

陈俊红, 蔡煜, 戴薇, 等. 禽致病性大肠杆菌 P 型菌毛 *papA* 基因克隆与基因分型分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1594-1602.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.018

禽致病性大肠杆菌 P 型菌毛 *papA* 基因克隆与基因分型分析

陈俊红, 蔡煜, 戴薇, 雷卫强, 戴鼎震

(金陵科技学院动物科学与食品工程学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 为克隆禽致病性大肠杆菌 P 型菌毛 *papA* 基因, 确定其基因分型并分析其变异性, 从 GenBank 数据库中查找大肠杆菌 P 型菌毛 *papA* 基因, 并运用 Snap Gene 3.2.1 软件设计合成 3 对引物。其中, 第 1 对引物为扩增不同基因分型通用引物, 预计扩增片段大小为 281 bp; 第 2 对和第 3 对引物是为了扩增完整 *papA* 基因并分析有无变异而设计的, 预计扩增片段大小分别为 522 bp 和 943 bp。以禽大肠杆菌 HJ2、TK3 菌株的基因组为模板进行 PCR 扩增; 将所有扩增片段回收、酶切, 并分别与 pTG19-T 载体进行连接, 转化进入 DH5 α 受体菌, 提取获得含扩增片段的重组质粒, 测序并进行序列分析。结果表明, 用引物 1 从 HJ2、TK3 菌株的基因组中均扩增获得接近 281 bp 大小的片段, 用引物 2 则只从 HJ2 菌株基因组中扩增获得接近 522 bp 大小的片段, 而未能从 TK3 菌株基因组中扩增出片段; 用引物 3 从 TK3 菌株基因组中扩增出接近 943 bp 大小的片段, 而未能从 HJ2 菌株基因组中扩增出产物。经过基因碱基序列分析比对, 完整的 *papA* 基因则位于 943 bp 的片段之中, 确定 HJ2 和 TK3 两个菌株 P 型菌毛 *papA* 基因均属基因 11 型, 但发现二者 *papA* 基因存在一定的碱基差异。PapA 蛋白氨基酸序列比对发现, 同属于基因 11 型的 *papA* 基因编码的 PapA 蛋白氨基酸序列也存在位点差异。

关键词: 禽大肠杆菌; P 型菌毛; *papA* 基因

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1594-09

Cloning and genotyping of *papA* gene of type P pili of avian pathogenic *Escherichia coli*

CHEN Jun-hong, CAI Yu, DAI Wei, LEI Wei-qiang, DAI Ding-zhen

(School of Animal Science and Food Engineering, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210046, China)

Abstract: In order to clone the *papA* gene of type P pili of avian pathogenic *Escherichia coli*, determine its genotyping and analyze its variability, the *papA* gene of *Escherichia coli* P-type pili was searched from the GenBank database, and three pairs of primers were designed and synthesized using Snap Gene 3.2.1 software. Among them, the first pair of primers was a universal primer for amplifying different genotypes, and the expected amplified fragment size was 281 bp. The second

收稿日期: 2022-09-27

基金项目: 江苏省高校自然科学面上项目(19KJB230006); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20210005); 金陵科技学院高层次人才科研启动项目(jit-b-201909); 金陵科技学院“创客”虚拟班项目(2017008, 2021001); 大学生创新训练计划项目(202113573090M)

作者简介: 陈俊红(1990-), 女, 安徽宿州人, 博士研究生, 主要从事预防兽医、中兽医学和比较医学研究。(E-mail) chenjunhong@jit.edu.cn

通讯作者: 戴鼎震, (E-mail) dzdai@163.com

and third pairs of primers were designed to amplify the complete *papA* gene and analyze the variation, and the expected amplified fragments were 522 bp and 943 bp, respectively. The genes of avian *Escherichia coli* HJ2 and TK3 strains were used as templates for PCR amplification. All amplified fragments were recovered, digested and connected with the pTG19-T vector, respectively, and transformed into DH5 α receptor bacteria. Recombinant plasmids containing amplified fragments were extracted, sequenced and analyzed. The results showed that a fragment

of 281 bp was amplified from the genome of HJ2 and TK3 strains by primer 1, and a fragment of 522 bp was amplified from the genome of HJ2 strain by primer 2 but not from the genome of TK3 strain. A fragment of 943 bp was amplified from the genome of TK3 strain by primer 3 but not from the genome of HJ2 strain. After sequencing analysis, the complete *papA* gene was located in the fragment of 943 bp. It was confirmed that the *papA* genes of P-type pili of the two strains belonged to genotype 11, but there were some base differences in their *papA* genes. Amino acid sequence alignment of PapA protein showed that there were site differences in the amino acid sequence of PapA protein encoded by *papA* gene, which belonged to genotype 11.

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*; type P pili; *papA* gene; variation

禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌(APEC)引起的细菌性传染病,对养禽业危害很大,常可引起气囊炎、肝周炎、心包炎,甚至败血症^[1-2]。由于大肠杆菌具有菌毛和毒素等多种致病因子,尤其是菌毛可对宿主上皮细胞进行黏附,有助于大肠杆菌在宿主组织器官的定居和繁殖,从而引发上述病理变化^[3-4]。禽大肠杆菌具有1型和P型两类菌毛,二者均由染色体基因编码,绝大多数禽致病性大肠杆菌表达1型菌毛^[5]。1型菌毛能凝集多种动物的红细胞,且可被D-甘露糖所抑制,因此,1型菌毛又称甘露糖敏感血凝特性菌毛(MSHA)。P型菌毛也能凝集红细胞,但不能被D-甘露糖所抑制,因此又称之为甘露糖抵抗血凝特性菌毛(MRHA)。1型菌毛主要黏附禽上呼吸道,有助于细菌对宿主呼吸道的初步感染,而P型菌毛主要黏附禽下呼吸道,有助于细菌对宿主呼吸道的深部感染^[6-7]。P型菌毛是由*papI*、*papB*、*papA*、*papH*、*papC*、*papD*、*papJ*、*papK*、*papE*、*papF*及*papG*等基因构成的基因簇编码的,PapA和PapG是大肠杆菌P型菌毛的结构蛋白,其中PapA是组成P型菌毛的主要结构蛋白,由1 000多个亚单位通过组合形成螺旋杆状的菌毛杆;PapG是P型菌毛顶端的黏附蛋白^[8-9]。研究表明,P型菌毛也存在于感染人尿道上皮的大肠杆菌上,且其*papA*基因与禽大肠杆菌P型菌毛*papA*基因存在明显的同源性,反映了它们起源于同一祖先^[10]。但同时,P型菌毛*papA*基因也处于持续的变异之中,先后出现了14个不同的基因分型,这些基因分型可分别用分型PCR引物进行扩增鉴别,而所有位于5'端的引物是共同的,只是3'端的引物不同^[11-13]。然而,即使是同样的基因分型,其相互之间仍然存在微小的变异^[9]。禽大肠杆菌P型菌毛*papA*基因分型报道较少,目前报道的*papA*基因多属于基因11型。但不同分离菌株之间是否存在变异仍有待于通过PCR扩增和测序予以分析,这对分析P菌毛抗原并

研制P型菌毛亚单位疫苗非常重要。本研究拟以2株禽致病性大肠杆菌为研究对象,针对其P型菌毛上的*papA*基因设计、合成相关引物,进行PCR扩增,对扩增产物片段进行酶切、连接、转化,构建*papA*基因重组克隆载体。然后对*papA*基因碱基序列进行测定,并与相关序列进行比较分析,从而推断P型菌毛*papA*基因是否存在变异以及变异规律,为P型菌毛的检测,相关疫苗的制备提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及主要试剂

禽致病性大肠杆菌TK3菌株(血清型O1)及HJ2菌株(血清型O114),含有P型菌毛,由金陵科技学院兽医微生物学实验室提供。pTG19-T PCR产物克隆载体来自上海捷瑞生物工程有限公司,胶回收试剂盒购自OMEGA公司,质粒抽提试剂盒由深圳逗点生物技术有限公司提供,琼脂糖购自兰杰科技有限公司。

1.2 引物的设计与合成

鉴于禽大肠杆菌P型菌毛*papA*基因多为11型,因此以*papA*基因11型PCR分型通用引物为第1对引物(P1、P2),预计扩增片段大小为281 bp。

P1:5'-GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG-3'

P2:5'-GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC-3'

第2对引物(P3、P4)为*papA*基因两端相对保守区选择的引物,预计扩增片段大小为522 bp,位于*papA*基因碱基序列的第4至第525位碱基之间,不完全包含*papA*基因全碱基序列。

P3:5'-ATTAAGTCGGTTATTGCCGG-3'

P4:5'-TGCAACTGCTGAGAAGGC-3'

第3对引物(P5、P6)拟用来扩增完整*papA*基因11型基因,但由于缺少基因11型可参考的模板,需要扩大引物设计的区域。拟以亲缘关系相近的其他*papA*基因碱基序列作为模板。查找文献发现基

因 11 型(F11)与基因 14 型(F14)、基因 13 型(F13)及基因 165 型(F165)亲缘关系相近,同属于一个进化分支^[5],其中,基因 14 型具有完整的 *pap* 基因碱基序列可供参考。遂以基因 14 型大肠杆菌 83 972 株中包含 *papA* 基因 14 型(GenBank:DQ10312.1)的 *papB* 至 *papH* 之间的碱基序列为模板,分别从 *papA* 基因上游的 *papB* 基因 3' 末端及 *papA* 基因下游的 *papH* 基因 5' 末端筛选引物,预计扩增片段大小为 943 bp,中间片段包含了 *papA* 基因的全碱基序列。

P5:5'-ACAGATGAGTCGTCCGGCATTTG-3'

P6:5'-GACCGGCAAAAACACCATGAAC-3'

1.3 *papA* 基因 DNA 模板提取

提取大肠杆菌 TK3 及 HJ2 菌株染色体 DNA 作为模板。取 1.5 ml 过夜培养菌液,离心后悬于 0.5 ml 裂解液(TE pH 8.0, 0.5% SDS 和蛋白酶 K 50 μg/ml)中,55 ℃ 水浴 1 h 后用等体积饱和酚、氯仿及 1:1 苯酚和氯仿混合液抽提,乙醇沉淀后溶于蒸馏水中。

1.4 反应体系与反应条件

反应体系均为 30 μl:待检测 *papA* 模板 3 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl(终浓度均为 0.4 μmol/L),2×PCR Mix 15 μl,灭菌三蒸水 10 μl。

反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 复性 10 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min,16 ℃ 维持 5 min。扩增产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 目的基因和 T 载体连接、转化与筛选鉴定

凝胶电泳后切胶:加 450 μl 溶胶液,65 ℃ 水浴至完全融解。将溶液转移到 DNA 纯化柱上,12 000 r/min 离心 1 min,加 600 μl 洗液至 DNA 纯化柱中,12 000 r/min 离心 1 min,重复洗 1 次。12 000 r/min 离心 5 min,室温挥发 5 min,除去残留的乙醇。加 20 μl 预热的洗脱液,室温静置 2 min,最大转速离心收集。取 200 μl PCR 管,加 1 μl pTG19-T 载体,再加 3 μl PCR 胶回收产物,混匀。加 4 μl 酶和 Buffer 混合的即用型 2× 预混液,立即混匀。在 PCR 仪上,25 ℃ 连接 30 min。冰上融化 DH5α 感受态细胞,加入连接产物,轻弹管壁混匀,冰上静置 30 min,42 ℃ 热激 45 s 后,立即冰上放置 3 min,加 900 μl LB 培养基(不含 Amp),37 ℃ 摇菌培养 1 h(转速 250 rpm)。Amp 抗性的 LB 固体培养基在 37 ℃ 预热。5 000 r/min 离心 5 min,弃 900 μl LB 培养基,用剩余

的培养基重悬细菌,用无菌的涂布棒涂菌,37 ℃ 培养箱中倒置培养过夜。

1.6 PCR 鉴定克隆

用 T 载体上 M13 上下游引物进行 PCR 克隆与鉴定。取无菌的 2.0 ml 离心管,加 200 μl LB 培养基(含 Amp),用无菌的 20 μl 枪头挑取菌落,并在培养基中反复吹打,37 ℃ 摇菌培养 4 h(转速 250 r/min)。反应体系 10.0 μl:待检测 *papA* 模板 1.0 μl,M13 上游引物 0.4 μl,M13 下游引物 0.4 μl(终浓度均为 0.4 μmol/L),2×PCR Mix 5.0 μl,灭菌三蒸水 3.2 μl。PCR 反应条件为 98 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,16 ℃ 维持 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 *papA* 基因碱基序列测定与分析

选取阳性克隆摇菌并抽提质粒:PCR 产物凝胶电泳后选取阳性克隆,取 60 μl 菌液加入到 3 ml LB 培养基(含 Amp),37 ℃ 摇菌培养过夜(转速 250 r/min),用质粒抽提试剂盒抽提质粒。取 10 μl 质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。通用测序引物:

M13 F:5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'

M13 R:5'-AGCGGATAACAATTTCACAGAGGA-3'

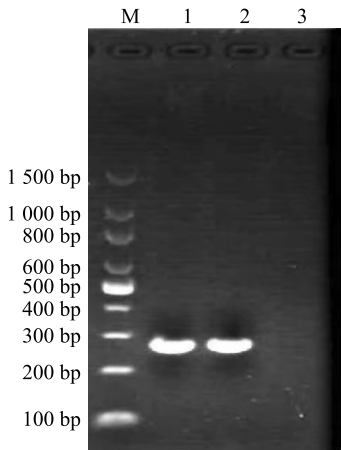
通过 Snap Gene 和 DNA-Star 等生物分析软件对测定的基因碱基序列进行分析、比对,鉴定出 HJ2 及 TK3 菌株 P 型菌毛 *papA* 基因是否属于基因 11 型。将 HJ2 及 TK3 菌株 P 型菌毛 *papA* 基因碱基序列进行比对,分析相互之间的同源性。通过模拟翻译得出 HJ2 及 TK3 菌株 P 型菌毛 PapA 蛋白的氨基酸序列进行比对,同时与亲缘关系相近的基因 13 型(F13)、基因 14 型(F14)和 F165 基因碱基序列及其编码的氨基酸序列进行对比,分析其同源性及其变异特点。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以提取的菌种基因组为模板,用引物 1 从 HJ2 及 TK3 模板中均扩增出产物,电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,电泳泳道 1 和 2 均有 1 条 DNA 条带,大小接近 300 bp,与预定的 281 bp 相近。

以 HJ2 和 TK3 菌株基因组为模板,运用引物 2 和引物 3 进行了 PCR 扩增,结果如图 2 和图 3。引

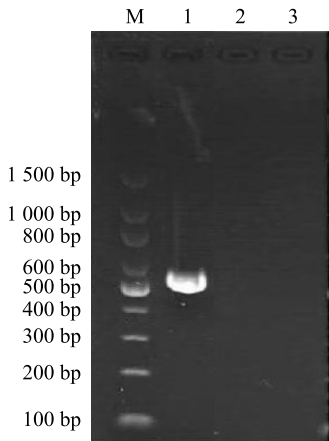


M:标准 DNA 对照;1:HJ2;2:TK3;3:阴性对照。

图 1 引物 1 扩增 HJ2 及 TK3 菌株基因组 *papA* 基因片段电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of amplifying *papA* gene fragments in HJ2 and TK3 genomes using primer 1

物 2 仅从 HJ2 菌株基因组中扩增出产物,大小接近 522 bp;引物 2 未能从 TK3 菌株基因组中扩增出产物。引物 3 从 TK3 菌株基因组扩增出产物,大小接近 943 bp,但用引物 3 未能从 HJ2 菌株基因组中扩增到产物。



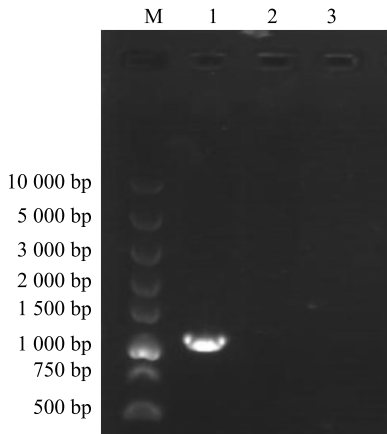
M:标准 DNA 对照;1:HJ2;2:TK3;3:阴性对照。

图 2 引物 2 扩增 HJ2 及 TK3 菌株基因组 *papA* 基因片段电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of amplifying *papA* gene fragments in HJ2 and TK3 genomes using primer 2

2.2 *papA* 基因克隆与筛选鉴定

PCR 扩增产物的连接与转化:以扩增产物为模板,再次进行 PCR 扩增,结果在同样的位置均获得更粗和更亮的 DNA 条带,将含有扩增产物的可溶性

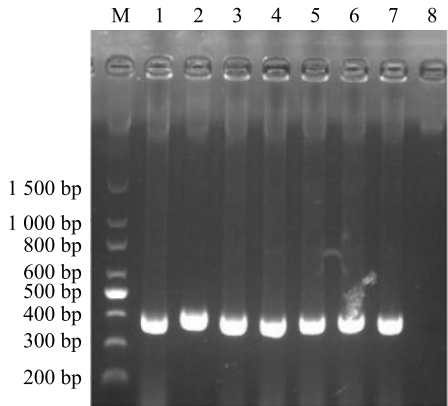


M:标准 DNA 对照;1:TK3;2:HJ2;3:为阴性对照。

图 3 引物 3 扩增 TK3 菌株基因组 *papA* 基因片段电泳结果

Fig.3 Electrophoresis results of amplifying *papA* gene fragments in TK3 genomes using primer 3

胶切块回收 DNA,连接后获得了待鉴定的重组质粒。以筛选待鉴定的重组质粒为模板,运用 M13 通用测序引物进行 PCR 扩增、验证,筛选到 3 种扩增产物阳性克隆,PCR 所扩增的片段大小与预期的产物相近。以引物 1 和引物 3 扩增产物的重组质粒为模板,用 M13 上下游引物进行 PCR 扩增,结果见图 4 和图 5。



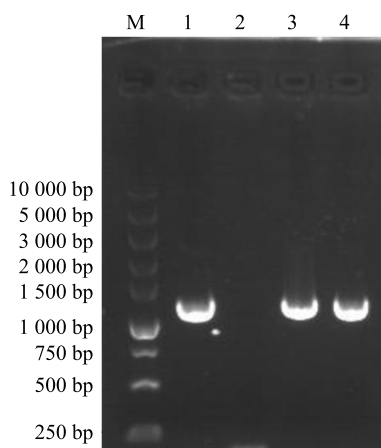
M:标准 DNA 对照;1~7:阳性条带;8:阴性对照。

图 4 以引物 1 扩增产物的重组质粒为模板进行 PCR 鉴定克隆 *papA* 基因片段电泳结果

Fig.4 The electrophoresis results of the cloned *papA* gene fragment identified by PCR using the recombinant plasmid of amplified product by primer 1 as the template

2.3 *papA* 扩增产物测序结果

2.3.1 引物 1 扩增的产物序列 运用 M13 通用测序引物对所扩增的所有 DNA 产物进行序列测定,获



M: 标准 DNA 对照; 1、3、4: 阳性条带; 2: 阴性对照。

图 5 以引物 3 扩增产物的重组质粒为模板进行 PCR 鉴定克隆 *papA* 基因片段电泳结果

Fig.5 The electrophoresis results of the cloned *papA* gene fragment identified by PCR using the recombinant plasmid of amplified product by primer 3 as the template

得了不同片段大小的 *papA* 基因碱基序列。运用 Snap Gene 生物软件分析比对,发现用基因 11 型扩增引物获得的 HJ2 和 TK3 菌株基因组的扩增产物大小为 281 bp,两者 *papA* 片段相似度达 99.5% 以上,仅 1 个碱基有差异(图 6)。将 HJ2 和 TK3 菌株基因组扩增产物序列与 GenBank 中已发表的禽大肠杆菌 *papA* 基因 11 型碱基序列(基因序列登记号 L07420,含有基因 11 型)^[11] 进行比对,发现 HJ2 菌株的 *papA* 基因与比对的 *papA* 基因 11 型区域碱基序列相同,但 TK3 菌株的 *papA* 基因 11 型有 1 个碱基发生变异,由 A 变为 C(图 7 阴影标注),说明扩增到 APEC 菌株 HJ2 和 TK3 的 *papA* 基因均属于基因 11 型。

2.3.2 引物 2 和引物 3 扩增的产物序列 引物 2 从 HJ2 菌株基因组中扩增的产物大小为 522 bp,涵盖从 *papA* 基因序列第 4 位至 525 位碱基位,有编码 7 个氨基酸的碱基序列不在扩增范围内。引物 3 扩增的产物大小为 943 bp,经碱基序列测定比对发现其包含了 *papA* 全部序列(549 个 bp),TK3 菌株 P 型菌毛 *papA* 基因共有 549 个碱基对,其编码 182 个氨基酸。

2.4 APEC 菌株 TK3 及 HJ2 P 型菌毛 *papA* 基因变异分析

经比对,菌株 TK3、HJ2 与 F13、F14、F165 之间

存在一定的同源性,主要表现为 *papA* 基因碱基序列的 5',从起始密码子到基因扩增分型的共同上游引物(图 7 中的阴影部分)的碱基序列完全相同,这正是所有基因分型 *papA* 扩增可共用同一上游引物的原因。相比之下,不同分型 *papA* 基因碱基序列的 3'端碱基序列有着明显的差异性,由图 8 可以看出,不同分型 *papA* 基因碱基序列的 3'末端近 60 个碱基差异比较明显,在可供比较的序列中,至少有 6 处碱基出现变异,而同为基因 11 型的禽大肠杆菌 TK3 与 HJ2,在引物 2 所扩增区域间(图 8 阴影处)二者之间有 2 处碱基不同,这可能正是引物 2 能够扩增出 HJ2 菌株的 *papA* 基因片段而不能从 TK3 菌株扩增出片段的原因。

2.5 TK3 及 HJ2 菌株 *PapA* 蛋白氨基酸变异分析

经检测分析,TK3 与 HJ2 菌株的 *papA* 基因同属于基因 11 型,而 F165 与 F11 大肠杆菌 *papA* 基因的之间的相似度达 95.3%^[14],将 TK3、HJ2 与 F165 和 F11 大肠杆菌 *PapA* 蛋白氨基酸序列进行比对,结果见图 9。结果显示 *PapA* 蛋白同源性较高,由 182 个氨基酸组成,相互之间绝大多数氨基酸序列一致,有 5 处氨基酸变异,分别位于第 20、31、107、147、151 位,而在 TK3 菌株和 HJ2 菌株之间,*PapA* 蛋白仅有 3 处出现氨基酸变异,位于第 20、147、151 位(图 9)。TK3 菌株和 HJ2 菌株作为二个不同血清型大肠杆菌,拥有同一基因分型的 *papA* 基因,说明 *papA* 基因分型与菌体血清型关联不大。

3 讨论

P 型菌毛是禽致病性大肠杆菌(APEC)重要的毒力因子,主要起到黏附人和动物宿主细胞的作用,从而有助于细菌的定居繁殖,引发病理变化,甚至造成死亡。不仅人大肠杆菌具有 P 型菌毛,禽大肠杆菌也有 P 型菌毛,所不同的是人大肠杆菌菌毛黏附的是尿道上皮细胞,引起尿道感染,而禽大肠杆菌 P 型菌毛则是与禽类深部呼吸道结合导致感染^[1,8-9]。研究表明,P 型菌毛是 APEC 的重要毒力标记,其流行分布率虽然不高^[9],但可能还有变异类型未能检出。国内很少有关于 APEC 的 *papA* 基因克隆与基因分型的报道。目前国外文献报道的 APEC 的 P 型菌毛 *papA* 基因均为基因 11 型,因此,采用基因 11 型的扩增引物可以检测出同基因类型的 *papA* 基因片段。但基因 11 型片段仅有 281 bp,而完整的

下划线表示引物 1 所在位置,有一处碱基变异,标有阴影,TK3 菌株中为 C,HJ2 菌株中为 A。

Fig.6 Comparison of the sequence of *papA* gene fragments amplified from TK3 and JI2 genomes by primer 1 with the sequence of type 11 *papA* gene

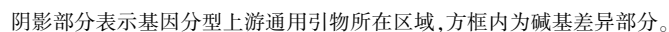


Fig.7 Homology comparison of *papA* gene amplified from TK3 and HJ2 strains with type 13 *papA* gene, type 14 *papA* gene and type 165 *papA* gene in 5' end

的不同分离株 P 型菌毛完整的 *papA* 基因之间的差异性,采用了引物 2 对位于基因分型片段之外的 5' 和 3' 之间的序列进行了扩增,引物 2 针对的范围从起始密码子到终止密码子前 23 个碱基处,有编码 7 个氨基酸的碱基序列不在其内,含有 *papA* 绝大多数碱基序列。PCR 扩增结果发现,针对 HJ2 菌株基因

○表示未检测;阴影部分表示引物 2 下游引物所在区域,方框内为碱基差异部分。

图8 TK3、HJ2 与 F13 及 F165 *papA* 基因 3'端部分碱基序列同源性比较

	1	20	31	40
F11	M I K S V I A G A V A M A V V S F G V	N A A P T I P Q G Q G	K V T F N G T V V D	
F165	- - - - - - - - - - - - - - - -	N - - - - - - - - - - - - - - - -	R - - - - - - - - - - - - - - - -	
HJ2	- - - - - - - - - - - - - - - -	N - - - - - - - - - - - - - - - -	K - - - - - - - - - - - - - - - -	
TK3	- - - - - - - - - - - - - - - -	T - - - - - - - - - - - - - - - -	K - - - - - - - - - - - - - - - -	
	41			80
F11	A P C S I S Q K S A D Q S I D F G Q L S K S F L E A G G T S K P M D L D I E L V			
F165	- - - - - - - - - - - - - - - -			
HJ2	- - - - - - - - - - - - - - - -			
TK3	- - - - - - - - - - - - - - - -			
	81		107	120
F11	N C D I T A F K Q G Q A A K N G K V Q L S F T G P Q	P T G Q A E E L A T N G G T		
F165	- - - - - - - - - - - - - - - -	V - - - - - - - - - - - - - - - -		
HJ2	- - - - - - - - - - - - - - - -	V - - - - - - - - - - - - - - - -		
TK3	- - - - - - - - - - - - - - - -	V - - - - - - - - - - - - - - - -		
	121			
F11	G T A I V V Q A A G K N V S F D G T A G D A Y P L K	D G D N	N L H Y T A L V K K	
F165	- - - - - - - - - - - - - - - -	N - - - - - - - - - - - - - - - -	N - - - - - - - - - - - - - - - -	
HJ2	- - - - - - - - - - - - - - - -	H - - - - - - - - - - - - - - - -	V - - - - - - - - - - - - - - - -	
TK3	- - - - - - - - - - - - - - - -	D - - - - - - - - - - - - - - - -	N - - - - - - - - - - - - - - - -	
	161		182	
F11	A N G G T V S E G A F S A V A T F N L S Y Q			
F165	- - - - - - - - - - - - - - - -			
HJ2	- - - - - - - - - - - - - - - -			
TK3	- - - - - - - - - - - - - - - -			

○表示未检测;阴影部分表示氨基酸差异部分。

图9 TK3、HJ2与基因型F11及F165菌株PapA蛋白氨基酸序列比较

Fig.9 Comparison of the amino acid sequence of PapA protein between TK3, HJ2 and genotype F11 and F165 strains

组能够扩增到 522 bp 片段,而未能从 TK3 菌株中扩增到产物,这说明同为基因 11 型的 APEC 的 P 型菌毛 *papA* 基因碱基序列在基因 11 型碱基序列之外的区域存在一定的差异。为进一步弄清不同菌株完整

的 *papA* 基因碱基序列的差异,又运用引物 3 对 TK3 菌株的完整 *papA* 基因进行扩增,并测定了碱基序列,但未能从 HJ2 菌株中扩增到完整的 *papA* 基因碱基序列。基因碱基序列比对后发现,HJ2 菌株和

TK3 菌株菌毛 *papA* 基因的 5'端有相同的碱基序列,而 3'则存在多处不同的碱基,仅在下游引物序列中就有 2 个碱基存在差异,这就是引物 3 能从用 HJ2 菌株中扩增出产物而不能从 TK3 菌株中扩增出产物的根本原因。将测得的 TK3 菌株和 HJ2 菌株菌毛 PapA 蛋白氨基酸序列进行了比对,发现分型引物间的区段基因编码的氨基酸序列基本相同,但对 TK3 菌株来说,PapA 蛋白氨基酸第 20 位氨基酸为苏氨酸(T),HJ2 的第 20 位则为天冬酰胺(N),TK3 菌株和 HJ2 菌株的其他 PapA 部位也有 2 处氨基酸存在变异,分别位于第 147 和 151 位。这说明即使同属于同一个基因分型,不同菌株的 *papA* 基因和编码的氨基酸序列也不是完全相同的,且 *papA* 基因分型与菌体血清型关系不大。

为了更全面比较分析不同血清型菌株 *papA* 之间的差异,通过 DNA-Star 软件分析,将 TK3 菌株的 PapA 蛋白氨基酸序列与相似度较高的 F165 PapA 和来自人尿道感染的大肠杆菌 P 型菌毛 PapA 蛋白氨基酸序列进行了比对,结果发现分型引物间的区段序列基本相同。在分型区外的区域,5'端同源性较高,3'端变异非常明显。值得注意的是,TK3 菌株虽然属于 *papA* 基因 11 型,却是以基因 14 型的 *papA* 上下游序列为模板设计的引物 3 扩增出来的。该引物扩增 *papA* 区域外的 *papB* 和 *papH* 之间的序列,其 5'端位于 *papA* 上游 *papB* 基因的 3'端,3'端则位于 *papA* 下游 *papH* 基因的 5'端,该对引物能够扩增出完整的 *papA* 基因。由此可见,虽然本研究扩增 *papA* 具有偶然性,但恰好说明了 *papA* 基因分型不同的菌株其 *papB* 和 *papH* 基因却可能存在较大的相似性。相反,运用引物 3 却未能从 HJ2 菌株中扩增到完整的 *papA* 片段,这反映了即使 *papA* 基因分型相同,其上下游 *papB* 和 *papH* 基因却可能存在变异,从另一个方面证明了通过现有基因分型划分 APEC P 型菌毛不一定具有代表性,提示用 *papA* 基因扩增分型对 APEC P 型菌毛进行检测分类有一定的意义,但是其他分子生物学特征则需要综合分析。

papA 是编码 P 型菌毛 PapA 蛋白的基因,约 1 000 个 PapA 蛋白亚基组装形成弹簧状菌毛杆,从而形成菌毛的主体结构^[8,10]。PapA 蛋白虽然不直接参与细菌的宿主作用,但仍然与细菌的致病性存在密切的关系。主要表现在菌毛杆连接着黏附性蛋白 PapG,没有 PapA 蛋白,PapG 蛋白将失去支撑。

而弹簧状菌毛杆也可以通过伸缩来调节菌毛的长度,便于接近宿主细胞。目前,人源大肠杆菌 *papA* 基因分布较广,且因变异出现 14 个基因型,但这些变异不影响菌毛的表达和黏附作用。禽大肠杆菌 *papA* 基因型均属基因 11 型,其变异与致病性的关系尚不知晓。大多数 APEC 缺乏完整的操纵子基因簇,因而较少能够克隆到表达菌毛的基因簇重组载体^[9]。究其原因,可能存在新的变异位点而没有检测出来。有的菌株 *papA* 基因还插入了抗生素抗性基因,与细菌耐药性保护机制有关^[9],这也会影响到 PCR 扩增检测结果。本研究测定的 *papA* 基因未发现有关抗生素抗性基因插入的现象,有关机制尚需进一步研究。

综上,本研究通过设计合成的多对引物,获得了 *papA* 基因的克隆,经比对分析发现属于基因 11 型,从而获得 *papA* 基因克隆重组菌,为致病性大肠杆菌菌毛毒力因子的检测、菌毛亚单位疫苗的研制提供了一定的依据。研究结果还证实,APEC 不同菌株 P 型菌毛 *papA* 基因虽然同属基因 11 型,但仍然处于变异过程之中,随着检测样品数量的不断积累,新的变异类型可能还会被发现。

参考文献:

- [1] RAMÍREZ RM, ALMANZA Y, GONZÁLEZ R, et al. Avian pathogenic *Escherichia coli* bind fibronectin and laminin[J]. *Vet Res Commun*, 2009, 33(4):379-386.
- [2] DOZOIS C M, POURBAKHSH S A, FAIRBROTHER J M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry[J]. *Vet Microbiol*, 1995, 45(4):297-309.
- [3] SMYTH C J, MARRON M B, TWOHIG J M, et al. Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1996, 16(2):127-139.
- [4] GYIMAH J E, PANIGRAHY B. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium[J]. *Avian Dis*, 1988, 32(1):74-78.
- [5] KLEMM P, ROOS V, ULETT GC, et al. Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(1):781-785.
- [6] POURBAKHSH S A, DHO-MOULIN M, BRÉE A, et al. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Microb Pathog*, 1997, 22(6):331-341.
- [7] SAUER M M, JAKOB R P, LUBER T, et al. Binding of the bacterial adhesin FimH to its natural, multivalent high-mannose type

- glycan targets [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(2):936-944.
- [8] EPLER BARBERCHECK C R, BULLITT, ANDERSSON M. Bacterial adhesion pili [J]. PubMed-NCBI, 2018, (87):1-18.
- [9] KARIYAWASAM S, NOLAN LK. *papA* gene of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Avian Dis, 2011, 55(4):532-538.
- [10] MORTEZAEI N, SINGH B, BULLITT E, et al. P-fimbriae in the presence of anti-PapA antibodies; new insight of antibodies action against pathogens[J]. Scientific Reports, 2013(12):1-9.
- [11] JOHNSON J R, STELL A L, SCHEUTZ F, et al. Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay[J]. Infect Immun, 2000, 68(3):1587-1599.
- [12] 戴鼎震, 郑明球, 蔡宝祥, 等. 鸡大肠杆菌 P 型菌毛结构基因 (*papA*) 的克隆与序列测定[J]. 中国兽医学报, 2000(5):455-458.
- [13] LILLINGTON J, GEIBEL S, WAKSMAN G. Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9):2783-2793.
- [14] MAITI S N, DESGROSEILLERS L, FAIRBROTHER J M, et al. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165(1) of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787[J]. Microb Pathog, 1994, 16(1):15-25.

(责任编辑:石春林)