

嗜水气单胞菌温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ* 的克隆与检测

任 燕, 陆承平, 姚火春

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 根据已发表的人源嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)温敏胞外蛋白酶基因 *eprA1* 的核苷酸序列, 设计合成一对引物, 以嗜水气单胞菌鱼源株 Ah J-1 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 1 005 bp 的胞外蛋白酶基因 *eprJ1*, 将该基因片段连接到 pMD18-T 载体中, 构建克隆载体 pMD-*eprJ1*。序列分析发现, 其与发表的 Ah AH1 的胞外蛋白酶 *eprA1* 基因的同源性有 91%。根据测序结果在保守区重新设计一对引物以增强特异性, 扩增片段大小为 387 bp。对 1990 ~ 2004 年 15 年间从浙江、福建、湖北及江苏等地不同患病水产动物肝肾等脏器分离到的 23 株 Ah 检测结果显示, 从中国东南地区分离的 21 株 Ah 水生动物致病性菌株扩增均为阳性, 2 株 Ah 非致病性菌株为阴性, 推测该基因普遍存在于致病性 Ah 中。检测模板 DNA 的灵敏度可达 1.5×10^{-3} ng/ μ L。[中国水产科学, 2006, 13(6): 924-928]

关键词: 嗜水气单胞菌; 温敏胞外蛋白酶基因; 克隆与检测

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-0924-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是一种革兰氏阴性菌, 普遍存在于淡水、污水中, 该菌产生多种毒力因子如肠毒素、溶血素和蛋白酶等, 可以引起鱼类败血症^[1]。Ah 亦可引发人类的腹泻或败血症等病症, 影响食品安全, 并且是免疫抑制病人和肝功能疾病患者的机会致病菌^[2]。因此, 嗜水气单胞菌已成为人-兽-鱼共患病原菌。对胞外蛋白酶和 Ah 菌株毒力之间的关系的研究已有报道^[3-5], 其为主要致病因子之一。这些蛋白酶可以克服宿主的防御机制, 引起组织损伤, 有助于细菌入侵并引起感染, 同时也为细菌增殖提供营养。Ah 胞外蛋白酶的种类比较多, 分子量大小不同, 理化特性不一, 主要有热不稳定丝氨酸蛋白酶、热稳定 EDTA 敏感金属蛋白酶、热稳定 EDTA 稳定蛋白酶等。李焕荣等^[6]发现, 纯化的 Ah J-1 株的 ECPase54 对 Vero 细胞有毒性, 腹腔注射能致死小白鼠。纯化的蛋白酶腹腔注射鲫鱼, 出现与自然感染的鲫鱼相同的症状; 肌肉注射后, 注射部位出现水肿、糜烂等症状^[7]。研究表明, 某些胞外蛋白酶有很好的抗原保护性。因此, 作者从 Ah J-1 基因组中扩增得到一种温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ1*, 并检测 23 株 Ah 中 *eprJ1* 基因的存在情

况, 探讨应用 PCR 技术检测 Ah 的方法及其灵敏度; 同时对 *eprJ1* 进行序列分析, 旨在为该基因的表达及基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

Ah 4332 菌株分离自牛犊, 来自德国吉森大学。其他 Ah 菌株分离自 1990 ~ 2004 年间浙江、福建、湖北及江苏等地不同患病水产动物的肝肾等脏器(除 W1 株分离自池塘水外)。其中 4332、W1 是无致病力菌株, 其他 21 株是强致病性菌株(表 1)。宿主菌大肠杆菌 DH5 α 由本室保存, 克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司。

1.2 主要试剂

Taq 酶、蛋白酶 K、限制性内切酶、Agarose Gel DNA Purification Kit 购自 Takara 公司, 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 菌株的培养

Ah 菌株和大肠杆菌 DH5 α 接种于 LB 液体培养基, 分别于 28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇振培养 18 h。

收稿日期: 2005-12-28; 修订日期: 2006-04-06。

基金项目: 江苏省攻关(三药)项目(BE2004609)。

作者简介: 任 燕(1976-), 女, 硕士, 研究方向: 鱼类病原微生物。现工作单位: 中国水产科学研究院珠江水产研究所鱼病中心(广州, 510380)

通讯作者: 姚火春(1963-), Tel: 025-84395328; E-mail: yaohch@njau.edu.cn

表1 嗜水气单胞菌株宿主及来源

Tab. 1 Hosts and resources of *Aeromonas hydrophila* strains

菌株 Strain	宿主 Host	脏器 Visceral organs	来源与时间 Resource and time
J-1	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1991
TPS-30	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1991
BSK-10	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1990
PBS-10	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1991
DF2CC	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1997
TPS-49	鳊 Bream	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1997
DF4-3CC	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1991
DF4-2GC	草鱼 Grass carp	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1991
HA50	鳖 Soft turtle	不详 Unknown	江苏 Jiangsu 1992
DF850P	鲫 Crucian carp	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1997
FPK-81	鳊 Bream	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1991
L316	日本鳗 Japanese eel	肝 Liver	福建 Fujian 2000
CHS00-3	欧鳗 European eel	肝 Liver	福建 Fujian 2000
WC00-2	欧鳗 European eel	肝 Liver	福建 Fujian 2000
AH9617	鲢 Sliver carp	腹水 Abdominal liquid	湖北 Hubei 1996
DX04-5	南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 2004
SPS103	鳊 Bream	肝 Liver	浙江 Zhejiang 1994
SPS104	鳊 Bream	肝 Liver	浙江 Zhejiang 1994
SB94-7	鳊 Bream	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1994
SB94-5	鳊 Bream	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1994
SBS-106	鳊 Bream	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1994
4332	牛 Calf	不详 Unknown	德国 Germany 1994
W1	塘水 Pond water	-	江苏 Jiangsu 1994

1.4 引物设计与合成

从 GenBank 中读取人源 Ah AH1 菌株的胞外蛋白酶基因 *eprA1*, 利用 primer5.0 软件自行设计一对引物, 其序列为: P1: 5'-GTGCTTCTGCTCTAGGGTG-GATG-3'(nt, 616-638); P2: 5'-ACACGACGTTGAAGT-GGCTCA-3'(nt, 1597-1617)。扩增测序后在保守区内设计一对引物 P1': 5'-GCTCGACGCCCAGCTCACC-3'(nt, 155-173), P2': 5'-GGCTCACC GCATTGGATTTCG-3'(nt, 522-541)以增强其针对性和特异性, 这对引物可以扩增出长度 387 bp 的片段, 引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。

1.5 温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ1* 的 PCR 扩增

按照常规方法进行 PCR 反应。冰上操作, 在 PCR 管中依次加入以下试剂: Ah J-1 株 DNA 1 μL , 上下游引物各 0.5 μL (25 pmol/L), 10 $\times$ PCR buffer (无

Mg^{2+}) 5 μL , Mg^{2+} 5 μL (25 mmol/L), dNTPs 0.5 μL (10 mmol/L), *Taq* 酶 0.2 μL (5 U/ μL), 加 ddH₂O 至总体积 25 μL , 混合均匀立即进行 PCR 反应。两对引物优化后的 PCR 反应条件为: 先 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ1* 的克隆和序列分析

PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 转化 DH5 α 菌株。电泳法和酶切法筛选重组子。挑取阳性克隆送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。使用 DNASTAR 软件进行序列分析。

1.7 PCR 扩增敏感性试验

Ah J-1 的 CTAB/NaCl 法提取模板做 10 倍比稀释后, 各取 1 μL 加入反应体系同上述 1.5 进行 PCR

扩增,产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ1* 的检测

J-1 等 23 株 Ah 用引物对 P1'、P2' 同上述 1.5 进行 PCR 扩增,产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

采用 P1、P2 引物对 Ah J-1 和重组质粒进行

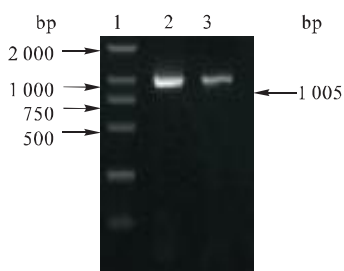


图 1 重组质粒的 PCR 鉴定

1: DNA Marker DL 2000;
2: 重组质粒扩增产物;
3: Ah J-1 株基因组扩增产物

Fig. 1 PCR analysis of recombinant plasmid

lane 1: DNA Marker DL 2000;
lane 2: PCR product of recombinant plasmid;
lane 3: PCR product of Ah J1 strain genome

2.3 序列测定

重组质粒的 DNA 序列测定结果显示 pMD18-T 的插入片段为 1 005 bp, ORF 阅读框从第 90 个碱基开始,编码含 305 个氨基酸的蛋白质。因该核苷酸序列的来源菌株 Ah J-1,将其命名为 *eprJ1* 基因。该基因序列已登录 GenBank, 登录号为 DQ002874。

2.4 *eprJ1* 基因片段序列的同源性分析

BLAST 结果发现该序列与 Ah AH1 的胞外蛋白酶 *eprA1* 基因有 91% 的同源性,与杀鲑气单胞菌

PCR 扩增后,电泳结果均可检测到约 1 000 bp 的特异条带(图 1)。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒经 *Hind* III/*Eco* R I 双酶切后,得到约 1 kb 的插入片段和 2.7 kb 的载体条带。经 *Hind* III、*Eco* R I 单酶切后得到约 3.7 kb 的条带,证明所挑取的克隆为正确的重组转化子(图 2)。

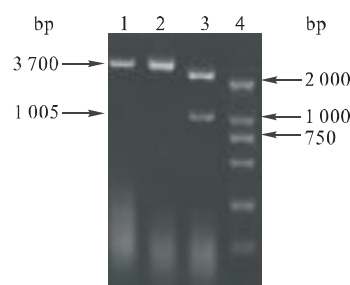


图 2 重组质粒的酶切鉴定

1: *Eco* R I 单酶切重组质粒;
2: *Hind* III 单酶切重组质粒;
3: *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切重组质粒;
4: DNA Marker DL 2000

Fig. 2 PCR analysis of recombinant plasmid digested

pMD-*eprJ1* with restrictive digestion

lane 1: pMD-*eprJ1* digested with *Eco* R I ;
lane 2: pMD-*eprJ1* digested with *Hind* III ;
lane 3: pMD-*eprJ1* digested with *Hind* III/*Eco* R I ;
lane 4: DNA Marker DL 2000

(*Aeromonas salmonicida*) 杀鲑亚种的胞外毒性内肽酶 *asaP1* 基因有 88% 同源性。

2.5 胞外蛋白酶结构预测

使用 DNASTAR 软件对 *eprJ1* 基因片段编码的胞外蛋白酶氨基酸序列分析发现:其编码 305 个氨基酸,分子量为 33 kD,等电点 pI 为 5.76,30 个带正电荷氨基酸(K、P),33 个带负电荷氨基酸(D、E),114 个疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V),88 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y),有良好的抗原性(图 3)。

```
MMKATPIALLLAGVLASPLCAAGLDAQTLVDGNSDDVRVNLTLTNSGDKPVRLLKWQLPGSEDAPLFLVERDQ
QPVSIEGALIKRAAPTDKDFQLKAGQSLTVQAEVSGLYDMSAQGGYSIRYLLPTLPQEAKAQAKQAQASESN
AVTLWVDGVSDERVLAKAAPLAEPQAVTASVSFSGRCTNTQKSDILAALDAASGITNNSSSSYQAVDKPEGQRYRS
WFGAYDASRWDQAETHFSKIKDAIDNKPLTFDCGCKQSYFAYVYPDRPYKVYLCKSFWTAPVSGTDSRAGTIVH
ELSHFNVV
```

图 3 温敏胞外蛋白酶 *eprJ1* 基因编码的氨基酸序列

Fig. 3 Predicted amino acids sequence of *eprJ1* gene of Ah J-1

2.6 PCR 扩增敏感性

随着模板量的减少,扩增条带逐步减弱。模板 $10 \sim 10^4$ 倍稀释后扩增均可见 387 bp 的目的条带, $10^5 \sim 10^6$ 倍稀释后则无目的片段(图4)。

2.7 胞外蛋白酶基因 PCR 检测

21 株致病性 Ah 均可检测到 387 bp 的特异目的条带,4332 和 W1 两株非致病菌中没有检测到该基因,推测这种蛋白酶基因普遍存在于致病性 Ah 中(图5)。

3 讨论

Ah 的蛋白酶种类较多,并与菌株致病能力密切相关。胞外蛋白酶基因的克隆和检测对 Ah 新毒力基因和新免疫原的发现有重要的意义。Alberto 等^[8-9]从 Ah AG2 克隆测序了分泌型弹性蛋白酶基因 *ahyB* 和胞外丝氨酸蛋白酶基因 *ahyA*, 定点突变证实 *AhyB* 蛋白对于致病性具有重要的作用。而 *ahyA* 编码的蛋白 *AhyA* 能水解酪蛋白和弹性蛋白,但不是毒力必备因子。人源 Ah AH1 胞外蛋白酶 *eprA1* 基因序列中有高度保守的金属蛋白酶 HEXXH 花环结构^[10], 本实验克隆的是鱼源 Ah J-1 菌株的部分 *eprJ1* 基因,未能发现金属蛋白酶的保守基序,但基因序列与前者有 91% 的同源性。

Tsong^[10]等将 Ah AH1 的 *eprA1* 基因克隆到 pUC18 和 pUC19 并转化大肠杆菌 JM109 都可表达出有水解酪蛋白活性的蛋白酶,且该重组蛋白酶经 56 ℃、30 min 处理后水解酪蛋白活性丧失,是一种温敏蛋白酶。本研究从鱼源 Ah J-1 基因组中扩增得到温敏蛋白酶基因 *eprJ1* 的部分序列,经 Protean 软件分析,其氨基酸序列中存在高抗原性片段,可能是一个良好免疫原,可作为亚单位疫苗或诊断抗原的候选抗原。

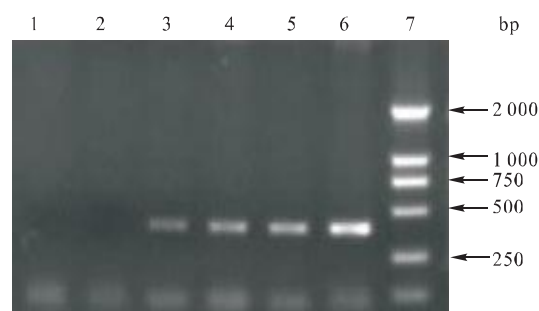


图4 PCR 检测的敏感性

1~6:依次为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 稀释倍数的基因组模板扩增结果;7:DNA Marker DL 2000

Fig. 4 Sensitivity of PCR method

Lanes 1,2,3,4,5,6: PCR with the templates of 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 fold dilution; lane 7: DNA Marker DL 2000



图5 不同来源 Ah 菌株 PCR 扩增检测结果

Fig. 5 Identification of PCR products of Ah from different hosts and years

lanes 1,13: DNA Marker DL 2000; lane 2: J-1; lane 3: TPS30; lane 4: BSK-10; lane 5: PBS-10; lane 6: DF4-2CC; lane 7: TPS49; lane 8: DF4-3CC; lane 9: DF4-3GC; lane 10: HA50; lane 11: DF850P; lane 12: FPK-81; lane 14: L316; lane 15: AH9617; lane 16: CHS00-3; lane 17: WC00-2; lane 18: DX04-5; lane 19: SPS103; lane 20: SPS-104; lane 21: SB94-7; lane 22: SB94-5; lane 23: SBS-106; lane 24: 4332; lane 25: W1

蛋白酶的检测方法很多,生物学方法有脱脂奶平板试验、底物(Azocasein)检测法、SDS PAGE 酪蛋白原位消化法以及 Dot ELISA 法等。脱脂奶平板法和底物(Azocasein)法,比较直观,但是该菌产生的所有胞外蛋白酶都可起作用,不能区分蛋白酶的种属。SDS PAGE 酪蛋白原位消化法比较直观且可以粗略判断有几种分子量大小不同的蛋白酶,但该方法

因借助于电泳而受温度、实验操作、酪蛋白含量等条件影响;ELISA 等免疫学方法需制备抗血清,整个试验过程费时费力,且该蛋白酶还属于未知蛋白,不易从 Ah 培养上清中纯化得到。而 PCR 方法可直接检测该基因的有无,省时省力,结果可靠。根据所扩增的 *eprJ1* 基因的保守区设计引物,建立了检测该基因的 PCR 方法,可检测的 Ah J-1 株最低 DNA 量

为 $1.5 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$, 相当于约 100 CFU 的细菌量。与脱脂奶平板法、底物法以及 Dot-ELISA 法相比, PCR 法具有敏感、特异, 而且操作简单的优点。蛋白酶基因 *eprJ1* 的 PCR 检测可作为致病性 Ah 的一种检测方法。通过对分离自 1990 ~ 2004 年 15 年间不同分离地区和宿主来源的 21 株 Ah 菌株的检测, 发现 *eprJ1* 基因普遍存在于致病性 Ah 菌株中, 而 2 株非致病性 Ah 中则未能检测出, 推测该基因与 Ah 的致病性存在一定的相关性。但是否是必备的毒力基因尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Cahill M M. A review, virulence factors in motile *Aeromonas* species[J]. Appl Bacteriol, 1990, 69: 1 - 6.
- [2] Daily O P, Joseph S W, Coolbaugh J C, et al. Association of *Aeromonas sobria* with human infection[J]. Clin Microbiol, 1981, 13: 769 - 777.
- [3] Ljungh A, Wadstrom T. Toxins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* [J]. Toxicol Toxin Rev, 1983, 1: 257 - 307.
- [4] Shieh H S. Protection of Atlantic salmon against motile aeromonad septicemia with *Aeromonas hydrophila* protease [J]. Microbios Lett, 1987, 36: 133 - 138.
- [5] Leung K Y, Stevenson R M. Tn5-induced pro-tease deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish [J]. Infect Immun, 1988, 56: 2 639 - 2 644.
- [6] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase 54 的纯化及特性分析[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 88 - 94.
- [7] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性 [J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 80 - 84.
- [8] Alberto C, Fregeneda J, Aller M, et al. Cloning, characterization and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Dis, 2000, 23: 49 - 59.
- [9] Alberto C, Javier Y, Alejandro T, et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infect Immun, 2000, 68: 3 233 - 3 241.
- [10] Tsong M C, Ching C L, Ming C C. Cloning and sequencing analysis of the gene (*eprA1*) encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. Gene, 1997, 199: 225 - 229.

Cloning, sequence analysis and detection of an extracellular temperature-labile protease encoding gene(*eprJ*) from *Aeromonas hydrophila*

REN Yan, LU Cheng-ping, YAO Huo-chun

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* (Ah) is an opportunistic pathogen and the leading cause of fatal hemorrhagic septicemia in fish, and also a cause of diseases in other aquatic and terrestrial animals. The virulence of Ah is multifactorial, including a wide variety of extracellular products (ECPs). The proteolytic activity of some extracellular enzymes of Ah was recognized early and is considered playing a major role in the virulence and pathogenicity of the bacterium. To study *eprJ1* gene encoding an extracellular temperature-labile protease (*eprJ1*), one target fragment about 1 005 bp was amplified from Ah J-1 strain genomic DNA by PCR. The PCR products were inserted into pMD18-T vector with conventional protocol and the cloning vector pMD-*eprJ1* was constructed. The *eprJ1* was then sequenced and analyzed. The nucleotide sequence of Ah J-1 was 91% identical to that of Ah AH1. In order to detect *eprJ1* of Ah rapidly and sensitively, the other specific primers based on extracellular protease gene *eprJ1* of Ah J-1 were composed, and a 387 bp fragment was amplified. The secondary primers were used to detect 23 isolates from 1990 to 2004. The PCR identification results of 21 pathogenic clinical isolates which were isolated from the southeast area of China were positive, and the results of two nonpathogenic Ah isolates were negative. It suggests that the *eprJ1* commonly presents in the pathogenic Ah and perhaps plays an important role in pathogenesis. The detection limit for *eprJ1* by PCR amplification was $1.5 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ template DNA. In conclusion, this PCR-based method is rapid and sensitive for the detection of pathogenic Ah strains. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 924 - 928]

Key words: *Aeromonas hydrophila*; extracellular temperature-labile protease gene; cloning; detection

Corresponding author: YAO Huo-chun. E-mail: yaohch@njau.edu.cn