

鸭源鸡杆菌外膜蛋白 W 基因扩增及序列分析

王继洋,王坤芃,敬文宪,王 艳,彭志锋,杨 霞

(河南农业大学 禽病研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为了解不同鸭源鸡杆菌菌株外膜蛋白 W 基因(*ompW*)的差异性,对不同地域 32 株鸭源鸡杆菌 *ompW* 基因进行扩增、测序,并应用 DNASTar/MegAlign 和 MEGA. 5. 05 软件对其进行比对及遗传进化分析。结果表明:*ompW* 基因存在于所有检测的鸭源鸡杆菌中。全长在 630~711 bp,编码 209~236 个氨基酸。与参考株 UMN179 的 *ompW* 核苷酸同源性为 88. 7%~100%,氨基酸同源性为 86. 7%~99. 6%。不同来源的鸭源鸡杆菌的核苷酸同源率为 84. 1%~100%,氨基酸同源性为 78. 7%~99. 6%。进化树分析表明,鸭源鸡杆菌 *ompW* 序列差异与分离地理位置,毒力无明显的相关性。

关键词:鸭源鸡杆菌;*ompW*;扩增;序列分析

中图分类号:S852. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)05-0006-06 DOI:10. 11942/j. issn1002-2767. 2017. 05. 0006

鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*)属于巴氏杆菌科,鸡杆菌属^[1],是感染鸡生殖器官最重要的细菌之一。正常情况下,为鸡上呼吸道及下生殖道常在菌,但在一定的情况下,会引起鸡的输卵管炎,腹膜炎及卵巢炎等损伤^[2]。由于损伤的存在,导致鸡免疫力下降,极易受到其它病原体的感染,最终导致母鸡产蛋量明显下降及死亡^[2-4]。同时,由于多重耐药性的产生及其固有的抗原多样性的存在^[5-6],使用传统抗生素或疫苗并不能很好的预防鸭源鸡杆菌对鸡群产生的危害。目前,鸭源鸡杆菌致病机理的研究有限,仅有几种致病因子得到鉴定,如:RTX 毒素 GtxA^[7]、多糖荚膜^[8]、金属蛋白酶^[9]、菌毛蛋白 FlfA^[10]等。因此,进一步了解其致病机理及毒力因子,对新的预防及治疗措施的研究是必要的。

外膜蛋白 W(Outer membrane protein W, OmpW)属于细菌外膜蛋白家族成员之一,属于小外膜孔蛋白家族,由 8 股反向平行 β 折叠片形成的桶状疏水通道^[11]。相关研究表明,OmpW 与提高细菌应对各种环境压力的能力紧密相关,如渗透作用^[12]、氧化作用^[13]、温度变化及营养匮乏^[14]等。同时,也与细菌耐药性及毒力相关,如

OmpW 缺失的大肠杆菌对硫酸新霉素和氨苄青霉素的敏感性大大增强^[15],OmpW 的表达上调增加了霍乱弧菌的毒力^[16],参与大肠杆菌抗吞噬能力^[17]等。此外,OmpW 在革兰氏阴性菌中具有较高的保守性,在病菌感染和宿主免疫反应的激活方面起重要作用,是重要的保护性抗原^[18]。

目前,国内外还鲜见关于鸭源鸡杆菌 OmpW 的研究,本研究参照 NCBI 中鸭源鸡杆菌 UMN179 的 *ompW* 序列设计一对特异性引物,对 32 株不同地域鸭源鸡杆菌 *ompW* 基因进行扩增及序列分析,旨在研究 *ompW* 基因在鸭源鸡杆菌中的差异性,为进一步研究其生物学功能,鉴别诊断方法的建立及亚单位疫苗的研制提供依据。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 菌种 鸭源鸡杆菌参考菌株 F149^T由德国勃林格公司惠赠,其余 31 株鸭源鸡杆菌均由河南农业大学禽病研究所分离鉴定并保存。32 株鸭源鸡杆菌分离株信息见表 1。

1. 1. 2 主要试剂 蛋白胨、酵母浸膏均购自北京奥博星生物技术有限责任公司,2 \times Taq Master-mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司,DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司。

1. 2 方法

1. 2. 1 引物设计与合成 参考 GenBank 中鸭源鸡杆菌 UMN179 的 *ompW* 基因序列,用 Primer Premier5. 0 设计 1 对特异性引物:F:5'-GCGA

收稿日期:2017-03-14

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(162300410153);河南省高校科技创新团队与支持计划资助项目(141RTSHN015)

第一作者简介:王继洋(1990-),男,河南省商丘市人,在读硕士,从事动物传染病发病机理及防制研究。E-mail:247132049@qq. com。

通讯作者:杨霞(1973-),女,博士,副教授,从事动物传染病发病机理及防制研究。E-mail: yangxia66@163. com。

TGAACTAAAATATCGTCTG-3',R:5'-AGAA 物工程(上海)有限公司合成。
TGTTACGCTGCTCTATGC-3',引物由生工生

表 1 32 株鸭源鸡杆菌来源及分离部位
Table 1 Source and separate parts of 32 strains of *Gallibacterium anatis*

编号 No.	分离株名称 Name	来源 Source	分离部位 Separate parts	登录号 Accession number	编号 No.	分离株名称 Name	来源 Source	分离部位 Separate parts	登录号 Accession number
1	ZZ-HL-1-SLG	郑州华罗	输卵管	KM485624	17	TK-5-LC	周口太康	卵巢	KP686248
2	ZZ-HL-4-SEL-G	郑州华罗	上颚裂	KP686253	18	HN-TK-2-SLG	周口太康	输卵管	KP686265
3	ZZ-HL-3-QG-G	郑州华罗	气管	KP686252	19	ZK-XC-7-QG	周口项城	气管	KM485622
4	ZZ-HL-3-SEL-G	郑州华罗	上颚裂	KP686251	20	ZK-XC-12-LC	周口项城	卵巢	KP686256
5	HN-GX-2-FZ	郑州古荥	肺脏	KP686264	21	JZ-YQ-5-SLG	焦作粤禽	输卵管	KM485628
6	ZZ-GC-3-QG	郑州古城	气管	KP686259	22	HN-JZ-YQ-1-11-QG	焦作粤禽	气管	KP686266
7	ZZ-GC-2-QG	郑州古城	气管	KP686254	23	YZ-12-LC	禹州	卵巢	KP686250
8	ZZ-ZD-25-XZQ	郑州正德	泄殖腔	KP686263	24	YZ-14-QG	禹州	气管	KM485630
9	ZZ-ZD-26-XZQ	郑州正德	泄殖腔	KP686260	25	PDS-JX-3-QG	平顶山郏县	气管	KP686255
10	ZZ-XMZ-44-SEL	郑州畜牧站	上颚裂	KP686261	26	PDS-JX-4-QG	平顶山郏县	气管	KP686249
11	ZZ-XMZ-10-SEL	郑州畜牧站	上颚裂	KP686262	27	PDS-RZ-1-SLG	平顶山汝州	输卵管	KM485620
12	XX-HJ-4-SLG	新乡获嘉	输卵管	KM485619	28	LH-BJT-11-SLG	漯河半截塔	输卵管	KM485626
13	XX-HJ-6-QG	新乡获嘉	气管	KM485623	29	SX-YC-7-PZ	山西运城	脾脏	KP686257
14	XX-HJ-6-SLG	新乡获嘉	输卵管	KM485625	30	SX-YC-7-QG	山西运城	气管	KM485627
15	TK-1-LC	周口太康	卵巢	KP686247	31	SHAN-XY-4-SLG	陕西咸阳	输卵管	KM485629
16	TK-3-LC	周口太康	卵巢	KP686258	32	F149 ^T	丹麦	肠道	KM485621

1.2.2 细菌的培养 将 32 株鸭源鸡杆菌分别划线接种于绵羊血平板上,37℃培养 24 h,分别挑取单个菌落接种于 LB 肉汤培养基中 37℃,200 r·min⁻¹振荡培养过夜。

1.2.3 ompW 基因的扩增及测序 使用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,分别提取 32 株鸭源鸡杆菌基因组,作为 ompW 基因 PCR 扩增的模板。PCR 反应均采用 50 μL 体系:2×Taq Mastermix 25 μL,双蒸水 22 μL,上下游引物(20 mmol·L⁻¹)各 1 μL,DNA 模板 1 μL。反应条件为:95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 50 s,共 30 个循环,最后延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.4 ompW 核苷酸及编码氨基酸序列分析 使用 DNASTAR/MegAlign 及 NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),将 32 株鸭源鸡杆菌及 UMN179 的 ompW 核苷酸序列进行同源性分析。由于丹麦分离株 12656-12 的 ompW 只公布了氨基酸序列,因此对以上共 34 株

鸭源鸡杆菌的 ompW 氨基酸序列进行比对。使用 MEGA. 5. 05,以多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida* Pm27)的 ompW 为外群,对 32 株鸭源鸡杆菌及参考菌株进行遗传进化分析。

2 结果与分析

2.1 ompW 基因的扩增

用合成的 ompW 序列特异性引物对 32 株鸭源鸡杆菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,凝胶电泳出现 1 200 bp 左右的条带,与预期相符(见图 1)。

2.2 ompW 核苷酸序列同源性分析

通过 ompW 核苷酸序列分析,结果显示,ompW 核苷酸序列全长在 630~711 bp(630 bp,657 bp,663 bp,678 bp,705 bp,711 bp),编码 209~236 个氨基酸。与 UMN179 的 ompW 核苷酸序列对比,同源性为 88. 7%~100%。其中 YZ-14-QG、ZK-XC-7-QG、ZZ-GC-3-QG、ZZ-XMZ-44-SEL、HN-GX-2-FZ、JZ-YQ-5-SLG、PDS-JX-3-QG 与 UMN179 核苷酸同源率为 100%。不同地区的鸭源鸡杆菌 ompW 核苷酸同源率为 84. 1%~100%。使用 MEGA. 5. 05,以多

杀性巴氏杆菌为外群,对 32 株鸭源鸡杆菌及参考菌株进行进化树分析(见图 2),结果显示,进化树整体分为两支,多杀性巴氏杆菌做为外群单独在

一分支上,33 株鸭源鸡杆菌在另一分支上。鸭源鸡杆菌内部主要有三大支,分别与核苷酸长度 630、678 和 705 bp 相对应。

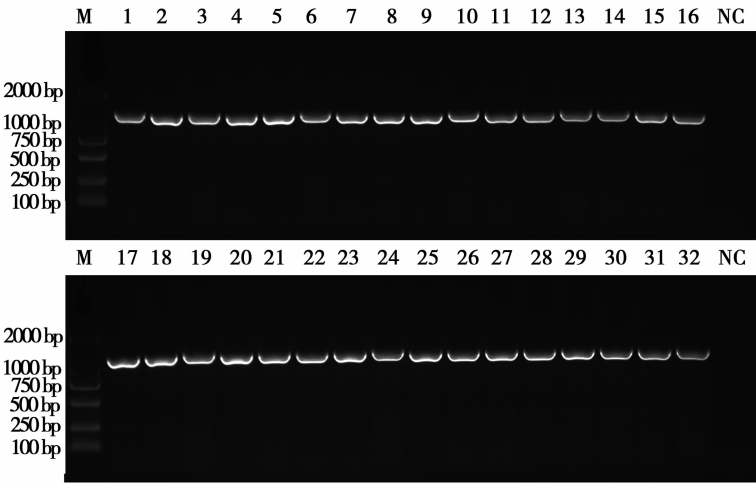


图 1 *ompW* 基因 PCR 扩增结果
Fig. 1 The PCR product of *ompW* gene

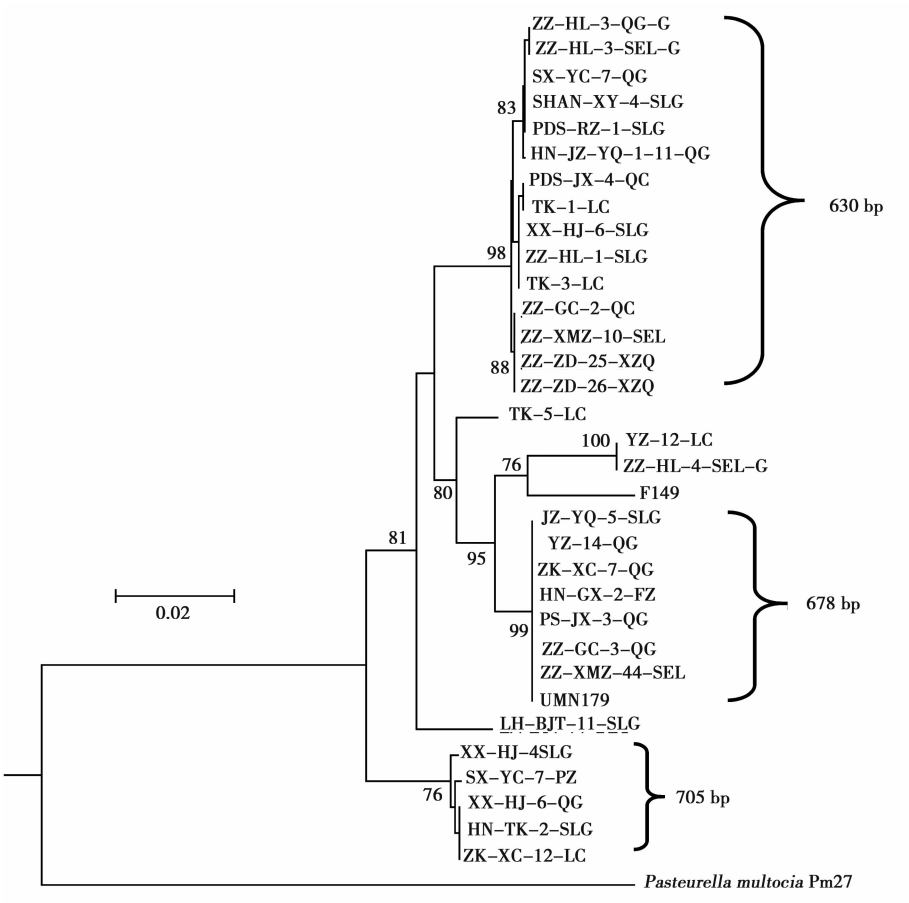


图 2 鸭源鸡杆菌 *ompW* 基因遗传进化树
Fig. 2 Phylogenetic tress of *Gallibacterium anatis ompW* gene

2.3 ompW 氨基酸同源性分析

分析比对 34 株鸭源鸡杆菌 ompW 核苷酸编码的氨基酸序列,结果显示,与参考菌株 UMN179 及 12656-12 的氨基酸同源性分别为 86.7%~99.6%,79.6%~98.3%。各菌株之间

的氨基酸同源性为 78.7%~99.6%。鸭源鸡杆菌 OmpW 氨基酸序列主要有 4 个高变区(见图 3)。与参考菌株 F149^T 及 12656-12 相比,鸭源鸡杆菌国内分离株拥有一段 13 个氨基酸(NTLS-VGNNOIKDV)组成的特有序列。

HN-TK-2-SLG	YNGG---AFDFD	KLG-----GST	DEQEKL-----NGLSN	DLAQ-----HKE
XX-HJ-4-SLG	YNGG---AFDFD	KLG-----GST	DEQEKL-----NGLSN	DLAQ-----HKE
XX-HJ-6-QG	YNGG---AFDFD	KLG-----GST	DEQEKL-----NGLSN	DLAQ-----HKE
ZK-XC-12-LC	YNGG---AFDFD	KLG-----GST	DEQEKL-----NGLSN	DLAQ-----HKE
SX-YC-7-FZ	YNGG---AFDFD	KLG-----GST	DEQEKL-----NGLSN	DLAQ-----HKE
ZZ-XMZ-10-SEL	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTDVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
HN-JZ-YQ-1-11-QG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTDVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
PDS-RZ-1-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTDVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
SHAN-XY-4-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTDVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
XX-HJ-4-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTDVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-GC-2-QG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-HL-3-QG-G	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-HL-3-SEL-G	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-ZD-25-XZQ	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-ZD-26-XZQ	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
PDS-JX-4-QG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
TK-1-LC	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
TK-3-LC	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
XX-HJ-6-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
ZZ-HL-1-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTLANTDFTGVLFPVSKIDAKN	DVYNQADGKKIASQE
12656-12	YKSDLPLSYDFD	KLNTLSVGNNDIKDVGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--NGNVVPQE
F149	YKSDLPLSYDFD	KLNTLSVGNNDIKDVGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--NGKMHSQE
LH-BJT-11-SLG	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DEKFNGLTA--GK-----GIKATN	DING-----SPQE
TK-5-LC	YAGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLGG-----QPQE
HN-GX-2-FZ	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
JZ-YQ-5-SLG	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
PDS-JX-3-QG	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
UMN179	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
YZ-14-QG	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
ZK-XC-7-QG	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
ZZ-GC-3-QG	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
ZZ-XMZ-44-SEL	YSGN-ALDYNFD	KQA-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
YZ-12-LC	YAGH-ALPYNFD	KQE-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
ZZ-HL-4-SEL-G	YAGH-ALPYNFD	KQE-----GLGT	DTHFNSTIDNAGL-----GVTAHN	DLKDA--SGKMHSQE
	* . : ** *	* . * : :	* * : :	* * : *

图 3 鸭源鸡杆菌 OmpW 氨基酸序列四个高变区

Fig. 3 Thefour hypervariable regions of *Gallibacterium anatis* OmpW amino acid sequence

3 结论与讨论

目前,由于鸭源鸡杆菌给养禽业带来的越来越大的损失,对其毒力因子及其疫苗的研究成为热点,Bojesen 等^[10,19]研究表明,RTX 毒素 GtxA 及 F17 样菌毛 FlfA 是鸭源鸡杆菌最主要的毒力因子。GtxA 拥有溶血及毒害白细胞活性,菌毛蛋白 FlfA 与鸭源鸡杆菌粘附与定殖有着密切的联系,同时这两种毒力因子均有良好免疫原性,能够为鸡群提供良好的免疫保护,是理想的疫苗候选靶蛋白,但是需要指出的是这两种蛋白并不是普遍存在的,这就限制了其应用范围。本研究结果显示,32 株参试鸭源鸡杆菌基因组中均含有 ompW 基因,OmpW 在鸭源鸡杆菌中普遍存在,在一定程度上表明 OmpW 在鸭源鸡杆菌中发挥着某些重要的作用,同时其在鸭源鸡杆菌中的广泛存在性,也为其成为广泛应用性疫苗的研制提

供了最基本的依据。

通过与同科不同属的参考菌株 *Pasteurella multocida* Pm27 的 ompW 核酸序列进行序列比对及进化树分析后可知,鸭源鸡杆菌与多杀性巴氏杆菌分别处在两个不同分支上,种内的 ompW 核苷酸序列同源性最低为 84.1%,而与多杀性巴氏杆菌的 ompW 核苷酸序列同源性最高为 70.6%,这说明 ompW 基因在巴氏杆菌科不同属之间存在明显差异,这也从侧面证明了鸡杆菌属为巴氏杆菌科中一个独立的属^[20]。Nandi 等^[21]利用 ompW 基因在霍乱弧菌中的保守性,及在所有菌株中都存在的特性,建立了以 ompW 基因为靶基因的快速菌种鉴定方法。而鸭源鸡杆菌与多杀性巴氏杆菌 ompW 核苷酸序列保守区存在明显差异,这可能将有助于鸭源鸡杆菌 PCR 菌种鉴定方法的建立。

从氨基酸序列比对的结果可以看出,鸭源鸡杆菌 OmpW 长度分别为 209 aa(5 株),218 aa(1 株),220 aa(1 株),225 aa(9 株),234 aa(15 株),236 aa(1 株),其中最长的标准株 F149^T 为 236 aa,同时可以发现除 225 aa 中的 YZ-12-LC,ZZ-HL-4-SEL-G 外,各长度内的序列同源性均在 99% 以上,可见氨基酸的长度与同源性有一定的关系,从氨基酸序列高变区分析结果可以看出,相同长度的 ompW 核苷酸几乎都在同一高变区内发生了统一的突变,这说明不同长度的 OmpW 变化位置是比较保守的。同时可以看出,所有鸭源鸡杆菌 OmpW 突变主要集中发生在 4 个高变区,而引起突变的原因主要是氨基酸的插入或缺失,同时需要指出的是突变并未改变鸭源鸡杆菌 OmpW 的开放阅读框,这也保证了其在功能方面稳定性。徐冬蕾等^[22-23] 研究发现,霍乱弧菌 PT6 中的 ompW 基因缺失 11 bp,造成其开放阅读框移位,OmpW 不能完整表达,导致其不能与噬菌体 VP5 结合,从而产生了对噬菌体 VP5 的抗性。

由鸭源鸡杆菌 OmpW 的核苷酸及氨基酸序列比对的结果可知,不同来源鸭源鸡杆菌 ompW 核苷酸同源率为 84.1%~100%,氨基酸同源性为 78.7%~99.6%,说明 OmpW 在鸭源鸡杆菌中是存在多样性的,这进一步证明了鸭源鸡杆菌存在基因多样性^[24]。对其多样性进一步分析可知,中国分离株 HN-GX-2-FZ、JZ-YQ-5-SLG、PDS-JX-3-QG、YZ-14-QG、ZK-XC-7-QG、ZZ-GC-3-QG、ZZ-XMZ-44-SEL 与美国分离株 UMN179 的 ompW 核苷酸序列同源性为 100%,丹麦分离株 F149^T 及 12656-12 与其它菌株之间也并不存在明显的差异,这说明鸭源鸡杆菌 OmpW 的同源性及其保守性与菌株分离地理位置并无明显关系。从进化树上可以看出,对小鼠毒力较强菌株 PDS-RZ-1-SLG、XX-HJ-6-SLG、YZ-14-QG、LH-BJT-11-SLG^[25] 与其它菌株之间并无明显的分支,说明 OmpW 与其毒力的强弱并无明显直接关系。同时需要指出的是,虽然氨基酸序列上没有明显的差异,但丹麦分离株 F149^T 及 12656-12 的 OmpW 比其它菌株均多出 13 个氨基酸(NTLS-VGNNQIKDV),这可能提示,鸭源鸡杆菌 OmpW 整体上是相对保守的,差别可能只是表现在某些特定的区域,而这些特定区域的变化可能与某些特定的环境有关,因为相关研究表明,鸭源鸡杆菌 OmpW 的四个高变区均处在膜外区,而膜

外区的改变与菌体所处的环境是密切相关的。但由于材料有限,还无法获得更多国外鸭源鸡杆菌参考菌株 OmpW 的信息,因此,确定差异存在与何种因素有关还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Christensen H, Bisgaard M, Bojesen A M, et al. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 275-287.
- [2] Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen A M, et al. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders[J]. Avian Pathology, 2009, 38(1): 1-7.
- [3] Rzewuska M, Karpinska E, Szeleszczuk P, et al. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections[J]. Med. Wet, 2007, 63: 1431-1433.
- [4] Paudel S, Alispahic M, Liebhart D, et al. Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization[J]. Avian Pathology, 2013, 42(6): 527-535.
- [5] Bojesen A M, Vazquez M E, Bager R J, et al. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*[J]. Veterinary microbiology, 2011, 148(1): 105-110.
- [6] 王珊, 陈陆, 付仁一, 等. 我国部分地区蛋鸡群鸭源鸡杆菌血清流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(2): 114-117.
- [7] Kristensen B M, Frees D, Bojesen A M. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organisation[J]. Veterinary research, 2010, 41(3): 25.
- [8] Bojesen A M, Nielsen O L, Christensen J P, et al. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens[J]. Avian Pathology, 2004, 33(2): 145-152.
- [9] Garcia-Gomez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, et al. *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG[J]. Avian Pathology, 2005, 34(5): 426-429.
- [10] Bager R J, Nesta B, Pors S E, et al. The fimbrial protein FliA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate [J]. Infection and immunity, 2013, 81(6): 1964-1973.
- [11] Hong H, Patel D R, Tamm L K, et al. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel[J]. Journal of biological chemistry, 2006, 281(11): 7568-7577.
- [12] Wu L, Lin X, Wang F, et al. OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*[J]. Journal of proteome research, 2006, 5(9): 2250-2257.

- [13] Gil F, Ipinza F, Fuentes J, et al. The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Research in microbiology, 2007, 158(6): 529-536.
- [14] Nandi B, Nandy R K, Sarkar A, et al. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W(OmpW) of *Vibrio cholerae* [J]. Microbiology, 2005, 151(9): 2975-2986.
- [15] 吴贤斌, 邹海杰, 田丽花, 等. 大肠杆菌外膜蛋白 *ompW* 基因敲除菌的构建及其对两种抗生素的敏感性[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 1021-1026.
- [16] Goel A K, Jiang S C. Genetic determinants of virulence, antibiogram and altered biotype among the *Vibrio cholerae* O1 isolates from different cholera outbreaks in India[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2010, 10(6): 814-818.
- [17] Wu X B, Tian L H, Zou H J, et al. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis[J]. Research in microbiology, 2013, 164(8): 848-855.
- [18] Maiti B, Shetty M, Shekar M, et al. Evaluation of two outer membrane proteins, Aha1 and OmpW of *Aeromonas hydrophila* as vaccine candidate for common carp[J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2012, 149(3): 298-301.
- [19] Pedersen I J, Pors S E, Bager Skjærning R J, et al. Immunogenic and protective efficacy of recombinant protein GtxA-N against *Gallibacterium anatis* challenge in chickens[J]. Avian Pathology, 2015, 44(5): 386-391.
- [20] Bisgaard M, Korczak B M, Busse H J, et al. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov.[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2009, 59(4): 735-744.
- [21] Nandi B, Nandy R K, Mukhopadhyay S, et al. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11): 4145-4151.
- [22] 徐冬蕾, 王洪霞, 刁保卫, 等. 1998 至 2001 年四川省霍乱流行中 6b 型菌株的分子特征[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(5): 409-412.
- [23] Xu D, Zhang J, Liu J, et al. Outer membrane protein OmpW Is the receptor for typing phage VP5 in the *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype[J]. Journal of Virology, 2014, 88(12): 7109-7111.
- [24] Bojesen A M, Thorpdahl M, Christensen H, et al. Genomic diversity of *Gallibacterium anatis* in chicken flocks representing different production systems [C]//International Pasteurellaceae Society Meeting, 2002, Alberta, 2003.
- [25] 张秀平, 陈陆, 赵军, 等. 鸭源鸡杆菌致病力与生物被膜形成能力及耐药性的相关性分析研究[J]. 中国兽医学报, 2014(10): 7.

Amplification and Sequence Analysis of Outer Membrane Protein W Gene of *Gallibacterium anatis*

WANG Ji-yang, WANG Kun-peng, JING Wen-xian, WANG Yan, PENG Zhi-feng, YANG Xia
(Institute of Poultry Diseases, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: To study the distribution of discrepancy of the outer membrane protein W gene (*ompW*) bacteria in *Gallibacterium anatis*, a pair of specific primers were designed for the *ompW* gene of UMN179, which was published by NCBI. Amplification and sequencing of *ompW* gene of 32 strains of *G. anatis* from different region were compared using DNASTar/MegAlign and MEGA. 5.05 software, as well as the sequence of *ompW* gene and the genetic evolution analysis. The results showed that the *ompW* gene was detected in *G. anatis*. Length between 630 ~ 711 bp, encoding 209 ~ 236 amino acids. The *ompW* nucleotide identity of the reference strain by 88.7% ~ 100% was UMN179, the homology of amino acid was 86.7% ~ 99.6%. The nucleotide homology of the different source of the *G. anatis* was 84.1% ~ 100%, and the amino acid homology was 78.7% ~ 99.6%. Phylogenetic tree analysis, there was no significant correlation between the *ompW* sequence and the geographical location of the isolate of the *G. anatis*. In order to further study its biological function, the establishment of differential diagnosis method and the development of subunit vaccine were provided.

Keywords: *Gallibacterium anatis*; *ompW* gene; amplification; sequence analysis