

## 研究报告

# 两株不同宿主源化脓隐秘杆菌分离鉴定及其 *plo* 基因生物信息学分析

王喜<sup>1</sup>, 赵津<sup>2</sup>, 李珂<sup>1</sup>, 赵国洪<sup>2</sup>, 常志顺<sup>1</sup>, 信爱国<sup>\*1</sup>

1 云南省畜牧兽医科学院养禽与禽病研究所, 云南 昆明 650224

2 玉溪农业职业技术学院, 云南 玉溪 653106

王喜, 赵津, 李珂, 赵国洪, 常志顺, 信爱国. 两株不同宿主源化脓隐秘杆菌分离鉴定及其 *plo* 基因生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2995-3008.

WANG Xi, ZHAO Jin, LI Ke, ZHAO Guohong, CHANG Zhishun, XIN Aiguo. Isolation and identification of two *Trueperella pyogenes* strains from different hosts and bioinformatics analysis of the *plo* gene[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2995-3008.

**摘要:** 【背景】化脓隐秘杆菌是一种能够感染人类及多种动物的条件致病菌, 常引起动物的各种非特异性化脓性感染。【目的】探究不同宿主疑似化脓隐秘杆菌感染的菌属种类和病原特性。

【方法】对林麝皮下脓肿和鸭跗关节脓肿进行细菌分离, 通过革兰氏染色、细菌 16S rRNA 基因分析等方法对病原菌进行鉴定, 通过生长曲线测定、药敏试验和毒力基因检测分析 2 株病原菌的生物学特性, 对溶血素 *plo* 基因进行序列分析和结构预测。【结果】分离鉴定到林麝源和鸭源化脓隐秘杆菌各 1 株, 分别命名为 FTP-1 和 DTP-1; 生长曲线测定发现, 2 株病原菌的生长繁殖速度差异较大; 药敏试验表明, 2 株病原菌对  $\beta$ -内酰胺类、磺胺类和利福霉素类抗生素耐药, 对氨基糖苷类、喹诺酮类抗生素敏感; 毒力基因检测显示, 2 株病原菌均携带 *plo*、*nanH*、*nanP*、*fimA* 和 *fimE* 基因, 鸭源分离株还携带有 *fimC* 基因; 生物信息学分析软件预测显示, 2 株病原菌溶血素 *plo* 基因核苷酸序列存在宿主特异性差异, 但二者氨基酸序列相同, 蛋白结构预测发现化脓隐秘杆菌溶血素(pyolysin, PLO)与胆固醇依赖性溶细胞素家族其他成员之间相似性较高。【结论】在云南宜良地区分离到林麝源和鸭源化脓隐秘杆菌各 1 株, 二者 *plo* 基因亲缘关系较近, 相关生物学特性分析可为推进该病原菌的研究和防控提供参考。

**关键词:** 化脓隐秘杆菌; 分离鉴定; *plo*; 生物信息学

资助项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-42-54); 云南省廖明专家工作站项目(202105AF150077); 云南省重大科技专项(202102AE090029); 玉溪市行业专家工作站项目

This work was supported by the Program of China Agriculture Research System (CARS-42-54), the LIAO Ming Expert Workstation Project of Yunnan Province (202105AF150077), the Key Science and Technology Program of Yunnan Province (202102AE090029), and the Industry Expert Workstation Project of Yuxi City.

\*Corresponding author. E-mail: aiguo\_xin@hotmail.com

Received: 2023-01-09; Accepted: 2023-03-06; Published online: 2023-03-25

# Isolation and identification of two *Trueperella pyogenes* strains from different hosts and bioinformatics analysis of the *plo* gene

WANG Xi<sup>1</sup>, ZHAO Jin<sup>2</sup>, LI Ke<sup>1</sup>, ZHAO Guohong<sup>2</sup>, CHANG Zhishun<sup>1</sup>, XIN Aiguo<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Poultry Husbandry and Disease Research Institute, Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming 650224, Yunnan, China

<sup>2</sup> Yuxi Agriculture Vocation-Technical College, Yuxi 653106, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] *Trueperella pyogenes* is an opportunistic pathogen causing infections in humans and diverse animal species, particularly non-specific purulent infections in animals. [Objective] To characterize the suspected *T. pyogenes* strains from different hosts. [Methods] Strains were isolated from the subcutaneous abscess of forest musk deer and duck tarsal joint abscess and identified based on Gram staining and bacterial 16S rRNA gene analysis. The biological properties of the two strains were characterized through the analysis of the growth curves, drug sensitivity test, and detection of virulence genes. Then we analyzed the sequence and predicted the structure of the pyolysin gene *plo*. [Results] The strains isolated from forest musk deer and duck were named FTP-1 and DTP-1, respectively. According to the growth curves, the growth rates of the two were quite different. Drug sensitivity test showed that the two strains were resistant to  $\beta$ -lactams, sulfonamides, and rifamycins and sensitive to aminoglycosides and quinolones. Both strains carried *plo*, *nanH*, *nanP*, *fimA*, and *fimE* genes, and DTP-1 also harbored *fimC* gene. There were host-specific differences in the nucleotide sequence of *plo* gene between the two strains, but the amino acid sequences of encoded proteins were the same. The pyolysin (PLO) of *T. pyogenes* was highly similar to other members of the cholesterol-dependent cytolysin family. [Conclusion] One strain of *T. pyogenes* was respectively isolated from forest musk deer and duck in Yiliang of Yunnan Province, and the *plo* gene of two strains had close genetic relationship. The biological characteristics can serve as a reference for further research on and prevention and control of the pathogen.

**Keywords:** *Trueperella pyogenes*; isolation and identification; *plo*; bioinformatics

化脓隐秘杆菌(*Trueperella pyogenes*)是多种家畜及部分野生动物的共生菌,也是一种引起动物乳房炎、脓肿和肺炎的条件性致病菌,常在动物机体处于不利条件(如受伤、原发性感染和极端天气等)以及免疫力低下时感染<sup>[1-2]</sup>。人类感染的报道较少见,但免疫功能受损以及接触感染动物时感染几率较大<sup>[3]</sup>。该病原菌无荚膜、无鞭毛、无芽孢,为一种革兰染色阳性的

兼性厌氧短棒状杆菌,原名化脓不规则杆菌、化脓放线菌,1997年将其划分至隐秘杆菌属中,称为化脓隐秘杆菌(*Arcanobacterium pyogenes*)<sup>[4]</sup>,后据其系统发育分型重新定名为 *Trueperella pyogenes*,中文名字未改动<sup>[5]</sup>。该菌营养条件要求高,在血琼脂培养基上生长良好,菌落周围可产生 $\beta$ -溶血环。

化脓隐秘杆菌的致病性主要由其毒力因子

导致, 目前发现的主要毒力基因为编码外毒素的溶血素 *plo* 基因以及促进其黏附宿主细胞的因子基因, 包括神经氨酸酶基因(*nanH* 和 *nanP*)、胶原结合蛋白(*cbpA*)和 4 个菌毛基因(*fimA*、*fimC*、*fimE* 和 *fimG*)<sup>[6]</sup>。化脓隐秘杆菌溶血素(pyolysin, PLO)作为胆固醇依赖性溶细胞素(cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)家族成员之一, 也是目前唯一已知的化脓隐秘杆菌外毒素, 其对多种宿主细胞具有毒性作用, 如红细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、上皮细胞、成纤维细胞和子宫内膜间质细胞等<sup>[1,7]</sup>。研究表明, PLO 与动物脓肿的发生有关, 为该菌的一种主要毒力因子, 存在于所有已知不同来源的菌株中<sup>[8]</sup>。

本研究对云南宜良地区某林麝特种养殖场发病林麝皮下脓肿液和某种鸭场发病鸭跖关节脓肿液进行细菌分离鉴定, 各分离到 1 株林麝源和鸭源化脓隐秘杆菌, 并分析二者耐药情况、毒力基因携带情况以及溶血素 *plo* 基因遗传进化情况, 以期为本地区对该病原菌科学防控提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料来源

2021 年 7 月和 2022 年 9 月, 云南省宜良县分别有某林麝特种养殖场的林麝出现皮下脓肿和某种鸭场的成年鸭出现跖关节脓肿等病症, 注射器无菌抽取脓肿液低温运送至本实验室进行细菌分离培养。

### 1.2 主要试剂、仪器和培养基

PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 购于宝日医生物技术(北京)有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; LB 固体培养基、LB 液体培养基和细菌微量生化鉴定管购于广东环凯微生物科技有限

公司; 抗生素药敏纸片购于杭州滨和微生物试剂有限公司; 胎牛血清购于 Gibco 公司; 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。振荡培养箱购于上海知楚仪器有限公司; PCR 扩增仪购于 Applied Biosystems 公司; 凝胶成像仪购于上海天能科技有限公司。

### 1.3 病原菌分离培养

无菌采集林麝皮下脓肿液与鸭跖关节脓肿液, 划线接种于血琼脂平板、LB 固体培养基以及含 10%胎牛血清的 LB 固体培养基, 37 °C 倒置培养 48 h, 观察菌株生长情况。挑取优势菌落纯化后, 革兰染色镜检, 观察分离菌株的形态。将已纯化菌株分别接种于各细菌微量生化鉴定管, 操作步骤及结果判定按产品说明书进行。

### 1.4 病原菌 16S rRNA 基因鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取化脓隐秘杆菌基因组 DNA 后, 以细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGRGTITYGATYMTGG CTCAG-3')和 1492R (5'-CGGYTACCTTGTTAC GACTT-3')进行 PCR 扩增鉴定。PCR 反应体系: PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA polymerase 12.5 μL, 引物 27F 和 1492R (10 μmol/L)各 0.5 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 反应结束后将阳性扩增产物送擎科生物科技有限公司进行双向测序, 测定的基因序列采用 DNASTar 6.0 软件拼接, 将菌株 16S rRNA 基因完整序列提交 NCBI 数据库中進行同源性比对, 并采用 MEGA 7.0 根据邻接法(neighbor-joining method)构建 2 株病原菌 16S rRNA 基因系统进化树。

### 1.5 病原菌生长曲线测定

将已纯化的 2 株病原菌分别接种至含 10%胎牛血清的 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min

培养 24 h 后 4 500 r/min 低速离心 5 min 收集菌体沉淀, 用无菌生理盐水调整二者具有相同的  $OD_{600}$  初始值, 取相同体积菌液于含 10% 胎牛血清的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 取 200  $\mu$ L 菌液测定  $OD_{600}$ , 每株菌各设 3 组平行对照, 培养结束后以  $OD_{600}$  值绘制 2 株病原菌的生长曲线。

### 1.6 病原菌药物敏感性检测

采用  $\kappa$ -B 纸片扩散法对病原菌进行药敏特性检测。将收集的菌株沉淀分别用无菌生理盐水调整至 0.5 个麦氏比浊度, 各取 100  $\mu$ L 均匀涂布含 10% 胎牛血清的 LB 固体培养基, 待培养基表面菌液干燥后按一定顺序和距离贴药敏试纸片, 37 °C 培养后测量抑菌圈直径大小, 并按抗生素类药敏纸片产品说明书进行药物敏感性判定。

### 1.7 病原菌毒力基因检测

采用 DNASTar 6.0 软件比对化脓隐秘杆菌参考菌株基因组, 在溶血素 *plo* 基因前后较保守区域设计可扩增 *plo* 基因全长以及参考文献

[9] 合成 7 个化脓隐秘杆菌毒力基因 *nanH*、*nanP*、*cbpA*、*fimA*、*fimC*、*fimE* 和 *fimG* 的引物 (表 1)。其中, *plo* 基因的 PCR 反应体系参照 1.4; PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 57 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。其余基因按文献[9]方法进行, 获得 2 株病原菌毒力基因携带情况。

### 1.8 病原菌 *plo* 基因变异性分析

将 1.7 中扩增的含 *plo* 基因全长的阳性扩增产物送擎科生物科技有限公司进行双向测序, 与化脓隐秘杆菌参考菌株 *plo* 基因比对拼接后获取 2 株病原菌 *plo* 基因核苷酸序列全长。参考 GenBank 中不同宿主来源的化脓隐秘杆菌 *plo* 基因核苷酸全长序列, 采用 SnapGene 6.0 进行比对, 分析不同宿主来源 *plo* 基因变异情况, 并构建 2 株病原菌 *plo* 基因系统进化树。

### 1.9 病原菌溶血素 PLO 生物信息学分析

利用生物信息学分析软件分析溶血素 PLO 蛋白: 使用 SnapGene 6.0 将溶血素 *plo* 基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列; 在线软件 ProtParam

表 1 毒力基因引物信息

Table 1 Virulence genes primer information

Gene	Sequence of primer (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)
<i>plo</i>	F: TGAGTTGTTTCAGTAGTCACG R: GATCACGACGAATCTAATCC	57	2 559
<i>nanH</i>	F: CGCTAGTGCTGTAGCGTTGTTAAGT R: CCGAGGAGTTTGTACTGACTTTGT	60	781
<i>nanP</i>	F: TTGAGCGTACGCAGCTCTTC R: CCACGAAATCGGCCTTATTG	60	150
<i>cbpA</i>	F: GCAGGGTTGGTGAAAGAGTTTACT R: GCTTGATATAACCTTCAGAATTTGCA	60	124
<i>fimA</i>	F: CACTACGCTCACCATTCAACAAG R: GCTGTAATCCGCTTTGTCTGTG	57	605
<i>fimC</i>	F: TGTCGAAGGTGACGTTCTTCG R: CAAGGTCACCGAGACTGCTGG	60	843
<i>fimE</i>	F: GCCCAGGACCGAGAGCGAGGGC R: GCCTTCACAAATAACAGCAACC	55	775
<i>fimG</i>	F: ACGCTTCAGAAGGTCACCAGG R: ATCTTGATCTGCCCCCATGCG	57	929

(<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析溶血素 PLO 蛋白的基本理化性质; 在线软件 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析溶血素 PLO 蛋白的亲/疏水性; 在线软件 Predicting Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) 预测溶血素 PLO 蛋白的抗原决定簇; 在线软件 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa%20\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)) 预测溶血素 PLO 蛋白二级结构; 在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测溶血素 PLO 蛋白三级结构; 在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 比对溶血素 PLO 与胆固醇依赖性溶细胞素家族其他成员之间一致性。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌分离培养结果

发病林麝皮下和鸭跖关节的脓肿腔内含黄色黏稠脓液, 抽取脓液培养 48 h 后, 在 10% 胎牛血清的 LB 固体培养基和血琼脂平板上均形成光滑湿润、白色半透明的小菌落, 血琼脂平板菌落周围形成界限明显的透明溶血环, 具有  $\beta$  溶血现象(图 1), 普通 LB 固体培养基上生长贫瘠, 形成针尖大小白色菌落。对 2 株化脓隐秘杆菌进行培养发现, 化脓隐秘杆菌初次在含血清的培养基中生长繁殖速度较慢, 但传代后其生长繁殖速度可加快。染色镜检均为无芽孢、不规则形状的革兰氏阳性短杆菌。生化反应结果显示 2 株病原菌半固体培养基均无扩散生长,  $\beta$ -半乳糖苷、葡萄糖试验均为阳性且均可产气, 尿素、氰化钾、赖氨酸脱羧酶、甘露醇、山梨醇、乳糖、麦芽糖、蔗糖、西蒙氏柠檬酸盐、硫化氢、MR、VP 试验均为阴性。

### 2.2 病原菌 16S rRNA 基因鉴定结果

两株病原菌 16S rRNA 基因序列经 BLAST



图 1 病原菌在血琼脂平板出现  $\beta$  溶血

Figure 1 The pathogenic bacteria appeared  $\beta$ -hemolysis on blood agar plate.

比对显示, 均与化脓隐秘杆菌参考菌株具有较高同源性, 以同属伯纳德隐秘杆菌和溶血隐秘杆菌为外源, 据邻接法构建系统发育树发现, 2 株病原菌与所有化脓隐秘杆菌参考株聚在同一分支上, 亲缘关系最近, 试验结果进一步证明各分离到一株林麝源和鸭源化脓隐秘杆菌, 分别命名为 FTP-1 和 DTP-1 (图 2)。

### 2.3 病原菌生长曲线测定结果

各取  $OD_{600}$  初始值为 0.34 的 100  $\mu$ L 菌液, 加入 15 mL 含 10% 胎牛血清的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 测定  $OD_{600}$ 。以  $OD_{600}$  平均值绘制 2 株病原菌的生长曲线, 结果如图 3 所示。2 株病原菌在 0–4 h 内生长繁殖速度较慢,  $OD_{600}$  值无明显变化; 4 h 后鸭源化脓隐秘杆菌生长繁殖速度较林麝源化脓隐秘杆菌快,  $OD_{600}$  值明显增大, 6 h 及其之后各检测时间点二者之间生长繁殖速度差异显著。

### 2.4 病原菌药物敏感性检测结果

对 2 株病原菌进行药敏特性检测, 结果显示, 鸭源化脓隐秘杆菌对青霉素 G、复方新诺明和利福平等 9 种抗生素耐药, 对头孢氨苄、四环素和红霉素等 7 种抗生素表现中介, 对卡

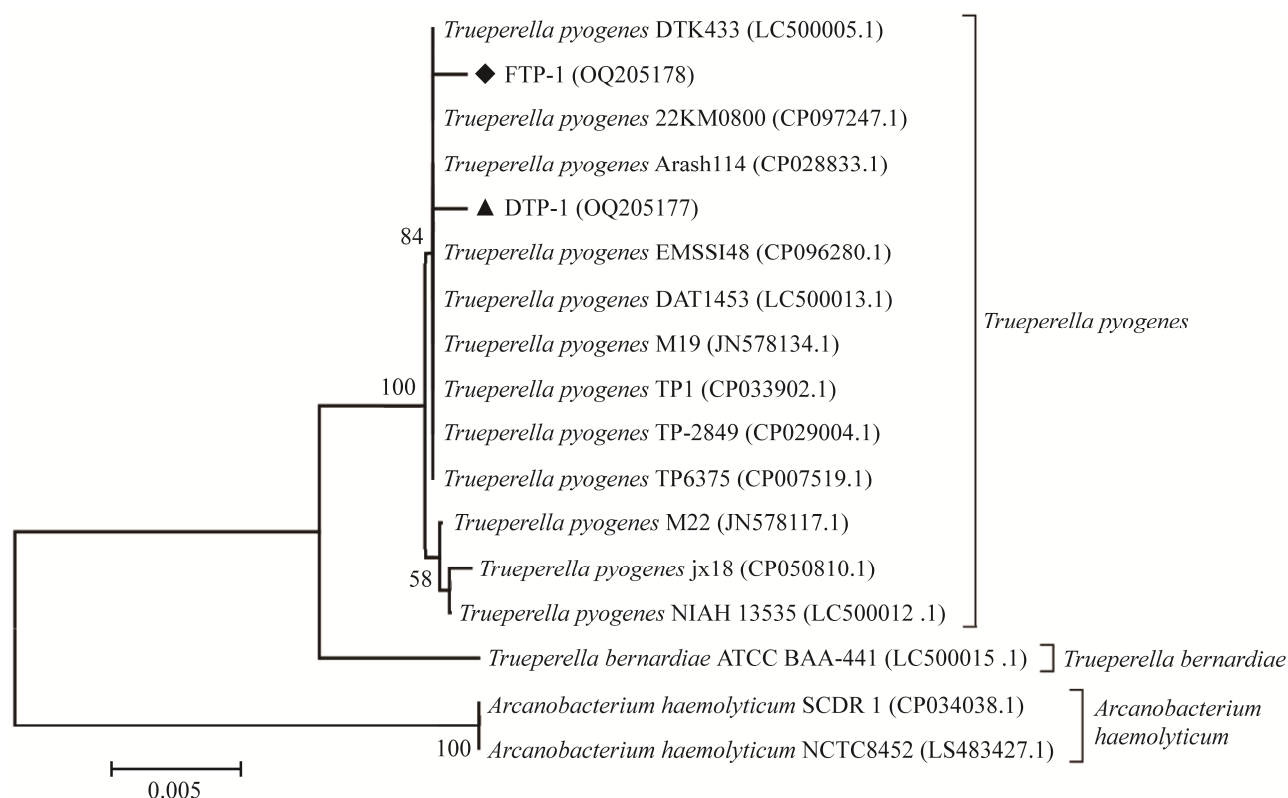


图2 病原菌基于16S rRNA基因序列建立的系统发育树 括号中序号是相关菌株的登录号；分支点上的数字是bootstrap支持率；标尺刻度0.005是序列差异的分支长度；◆：林麝源分离株；▲：鸭源分离株。下同

Figure 2 Phylogenetic tree established based on 16S rRNA gene sequences of pathogens. Numbers in parentheses are the accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar=0.005 is nucleotide divergence; ◆: Forest musk deer isolates; ▲: Duck isolates. The same below.

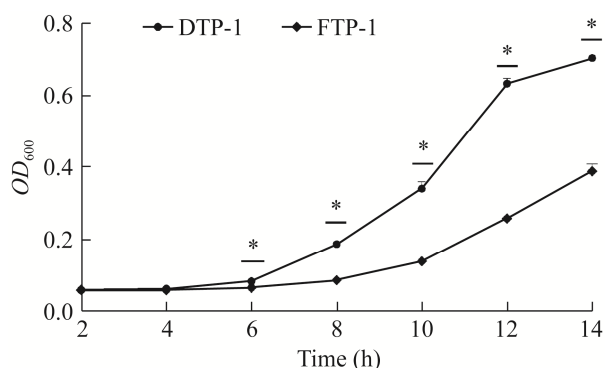


图3 病原菌生长曲线测定结果 \*：显著性差异(P<0.05)

Figure 3 Determination results of pathogen growth curve. \*: Significant differences (P<0.05).

那霉素、头孢拉定和恩诺沙星等14种抗生素敏感；林麝源化脓隐秘杆菌对青霉素G、林可霉素和复方新诺明等10种抗生素耐药，对四环素、红霉素和新霉素等6种抗生素表现中介，对卡那霉素、头孢拉定和恩诺沙星等14种抗生素敏感。2株病原菌均表现为主要对β-内酰胺类、磺胺类和利福霉素类抗生素耐药以及主要对氨基糖苷类、喹诺酮类抗生素敏感(表2)。

## 2.5 病原菌毒力基因检测结果

对分离的2株不同源化脓隐秘杆菌8个主要毒力基因进行检测，图4结果显示，2株病原菌均未检出胶原结合蛋白基因(*cbpA*)和鞭毛

表 2 病原菌药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test of pathogens

Types of antibiotics	Antibiotics	Inhibition zone diameters (mm)	
		Duck	Forest musk deer
β-lactam	Penicillin G	0 (R)	0 (R)
	Ampicillin	0 (R)	0 (R)
	Amoxicillin	12 (R)	10 (R)
	Cefalexin	17 (I)	20 (S)
	Cefotaxime	12 (R)	11 (R)
	Ceftazidime	14 (R)	17 (R)
	Cefradine	21 (S)	23 (S)
	Tetracycline	18 (I)	18 (I)
Tetracyclines	Doxycycline	17 (R)	20 (I)
	Erythromycin	18 (I)	19 (I)
Macrolides	Azithromycin	14 (S)	13 (S)
	Roxithromycin	18 (I)	17 (I)
	Enrofloxacin	25 (S)	27 (S)
Quinolones	Ciprofloxacin	24 (S)	22 (S)
	Levofloxacin	25 (S)	28 (S)
	Streptomycin	23 (S)	26 (S)
Aminoglycosides	Kanamycin	20 (S)	24 (S)
	Tobramycin	18 (S)	19 (S)
	Spectinomycin	28 (S)	31 (S)
	Gentamicin	21 (S)	22 (S)
	Neomycin	21 (I)	23 (I)
	Amikacin	23 (S)	22 (S)
	Lincomycin	20 (S)	10 (R)
	Clindamycin	21 (S)	14 (R)
Peptides	Polymyxin B	11 (I)	12 (S)
	Bacitracin	0 (R)	0 (R)
Amphenicols	Chloramphenicol	16 (I)	17 (I)
	Florfenicol	25 (S)	21 (S)
Sulfonamides	Compound sulfamethoxazole	0 (R)	0 (R)
Rifamycin	Rifampicin	13 (R)	12 (R)

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

基因(*fimG*), 林麝源化脓隐秘杆菌共检出毒力基因 5 个, 分别为 *plo*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimE*; 鸭源化脓隐秘杆菌共检出毒力基因 6 个, 分别为 *plo*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE*。

## 2.6 病原菌 *plo* 基因变异性分析结果

经 PCR 扩增测序获得 2 株病原菌 *plo* 基因核苷酸序列全长, 均为 1 605 bp, GC 含量均为

51.40%。以 MEGA 7.0 构建 2 株病原菌与 GenBank 中不同宿主来源的 18 株化脓隐秘杆菌参考株 *plo* 基因系统发育树发现, 不同宿主来源的化脓隐秘杆菌 *plo* 基因处于几个不同独立分支, 本次分离到的林麝源和鸭源化脓隐秘杆菌与羊源参考株聚于同一小分支上, 亲缘关系最近(图 5A)。不同宿主来源 *plo* 基因核苷酸比

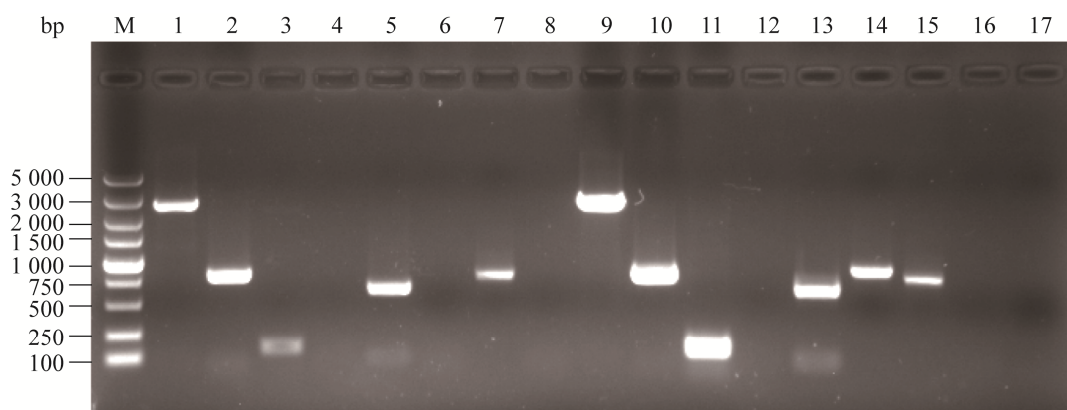


图4 病原菌毒力基因 PCR 扩增结果 M: DL5000 DNA Marker; 1–8: 依次为林麝源化脓隐秘杆菌 *plo*、*nanH*、*nanP*、*cbpA*、*fimA*、*fimC*、*fimE* 和 *fimG* 基因; 9–16: 依次为鸭源化脓隐秘杆菌 *plo*、*nanH*、*nanP*、*cbpA*、*fimA*、*fimC*、*fimE* 和 *fimG* 基因; 17: 阴性对照

Figure 4 PCR amplification results of pathogenic bacteria virulence genes. M: DL5000 DNA Marker; 1–8: *plo*, *nanH*, *nanP*, *cbpA*, *fimA*, *fimC*, *fimE* and *fimG* genes of *Trueperella pyogenes* isolated from forest musk deer; 9–16: *plo*, *nanH*, *nanP*, *cbpA*, *fimA*, *fimC*, *fimE* and *fimG* genes of *Trueperella pyogenes* isolated from duck; 17: Negative control.

对结果发现, *plo* 基因突变率较高, 各宿主来源在某些碱基位点具有各自种属所共有的独特突变, 但均以点突变为主, 无插入或缺失。本次分离的林麝源化脓隐秘杆菌与其他动物源菌株相比, 存在 3 个独特碱基突变位点为 84 (G/C)、399 (T/G/C) 和 906 (C/T), 独特碱基突变位点较分离的鸭源化脓隐秘杆菌多, 推测这些碱基位点可能是其种属特异性突变位点; 而鸭源化脓隐秘杆菌与亲缘关系最近的羊源参考株相比, 仅存在一个独特碱基突变位点为 1 071 (C/T), 与羊源参考株具有较高相似性, 且林麝源化脓隐秘杆菌在该位点处同样存在突变, 2 株病原菌在该位点处还与梅花鹿源参考株独特突变相同(图 5B)。

## 2.7 病原菌溶血素 PLO 生物信息学分析结果

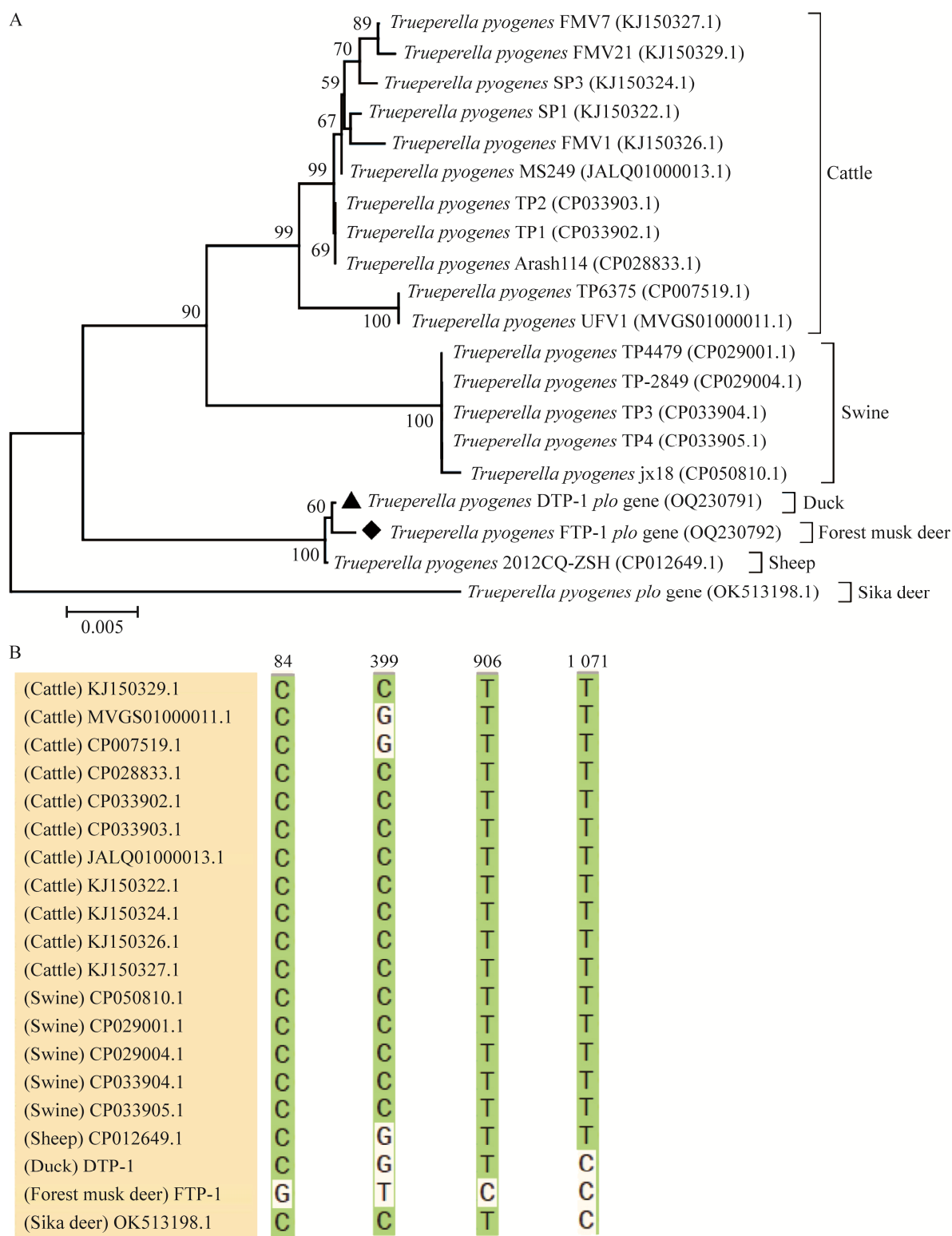
### 2.7.1 PLO 理化性质和亲/疏水性预测

经 SnapGene 6.0 翻译, 虽然林麝源与鸭源

化脓隐秘杆菌溶血素 *plo* 基因核苷酸序列存在差异, 但二者氨基酸序列相同, 且与亲缘关系最近的羊源参考株氨基酸序列相同, 共有 534 个氨基酸。经在线软件 ProtParam 预测, PLO 含负电荷残基(Asp+Glu) 52 个, 含正电荷残基(Arg+Lys) 68 个, 包含 19 种氨基酸, 其中, Ala 含量最高, 为 9.4%; Met 含量最低, 为 0.9%; 不包含 Cys (图 6A)。溶血素 PLO 分子式为  $C_{2588}H_{4105}N_{715}O_{787}S_5$ , 理论相对分子质量约为 57 988.68, 理论等电点(pI)为 9.49, 不稳定性指数为 26.86, 说明该蛋白属于稳定性蛋白。经在线软件 ProtScale 预测, PLO 亲水性平均系数为 -0.348, 预测该蛋白为亲水性蛋白, 其中, 第 200 位 Lys 亲水性最强, 分值为 -2.867; 第 267 位的 Val 疏水性最强, 分值为 2.533 (图 6B)。

### 2.7.2 PLO 抗原决定簇预测

经在线软件 Predicting Antigenic Peptides 预测, PLO 共存在 20 个抗原决定簇(表 3)。

图 5 *plo* 基因核苷酸序列系统发育树(A)和位点差异分析(B)Figure 5 Phylogenetic tree (A) and site variation analysis (B) of *plo* gene nucleotide sequence.

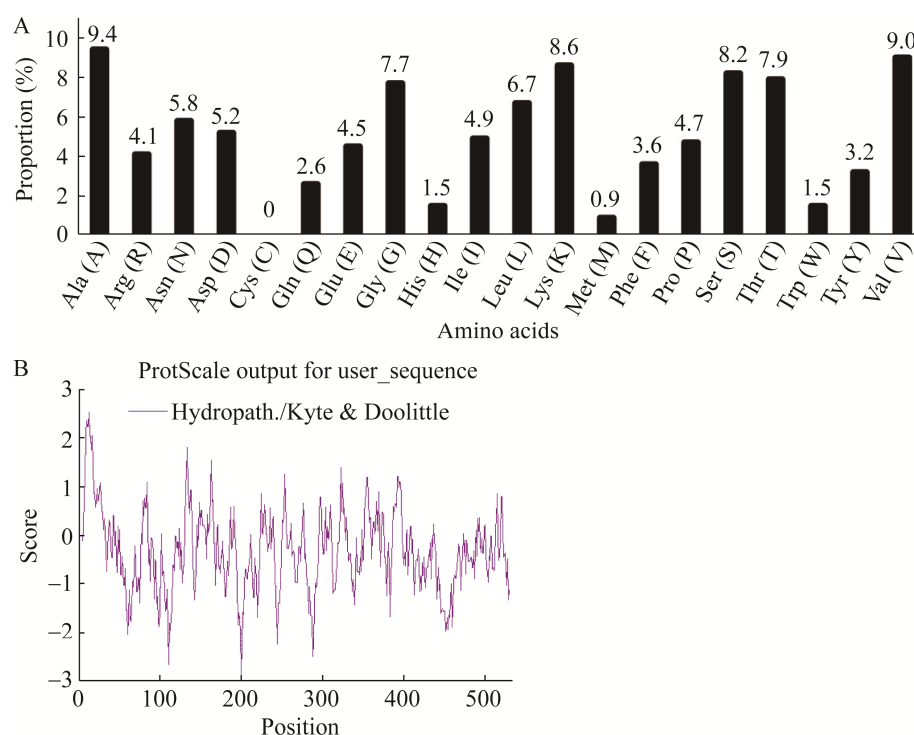


图 6 PLO 的氨基酸组成(A)与亲水性(B)

Figure 6 Amino acid composition (A) and hydrophilicity (B) of PLO.

表 3 PLO 蛋白抗原决定簇预测

Table 3 Antigenic determinants prediction of PLO protein

No.	Start position	End position	Sequence
1	5	21	AFASLVASVVAATVTM
2	36	46	LTDGLSAPRAS
3	65	85	SVDKYIRGLKYDPSGVLAVKG
4	88	95	IENVPVTK
5	101	107	GTYYTVFK
6	126	139	NNAHVYPGALVLAN
7	148	166	TSIGIARAPQTVSVDLPGL
8	168	175	DGKNKVVI
9	201	208	YPDHAANKI
10	221	242	LEAKLGLGFEKVSAKLNVDFDA
11	248	266	RQVAIASFKQIYYTASVDT
12	268	280	TSPHSVFGPNVTA
13	293	310	PLGYISSVSYGRQIFVKL
14	317	328	NDVQAAFSGLFK
15	350	357	RATVYVVG
16	362	368	GGVEVAT
17	384	399	FSTKVPAPVPSYAVNF
18	404	410	QLAAVRS
19	432	439	GGGYVAKF
20	508	520	NLPLVPHREIVLK

### 2.7.3 PLO 二级结构与三级结构预测

经在线软件 SOPMA 预测, PLO 共存在 4 种二级结构, 含  $\alpha$ -螺旋 134 个(25.09%),  $\beta$ -转角 36 个(6.74%)、延伸链 124 个(23.22%)和无规则卷曲 240 个(44.94%), 以无规则卷曲占比最高(图 7)。经在线软件 Phyre2 预测, 获得溶血素 PLO 蛋白三级结构(图 8A); 使用拉氏图(Ramachandran plot)对 PLO 蛋白三级结构预测结果进行分析, 结果显示, PLO 蛋白 91.3%的残基位于最合理结构区域内, 8.0%的残基位于额外允许区域内, 0.5%的残基位于最大可接受区域内, 0.2%的残基为不可靠区域, 最合理结构区域超过 90%, 预测结果合理性高(图 8B)。经在线软件 SWISS-MODEL 比对, PLO 三级结构与链球菌溶血素 O (streptolysin O, SLO)和单核增生李斯特氏菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO)等 CDCs 家族成员在大多数结构区域上一致性较高(图 9A、9B)。

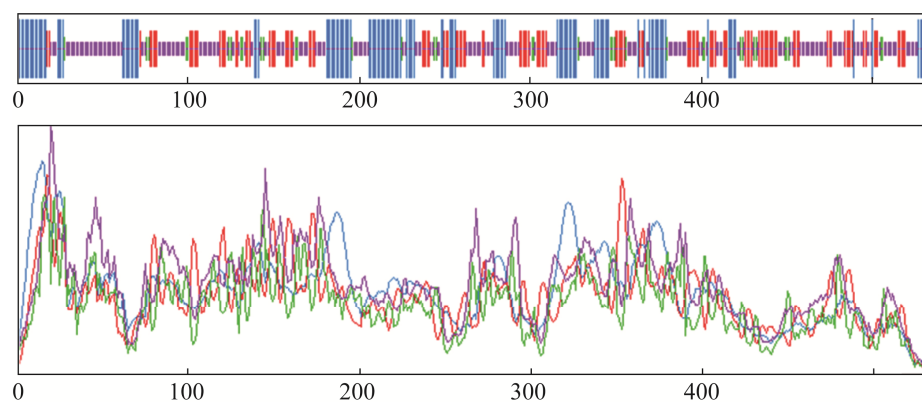


图7 PLO 二级结构预测 线条由长到短分别代表  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲

Figure 7 Protein secondary structure prediction of PLO. The lines in the graph from long to short represent  $\alpha$ -helix, extended strand,  $\beta$ -turn and random coil, respectively.

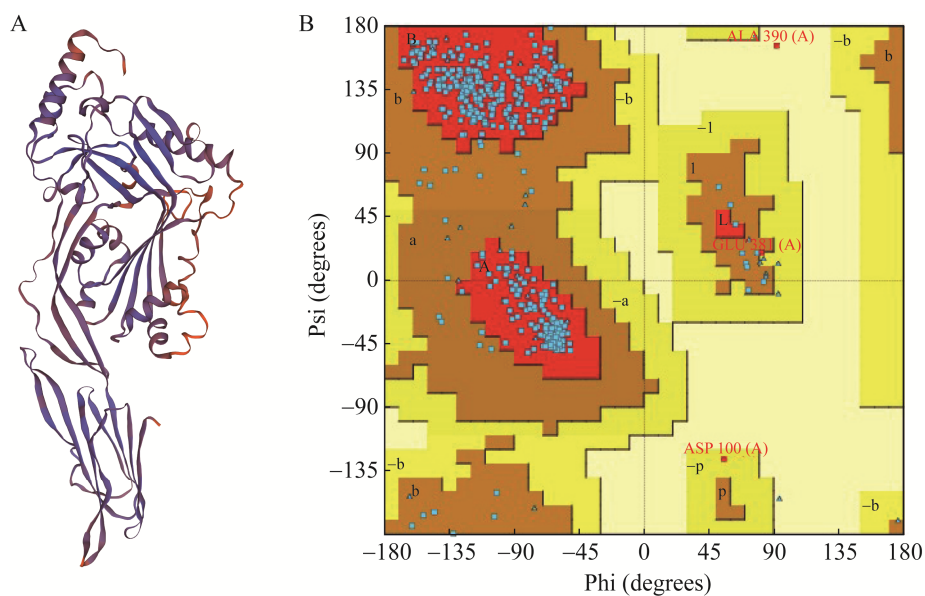


图8 PLO 空间构象(A)和拉氏图(B)

Figure 8 The conformation simulated maps of PLO (A) and Ramachandran plot (B).

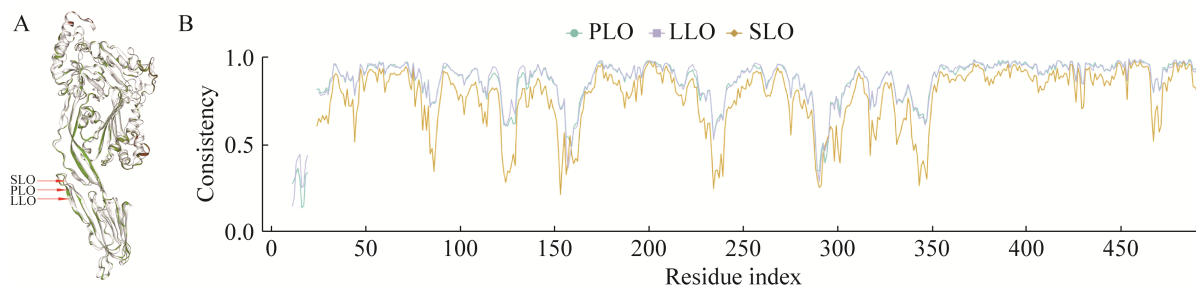


图9 PLO、LLO 和 SLO 的结构评估(A)及一致性比对(B)

Figure 9 PLO, LLO and SLO structure assessment (A) and consistency comparison (B).

### 3 讨论与结论

化脓隐秘杆菌是一种重要的接触性病原体,可在多种动物中引起各种化脓性感染,造成畜牧业重大经济损失的同时还威胁人类健康。本研究从云南宜良地区某林麝特种养殖场发病林麝皮下脓肿液和某种鸭场发病鸭跗关节脓肿液各分离到 1 株化脓隐秘杆菌,分别命名为 FTP-1 和 DTP-1。林麝作为国家一级保护动物<sup>[10-11]</sup>,雄性林麝香囊的分泌物麝香是传统名贵中药材和高级动物香料,具有广泛的临床应用和多种药理作用,经济价值极高,发展林麝人工驯养是解决林麝濒危及麝香可持续生产的有效方式<sup>[12]</sup>,而化脓性疾病是我国圈养林麝中发病率最高和危害最严重的群发性疾病之一,条件致病菌化脓隐秘杆菌就是可导致麝化脓性疾病的其中一种重要病原菌<sup>[13-14]</sup>。目前家禽感染化脓隐秘杆菌报道还较少,本研究从同一地区鸭跗关节脓肿液分离到了化脓隐秘杆菌,推测有该病原体的地区禽类感染率可能增高。

药物敏感性检测发现,林麝源化脓隐秘杆菌与鸭源相比,其对林可胺类抗生素具有较强耐药性,推测这与二者养殖方式不同以及不同养殖方式下用药习惯不同有关,林麝圈地散养的养殖环境较鸭集约化大规模养殖复杂,环境中致病菌复杂多样、用药杂乱,加大了致病菌之间耐药基因转移整合的机会。本研究中分离的 2 株化脓隐秘杆菌耐药性较其他地区分离株高,如李俊锋等<sup>[15]</sup>在重庆地区分离的梅花鹿源化脓隐秘杆菌仅对氨苄西林和青霉素等 4 种抗生素耐药;谭佳等<sup>[16]</sup>在江西地区分离的猪源化脓隐秘杆菌仅对克林霉素和林可霉素 2 种抗生素耐药。不同地区不同宿主来源耐药性存在差异,本地区应注意调整用药,严防强耐药致病菌株的出现。Dong 等<sup>[17]</sup>对分离于吉林的 27 株

猪源化脓隐秘杆菌进行耐药性分析发现,大多数病原菌对氨基糖苷类抗生素耐药,且发现主要因为这些耐药菌株均携带有 I 类整合子中的部分耐药基因,但本次分离到的 2 株化脓隐秘杆菌对氨基糖苷类抗生素的耐药表现均不明显,或许与 2 株病原菌尚未含有该类整合系统有关。

毒力基因检测发现,2 株化脓隐秘杆菌均携带 *plo*、*nanH*、*nanP* 基因,*cbpA* 基因未检出,Ashrafi Tamai 等<sup>[18]</sup>和董文龙等<sup>[19]</sup>的研究中,*cbpA* 基因的阳性率同样低于 *plo*、*nanH*、*nanP* 基因,可能为化脓隐秘杆菌感染过程非必需毒力基因。Fujimoto 等<sup>[6]</sup>对 100 株来源于牛和 67 株来源于猪的化脓隐秘杆菌研究发现,*fimA* 和 *fimE* 阳性率较高,均达 82.0%以上,而 *fimG* 阳性率相对较低(不超过 42.0%),但 *fimC* 阳性率却存在明显差异,牛源阳性率高达 80.0%,而猪源仅为 22.4%。本研究中 2 株不同来源的化脓隐秘杆菌鞭毛基因阳性率也存在类似情况,2 株菌均检出 *fimA* 和 *fimE*,均未检出 *fimG*,而 *fimC* 仅在鸭源化脓隐秘杆菌中检出,2 个不同宿主病原菌之间致病基因的阳性率存在一定差异。

溶血素 PLO 作为化脓隐秘杆菌的主要毒力因子之一,具有溶细胞活性,可导致红细胞、巨噬细胞等多种真核细胞形成孔隙。Qi 等<sup>[20]</sup>和 Preta 等<sup>[21]</sup>的研究表明,化脓隐秘杆菌溶血素 PLO 可通过与其他生物分子结合来介导细胞自噬,致使化脓隐秘杆菌感染宿主细胞时发生细胞溶解,在化脓隐秘杆菌毒力作用中具有重要影响作用。然而林昶等<sup>[22]</sup>研究发现,同宿主来源化脓隐秘杆菌 *plo* 基因之间核苷酸变异较小,不同宿主来源之间变异较大,*plo* 基因具有一定的宿主独特性。本研究分离的 2 株化脓隐秘杆菌,其 *plo* 基因核苷酸与其他来源参考株相比,同样存在各自的独特性变异,其中某些位点可能就是其宿主独特性变异位点,但二者间亲缘

关系相较其他宿主而言较近, 且氨基酸变异相同。准确预测蛋白结构, 立足蛋白结构生物学信息可有利于研究特异功能基因遗传本质与调控机理, 如药物和抗体设计开发、研究蛋白间相互作用以及蛋白与其他生物分子间相互作用<sup>[23-24]</sup>。有研究表明, CDCs 家族成员之间具有 40%–70% 的序列相似性, 所有成员也都具有相似的三级结构和保守的基本作用机制, 本研究预测的化脓隐秘杆菌溶血素 PLO 结构与其他研究所预测的链球菌溶血素 SLO 和单核增生李斯特氏菌溶血素 LLO 等 CDCs 家族成员具有较为相似的蛋白空间构象<sup>[25-26]</sup>, 可有效指导后续该蛋白的结构与功能间关系等相关研究。

## REFERENCES

- [1] JOST BH, BILLINGTON SJ. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 88(2): 87-102.
- [2] ZHAO KL, TIAN YQ, YUE BS, WANG HN, ZHANG XY. Virulence determinants and biofilm production among *Trueperella pyogenes* recovered from abscesses of captive forest musk deer[J]. *Archives of Microbiology*, 2013, 195(3): 203-209.
- [3] KWIECIEŃ E, STEFAŃSKA I, CHROBAK-CHMIEL D, SAŁAMASZYŃSKA-GUZ A, RZEWUSKA M. New determinants of aminoglycoside resistance and their association with the class 1 integron gene cassettes in *Trueperella pyogenes*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(12): 4230.
- [4] RAMOS CP, FOSTER G, COLLINS MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(1): 46-53.
- [5] YASSIN AF, HUPFER H, SIERING C, SCHUMANN P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehn et al. 2006: proposal for *Trueperella* Gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(Pt 6): 1265-1274.
- [6] FUJIMOTO H, SHIMOJI N, SUNAGAWA T, KUBOZONO K, NAKAJIMA C, CHUMA T. Differences in phenotypic and genetic characteristics of *Trueperella pyogenes* detected in slaughtered cattle and pigs with septicemia[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2020, 82(5): 626-631.
- [7] RZEWUSKA M, KWIECIEŃ E, CHROBAK-CHMIEL D, KIZERWETTER-ŚWIDA M, STEFAŃSKA I, GIERYŃSKA M. *Trueperella pyogenes* pathogenicity and virulence of: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2737.
- [8] HU YH, ZHANG WL, BAO J, WU YH, YAN MH, XIAO Y, YANG LX, ZHANG Y, WANG JW. A chimeric protein composed of the binding domains of *Clostridium perfringens* phospholipase C and *Trueperella pyogenes* pyolysin induces partial immunoprotection in a mouse model[J]. *Research in Veterinary Science*, 2016, 107: 106-115.
- [9] KWIECIEŃ E, STEFAŃSKA I, KIZERWETTER-ŚWIDA M, CHROBAK-CHMIEL D, DIDKOWSKA A, BIELECKI W, OLECH W, ANUSZ K, RZEWUSKA M. Prevalence and genetic diversity of *Trueperella pyogenes* isolated from infections in European Bison (*Bison bonasus*)[J]. *Animals*, 2022, 12(14): 1825.
- [10] 王涓, 姜海瑞, 薛文杰, 徐玲, 徐宏发. 林麝(*Moschus berezovskii*)研究概况和进展[J]. *四川动物*, 2006, 25(1): 195-200.
- WANG Y, JIANG HR, XUE WJ, XU L, XU HF. Advances in research of forest musk Deer (*Moschus berezovskii*)[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006, 25(1): 195-200 (in Chinese).
- [11] HUANG J, LI YZ, LI P, YUE H, ZHANG XY, LI XX, ZOU FD, MING H, MOERMOND T, YUE BS. Genetic quality of the Miyaluo captive forest musk Deer (*Moschus berezovskii*) population as assessed by microsatellite loci[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 47: 25-30.
- [12] YANG QS, MENG XX, XIA L, FENG ZJ. Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus* spp.) in China[J]. *Biological Conservation*, 2003, 109(3): 333-342.
- [13] 闫敏, 颜其贵, 杨光友. 圈养麝的群发性疾病[J]. *经济动物学报*, 2016, 20(2): 112-117.
- YAN M, YAN QG, YANG GY. The mass diseases of captive musk Deer[J]. *Journal of Economic Animal*, 2016, 20(2): 112-117 (in Chinese).

- [14] ZHAO W, REN ZW, LUO Y, CHENG JG, WANG J, WANG Y, YANG ZX, YAO XP, ZHONG ZJ, YANG W, WU X. Metagenomics analysis of the gut microbiome in healthy and bacterial pneumonia forest musk deer[J]. *Genes & Genomics*, 2021, 43(1): 43-53.
- [15] 李俊锋, 赵自亮, 朱桓奕, 田宇森, 王迎平, 冯旭东, 刘霞, 赵光伟, 张立武, 杨晓伟. 一株梅花鹿源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(4): 720-725, 740.
- LI JF, ZHAO ZL, ZHU HY, TIAN YS, WANG YP, FENG XD, LIU X, ZHAO GW, ZHANG LW, YANG XW. Isolation, identification and biological characteristics analysis of a strain of *Trueperella pyogenes* from Sika deer[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(4): 720-725, 740 (in Chinese).
- [16] 谭佳, 曾艳兵, 李海琴, 张帆帆, 杨群, 方绍培, 季华员, 谭美芳. 一株猪源化脓隐秘杆菌的鉴定、生物学特性研究与基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4198-4208.
- TAN J, ZENG YB, LI HQ, ZHANG FF, YANG Q, FANG SP, JI HY, TAN MF. Identification, biological characterization, and genomic analysis of *Trueperella pyogenes* isolated from swine[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4198-4208 (in Chinese).
- [17] DONG WL, KONG LC, WANG Y, GOU CL, XU B, MA HX, GAO YH. Aminoglycoside resistance of *Trueperella pyogenes* isolated from pigs in China[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(11): 1836-1839.
- [18] ASHRAFI TAMAI I, MOHAMMADZADEH A, ZAHRAEI SALEHI T, MAHMOODI P, PAKBIN B. Investigation of antimicrobial susceptibility and virulence factor genes in *Trueperella pyogenes* isolated from clinical mastitis cases of dairy cows[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(8): 4529-4538.
- [19] 董文龙, 魏菁, 耿昕颖, 王羽, 张红伟, 张喜庆, 马红霞, 高云航. 吉林省 8 株猪源化脓隐秘杆菌主要毒力基因的鉴定及耐药性分析[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(1): 69-73.
- DONG WL, WEI J, GENG XY, WANG Y, ZHANG HW, ZHANG XQ, MA HX, GAO YH. PCR identification of major virulence genes and analysis of drug resistance of 8 *Arcanobacterium pyogenes* isolated from swine in Jilin Province[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(1): 69-73 (in Chinese).
- [20] QI MZ, LIU JG, JIANG QR, NIU HY, WANG XY, ZHOU D, LIN PF, CHEN HT, WANG AH, JIN YP. *Trueperella pyogenes* pyolysin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in endometrium stromal cells via autophagy- and ATF6-dependent mechanism[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52(2): 939-952.
- [21] PRETA G, LOTTI V, CRONIN JG, SHELDON IM. Protective role of the dynamin inhibitor Dynasore against the cholesterol-dependent cytolysin of *Trueperella pyogenes*[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(4): 1516-1528.
- [22] 林昶, 王锐鸿, 胥焯然, 池雪林, 陈仕龙, 陈叶, 曾显成. 山羊化脓隐秘杆菌 LM01 株分离鉴定及其毒力基因 PLO 遗传进化分析[J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(9): 1163-1174.
- LIN C, WANG RH, XU ZR, CHI XL, CHEN SL, CHEN Y, ZENG XC. Isolation and identification of *Trueperella pyogenes* LM01 strain from goats and phylogenetic analysis of PLO virulence gene[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2021, 51(9): 1163-1174 (in Chinese).
- [23] JISNA VA, JAYARAJ PB. Protein structure prediction: conventional and deep learning perspectives[J]. *The Protein Journal*, 2021, 40(4): 522-544.
- [24] 王会征, 兰玉彬. 辣椒疫霉菌果胶裂解酶 PL101 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4021-4028.
- WANG HZ, LAN YB. Cloning and bioinformatics analysis of pectate lyase PL101 from *Phytophthora capsici*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4021-4028 (in Chinese).
- [25] FEIL SC, ASCHER DB, KUIPER MJ, TWETEN RK, PARKER MW. Structural studies of *Streptococcus pyogenes* streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(4): 785-792.
- [26] KÖSTER S, van PEE K, HUDEL M, LEUSTIK M, RHINOW D, KÜHLBRANDT W, CHAKRABORTY T, YILDIZ Ö. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3690.