

# 支气管败血波氏杆菌皮肤坏死毒素的重组表达及其生物学特性

薛云<sup>2</sup>, 赵战勤<sup>1</sup>, 裴洁<sup>3</sup>, 王臣<sup>1</sup>, 丁轲<sup>1</sup>, 程相朝<sup>1</sup>

1 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003

2 河南科技大学医学技术与工程学院, 洛阳 471003

3 湖北省动物疫病预防控制中心, 武汉 430064

**摘要:** 皮肤坏死毒素 (DNT) 是支气管败血波氏杆菌的主要致病因子之一。通过 PCR 分段扩增和克隆获得了全长 4 356 bp 的 *dnt* 基因, 并利用 pET-28a/BL21 系统对其进行了融合表达。Western blotting 检测结果表明, 表达产物具有良好的免疫学活性。使用 His-band purification kit 纯化试剂盒纯化后, 得到纯度为 93.2% 的融合蛋白 His<sub>6</sub>-DNT。在乳鼠皮肤坏死试验中, 表达产物 His<sub>6</sub>-DNT 和天然 DNT 均能导致乳鼠皮肤产生坏死性病变。在乳鼠皮肤坏死阻断试验中, 兔抗 His<sub>6</sub>-DNT 血清能中和天然 DNT 使其失去对乳鼠的皮肤坏死毒性。试验结果表明, 重组蛋白具有天然 DNT 的生物学毒性和免疫原性, 所产生的抗体具有中和活性。文中所获得的重组 DNT 蛋白具有良好的生物学活性, 为 DNT 的结构和功能研究奠定基础。

**关键词:** 支气管败血波氏杆菌, 皮肤坏死毒素, *dnt* 基因

## Expression and characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella bronchiseptica*

Yun Xue<sup>2</sup>, Zhanqin Zhao<sup>1</sup>, Jie Pei<sup>3</sup>, Chen Wang<sup>1</sup>, Ke Ding<sup>1</sup>, and Xiangchao Cheng<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2 College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

3 Hubei Province Animal Disease Control Center, Wuhan 430064, China

**Abstract:** Dermonecrotic toxin (DNT) is identified as one of the most important virulence factor of *Bordetella bronchiseptica*. The complete coding sequence (4 356 bp) of the *dnt* gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a, and expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) under IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) induction. The recombinant His<sub>6</sub>-DNT protein showed immunological reactivity in the Western-blot analysis. The recombinant protein was purified from crude lysates of

**Received:** April 18, 2011; **Accepted:** June 23, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31001051), Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (No. 2009CZ0010).

**Corresponding author:** Zhanqin Zhao. Tel: +86-379-64282341; E-mail: zhaozhanqin@126.com

国家自然科学基金 (No. 31001051), 河南科技大学博士创新培育基金项目 (No. 2009CZ0010) 资助。

BL21 harboring pET-DNT with the purity of 93.2%. His<sub>6</sub>-DNT showed the dermonecrotic effects in the infant mouse assay. However, rabbit anti-serum against recombinant DNT protein could neutralize the dermonecrotic effects of native DNT to the infant mice *in vivo*. These findings suggest that the recombinant DNT protein retained the characteristics and immunogenicity of native DNT. Furthermore, this approach could be used to induce active immunity and serum immunoglobulin for production of a passive therapeutic reagent. In this study, we have shown that the recombinant His<sub>6</sub>-DNT protein retained the characteristics of native DNT of *B. bronchiseptica*, which built a good foundation for the further research on the structure and function of DNT.

**Keywords:** *Bordetella bronchiseptica*, dermonecrotic toxin, *dnt* gene

支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*, Bb) 是一种革兰氏阴性需氧小杆菌, 可广泛感染多种哺乳动物, 表现为呼吸道的急慢性炎症<sup>[1]</sup>。在猪群中, Bb 可引起猪发生萎缩性鼻炎 (Atrophic rhinitis, AR) 和支气管肺炎, 世界猪群有 25%~50% 受感染, 已成为猪的重要传染病之一<sup>[2]</sup>。2003~2008 年, 笔者从全国各地 3 506 份有呼吸道症状的猪肺脏病料中分离到 652 株 Bb, 分离率高达 18.6%, 各省份之间没有明显差异, 表明 Bb 在我国猪场广泛流行和致病<sup>[3]</sup>。近年来发现, Bb 可从家畜等动物传染给人类, 并在免疫功能缺陷或低下的人群 (如 AIDS 患者) 体内形成严重感染, 因此引起高度关注<sup>[4]</sup>。

目前, 用于预防和控制该病的疫苗主要有灭活菌苗和类毒素苗, 其中类毒素苗免疫效果优于灭活菌苗, 不同型菌株的类毒素具有交叉保护<sup>[4]</sup>。皮肤坏死毒素 (Dermonecrotic toxin, DNT) 是 Bb 定居于宿主上呼吸道所必需的致病因子, 缺失 *dnt* 基因的 Bb 突变株无法导致猪发生支气管肺炎和鼻甲骨损伤<sup>[5]</sup>。此外, DNT 还通过损坏呼吸道上皮细胞而间接地促进 Bb 的附着作用<sup>[5-6]</sup>。DNT 存在于胞浆内, 不耐热, 对福尔马林敏感, 灭活后仍具有抗原性, 可刺激机体产生抗毒素中和抗体<sup>[7]</sup>。然而, 天然 DNT 的分泌量非常有限, 不到菌体蛋白的 0.8%<sup>[8]</sup>, 且纯化工艺复杂, 因此通过提纯天然 DNT 来制备类毒素苗成本太高, 不适合规模化生产。本研究旨在通过分子生物学方法对毒素基因进行克隆、表达和生物学活性研究, 为 DNT 的分子致病机理和新型亚单位疫苗的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、试剂和试验动物

猪源 Bb 强毒菌株 HH0809 (FHA<sup>+</sup>, PRN<sup>+</sup>, DNT<sup>+</sup>)<sup>[9]</sup>、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21、载体质粒 pET-28a、HH0809 株猪阳性血清由河南科技大学动物病原微生物实验室保存; LB 培养基购自美国 BD 公司; LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等购自大连 TaKaRa 公司; 基因组提取试剂盒和 UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司; His-band purification kit 购自德国 Novagen 公司。天然 DNT 抗血清、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 和弗氏佐剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 新西兰大白兔、5~6 日龄 BALB/c 小鼠由河南科技大学实验动物中心提供。

### 1.2 *dnt* 基因的克隆、序列分析及表达载体的构建

利用 HMMTOP 软件<sup>[10]</sup> (<http://www.cn.expasy.org/tools/>) 对 GenBank 上公布的 *dnt* 基因 (Accession No. U59687) 编码的氨基酸序列进行跨膜性预测, 为 *dnt* 的引物设计和高效表达提供理论依据。设计 3 对引物 (由北京 AuGCT 公司合成), 分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点 (下划线部分), 并在 P2 和 P4 中引入终止密码子 (表 1)。3 对引物分别扩增其 N 端 (*dntN*)、中间部分 (*dntM*) 和 C 端 (*dntC*) 的编码区域 (图 1)。按试剂盒说明书提取 Bb HH0809 株基因组为模板, 使用引物 P1/P2 进行 PCR, 扩增 *dntN* 片段并回收产物。使用 *Bam*H I 与 *Hind* III 分别对 PCR 产物和 pET-28a 载体质粒进行酶切、回收、连接构建重组质粒, 命名为 pET-dntN。将连接

产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 提取质粒, 进行酶切鉴定和序列测定 (由大连 TaKaRa 公司完成)。按同样的方法使用引物 P3/P4 和 P5/P6 进行 PCR 并构建重组质粒 pET-dntM 和 pET-dntC。最后利用 *dnt* 基因含有的酶切位点 *Sma* I 和 *Sca* I 将 *dntM* 和 *dntC* 片段克隆到 pET-dntN 上构建含有 *dnt* 整个编码区的重组质粒 pET-dnt (图 1)。

### 1.3 基因的表达、纯化和 Western blotting 分析

将重组质粒 pET-dnt 转化大肠杆菌 BL21, 挑取单菌落于含有卡那霉素 (终浓度为 50 mg/L) 的 LB 培养基中, 37 °C、225 r/min 摇床培养至对数生长期时 ( $OD_{600}=0.6\sim 1.0$ ), 加入 0.8 mmol/L IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 诱导表达 4 h。通过 12% SDS-PAGE 分析蛋白的表达特性。应用 His-band purification kit 试剂盒对表达产物 (命名为 His<sub>6</sub>-PRN) 进行纯化。蛋白浓度通过分光光度计进行测定, 纯度经 SDS-PAGE 电泳和 Bio-Rad Quantity

One program (美国 Bio-Rad 公司) 进行分析。对纯化的各表达产物进行 Western blotting 分析, 一抗为天然 DNT 抗血清 (购自美国 Sigma-Aldrich 公司), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG。

### 1.4 乳鼠皮肤坏死试验

按文献[6]所述方法, 将 Bb 菌株 HH0809 在含有 15% 脱纤维羊血的鲍-姜氏平板上培养, 并对其培养物进行天然 DNT 的提取, 并按 1.3 所述方法进行浓度和纯度分析。将重组蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 和天然 DNT 均调整至浓度为 100 mg/L, 通过颈部皮下途径分别注射 5 只乳鼠 (50  $\mu$ L/只)。按相同的方法将两者的灭活溶液 (经 56 °C 水浴 30 min) 以及无菌 PBS 各注射 5 只乳鼠为对照 (表 2)。观察乳鼠皮肤坏死情况至 48 h。接种部位仅出现小红点判为轻微病变, 接种部位出现直径大于或等于 1 cm 的坏死灶判为严重病变, 介于两者之间的判为中度病变。

表 1 实验中所用引物

Table 1 PCR primers used in this study

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Restriction site	Size (bp)
<i>dntN</i>	P1	CATGTTGGATCCGTGGATAAAGATGAATCGGC	<i>Bam</i> H I	876
	P2	CTATTGAAGCTTTTAATCAAGTTTGCGTGGCA	<i>Hind</i> III	
<i>dntM</i>	P3	CTTGTTGGATCCGCGTATGCCGATGCATTG	<i>Bam</i> H I	1 854
	P4	CGTATCAAGCTTTTATCTGTAGGCATTCCCG	<i>Hind</i> III	
<i>dntC</i>	P5	CAAGTTGGATCCTGGGACCGTTGAGCGAG	<i>Bam</i> H I	1 832
	P6	GATTTC AAGCTTTGCGATT CAGACCGGCG	<i>Hind</i> III	

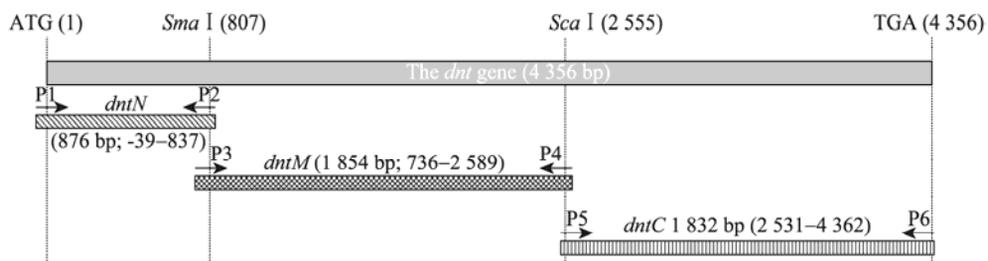


图 1 *dnt* 基因的结构及其分段克隆

Fig. 1 Structure of the constructed *dnt* segments.

表 2 重组蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 的乳鼠皮肤坏死试验结果Table 2 Dermonecrotic effects of His<sub>6</sub>-DNT in the infant mouse assay

Group	Lesions in the infant mouse assay					The results
	1	2	3	4	5	
Native DNT	+++	+++	+++	+++	+++	Severe lesions
His <sub>6</sub> -DNT	++	++	++	++	++	Moderate lesions
Inactivated native DNT	-	-	-	-	-	No lesions
Inactivated His <sub>6</sub> -DNT	-	-	-	-	-	No lesions
PBS	-	-	-	-	-	No lesions

Note: “-”, no lesions; “++” and “+++”, moderate or severe lesions.

### 1.5 乳鼠皮肤坏死阻断试验

将表达产物 His<sub>6</sub>-DNT 的蛋白质溶液加入 0.4% 甲醛溶液, 灭活 48 h, 取灭活后的 His<sub>6</sub>-DNT 蛋白 150 μg 与等体积弗氏完全佐剂均匀混合, 皮下注射新西兰大白兔, 分别在 3、5、7 周后各加强免疫 1 次 (使用弗氏不完全佐剂)。在最后一次免疫后 10 d 进行心脏采血, 分离血清, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 °C 保存备用。将兔抗 His<sub>6</sub>-DNT 血清 0.5 mL 与 1.4 中提取的天然 DNT 蛋白 50 μg 均匀混合, 37 °C 孵育 30 min。然后, 将孵育后的混合物按 1.4 所述方法分别接种 5 只乳鼠 (50 μL/只) 并进行观察。同时, 设 His<sub>6</sub>-DNT 兔抗血清、天然 DNT 蛋白以及无菌 PBS 组为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *dnt* 基因的序列分析及其重组表达质粒的构建

GenBank 上公布的 *dnt* 基因 (Accession No. U59687) 编码区全长为 4 356 bp, 编码 1 451 个氨基酸, HMMTOP 软件的分析结果表明, DNT 的氨基酸序列存在 1 个跨膜区, 位于约第 99~118 氨基酸之间, 对应于 DNT 信号肽序列位置<sup>[6]</sup>。ProtParam 软件的分析结果表明, DNT 的分子结构式为 C<sub>7186</sub>H<sub>11258</sub>N<sub>2040</sub>O<sub>2092</sub>S<sub>31</sub>, 理论 pI 值为 6.20, 脂肪系数为 94.83, 不稳定系数为 40.75, 属于不稳定型蛋白质。

本研究中, 将 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 表明成功扩增了 *dnt* 基因的 3 个片段 *dntN*、*dntM* 和 *dntC*, 扩增的片段大小分别为 876 bp、1 854 bp 和 1 832 bp (图 2A)。酶切鉴定结果表明, 构建的 3 个重组质粒 pET-*dntN*、pET-*dntM* 和 pET-*dntC* 均正确 (图 2B)。最后利用 *dnt* 基因含有的酶切位点 *Sma* I 和 *Sca* I 将 *dntM* 和 *dntC* 片段克隆到 pET-*dntN* 上构建含有 *dnt* 整个编码区 4 356 bp 的重组质粒 pET-*dnt*。将 pET-*dnt* 进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 得到大小为 5 000 bp 和 4 356 bp 左右的 2 条带, 与预期 DNA 片段相符 (图 2C)。测序结果进一步表明 *dnt* 基因片段在 pET-28a 表达载体中得到正确连接。本研究克隆的 *dnt* 全基因序列与 GenBank 公布的 3 个序列 U59687、AB020025、E17214 的核苷酸序列同源性均在 99.6% 以上; 有 6 个核苷酸发生突变, 最终导致 4 个氨基酸发生改变。

### 2.2 DNT 的表达和 Western blotting 分析

SDS-PAGE 结果表明 (图 3), 含 pET-*dnt* 重组质粒的大肠杆菌 BL21 在约 145 kDa 处有明显的表达带, 以包涵体形式存在, 与以前报道的该蛋白的分子量大小相符合<sup>[6]</sup>。pET-28a 空载体对照没有对应的表达带。经 Bio-Rad Quantity One program 进行分析, 重组蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 的表达量占菌体总蛋白的 42.3%。提取的包涵体经过复性, 并使用组氨酸融合蛋白纯化试剂盒 His-band purification kit 进行纯化后, 得到浓度为 302.1 μg/mL、纯度为 93.2% 的融合

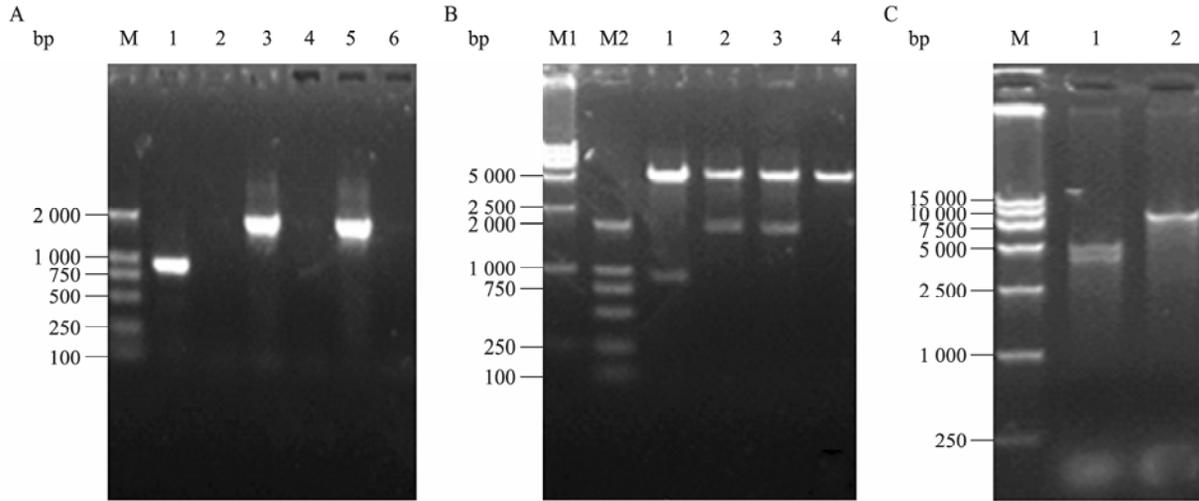


图 2 *dnt* 基因的分段扩增及其重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 The amplification of *dnt* gene fragments and identification of the recombinant plasmids by enzyme digestion. (A) M: marker DL 2 000; 1, 3 and 5: PCR products of *dntN*, *dntM*, and *dntC* fragments; 2, 4, 6: negative control. (B) M1 and M2: marker DL 15 000 and DL 2 000; 1-4: enzyme digestion analysis of pET-dntN, pET-dntM, pET-dntC and pET-28a by *BamH* I and *Hind* III, respectively. (C) M: marker DL 15 000; 1: pET-dnt digested with both *BamH* I and *Hind* III; 2: pET-dnt digested with *BamH* I.

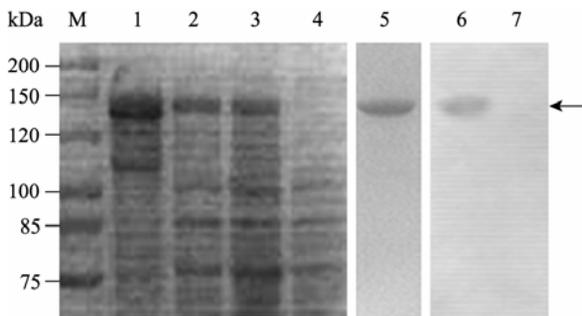


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blotting 结果

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the recombinant His<sub>6</sub>-DNT proteins. M: protein marker; 1 and 2: cell pellets and supernatants of *Escherichia coli* BL21 harboring pET-DNT plasmid; 3 and 4: crude lysates of BL21 harboring pET-DNT or pET-28a plasmid; 5: purified His<sub>6</sub>-DNT; 6 and 7: Western blotting of the purified His<sub>6</sub>-DNT and the PBS control with anti-DNT. His<sub>6</sub>-DNT proteins are indicated by the arrow.

蛋白 His<sub>6</sub>-DNT (图 3)。Western blotting 分析表明, 重组 DNT 蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 能够与天然 DNT 的抗血清发生特异性的免疫反应, 空载体对照诱导物则不能 (图 3)。这证实克隆基因片段得到正确表达, 并具有良好的反应原性。

### 2.3 His<sub>6</sub>-DNT 的乳鼠皮肤坏死试验

乳鼠皮肤坏死试验结果表明 (表 2), 表达蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 在 48 h 内可以使 5~6 日龄乳鼠发生中度的皮肤坏死病变, 天然毒素 DNT 则可使乳鼠全部发生严重病变。天然 DNT 和表达蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 经 56 °C 水浴 30 min 灭活后则完全丧失了使乳鼠皮肤发生坏死的能力 (图 4)。注射无菌 PBS 的 1 组乳鼠也未出现任何皮肤坏死病变。这些试验结果表明, 虽然重组蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 低于天然 DNT 的毒素活性, 但仍具有导致乳鼠皮肤坏死的生物学毒性作用。

### 2.4 乳鼠皮肤坏死阻断试验

结果表明, 天然 DNT 能导致乳鼠发生严重的皮肤坏死病变 (图 5B)。但是, 天然 DNT 蛋白与 His<sub>6</sub>-DNT 兔抗血清混合孵育后, 完全丧失了导致乳鼠皮肤坏死的能力, 注射的 5 只乳鼠均没有出现明显病变 (图 5A)。这表明天然 DNT 与 His<sub>6</sub>-DNT 的兔抗血清发生了中和反应从而丧失了导致乳鼠皮肤坏死的生物学毒性作用。这也进一步证明, 重组蛋白不仅具有 Western blotting 试验中所显现的良好反应原性, 也具有较强的免疫原性。

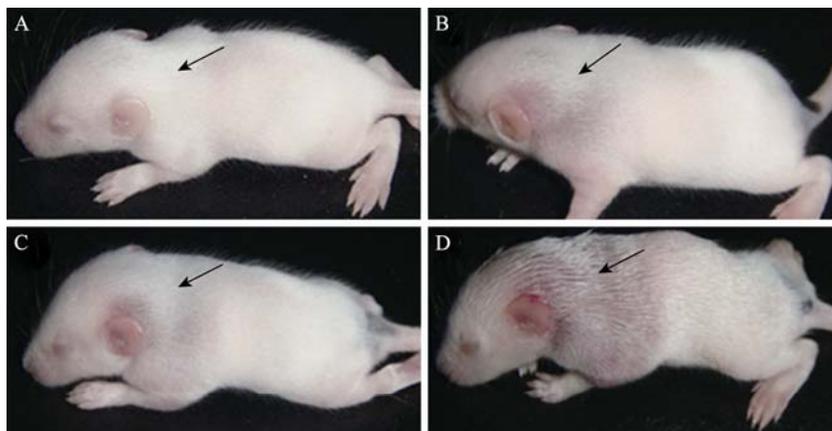


图 4 重组蛋白 His<sub>6</sub>-DNT 能导致乳鼠皮肤坏死

Fig. 4 Dermonecrotic effect of His<sub>6</sub>-DNT in the infant mice. (A) Inactivated His<sub>6</sub>-DNT could not cause lesions (arrow). (B) Natural DNT could cause severe lesions. (C and D) His<sub>6</sub>-DNT could cause lesions. Lesion was showed after being wetted with PBS.



图 5 DNT 的乳鼠皮肤坏死阻断试验结果

Fig. 5 Inhibition of dermonecrotic effect of DNT in the infant mouse assay. (A) Natural DNT neutralized with rabbit anti-His<sub>6</sub>-DNT could not cause dermonecrotic effect (arrow). (B) Natural DNT could cause severe dermonecrotic effect (arrow).

### 3 讨论

Bb 的 *dnt* 基因全长 4 356 bp, 国外学者均使用酶切基因组后杂交的方法获取 *dnt* 基因, 尚未使用 PCR 方法。考虑到本研究若选用普通的 DNA 聚合酶进行扩增, 很难保证片段的保真度, 故改用 *LA Taq* DNA 聚合酶扩增长片段, 但扩增比较困难。最后采用分段扩增的方法, 分三段扩增 *dnt* 基因, 再利用序列中的 2 个酶切位点 *Sma* I 和 *Sca* I 与载体的多克隆位点进行拼接, 最终获得 4 356 bp 的 *dnt* 全基因片段。序列分析表明, 该 *dnt* 基因与 GenBank 上所报道的 3 个 *dnt* 基因序列具有高度的同源性, 无插入和缺失突变。

本研究是国内首次在大肠杆菌中成功地用原核表达系统融合表达了 Bb 完整的 *dnt* 基因。SDS-PAGE 结果表明, 重组质粒 pET-dnt 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达的产物 His<sub>6</sub>-DNT 约占整个蛋白的 42.3%, 表达量大且易于纯化。而天然 DNT 毒素在 Bb 的表达量仅占 0.8%, 且难于纯化<sup>[8]</sup>。Western blotting 检测结果显示, 该重组蛋白具有良好的免疫学活性, 这为研制开发基因工程疫苗提供了可靠的试验基础。*dnt* 基因的高效表达为进一步研究 DNT 毒素蛋白的结构特点、理化特性打下了基础, 而且对于毒素作用机制以及致病机理的研究提供了试验材料。

乳鼠皮肤坏死试验结果显示, 虽然重组 His<sub>6</sub>-DNT 低于天然 DNT 毒素的生物学毒性, 但仍然能够导致乳鼠发生中等程度的皮肤坏死。重组蛋白以包涵体形式存在是其活性降低的一个主要原因, 即使经过变性、复性处理, 活性只能部分恢复。这些因素都会影响表达产物 His<sub>6</sub>-DNT 的生物学活性。在乳鼠皮肤坏死阻断试验中, His<sub>6</sub>-DNT 的兔抗血清能够中和天然 DNT 使其失去针对乳鼠的生物学毒性作用。这表明重组蛋白也具有好的免疫原性。同时也预示着, 重组 DNT 抗原不仅可用于

主动免疫预防, 也可通过制备抗血清用于波氏菌病的治疗。

### REFERENCES

- [1] United States Department of Agriculture. Part II: reference of swine health and health management in the United States. CO: National Animal Health Monitoring System, Fort Collins. 2000: 112-128.
- [2] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, et al. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2006.
- [3] Zhao ZQ, Wang C, Xue Y, et al. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *Vet J*, 2011 188(3): 337-340.
- [4] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2): 326-382.
- [5] Brockmeier SL, Register KB, Magyar T, et al. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun*, 2002, 70(2): 481-490.
- [6] Pullinger GD, Adams TE, Mullan PB, et al. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. *Infect Immun*, 1996, 64(10): 4163-4171.
- [7] Chen PY. Diseases of Animals. 5th ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2008: 209-269.  
陈博言. 兽医传染病学. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 209-269.
- [8] Horiguchi Y, Nakai T, Kume K. Purification and characterization of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Microb Pathog*, 1989, 6(5): 361-368
- [9] Zhao ZQ, Pei J, Xue Y, et al. Isolation, identification and characterization for *Bordetella bronchiseptica* from diseased pigs. *Sci Agri Sin*, 2008, 41(12): 4209-4217.  
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. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4209-4217.
- [10] Tusnady GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 2001, 17(9): 849-850.