

# 应用抑制性差减杂交筛选副猪嗜血杆菌 4 型菌株可能毒力基因

李 淼<sup>1 2</sup> 李春玲<sup>1 2</sup> 宋 帅<sup>1 2</sup> 杨冬霞<sup>1 2</sup>

(1. 广东省农业科学院 兽医研究所, 广东 广州 510640; 2. 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:**为了寻找副猪嗜血杆菌可能毒力基因, 采用抑制性差减杂交技术, 以 HPS 有毒力菌株 SW124(血清 4 型) 和无毒力菌株 H465(血清 11 型) 为研究对象, 构建差减杂交文库, 利用 Southern Blot 分析和 PCR 鉴定进行差异基因片段的筛选。从构建的文库中共筛选得到 7 个特异性差异基因片段, 经同源性分析, 其中 5 个片段分别与噬菌体重组蛋白、糖基转移酶/荚膜多糖磷酸转移酶、磷酸核糖甲酰甘氨酸合酶、核糖体蛋白丙氨酸转移酶和 ABC 型硝酸盐/磺酸盐/碳酸氢盐转运系统周质蛋白等编码的基因有同源性; 2 个差异基因片段与功能未知蛋白或假定蛋白编码基因有关。利用 PCR 对上述可能与毒力相关的差异基因片段在 9 种不同血清型 HPS 中的分布进行了检测, 结果表明, 7 个片段存在于多数的有毒力菌株(血清 4, 5, 12, 14, 15 型) 中, 而在无毒力菌株(血清 3, 11 型) 中均未检测到。利用 SSH 技术成功构建了 HPS 有毒力菌株 SW124 和无毒力菌株 H465 的差异表达基因差减文库, 筛选获得了 7 个差异基因片段, 且上述片段在 HPS 不同血清型有毒力菌株中分布广泛。

**关键词:**副猪嗜血杆菌; 抑制性差减杂交; 毒力基因

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)01-0057-06

## Putative Virulence Associated Genes of *Haemophilus parasuis* Type 4 Strains Identified by Suppression Subtractive Hybridization

LI Miao<sup>1 2</sup>, LI Chun-ling<sup>1 2</sup>, SONG Shuai<sup>1 2</sup>, YANG Dong-xia<sup>1 2</sup>

(1. Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agriculture Sciences, Guangzhou 510640, China;  
2. Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The objective of this paper is to find putative virulent genes of *Haemophilus parasuis* (HPS). Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to construct the subtracted library between virulent strain SW124 (HPS serovar 4 reference strain) and non-virulent strain H465 (HPS serovar 11 reference strain). Using Southern hybridization and PCR to screen the differentially expressed genes. Seven clones were identified containing fragments that were present in the SW124 genome while absent in the H465 genome and the DNA sequences of these fragments were determined. These DNA fragments involved putative virulence associated genes encoded 7 proteins, including transport systems periplasmic components protein, phage recombination protein, phosphoribosylformylglycinamide synthase, ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase, ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transportsystems periplasmic components protein, hypothetical protein and unknown. Based on PCR analysis of the 9 HPS serovar strains, these DNA fragments were found in most virulent serovars (4, 5, 12, 14, 15), but absent in the non-virulent serovars (3, 11). The subtracted library of HPS SW124 and H465 was successfully constructed using SSH technique and seven specific genomic fragments were obtained. In addition, most of these fragments could be detected in other serotypes HPS virulent strains with different distribution.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; Suppression subtractive hybridization (SSH); Virulence associated gene

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪 上呼吸道的一种常在菌, 因其被证明是以多发性浆

收稿日期: 2011-11-09

基金项目: 广东省农业科技重大专项 (2009A020101006); 广州市农业科技重大专项 (2009A1-E041); 广东省农科院兽医研究所所长基金

作者简介: 李 淼 (1982-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 助理研究员, 硕士, 主要从事细菌分子生物学研究。

通讯作者: 李春玲 (1965-), 女, 河南长葛人, 研究员, 博士, 主要从事兽医微生物学研究。

膜炎、关节炎、呼吸困难、高热及高死亡率为特征的格拉泽氏病 (Glasser's disease) 的病原体而广受关注。随着世界养猪业的发展,该病已成为全球范围内影响养猪业的典型细菌性疾病之一<sup>[1]</sup>。目前,尚无检测副猪嗜血杆菌毒力菌株的快速、特异的方法,其致病机制也不明确,而该菌的毒力因子和相应毒力基因的研究也处于探索阶段,这就为该病的诊断和预防带来了很大的困难。因此,寻求致病基因对于了解副猪嗜血杆菌的致病机理和有效防治该病具有重要意义。

近 10 年来,关于副猪嗜血杆菌毒力因子的研究较少,起初毒力因子的研究也只局限于常规毒力因子的范围,如荚膜、外膜蛋白、菌毛、脂多糖等,对临床诊断及治疗指导意义不大。随着基因组学研究的兴起,出现了许多从分子水平研究基因表达的方法,新技术的应用使副猪嗜血杆菌分子生物学的研究有所进展,Hill 等<sup>[2]</sup>首次利用 DDRT-PCR (Differential display RT-PCR) 鉴定了血清 5 型菌株 1185 的 7 个在 40℃ 高温热应激条件下表达上调的基因,主要是酶类,它们分别与 *fadD* (脂肪酰基辅酶 A 合成酶)、*apaH* (二腺苷四磷酸)、*pstI* (磷酸转移酶系统酶 I)、*cysK* (半胱氨酸合成酶)、*StD* ( $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  依赖性离子转运蛋白)、*HSPG* (硫酸乙酰肝素蛋白多糖) 和 *PntB* (吡啶核苷酸转氨酶) 基因同源且在 15 个血清型都有相同的表达,其与毒力因子的关系尚在研究中;德国的 Sack<sup>[3]</sup>等运用 RDA 技术鉴定了血清 5 型 (毒力株) 和血清 11 型 (无毒力株) 之间的差异基因 *hemolysin operon* (*hhdBA*) ,与溶血系统有关,但与毒力没有相关性。Zhou Mingguang<sup>[4-5]</sup>等运用二维电泳技术鉴定出 4 个具有良好免疫原性的基因 *PalA*、*Omp P2*、*D15* 和 *HPS06257*,认为是不错的疫苗候选基因,与毒力关系不详。虽然已有以上关于副猪嗜血杆菌毒力基因的研究,但均未找出与 HPS 毒力真正相关的基因,因此,找到该菌的主要致病因子是预防和治疗该病的关键所在。

在副猪嗜血杆菌中,存在强毒、中等毒力和无毒力的菌株。有毒力的菌株可以引起猪的临床症状,同时可从猪的脑部、关节及各内脏器官分离到细菌;而无毒力的菌株对猪则完全没有致病力。比较毒力菌株与弱毒力菌株或无毒力菌株之间的基因组,是鉴定毒力株仅有的可能与毒力相关的基因区域的一种有效策略。遗传关系密切的同种细菌不同菌株的基因组差异分析对研究菌株分化与变异等方面具有重要意义。抑制性差减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 是以差减杂交技术和抑制性

PCR 为基础的一种简便而高效的寻找差异表达基因的新方法<sup>[6-7]</sup>,这种方法克服了以往任何一种差减方法的技术限制,在差减杂交过程中使不同丰度 cDNA 的拷贝数差异趋于均衡,因此,不同丰度的差异表达基因都能得到有效克隆。

本研究以 HPS 有毒力菌株和无毒力菌株为试验材料,采用 SSH 方法构建二者之间的差减杂交文库,利用 Southern 杂交试验筛选差异表达基因,通过测序分析,对 HPS 不同毒力菌株间的遗传差异进行探索研究,以期发现新的毒力基因,为进一步研究副猪嗜血杆菌病的致病机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与试剂

HPS 血清 4 型 (SW124)、11 型 (H465) 标准菌株由兰州兽医研究所惠赠, HPS 血清 1 型 (H48)、3 型 (SW114)、4 型 (H25)、5 型 (HS80)、10 型 (H39)、12 型 (H31)、14 型 (H12) 和 15 型 (H35) 菌株均由本实验室保存。

杂交试剂盒 PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit 为 Clontech 公司产品; DNA 探针标记和检测试剂盒 II (DIG Random Labeling and Detection Kit II) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 细菌基因组抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; pMD19-T 载体购自宝生物 (大连) 生物公司 (TaKaRa)。

### 1.2 抑制性差减杂交文库的构建

按照细菌基因组抽提试剂盒说明书提取 HPS SW124 和 H465 菌株基因组 DNA。抑制性差减杂交试验按照试剂盒说明书进行。分别将 SW124 (tester) 及 H465 (driver) 基因组 DNA 用 *RsaI* 酶消化, SW124 DNA 被分成 2 部分,分别与不同的接头连接,并进行连接效率的分析。确定连接效率后,进行 2 轮差减杂交。在第一轮杂交中,过量酶切后的 H465 DNA 被分别加入到 2 种接头连接后的 SW124 DNA 样品中,样品经变性后开始杂交。在第二轮杂交中,将以上 2 个杂交样品直接混合,加入新变性的 H465 DNA,杂交过夜。杂交后的产物进行 2 轮 PCR 扩增,所得基因即为 SW124 株特异性基因序列。第二次扩增的 PCR 产物经试剂盒纯化后,与 pMD19-T simple vector 连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,用含氨苄青霉素 / IPTG / X-gal 的 LB 培养板筛选阳性克隆,建立差减文库。

### 1.3 差减文库多样性鉴定

为进一步检查插入片段的多样性,随机挑取多

个白色菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡 12 h 后进行菌液 PCR。反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 10 s, 68℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 30 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

#### 1.4 Southern 杂交

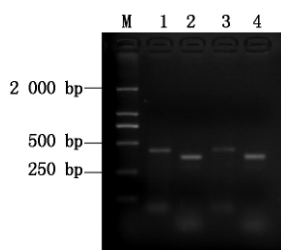
将 SW124 和 H465 菌株的基因组 DNA 用 *Rsa* I 酶切, 经纯化回收后分别作为杂交探针进行地高辛标记, 经 Southern Blot 对差减杂交的 PCR 产物进行筛选, 验证 SSH 方法的效率, 具体操作步骤按地高辛标记试剂盒说明进行。

#### 1.5 DNA 测序

将鉴定为阳性的克隆重组质粒纯化后经由上海生工生物工程有限公司测序。通过 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 中的 BLASTN 进行 DNA 同源检索。

#### 1.6 差异基因在 HPS 不同血清型菌株中的分布

根据获得的差异基因的序列设计引物, 分别以副猪嗜血杆菌部分血清型的标准菌株及部分广东地区分离代表毒株为模板, 进行 PCR 扩增; 同时以差异基因序列为探针进行地高辛标记, 采用 Southern Blot 杂交试验, 检测差异基因在不同菌株中的分布情况, 进一步锁定毒力因子的范围。



M. DL2000 Marker; 1. 以 Tester 2-1 为模板, HPS 16S rRNA Forward Primer and PCR Primer1 作为引物的 PCR 产物; 2. 以 Tester 2-1 为模板, HPS 16S rRNA Reverse Primer and Forward Primer 作为引物的 PCR 产物; 3. 以 Tester 2-2 为模板, HPS 16S rRNA Forward Primer and PCR Primer1 作为引物的 PCR 产物; 4. 以 Tester 2-2 为模板, HPS 16S rRNA Reverse Primer and Forward Primer 作为引物的 PCR 产物。

M. DL2000 Marker; 1. PCR products obtained using Tester 2-1 as template with 16S rRNA Forward Primer and PCR Primer1; 2. PCR products obtained using Tester 2-1 as template with 16S rRNA Reverse Primer and Forward Primer; 3. PCR products obtained using Tester 2-2 as template with 16S rRNA Forward Primer and PCR Primer1; 4. PCR products obtained using Tester 2-2 as template with 23S RNA Reverse Primer and Forward Primer.

图 1 接头连接效率的 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Analysis of the adaptors ligation by PCR and gel electrophoresis

## 2 结果与分析

### 2.1 SW124 菌株抑制性差减杂交结果分析

根据 HPS 16S rRNA 序列设计引物, 按照 Clon-

tech 公司差减杂交试剂盒说明书进行连接效率检测, 结果显示 2 组扩增产物浓度相当, 连接效率大于 25% (图 1)。以 SW124 作为 tester, H465 作为 driver 进行抑制性差减杂交试验, 细菌基因组 DNA 经 *Rsa* I 酶切后, 进行抑制性差减杂交, 差减后的 PCR 产物大小分布不一, 呈现多样性, 大小范围为 100 ~ 2 000 bp (图 2)。差减后的 PCR 产物经纯化后与 pMD19-T simple vector 连接, 从转化后的平板上随即挑取 100 个克隆, 用 SSH 试剂盒中的套式引物进行菌落 PCR 扩增, 经 Southern blot 分析后获得 7 个阳性克隆 (图 3)。

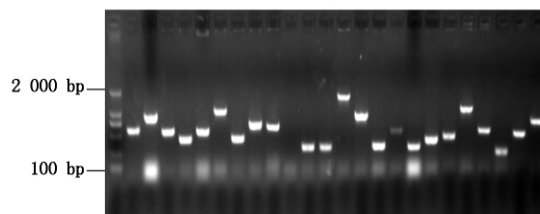
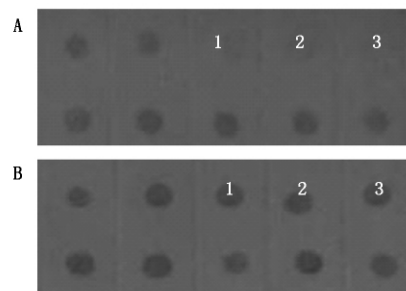


图 2 差减杂交文库中部分随机克隆的 PCR 鉴定

Fig. 2 The PCR products of some different clones picked randomly from subtracted library



A. H465 基因组 DNA 为探针的杂交; B. SW124 基因组 DNA 为探针的杂交; 1 ~ 3. SW124 特异性克隆。

A. Southern hybridization with H465 genomic DNA probe; B. Southern hybridization with SW124 genomic DNA probe; 1 ~ 3. SW124 (tester) specific clones.

图 3 部分差异片段 Southern Blot 杂交结果

Fig. 3 Comparison on hybridization signal of some plasmids probed with SW124 and H465 DNA by Southern hybridization

### 2.2 差异基因的同源性结果分析

将获得的阳性克隆进行测序, 并将结果递交 GenBank, 对差异片段进行同源性分析。其中 5 个分别与噬菌体重组蛋白、糖基转移酶/荚膜多糖磷酸转移酶、磷酸核糖甲酰甘氨酸氨酶、核糖体蛋白丙氨酸转移酶和 ABC 型硝酸盐/磺酸盐/碳酸氢盐转运系统周质蛋白等编码的基因有同源性; 2 个差异基因片段分别与功能未知蛋白或假定蛋白编码基因有关 (表 1)。

### 2.3 差异基因片段的分布

根据基因测序结果分别设计 7 段差异基因片段

的引物,利用 PCR 扩增检测上述基因在 HPS 1、3、4、5、10、11、12、14 和 15 等不同血清型菌株中的分布情况。结果显示,7 个片段存在于多数的有毒力菌

株(血清 4、5、12、14 和 15 型)中,而在无毒力菌株(血清 3 和 11 型)中均未检测到(表 2)。

表 1 HPS SW124 株基因组差异片段

Tab.1 Genes of HPS identified via SSH

SSH 片段 SSH fragment	片段大小/bp Insert size	预测功能或属性 Predicted function or property	E 值 E value	登陆号 Genbank Accession No.
A4	408	hypothetical protein	1e-128	CP001321
C2	393	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems periplasmic components protein	0	CP001321
C4	563	Unknown	0	CP001321
D1	1 020	glycosyltransferase/capsular polysaccharide phosphotransferase wcwK	0	CP001321
E1	706	phosphoribosylformylglycinamide synthase	0	CP001321
E6	663	ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase	0	CP001321
G9	504	phage recombination protein Bet	0	CP001321

表 2 差异基因片段在 HPS 不同血清型菌株中的分布

Tab.2 The presence of specific gene fragments in different serotypes HPS strains

菌株 Strains	血清型 Serotypes	SSH 获得的差异基因片段 SSH fragments						
		A4	C2	C4	D1	E1	E6	G9
H48	1	-	-	-	-	-	-	-
SW114	3	-	-	-	-	-	-	-
SW124	4	+	+	+	+	+	+	+
HS80	5	+	+	+	+	+	+	+
H39	10	-	-	-	-	-	-	-
H465	11	-	-	-	-	-	-	-
H31	12	+	+	+	+	+	+	+
H12	14	+	+	+	-	+	+	+
H35	15	+	+	-	-	+	+	+
H25	4	+	+	+	+	+	+	+

### 3 讨论

副猪嗜血杆菌曾被认为是猪呼吸道的常在菌或条件性致病菌,而近年来却在临床健康猪群中流行,而且常与多种猪的呼吸道病原微生物混合或/和继发感染,使猪的呼吸道感染病更为复杂和严重,给养猪业带来巨大的经济损失。直到 20 世纪 90 年代,人们才认识到副猪嗜血杆菌病对养猪业的危害,才花了较多的精力对其发病和防治进行研究。检测及鉴定细菌的毒力基因对于了解其致病机制具有重要价值,但一直以来对该菌的毒力因子和相应毒力基因的研究相对比较少,尽管已经报道了部分潜在的毒力基因,但其在毒力株和非毒力株之间没有差异或者与致病率没有关系,因此,推测可能有其他因子导致了其毒力差异。

抑制性差减杂交最早见诸于 1996 年 6 月的研究报告,是一种简便而高效的寻找差异表达基因的新方法<sup>[6]</sup>,它的问世为微生物基因组学研究、致病基因研究和新基因的筛选提供了新技术<sup>[8-9]</sup>。SSH

技术目前已应用于鉴定细菌<sup>[10]</sup>、毒力岛<sup>[11]</sup>,发现插入序列<sup>[12]</sup>及构建检测探针<sup>[13]</sup>等多方面研究。本研究中利用 SSH 这一技术鉴定副猪嗜血杆菌有毒力菌株 SW124(血清 4 型)和无毒力菌株 H465(血清 11 型)之间的基因差异,经同源性分析,从 HPS SW124 菌株中共获得 7 个差异基因片段。国外相关报道中,Sack 等<sup>[3]</sup>利用 SSH 方法,以 HPS 血清型 5 型标准菌株作为研究对象,筛选获得了 5 个差异基因,主要包括假定的溶血素操纵子(*hhdBA*),假定的铁转运子以及两个假定的噬菌体相关基因等;而 Zhou 等<sup>[14]</sup>选择相同的毒力菌株为研究对象,鉴定获得了完全不同的 15 种差异基因。在本研究中,采用的是血清型 4 型标准菌株为研究对象,获得的差异基因与上述 2 项研究结果也不相同,揭示 HPS 不同毒力菌株之间存在着大量的差异表达基因。

细菌的血清型已被普遍作为其毒力的标志,根据 Kieletein-Rapp-Gabrielson(KRG)血清分型标准,可将 HPS 至少分为 15 个血清型,研究证实不同血清型菌株间的毒力存在差异<sup>[15]</sup>。我们在研究中发

现,当对获得的差异基因在不同血清型的 HPS 菌株中的分布进行检测时,本实验室在广东本地分离的血清 4 型 HPS 菌株 H25 与血清 4 型标准菌株 SW124 的分布情况相同,表明分离的同一血清型的野外株与标准株的检测结果一致,进一步验证了毒力因子与血清型之间可能存在某种关系,揭示某些细胞表面抗原可能是重要的毒力因子。本研究中,鉴定得到了与细胞表面相关抗原有关的 DNA 片段 D1,其编码糖基转移酶/荚膜多糖磷酸转移酶 wcwK 蛋白,根据功能预测,该片段与革兰氏阴性细菌的荚膜相关,而荚膜是细菌的主要抗原成分且具有型特异性。有研究表明,细胞表面的糖复合物在细菌与外界环境相互作用的过程中起重要的作用,高分子量的荚膜多糖是重要的毒力因子<sup>[16]</sup>,其依赖保护细胞逃避调理吞噬和补体介导的杀伤作用而发挥作用<sup>[17-18]</sup>。

片段 C2 所编码的是 ABC 型硝酸盐/磺酸盐/碳酸氢盐转运系统周质结构蛋白,与菌体的新陈代谢有关;片段 E1 和 E6 编码蛋白的属性分别是磷酸核糖甲酰甘氨酸合酶和核糖体蛋白 N 端转移酶,均属于酶类,功能与核糖体代谢和蛋白质合成等相关。Devon 等<sup>[19]</sup>利用 DDRT-PCR 方法,模拟体内生长条件对血清 5 型菌株进行研究,对获得的差异表达基因进行观察发现水解酶及其类似物仅仅在典型性 HPS 中表达具有潜在高毒力,说明这些毒力相关酶可能在发病机理中发挥重要作用。

片段 G9 编码噬菌体重组蛋白,有研究证明,由于噬菌体能够运载或传输毒力相关基因,如毒素等,其中最著名的例子是霍乱弧菌的霍乱毒素和大肠杆菌的志贺毒素,因此,噬菌体被认为与许多有机体的毒力相关<sup>[20]</sup>。在 Sack<sup>[3]</sup>及 Zhou<sup>[14]</sup>等的研究中,也分别筛选得到了编码噬菌体蛋白的差异片段,但其功能还有待于进一步研究。本研究中还发现了一个功能未知的蛋白,但目前仅完成了 HPS SH0615(血清 5 型)一个菌株的全基因组测序工作,需借助其他方法获得蛋白的完整序列,从而开展其功能研究。

笔者根据 7 段差异基因序列设计引物,利用 PCR 扩增检测其在 HPS 不同血清型菌株中的分布情况,其中在血清 4 型、5 型和 12 型 3 个临床分离菌株中检测到全部 7 个片段,血清 14 型和 15 型分离菌株中分别检测到 6 个(不包括 D1)和 5 个(不包括 C4 和 D1)片段,其他无毒力菌株中均未检测到相应的差异基因。检测的结果表明,本研究筛选得到的差异基因片段在 HPS 有毒力菌株中的分布较为广泛。但同时也发现,7 个差异片段在 HPS 血

清 1 型和 10 型这 2 种有毒力菌株中均未检测到。先前的一些研究表明,鉴定得到的潜在毒力因子在所有 HPS 无毒力血清型菌株中均不存在,但也并非普遍存在于所有有毒力的血清型菌株中<sup>[3,14]</sup>。我们的研究也证实了上述情况,表明筛选得到的潜在毒力因子的存在能够在很大程度上帮助我们了解 HPS 毒力菌株的特征,但某些有毒力血清型菌株的特征还有待于进一步的研究(特别是血清 1 型和 10 型),这就需要进行更加深入的研究,获得更详实的数据结果,才能够更确切地了解 HPS 的毒力情况及其致病机理。

本研究以副猪嗜血杆菌有毒力菌株 SW124 和无毒力菌株 H465 为研究对象,成功构建了 HPS 差减杂交文库,对文库中的克隆进行特异性鉴定及功能分析,获得 7 个差异基因序列,其中 5 个片段分别编码不同功能蛋白,其余 2 个差异基因片段与功能未知蛋白或假定蛋白编码基因有关。经检测,上述差异基因在 HPS 不同血清型的有毒力菌株中分布比较广泛。这一发现有助于区分 HPS 菌株的毒力类型,将为 HPS 不同毒力菌株的 PCR 检测方法的建立及检测猪群中所携带的毒力株等奠定良好基础,同时可借助基因步移等技术来发现完整的毒力基因,以便开展 HPS 致病机制研究。

#### 参考文献:

- [1] 蔡旭旺. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及诊断方法与灭活疫苗的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [2] Hill C E, Metcalf D S, MacInnes J I. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR[J]. *Veterinary Microbiology* 2003, 96(2): 189-202.
- [3] Sack M, Baltes N. Identification of novel potential virulence associated factors in *Haemophilus parasuis*[J]. *Veterinary Microbiology* 2009, 136(3-4): 382-386.
- [4] Zhou M, Guo Y, Zhao J *et al.* Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane protein of *Haemophilus parasuis* serovar 5[J]. *Vaccine*, 2009, 27(38): 5271-5277.
- [5] Zhou M, Zhang A, Guo Y *et al.* A comprehensive proteome map of the *Haemophilus parasuis* serovar 5[J]. *Proteomics* 2009, 9(10): 2722-2739.
- [6] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996, 93: 6025-6030.
- [7] Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A *et al.* Equali-

- zing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240 (1): 90–97.
- [8] 李会勇, 黄素华, 赵久然, 等. 应用抑制差减杂交法分离玉米幼苗期叶片土壤干旱诱导的基因 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 882–888.
- [9] 李 星, 于秀梅, 李亚宁, 等. 叶锈菌诱导的小麦叶片抑制差减杂交文库构建及其分析 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4069–4076.
- [10] Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready P M *et al.* Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3759–37621.
- [11] Janke B, Dobrindt U, Hacker J *et al.* A subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG16551 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 199(1): 61–661.
- [12] Sawada K, Kokeguchi S, Hongyo H *et al.* Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(11): 5621–56251.
- [13] Parsons Y N, Panagea S, Smart C H *et al.* Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(12): 4607–46111.
- [14] Zhou H, Yang B, Xu F *et al.* Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 26, 144(3–4): 377–383.
- [15] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(4): 862–865.
- [16] Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 39–68.
- [17] Neidhardt F C, Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology [M]. 2nd Ed. Washington D C: American Society for Microbiology Press, 1996: 104–122.
- [18] Sussman M. *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 113–143.
- [19] Metcalf D S, MacInnes J I. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2007, 71(3): 181–188.
- [20] Waldor M K, Friedman D I. Phage regulatory circuits and virulence gene expression [J]. *Current Opinion of Microbiology*, 2005, 8(4): 459–465.