

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Clonación, secuenciación y expresión del gen prn de pertactina de Bordetella bronchiseptica de origen canino

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Clonación, secuenciación y expresión del gen prn de pertactina de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino

Cloning, sequencing and expression of the prn pertactin gene of canine origin *Bordetella bronchiseptica*

Francisco Javier Basurto-Alcántara* Rigoberto Hernández-Castro* Antonio Verdugo-Rodríguez*
María Eugenia Rosales** Juan Antonio Montaraz Crespo**

Abstract

Pertactin (Prn) is an outer membrane protein of *Bordetella bronchiseptica*, it has adhesive properties and the auto-transporter properties of the type V secretion system. This protein has two variable regions in the primary structure, which induces protective immunity in pigs and mice. In this study, the prn gene of *B. bronchiseptica* (P98 wild type) of canine origin was cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. Prn was detected by immunoblot using antibodies against *Bordetella*. The RGD domain was identified due to the sequence of aminoacids, which is the epithelial cell adherence domain between 261 and 263 aminoacids and two repeat regions between gly 264 and pro 278 that correspond to the region I and pro 568 to pro 587 for the region II.

Key words: *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*, PERTACTIN, PCR CLONING, RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION.

Resumen

La pertactina (Prn) es una proteína de la membrana externa de *Bordetella bronchiseptica* con propiedades de adhesina y de autotransportador del sistema de secreción tipo V, que posee dos regiones variables en la estructura primaria de la proteína y que induce inmunidad protectora en cerdos y ratones. En este trabajo, el gen *prn* fue clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* a partir de un aislamiento de campo, cepa P98 de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. La detección de Prn fue realizada con el empleo de los anticuerpos contra *Bordetella*, mediante Inmunoblot. Con el análisis de la secuencia de aminoácidos se identificó el dominio RGD de adherencia a células epiteliales en los aminoácidos 261 al 263 y las dos regiones de repeticiones variables ubicadas entre el aminoácido Gly 264 a la Pro 278 que corresponde a la región I y de la Pro 568 a la Pro 587 para la región II.

Palabras clave: *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*, PERTACTINA, PCR CLONACIÓN, EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.



Recibido el 16 de agosto de 2004 y aceptado el 11 de marzo de 2005.

*Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Laboratorio de Inmunología, Unidad de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1 de mayo s/n, 54700, Cuatitlán-Izcalli, Estado de México, México, Correo electrónico: basurto@fmvz.unam.mx

Introduction

Bordetella bronchiseptica is the causal agent of diverse respiratory problems in different animal species.¹ *B. bronchiseptica* is a mobile, aerobic, gram-negative, short bacillus. As a primary agent of disease, it causes atrophic rhinitis in the pig, kennel cough or tracheobronchitis of dog, bronchopneumonia in dogs, pneumonia in rabbits, and nasal discharge with cough and sneezes in cats.¹⁻³ Humans may become infected after having contact with diseased or infected animals.⁴⁻⁶ *B. bronchiseptica* has several virulence factors that affect the respiratory tract. Amongst these are: dermonecrotxin (DNT), tracheal cytotoxin (TC), pertactin (Prn), filamentous hemagglutinin (Fha) and cyclase adenylate-hemolysin toxin (Cya).^{1,7-9}

The expression of some of the virulent factors are regulated by the *bvgAS+* genes that promote the synthesis of BvgS (trans-membrane sensor protein) and BvgA proteins (transcriptional activation protein) and these, once phosphorylated, promote the synthesis of Prn, Cya and Fha of the bacteria. Also, *Bordetella* may pass from the *bvgAS+* phase to *bvgAS-* by means of an *in vitro* culture at 25°C or with the addition of magnesium sulfate or nicotinic acid to the culture medium.¹⁰⁻¹⁵

Prn is an external membrane protein that is synthesized as a precursor of 93 kDa^{16,17-19} while the active protein is 68 kDa in *B. bronchiseptica*, 69 kDa in *B. pertussis* and 70kDa in *B. Parapertussis*.^{19,20} Prn has an Arg-Gly-Asp dominion (RGD),¹⁹ that participates in the adhesion to epithelial cells and their invasion by *Bordetella*.¹⁹ It also induces the production of protector antibodies against the infection by *Bordetella*.²¹⁻²⁴

The objective of this work was to clone the gene that codifies Prn in *B. bronchiseptica* of canine origin, that was obtained from a field isolation (Mexican strain P98),² obtain their sequence to compare it with what has been described by other authors and express it in *Escherichia coli*.

Material and methods

Strains and vectors

The strains and vectors that were used for this work are listed in Table 1. *Bordetella bronchiseptica* P98 wild-type strain, was identified through biochemistry tests for *Bordetella*.^{2,25} and in order to determine the presence of pertactin a Western blot assay was carried out with the use of BB05 and BB07 monoclonal antibodies prepared by Montaraz *et al.*^{2,21} *Bordetella bronchiseptica* was cultured in brain-heart infusion broth* (BHI) at 37°C in a shaker orbit** at 200 rpm during 18 hours.

Introducción

Bordetella bronchiseptica es el agente causal de diversos problemas respiratorios en diferentes especies animales.¹ *B. bronchiseptica* es un bacilo corto, gramnegativo, aerobio y móvil. Como agente primario de enfermedad, ocasiona rinitis atrófica del cerdo, tos de las perreras o traqueobronquitis del perro, bronconeumonía en perros, neumonía en conejos, descarga nasal con tos y estornudos en gatos.¹⁻³ La infección en humanos puede ocurrir después del contacto con animales enfermos o infectados.⁴⁻⁶ *B. bronchiseptica* tiene diversos factores de virulencia con los que afecta al tracto respiratorio. Entre éstos están: dermonecrotina (DNT), citotoxina traqueal (CT), pertactina (Prn), hemagglutinina filamentosa (Fha) y la toxina hemolisina adenilato ciclase (Cya).^{1,7-9}

La expresión de algunos de los factores de virulencia son regulados por los genes *bvgAS+* que promueven la síntesis de las proteínas BvgS (proteína sensor transmembranal) y BvgA (proteína de activación transcripcional) y éstos, una vez fosforilados, promueven la síntesis de Prn, Cya y Fha de la bacteria. Asimismo, *Bordetella* puede pasar de la fase *bvgAS+* a *bvgAS-* mediante el cultivo *in vitro* a 25°C o con la adición de sulfato de magnesio o ácido nicotínico al medio de cultivo.¹⁰⁻¹⁵

Prn es una proteína de la membrana externa, es sintetizada como precursor de 93 kDa^{16,17-19} mientras que la proteína activa es de 68 kDa en *B. bronchiseptica*, 69 kDa en *B. pertussis* y de 70kDa en *B. Parapertussis*.^{19,20} Prn tiene un dominio de Arg-Gly-Asp (RGD),¹⁹ que participa en la adhesión e invasión de *Bordetella* a células epiteliales.¹⁹ También induce producción de anticuerpos protectores contra infección por *Bordetella*.²¹⁻²⁴

El objetivo de este trabajo fue clonar el gen que codifica para la Prn de *B. bronchiseptica* de origen canino, que fue obtenida a partir de un aislamiento de campo (cepa mexicana P98),² obtener su secuencia para compararla con las descritas por otros autores y expresarla en *Escherichia coli*.

Material y métodos

Cepas y vectores

Las cepas y vectores utilizados en este trabajo se enlistan en el Cuadro 1. *Bordetella bronchiseptica* P98 cepa tipo silvestre, se identificó mediante pruebas bioquímicas para *Bordetella*.^{2,25} y para determinar la presencia de la pertactina se utilizó un ensayo de Western blot con el empleo de los anticuerpos monoclonales BB05 y BB07 elaborados por Montaraz *et al.*^{2,21} *Bordetella bronchiseptica* fue crecida en caldo infusión cerebro-

The different strains of *E. coli* were cultured in Luria-Bertani (LB) agar and broth (bactotripton,*** 10 g; yeast extract,† 5 g; NaCl,‡ 5 g; 1 mL of NaOH° 1N; agar-agar,°° 10 g; bi-distilled water cbp, 1 000 mL).

The pCR2.1 vector of the *Topo-TA Cloning Kit*°°° system with resistance to kanamycine and ampicillin was used for cloning and sequencing the prn gene obtained from the product of the polymerase chain reaction (PCR). The pET28a^ vector was used in the sub-cloning of the prn gene in order to induce protein synthesis.

The strains transformed with the plasmids were cultured in agar or LB broth with kanamycine^^ (Km), 50 µg/mL.

Extraction of genomic and plasmid DNA

DNA of the P98 strain of the canine origin *Bordetella bronchiseptica* (Prn+) from field isolation was used² The extraction and purification of the genomic DNA was done through the guanidine thiocyanate method described by Pitcher *et al.*²⁶ The plasmids were purified through the alkaline lysis method.²⁷

Polymerase chain reaction (PCR)

The prn gene was cloned from a PCR-amplified product. The primers used were designed on the basis of the sequence described by Li *et al.*²⁸ 5'-3' GATGATGCGTCGCTGTAACA and 3'-5' ACCGGTACAGCTGGTAAAG and thus amplify the product with an approximate size of 2 880 base pairs.

The PCR solution was adjusted to a final volume of 50 µL, of which 1 µL with 50-250 ng of genomic DNA of *B. bronchiseptica*, 5 µL buffer 10X [50 mM tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, stabilizers and 50% (v/v) glycerol], 2.5 µM of MgCl, 200 µM of dNTP mix, 25 pM of primers, Enhancer* solution with a final reaction concentration of 3X (15 µL) and Taq Pfx¹ (2.5 U). The cycles were: an initial denaturing at 94 °C during four minutes and then 33 cycles at 94 °C, 0:45 min; 52°C, 0:45 min; 72°C, 2:45 min, and a final extension at 72°C during eight minutes.

Prn gene cloning

The PCR amplified product was directly cloned into the pCR2.1 plasmid of the *Topo-TA Cloning*** kit following the methods recommended by the manufacturer, the resulting plasmid was identified as pBH7. White-colored colonies cultured in LB agar plates with 1 mM of Isopropyl-Beta-d-Thiogalactopyranoside*** (IPTG) and 40 µg of X-Gal were selected.† The evaluation of the plasmids was performed through a restric-

corazón* (BHI) a 37°C en agitador orbital** a 200 rpm durante 18 horas.

Las diferentes cepas de *E. coli* fueron cultivadas en agar y caldo Luria-Bertani (LB) (bactotripton,*** 10 g; extracto de levadura,† 5 g; NaCl,‡ 5 g; 1 mL de NaOH° 1N; agar-agar,°° 10 g; agua bidestilada cbp, 1 000 mL).

El vector pCR2.1 del sistema *Topo TA Cloning Kit*°°° con resistencia a kanamicina y ampicilina se utilizó para clonar y secuenciar el gen prn obtenido a partir del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El vector pET28a^ se utilizó en la subclonación del gen prn para inducir la síntesis de proteínas.

Las cepas transformadas con los plásmidos fueron cultivadas en agar o caldo LB con kanamicina^^ (Km), 50 µg/mL.

Extracción de ADN genómico y de plásmidos

Se utilizó ADN de la cepa P98 de *Bordetella bronchiseptica* (Prn+) de origen canino a partir de un aislamiento de campo.² La extracción y purificación de ADN genómico se realizó mediante el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher *et al.*²⁶ Los plásmidos fueron purificados mediante el método de lisis alcalina.²⁷

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen prn se clonó a partir de un producto amplificado por la PCR. Los iniciadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia descrita por Li *et al.*²⁸ 5'-3' GATGATGCGTCGCTGTAACA y 3'-5' ACCGGTACAGCTGGTAAAG y así amplificar un producto de un tamaño aproximado de 2 880 pares de bases.

La solución de PCR se ajustó a un volumen final de 50 µL, de los cuales fueron 1 µL con 50-250 ng de ADN genómico de *B. bronchiseptica*, 5 µL de amortiguador 10X [50 mM tris-HCl (pH 8.0)], 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, estabilizadores, y 50% (v/v) glycerol], 2.5 µM de MgCl, 200 µM de mezcla de dNTP's,

*Difco.

**Incubator-Shaker Orbit, lab-line Instruments. Melrose park, Illinois.

***Difco.

†Bioxon®.

‡J. T. Baker®.

°J. T. Baker®.

°°Merk®.

°°°Invitrogen.

^Novagen®.

^^Sigma.

tion assay with enzymes *EcoRI*† and *ClaI*.°

Sub-cloning of *prn* gene

The pBH7 plasmid insert was obtained through digestion with the restriction enzyme *EcoRI*.°° The insert was purified from an agarose gel with the QIAquick gel extraction kit,°°° DNA purification system according to the technique established by the manufacturer. The pET28a plasmid was used for subcloning, which was previously digested with the restriction enzyme *EcoRI*.^ The ligation reaction was performed with the buffer solutions of the *LigaFast*,^^ 3 U ligase T4^^^ system and a proportion of 3:1 (vector: insert), the resulting plasmid was identified as pBH7E9 (Table 1). The DH5a *E. coli* competent cells were transformed at 42°C during two minutes, were incubated one hour in SOC~ broth and then were inoculated and incubated at 37°C during 18 hours in LB agar plates with kanamycin 50 g/mL. Scrutiny of the colonies was made by purification of plasmids by alkaline lysis followed by a restriction analysis with *ClaI*~ and *EcoRV*~~~ enzymes to define the read direction of the cloned insert.

Sequencing

The pBH7 plasmid was purified with Concert High Purity* ionic exchange columns according to methods recommended by the manufacturer. In order to obtain the sequence of both plasmid pBH7 chains, an automatic sequencer** was used with the BigDye Terminator cycle system*** in the sequencing laboratory of the Cellular Physiology Institute, of the National Autonomous University of Mexico.

The sequencing primers were designed with the NT1 Vector software† and are shown in Table 2. In the first sequencing run we used the forward and reverse primers for the M13 promoter found in the pCR2.1 vector. The next primers were designed as the partial sequences were obtained (Table 2).

Protein expression in *E. coli*

Rosetta *E. coli* bacteria‡ were selected to translate Arg and Pro contained in the *prn* gene. They were transformed with the pBH7E9 plasmid and incubated in LB broth plates with Km 50 µg/mL. From five to ten colonies were plated in 10 ml of LB broth with Km 50 µg/mL and were incubated during 16 h. They were inoculated at a 1:50 proportion in 100 ml of LB broth with 50 µg/mL and were incubated with shaking (200 rpm) at ambient temperature until they reached an OD of 0.5 to 0.6 at 600 nm wavelength;* at this point the culture was divided into two 50-mL

25 pM de iniciadores, solución Enhancer* con una concentración final de reacción de 3X (15 µL) y Taq Pfx¹ (2.5 U). Los ciclos fueron: uno de desnaturalización inicial a 94°C durante cuatro minutos y posteriormente 33 ciclos con 94°C, 0:45 minutos, 52°C, 0:45 minutos, 72°C, 2:45 minutos, y una extensión final a 72°C durante ocho minutos.

Clonación del gen *prn*

El producto amplificado mediante la PCR fue clonado directamente en el plásmido pCR2.1 del kit TopoCloning TA** de acuerdo con la metodología que recomienda el fabricante, el plásmido resultante se identificó como pBH7. Se seleccionaron las colonias de color blanco cultivadas en placas de agar LB con 1 mM de isopropil-β-D-Thiogalactopiranosido*** (IPTG) y 40 µg de X-Gal.† La evaluación de los plásmidos se realizó mediante un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI*‡ y *ClaI*.°

Subclonación del gen *prn*

Se obtuvo el inserto del plásmido pBH7 mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.°° El inserto se purificó a partir de un gel de agarosa con el sistema de purificación de ADN QIAquick gel extraction kit,°°° según la técnica establecida por el fabricante. Para la subclonación se utilizó el plásmido pET28a, que se digirió previamente con la enzima de restricción *EcoRI*.^ La reacción de ligazón se realizó con las soluciones amortiguadoras del sistema *LigaFast*,^^ 3 U de ligasa T4^^^ y una proporción de 3:1 (vector: inserto), el plásmido resultante se identificó como pBH7E9 (Cuadro 1). Las células *E. coli* DH5a competentes fueron transformadas a 42°C durante dos minutos, se incubaron una hora en caldo SOC~ y se sembraron e incubaron a 37°C durante 18 horas en placas de agar LB con kanamicina 50 µg/mL. Se realizó el escrutinio de las colonias mediante la purificación de los plásmidos por lisis alcalina y un posterior análisis de restricción con las enzimas *ClaI*~ y *EcoRV*~~~ para definir la dirección de lectura del inserto clonado.

*Invitrogen.

**Invitrogen.

***Amersham Life Science.

†Invitrogen.

‡Invitrogen.

°Invitrogen.

°°Invitrogen.

°°°Quiagen.

^Invitrogen.

^^Promega.

^^^Quiagen.

~Invitrogen.

~Invitrogen.

~~~Invitrogen.

**Cuadro 1**  
**CEPAS Y VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**  
**STRAINS AND VECTORS USED IN THIS WORK**

| <i>Strain or vector</i>              | <i>Characteristic</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <i>Reference</i> |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> P98 | Strain wild type, obtained from an isolation of ground canine origin<br><i>Prn</i> <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | (24)             |
| <i>Escherichia coli</i> TOP10F'      | F' { <i>lacIq</i> Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> .( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> )<br>80 <i>lacZ</i> .M15. <i>lac</i> x 74 <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD</i> 139.( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i><br><i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i><br>These strains over-express the represor <i>Lac</i> .<br>Scrutiny of white/blue colonies can be made by the addition of IPTG and X-Gal to the plaques of agar LB. | Invitrogen®      |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α         | F- 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacZ</i> YA- <i>argF</i> U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsd</i><br>R17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA1</i> <i>tonA</i> (confer resistance to fago T1)                                                                                                                                                                           | Invitrogen®      |
| <i>Escherichia coli</i> Rosetta      | <i>E. coli</i> derived from the strain Turner. Synthesize tRNA's for weird codones (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Resistant to chloramphenicol.                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Novagen®         |
| pCR2.1                               | Open plasmid with cohesive extremes with a Timidin.<br>Possess the enzyme Topoisomerasa I covalently joined to vector (Activated Vector ). Has the promoters T7 and <i>LacZ</i> . Confers resistance to kanamicin and ampicilin                                                                                                                                                                                                              | Invitrogen®      |
| pET28a                               | Plasmid for expression of proteins. Possess a promoter T7 with ending. Confers resistance to kanamicin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Novagen®         |
| pBH7                                 | Plasmid derivative from the pCR2.1 with the gene <i>prn</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | This research    |
| pBH7E                                | Plasmid derivative from pET28a with insert of gene <i>prn</i> . The insert stays between the promoter T7 and the ending T7. Codifies for a polihistidine tails. Confers resistance to kanamicin                                                                                                                                                                                                                                              | This research    |

parts. One of these had 10 mM/mL IPTG added as a protein synthesis inducer, while the other was maintained without protein synthesis inducer as a control; both were incubated four more hours at ambient temperature with shaking (200 rpm). Bacteria were centrifuged and re-suspended in a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7.2) buffer solution. Bacteria were lysed by sonication\*\* until clarification with 43% amplitude and nine-second pulses with nine seconds pause in an ice bath. The sonicated bacteria were centrifuged at 10 000 g in a microfuge.\*\*\* The supernatant was recovered and protein concentration was quantified by the Bradford<sup>29</sup> method. Fifty µg were placed in a 12.5% polyacrylamide gel† for electrophoretic analysis; the pellet was suspended in a urea‡ buffer solution 8M, Tris 20 mM, NaCl 0.3 M pH 8 adjusted with HCl° and 5 µL were placed in a 12.5% polyacrylamide gel for electrophoresis analysis.

### Protein extraction for immunoblot analysis

For protein extraction from *B. bronchiseptica* and *E. coli* pBH7 and pBH7E9 plasmid transformed, the method described by Montaraz *et al.*<sup>21</sup> of cold acetone precipitation was used; furthermore, the external membrane protein purification method described by Matsuyama *et al.*<sup>30</sup> was applied. The recombinant Prn and that of *B. bronchiseptica* were detected through immunoblot in nitrocellulose with polyclonal antibodies against *B. bronchiseptica* and *B. pertussis*. A 45 miniblitter was used.\*

### Sequence analysis

## Secuenciación

Se purificó el plásmido pBH7 en columnas de intercambio iónico Concert High Purity,\* con la metodología que recomienda el fabricante. Para obtener la secuencia de ambas cadenas del plásmido pBH7 se realizó en un secuenciador automático\*\* con el sistema de secuenciación BigDye Terminator cycle sequencing\*\*\* en el laboratorio de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los iniciadores para secuenciación se diseñaron con el software Vector NT1,† se muestran en el Cuadro 2. En el primer ensayo de secuenciación se utilizaron los iniciadores del promotor M13 adelantado y reverso que se encuentran en el vector pCR2.1. Los siguientes iniciadores se diseñaron conforme se fueron obteniendo las secuencias parciales (Cuadro 2).

### Expresión de proteínas en *E. coli*

Las bacterias *E. coli* Rosetta‡ se seleccionaron para traducir las Arg y Pro que contiene el gen prn. Fueron transformadas con el plásmido pBH7E9 y se incubaron en placas de agar LB con Km 50 µg/mL. Se resembraron cinco a diez colonias en 10 mL de caldo LB con Km 50 µg/mL y se incubaron durante 16 h. Se

\*Gibco®.

\*\*Applied Biosystem, modelo 3100.

\*\*\*Applied Biosystem, modelo 3100.

†Informax, Inc.

‡Novagen.

**Cuadro 2**  
INICIADORES EMPLEADOS EN LA SECUENCIACIÓN DEL INSERTO CLONADO EN EL PCR2.1  
PRIMERS USED IN THE SEQUENCE OF THE INSERT

| Forward 5'-3'                         | Reverse 5'-3'                            |
|---------------------------------------|------------------------------------------|
| 1. GTAAAACGACGGCCAG (M13)(-106 A 298) | 1. CAGGAAACAGCTATGAC (M13) (-103 A 432)  |
| 2. TACGCCGACTGGAACAACCA (238 A 956)   | 2. ACCTCCAGGCCAGGCGACC (272 A 908)       |
| 3. GGGCCAATGAGCTTACGGTT (812 A 1449)  | 3. GCTTGGACAACGCATTGCT (839 A 1483)      |
| 4. ACAACGCCACCTGGGTCAT (1424 A 2188)  | 4. ATGACCCAGGTGGCGTTGT (1451 A 2230)     |
| 5. AGTTGCGCCTGAATCCGGAC (2064 A 2902) | 5. TTGGCCCCGAATACAGACACCGC (2073 A 3283) |

Primers used in the sequence of the insert. The progressive number to the left identifies the phase of sequence, M13 belongs to primer that aligns with vector pCR2.1 in the site of multiple clonation. The values in parenthesis indicate the number of bases detected in the sequence process.

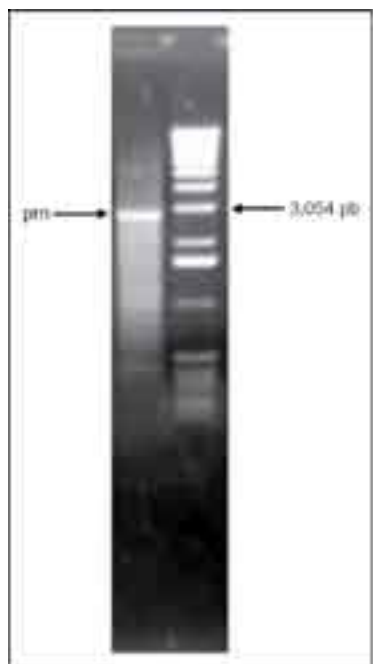
The nucleotide and amino acid sequence analysis, as well as the plasmid maps constructed in this work, were carried out with the Vector NT1 software.

## Results

The PCR product had an approximate size of 2 900 bp (Figure 1). Due to the presence of unspecific banding, it was decided that the band would be purified directly from the agarose gel and then cloned into the pCR2.1 vector.

The pCR2.1 vector that had the pertactin gene insert was designated pBH7 (Figure 2). The read direction remained in the same direction of the T7 promoter and in inverse direction to the LacZ promoter.

Sub-cloning of the pET28a vector with the pertactin gene was designated pBH7E9. The *prn* gene was located between the T7 promoter and the T7 terminal (Figure 3); the plasmid contains a kanamycin-resistance gene.



**Figura 1.** Fotografía del gel de agarosa, donde se muestra en el carril 1 el producto de PCR correspondiente a la secuencia nucleotídica de la pertactina de *Bordetella bronchiseptica* con un tamaño aproximado de 2 900 pb, en el carril 2 se colocó el marcador 1 Kb para determinar el tamaño aproximado del producto de PCR.

**Figure 1.** Photography of the gel of agarose. To the left, it shows the product of the PCR belonging to the pertactin of *Bordetella bronchiseptica* with an approximate of the 2 900 pb; to the right, the marker 1 Kb was used to determine the approximate size of the product of PCR.

resembraron en una proporción de 1:50 en 100 mL de caldo LB con Km 50 µg/mL y se incubaron con agitación (200 rpm) a temperatura ambiente hasta que alcanzaron una D.O. 0.5-0.6 a 600 nm de longitud de onda;\* en ese momento el cultivo se dividió en dos partes de 50 mL cada una; a una parte se le agregaron 10 mM/mL de IPTG como inductor de la síntesis de proteínas, mientras que la otra se mantuvo sin inductor a manera de testigo y se incubaron durante cuatro horas más a temperatura ambiente con agitación (200 rpm). Las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7.2). Las bacterias fueron lisadas por sonicación\*\* hasta clarificar, con una amplitud de 43% y pulsos de nueve segundos con nueve segundos de reposo en baño de hielo. Las bacterias sonicadas se centrifugaron a 10 000 g en una microfuga.\*\*\* Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.<sup>29</sup> Se colocaron 50 µg en un gel de poliácridamida† al 12.5% para su análisis por electroforesis; el pellet se resuspendió en solución amortiguadora de urea‡ 8M, tris 20 mM, NaCl 0.3 M pH8 ajustado con HCl° y se colo-

\*µ Speed Fuge Savant.

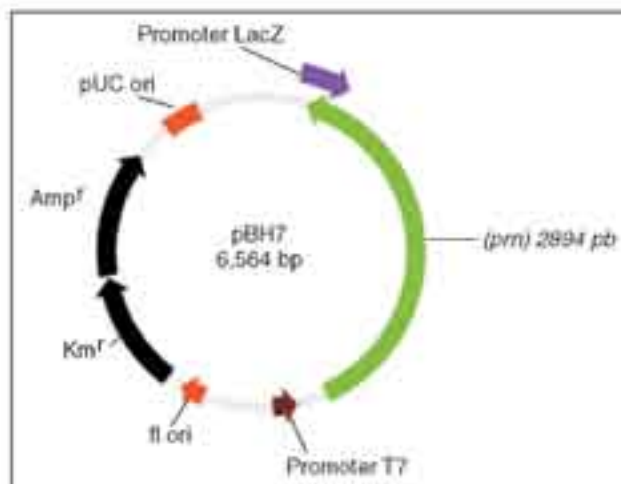
\*\*Informax, Inc.

\*\*\*µ Speed Fuge Savant.

†BioRad.

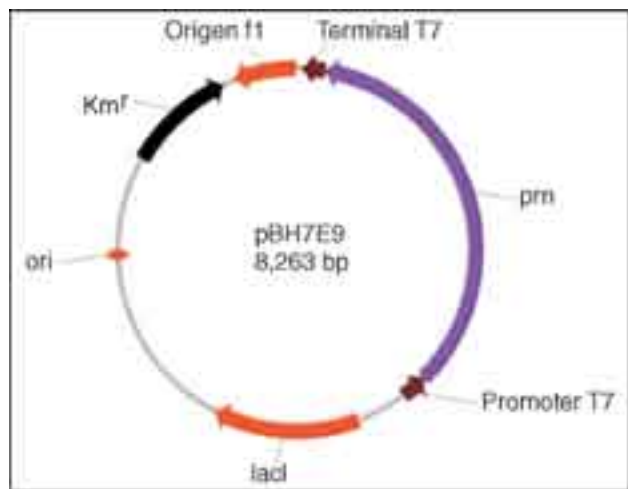
‡Merk.

°JT Baker.



**Figura 2.** Mapa del pBH7. Se utilizó el plásmido pCR2.1 de Invitrogen. El inserto con el gen *prn* se localiza entre los promotores T7 y LacZ. El plásmido contiene los genes de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>) y kanamicina (Km<sup>r</sup>).

**Figure 2.** Map of the pBH7. The plasmid pCR2.1 of Invitrogen was used. The insert with the gene *prn* stayed between the promoters T7 and LacZ. The plasmid contains the genes of resistance to Ampicillin (Amp<sup>r</sup>) and Kanamicin (Km<sup>r</sup>).



**Figura 3.** Mapa del pBH7E9. El inserto se localiza entre el promotor T7 y el terminador T7. El plásmido codifica para una cola de polihistidinas para la recuperación de la proteína recombinante.

**Figure 3.** Map of the pBH7E9. The insert stayed between the promoter T7 and the terminal T7. The plasmid codifies for polihistidine tails for the recuperation of the recombinant protein.

The sequence obtained from the PCR product cloned into the pCR2.1 vector was registered in GenBank with the accession number AY376325.

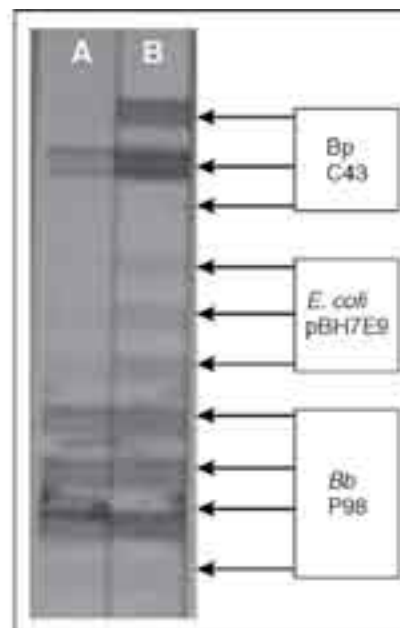
The extracted proteins were analyzed by using immunoblot with polyclonal antibodies against *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* (Figure 4).

The sequence of the prn gene from *Bordetella bronchiseptica* P98 in pBH7 was compared with the sequences of the same gene in *Bordetella bronchiseptica* RB50 strain, B14 strain and CN7531 strain. It was observed an 89.7% identity at the nucleotide level.

The alignment from Table 3 corresponds to the amino acid sequences of the Prn from *B. bronchiseptica* P98 compared to those of the RB50, B14 and CN7531 strains. The amino acid sequence was deduced starting from the ATG described as initiation codon. It showed a 96.6% identity at the amino acid level. Through sequence analysis the RGD dominion, for adhesion to epithelial cells, was located in amino acid 258. Region 1 initiates in the amino acid Gly 264 and region 2 from Pro 568 of the Prn of *B. bronchiseptica* P98 cloned into pBH7.

## Discussion

In this work it is reported the cloning, sequencing and expression of the pertactin gene in canine origin *Bordetella bronchiseptica* P98. The prn gene was obtained from a PCR product, which was cloned into the pCR2.1 plasmid and was identified as pBH7. The



**Figura 4.** Inmunoblot para la detección de proteínas de *B. bronchiseptica* y Prn recombinante con la utilización de anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. La fotografía muestra la reacción de inmunoblot con anticuerpos policlonales contra *Bordetella bronchiseptica* en la tira A de nitrocelulosa y contra *Bordetella pertussis* en la tira B de nitrocelulosa. De manera descendente, los tres primeros carriles corresponden a extractos de proteínas de *Bordetella pertussis* cepa C43. Los tres siguientes al extracto obtenido a partir de *E. coli* con el pBH7E9 y los cuatro últimos al extracto de *Bordetella bronchiseptica*. Las diferentes intensidades de las bandas se deben a diluciones de las muestras.

**Figure 4.** Immune blot with polyclonal antibodies versus *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. The photography shows the reaction of Immune blot with polyclonal antibodies against *Bordetella bronchiseptica* in the A strip of nitrocellulose and against *Bordetella pertussis* in the B strip of nitrocellulose. In a descending way, the first three tracks belong to protein extracts of *Bordetella pertussis* strain C43. The following three belong to the obtained extract through the *E. coli* with the pBH7E9 and the last 4 to the extract of *Bordetella bronchiseptica*. The different intensities of the bands are due to the dilutions of the samples.

caron 5 µl en un gel de poliacrilamida al 12.5% para su análisis por electroforésis.

## Extracción de proteínas para análisis por inmunoblot

Para la extracción de proteínas de *B. bronchiseptica* y de la *E. coli* transformada con los plásmidos pBH7 y pBH7E9 se utilizó el método descrito por Montaraz *et al.*<sup>21</sup> de precipitación con acetona fría; asimismo,

product cloned contained 2880 bp which includes the ATG as initiation codon in site 148 and the TAA stop codon in nucleotide 2875. Sub-cloning of the prn gene was carried out in the pET28a plasmid and was identified as pBH7E9.

Amino acid sequence variation of the Prn, derived from pBH7, did not affect the antigenic properties of the molecule, which was checked with the immunoblot test with polyclonal antibodies, thus coinciding with the data presented by Register,<sup>19</sup> who even showed variations in regions I and II without any changes in the antigenic properties of the pertactin.

Through the sequence analysis of Prn from *B. bronchiseptica* it was observed that strain RB50 shows in region 1 an extra GGXXP sequence at site 277 in relation to the sequence derived from pBH7, as well as in the other sequences that were compared. This coincides with previous work and pertactin sequences registered in GenBank.<sup>19</sup>

When region 2 of the amino acid sequence of pBH7 was compared, a 100% homology was observed in relation to the sequences described by King *et al.*<sup>20</sup> and Li *et al.*<sup>28</sup>, and a 95% similarity with strain RB50 due to the absence of a Pro in site 595 of the last PQP repetition.

Changes were observed in two amino acids of the pertactin sequence from *Bordetella bronchiseptica* P98. One was detected with the presence of a Thr instead of Ala in site 148, which indicates that pertactin from *Bordetella bronchiseptica* P98 possesses a neutral polar site instead of the hydrophobic one shown in the other sequences. The second was a His in place of Arg at site 859, both amino acids are part of the same basic amino acid group; nevertheless, this change is inconsequential since mature Prn is cut at amino acid 633.

The Prn derived from pBH7 presented other changes in the amino acid sequence; nevertheless, these changes were only observed in one or two of the three sequences compared.

These amino acid variations do not affect the immunogenic characteristics of the molecule since the two variable regions are conserved, as well as the RGD dominion in site 261, which is the cell adhesion receptor.<sup>20</sup> Furthermore, there were no changes in the reaction with the monoclonal antibodies produced by Montaraz *et al.*<sup>21</sup> (data not shown) or with the polyclonal antibodies used in the immunoblot test.

Due to the similarity presented by the pertactin in *E. coli* transformed with pBH7 in relation to the pertactin from *Bordetella* described by other authors, it is possible to use it as an antigen to induce and study the immunity mechanisms that protects against *Bordetella bronchiseptica* or use it as an antigen for serum tests in the diagnostic of *Bordetella* associated diseases.

se aplicó el método de purificación de proteínas de membrana externa descrito por Matsuyama *et al.*<sup>30</sup> La Prn recombinante y de *B. bronchiseptica* se detectó mediante inmunoblot en nitrocelulosa con anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. Se utilizó un miniblatter 45.\*

## Análisis de secuencias

Los análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como los mapas de los plásmidos construidos en este trabajo se realizaron con el software Vector NT1.

## Resultados

El producto de la PCR presentó un tamaño de 2 900 pb, aproximadamente (Figura 1). Debido a la presencia de un bandeo inespecífico, se decidió purificar la banda a partir del gel de agarosa para clonarlo en el vector pCR2.1.

El vector pCR2.1 con el inserto del gen de la pertactina se denominó pBH7 (Figura 2). La dirección de lectura quedó en la misma dirección del promotor T7 y en sentido inverso con relación al promotor LacZ.

La subclonación en el vector pET28a con el gen de pertactina se denominó pBH7E9. El gen prn se localizó entre el promotor T7 y el terminador T7 (Figura 3), el plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina.

La secuencia que se obtuvo del producto de la PCR clonado en el vector pCR2.1 fue registrada en el GenBank con número de acceso AY376325.

Las proteínas extraídas fueron analizadas mediante inmunoblot con anticuerpos policlonales contra *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertussis* (Figura 4).

Se comparó la secuencia del gen prn de *Bordetella bronchiseptica* P98 en el pBH7 con las secuencias del mismo gen de la *Bordetella bronchiseptica* cepas RB50, B14 y CN7531. Se observó 89.7% de identidad a nivel de nucleótidos.

El alineamiento del Cuadro 3 corresponde a las secuencias de aminoácidos de la Prn de *B. bronchiseptica* P98 comparada con las cepas RB50, B14 y CN7531. Se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir del ATG descrito como codón de inicio. Se observó 96.6% de identidad a nivel de aminoácidos. Mediante el análisis de la secuencia, se localizó el dominio RGD de adhesión a células epiteliales, en el aminoácido 258. La región 1 inicia en el aminoácido Gly 264 y la región 2 en la Pro 568 de la Prn de *B. bronchiseptica* P98 clonada en el pBH7.

## Discusión

\*Immunonetics.

Cuadro 3

ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PERTACTINA DE *Bordetella*  
*bronchiseptica* P98 CON LAS SECUENCIAS DE OTRAS PERTACTINAS  
 ALIGNMENT OF THE SEQUENCE OF THE PERTACTIN OF *Bordetella bronchiseptica* P98 WITH  
 THE SEQUENCES REPORTED BY OTHER AUTHORS.

|               |       |                                     |                         |
|---------------|-------|-------------------------------------|-------------------------|
|               |       | 1                                   | 50                      |
| prn Bb P98    | (1)   | MSLSRIVKAAPLRRTTLAMALGAL---         | GAAPAAADWNNQSI IKAGERQH |
| prn Bb RB50   | (1)   | MSLSRIVKAAPLRRTTLAMALGALGALGA       | APAAHADWNNQSI IKAGERQH  |
| prn Bb B14    | (1)   | MSLSRIVKAAPLRRTTLAMALGAL---         | GAAPAAADWNNQSI IKAGERQH |
| prn Bb CN7531 | (1)   | MSLSRIVLAAPLRRTTLAMALGALG---        | AAPAAADWNNQSI IKAGERQH  |
| Consensus     | (1)   | MSLSRIVKAAPLRRTTLAMALGALG           | GAAPAAADWNNQSI IKAGERQH |
|               |       | 151                                 | 200                     |
| prn Bb P98    | (148) | TSIADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIV      | DGGLHIGTLQPLQPEDLPSS    |
| prn Bb RB50   | (151) | ASIADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIV      | DGGLHIGTLQPLQPEDLPSS    |
| prn Bb B14    | (148) | ASIADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIV      | DGGLHIGTLQPLQPEDLPSS    |
| prn Bb CN7531 | (148) | ASIADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIV      | DGGLHIGTLQPLQPEDLPSS    |
| Consensus     | (151) | ASIADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIV      | DGGLHIGTLQPLQPEDLPSS    |
|               |       | 251                                 | 300                     |
| prn Bb P98    | (248) | IVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPG----     | GFGPLLDGWYGVDSVDS       |
| prn Bb RB50   | (251) | IVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPG    | GFGPLLDGWYGVDSVDS       |
| prn Bb B14    | (248) | IVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPG----     | GFGPLLDGWYGVDSVDS       |
| prn Bb CN7531 | (248) | IVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPG----     | GFGPLLDGWYGVDSVDS       |
| Consensus     | (251) | IVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPG         | GFGPLLDGWYGVDSVDS       |
|               |       | 451                                 | 500                     |
| prn Bb P98    | (443) | ASDGSVDFQQPAEAGRFKCLMVDTLAGSGLFRMNV | FADLGLSDKLVVMRD         |
| prn Bb RB50   | (451) | ASDGSVDFQQPAEAGRFKVLMVDTLAGSGLFRMNV | FADLGLSDKLVVMRD         |
| prn Bb B14    | (443) | ASDGSVDFQQPAEAGRFKVLMVDTLAGSGLFRMNV | FADLGLSDKLVVMRD         |
| prn Bb CN7531 | (443) | ASDGSVDFQQPAEAGRFKCLMVDTLAGSGLFRMNV | FADLGLSDKLVVMRD         |
| Consensus     | (451) | ASDGSVDFQQPAEAGRFKVLMVDTLAGSGLFRMNV | FADLGLSDKLVVMRD         |
|               |       | 501                                 | 550                     |
| prn Bb P98    | (493) | ASGQHRLWVRNSGSEPASANTMLLVQTPRGSAA   | FTLANKDGKVDIGTYR        |
| prn Bb RB50   | (501) | ASGQHRLWVRNSGSEPASANTMLLVQTPRGSAA   | FTLANKDGKVDIGTYR        |
| prn Bb B14    | (493) | ASGQHRLWVRNSGSEPASANTMLLVQTPRGSAA   | FTLANKDGKVDIGTYR        |
| prn Bb CN7531 | (493) | ASGQHRLWVRNSGSEPASANTMLLVQTPRGSAA   | FTLANKDGKVDIGTYR        |
| Consensus     | (501) | ASGQHRLWVRNSGSEPASANTMLLVQTPRGSAA   | FTLANKDGKVDIGTYR        |
|               |       | 551                                 | 600                     |
| prn Bb P98    | (543) | YRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPGP  | QPPQPPQPPQPPQPPQ        |
| prn Bb RB50   | (551) | YRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPGP  | QPPQPPQPPQPPQPPQ---     |
| prn Bb B14    | (543) | YRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPGP  | QPPQPPQPPQPPQPPQ        |
| prn Bb CN7531 | (543) | YRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPGP  | QPPQPPQPPQPPQPPQ        |
| Consensus     | (551) | YRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPGP  | QPPQPPQPPQPPQPPQ        |
|               |       | 801                                 | 850                     |
| prn Bb P98    | (793) | GGGSYRAANGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIE  | LAGGRQVQPYIKASVL        |
| prn Bb RB50   | (798) | GGGAYRAANGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIE  | LAGGRQVQPYIKASVL        |
| prn Bb B14    | (793) | GGGSYRAANGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIE  | LAGGRQVQPYIKASVL        |
| prn Bb CN7531 | (793) | GGGSYRAANGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIE  | LAGGRQVQPYIKASVL        |
| Consenso      | (801) | GGGSYRAANGLRVRDEGGSSVLGRLGLEVGKRIE  | LAGGRQVQPYIKASVL        |
|               |       | 851                                 | 900                     |
| prn Bb P98    | (843) | QEFDGAGTVRTNGIAHHTELRGTRAEGLGMAAAL  | GRGHSLYASYEYSKG         |
| prn Bb RB50   | (848) | QEFDGAGTVRTNGIAHRTELRGTRAEGLGMAAAL  | GRGHSLYASYEYSKG         |
| prn Bb B14    | (843) | QEFDGAGTVRTNGIAHRTELRGTRAEGLGMAAAL  | GRGHSLYASYEYSKG         |
| prn Bb CN7531 | (843) | QEFDGAGTVRTNGIAHRTELRGTRAEGLGMAAAL  | GRGHSLYASYEYSKG         |
| Consensus     | (851) | QEFDGAGTVRTNGIAHRTELRGTRAEGLGMAAAL  | GRGHSLYASYEYSKG         |

The numbers in the superior part of the sequences belong to the compared fragment, the numbers between parenthesis identify to the amino acid that is at the beginning of the sequence. It identifies on dark gray the dominion rgd, with medium gray the region 1 and in light gray region 2. The letters of the amino acid with different shades represent changes in the sequence. The short dashes mean absence of amino acids in relation to other sequences.

## Referencias

Gerlacha G, Von Wintzingerode F, Middendorp B, Grossa R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microb Infect*. 2001; 3:61-72.

1. Molina González MG. Aislamiento y caracterización de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino (tesis de maestría). Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2001.
2. México. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán; Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
3. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella pathogenesis*. *Front Biosci* 2001; 6:168-186.
3. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, Harvill ET. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun* 2003; 71:86-94.
4. Dubuisson FJ, Kehoe B, Willery E, Reveneau N, Locht C, Relman DA. Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology* 2000; 146:1211-1221.
5. Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* Infection Related to Contact with Infected Animals: Persistence of Bacteria in Host. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2002-2006.
6. Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, David A, et al. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun* 1998; 66:5921-5929.
7. Brockmeier SL, Register KB, Magyar T, Lax AJ, Pullinger GD, Kunkle RA. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in Swine. *Infect Immun* 2002; 70:481-490.
8. Mattoo S, Miller JF, Cotter PA. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun* 2000; 68:2024-2033.
9. Brickman TJ, Armstrong SK. Alcaligin siderophore production by *Bordetella bronchiseptica* strain RB50 is not repressed by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol* 2002; 184:7055-7057.
10. Brockmeier SL, Register KB. Effect of temperature modulation and bvg mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* 2000; 73:1-12.
11. Forde CB, Shi X, Li, J, Roberts M. *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on bvg-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun* 1999; 67:5972-5978.
12. Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, Carbonetti NH. Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1999; 181:5234-5241.
13. Boursaux-Eude C, Guiso N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella paraptussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*

En este trabajo se notifica la clonación, secuenciación y expresión del gen de la pertactina de *Bordetella bronchiseptica* P98 de origen canino. El gen prn se obtuvo a partir de un producto de PCR y éste se clonó en el plásmido pCR2.1 y fue identificado como pBH7. El producto clonado contiene 2 880 pb que incluye el ATG para el codón de inicio en el sitio 148 y la secuencia de terminación TAA en el nucleótido 2875. La subclonación del gen prn se hizo en el plásmido pET28a y se identificó como pBH7E9.

Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la Prn derivada del pBH7 no afectan las propiedades antigénicas de la molécula, lo cual se comprobó con la prueba de inmunoblot con los anticuerpos policlonales, lo que coincide con los datos notificados por Register,<sup>19</sup> quien mostró, incluso, variaciones en las regiones I y II sin que haya cambios en las propiedades antigénicas de la pertactina.

Mediante el análisis de la secuencia de Prn de *B. bronchiseptica*, se observó que la cepa RB50 presenta, en la región 1, una secuencia GGXXP extra en el sitio 277 con relación a la secuencia derivada del pBH7, así como en las otras secuencias comparadas, lo que coincide con otros trabajos anteriores y secuencias de pertactina registradas en el GenBank.<sup>19</sup>

Al comparar la región 2 de la secuencia de aminoácidos del pBH7 se observó una homología del 100% con relación a las secuencias descritas por King et al.<sup>20</sup> y Li et al.,<sup>28</sup> mientras que con la cepa RB50 hubo una similitud de 95%, debido a que carece de una Pro en el sitio 595 de la última repetición PQP.

Se observaron cambios en dos aminoácidos de la secuencia de la pertactina de *Bordetella bronchiseptica* P98. Uno se detectó con la presencia de una Thr en lugar de la Ala 148, lo que indica que la pertactina de *Bordetella bronchiseptica* P98 posee un sitio polar neutro en lugar del hidrofóbico que se señala en las otras secuencias, el segundo fue una His en lugar de la Arg 859, donde ambos aminoácidos forman parte del mismo grupo de aminoácidos básicos; sin embargo, este cambio es intrascendente debido a que la Prn madura es cortada en el aminoácido 633.

Se observó que la Prn derivada del pBH7 presentó otros cambios en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, esos cambios sólo se observaron en una o dos de las tres secuencias comparadas.

Estas variaciones de aminoácidos no afectan las características inmunogénicas de la molécula debido a que se conservan sin cambios las dos regiones variables, así como el dominio RGD del sitio 261, que es el receptor de adhesión a células;<sup>20</sup> asimismo, no hubo cambios en la reacción con los anticuerpos monoclonales elaborados por Montaraz et al.<sup>21</sup> (datos no mostrados) ni con los policlonales utilizados en la prueba

14. 2000; 68:4815-4817.  
Finn TM, Amsbaugh DF. Vag8, a *Bordetella pertussis* by-regulated protein. Infect Immun 1998; 66:3985-3989.
- Kirimanjeswara GS, Mann PB, Harvill ET. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. Infect Immun 2003; 71:1719-1724.
15. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect Immun 2001; 69:1231-1243.
16. Mooi FR, Van Oirschot H, Heuvelman K, Van Der Heide HGJ, Gastra W, Willems RJL. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun 1998; 66:670-675.
- Register KB. Novel genetic and phenotypic heterogeneity in *Bordetella bronchiseptica* pertactin. Infect Immun 2001; 69:1917.
17. King AJ, Berbers G, van Oirschot HFLM, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. Microbiology 2001; 147:2885.
- Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun 1985; 47:744-751.
21. He Q, Makinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H, et al. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? J Infect Dis 2003; 187:1200-1205.
- Kirimanjeswara GS, Mann PB, Harvill ET. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. Infect Immun 2003; 71:1719-1724.
22. Riising HJ, Van Empel P, Witvliet M. Protection of piglets against atrophic rhinitis by vaccinating the sow with a vaccine against *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. Vet Rec 2002; 150:569-571.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. London: Wofe Publishing, Mosby-Year Book europe Limited, 1994.
- de inmunoblot.
- Debido a la similitud que presenta la pertactina en *E. coli* transformada con el pBH7 con relación a las pertactinas de *Bordetella* descritas por otros autores, es posible emplearla como un inmunógeno para inducir y estudiar los mecanismos de inmunidad protectora contra *Bordetella bronchiseptica*, o utilizarla como antígeno para pruebas serológicas en el diagnóstico de las enfermedades asociadas a *Bordetella*.
25. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. Lett Appl Microbiol 1989; 8:151-156.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Alkaline lysis. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Oxford UK. 1989: 125-128.
27. LI J, Fairweather NF, Novotny P, Dougan G, Charles IG. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. J Gen Microbiol 1993; 138:1697-1705.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
29. Matsuyama S, Inokuchi K, Mizushima S. Promoter exchange between ompF and ompC, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 1984; 158:1041-1047.
30. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomason N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nature Gen 2003; Advanced on line publication:1-9.