

宋吉健,王怡滂,杨金钱,等. 支气管败血波氏杆菌 PRN 基因 CDS 区的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(10):52-57.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.10.008

支气管败血波氏杆菌 PRN 基因 CDS 区的生物信息学分析

宋吉健,王怡滂,杨金钱,李梦云,刘志军,赵战勤

(河南科技大学动物科技学院兽医生物制品工程实验室,河南洛阳 471003)

摘要:通过生物信息学软件预测分析支气管败血波氏杆菌 PRN 基因编码蛋白功能及其调节机制。结果表明,支气管败血波氏杆菌 PRN 基因 CDS 区编码 911 个氨基酸,分子式为 $C_{4121}H_{6556}N_{1250}O_{1258}S_{11}$,分子质量为 13 196,消光系数为 95 800,其理论等电点为 9.64,不稳定系数为 36.24,PRN 蛋白的理化性质稳定;PRN 蛋白有多个磷酸化位点和糖基化位点;信号肽预测 PRN 蛋白有 1 个信号肽,信号肽位置在 1~34;PRN 蛋白为亲水性蛋白,存在 1 个跨膜结构;预测二级结构主要由无规则卷曲构成,占 39.08%, β -折叠占 23.93%, α -螺旋占 23.30%,三级结构主要由无规则卷曲和 β -折叠构成。上述结果提示,该蛋白具有重要生物学意义,可为进一步开发支气管败血波氏杆菌亚单位疫苗奠定基础。

关键词:支气管败血波氏杆菌;PRN;CDS 区;生物信息学

中图分类号:S855.1⁺² **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)10-0052-06

支气管败血波氏杆菌是一种引起呼吸道感染的革兰氏阴性细菌,它是多种哺乳动物的天然病原体^[1]。波氏杆菌为波氏杆菌属,波氏杆菌属目前包括 16 个已命名的菌种:百日咳波氏杆菌(*Bordetella pertussis*)、副百日咳波氏杆菌(*B. parapertussis*)、支气管败血波氏杆菌(*B. bronchiseptica*)、禽波氏杆菌(*B. avium*)和其余菌种,后几种由于发现较晚,所以研究相对较少^[2]。目前,研究较多的主要为前 3 种,与人类和其他哺乳动物的呼吸道感染有关,因而称为“经典波氏杆菌”^[3-4]。近年来,大量研究发现波氏杆菌在世界范围内的猪、兔、犬及猫中广泛存在,协同感染非常严重,给畜牧业造成巨大的经济损失^[5]。目前,研究者们通过多种方法运用基因技术,研发新型的亚单位疫苗,但大多还未大批量投入生产。

支气管败血波氏杆菌 pertactin (PRN) 是一种外膜蛋白,从细菌表面突起的长线型蛋白非常适合促进细胞间的黏附,由 92 ku PRN 前体蛋白分解产生,表观分子量在支气管败血杆菌中为 68 ku,在百日咳杆菌中为 69 ku,在副百日咳杆菌中为 70 ku^[6]。大

量研究表明,缺失 PRN 的 Bb 菌株不能引起猪的发病,且猪群保护率与 PRN 为线性关系,表明 PRN 作为支气管败血波氏杆菌的主要保护性抗原^[7]。因此,本研究通过生物信息学分析深入研究该基因,以期为进一步研发波氏杆菌新型疫苗的研发提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

NCBI 数据库公布的支气管败血波氏杆菌 PRN 基因 (GenBank No:AJ245927) 序列共含 911 个氨基酸,序列如下:MNMSLSRIVKAAPLRRRTLAMALGALGAAPAAYADWNNQSIIKAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATGTTIKVSGRQAQGVLLNPAAELRFQNGSVTSSGQLFDEGVERRFLGTVTVKAGKLVADHATLANVSDTRDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQAGGVRVERGANVTVQRSTIVDGGHLIGTLQPLQPEDLPPSRVVLGDTSVTAVPASGAPAAVSVFGANELTVDGGHITGGRAAGVAAMDGAIVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFPLLDGWYGVVDVSDSTVDLAQSIV EAPQLGAAIRAGRGARVTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRFPASPPLSITLQAGARAQGRALLYRVLPEPVKLTLAGGAQGGDIVATELPPIPGASSGPLDVALASQARWTGATRAVDSLSIDNATVWMTDNSNVGLRLSDGSVDFQQPEGRFKVLMVDTLGSGLFRMNVDLGLSDKLVVMRDSGQHRLWVRNSGSEPSNTMLL

收稿日期:2021-07-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31302106,31672530)。

作者简介:宋吉健(1995—),男,河南中牟人,硕士研究生,主要从事兽医微生物及免疫学研究,E-mail:2697412384@qq.com。

通信作者:赵战勤,博士,教授,研究方向为家畜传染病及其疫苗。E-mail:zhaozhanqin@126.com。

VQTPRGS TFTLNKDGKVDIGTYRYRL NGNGQWSL
VGKPPPKPPQPGPQPGPQPPQPPQPPQPPQPPQPEP
PQPPGRELS N VNTGGVGLSTLWYESNLSKRLGEL
RLNPDGGWGRGFQRQQLDNRGRFRDQKVGFEGLD
HVVGGRWHLGGLGYTRGDRGFTGDGGHTDSVH
VGGYTYI NSGFYLDTLRSRLNDFKVGSDGYVVK
KYRTHGVGSLEGRRFHDGWFLEPQELVFRVGGGS
YR NGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIELGGRQV
QPYIKSVLQEFDGCTVRTNGI HRTELRTRELGLG
MLGRGHSLSYEYSKGPKLMPWTFHGYSYRYSW。

1.2 方法

利用 ExPASy - ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测分析 PRN 蛋白的亲水性、等电点、半衰期、稳定性等理化性质,利用 Net Phos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 使用 YinOYang 1.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) 和 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) PRN 蛋白综合分析磷酸化和 N、O 这 2 种糖基化;利用 PSORTb version 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/results.pl>) 和 LocTree3 (<https://roslab.org/owiki/index.php/LocTree3>) 分析 PRN 的亚细胞定位和预测。对 PRN 蛋白的保守结构域分析使用 NCBI 的 CDD 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>);用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和使用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对 PRN 氨基酸序列进行跨膜区和信号肽预测分析;利用 NPS@ 中 SOPMA (https://npsaprabhi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSAHLN/npsahlp_secpredsopma.html) 分析软件对 PRN 蛋白的二级结构进行分析;PRN 蛋白三级结构的预测在 SWISS - MODEL 程序进行 (<https://swissmodel.expasy.org/>)。

2 结果与分析

2.1 理化性质分析

利用 ExPASy - ProtParam 对 PRN 蛋白质的理化性质进行预测,结果表明,PRN 蛋白包含 911 个氨基酸,其中,Ala (14.3%)、Gly (14.3%) 和 Leu (8.8%) 出现频率较高,带负电荷的残基总数 (Asp + Glu) 有 75 个,频率为 8.2%;带正电荷的残基总数 (Arg + Lys) 有 89 个,频率为 9.8% (表 1)。

PRN 蛋白分子式为 $C_{4121}H_{6556}N_{1250}O_{1258}S_{11}$, 分子质量为 13 196, 消光系数为 95 800 L/(mol · cm), 其理论等电点 (pI) 为 9.64; 其不稳定系数为 36.24 (<40), 属于稳定类蛋白质; 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.201, 为亲水性蛋白。预测在哺乳动物网织红细胞 (体外) 中的半衰期为 30 h, 在酵母 (体内) 中的半衰期 >20 h, 在大肠杆菌 (体内) 中的半衰期 >10 h。

表 1 PRN 蛋白的氨基酸组成

氨基酸	数量 (个)	频率 (%)	氨基酸	数量 (个)	频率 (%)
Ala (A)	130	14.3	Lys (K)	22	2.4
Arg (R)	67	7.4	Met (M)	11	1.2
Asn (N)	27	3.0	Phe (F)	22	2.4
Asp (D)	45	4.9	Pro (P)	55	6.0
Cys (C)	0	0.0	Ser (S)	57	6.3
Gln (Q)	43	4.7	Thr (T)	49	5.4
Glu (E)	30	3.3	Trp (W)	12	1.3
Gly (G)	130	14.3	Tyr (Y)	20	2.2
His (H)	17	1.9	Val (V)	69	7.6
Ile (I)	25	2.7	Pyl (O)	0	0.0
Leu (L)	80	8.8	Sec (U)	0	0.0

2.3 疏水性分析

利用 ProtScale 中 Kyte & Doolittle 对 PRN 蛋白的疏水性进行预测 (window size = 9), 由图 1 可知, 该蛋白最大疏水性区域为 23、875 位氨基酸区域, 均为 1.989; 在 589、591 位氨基酸区域为最小疏水区, 均为 -2.767。平均疏水指数 (GRAVY) 为 -0.201, 即为亲水性蛋白。

2.3 跨膜结构和信号肽预测

利用 TMHMM 软件对 PRN 氨基酸序列进行跨膜区预测分析, 跨膜区位于 17 ~ 34 氨基酸之间, 由图 2 可知, 与使用 ProtScale 中 Kyte & Doolittle 分析的最大疏水区域第 23 位氨基酸的位置相一致。对序列跨膜区预测是十分必要的。通常, 膜蛋白不能在原核表达系统中表达, 如果对序列进行跨膜区预测发现序列中存在跨膜区, 则在后续需要选择真核表达系统进行表达; 如果想利用原核表达系统进行表达, 需要对跨膜区序列进行删除。利用 SignalP 4.1 软件分析发现有一个信号肽, 由图 3 可知, 信号肽类型为 SP (Sec/SPI); 信号肽位置为 1 ~ 34; 信号肽序列为 MNMSLSRIVKAAPLRRTTLAMALGALGAAPAAYA。通过预测跨膜区和信号肽, 可进行原核表达时去除其信号肽, 对 PRN 进行克隆表达, 为进

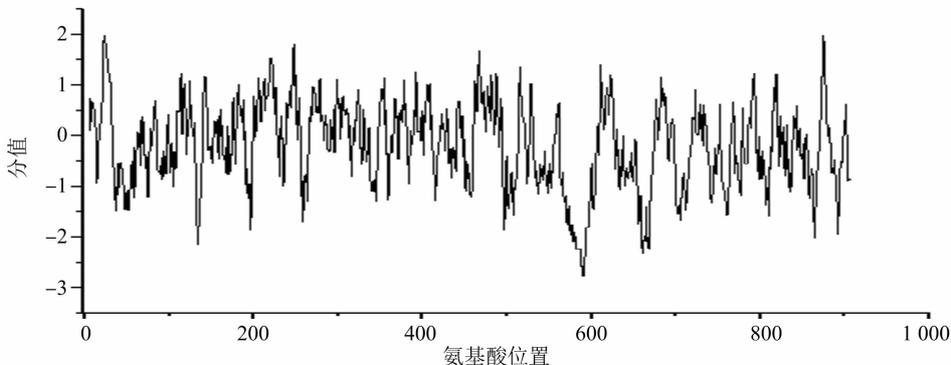


图1 PRN 蛋白疏水性分析

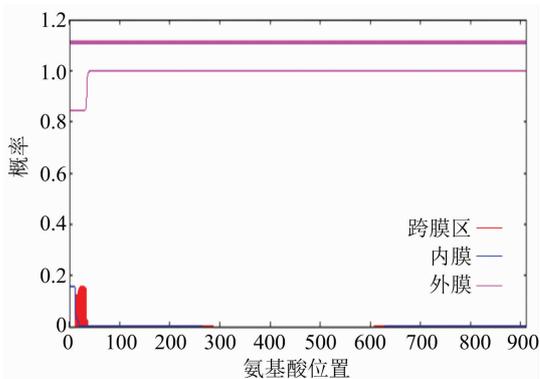


图2 PRN 蛋白的跨膜结构域预测结果

一步开发亚单位疫苗奠定基础。

2.4 PRN 蛋白磷酸化、糖基化位点

利用 Net Phos 3.1、YinOYang 1.2 Server 和 NetNGlyc 1.0 Server 蛋白综合分析磷酸化和糖基化位点,由图 4 可知,磷酸化位点较多;糖基化分析结果(图 5)表明,与 *N*-连接的糖基化有 6 个,在 2、38、92、129、170、428,与 *O*-连接的糖基化 18 个(图 6),在 68、72、151、172、207、209、214、221、291、320、322、415、418、506、617、631、902、910,其中,序列位置 214 和 631 严重糖基化。

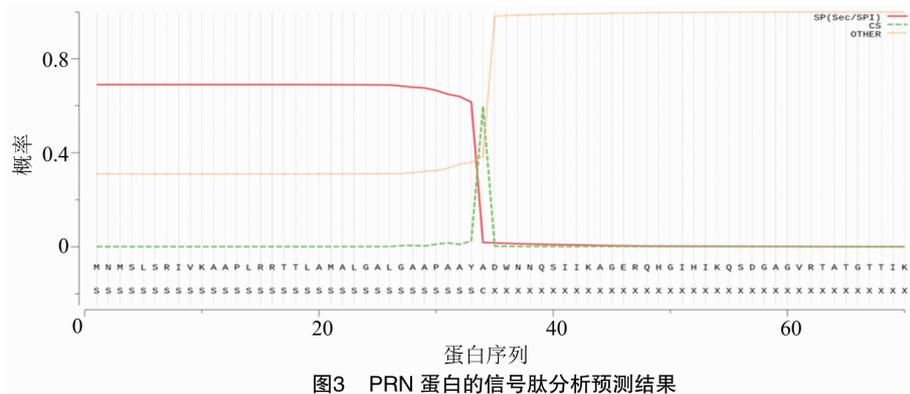


图3 PRN 蛋白的信号肽分析预测结果

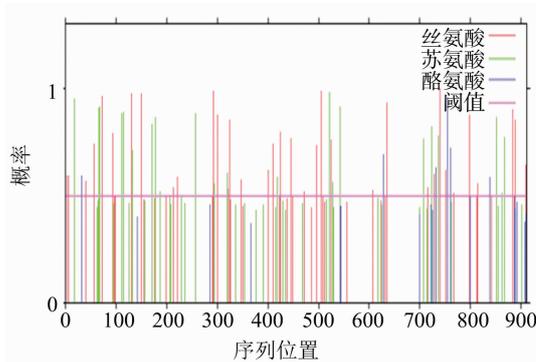


图4 PRN 蛋白的磷酸化分析预测结果

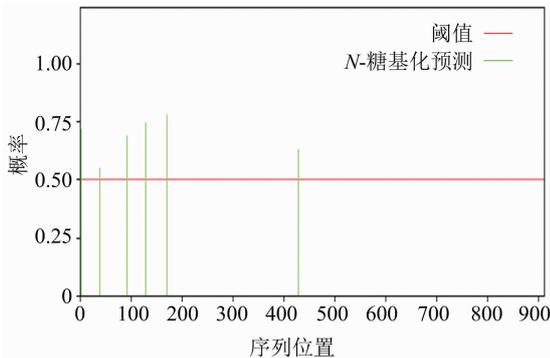


图5 PRN 蛋白的 N-糖基化分析预测结果

2.5 PRN 亚细胞定位分析

利用 PSORTb version 3.0.2 和 LocTree3 分析 PRN 的亚细胞定位。PRN 的亚细胞定位分数分别

为细胞质 0.00、细胞质膜 0.00、周质 0.00、外膜 10.00、细胞外 0.00。定位分数显示,PRN 定位在细菌的细胞外膜中,利用 LocTree 3 分析 PRN 的亚细

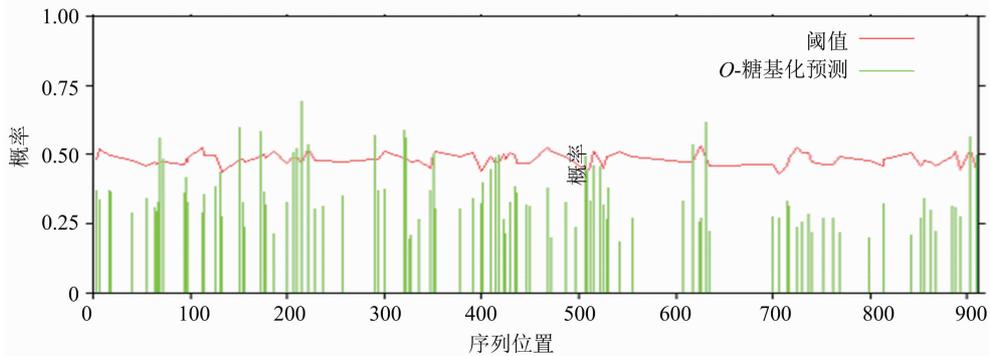


图6 PRN 蛋白 O-糖基化位点预测结果

胞定位。由图 7 可知, PRN 定位在细胞外膜中, 亚细胞定位分数为 0.95, 精确度为 98%。基于上述 2

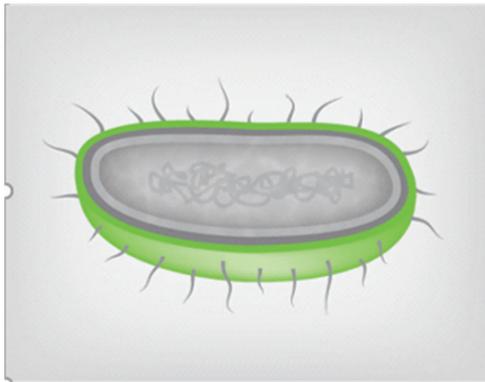
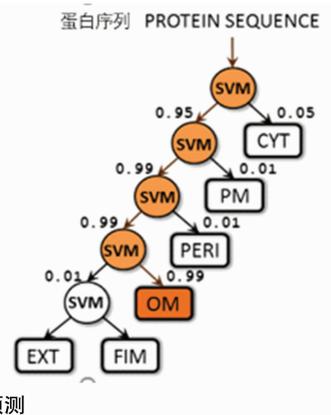


图7 亚细胞定位预测

种在线软件的亚细胞定位预测结果表明, PRN 定位在细胞外膜中。



2.6 蛋白结构

通过 NCBI 的 CDD 程序分析发现, PRN 蛋白存在 2 个保守域结构, 分别命名为 TIGR01414 和 cd01343, TIGR01414 是主要在病原体中发现并与毒力相关, 参与细胞黏附, 在氨基酸 458 ~ 911 间包含 1 个保守的 C 端结构域, 自动转运蛋白结构域的长度约为 400 个氨基酸, 包括富含芳香族氨基酸的 OMP 信号, 还是 cl36898 超家族唯一成员。cd01343 位于氨基酸 317 ~ 559 间, 是革兰氏阴性菌 V 型分泌系统的自转运蛋白。cd01343 是超家族 cl00185 的成员。PRN 蛋白由 16 股平行的 β 螺旋氨基酸结构组成, 呈“V”形横截面, 是迄今为止已知的最大的 β 螺旋蛋白之一。

使用 SOPMA 分析软件对 PRN 蛋白的二级结构进行分析, 由图 8 可知, PRN 蛋白二级结构中主要以 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲构成, 分别占 23.30%、13.61%、23.93% 和 39.08%。运用 SWISS-MODEL 软件完成 PRN 蛋白三级结构模型的构建(图 9)。观察到较多的无规则卷曲和 α -螺旋, 与二级预测结果相一致。但 GMQE 评价模型可

靠性得分为 0.42, 表明该模型可信度一般。

3 讨论

目前, 支气管败血波氏杆菌主要在猪、犬、兔等动物群体间感染非常严重, 长期以来危害被低估^[8]。尤其在猪群中与副猪嗜血杆菌、猪链球菌等协同感染严重, 死亡率很高, 给养殖业带来巨大的损失^[9]。虽然 Bb 主要是佐剂灭活苗已在世界范围内广泛应用, 但免疫效果普遍较差, 猪群对于支气管败血波氏杆菌的携带十分严重^[10]。此外, 大量抗生素的使用加剧了细菌耐药性的产生^[11]。相关研究表明, 使用猪支气管败血波氏杆菌某些表面毒力因子及相关分泌蛋白作为亚单位疫苗, 对于猪波氏杆菌病感染具有一定的免疫保护作用^[12]。研究人员发现, 除去 N 端信号肽的 PRN 基因, 在大肠杆菌中实现了各段基因的高效表达^[13]。结果表明, 蛋白片段氨基酸序列保守、表达量高、纯化方便, 可作为亚单位疫苗进行开发。本研究通过生物信息学软件对 PRN 分析, 它编码由 911 个氨基酸组成、理论等电点为 9.64 的亲水性蛋白, 根据结构与生物特性

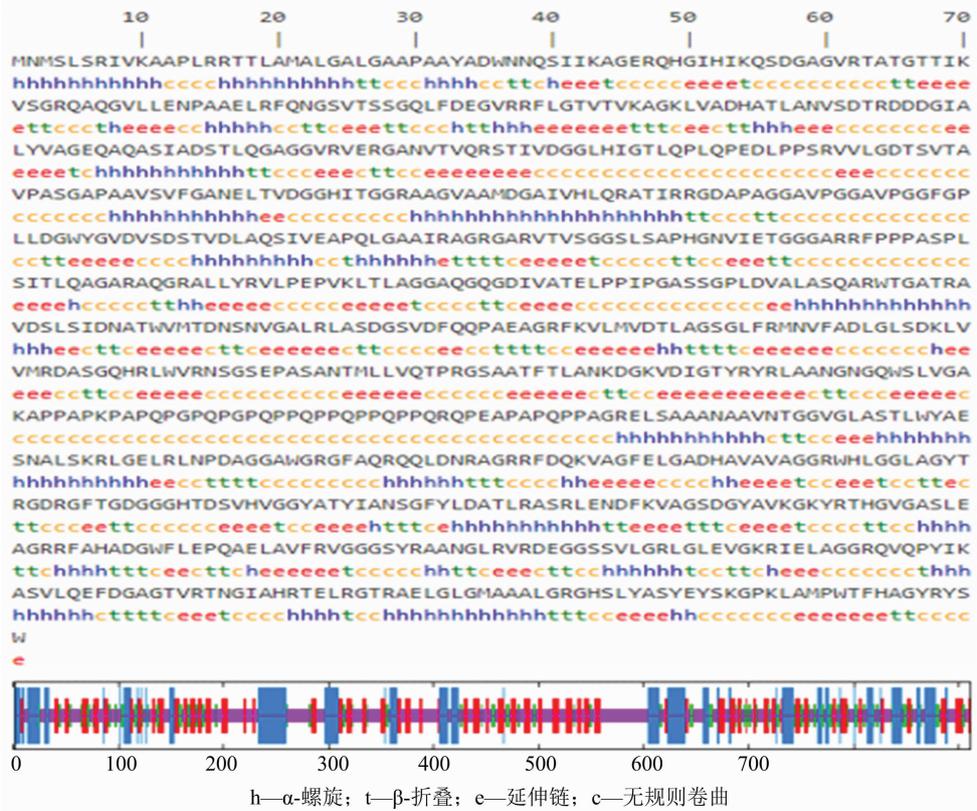


图8 PRN 蛋白二级结构预测

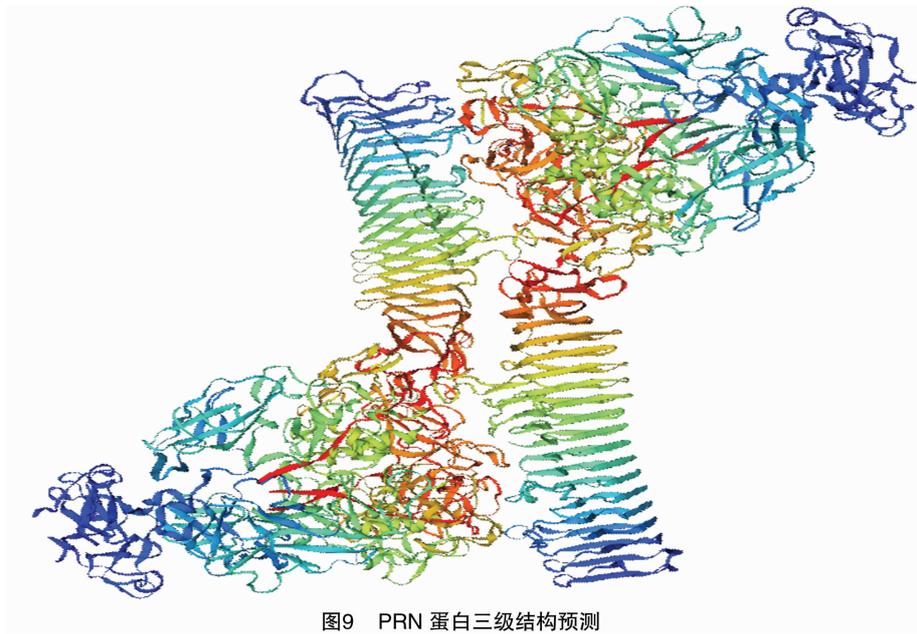


图9 PRN 蛋白三级结构预测

预测结果分析,PRN 包含 2 个 R I (GGXXP)_n 和 R II (PQP)_n 重复氨基酸序列,研究发现 R I 区可能与细菌的黏附功能有关,R II 为主要的保护性抗原表位^[14]。PRN 还具有逃避宿主细胞的免疫保护作用,对巨噬细胞可能有一定的毒性^[15]。

赵战勤等曾克隆表达出 PRN 及其不同区域的

氨基酸多肽,通过小鼠免疫保护试验证明了 PRN 的 N 端强于 C 端,且 R II 区域强于 R I 区域^[16],但其仅在小鼠模型进行了免疫保护试验,未在猪群进一步验证,无法确定是否对猪也具有较好的免疫保护性。此外,在设计引物进行 PCR 扩增时会出现扩增不出目的条带的现象,或者克隆出 PRN 基因片段在

测序时也会出现不同的问题,这可能是波氏杆菌基因 GC 含量过高,尤其 PRN 基因 GC 含量高达 71.6%。有研究发现在扩增 PRN 基因时加入少量的二甲基亚砜(DMSO)或 betaine^[17],使其氢键断裂有利于双链解开,因此对该基因还需要进一步研究。最近科学研究发现不表达 PRN 基因的阴性菌株越来越多,一些重要基因(包括毒力相关基因或调节基因)上的单核苷酸多态性(SNP)可能帮助机体在疫苗选择压力下存活^[15],这也是为什么最近几年百日咳波氏杆菌、副百日咳波氏杆菌和支气管败血波氏杆菌在全球广泛传播,从未消退,研发新型疫苗刻不容缓。其次,在进行同源性分析时,发现禽波氏杆菌(*B. avium*)基因中没有 PRN 基因,这也可以证明禽波氏杆菌与百日咳波氏杆菌、副百日咳波氏杆菌和支气管败血波氏杆菌不属于同一个群。而且发现支气管败血波氏杆菌在一个支上,PRN 基因同源性较高,可为研究新型疫苗的研发提供一个新思路。李洪广等发现兔支气管败血波氏杆菌缺失 PRN 基因可以使毒力下降,突变株产生了较好的免疫原性,进行减毒活疫苗的研发也是一种新思路^[18]。

本研究通过对编码的 PRN 蛋白进行了较全面的生物信息学分析,预测分析了该蛋白的氨基酸同源性、理化性质、生物学特性及功能,研究其信号肽和功能域,预测该蛋白二级结构和三级结构,可为进一步研究其功能、调节机制及相关支气管败血波氏杆菌疫苗提供借鉴。

参考文献:

- [1] 赵战勤. 支气管败血波氏杆菌的重组沙门氏菌基因工程疫苗研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [2] Weigand M R, Peng Y H, Batra D, et al. Conserved patterns of symmetric inversion in the genome evolution of *Bordetella* respiratory pathogens[J]. *mSystems*,2019,4(6):e00702-19.
- [3] Park J, Zhang Y, Buboltz A M, et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence - associated diversity amongst closely related pathogens [J]. *BMC Genomics*,2012,13:545.
- [4] Linz B, Ma L H, Rivera I, et al. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella*[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*,2019,32(3):223-230.
- [5] Ruch - Gallie R, Moroff S, Lappin M R. Adenovirus 2, *Bordetella bronchiseptica*, and parainfluenza molecular diagnostic assay results in puppies after vaccination with modified live vaccines[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*,2016,30(1):164-166.
- [6] Lipscombe M, Charles I G, Roberts M, et al. Intranasal immunization using the B subunit of the *Escherichia coli* heat - labile toxin fused to an epitope of the *Bordetella pertussis* P. 69 antigen [J]. *Molecular Microbiology*,1991,5(6):1385-1392.
- [7] Zhao Z Q, Xue Y, Tang X B, et al. Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Vaccine*,2009,27(18):2523-2528.
- [8] 裴洁,何华,赵战勤,等. 支气管败血波氏杆菌的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息,2006(2):4-6.
- [9] 赵战勤,裴洁,薛云,等. 猪源支气管败血波氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国农业科学,2008,41(12):4209-4217.
- [10] 赵战勤,徐引弟,吴斌,等. 猪霍乱沙门氏菌 Δ asdC500 株的生物学特性及作为活疫苗表达载体的应用[J]. 生物工程学报,2009,25(1):29-36.
- [11] Lin X J, Zou J, Yao K H, et al. Analysis of antibiotic sensitivity and resistance genes of *Bordetella pertussis* in Chinese children [J]. *Medicine*,2021,100(2):e24090.
- [12] Shin E K, Jung R, Hahn T W. Polymorphism of pertactin gene repeat regions in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*,2007,69(7):771-774.
- [13] 吴庭才,赵战勤,王臣,等. 支气管败血波氏杆菌 PRN 黏附素 R1 区蛋白的免疫原性[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(9):1370-1375.
- [14] Dominowski P J, Frantz J C, Krebs R L, et al. Formulations and process for production of bordetella bronchiseptica p68 antigen and vaccines:IB2006000946[P]. 2006.
- [15] Octavia S, Maharjan R P, Sintchenko V, et al. Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine - driven selection[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2010,28(1):707-715.
- [16] 赵战勤,王臣,薛云,等. 百日咳杆菌黏附素中针对支气管败血波氏杆菌的保护性抗原的筛选[J]. 微生物学报,2010,50(9):1239-1245.
- [17] 胡佳佳. 兔源支气管败血波氏杆菌 PRN 蛋白的表达及其免疫保护性研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [18] 李洪广,王芳,姜平,等. 兔支气管败血波氏杆菌 PRN 基因缺失突变株的构建及特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(2):299-305.