

嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆与序列分析

李寿崧* 郭立新 江树勋 陈文炳 邵碧英

(福建出入境检验检疫局 福州 350001)

摘要: 以嗜水气单胞菌 BZ 和 NK 分离株的 DNA 为模板, 采用 PCR 技术, 扩增气溶素基因(*aerA*) 的 DNA 片段, 将其克隆到 pMD18-T 载体上。通过序列测定, 分析结果表明: 所克隆的 1393 bp 片段为 *aerA* 部分序列, 编码产生 464 个氨基酸。BZ 与 NK 之间 *aerA* 核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为 97.6% 和 98.3%, 与其它分离物核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为 71.6%~97.5% 和 68.0%~98.9%。利用邻接法构建了 *aerA* 分子树状图, 树状图分析表明: 气单胞菌属各分离物聚为三支, 其中嗜水气单胞菌各菌株之间关系密切, 被聚类为同一支。

关键词: 嗜水气单胞菌, 气溶素基因, 克隆, 序列分析

Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Aerolysin Gene of *Aeromonas hydrophila*

LI Shou-Song* GUO Li-Xin JIANG Shu-Xun CHEN Wen-Bing SHAO Bi-Ying

(Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P.R.C, Fuzhou 350001)

Abstract: The aerolysin genes (*aerA*) of BZ and NK isolates were cloned and sequenced. The sequence analysis showed that the partial *aerA* of BZ and NK isolates consisted of 1393 bp, encoding a protein of 464 amino acids. The similarity of nucleotide and amino acid sequences of *aerA* between BZ and NK isolates was 97.6% and 98.3% respectively. The nucleotide sequence of *aerA* of BZ strain exhibited 71.6% to 97.5% homology with other *Aeromonas* isolates, and the amino acid sequence exhibited 68.0% to 98.9% homology. The phylogenetic tree based on *aerA* nucleotide sequences from *Aeromonas* isolates was constructed with neighbor-joining method. It showed that there were three branches of aerolysin genes, and a close relationship among *Aeromonas hydrophila* isolates which were clustered into the same branch.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Aerolysin gene, Cloning, Sequence analysis

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 隶属于气单胞菌科 *Aeromonadaceae* 气单胞菌属 *Aeromonas*, 是气单胞菌属的模式种^[1]。该细菌普遍存在于水生环境中, 是多种水生、陆生动物的机会致病菌^[2]。能引起冷血动物, 包括鱼、爬行动物及两栖动物的败血症, 能通过食物传染给人并使人患病。该病菌是

人的急性腹泻病的主要病原菌^[3], 可引起人患肺炎、脓血症、腹膜炎、尿道感染和肌肉恶化等疾病^[3,4], 目前已越来越受到人们的关注与重视。

嗜水气单胞菌分泌至少两种溶血素(haemolysins), 一种为溶血素(haemolysin, *HlyA*), 另一种为气溶素(aerolysin, *AerA*)^[2]。大量研究表明气溶素是

重要的毒力因子,与气单胞菌毒力密切相关^[5]。该毒素具有溶血性、肠毒性和细胞毒性,是分子量为52 kD左右的单一多肽^[6]。气溶素前毒素含有23个氨基酸的信号肽序列,其通过细菌膜壁后,在翻译时切除掉信号肽,没有信号肽的前毒素随后被蛋白水解除去羧基端约25个氨基酸而被激活成为成熟蛋白^[7,8]。当嗜水气单胞菌侵染寄主时,其气溶素成熟蛋白与真核细胞表面特定的糖蛋白受体相结合,插入脂质双分子层中,形成直径约3 nm的孔径,破坏细胞膜的渗透性,导致细胞死亡^[7,8]。

目前国外对嗜水气单胞菌气溶素基因的致病机制已进行了研究,对一些分离物 *aerA* 进行了测序与分析^[7,9]。国内嗜水气单胞菌 *aerA* 的研究主要集中在PCR检测上^[10-12],对该基因序列的报道较少,仅卢强等对吉林的一个分离物进行了克隆^[13]。这给调查嗜水气单胞菌国内分离株气溶素基因的分子变异造成了障碍,对分子定向技术研究国内分离株带来了不便。为此本文对嗜水气单胞菌其它两个分离物 *aerA* 进行了克隆和序列测定,并与GenBank上已报道的气单胞菌属其它分离物进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养条件:嗜水气单胞菌 NK 分离株为福建农科院水产所惠赠;BZ 标准株购买于中国科学院微生物菌种保藏中心。迟钝爱德华氏菌 Et 分离株由福建淡水水产研究所惠赠,分离于日本鳗鲡 (*Japanese eel*)。所有菌株用 LB 液体培养基室温过夜培养。

1.1.2 分子生物学试剂:Taq DNA polymerase、MgCl₂ 等购自上海 Promega 公司;dNTPs、克隆载体 pMD18-T、胶回收试剂盒等购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取:取 1.5 mL 细菌培养液于微量离心管中,8000 r/min 离心 5 min,收集沉淀;加 300 μL 双蒸水煮沸 5 min,冰浴 5 min,反复 3 次;10000 r/min 离心 30 s;收集上清液,即模板 DNA。

1.2.2 引物设计:根据 GenBank 中已登录的嗜水气单胞菌核苷酸序列,设计并合成了一对引物, *AerA-Ph5*:5'-GCAGAGCCCGTCTATCCAGACCAG-3'; *AerA-Ph6*:5'-TCACGCTGAGGCTGACGTTGT TGAAG-3'。引物 *AerA-Ph5* 与嗜水气单胞菌

(GenBank 登录号 DQ186611)基因的 463 nt~486 nt 相对应,引物 *AerA-Ph6* 与 1830 nt~1855 nt 相互互补(两个碱基例外)。

1.2.3 PCR 扩增:以 DNA 为模板进行 PCR。50 μL 反应体系含 32.5 μL 灭菌重蒸水,5 μL Taq DNA polymerase 10×Buffer,1 μL dNTPs(2.5 mmol/L),5 μL MgCl₂(25 mmol/L),0.5 μL 引物 *AerA-Ph5*(20 μmol/L),0.5 μL 引物 *AerA-Ph6*(20 μmol/L),0.5 μL Taq DNA polymerase(5 U/μL),5 μL DNA(100 ng/μL)。反应条件:94 8 min;94 55 s,53 55 s,72 90 s,35 个循环;72 10 min。

1.2.4 目的片段克隆和序列测定:PCR 反应产物,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的 DNA 片段。将纯化后产物直接连接到 pMD18-T Vector 的多克隆位点上,连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选、细菌 PCR 法和质粒 PCR 法鉴定阳性重组子。DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司在 Applied Biosystems 3730 型测序仪上完成。

1.2.5 序列分析:利用 DNAMAN 6.0.40 软件对所测序列与 GenBank 上其它 *aerA* 序列进行同源性比较。利用 Clustal X(1.81)、BioEdit 7.0.5.3 及 MEGA 3.1 软件采用邻接法(neighbor-joining method)构建分子树状图,自举分析(bootstrap)为 1000 次检测,以估算其内分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以嗜水气单胞菌 NK 和 BZ 分离株 DNA 为模板通过 PCR 扩增到大小为 1393 bp 的目标片段,而水、迟钝爱德华氏菌未出现特异性扩增(图 1)。

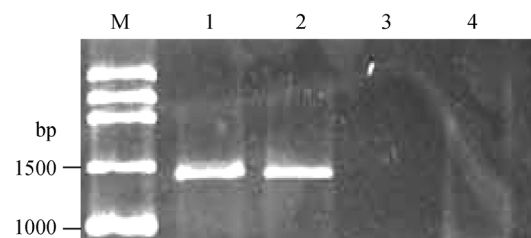


图 1 嗜水气单胞菌 *aerA* PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplified products of the *aerA* gene of *Aeromonas hydrophila*

M: 分子标记 250 bp DNA Ladder Marker; 1: BZ 分离株; 2: NK 分离株; 3: 水; 4: 迟钝爱德华氏菌 Et 分离株

M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: BZ; 2: NK; 3: water control; 4: Et

2.2 嗜水气单胞菌 *aerA* 的克隆及序列测定

将 BZ 和 NK 分离株扩增出的 1393 bp 的特异性片段分别克隆到 pMD18-T 载体上, 进行菌落 PCR 鉴定(图 2)后提取质粒, 对质粒进行 PCR 鉴定(图 3)。序列分析和测定结果表明, 所克隆的 1393 bp 片段为 *aerA* 部分序列, 编码产生 464 个氨基酸, 其核苷酸和推导的氨基酸序列已提交到 GenBank 上, 登录号为 EF450824 和 EF450825。

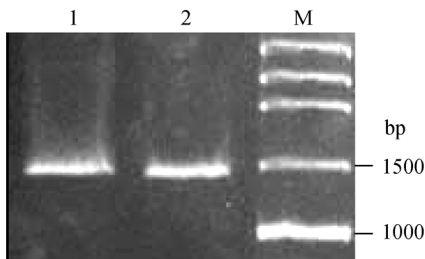


图 2 菌落 PCR 筛选阳性克隆子

Fig. 2 Positive clones selected by PCR

1: BZ 分离株菌斑; 2: NK 分离株菌斑; M: 分子标记 250 bp DNA Ladder Marker

1: BZ; 2: NK; M: 250 bp DNA Ladder Marker

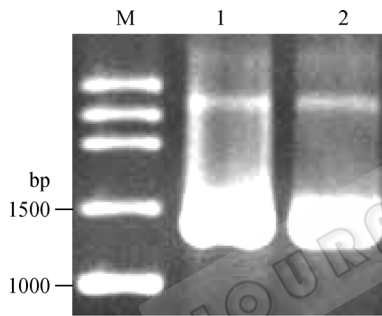


图 3 质粒的 PCR 扩增产物

Fig. 3 PCR amplified products of recombinant plasmid

M: 分子标记 250 bp DNA Ladder Marker; 1: BZ 质粒; 2: NK 质粒

M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: BZ; 2: NK

2.3 BZ 和 NK 分离物与气单胞菌其它分离物 *aerA* 序列的比较及进化分析

用于 *aerA* 核苷酸序列同源性比较和分子树状图构建的气单胞菌和登录号为: 嗜水气单胞菌 AHBHP3 菌株(*A. hydrophila*, AF485759), 嗜水气单胞菌 AHK4 菌株(*A. hydrophila*, AF485772), 嗜水气单胞菌 XS91-4-1 菌株(*A. hydrophila*, DQ186611), 嗜水气单胞菌 AH65 菌株(*A. hydrophila*, M16495)^[7], 嗜水气单胞菌 28SA 菌株(AHH4)(*A. hydrophila*, X65043)^[9], 嗜水气单胞菌(AHH3)28SA 菌株(*A. hydrophila*, X65044)^[9], 嗜水气单胞菌 AH-1 菌株(*A. hydrophila*, X65045)^[9], 温和气单胞菌 33 菌株(*A. sobria*, X65046)^[9], 豚鼠气单胞菌 A1833 菌株(*A. caviae*, U40711)^[14], 易损气单胞菌 ATCC 49659 菌株(*A. trota*, AF064068)^[15], 杀鲑气单胞菌 17-2 分离物(*A. salmonicida*, X65048)^[16], 温和气单胞菌 AB3 菌株(*A. sobria*, Y00559)^[17]。

利用 DNAMAN 6.0.40 软件对 BZ 和 NK *aerA* 序列与 GenBank 中已登录的序列进行比较, 结果表明, BZ 与 NK 分离物 *aerA* 之间的核苷酸序列同源性为 97.6%, 氨基酸同源性为 98.3%; BZ、NK 与嗜水气单胞菌其它分离株核苷酸序列同源性为 88.3%~97.5%, 氨基酸序列同源性为 92.9%~98.9%; 与气单胞菌属其它分离物(除嗜水气单胞菌外) *aerA* 核苷酸序列同源性为 71.3%~80.3%, 氨基酸序列同源性为 67.6%~84.9%, 由此可知, 嗜水气单胞菌种内同源性明显高于种间(表 1)。

表 1 气单胞菌属不同分离物 *aerA* 核苷酸序列(对角线上方)和推导的氨基酸序列(对角线下方)的同源率
Table 1 Percentage of nucleotide(above the diagonal) and putative amino acid sequence(below the diagonal) identities of *aerA* among isolates of *Aeromonas*

Isolates	AF485759	AF485772	DQ186611	M16495	X65043	X65044	X65045	X65046	NK	BZ	U40711	AF064068	X65048	Y00559
AF485759		99.8	94.1	90.3	88.1	88.0	98.1	73.0	94.0	94.5	79.7	77.7	72.9	77.4
AF485772	99.7		93.9	90.2	88.1	88.0	97.9	72.8	93.8	94.2	79.6	77.5	72.7	77.1
DQ186611	96.5	96.3		91.8	88.8	88.8	94.0	70.7	96.7	97.5	79.9	77.8	70.3	77.7
M16495	93.7	93.6	95.1		91.6	91.6	89.3	70.8	92.0	91.7	80.5	78.0	70.5	77.8
X65043	95.1	95.0	94.5	93.8		99.9	87.4	70.7	89.1	88.3	80.2	77.6	70.4	77.4
X65044	94.9	94.7	94.5	93.8	99.6		87.4	70.6	89.1	88.3	80.2	77.6	70.2	77.4
X65045	95.3	95.2	93.8	92.0	90.7	90.7		70.2	93.4	94.4	79.0	76.2	69.8	76.0
X65046	68.7	68.2	66.1	66.0	65.7	65.3	65.1		71.4	71.8	68.4	67.4	99.4	67.4
NK	96.2	96.0	98.1	95.5	94.6	94.6	92.9	67.6		97.6	80.0	78.0	71.3	77.7
BZ	96.2	96.0	98.9	95.5	94.8	94.8	93.7	68.0	98.3		80.3	78.5	71.6	78.3
U40711	83.8	83.4	83.6	82.9	82.7	82.7	80.8	63.4	84.3	84.9		79.4	68.2	79.0
AF064068	78.7	78.4	79.7	78.0	78.4	78.6	75.5	58.9	79.7	80.2	78.9		67.1	99.0
X65048	68.9	68.4	65.9	65.6	65.3	64.9	64.9	98.8	67.6	68.0	63.4	58.7		67.1
Y00559	78.7	78.4	79.5	77.8	78.2	78.4	75.5	58.9	79.7	80.2	78.5	99.4	58.7	

注: 登录号来源于 NCBI 基因库(利用 DNAMAN6.0.40 软件分析序列)

Note: The accession number is from NCBI GeneBank (Software DNAMAN6.0.40)

BZ 和 NK 序列与气单胞菌其它分离物 *aerA* 核苷酸序列构建的分子树状图上可以看出(图 4), 所有嗜水气单胞菌分离物聚为一大支, 分支内各分离物亲缘关系较近; 其它分离物聚成另外两大分支。温和气单胞菌 AB3 与温和气单胞菌 33 在树状图上彼此分离, 而与易损气单胞菌 ATCC 49659 却聚为一个分支, 支持率高达 100%。

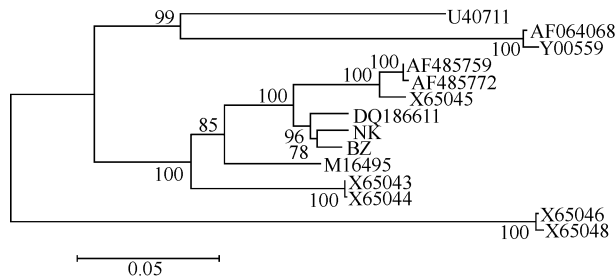


图 4 根据气单胞菌属气溶素基因核苷酸序列采用邻接法构建的树状图(分支处数值表示支持率)

Fig. 4 Phylogenetic tree produced by comparison of nucleotide sequences of different aerolysins with neighboring method. The numbers at the branch points indicate the percentages of bootstrap values (based on 1000 replicates)

3 讨论

本研究在设计引物时发现 Howard S P 等发表的嗜水气单胞菌 AH65 菌株 *aerA* 的 1445 nt~1446 nt 缺失 1 个碱基, 导致密码子移位, 提前终止表达^[7]。Chopra AK 等提到 Howard SP 更正了 AH65 菌株 *aerA* 482~493 位氨基酸序列^[18], 但更改内容是否与本研究结论一致还有待进一步核实。

嗜水气单胞菌 BZ 与 NK 之间 *aerA* 核苷酸同源率为 97.6%, 氨基酸同源率为 98.3%, 与其它分离物核苷酸同源率为 71.6%~97.5%, 氨基酸同源率为 68.0%~98.9%。树状图将气单胞菌 *aerA* 分为三大支, 每大支内部菌株之间同源性均高于支间; 除温和气单胞菌 AB3 外气单胞菌种间关系密切; 温和气单胞菌 AB3 与温和气单胞菌 33 在树状图上彼此分离, 它们之间核苷酸同源率为 67.4%, 而 AB3 与易损气单胞菌 ATCC 49659 却同处于一个小的分支上, 同源性为 99.0%, 这与 Ashraf AK 等研究结论一致^[15]。Ashraf AK 等认为出现这种情况可能是温和气单胞菌 AB3 或 33 之一被鉴定错误了或者可能是构建树状图的基因序列数目不够多^[15], 而 Chopra AK 和

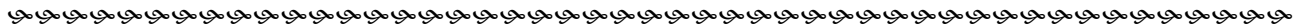
Houston CW 在文中提到温和气单胞菌 AB3 现为易损气单胞菌^[18], 由此可知以前鉴定有误, 导致易损气单胞菌两个分离物处在树状图的不同分支上。

本研究对嗜水气单胞菌两个国内分离株的气溶素基因进行了克隆与序列分析, 这为下一步基于在体外模拟自然进化过程(随机突变、重组和选择)使基因发生大量变异并定向选择出所需性质或功能的分子定向进化策略对气溶素基因进行研究^[19], 以及致病性嗜水气单胞菌实时疫苗的制备奠定了基础。

参考文献

- [1] 李爱华. 气单胞菌(Aeromonads)分类与命名的最新进展. 鱼类病害研究, 2001, 23(2): 25-32.
- [2] Zhang YL, Ong CT, Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology*, 2000, 146: 999-1009.
- [3] Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect*, 1999, 1(13): 1129-1137.
- [4] Poirier T, Laurens E, Viaud JY, et al. Nosocomial *Aeromonas hydrophila* pneumonia complicating toxic coma. *Ann Fr Anesth Reanim*, 1993, 12(1): 72-74.
- [5] Heuzenroeder MW, Christopher YFW, Flower RLP. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(1): 131-136.
- [6] 朱大玲, 李爱华, 钱冬, 等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展. 水生生物学报, 2004, 28(1): 80-84.
- [7] Howard SP, Garland WJ, Green MJ, et al. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(6): 2869-2871.
- [8] Howard SP, Buckley JT. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163(1): 336-340.
- [9] Hirono I, Aoki T, Asao T, et al. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microbial Pathogenesis*, 1992, 13(6): 433-446.
- [10] 卢强, 任瑞文, 王文东, 等. 致病性嗜水气单胞菌气溶素基因 PCR 检测方法的建立. 中国兽医学报, 2001, 21(4): 347-349.
- [11] 陈陆平, 陈怀青. 用 PCR 检测嗜水气单胞菌毒素基因. 中国动物检疫, 1995, 12(5): 5-7.

- [12] 宋铁英, 包晓东, 郑伟文. 中华鳖爆发性传染病研究 IV. 不同生化类型嗜水气单胞菌 *aer* 基因的 PCR 比较. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(2): 164-167.
- [13] 卢强, 李连瑞, 付宝权, 等. 致病性嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆与高效表达. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 21-23.
- [14] Wang G, Tyler KD, Munro CK, *et al.* Characterization of cytotoxic, hemolytic *aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene. *Journal of Clinical microbiology*, 1996, 34(12): 3203-3205.
- [15] Ashraf AK, Kim E, Carl E, *et al.* Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of a hemolytic toxin (Aerolysin) gene from *Aeromonas trola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (7): 2473-2478.
- [16] Hirono I, Aoki T. Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. *Microbial Pathogenesis*, 1993, 15(4): 269-282.
- [17] Husslein V, Huhle B, Jarchau T, *et al.* Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *aerCaerA* region of *Aeromonas sobria* encoding aerolysin and its regulatory region. *Molecular Microbiology*, 1998, 2(4): 507-517.
- [18] Chopra AK, Houston CW, Buckley JT, *et al.* The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infection and Immunity*, 1999, 67(1): 466-467.
- [19] 徐卉芳, 张先恩, 张用梅. 体外分子定向进化研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(4): 518-522.



科技信息

生物炼制技术用于生物石油开发

几年前美国一家国家实验室研究人员发明生物炼制石油技术,即用一种极端纤细细菌的催化作用炼制优质的石油产品,该菌能在高温(60)下分离重油(注:重油指非常规石油的统称。包括重质油、高粘油、油沙、天然沥青等)中的硫氢、重金属物,使这些杂质含量降低 20%~50%左右。这种生物炼油技术不仅提高“生物石油”的质量,而且更有利于环保。在炼制生物石油方面除细菌外,有些微藻也值得注意,一种叫丛粒藻(*Botryococcus braunii*, 又称葡萄藻)的单胞藻,它产生的碳氢化合物占其干物质重量的 15%~75%,最高达到 90%,其组成与原油极为类似,经过加工处理后达到真正石油的指标。除了该藻藻体有“储能库”之称以外,微藻中还有小球藻、盐藻(均系绿藻类)等均有“储能”的潜力,都可用透明玻璃管作为“生物反应器”,通入含 1% CO₂ 的空气,对数增殖期测定其产烃量,已达到占细胞干重的 16%~44%,每天可从藻体生物量中索取大量油烃化合物,完全有可能利用“环型玻璃管生物反应器”按需求量扩大再生产,从其生物量炼制生物石油。在美国,哈佛大学和斯坦福大学有关专家组建了一家公司想从生物炼油开辟新径:主要通过“合成生物学”、“基因工程”改造、建构或合成新的生物来生产类似石油的含烃化合物,类似原油但不含硫,按标准化需求进一步炼制生产所需要的车用燃料(“工程微生物”生产生物石油)。其优点在于:1)纯净,不含杂质如硫等;2)热值高,优于乙醇,每加仑大约高 30%;3)生产所用的能耗比乙醇少,没有蒸馏的程序,而生产乙醇所需能耗比碳氢化合物多 65%的能量;4)有利于节能。

基于生物石油有如此的优越性,选择合适的产油微生物或经改造、重组开发“可再生石油”是有可能的,经研究人员的实践、探索、再实践一定会取得满意的结果,这不仅能对“洁净替代能源”的开发有用,而且能对保护环境、减轻温室效应做出重要贡献。

(柯为 供稿)