

绵羊肺炎支原体 *p113* 基因的序列分析及
功 能 预 测

杨发龙, 张焕容, 汤 承, 岳 华
(西南民族大学 生命科学与技术学院, 四川 成都 610041)

摘要:采用多种软件对 *p113* 基因的相似性、跨膜结构、重复序列、信号肽、抗原表位等进行预测,并与同源序列进行比较分析.结果表明,*p113* 基因是猪肺炎支原体黏附素基因 *p97* 的直系同源基因,并具有与 *P97* 蛋白 R2 区类似的特征性重复序列.通过综合比较分析,推测 *P113* 蛋白极可能是绵羊肺炎支原体的黏附素和膜表面免疫原.

关键词:绵羊肺炎支原体;*p113* 基因;黏附素;免疫原
中图分类号:S852.62 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)01-0117-05

Sequence Analysis and Functional Prediction of
Mycoplasma ovipneumoniae p113 Gene

YANG Falong, ZHANG Huanrong, TANG Cheng, YUE Hua
(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this paper is to conduct a bioinformatics analysis for *p113* gene of *Mycoplasma ovipneumoniae* and further predict its functions. Using several softwares, homology of *p113* gene with other genes was calculated and trans-membrane structure, repeat sequence, signal peptide and epitodes were predicted. The results revealed that *p113* was an orthologous of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin gene *p97* which shared similar R2 repeat sequence. Overall analysis leads to the prediction that *P113* protein is one of the important adhesins and membrane immunogens.

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*; *p113* gene; adhesin; immunogen

绵羊肺炎支原体 *Mycoplasma ovipneumoniae* 最早于 1963 年分离得到,目前其分布范围遍及全球^[1-3].研究表明,绵羊肺炎支原体是一种重要的呼吸道疾病病原,可导致绵羊、山羊以及小反刍野生动物的非典型性肺炎^[1-2,4].此外,羊感染绵羊肺炎支原体后,对其他病原的易感性明显增加^[5].然而,与羊的其他致病性支原体相比,对绵羊肺炎支原体的研究相对滞后,特别是对于其重要功能蛋白(如重要抗原及毒力因子等)知之甚少.这一方面不利于对其致病机制等基础研究的推进,也对研发安

全、高效的疫苗以及建立特异、快速的诊断技术造成困难.

2011 年,我们完成了绵羊肺炎支原体临床分离菌株 SC01 的全基因组测序工作^[6],表明其全长约 1 020 kb,共包含 865 个基因编码区(CDS).经功能注释,发现至少有 8 个基因与其他支原体的黏附素相关基因具有相似性,其中编号为 SWUN0000207 的 CDS 与猪肺炎支原体 *P97* 黏附素基因具有高度相似性,值得进一步深入分析和试验研究.由于该基因编码蛋白的预测相对分子质量为 113 400,故将该基因

收稿日期:2012-07-08 网络出版时间:2013-01-11
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130111.0926.010.html>
作者简介:杨发龙(1976—),男,土族,副教授,博士;通信作者:岳 华(1963—),女,教授,博士, E-mail: yhua900@yahoo.com.cn
基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(11NZYQN34);山羊现代产业链关键技术集成研究与产业化示范(2011NZ0003)

暂命名为 *p113* 基因. 本文通过生物信息学分析, 对该基因及其所编码蛋白特性和功能进行预测, 旨在为进一步研究其功能提供依据.

1 材料与方法

绵羊肺炎支原体 SC01 株分离自四川省一自然发病山羊肺部, 其全基因组 GenBank 号: AHFO000001.

核苷酸及氨基酸序列相似性比较分析采用 NCBI 的 BLAST 工具及 DNASTAR 软件包中 MegAlign 分析工具进行. 重复序列分析采用 Internal Repeats Finder (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/Repeats/>) 进行. 蛋白跨膜区、信号肽及脂蛋白预测分别利用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 以及 (www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/) 完成. 抗原性分析采用在线分析站点 (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) 进行.

2 结果与分析

2.1 *p113* 基因的基本特征

p113 基因 CDS 全长 3 066 bp, G + C 占 32.8%, 稍高于绵羊肺炎支原体全基因组 28.85% 的平均 C +

G 含量. 该基因包含 3 个用于编码色氨酸的 TGA 密码子, 分别位于第 1 647、1 854 和 1 986 bp 处. *p113* 基因编码蛋白共含有 1 021 个氨基酸, 相对分子质量为 113 400.

2.2 相似性分析及比较

经 BLAST 比较分析, 绵羊肺炎支原体 *p113* 基因与猪肺炎支原体 *p97* 基因及其旁系同源基因 (Paralogous) *p146*、*mhp107* 和 *mhp271* 等之间具有较高的相似性. 在猪肺炎支原体中, 上述基因的编码产物分别为黏附素 P97 (Adhesin P97)、黏附素样蛋白 P146 (Adhesin like-protein P146)、P97 样蛋白 (P97-like protein) Mhp107 以及 Mhp271. 其中, *p113* 基因与黏附素基因 *p97* 相似性最高, 两者间核苷酸序列相似性为 60.5%, 编码氨基酸序列相似性为 46.8%, 表明 *p113* 为 *p97* 的直系同源基因 (Orthologous). 两者间氨基酸高度相似区域主要集中在 N 端, 其中 P113 蛋白第 120 ~ 176 氨基酸之间序列与黏附素 P97 相似性达 71%. 除上述基因之外, *p113* 基因与结膜支原体 *Mycoplasma conjunctivae* 黏附素 *lppS* 基因也具有较高相似性, 两者间核苷酸及氨基酸序列相似性分别为 42% 和 28%. *p113* 基因与上述各同源基因间的系统进化关系见图 1.

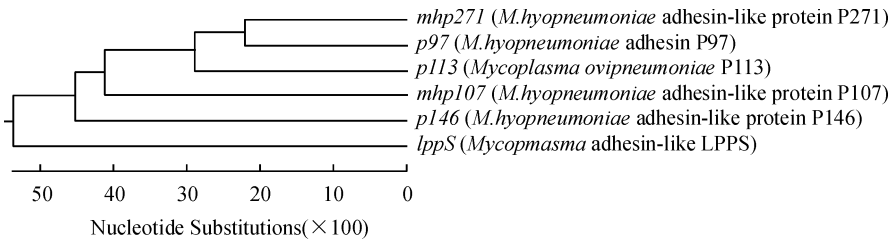


图 1 *p113* 基因系统进化关系

Fig. 1 Phylogenetic tree of *p113* gene

2.3 重复序列分析

进一步比较分析发现, 推测的 P113 蛋白中存在与上述同源蛋白类似的一些特征性序列. 在其 C 端包含与 P97 蛋白 R2 重复区极为相近的重复序列, P97 蛋白 R2 区为一段 3 ~ 4 个连续排序的重复序列 GA(E, S, T)PN(S)QGKKA E, 而 P113 蛋白包括 2 段 2 个连续排列的重复序列 GAQN(D)QGKKA(E)E(Q, D), 分别位于第 783 ~ 802 以及第 880 ~ 899 氨基酸. 此外, 在 P113 蛋白 C 末端还发现一段与结膜支原体黏附素 LppS 以及猪肺炎支原体 P146 相似的聚丝氨酸序列, 在其第 953 ~ 978 氨基酸的 26 个氨基酸残基中, 有 21 个为丝氨酸残基, 其中有 16 连续排列的丝氨酸序列, 与 LppS 及 P146

蛋白 C 末端特征性的聚丝氨酸区 (Poly-serine region) 极为相似. 在 LppS 的这一富含丝氨酸区域中, 44 个氨基酸中有 37 个丝氨酸残基, 并且存在 28 个连续排列的丝氨酸残基. 在 P146 蛋白中存在 16 个排列的丝氨酸残基.

2.4 跨膜结构域及信号肽分析

TMHMM、SignalP4.0 和 LipoP1.0 在线工具分析的结果表明, P113 蛋白在其 N 端有一明显的跨膜区螺旋, 位于第 12 ~ 34 氨基酸之间 (图 2), 无非脂蛋白信号肽及脂蛋白信号肽成分 (图 3).

2.5 抗原表位分析

通过预测发现 P113 蛋白包含 37 个可能的抗原表位, 平均抗原趋向性为 1.010 7. 其中由第

304 ~ 317 氨基酸形成的表位的抗原指数最高,其氨基酸序列为“SSSSFAPVVSAVKL”. P113 蛋白抗原表位分布如图 4.

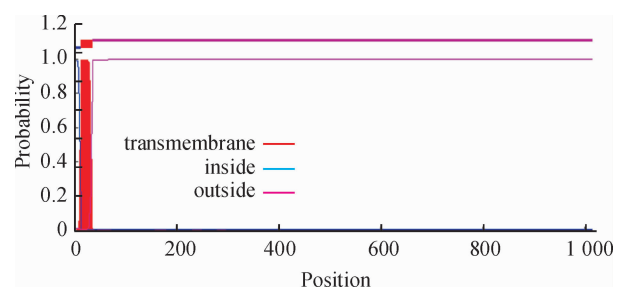


图 2 P113 蛋白跨膜区预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane region of P113

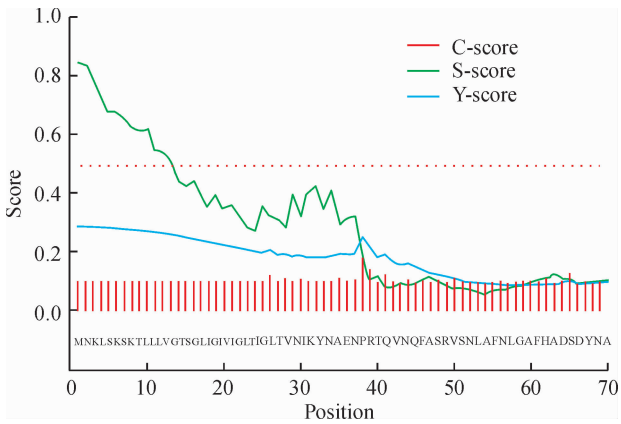


图 3 P113 蛋白信号肽预测

Fig. 3 Prediction of signal peptide of P113

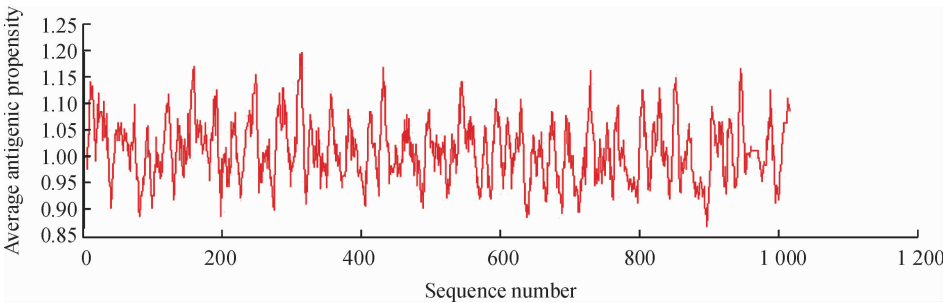


图 4 P113 蛋白抗原表位分析

Fig. 4 Epitope analysis of P113

3 讨论

支原体借助黏附素定殖于宿主细胞是其致病的前提条件. 支原体黏附于宿主细胞表面后,可导致纤毛运动停滞和损伤^[7]. 而且,支原体与宿主细胞直接接触,有利于其释放的过氧化物和活性氧自由基对宿主细胞造成损害^[8]. 同时,纤毛运动停滞和上皮细胞的损害还将有利于其他病原的入侵. 因此,黏附素是支原体最为重要的毒力因子之一,失去黏附素的支原体突变体的致病作用也随即消失^[9]. 此外,黏附素作为暴露于膜表面的蛋白分子,也是支原体重要的免疫原.

由于具有重要生物学功能,黏附素已成为探索支原体致病机制、开发基因工程疫苗及建立血清学诊断技术的重要研究对象. 一些重要支原体的黏附素先后被鉴定并进行了较为深入的研究,例如:人肺炎支原体 *M. pneumoniae* 黏附素 P1^[10] 及 P30^[11]、猪肺炎支原体 *M. hyopneumoniae* 黏附素 P97^[12]、山羊结膜支原体 *M. conjunctivae* 黏附素 LPPS^[13]、无乳支原体 *M. agalactiae* 黏附素 P40^[14] 等. Jones 等^[15] 及 Niang 等^[16] 发现,与其他致病性支原体一样,绵羊肺炎支原体同样能够黏附到呼吸道上皮细胞,导致纤毛运动停滞,进一步造成纤毛破坏和脱落. 然而,至

今哪些分子参与绵羊肺炎支原体对宿主细胞的黏附尚不清楚.

通过上述对 *p113* 基因的生物信息学分析表明,绵羊肺炎支原体 P113 与猪肺炎支原体黏附素分子 P97 高度相似. P97 蛋白是猪肺炎支原体的黏附素,在黏附和致病过程中发挥着关键作用,是重要的毒力因子^[12]. 同时,P97 也是重要的免疫原,可诱导机体产生有效的免疫应答,并产生高水平 IgA^[17-18]. 通过原核表达的重组 P97 蛋白免疫猪后,可明显减轻临床症状^[19],而表达 P97 的猪丹毒杆菌活载体疫苗^[20]以及复制缺陷性腺病毒为载体构建的 P97 重组亚单位疫苗^[21-22]可显著减轻野毒感染后的肺部病变和炎症反应. 此外,利用重组 P97 蛋白所建立的 ELISA 抗体检测技术具有良好的敏感性^[23]. 这些结果说明,猪肺炎支原体黏附素 P97 在亚单位疫苗和血清学诊断试剂盒的研制方面存在巨大的应用潜力.

基于 16S rRNA^[24] 及 HSP70^[25] 的系统发育分析表明,绵羊肺炎支原体与猪肺炎支原体亲缘关系最近. 本文对绵羊肺炎支原体 *p113* 基因及其编码蛋白 P113 的分析表明,其与猪肺炎支原体的黏附素 P97 高度相似,由此可以推测,*p113* 是 *p97* 的直系同源基因. 分析结果同时表明,P113 蛋白和 P97 蛋白之间存

在类似的结构特性,如 P113 蛋白中存在与 P97 蛋白 R2 区类似的重复序列,而研究已表明 R2 重复序列是猪肺炎支原体黏附纤毛的重要区域^[26]. 这表明, P113 极有可能是绵羊肺炎支原体的重要黏附素,在介导其吸附宿主细胞和致病过程中发挥重要作用. 同时,上述生物信息学分析还表明, P113 蛋白具有跨膜结构和丰富的抗原表位,推测其是重要的膜表面免疫原,可诱导机体产生免疫应答.

综合上述分析,可以推测:绵羊肺炎支原体 P113 蛋白是其重要的黏附分子; P113 蛋白为重要的膜表面免疫原. 若上述对 P113 蛋白的推测得到试验验证,则说明 P113 蛋白不仅可以用于研发亚单位疫苗,同时,利用其重组抗原可开发有效的血清学诊断技术,这对于该病原的鉴定、疾病的诊断及预防均具有十分重要的实践意义,而且有助于深入了解绵羊肺炎支原体的致病机理.

参考文献:

- [1] BESSER T E, HIGHLAND M A, BAKER K, et al. Causes of pneumonia epizootics among bighorn sheep, western United States, 2008-2010[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(3):406-414.
- [2] RIFATBEGOVIC M, MAKSIMOVIC Z, HULAJ B. *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with severe respiratory disease in goats[J]. *Vet Rec*, 2011, 168(21):565.
- [3] GIANCASPERO M, NICHOLAS R A, HLUSEK M, et al. Seroepidemiological survey of sheep flocks from Northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae*[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2012, 44(3):395-398.
- [4] GONÇALVES R, MARIANO I, NÚÑEZ A, et al. Atypical non-progressive pneumonia in goats [J]. *Vet J*, 2010, 183(2):219-221.
- [5] DASSANAYAKE R P, SHANTHALINGAM S, HERN-DON C N, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae* can predispose bighorn sheep to fatal *Mannheimia haemolytica* pneumonia[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 145(3/4): 354-359.
- [6] YANG Falong, TANG Cheng, WANG Yong, et al. Genome sequence of *Mycoplasma ovipneumoniae* strain SC01 [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(18):5018.
- [7] DEBEY M C, ROSS R F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(12): 5312-5318.
- [8] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(4):1094-1156.
- [9] KRAUSE D C, LEITH D K, BASEMAN J B. Reacquisition of specific proteins confers virulence in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Infect Immun*, 1983, 39(2): 830-836.
- [10] SU C J, TRYON V V, BASEMAN J B. Cloning and sequence analysis of cytoadhesin P1 gene from *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Infect Immun*, 1987, 55(12): 3023-3029.
- [11] BASEMAN J B, MORRISON-PLUMMER J, DROUIL-LARD D, et al. Identification of 30-kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* associated with hemadsorption [J]. *Isr J Med Sci*, 1987, 23(5):474-479.
- [12] HSU T, ARTIUSHIN S, MINION F C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(4):1317-1323.
- [13] BELLOY L, VILEI E M, GIACOMETTI M, et al. Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*[J]. *Microbiology*, 2003, 149(1):185-193.
- [14] FLEURY B, BERGONIER D, BERTHELOT X, et al. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(10):5612-5621.
- [15] JONES G E, KEIR W A, GILMOUR J S. The pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in ovine and caprine tracheal organ cultures [J]. *J Comp Path*, 1985, 95(4): 477-487.
- [16] NIANG M, ROSENBUSCH R F, DEBEY M C, et al. Field isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* exhibit distinct cytopathic effects in ovine tracheal organ cultures [J]. *Zentralbl Veterinarmed A*, 1998, 45(1):29-40.
- [17] CONCEIÇÃO F R, MOREIRA A N, DELLAGOSTIN OA. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice [J]. *Vaccine*, 2006, 24(29/30): 5734-5743.
- [18] CHEN A Y, FRY S R, FORBES-FAULKNER J, et al. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(7):923-929.
- [19] KING K W, FAULDS D H, ROSEY E L, et al. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential[J]. *Vaccine*, 1997, 15(1):25-35.
- [20] OGAWA Y, OISHI E, MUNETA Y, et al. Oral vaccination against *Mycoplasmal pneumoniae* of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector [J]. *Vaccine*, 2009, 27(33):4543-4550.
- [21] OKAMBA F R, ARELLA M, MUSIC N, et al. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin pro-

- tein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine [J]. *Vaccine*, 2010, 28(30):4802-4809.
- [22] OKAMBA F R, MOREAU E, CHEIKH SAAD BOUH K, et al. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(6):767-774.
- [23] JANG E J, KIM T J. *In vitro* expression of the 50-kDa and 30-kDa fragments of the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use for serodiagnosis[J]. *Can J Vet Res*, 2007, 71(4): 278-282.
- [24] PETTERSSON B, UHLÉN M, JOHANSSON K E. Phylogeny of some *Mycoplasmas* from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(4): 1093-1098.
- [25] LI Ming, MA Chunji, LIU Xiaoming, et al. Molecular cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and comparison with that of other mycoplasmas [J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(2):834-848.
- [26] DEUTSCHER A T, JENKINS C, MINION F C, et al. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(2):444-458.
- 【责任编辑 李晓卉, 霍 欢】
-
- (上接第 116 页)
- [10] 马树芝, 郑文捷, 周美锋, 等. 稀土水杨醛缩苯丙氨酸盐邻菲罗啉配合物的合成、表征及抗菌活性[J]. *上海师范大学学报:自然科学版*, 2007, 36(3):66-72.
- [11] 卢艳梅, 区志宾, 胡伟, 等. (2-(2'-吡啶)苯并咪唑)(*L*-丙氨酸根)铜(Ⅱ)配合物结构、抗菌活性及 DNA 断裂作用[J]. *化学学报*, 2012, 70(8):973-979.
- [12] GEARY W J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds[J]. *Coord Chem Rev*, 1971, 7(1):81-122.
- [13] NAKAMOTO. 无机和配位化合物的红外和拉曼光谱[M]. 黄德如, 汪仁庆, 译. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 1991:257-259.
- [14] 陈德余, 张平, 史卫良. 邻香草醛缩天冬氨酸铜、锌、钴、镍配合物的合成[J]. *应用化学*, 1999, 16(2):75-77.
- [15] 史卫良, 陈德余, 吴清洲. 水杨醛缩 *L*-天冬氨酸过渡金属配合物的合成及表征[J]. *无机化学学报*, 1999, 15(6):761-765.
- [16] 许军鹏, 刘景旺, 达文燕, 等. 稀土-姜黄素-菲罗啉配合物荧光和抑菌活性研究[J]. *中国稀土学报*, 2009, 27(1):68-75.
- [17] 黎植昌, 李太山. *N*-亚水杨基氨基酸锌配合物的合成及表征[J]. *高等学校化学学报*, 1993, 14(3):301-304.
- [18] 丁瑜, 刘志伟, 张忠海. 席夫碱三核锌(Ⅱ)配合物的晶体结构及荧光活性研究[J]. *化学学报*, 2007, 65(8):688-692.
- [19] 黄娟, 崔紫宁, 李映. Schiff 碱铜配合物的生物活性[J]. *有机化学*, 2008, 28(4):598-599.
- [20] CHOHAN Z H, ARIF M, SARFRAZ M. Metal-based antibacterial and antifungal amino acid derived Schiff bases: Their synthesis, characterization and *in vitro* biological activity[J]. *Appl Organomet Chem*, 2007, 21(4):294-302.
- [21] LV Jian, LIU Tingting, CAI Sulan, et al. Synthesis, structure and biological activity of cobalt(Ⅱ) and copper(Ⅱ) complexes of valine-derived schiff bases[J]. *J Inorg Biochem*, 2006, 100(11): 1888-1896.
- [22] 廖升荣, 乐学义, 卢其明, 等. 1,10-邻菲咯啉-铜(Ⅱ)-氨基酸配合物的合成、分子结构及其生物活性[J]. *华南农业大学学报*, 2006, 27(3): 122-124.
- 【责任编辑 李晓卉】