | *****
ompA₁ 1051GCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGC
ompA₂ 105 | *****
ompA₂ 105 | *****
ompA₁ 1101CGCTCCGAAAGATAACACCTGGTACACTGGTGCTAAACTGGGCTGGTCCC
ompA₂ 110 | *****
ompA₂ 110 | *****
ompA₁ 1151AGTACCATGACACTGGTTTCATCAACAACATGGTCCGACCCATGAAAAC
ompA₂ 115 | *****
ompA₂ 115 | *****
ompA₁ 1201CAACTGGGCGCTGGTGTCTTTGGTGGTACCAGGTAAACCCGTATGTTGG
ompA₂ 120 | *****
ompA₂ 120 | *****
ompA₁ 1251CTTTGAAATG GGTATGACTGGTTAGGTGCTATGCCATACAAAGGCAGCG
ompA₂ 125 | *****
ompA₂ 125 | *****
ompA₁ 1301TTGAAAAACGGTGATATATAAGCTCAGGCGGTTACGCTGACCGCTAAACTG
ompA₂ 130 | *****
ompA₂ 130 | *****
ompA₁ 1351GGTTACCCAATCACTGACGATCTGACGTATACACTGCTGGGTGGTAT
ompA₂ 135 | *****

ompA₃ 135 | *****
ompA₁ 1401GGTATGGCGTGACAGACTAAATCCAACGTTTATGTGTAACCAACGACGA
ompA₂ 140 | *****
ompA₂ 140 | *****
ompA₁ 1451CCGGCGTTTCTCCGGCTTTCGCTGGCGGTGTTGAGTATGCGATCACTCCT
ompA₂ 145 | *****
ompA₂ 145 | *****
ompA₁ 1501GAAATCGCTACCCGTCTGGAATACCAGTGGACCAACAACA CGGTGACGC
ompA₂ 150 | *****
ompA₂ 150 | *****
ompA₁ 1551ACACACCATCGGCACCTCGTCCGGACAACGGCATGCTGAGCTTGGGTGTTT
ompA₂ 155 | *****
ompA₂ 155 | *****
ompA₁ 1601CCTACCGTTTCGGTACGGGCGAAGCAGCTCCAGTAGTGTCTCCGGCTCCA
ompA₂ 160 | *****
ompA₂ 160 | *****
ompA₁ 1651GCTCCGGCACCAGGAGTACAGACCAAGCACTTCACTCTGAGTCTGACGT
ompA₂ 165 | *****
ompA₂ 165 | *****
ompA₁ 1701TCTGTTCACCTTCAACAAGCAACCCTGAAACCGGAAGGTAGGCTGCTC
ompA₂ 170 | *****
ompA₂ 170 | *****
ompA₁ 1751TGGATCAGCTGTACAGCCAGCTGAGCAACCTGGAATCCGAAGACGGTTC
ompA₂ 175 | *****
ompA₂ 175 | *****
ompA₁ 1801GTAGTTGTTCTGGGTTACACTGACCGCATCGGTTCTGACG CTTATAACCA
ompA₂ 180 | *****
ompA₂ 180 | *****
ompA₁ 1851GGCTCTGTCCGAGCGCTGTGCTCAGTCCGTTGTGATTACCTGATCTCTA
ompA₂ 185 | *****
ompA₂ 185 | *****
ompA₁ 1901AAGGTATCCCGGCAGACAAAATCTCCGCACGTGGTATGGCGCAATCCAAC
ompA₂ 190 | *****
ompA₂ 190 | *****
ompA₁ 1951 CCGGTTACTGGCAACACCT TGACAACGTGAACACGCTGCTGCACTGAT
ompA₂ 195 | *****
ompA₂ 195 | *****
ompA₁ 2001CGATTGCGTGGCTCCGGATCGTCGCTAGAGATCGAAAGTAAAGGCATCA
ompA₂ 200 | *****
ompA₂ 200 | *****
ompA₁ 2051AAGACGTTGTAACCTCAGCCGACGGCTTAAGTTCTGCTCTG TAGAAAAAC
ompA₂ 205 | *****
ompA₂ 205 | *****
ompA₁ 2101CCCGCAGCTG CGGGGTTTTTTTTCGCCTTTGTAAATGAACCTGACTTT
ompA₂ 210 | *****
ompA₂ 210 | *****
ompA₁ 2151TGACAGTTATCTCTTACCCA GCAATGCCTG CAGATCTGCTTCAAGAAG
ompA₂ 215 | *****
ompA₂ 215 | *****
ompA₁ 2201ACATTTTATTCGCGTATTTCTCTTTGTTTCCGCATCTTCAATCAGCTGA
ompA₂ 220 | *****
ompA₂ 220 | *****
ompA₁ 2251ACAATCGTTTCAGAAAGCGTTTTACCGC... ..
ompA₂ 225 | *****
ompA₂ 225 | *****

图 2 ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃ 核苷酸序列比较

Fig. 2 Sequence comparison of ompA₁, ompA₂ and ompA₃

2.3 疏水性分析

对 ompA₁、ompA₂ 及 ompA₃ 推导的氨基酸序列进行疏水性分析^[5],结果显示前 21 个氨基酸残基均构成一明显的疏水区,根据信号肽的共同特征,前 21 个氨基酸残基组成信号肽.故成熟的 OmpA₁、OmpA₂ 及 OmpA₃ 均由 325 个氨基酸残基组成,相对分子质

量均为37 000.

3 讨论

目前控制禽大肠杆菌病主要是使用抗菌药和疫苗. 抗菌药的使用又面临着耐药菌株和药物残留的困扰. 现行疫苗的研制又是建立在 O 血清学分型基础上. 由于 O 血清学分型并不能反映禽大肠杆菌分离株的遗传多态性, 因此, 以 O 血清型为依据研制的疫苗难以获得理想的免疫效果. 研究表明, 大肠杆菌外膜蛋白具有良好的免疫原性, 不仅可加快巨噬细胞对抗原的提呈作用^[6], 刺激机体产生体液和细胞免疫^[7], 而且不同血清型分离株具有交叉保护作用. 陈红英^[2]对禽大肠杆菌菌株 O₂、O₇₈及融合双价弱毒株 O_{2,78}(Chl^r Nor^r)的外膜蛋白进行了电泳及免疫原性研究, 结果表明, 上述菌株的 OMP 具有相同电泳条带, 均具有免疫原性, 且对 O₂、O₇₈强毒攻击具有交叉保护作用. 韦莉等^[8]用 western-blotting 分析了 O₇₈免疫血清对 O₁、O₂、O_{27r}及 O₃₅菌株外膜蛋白抗原识别, 也证明不同血清型主要外膜蛋白间有交叉免疫原性. Carole 等^[9]证实, 针对大肠杆菌铁调节外膜蛋白的抗体可对火鸡大肠杆菌败血症提供被动免疫保护. Melamed^[10]也证明外膜蛋白具有免疫原性. 这为研制禽大肠杆菌外膜蛋白疫苗提供了理论基础. 但是由于大肠杆菌外膜蛋白结构复杂, 分离纯化困难. 应用遗传工程技术对外膜蛋白进行表达, 为防制禽大肠杆菌病提供新的思路. DNA 序列的测定与分析是分子病理学和新型疫苗研究的基础之一. 全基因序列的解读将为疾病提供新的方法和手段. 本文对 3 株禽大肠杆菌外膜蛋白 A 基因进行了全基因序列测定并进行了比较, 它们的核苷酸序列完全相同, 推导的氨基酸序列亦相同. 从基因水平上证实了 O₂、O₇₈存在相同的外膜蛋白 A 抗原, 为研制广谱的禽大

肠杆菌外膜蛋白基因工程疫苗提供了科学的理论依据.

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第9版. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 126 - 132.
- [2] 陈红英. 禽大肠杆菌外膜蛋白电泳分析与免疫原性研究[D]. 广州: 华南农业大学兽医学院, 2002.
- [3] 黄青云, 任 涛. 禽大肠杆菌 O₂ 与 O₇₈强毒菌株原生质体融合的研究[A]. 中国畜牧兽医学学会第十届会员代表大会暨学术年会论文集(兽医卷)[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996. 188 - 192.
- [4] 罗贤忠, 黄青云, 林泰松. 禽大肠杆菌 O₂、O₇₈融合双价弱毒菌株免疫原性的研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 50 - 54.
- [5] KYTE J, DOOLITTLE R F. A Simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157: 105 - 132.
- [6] KIRN A, LANG J M, REY D, et al. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by the major outer membrane protein ompA of gram-negative bacteria[J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2 697 - 2 705.
- [7] ROYS P, DAS A B, SINGH R, et al. Purification, pore-forming ability, and antigenic relatedness of the major outer membrane protein of *Shigella dysenteriae* type I[J]. Infect Immun, 1994, 64(10): 4 333 - 4 337.
- [8] 韦 莉, 杨 兵. 禽致病性大肠杆菌外膜蛋白 SDS-PAGE 分析[J]. 北京农业科学, 1999, 17(1): 43 - 45.
- [9] CAROLE A, BOLIN R, ALLEN E, et al. Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane protein protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia[J]. Infect Immun, 1987, 55(5): 1 239 - 1 242.
- [10] MELAMED D, TAKARAE Y, AMIR J, et al. A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*[J]. Avian Dis, 1991, 35: 17 - 22.

【责任编辑 柴 焰】