

副猪嗜血杆菌 *hhdA* 基因的鉴定和分析

宋帅^{1,2}, 李春玲^{1,2*}, 杨冬霞¹, 李淼¹

(1.广东省农业科学院 兽医研究所, 广东 广州 510640; 2.广东省兽医公共卫生实验室, 广东 广州 510640)

摘 要: 副猪嗜血杆菌可引起猪的格氏病, 其不同毒力菌株分子水平上的差异还不清楚。从广东省不同地区猪场送检病猪中分离到 9 株细菌(H1~H9), 并对其 *16SrRNA* 基因进行鉴定和分析。经形态观察、生化特性鉴定和 PCR 鉴定, 所分离的 9 株细菌为阳性副猪嗜血杆菌, 具有卫星现象和不溶血特征。用 *hhdA* 基因引物从分离菌株中扩增到了特异性片段, 所获得的 *hhdA* 基因序列与 GenBank 中副猪嗜血杆菌 SH0165、HPS59 的 *hhdA* 基因的同源性为 98%~99%, 获得的分离菌株 *hhdA* 基因的同源性为 99.0%~99.9%, 菌株 H1(5 型)、H2(5 型)、H8(4 型)、H9(12 型) *hhdA* 基因在遗传进化关系上处于同一进化分支。推导的氨基酸序列与同一种属细菌的溶血素具有一定的相似性, 用 RT-PCR 扩增到了 *hhdA* 基因的目的条带, 表明该基因在分离菌株中得到了相应的表达。

关 键 词: 副猪嗜血杆菌; *hhdA* 基因; 克隆

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0290-05

Identification and analysis of the *hhdA* gene of *Haemophilus parasuis*

SONG Shuai^{1,2}, LI Chun-ling^{1,2*}, YANG Dong-xia¹, LI Miao¹

(1.Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China; 2.Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Haemophilus parasuis* is best known as the cause of Glasser's disease, but the mechanisms underlying virulence differences on the molecular level are largely unknown. Nine strains (H1-H9) of bacteria were isolated from unsound swine within farms in different regions of Guangdong province, then the *16SrRNA* genes of the isolated strains were analyzed by PCR. The results of PCR combined with morphological observation and biochemical characterization showed that the isolated strains belonged to *Haemophilus parasuis* which had satellite phenomena and nonhemolytic characteristics. The nucleotide sequence similarities of *hhdA* genes between the isolated strains and *Haemophilus parasuis* strains SH0165 and HPS59 are 98%~100% and nucleotide sequence similarities of *hhdA* genes among the isolated 9 strains are 99.0%~99.9%. The phylogenetic tree showed that the isolated strain H1, H2, H8 and H9 belonged to one cluster. The deduced amino acid sequences of *hhdA* gene from the isolated strains were similar to the amino acid sequence of the hemolysin from other *Haemophilus* bacteria. RT-PCR indicated that the *hhdA* gene was expressed in all of the isolated strains. This study would be helpful for identification of virulence gene and for pathogenic mechanism study of *Haemophilus parasuis*.

Key words: *Haemophilus parasuis*; *hhdA* gene; cloning

副猪嗜血杆菌(*haemophilus parasuis*, HPs)可引起猪的格氏病, 临床上以多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎、肺炎为特征^[1]。该菌已成为国内外引起保育仔猪死亡的一个重要因素, 且死亡率呈显著上升趋势

势。该菌曾被认为是猪呼吸道的常在菌或条件性致病菌, 现在却在临床健康猪群中流行, 且常与其他病原菌混合感染^[2]。Kielstein 等^[3]利用血清学方法已鉴定出该菌的 15 个血清型, 并用每个血清型的代表

收稿日期: 2010-10-27

基金项目: 广东省农业科技重大专项(2009A020101006); 广东省农业攻关项目(2007A020300005-11); 广州市农业科技重大专项(2009A1-E041)

作者简介: 宋帅(1982—), 男, 河南平顶山人, 硕士, 主要从事兽医微生物学研究, songshuai0602@126.com; *通信作者, lclclaire@163.com

菌株通过腹腔途径感染 SPF 猪,证实了不同血清型的毒力差异,例如血清 1、5、10、12 型为强毒力血清型,血清 6、7、9、11 型为非毒力血清型。用血清型鉴定方法对某些分离菌株无法定型,且同一血清型不同分离菌株的毒力也存在差异^[4]。目前,已有关于副猪嗜血杆菌毒力因子的报道^[5],但对编码神经氨酸苷酶基因的了解还很少,对副猪嗜血杆菌外膜蛋白所引起的致病性研究还处于鉴定阶段,利用毒力因子来区分致病菌株和非致病菌株还存在缺陷。毒力因子是构成细菌毒力的物质基础,在其病原菌的致病过程中发挥主要作用,因此对毒力因子生物学特性的研究是探索病原菌致病机理的首要任务^[6]。副猪嗜血杆菌中有段核苷酸序列所编码的氨基酸序列与杜克雷嗜血杆菌溶血素 *hhdA* 的氨基酸序列有很高的相似性^[7],从而将这段核苷酸序列假定为副猪嗜血杆菌的 *hhdA* 基因^[7],但该基因所编码的蛋白是否作为副猪嗜血杆菌的毒素发挥毒性作用还没有定论。笔者对从临床发病猪中分离的副猪嗜血杆菌菌株进行 *hhdA* 基因的鉴定和分析,旨在了解该基因的生物学特性,对致病菌株和非致病菌株的鉴定和副猪嗜血杆菌致病机理的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料

从广东省不同地区猪场送检病猪中采集病料,发病猪大多处于保育阶段,临床表现为消瘦、被毛粗乱、腹式呼吸、卧行等,剖检病理变化表现为淋巴结肿大、肺实质性病变并与胸腔壁黏连、胸腹腔内有淡黄色积液等。

1.1.2 试剂及培养基

限制性核酸内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker、DNA 片段纯化试剂盒、随机六聚体引物、反转录酶 AMV 等购自 TaKaRa 公司;RNeasy Mini kit 购自 Qiagen 公司;TSA、TSB 培养基购自美国 BD 公司,配制时加 10%小牛血清和 0.01% NAD;脲酶、氧化酶、接触酶、吲哚、葡萄糖等试剂均购自杭州微生物试剂有限公司;其他试剂均为国产,分析纯。

1.1.3 引物

副猪嗜血杆菌 16SrRNA 的引物设计参照文献^[4]的方法。16SrRNA 上游引物:5'-GATGAGGAAGGG TGGTGT-3';16SrRNA 下游引物:5'-GGCTTCGTC ACCCTCTGT-3'。预期扩增片段大小为 821 bp。副猪嗜血杆菌 *hhdA* 的引物设计参照文献^[6]的方法。*hhdA* 上游引物:5'-GGTTCTAGTTCACAAACAG CCAATAC-3';*hhdA* 下游引物:5'-GATATTACCC CTGCCTTCATTGTATC-3'。预期扩增片段大小为 964 bp。以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病料中病原菌的分离和鉴定

1) 病原菌的分离培养。在无菌条件下,从发病猪的心脏、肺脏、肝脏、脾脏、脑、扁桃体、腹股沟淋巴结、胸腹腔积液等病料中采样,分别划线接种于含有 NAD 的 TSA 平板上。置 CO₂ 培养箱,于 37 °C 培养 36~48 h,挑取病原菌落进行纯培养和鉴定。

2) 分离菌株的生化鉴定。挑取纯化的单个菌落接种于添加 NAD 的葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、核糖、脲酶、氧化酶、接触酶、吲哚等生化管中,置 CO₂ 培养箱,于 37 °C 培养 12~48 h,观察生化反应结果。

3) 分离菌株 16SrRNA 的 PCR 鉴定。从 TSA 平板上挑取可疑菌落,接种到 TSB 培养液中,置 37 °C 摇床中 160 r/min 振荡培养约 12 h,对菌液进行 16SrRNA PCR 鉴定。反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTPs 2.0 μL,上、下游引物各 1.0 μL,*Taq* 酶 0.5 μL,菌液 1.0 μL,加双蒸水至 25 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,58 °C 复性 40 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

4) 分离菌株的分型鉴定。利用广东省农业科学院兽医研究所制备的副猪嗜血杆菌血清型 1-15 型多抗进行分离菌株的分型。根据 Kielstein^[3]的方法,将分离菌 121 °C 高压 2 h,提取热稳定抗原,用琼扩试验进行分型鉴定。

1.2.2 细菌生长情况的观察

将用上述方法初步鉴定为副猪嗜血杆菌阳性的 TSB 培养液均匀涂布于无 NAD 的鲜血琼脂平板上,并将金黄色葡萄球菌做 2 条平行划线接种于平板中央,同时也将阳性菌的 TSB 培养液划线接种到含有 NAD 的鲜血琼脂平板上,置 CO₂ 培养箱,于 37 °C 培养 12~36 h,观察细菌生长情况。

1.2.3 *hhdA* 基因的扩增和克隆

1) *hhdA* 基因的扩增。以副猪嗜血杆菌阳性的 TSB 培养液为模板。反应体系为:10×PCR Buffer 5 μL, dNTPs 4 μL, *hhdA* 基因上、下游引物各 1.0 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, 菌液 1.0 μL, 加双蒸馏水至 50 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,58 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳观察。

2) *hhdA* 基因的克隆。用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 *hhdA* 基因的 PCR 目的片段,进行连接。连接反应体系为 10 μL,依次加入 PCR 产物 4.5 μL, pMD18-T 载体 0.5 μL, ligation solution I 5 μL,16 °C 连接 4 h。取 5 μL 连接产物转化至制备好的基因工程菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,于 37 °C 培养 12~16 h 后,挑取白色单个菌落。以碱裂解法小剂量制备质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定。将初步鉴定为阳性的重组质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 *hhdA* 基因的序列分析

将所测得的副猪嗜血杆菌 *hhdA* 基因在 NCBI 网站中作 Blast 分析,用 DNA Star、Mega4.0 等生物学软件对序列进行分析和绘制系统进化树,分析所分离菌株 *hhdA* 基因与其他细菌相似序列的遗传进化关系。

1.2.5 *hhdA* 基因的 RT-PCR 鉴定

将鉴定分离的副猪嗜血杆菌菌株接种到 TSB 培养液中,于 37 °C 摇菌培养至 OD₆₀₀ 为 0.4。取 5 mL 培养菌液,参考 RNA 提取试剂盒的操作说明,提取细菌中的总 RNA,用 DNA 酶进行相应处理,然后进行反转录。反转录体系:总 RNA 1 μg, dNTPs 2.0 μL, 随机六聚体引物 1.0 μL, 5×RT Buffer 4 μL,

反转录酶 0.5 μL, RNA 酶抑制剂 0.5 μL, 加双蒸水至 20 μL。混匀后置于 42 °C 水浴 2.5 h,于 99 °C 水浴 5 min,冰浴冷却备用。以反转录的 cDNA 为模板扩增 *hhdA* 基因,其反应体系和反应程序与前述 *hhdA* 基因的扩增相同。以从反转录 cDNA 中扩增 16SrRNA 的特异性片段作为该体系的阳性对照,以未经反转录的总 RNA 为该体系的阴性对照,扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳观察。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和鉴定结果

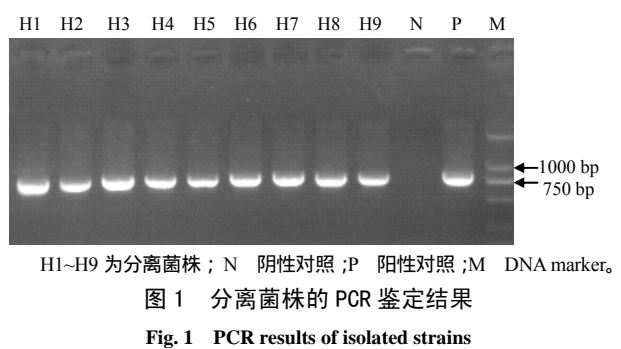
1) 病料中病原菌的分离结果。将采集于心脏、肺脏、脾脏、脑、胸腹腔积液等部位的病料培养后,平板上出现了无色、透明、边缘整齐的小菌落,涂片镜检可见革兰氏阴性的细小杆菌。挑取该菌落接种到 TSB 培养液中进行分离、纯化、培养后,分离出 9 株副猪嗜血杆菌可疑菌株,并将其编号为 H1~H9。生化试验鉴定结果(表 1)表明:所分离的 9 株菌株的生化特性与副猪嗜血杆菌的相符。

表 1 分离菌株的生化鉴定结果

菌株	葡萄糖	半乳糖	果糖	蔗糖	核糖	脲酶	氧化酶	接触酶	吲哚
H1	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H2	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H3	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H4	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H5	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H6	+	-	+	+	-	-	-	+	-
H7	+	+	+	+	-	-	-	+	-
H8	+	-	-	-	-	-	-	+	-
H9	+	+	+	+	-	-	-	+	-

"-" 示阴性;"+" 示阳性。

2) 分离菌株的 PCR 扩增及分型鉴定结果。用副猪嗜血杆菌 16SrRNA 的特异性引物对分离菌株进行 PCR 扩增,所分离的 9 株菌株均可扩增出与预期大小(821 bp) 相符的片段(图 1)。可见,所分离的 9 株菌株为阳性副猪嗜血杆菌。分型鉴定结果显示:所分离的菌株中,5 型的有 7 株(菌株 H1~H7);4 型(菌株 H8)和 12 型(菌株 H9)的各 1 株。



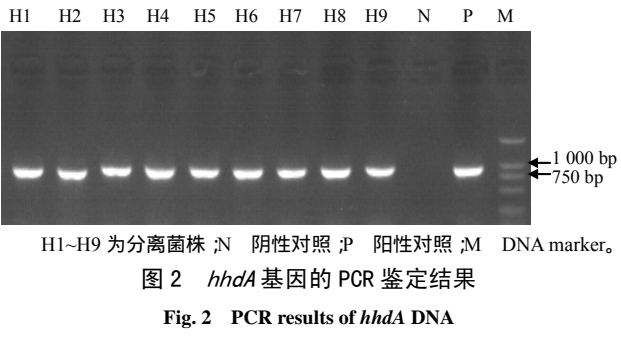
2.2 细菌生长情况

经观察，细菌的生长情况表现为距金黄色葡萄球菌越近，菌落越大，反之越小，甚至不生长，呈现卫星现象。

外毒素按其结构特征可分为 A-B 型毒素、攻膜毒素、超抗原毒素，其中攻膜毒素又名穿孔毒素，是指跨细胞膜形成孔道的细菌蛋白毒素。很多革兰氏阳性菌和阴性菌都可产生此毒素，某些病原菌所分泌的此毒素还兼有溶血的特性^[9]，例如猪胸肺炎放线杆菌所分泌的细胞毒素(Apx)中，Apx I 为强溶血性强细胞毒素；Apx II 为强溶血性中度细胞毒素；Apx III 为无溶血性强细胞毒素。杜克雷嗜血杆菌所分泌的 *hhdA* 毒素除了能溶解红细胞外，对成纤维细胞、心肌细胞、单核细胞、粒细胞、内皮细胞等都具有溶解作用^[10]。本试验中，在血平板上有针尖大小、边缘整齐的非溶血菌落，表明所分离的菌株为 NAD 依赖性、非溶血性细菌。

2.3 *hhdA* 基因的扩增和克隆结果

1) *hhdA* 基因的扩增结果。*hhdA* 基因扩增后，得到了约 964 bp 的目的条带(图 2)。



2) *hhdA* 基因的克隆结果。经 PCR 和酶切鉴定，片段大小与预期结果相符(图略)。

2.4 *hhdA* 基因的序列分析结果

所获得的 *hhdA* 基因的序列与副猪嗜血杆菌 SH0165 的 *hhdA* 基因(登录号 CP001321)以及副猪嗜血杆菌克隆株 HPS59 的 *hhdA* 基因(登录号 DQ127971) 的同源性为 98%~100%(表 2)。分离菌株 H1~H9 *hhdA* 基因序列的同源性为 99.0%~99.9%(图 3)。分离菌株与参考菌株 *hhdA* 基因的系统进化树见图 4。对推导的氨基酸序列进行 Blast 分析，获得的氨基酸序列与副猪嗜血杆菌 29755 *hhdA* 序列(登录号 AAZ67675)的同源性为 98%，与少数放线杆菌 *hhdA* 序列(登录号 EER48111) 的同源性为 61%。

表 2 分离菌株与其他菌株 *hhdA* 基因的同源性

Table 2 Nucleotide similarity of <i>hhdA</i> between isolated strains and									
other strain									%
菌株	同源性								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
SH0165	99	98	100	99	99	99	99	99	99
HPS59	99	99	99	99	99	99	99	99	99

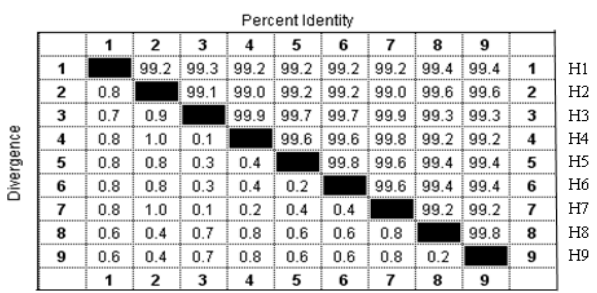


图 3 分离菌株 *hhdA* 基因序列的同源性

Fig.3 Analysis on nucleotide similarity of *hhdA* from the isolated strains

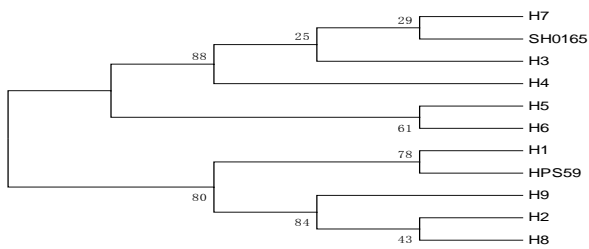


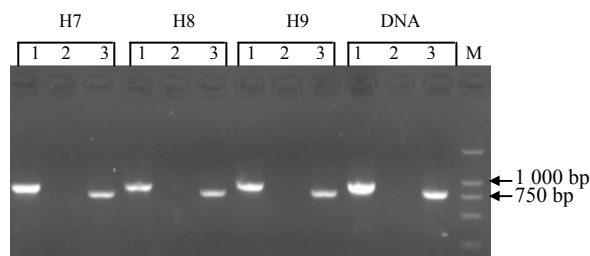
图 4 分离菌株与参考菌株 *hhdA* 基因的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed for *hhdA* gene of isolated and reference strains

2.5 *hhdA* 基因的 RT-PCR 鉴定结果

为了鉴定所分离菌株 *hhdA* 基因的表达，将分离鉴定副猪嗜血杆菌 5 型 H7 菌株、4 型 H8 菌株、12

型 H9 菌株摇菌培养后提取的总 RNA, 经反转录 PCR, 得到了相应的 *hhdA* 基因(图 5)。对分离菌株 H1~H6 进行反转录 PCR 也得到了相应的结果(图略)。



1 *hhdA*; 2 阴性对照; 3 16SrRNA; M DNA marker.

图 5 *hhdA* 基因的 RT-PCR 鉴定结果

Fig.5 RT-PCR results of *hhdA* gene

3 结论与讨论

从广东省不同地区猪场送检病猪中采集病料, 送检病猪呈现疑似副猪嗜血杆菌全身性感染的特征, 解剖后可见胸腔内心、肺黏连, 并有大量纤维性渗出物和淡黄色积液; 腹腔内也有大量纤维性渗出物和淡黄色积液; 腹股沟淋巴结肿大、出血。经形态观察、生化特性鉴定和 PCR 鉴定, 从采集病料分离到的 9 株细菌(H1~H9)为副猪嗜血杆菌阳性。9 株细菌分别从不同发病猪的脑(H3、H7)、心(H5、H6)、肺(H8)、脾(H4、H9)、胸腹腔积液(H1、H2)中分离得到, 经血清型鉴定为 4 型(H8)、5 型(H1~H7)、12 型(H9), 均属强毒力致病菌株。用副猪嗜血杆菌 *hhdA* 基因的特异性引物从 9 株细菌中均扩增到了相应的目的条带, 在 NCBI 网站中进行 BLASTn 分析, 结果显示获得的序列与参考菌株的 *hhdA* 基因具有很高的同源性, 说明所分离的菌株中均含有相应的 *hhdA* 基因序列。副猪嗜血杆菌 15 个血清型与该菌毒力的关系尚不完全清楚, 不同血清型之间, 甚至同一血清型不同菌株之间的交叉保护性差别较大^[11], 使得利用血清型判定其毒力差异存在一定的缺陷。本试验中所获得的 9 株副猪嗜血杆菌 *hhdA* 基因的同源性为 99.0%~99.9%, 遗传进化树显示 5 型分离菌株 H3、H4、H5、H6、H7 与参考菌株 SH0165 的 *hhdA* 基因具有较近的遗传进化关系; 另外 5 型菌株 H1 和 H2、4 型菌株 H8、12 型菌株

H9 的 *hhdA* 基因在遗传进化关系上处于同一进化分支, 表明 *hhdA* 基因在致病菌株中具有良好的保守性, 不同血清型致病菌株的 *hhdA* 基因存在较近的遗传进化关系。因 *hhdA* 基因在非致病菌株中为阴性, 所以, 可考虑将 *hhdA* 基因作为区分致病菌株和非致病菌株的候选对象, 以完善对副猪嗜血杆菌致病菌株的鉴定方法。

另外, 根据获得的 *hhdA* 基因序列推导了相应的氨基酸序列, 并在 NCBI 网站中进行 BLASTp 分析, 结果表明与相应种属细菌的溶血素蛋白具有较高的相似性。RT-PCR 也扩增到了相应的目的条带, 表明 *hhdA* 基因在菌体内得到了相应的表达, 但所分离菌株在含有 NAD 的血平板上进行培养时并没有溶血现象。由此推测, *hhdA* 基因所编码的蛋白可能是一种非溶血性的细胞毒素, 其所作用的靶细胞以及在副猪嗜血杆菌中所发挥的致病机理还有待研究。

参考文献:

- [1] Amano H, Shibata M, Kajio N, et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method[J]. J Vet Med Sci, 1994, 56(4): 639-644.
- [2] MacInnes J I, Desrosiers R. Agents of the "suicide Diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*[J]. Can J Vet Res, 1999, 63: 83-89.
- [3] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat stable antigen extracts[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30: 862-865.
- [4] Oliveira S, Pijoan C. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints[J]. Can J Vet Res, 2004, 68: 71-75.
- [5] Metcalf D S, MacInnes J I. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid[J]. Can J Vet Res, 2007, 71: 181-188.

(下转第 301 页)