

袁晓晴, 彭 凌, 陈锦红, 等. 猪丹毒丝菌强毒株与弱毒疫苗株 *SpaA* 基因生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 70–76.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.012

# 猪丹毒丝菌强毒株与弱毒疫苗株 *SpaA* 基因生物信息学分析

袁晓晴, 彭 凌, 陈锦红, 温 权, 刘博婷, 蔡巩林

(韶关学院英东生命科学学院/粤北生猪生产及疫病防控协同创新发展中心, 广东韶关 512005)

**摘要:**对猪丹毒丝菌 *SpaA* 蛋白进行生物信息学分析, 并对比了猪丹毒丝菌弱毒菌株和野生强毒菌株间的差异。结果显示, 由于猪丹毒丝菌 GC42 的 *SpaA* 蛋白缺少一段含有 80 个氨基酸的序列, 使得该菌株的蛋白质相对分子质量、氨基酸组成、二级和三级结构与强毒株的 *SpaA* 蛋白质相比均有所差异, 导致这 2 株菌株引发机体产生的免疫原性和抗原性强弱有所不同, 推测这 2 株菌株中, SG7 菌株的免疫原性相对 GC42 较强; GC42 菌株的抗原性相对 SG7 菌株的抗原性来说较弱, 而猪丹毒丝菌 GC42 菌株的毒力相对猪丹毒丝菌 SG7 菌株较弱, 因此呈现弱毒菌株特性; 推测 2 株菌株的氨基酸序列均在 193~206、217~231、290~309、313~327、328~376、386~457 区段具有较高的形成 B 细胞表位的可能性。

**关键词:**猪丹毒丝菌; *SpaA* 蛋白; 弱毒菌株; 生物信息学分析; B 细胞抗原表位

**中图分类号:** S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0070-06

猪丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)是一种人畜共患传染病的病原菌, 人感染后表现为类丹毒症状, 猪感染后表现急性或亚急性败血症, 这种病原菌广泛分布在各个国家, 我国也是猪丹毒流行较广泛的国家之一<sup>[1]</sup>。猪丹毒是一种自然疫源性疾病, 其传染源主要包括病猪和带菌猪的分泌物、排泄物及死猪污染的饲料、饮水、土壤等<sup>[2]</sup>; 这不仅对世界各地畜禽养殖业的经济造成了巨大损失, 而且还严重危害了人类的健康<sup>[3]</sup>。目前, 已有多种灭活疫苗和弱毒疫苗用于预防猪丹毒的流行, 虽然这些疫苗的应用对预防和控制猪丹毒的暴发确实起到一定的积极作用, 但由于猪丹毒丝菌有较多的血清型, 使得疫苗的免疫保护效果存在严重的局限性, 因此研制安全高效的疫苗是目前对控制猪丹毒流行较为有效的手段<sup>[4]</sup>。

随着生物信息学的快速发展, 利用生物信息学

软件对所获得的生物信息数据进行分析已是常用的方法<sup>[4]</sup>。迄今为止, 已有很多研究者通过生物信息学的方法对所获得的数据进行分析预测<sup>[5]</sup>, 本研究通过生物信息学相关软件对猪丹毒丝菌强毒、弱毒菌株的表面蛋白抗原 A(surfactant proteins antigen A, *SpaA*) 基因序列进行同源性分析及结构域对比, 从而对 *SpaA* 基因指导的蛋白质一、二、三级结构及 B 细胞表位进行预测, 对比猪丹毒丝菌弱毒菌株和野生强毒菌株之间的差异, 试图对弱毒菌株减毒原因进行分析, 以期 *SpaA* 蛋白作为猪丹毒丝菌亚单位疫苗的候选抗原提供理论依据, 同时也为猪丹毒杆菌 *SpaA* 蛋白功能研究提供线索<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

从广东地区分离得到的猪丹毒丝菌野外分离株 SG7, 经动物试验鉴定为强毒株。猪丹毒丝菌弱毒株 GC42, 从广西丽原生物股份有限公司的猪瘟、猪丹毒、猪肺疫三联活疫苗中分离得到。

### 1.2 *SpaA* 基因聚合酶链式反应(PCR)扩增与测序

按照 *SpaA*(EF688017) 的基因序列及载体多克隆位点, 运用 Primer Premier 5.0 软件来设计特异性引物的序列, 在引物序列的 5' 端上插入 2 个酶切位点, 分别为 *Bam*H I 酶切位点与 *Eco*R I 酶切位点。

收稿日期: 2019-11-17

基金项目: 广东省自然科学基金(编号: 2017A030307041); 广东省科技创新战略专项资金——“攀登计划”专项资金(编号: pdjh2020l0537)。

作者简介: 袁晓晴(1999—), 女, 广东罗定人, 主要从事分子生物学方面的研究。E-mail: 1042432568@qq.com。

通信作者: 彭 凌, 硕士, 副教授, 主要从事动物病原微生物及分子生物学方面的研究。E-mail: penglingfx@sgu.edu.cn。

上游引物 *SpaA*-1:5'-CGCGGATCCATGAAAAAGA  
AAAAACACC-3'。下游引物 *SpaA*-2:5'-CCGGAA  
TCCCTATTTTAAACTTCCATCGT-3'。

PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性  
30 s,54 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环后,  
72 ℃ 延伸 7 min。将 PCR 产物连接载体后再送至生  
工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.3 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 基因的理化 性质分析

通过 ExPASy 服务器来分析猪丹毒丝菌 *SpaA*  
基因的性质;通过 Prot Param 来分析蛋白质的氨基  
酸序列组成、相对分子质量、等电点等物理化学性  
质;通过 SignalP 4.0 来预测蛋白质的信号肽。

### 1.4 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 蛋白二级 结构预测

通过 ExPASy 服务器上的 SOPMA 方案进行预  
测猪丹毒杆菌 *SpaA* 蛋白的二级结构。

### 1.5 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 基因结构域 和功能预测

使用 NCBI 中的 CDD (Conserve Domain  
Database) 数据库对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的  
*SpaA* 基因序列进行保守结构域分析。

### 1.6 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 蛋白三级 结构预测

利用 SWISS-MODEL 构建猪丹毒丝菌 SG7 和  
GC42 的 *SpaA* 蛋白的三级结构。

### 1.7 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 蛋白 B 细胞表位的预测

通过 DNASTar 软件对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42  
的 *SpaA* 蛋白质的亲水性、柔韧性、抗原性和表面可  
及性等各方面的参数进行预测。

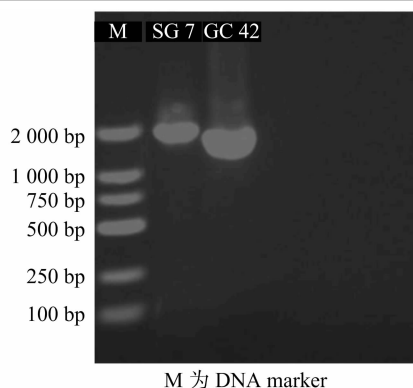
## 2 结果与分析

### 2.1 猪丹毒丝菌 *SpaA* 基因 PCR 扩增结果

扩增结果由图 1 可知,SG7 菌株的 *SpaA* 基因全  
长为 1 881 bp,GC42 菌株的 *SpaA* 基因全长为  
1 641 bp,缺失 240 bp。

### 2.2 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 基因序列翻 译结果

*SpaA* 基因序列翻译结果由图 2 可知,由于  
GC42 菌株相比 SG7 菌株而言缺少一段氨基酸序  
列,缺少的这段氨基酸序列在猪丹毒丝菌 SG7 氨基  
酸序列的 463 ~ 543 区段。利用 ExPASy 和 SOPMA



M 为 DNA marker  
图1 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 *SpaA* 基因扩增结果

在线软件对这一段氨基酸序列进行分析,结果显  
示,缺失的这段氨基酸序列含有 80 个氨基酸,相对  
分子量为 9 259.59,理论等电点(PI)为 9.70,亲水  
性的平均值(GRAVY)为 -0.714,即缺失的这一段  
氨基酸形成的蛋白质为亲水性的碱性蛋白质。同  
时,猪丹毒丝菌 SG7 的氨基酸序列与猪丹毒丝菌  
GC42 的 *SpaA* 基因氨基酸序列还存在单个氨基酸差  
异,其中,在 203 的氨基酸位点中,猪丹毒丝菌 SG7  
的氨基酸为甲硫氨酸,而猪丹毒丝菌 GC42 的氨基  
酸为异亮氨酸,这一变化可能导致猪丹毒丝菌 GC42  
的 *SpaA* 蛋白质的三级结构较松散,在 461 位点中猪  
丹毒丝菌 SG7 的赖氨酸在猪丹毒丝菌 GC42 中被替  
换成天冬酰胺,这一替换可能会影响猪丹毒丝菌  
GC42 的 *SpaA* 蛋白质的等电点。

### 2.3 理化性质分析

利用 ExPASy (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 在线软件对猪丹毒丝菌 SG7 和  
GC42 的 *SpaA* 蛋白质理化性质进行预测分析可知,  
猪丹毒丝菌 SG7 的 *SpaA* 蛋白质共有 626 个氨基  
酸,蛋白质相对分子量为 72 289.85,猪丹毒丝菌  
GC42 的 *SpaA* 蛋白质共有 546 个氨基酸,蛋白质相  
对分子量为 63 037.24,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的  
*SpaA* 蛋白的氨基酸数量差异见表 1,其中赖氨酸、  
酪氨酸和色氨酸均有明显差异;根据理论的等电点  
值分析可知,猪丹毒丝菌 SG7 的 *SpaA* 蛋白质理论  
等电点为 8.82,猪丹毒丝菌 GC42 的 *SpaA* 蛋白质理  
论等电点为 7.61,其中,猪丹毒丝菌 SG7 的 *SpaA* 蛋  
白质为碱性蛋白质,猪丹毒丝菌 GC42 的 *SpaA* 蛋白  
质则为中性蛋白质。

### 2.4 蛋白质亲疏水性分析

利用 ExPASy 在线软件对猪丹毒丝菌 SG7 和  
GC42 的 *SpaA* 蛋白质亲水系数进行预测,结果显示,

SG7	MKKKKHLFPKVSLSCLLLTAMPLQTAFAADSTDISVIPLIGBQWGLLPVLPCTGVHAQY	60
GC42	MKKKKHLFPKVSLSCLLLTAMPLQTAFAADSTDISVIPLIGBQWGLLPVLPCTGVHAQY	60
*****		
SG7	NKMIDAYIEKLVSLLNQKVPFLINEPKG YQSF EAVNEE INSI VSELKNBMSLQNIHHM	120
GC42	NKMIDAYIEKLVSLLNQKVPFLINEPKG YQSF EAVNEE INSI VSELKNBMSLQNIHHM	120
*****		
SG7	FKQSIQNLAIRIGYRSFMQDAMYLENFERLTIPELDEAYVDLLVNYEVKHRILVKYEGKV	180
GC42	FKQSIQNLAIRIGYRSFMQDAMYLENFERLTIPELDEAYVDLLVNYEVKHRILVKYEGKV	180
*****		
SG7	KGRAPLEAFIVPLRDRIRSMNEMAAEVNYLPEAHEDFLVSDSSEYNDKLNWINFALGLGV	240
GC42	KGRAPLEAFIVPLRDRIRSMNEIAAEVNYLPEAHEDFLVSDSSEYNDKLNWINFALGLGV	240
*****		
SG7	SELIDYNLENMMEKEITHPLYLELYAMRRNRQIQVVRDVYPNLERANAVVESLKTIKDIK	300
GC42	SELIDYNLENMMEKEITHPLYLELYAMRRNRQIQVVRDVYPNLERANAVVESLKTIKDIK	300
*****		
SG7	QRGKKLQELLEIYIQSGDVVKPDWLQRFIGKYQSVVDEEKNKLQDYLESDIFDSTYSVDG	360
GC42	QRGKKLQELLEIYIQSGDVVKPDWLQRFIGKYQSVVDEEKNKLQDYLESDIFDSTYSVDG	360
*****		
SG7	EKIRNKEITLINRDATLSMTYRAQSISEIKTIRADLESVKSFQNEESDSKVEPESPVKV	420
GC42	EKIRNKEITLINRDATLSMTYRAQSISEIKTIRADLESVKSFQNEESDSKVEPESPVKV	420
*****		
SG7	REPVDHEPKDKQKLVDQSKPESNSKEGWIKDNKWFYIEKSGMATGWKKVADKWYILD	480
GC42	EKPVDHEPKDKQKLVDQSKPESNSKEGWIKDNKWFYLENSG	463
*****		
SG7	NTGALVTGWKRVANKWYYLEKSGAMATGWKKVSNKWYILENSGAMATGWKKVSNKWYILE	540
GC42	NTGALVTGWKRVANKWYYLEKSGAMATGWKKVSNKWYILENSGAMATGWKKVSNKWYILE	463
*****		
SG7	NSGAMATGWKKVANKWYILENSGAMATGWKKVSNKWYILENSGAMATGWKKVANKWYILD	600
GC42	NSGAMATGWKKVANKWYILENSGAMATGWKKVSNKWYILENSGAMATGWKKVANKWYILD	520
*****		
SG7	KSGMMVTGSKSLDGKRYAFKNDGSLK	626
GC42	KSGMMVTGSKSLDGKRYAFKNDGSLK	546
*****		

“\*”表示氨基酸相同，“:”及空格表示氨基酸不同

图2 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白氨基酸序列对比

猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白质亲水性的平均值为 -0.568, 猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质亲水性的平均值为 -0.552; 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的

SpaA 蛋白质均表现为亲水性, 其中猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质亲水性较弱。

表 1 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白氨基酸数量差异

氨基酸种类	氨基酸数量(个)	
	SG7 菌株	GC42 菌株
精氨酸(R)	23	22
天冬酰胺(N)	39	34
天冬氨酸(D)	32	30
半胱氨酸(C)	1	1
谷氨酰胺(Q)	21	21
谷氨酸(E)	53	49
甘氨酸(G)	35	26
组氨酸(H)	7	7
异亮氨酸(I)	36	35
亮氨酸(L)	55	51
赖氨酸(K)	70	58
蛋氨酸(M)	22	18
苯丙氨酸(F)	15	15
脯氨酸(P)	19	19
丝氨酸(S)	46	41
苏氨酸(T)	19	14
色氨酸(W)	16	8
酪氨酸(Y)	36	29
缬氨酸(V)	43	38

## 2.5 蛋白质信号肽预测

信号肽是一种位于分泌蛋白的 N 端并引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的肽链,对于外泌蛋白的分泌起主导作用<sup>[5]</sup>,采用 ExPASy 中的 SignalP 4.0 分析猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的氨基酸序列信号肽的存在位置及序列,结果(图 3)显示,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质氨基酸序列上信号肽的剪切位点均位于第 28~32 个氨基酸(图 3-a 为猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白质的氨基酸序列信号肽,图 3-b 为猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质的氨基酸序列信号肽)。

## 2.6 二级结构预测

利用 SOPMA 在线软件对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的二级结构进行预测,分析结果由表 2 可知,各组成所占百分比表现为  $\alpha$  螺旋 > 无规则卷曲 > 延伸链 >  $\beta$  转角;其中  $\alpha$  螺旋是猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白氨基酸序列减少最多的结构,其次是延伸链。

## 2.7 结构域和功能预测

使用 NCBI 中 CDD 数据库对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的进行保守结构域分析,结

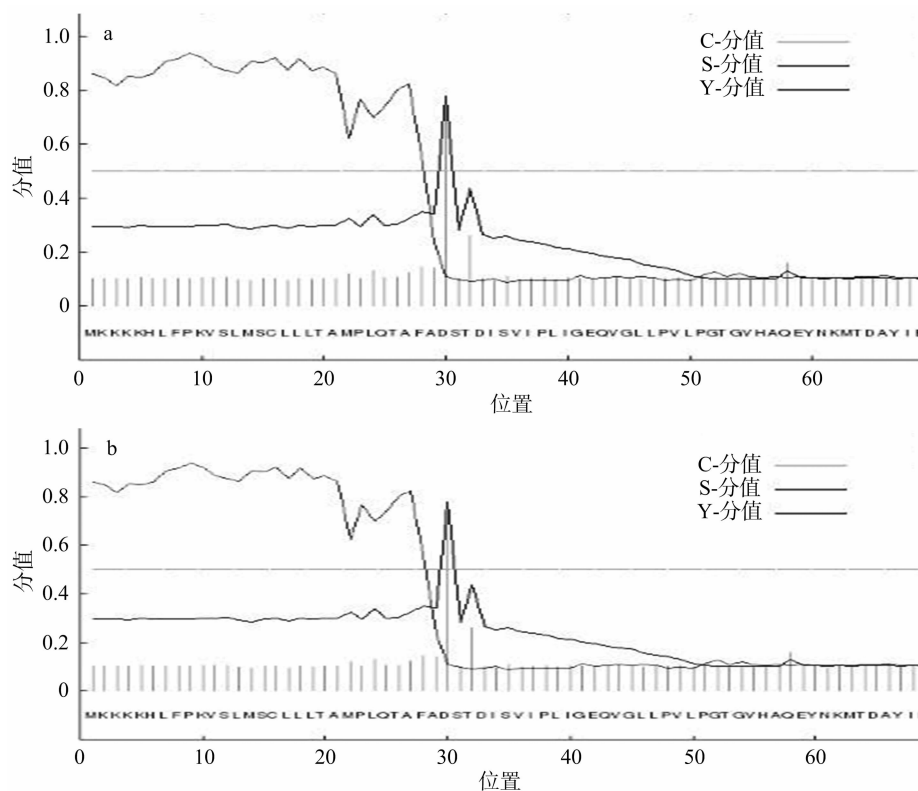


图 3 猪丹毒丝菌 SG7(a)、GC42(b) 的 SpaA 蛋白质的氨基酸序列信号肽

果显示,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质在羧基端(446~625)均存在一个重复结构域为葡聚

糖结合域,预测为该保守的重复结构域属于 N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶家族蛋白,同时,根

表 2 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质二级结构数量

菌株	数量(个)			
	α 螺旋	延伸链	无规则卷曲	β 转角
SG7	320	93	132	81
GC42	290	70	125	61

据吾鲁木汗·那孜尔别克等通过被动免疫试验证实了猪丹毒丝菌的 SpaA 蛋白中主要免疫保护效应的核心区段为氨基端(88 ~ 431)<sup>[6]</sup>,但猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白缺少的氨基酸序列位于猪丹毒丝菌 SG7 的氨基酸序列区段的羧基端(463 ~ 543),因此这一缺失对蛋白氨基端所引起的免疫保护并无太大影响。

2.8 三级结构预测

利用 SWISS - MODEL 构建了 2 种蛋白质的模型,由图 4 可知,猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白模型主要由 β - 折叠分布在表面,由无规则卷曲连接形成,且整体结构均较为紧密,而猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白模型主要由 3 条 α - 螺旋通过无规则卷曲连接形成,排列相对松散。

2.9 B 细胞表位的预测

通过 DNASTar 软件对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的亲水性、柔韧性、抗原性和表面可及性等各方面参数进行预测,由图 5、图 6 可知,虽然 B 细胞抗原表位的数量及抗原表位出现的肽段可能有所不同(表 3),但猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白的氨基酸序列均在 193 ~ 206、217 ~ 231、290 ~ 309、313 ~ 327、328 ~ 376、386 ~ 457 间的这些区段在各方案所预测的参数值均高于其他区段,因此这几个区段具有较高形成 B 细胞表位的可能性。

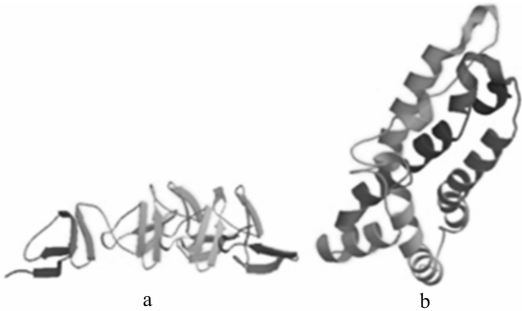


图4 猪丹毒丝菌 SG7(a) 和 GC42(b) 的 SpaA 蛋白模型

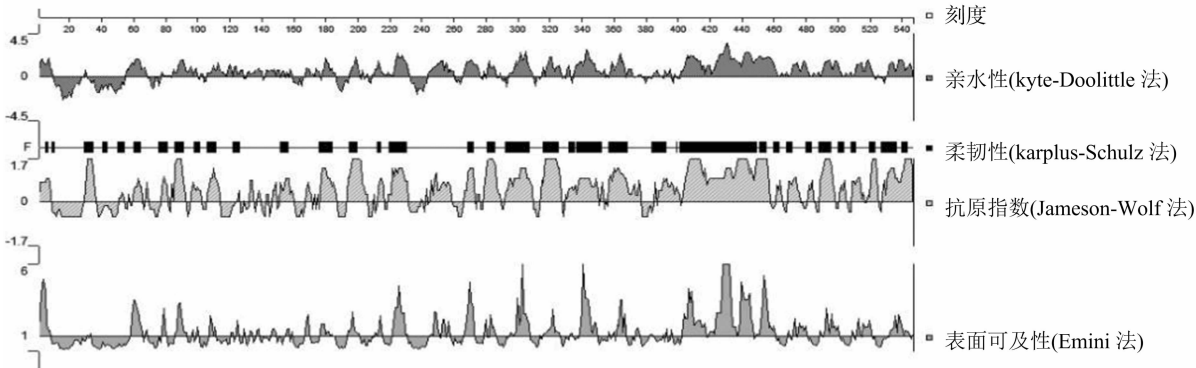


图5 猪丹毒丝菌 SG7 B 细胞表位的预测

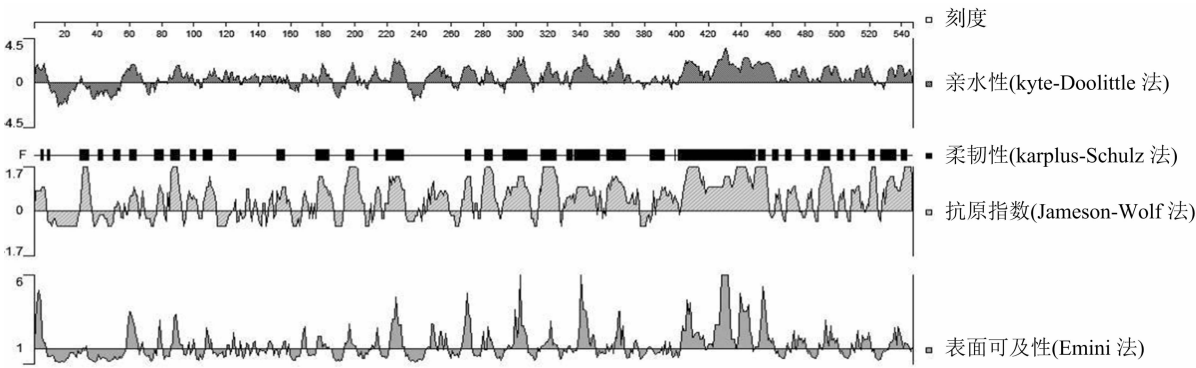


图6 猪丹毒丝菌 GC42 B 细胞表位的预测

3 讨论

免疫原性是指能引起免疫应答的性能,一般包

括多糖和蛋白质。一种物质的免疫原性强弱受多方面的影响,包括该物质自身的性质、异种性、宿主遗传性等。具有免疫原性的物质分子量越大,免疫

表 3 猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 基因抗原表位氨基酸区段

菌株	抗原表位氨基酸区段
猪丹毒丝菌 SG7 菌株	192 ~ 206、217 ~ 231、290 ~ 309、313 ~ 327、328 ~ 377、386 ~ 457、527 ~ 546
猪丹毒丝菌 GC42 菌株	193 ~ 206、217 ~ 231、290 ~ 309、313 ~ 327、328 ~ 376、386 ~ 457、527 ~ 546

原性就越强,而在所有含有大量芳香族氨基酸尤其含有酪氨酸且具有免疫原性蛋白质分子中,其免疫原性更强。本研究中,由于猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白缺少一段含有 80 个氨基酸的序列,从而使猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质在相对分子质量和氨基酸数量组成上与猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白质相比有所差异,这使 2 株菌株引发机体产生的免疫原性的强弱不同;根据这 2 株菌株的结构域分析,猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白虽缺少一段氨基酸序列,但猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白缺少的氨基酸序列位于猪丹毒丝菌 SG7 的氨基酸序列区段的羧基端(463 ~ 543),而猪丹毒丝菌的 SpaA 蛋白中起主要免疫保护效应的核心区段为氨基端(88 ~ 431)<sup>[6]</sup>,因此这一缺失对蛋白氨基端引起的免疫保护并无太大影响。这些分析结果表明,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质具有相同的保守结构域,即 2 株菌株均具有引起机体免疫应答的免疫原性;根据理化性质分析,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白氨基酸在序列数量上有所差异,其中差异较明显的氨基酸为赖氨酸、酪氨酸和色氨酸;猪丹毒丝菌 SG72 的 SpaA 蛋白质中赖氨酸、酪氨酸和色氨酸的数量明显高于猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质相对分子量的大小表现为 SG7 > GC42,这些分析结果均表明,猪丹毒丝菌 SG72 的 SpaA 蛋白质可能比猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质具有更强的免疫原性。

我们通常把病原菌的致病性强弱程度称为细菌的毒力,主要包括病原菌的侵袭力和病原菌产生的毒素,产生的毒素主要包括内毒素和外毒素,化学本质为多糖和蛋白质;蛋白质抗原与其在机体所诱导产生的抗体特异性结合的能力称为抗原性,一般来说,细菌毒力的强弱与抗原性的强弱呈正相关<sup>[7]</sup>,蛋白质抗原在机体中抗原性的强弱受抗原分子大小、化学组成成分、抗原决定簇结构、抗原与被免疫动物亲缘关系远近等各方面的影响,抗原分子的立体结构不仅是决定抗原分子与淋巴细胞抗原受体结合、引起免疫应答功能的关键,而且决定着抗原与相应抗体结合,同时还是出现各种免疫反应

的物质基础,蛋白质的立体结构又由氨基酸序列所决定,猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质由于缺失一段氨基酸序列,从而使猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质二级和三级结构相对猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白质有明显差异;猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白氨基酸序列相比猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白氨基酸序列来说, $\alpha$ 螺旋的数量减少最多且 $\alpha$ 螺旋含量减少, $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲等结构含量均呈现增加趋势,这可能使猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质构象变得更为松散和伸展,从而对蛋白质的抗原性有影响。猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质模型分析结果表明,猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质相比猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白的立体结构更为松散些,这一空间结构的差异可能导致了抗原表位的掩盖<sup>[8]</sup>。其中,蛋白质中的 $\alpha$ -螺旋含量与抗原性的强弱呈明显正相关<sup>[8]</sup>;因此可以推测,猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质中 $\alpha$ -螺旋含量的减少及猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质的立体结构可能是导致抗原表位结构松散,从而导致猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白质在机体的抗原性比丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 基因蛋白质在机体的抗原性弱,从而使猪丹毒丝菌 GC42 菌株在机体中呈现出毒力相对猪丹毒丝菌 SG7 菌株较弱的现象,表现出猪丹毒丝菌 GC42 的弱毒菌株特性。

蛋白质的抗原性并不是取决于整个蛋白质分子,而是取决于其与抗体分子结合的特异性化学基团,即抗原表位,因此通过对猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的亲水性、柔韧性、抗原性和表面可及性等各方面参数进行预测,可寻找具有形成 B 细胞表位的较高可能性的氨基酸区段。根据分析预测,猪丹毒丝菌 SG7 和 GC42 的 SpaA 蛋白质的氨基酸序列均在 193 ~ 206、217 ~ 231、290 ~ 309、313 ~ 327、328 ~ 376、386 ~ 457 之间,这几个区段在各方案所预测的参数值均高于其他区段,极可能形成 B 细胞表位。这些分析可以表明,猪丹毒丝菌 GC42 的 SpaA 蛋白虽然因缺少一段氨基酸,相对猪丹毒丝菌 SG7 的 SpaA 蛋白而言,预测抗原表位稍有差异,但绝大多数的抗原表位预测均是相同的,

胡利娟,贾元,田忠静,等. 基于 ISSR 标记的 29 种石斛遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):76-80.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.013

# 基于 ISSR 标记的 29 种石斛遗传多样性分析

胡利娟,贾元,田忠静,冯群,刘杰,朱斌

(贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550025)

**摘要:**遗传多样性分析可为野生植物的开发与保护提供科学依据。采集贵州地区的 29 份石斛资源,通过简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeats,简称 ISSR)标记对其进行遗传多样性和亲缘关系分析,从 16 条引物中筛选出 13 条多态性稳定的 ISSR 引物进行扩增。结果表明,13 条引物共扩增出 214 个条带,其中多态性条带数为 212 个,多态性比例为 99.07%,平均每个引物扩增的条带数为 16.46 条。随后利用非加权平均距离法(UPGMA)对其进行聚类分析,结果显示,29 份石斛材料的遗传相似系数为 0.678~0.804。在遗传相似系数为 0.715 处,可以把 29 种石斛植物划分为 10 个类群,从而证明所取石斛材料的遗传多样性十分丰富。

**关键词:**石斛;ISSR 分子标记;遗传多样性;亲缘关系

**中图分类号:** S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0076-05

石斛属(*Dendrobium*)是兰科(Orchidaceae)的大属之一,属附生兰类多年生草本植物。全球约有 1 500 多种石斛属植物,主要分布于亚洲、欧洲、大洋洲等地<sup>[1]</sup>,中国现共有 76 种石斛属植物,主要产区分布于四川、云南、广西和贵州等省份的原始森林以及安徽、浙江等省份<sup>[2]</sup>。大多数石斛具有药用

和观赏价值,目前发现的药用石斛有 39 种,具有润肺生津、活血化瘀、治疗心血管疾病等功效<sup>[3]</sup>。由于石斛种类繁多,历代本草著作称之为医工难辨的种类<sup>[4]</sup>。随着人们对药用及观赏石斛需求量的不断扩大和森林砍伐等多方面的影响,野生石斛属植物资源面临枯竭,已经成为濒危植物<sup>[5]</sup>。近年来,由于人们对药用石斛需求量的加大,石斛种植面积不断增加,选育优良石斛品种供生产使用尤为重要。

为了更好地利用药用石斛种质资源,更准确地了解石斛种质资源的类型及亲缘关系,对石斛资源进行遗传多样性及亲缘关系分析显得尤为重要<sup>[6]</sup>。目前应用于石斛属植物种质资源鉴定和亲缘关系研究的分子生物学方法主要有随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA,简称

收稿日期:2019-08-17

基金项目:贵州省科学计划项目联合基金[编号:QKHLHZ(2017)7368];贵州师范大学大学生创新创业训练计划[编号:2018520165];贵州省科技计划[编号:(2019)3001]。

作者简介:胡利娟(1997—),女,贵州盘县人,主要研究方向为油菜种质资源。E-mail:hulj0911@163.com。

通信作者:朱斌,博士,副教授,主要从事油菜种质资源创新及远缘杂交研究。E-mail:zhugg130@126.com。

即 2 个菌株抗原表位可能并未改变,这为猪丹毒丝菌基因工程亚单位疫苗打下了坚实的基础<sup>[9]</sup>。

## 参考文献:

- [1]卢琴,李明波,彭先文,等.猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因的生物信息学分析[J].动物医学进展,2015,36(9):23-27.
- [2]曹文尧,李江伟,吕芳等.丹毒丝菌 *SpaA* 基因免疫保护区的克隆与功能研究[J].中国预防兽医学报,2007,29(7):496-500.
- [3]吾鲁木汗·那孜尔别克,张磊,何翠等.猪丹毒丝菌天然 *SpaA* 和重组 *SpaA-N* 免疫保护效果的评价[J].微生物学报,2010,50(3):367-372.
- [4]林琳,江斌,吴胜会,等.猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因的克隆与生物信息学分析[J].中国兽医学报,2013,33(8):1232-1236.

- [5]冷非凡,罗文,李渊利,等.嗜铁钩端螺旋菌中铁硫簇相关蛋白的生物信息学分析[J].基因组学与应用生物学,2018,37(12):5296-5303.
- [6]吾鲁木汗·那孜尔别克,刘祝祥,李科,等.猪丹毒丝菌 C43311 株 *SpaA* 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达[J].微生物学报,2008,48(2):207-212.
- [7]张焕容.副猪嗜血杆菌抗原性研究进展[J].动物医学进展,2010,31(7):91-94.
- [8]朱业培,王玮,吕青裴,等.超高压协同温度处理对过敏原 Bosd6 抗原性及二级结构的影响[J].南京农业大学学报,2016,39(4):668-672.
- [9]李伟杰,赵耘,康凯,等.红斑丹毒丝菌 *SpaA* 抗原基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测[J].中国兽医学报,2011,31(11):1631-1634,1639.