

6株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因的克隆与序列分析

方 兵, 李 瑾 年, 汪 天 杰, 余 为 一, 祖 国 掌

(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 根据气单胞菌主要黏附素基因(*ahal*)、溶血素基因(*hly*)和细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)完整开放阅读框(ORF)设计3对特异性引物,对6株气单胞菌安徽分离株进行*ahal*、*hly*和*alt*基因的PCR扩增、克隆和测序。测序结果显示,安徽分离株*ahal*、*hly*和*alt*基因的ORF大小分别为1 056~1 068 bp、1 482 bp和1 104~1 107 bp,各编码351~355、493和367~368个氨基酸。序列分析显示:(1)属于*alt*⁺*ahal*⁺*hly*⁺毒力基因型的3个安徽分离株间*ahal*核苷酸序列和推测的氨基酸序列同源性均很高,分别为98.8%~99.3%和97%~97.6%,且与国内参考株Ah/Trionyx sinensis/Guangzhou(Guangdong)/AF276639的同源性高达98.5%~99%和96.8%~97.6%。而*alt*⁺*ahal*⁺*hly*⁻HA6安徽分离株与国外参考株Ah/Fish/Barcelona(Spain)/AF183931间的核苷酸序列和氨基酸序列同源性较高,分别为95.8%和97.2%。(2)不同表型种气单胞菌安徽分离株之间及其与国内外其他分离株之间的*hly*核苷酸序列和推测的氨基酸序列同源性均较高,分别介于88.4%~100%之间和90.8%~98.7%之间。(3)5个安徽分离株(BA16、CA1、HA6、HA7和GA1)之间及其与惟一参考株之间的*alt*核苷酸序列和推测的氨基酸序列同源性分别高达93.5%~99.9%和80.2%~98.3%,但与BA17分离株间的核苷酸序列同源性(81.6%~81.7%)和推测的氨基酸序列同源性(77.5%~84.9%)均较低。这些结果表明,气单胞菌*ahal*和*alt*基因在不同毒力基因型间存在一定差异性,*hly*基因在不同表型种间存在较高保守性,该基因可作为研制气单胞菌基因工程亚单位疫苗的候选成分。[中国水产科学,2006,13(6):966~972]

关键词: 气单胞菌;安徽分离株;毒力基因;序列分析

中图分类号:S94

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2006)06-0966-07

气单胞菌作为人-畜-水产动物共患病病原菌,日益受到国内外学者的高度重视,目前对该菌致病机理的研究已达到分子水平^[1-4]。研究表明,气单胞菌(*Aeromonads*)的致病性是由多种毒力因子共同作用的结果,其中黏附素、溶血素和细胞兴奋性肠毒素是其3种主要毒力因子,并且毒力基因的种类与数量在不同表型种及不同地区分离株间均存在一定差异性。2000~2004年,本课题组先后从安徽省患有败血性疾病的水产动物体内分离鉴定获得13株致病性气单胞菌,并应用多重PCR方法检测其主要黏附素基因(*ahal*)、溶血素基因(*hly*)和细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)的携带情况,确定了它们分布于*alt*⁺*ahal*⁻*hly*⁻、*alt*⁺*ahal*⁺*hly*⁻和*alt*⁺*ahal*⁺*hly*⁺3个毒力基因型^[5]。本研究选取6株不同毒力基因型的气单胞菌,对其*ahal*、*hly*和*alt*全基因进行克隆与序列分析,旨在从分子水平探讨气单胞菌安徽分离株之间及其与国内外其他分离株间的亲缘关系,确定它们在系统发生树中的位置,丰富气单胞菌的分

子流行病学方面资料,也为进一步研制毒力因子基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

6株气单胞菌(BA16、BA17、HA6、HA7、CA1和GA1安徽分离株)由本研究室从患有败血性疾病的水产动物体内分离鉴定并保存,其来源、表型种和毒力基因型见表1。

1.2 工程菌与主要试剂

E. coli DH5a由中国科技大学生命科学学院惠赠;限制性内切酶*EcoR* I、*EcoR* V、*Fba* I、*Taq* DNA聚合酶及pMD18-T载体为大连宝生物TaKaRa公司产品;“Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit”、“Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep Kit”和“DNA Gel Extraction Kit”均购自杭州维特洁生化技术有限公司。

收稿日期:2006-01-09;修订日期:2006-03-15.

基金项目:安徽省高校“十五”优秀人才项目,安徽省教育厅项目(2006KJ170B)。

作者简介:方 兵(1975-),男,硕士研究生,主要从事分子病原微生物学研究。

通讯作者:李瑾年. E-mail: Lijinnian2000@163.com

表1 菌株的来源、表型种和毒力基因型

Tab. 1 Sources, phenospecies and virulence genotypes of *Aeromonad* strains

菌株 Strain	宿主 Host	表型种 Phenospecies	毒力基因型 Virulence genotypes
BA16	中华鳖 <i>Trionyx siliensis</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	alt ⁺ aha1 ⁻ hly ⁻
BA17	中华鳖 <i>Trionyx siliensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	alt ⁺ aha1 ⁺ hly ⁺
HA6	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	alt ⁺ aha1 ⁺ hly ⁻
HA7	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	alt ⁺ aha1 ⁺ hly ⁺
CA1	草鱼 <i>Grass carp</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	alt ⁺ aha1 ⁻ hly ⁻
GA1	鳊鱼 <i>Mandarin fish</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	alt ⁺ aha1 ⁺ hly ⁺

1.3 毒力基因的 PCR 扩增

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的 hly、aha1 和 alt 基因全序列^[6-8], 应用软件设计并合成 3 对针对完整开放阅读框(ORF)的特异性引物, 预期扩增片段长度分别为 1 482 bp, 1 132 bp 和 1 107 bp。

1.3.2 模板的制备 分别挑取 6 株气单胞菌典型菌落接种 LB 培养基, 置 30 ℃、200 r/min 振荡培养 18 h。离心收集菌体后按照“Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit”说明提取细菌基因组 DNA 作为模板。

1.3.3 目的片段的 PCR 扩增 50 μL 反应体系中 10 × PCR buffer 5.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA polymerase 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 5 μmol Sense primer 0.5 ~ 1 μL, 5 μmol/L Antisense primer 0.5 ~ 1 μL, ddH₂O 38.0 ~ 39.0 μL。循环参数为 94 ℃预变性 2 min, 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃后延伸 10 min。用含 0.5 μg/mL EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 毒力基因的克隆与序列测定

经“DNA Gel Extraction Kit”回收纯化的 PCR 产物克隆于 pMD18-T 载体并转化至 *E. coli* DH5a 感受态细胞。碱裂解法提取质粒进行 PCR 鉴定和单酶切鉴定, 选取阳性重组质粒送上海生物工程公司进行序列测定。测序结果拼接整理后获得的毒力基因序列并与基因库中登录的国内外分离株相应序列进行同源性分析, 并绘制相应的系统发生树。

2 结果

2.1 毒力基因的 PCR 扩增

结果见图 1。由图 1 可见, 安徽分离株 HA6、HA7、BA17 和 GA1 扩增出 aha1 基因特异性条带(1 132 bp), HA7、BA17 和 GA1 安徽分离株扩增出 hly 基因特异性条带(1 482 bp), BA16、CA1、HA6、HA7、BA17 和 GA1 安徽分离株扩增出 alt 基因特异性条带(1 107 bp)。

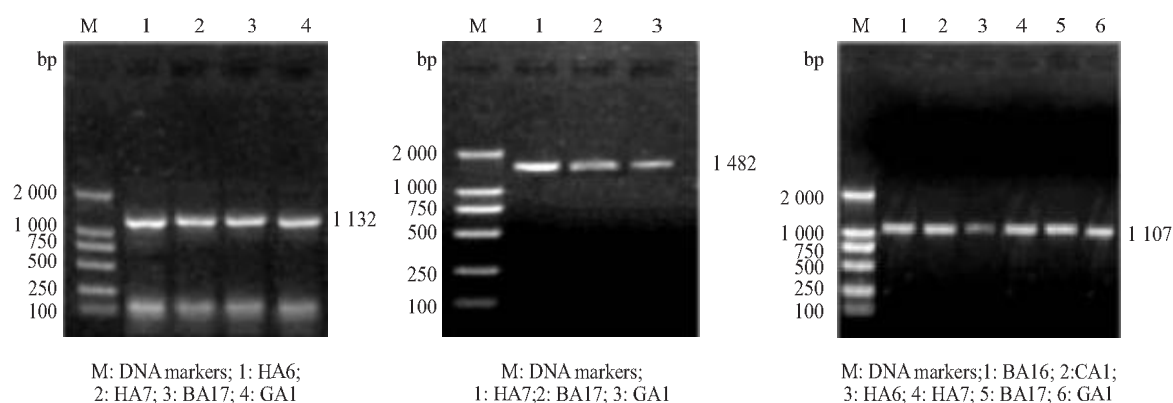


图1 气单胞菌安徽分离株3种毒力基因的PCR扩增

Fig. 1 PCR amplification of virulence genes of *Aeromonad* isolated from Anhui

2.2 毒力基因的克隆与鉴定

以重组质粒为模板通过 PCR 筛选到阳性克隆菌株,从阳性菌株提取的质粒使用不同酶单酶切后均得到预期大小的 2 条片段(其中,用 *EcoR* V 酶切 *aha1* 基因, *EcoR* I 酶切 *hly* 基因, *Fba* I 酶切 *alt* 基因),说明 *aha1*、*hly* 和 *alt* 基因均成功克隆入 pMD18-T 载体。

2.3 毒力基因的序列分析与同源性比较

2.3.1 *aha1* 基因的序列分析与同源性比较 以鱼源嗜水气单胞菌参考株 Ah/Fish/ Barcelona (Spain)/AF183931 *aha1* 基因全序列设计引物,对 BA17(蟹源嗜水气单胞菌/*alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺)、GA1(鱼源温和气单胞菌/*alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺)、HA7(蟹源嗜水气单胞菌/*alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺)和 HA6(蟹源嗜水气单胞菌/*alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁻) 4 个安徽分离株的 *aha1* 基因进行扩增、克隆和测序。结果显示属于 *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺ 毒力基因型的 3

个菌株 *aha1* 基因 ORF 长均为 1 068 bp,编码 355 个氨基酸;属于 *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁻ 毒力基因型的 HA6 菌株 *aha1* 基因 ORF 长 1 056 bp,编码 351 个氨基酸 (GenBank No. DQ302124 ~ DQ302127)。序列分析表明,3 个 *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺ 菌株间 *aha1* 核苷酸序列和氨基酸序列同源性均很高,分别介于 98.8% ~ 99.3% 和 97% ~ 97.6% 之间,但与 *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁻ HA6 菌株间的核苷酸同源性 (80.9% ~ 81.5%) 和氨基酸同源性 (72.9% ~ 73.6%) 均较低 (表 2)。由 *aha1* 基因系统发生树可见 3 个 *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺ 菌株与国内参考株 Ah/Trionyx sinensis/Guangzhou (Guangdong)/AF276639 的同源性最高 (98.6% ~ 99%),同属于 group1 中的 subgroup 1.1; *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁻ HA6 菌株与国外参考株 Ah/Fish/ Barcelona (Spain)/AF183931 的同源性最高 (95.8%),同属于第 2 群中的 2.1 亚群 (图 2)。

表 2 气单胞菌不同分离株的 *aha1* 基因同源性比较

Tab. 2 Homology comparison of *aha1* gene of different *Aeromonas* strains isolated

同源性 Percentidentity											
差异性 Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8			
	1	99.3	99.0	81.0	90.3	98.6	74.8	80.5	1	As/MF/SH/GA1-03	
	2	0.8		98.8	81.5	90.4	99.0	75.0	80.5	2	As/TS/AH/BA7-01
	3	0.9	1.1		80.9	90.1	98.5	74.6	80.3	3	Ah/ES/AH/HA7-03
	4	17.0	16.4	17.0		79.4	81.5	86.9	95.8	4	Ah/ES/AH/HA6-03
	5	8.2	8.1	8.3	18.4		91.1	73.6	78.7	5	Ah/FH/SP/AY165026-02
	6	1.4	1.0	1.4	16.5	7.5		74.9	80.5	6	Ah/TS/GD/AF276639-00
	7	23.5	23.4	23.6	12.5	25.1	23.3		87.2	7	As/FH/BL/AY818146-05
	8	17.5	17.6	17.6	4.0	18.5	17.5	12.2		8	Ah/FH/BL/AF183931-99
	1	2	3	4	5	6	7	8			

同源性 Percentidentity											
差异性 Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8			
	1		97.6	97.2	73.1	63.4	97.0	89.9	72.3	1	As/MF/SH/GA1-03
	2	0.7		97.0	73.6	63.9	97.6	70.4	72.7	2	As/TS/AH/BA7-01
	3	1.1	1.3		72.9	63.2	96.8	89.7	97.2	3	Ah/ES/AH/HA7-03
	4	28.2	27.6	28.5		61.1	73.1	80.3	97.2	4	Ah/ES/AH/HA6-03
	5	28.3	27.6	28.7	35.5		83.9	55.6	60.0	5	Ah/FH/SP/AY165026-02
	6	1.3	0.7	1.5	27.9	27.6		70.4	72.5	6	Ah/TS/GD/AF276639-00
	7	33.1	32.4	33.4	20.2	42.3	32.4		80.1	7	As/FH/BL/AY818146-05
	8	29.5	28.8	29.8	1.1	37.4	29.2	20.5		8	Ah/FH/BL/AF183931-99
	1	2	3	4	5	6	7	8			

注:左侧为核苷酸序列,右侧为氨基酸序列。

Note: Left, nucleotide sequence. Right, amino acid sequence.

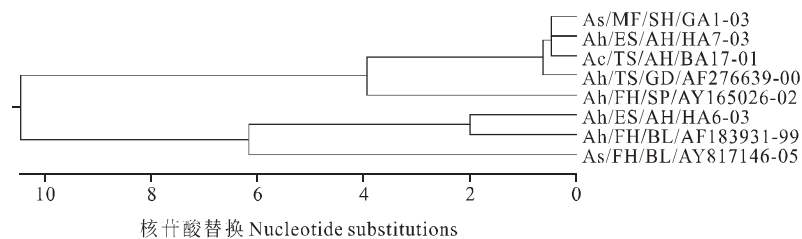


图 2 *aha1* 基因的系统发生树 (×100)

Fig. 2 Phylogenetic tree of *aha1* gene (×100)

2.3.2 hly 基因的序列分析与同源性比较 以龚晖等^[6]报道的嗜水气单胞菌溶血素基因全序列设计引物对 HA7(蟹源嗜水气单胞菌/alt⁺ aha1⁺ hly⁺)、BA17(鳖源嗜水气单胞菌/alt⁺ aha1⁺ hly⁺)和 GA1(鱼源温和气单胞菌/alt⁺ aha1⁺ hly⁺) 3 个安徽分离株 hly 基因进行扩增、克隆和测序。结果显示 3 个安徽分离株的 hly 基因 ORF 大小均为 1 482 bp, 编码 439 个氨基酸 (GenBank No. DQ302121 ~

DQ302123)。序列分析表明,3 个安徽分离株间 hly 核苷酸序列和氨基酸序列同源性均很高,分别为 99.6% ~ 100% 和 97.8% ~ 98.7% (表 3)。由 hly 基因系统发生树可见安徽分离株与 6 个国内外参考株的同源性为 88.2% ~ 99.6%, 且均与国内参考株 *Ah/Anguilla anguilla*/Fuzhou (Fujian)/AF539467 的同源性最高(97.6%), 同属于第 1 群中亚群 1.1 (图 3)。

表 3 气单胞菌不同分离株的 hly 基因核苷酸和氨基酸序列同源性比较

Tab. 3 Homology comparison of hly gene of different *Aeromonas* strains

同源性 Percentidentity										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1		97.6	97.3	97.3	97.3	92.1	89.2	89.2	94.0	1
2	2.5		97.6	97.6	97.6	91.5	88.4	88.4	94.5	2
3	2.8	2.5		100.0	99.6	91.6	88.8	88.8	93.9	3
4	2.8	2.5	0.0		99.6	91.6	88.8	88.8	93.9	4
5	2.8	2.5	0.4	0.4		91.6	88.8	88.8	93.9	5
6	8.4	9.1	9.0	9.0	9.0		91.5	91.5	89.4	6
7	11.8	12.7	12.2	12.2	12.2	9.1		99.9	87.5	7
8	11.8	12.7	12.2	12.2	12.2	9.1	0.1		87.5	8
9	6.3	5.7	6.4	6.4	6.4	11.5	13.8	13.8		9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1		97.9	97.9	97.9	97.9	94.7	93.5	93.5	93.4	1
2	0.8		97.8	97.8	97.8	94.5	93.1	93.1	93.4	2
3	0.8	1.0		98.7	97.8	94.4	93.0	93.0	93.1	3
4	0.8	1.0	1.0		97.8	94.4	93.0	93.0	93.1	4
5	0.8	1.0	1.0	1.0		94.4	93.0	93.0	93.1	5
6	4.7	4.8	5.0	5.0	5.0		92.7	92.7	91.6	6
7	5.5	5.8	6.0	6.0	6.0	6.8		98.4	90.8	7
8	5.5	5.8	6.0	6.0	6.0	6.8	0.3		90.8	8
9	5.0	5.2	5.5	5.5	5.5	6.4	7.7	7.7		9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

注:左侧为核苷酸序列,右侧为氨基酸序列。

Note: Left, nucleotide sequence. Right, amino acid sequence.

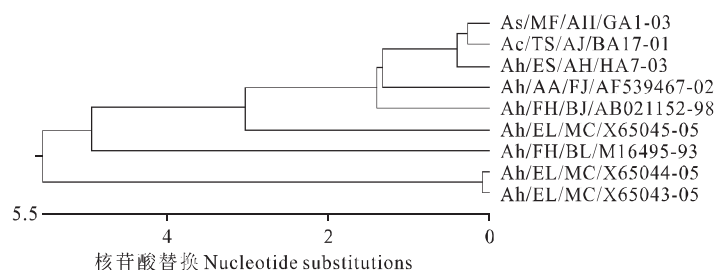


图 3 hly 基因的系统发生树(×100)

Fig. 3 Phylogenetic tree of hly gene(×100)

2.3.3 alt 基因的序列分析与同源性比较 以 GenBank 中目前登录的惟一人源嗜水气单胞菌参考株 *Ah/Diarrheal disease/Texas* (America)/L77573 alt 基因全序列设计引物,对分别属于 3 个毒力基因型的 6 株气单胞菌进行 alt 全基因扩增、克隆和测序,结果显示 HA6、HA7、BA16 和 BA17 4 株气单胞菌安徽分离株 alt 基因 ORF 长均为 1 107 bp,编码 368 个氨基酸;CA1 和 GA1 2 株分离菌 alt 基因 ORF 长均为 1 104 bp,编码 367 个氨基酸 (GenBank No. DQ074979, DQ302128 ~ DQ302132)。序列分析表明属于不同毒力基因型、不同表型种和不同动物来源

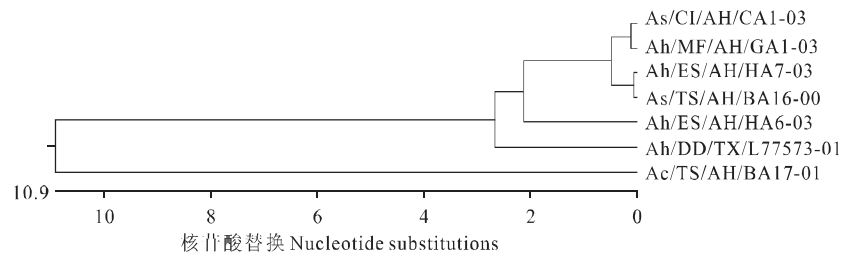
的 5 个安徽分离株(BA16、CA1、HA6、HA7 和 GA1)之间 alt 基因的核苷酸和氨基酸序列同源性均较高,分别为 95.4% ~ 99.9% 和 80.2% ~ 98.3%,但它们与 BA17 安徽分离株间的核苷酸同源性(81.6% ~ 81.7%)和氨基酸同源性(77.5% ~ 84.9%)均较低(表 4)。由 alt 基因系统发生树可见 HA6、HA7、BA16、CA1 和 GA1 5 个安徽分离株与目前惟一的参考株同源性高达 93.5% ~ 95.8%,同属于第 1 群;而 BA17 安徽分离株与参考株序列差异较大,自成为第 2 群(图 4)。

表4 气单胞菌不同分离株的 *alt* 基因同源性比较Tab. 4 Homology comparison of *alt* gene of different *Aeromonas* strains

同源性 Percentidentily										同源性 Percentidentily											
差异性 Divergence		1	2	3	4	5	6	7		差异性 Divergence		1	2	3	4	5	6	7			
	1		81.8	81.9	81.7	81.9	82.1	81.6	1		Ac/TS/AH/BA17-01	1		84.9	90.9	90.7	98.3	96.4	85.9	1	Ac/TS/AH/BA16-00
	2	21.8		99.1	99.9	99.1	95.8	96.1	2		Ah/ES/AH/HA7-03	2	14.1		80.2	80.0	84.9	84.5	77.5	2	Ac/TS/AH/BA17-01
	3	21.4	0.9		99.1	99.8	94.8	95.6	3		As/CI/AH/CA1-03	3	7.5	20.8		98.1	90.9	89.1	80.2	3	As/CI/AH/CA1-03
	4	21.9	0.1	0.8		99.0	95.8	96.2	4		As/TS/AH/BA16-00	4	7.8	21.1	0.2		90.7	88.8	80.2	4	Ah/MF/AH/GA1-03
	5	21.4	0.9	0.2	1.0		94.8	95.4	5		Ah/MF/AH/GA1-03	5	0.0	14.1	7.5	7.8		96.4	85.9	5	Ah/ES/AH/hA7-03
	6	21.8	4.3	5.3	4.4	5.3		93.9	6		Ah/DD/TX/L77573-01	6	1.9	14.6	9.7	9.9	1.9		84.5	6	Ah/DD/TX/L77573-01
	7	21.5	3.9	4.4	3.8	4.6	6.3		7		Ah/ES/AH/HA6-03	7	11.6	21.2	17.9	18.1	11.6	13.4		7	Ah/ES/AH/HA6-03
	1	2	3	4	5	6	7			1	2	3	4	5	6	7					

注:左侧为核苷酸序列,右侧为氨基酸序列。

Note: Left, nucleotide sequence. Right, amino acid sequence.

图4 *alt* 基因的系统发生树(×100)Fig. 4 Phylogenetic tree of *alt* gene(×100)

3 讨论

黏附素(Ahal)、溶血素(Hly)和细胞兴奋性肠毒素(Alt)是气单胞菌的3种重要毒力因子。其中黏附素通过介导细菌定居黏膜表面而发挥致病作用;溶血素通过其溶血性、肠毒性及细胞毒性损伤组织细胞;细胞兴奋性肠毒素则通过类似霍乱毒素的作用机制导致水产动物发生腹泻。因此,分析气单胞菌安徽分离株间及其与国内外其他分离株间3种毒力基因的亲缘关系,对丰富气单胞菌的分子流行病学资料,研究毒力因子的致病作用和研制毒力因子基因工程亚单位疫苗均具有重要指导意义。本研究中对气单胞菌 *hly* 全基因序列分析的结果显示,3个不同表型种安徽分离株之间及其与国内外其他分离株间的核苷酸序列和推测的氨基酸序列同源性均很高。表明溶血素基因广泛存在于不同表型种气单胞菌中,该基因高度保守,长期传代培养并未使其发生变异。如果进一步证明此基因表达的溶血素蛋白具有良好免疫保护作用,那么 *hly* 基因将是气单胞菌基因工程疫苗的良好基因材料。

气单胞菌安徽分离株 *aha1* 全基因序列分析显示,同属于 *alt*⁺ *ahal*⁺ *hly*⁺ 毒力基因型的3个安徽分离株之间以及与3个参考株之间的同源性均很高,而与 *alt*⁺ *ahal*⁺ *hly*⁻ HA6 安徽分离株存在较大差异性,HA6 菌株与国外参考株 Ah/Fish/ Barcelona (Spain)/AF183931 的亲缘关系很近。表明气单胞菌 *aha1* 基因在不同菌株间存在一定差异性,并且这种差异性可能与菌株的毒力基因型有一定的关联性。Chamberlain 等^[9]报道气单胞菌黏附素蛋白的N端均由20个疏水性氨基酸组成信号肽,本研究测序结果也证实了这一点。但是 BA17 菌株的信号肽在第12位由 A→S, GA1 菌株在第10位由 I→T, 在第12位由 A→S, HA7 菌株在第17位由 A→D, 这些位点突变是否影响黏附素表达有待于进一步探讨。

细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)最先由 Chopra 等^[8]从嗜水气单胞菌中克隆测序,其 ORF 长 1 107 bp,编码 368 个氨基酸,并推断 Alt 蛋白 N 端前 18 个氨基酸构成 1 个信号肽序列。本研究测序结果显示,6 个安徽分离株 *alt* ORF 长为 1 104 ~ 1 107 bp,编码 367

~368个氨基酸,Alt蛋白N端均有18个氨基酸残基构成的信号肽疏水区。属于不同毒力基因型、不同表型种和不同动物来源的5个安徽分离株(BA16、CA1、HA6、HA7和GA1)间alt核苷酸序列和氨基酸序列同源性均较高,且与唯一人源嗜水气单胞菌参考株的同源性高达93.5%~95.8%。虽然BA17分离株alt ORF长度与同一毒力基因型的HA7和GA1菌株相同,但其核苷酸序列和推测的氨基酸序列发生了较大变异,表达的Alt蛋白抗原性可能也不同。因此,在研制基因工程疫苗中应考虑选择序列不同的alt基因制备多价苗,提高疫苗效果。

参考文献:

- [1] Sechi L A, Deriu A, Falchi M P, et al. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea[J]. *Applied Microbiology*, 2002, 92: 221 - 227.
- [2] Albert M J, Ansaruzzaman M, Talukder K A, et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(10): 3 785 - 3 790.
- [3] Per E G, Kristin O S, Juan M T, et al. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. From food and water[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, 21: 131 - 137.
- [4] Wang G, Clark C G, Liu C, et al. Detection and characterization of the hemolysin gene *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(3): 1 048 - 1 054.
- [5] 方 兵, 李耀年, 祖国掌, 等. 应用多重PCR检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布[J]. *水产学报*, 2005, 29(4): 473 - 477.
- [6] 龚 晖, 林天龙, 俞伏松, 等. 鳊源嗜水气单胞菌 β -溶血素基因的克隆及表达[J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 124 - 130.
- [7] Fang H M, Ge R, Sin Y M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(5): 645 - 658.
- [8] Chopra A K, Peterson J W, Xu X J, et al. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*[J]. *Microb Pathog*, 1996, 21(5): 357 - 377.
- [9] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier Jenguyen P N, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucl Acids Res*, 1988, 16: 11 141 - 11 156.

Cloning and sequence analysis of virulence genes of six *Aeromonas* strains isolated from aquatic animals in Anhui

FANG Bing, LI Jin-nian, WANG Tian-jie, YU Wei-yi, ZU Guo-zhang

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Three different sets of specific oligonucleotide primers were designed according to the ORF sequences of *aha1*, *hly* and *alt* genes of *Aeromonas*. Three virulence genes of six strains of *Aeromonas* isolated from aquatic animals in Anhui were amplified by PCR technique respectively. The PCR products were cloned into pMD-18T vectors and then sequenced. The results show that *aha1* gene of strains HA7, BA17, GA1 and HA6 contain an ORF of 1 056 - 1 068 bp, encoding 351 - 355 amino acids. *Hly* gene ORF of strains HA7, BA17 and GA13 are all 1 482 bp in length, encoding 493 amino acids. *Alt* gene ORF of six isolates are 1 104 - 1 107 bp in length, encoding 367 - 368 amino acids. Sequence homology comparison shows that the homology at the nucleotide levels for the *aha1* gene are 98.8% - 99.3% and that of the deduced amino acid sequences are 97% - 97.6% among three strains belonging to *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺ virulence genotypes. The nucleotide and deduced amino acid sequences homology of the *aha1* gene are 98.5% - 99% and 96.8% - 97.6% between three strains belonging to *alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁺ virulence genotypes and reference strain Ah/*Trionyx sinensis*/Guangzhou(Guangdong)/AF276639, but only 80.9% - 81.5% and 72.9% - 73.6% between the three virulence strains and strain HA6(*alt*⁺*aha1*⁺*hly*⁻). *Aha1* gene of strain HA6 shares 95.8% nucleotide identity and 97.2% deduced amino acid identity with reference strain Ah/Fish/Barcelona (Spain)/AF183931. The nucleotide homology of *hly* gene among different phenospecies is 88.4% - 100% and de-

duced amino acid homology is 90.8% – 98.7%. The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of *alt* gene among strains HA6, HA7, BA16, CA1 and GA1, and the only reference strain A/Diarrheal disease/Texas (America)/L77573 are 93.5% – 99.9% and 80.2% – 98.3%, but the sequence homology is only 81.6% – 81.7% and 77.5% – 84.9% between the fine strains and strain BA17 strain BA17 at the nucleotide and amino acid levels respectively. All of these results reveal that there are some variation in *aha1* and *alt* gene among different virulence genotypes. *Hly* gene is widely distributed in different phenospecies and shares quite high similarity in nucleotide and deduced amino acid sequences, so *hly* can be used as a candidate for gene engineered sudunit vaccine. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6):966 – 972]

Key words: Aeromonad; Anhui isolation strains; virulence genes; sequence analysis

Corresponding author: LI Jin-nian. E-mail: Lijinnian2000@163.com

欢迎订阅 2007 年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办、上海水产大学承办的以水产科学技术为主的国家级学术刊物,创刊于 1964 年。主要刊载渔业资源、水产养殖与增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文,简报和综述,并酌登学术动态和重要书刊的评价等。

本刊为双月刊,大 16 开,国内外公开发行人。每期定价 25 元,全年定价 150 元(含邮费)。国内统一刊号:CN31 – 1283/S; 国际标准刊号:ISSN 1000 – 0615。国内邮发代号:4 – 297,国外发行代号:Q – 387。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 48 信箱
邮 编:200090

联系电话和传真:021 – 65710232

E-mail: jfc@shfu.edu.cn 或 scxuebao@online.sh.cn