

嗜水气单胞菌 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶基因的克隆表达及酶的性质

龚霞, 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开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 通过水生动物源性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 强毒株 J-1 株与弱毒株 MR-1 株抑制差减杂交得到 *gneJ* 差减片段, 该片段与创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 和人源嗜水气单胞菌的 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4 差向异构酶基因有较高的同源性。扩增完整的 *gneJ* 基因, 进行分布检测并将其克隆至质粒 pET32a(+), 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 中进行异源表达, SDS-PAGE 结果显示, 重组表达蛋白的分子量约 59.7 kD, 与理论推测值基本相同。酶活性分析表明, 该重组蛋白可将 UDP- 乙酰葡萄糖胺转化为 UDP- 乙酰半乳糖胺, 确证 *gneJ* 基因编码蛋白为 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶。Western Blot 分析显示, 嗜水气单胞菌 J-1 株胞外产物的兔抗血清可识别该重组蛋白, 表明该蛋白与天然蛋白有相同的抗原性。以重组蛋白为免疫原, 对小鼠进行动物保护实验, 结果显示, 该重组蛋白对小鼠有 60% 的保护率, 证明 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4 差向异构酶可作为亚单位疫苗的候选成分。[中国水产科学, 2008, 15(1): 106-112]

关键词: 嗜水气单胞菌; 差向异构酶基因; 克隆表达; 抗原性分析

中图分类号: S947

文献标识号: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0106-07

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 是一类广泛存在于水环境的革兰氏阴性菌, 是中国淡水养殖鱼类暴发性传染病的主要病原, 可引起鱼类败血症^[1-2], 亦可引发人类的腹泻或败血症等, 对食物安全具有威胁, 并且是免疫抑制病人和肝功能疾病患者的机会致病菌。因此, 嗜水气单胞菌已成为人兽鱼共患病原菌^[3-4]。

通过抑制差减杂交技术^[5-6]对 Ah 强毒株 J-1 株与 Ah 弱毒株 MR-1 株进行抑制差减杂交时, 发现一差异片段 (命名为 *gneJ*) 的核苷酸序列与创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 的 *wbpP* 基因 (AY350749) 和人源 Ah AH-3 的 *gne* 基因 (DQ119103) 分别有 83% 和 88.3% 的同源性, 推测其功能可能为 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶 (UDP *N*-Acetylgalactosamine 4-Epimerase, EC No.: 5.1.3.7)。为证实该推测, 本实验扩增了 Ah J-1 株 *gneJ* 基因全长, 对其进行水生动物源性 Ah 分布检测并将其克隆至大肠杆菌进行重组表达, 经酶活性分析确证其编码产物为 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶。Rocío Canals 等^[7]报道该酶与嗜水气单胞菌的 LPS 生物合成及毒力作用有关。

革兰氏阴性菌的脂多糖 LPS 有 2 种形式: O 抗

原保守型 A 群 LPS; O 抗原可变量 B 群 LPS。B 群 LPS 是革兰氏阴性菌重要的毒力因子, 它在细菌感染宿主的初始阶段, 逃避宿主防御系统以及定植中起着重要作用^[8-9], 可引起组织损伤和炎症反应。Carole^[10]等报道, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) B 群 LPS 合成功能的缺失突变株相比野生株更敏感于抗血清^[11-13], 更易受噬菌作用影响^[14], 且几乎对鼠无毒作用^[9]。Poole 等^[15]报道, 铜绿假单胞菌所具有的多抗药性与其存在于细菌外膜 B 群 LPS 上的多抗药性泵有关。LPS 的生物合成已成为当前药物研发的重要目标。因此, 研究 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶可为深入研究嗜水气单胞菌的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件 Ah J-1 株系由本实验室陈怀青等从江苏省某养殖场患病的银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 中分离, Ah MR-1 株由罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 分离, 由浙江淡水所提供。Ah4332 菌株分离自牛犊, 来自德国吉森大学。其他 Ah 株分离自 1990~2004 年

收稿日期: 2007-03-30; 修订日期: 2007-05-30.

基金项目: 江苏省攻关 (三药) 项目 (BE2004609).

作者简介: 龚霞 (1981-), 女, 硕士, 研究方向: 鱼类病原微生物.

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

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)。其中 4332 株、W1 株是无致病力菌株,MR-1 株为不产胞外蛋白酶的弱毒株,其他 19 株是强致病性菌株(表 1)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)BL21 及质

粒 pET-32a(+) 由本室保存。Ah J-1 株、大肠杆菌分别于 28 ℃、37 ℃ 摇振过夜培养于 LB 培养基内。当被用于培养携带有质粒的细菌时, LB 培养基添加氨苄青霉素的质量浓度为 100 μg/mL。

表 1 嗜水气单胞菌株宿主及来源
Tab.1 Host and resources of *Aeromonas hydrophila* strains

菌株 Strain	宿主 Host	样品 Sample	来源与时间 Resource and time
J-1	银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1991
TPS30	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1991
TPS49	鳊 <i>P. pekinensis</i>	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1997
MR-1	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 2004
PBS10	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1991
BSK10	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1990
SPS103	鳊 <i>P. pekinensis</i>	肝 Liver	浙江 Zhejiang 1994
SB94-7	鳊 <i>P. pekinensis</i>	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1994
SB94-5	鳊 <i>P. pekinensis</i>	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1994
SBS106	鳊 <i>P. pekinensis</i>	肾 Kidney	浙江 Zhejiang 1994
HA9	鳖 <i>T. sinensis</i>	不详 Unknown	江苏 Jiangsu 1992
DF2CC	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1997
DF43CC	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1991
DF42GC	草鱼 <i>C. idella</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1991
DF850P	鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	肾 Kidney	江苏 Jiangsu 1997
FPK-81	鳊 <i>P. pekinensis</i>	不详 Unknown	浙江 Zhejiang 1991
CHSO0-3	欧鳗 <i>A. japonicus</i>	肝 Liver	福建 Fujian 2000
WC00-2	欧鳗 <i>A. japonicus</i>	肝 Liver	福建 Fujian 2000
L316	日鳗 <i>A. japonicus</i>	肝 Liver	福建 Fujian 2000
AH9617	鲢 <i>H. molitrix</i>	腹水 Abdominal liquid	湖北 Hubei 1996
4332	牛 Calf	不详 Unknown	德国 Germany 1994
W1	池塘水 Pond water		江苏 Jiangsu 1994

1.1.2 试剂 DNA 凝胶抽提试剂盒和 Taq DNA 聚合酶购自上海生兴公司。所有限制性内切酶、DNA 分子量标准、dNTP、IPTG 和 T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司或 Promega 公司。His Bind purification Kit 纯化试剂盒购自 Novagen 公司。UDP-GalNAc 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *gneJ* 基因的全长扩增 根据人源 Ah AH-3 的 *gne* 基因及其两侧序列设计引物, P1: 5-AGAGGATCCATGACAATAT TGGTC AC-3' (划线碱基为 BamHI 酶切位点), P2: 5-ATAGAATTCT CACGGCTTCGCAGTAG-3' (划线碱基为 EcoRI 酶切位点), 扩增 *gneJ* 基因全长。以 Ah J-1 总 DNA 为模板, 按常规方法进行 PCR 反应, 优化后的 PCR 反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 52 ℃ 50 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。引物合成及 DNA 测序均由上海英骏生物技术有限公司进行。

1.2.2 *gneJ* 基因的分布检测 在 Ah J-1 的 *gneJ* 基因的保守区内设计引物 P1: 5'-ATGACAATATTGG CTCGACGG-3'; P2: 5'-TCACGGCTTCPCGGCTT CGCA-3', 对以强毒株 J-1 与弱毒株 MR-1 为代表的不同来源、不同毒力的 22 株嗜水气单胞菌菌株进行 *gneJ* 基因分布检测, 设 ddH₂O 与 *E. coli* BL21 为阴性对照。

1.2.3 *gneJ* 基因的克隆和表达 扩增片段经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后克隆至同样双酶切的 pET-32a(+) 质粒, 转化至 *E. coli* BL21。对重组质粒 pET-32a(+)-*gneJ* 进行酶切鉴定后, 再转化入表达载体 *E. coli* BL21, 对重组质粒进行 DNA 测序分析。将 *E. coli* BL21 pET-32a-*gneJ* 接种于含氨苄霉素的 LB 平板上, 37 ℃ 培养。2 mL 过夜培养菌液接种入 100 mL 含氨苄 LB, 37 ℃ 培养, 当 600 nm OD 值达到 0.6 时加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG, 37 ℃ 诱导 3 h, 4 ℃ 8 000 g 离心 15 min 去上清,

收集沉淀,用1×Binding Buffer(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, 6 mol/L 盐酸胍, pH 7.9)悬浮, 500 Hz 5 s 间歇进行超声裂解, 4℃高速离心分别收集沉淀和上清, 沉淀重悬, 分别取1.5 mL 沉淀液和上清液, 同时取转化空载体 pET-32a(+) 及未经诱导的重组表达菌作对照, 进行 SDS-PAGE 以观察表达产物的存在形式和表达量。表达蛋白在变性条件下用 His Tag Kit 亲和层析柱纯化。将包涵体沉淀重悬于含 6 mol/L 盐酸胍的 1×Binding Buffer, 冰浴 1 h 以彻底溶解包涵体蛋白, 然后 16 000 g 离心 30 min, 取上清, 将上清用 0.45 μm 滤膜过滤, 以备 His-Bind 纯化。

1.2.4 重组 pET-32a(+)-*gneJ* 蛋白的纯化 用 His-Bind Resin purification Kit 纯化重组 pET-32a(+)-*gneJ* 蛋白, 方法按使用说明书进行, 把混匀的 His Bind Resin 转入柱床当液体流到柱底后, 依次加入 3 倍柱体积的去离子水, 5 倍柱体积的 1×Charge Buffer(50 mmol/L NiSO₄), 3 倍柱体积的 1×Binding Buffer。当柱顶部液体流干后, 加入收集的上清, 流速为每小时 10 倍体积, 然后依次加入 10 倍柱体积的 1×Binding Buffer, 6 倍柱体积的 1×Wash Buffer(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 6 mol/L 盐酸胍, pH 7.9), 6 倍柱体积的 1×Elute Buffer(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L 咪唑, 6 mol/L 盐酸胍, pH 7.9) 洗脱蛋白, 将洗脱蛋白用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.9) 在 4℃进行透析, 换液 6 次, 冻干后于 -20℃保存。

1.2.5 表达蛋白 Western blot 分析 参照《分子克隆指南》^[16] 进行, SDS-PAGE 电泳结束后, 将蛋白从凝胶转印至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶溶液 4℃封闭过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入一抗即 Ah J-1 抗血清(体积比 1:100), 37℃反应 2 h。洗膜后再加入 HRP-SPA(1:10 000) 37℃反应 1 h, 最后加入底物 DAB 显色。

1.2.6 酶活性测定 参照 Morgan-Elson 反应方法^[10, 17] 对重组 pET-32a(+)-*gneJ* 蛋白进行酶活测试, 反应总体积为 500 μL: 含 20 μL 表达蛋白溶液(含蛋白 4 μg), 10 mmol/L 氨基乙酸, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 10 μL UDP-GalNAc(终浓度为 1 mmol/L), 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)。37℃反应, 分别在 5 min 和 10 min 时加入 10 μL 5 mol/L HCl 终止反应, 检测波长为 585 nm。重复 3 次酶活测试取结果平均值以增加准确性。

1.2.7 表达蛋白的相对保护率测定 将经镍柱纯化的表达蛋白与弗氏完全佐剂等量充分混合, 形成乳液。首次背部皮下多点注射免疫 20 只实验鼠, 每只注射含蛋白 50 μg 乳液 200 μL。14 d 后与弗氏不完全佐剂等量充分混合, 加强免疫, 以后每隔 1 周加强免疫 1 次。随机选取两只免疫鼠, 尾静脉采血, 由琼脂扩散实验检测抗体效价。当抗体琼扩效价达 1:32 以上时, 即免疫后第 35 天, 对受免疫组与未免疫的对照组小鼠每只腹腔注射 0.2 mL 浓度为 2×10^7 CFU(约 50 LD₅₀, J-1 的 LD₅₀ 为 $0.5 \times 10^{5.4}$ CFU) 的 Ah J-1 株菌液。观察 3 d, 记录各组死亡数, 计算相对保护率(Relative percentage survival, RSP)。计算公式如下: 相对保护率 = (1 - 免疫组死亡百分率 / 对照组死亡百分率) × 100%

2 结果与分析

2.1 *gneJ* 基因序列测定及同源性分析

根据 Ah AH-3 的 *gne* 基因设计引物扩增得到了 *gneJ* 全长基因, GenBank 登录号为 DQ512488。用 EcoRI+BamHI 双酶切所构建的重组质粒对 pET-32a(+)-*gneJ*, 酶切产物电泳结果可观察到约 1 026 bp 的插入片段。插入片段的核苷酸序列测定结果与 *gneJ* 全基因序列完全相符, 证明插入片段的核苷酸序列测定结果与实验设计序列完全一致(图 1)。

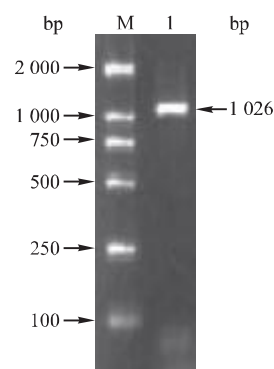


图 1 *gneJ* 基因片段 PCR 扩增结果

Fig.1 Identification of PCR of *gneJ*

M: DNA Marker DL 2000; lane1: PCR product of Ah J-1

gneJ 基因共有 1 026 个碱基, 编码 341 个氨基酸, 进行 BLAST 比对, 结果发现, 其氨基酸序列与大肠杆菌的 UDP-Galactose 4-Epimerase 同源性达 57%, 与铜绿假单胞菌的 UDP-N-Acetylglucosamine 4-Epimerase 有 27% 的同源性。用 Swiss Model spdbv 软件对 *gneJ* 基因编码的氨基酸序列进行三

级结构预测,分析发现,该氨基酸序列的第3至339位与1i3kA,即人源UDP-Galactose 4-Epimerase等蛋白模版有60%的同源性。

2.2 *gneJ*基因的分布

对不同来源的22株嗜水气单胞菌株进行分

布检测,结果显示,19株强致病性Ah均可检测到1026 bp的特异目的条带,MR-1弱毒株、4332与W1两株非致病菌中未检测到该基因,推测*gneJ*基因普遍存在于强致病性Ah菌株中(图2)。

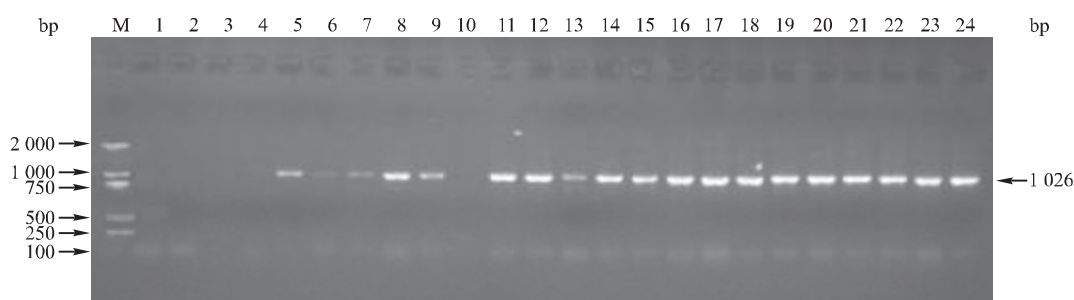


图2 Ah菌株*gneJ*基因的分布检测

Fig.2 Distribution detection of *gneJ* gene of Ah strains

Lane M: DNA Marker DL2 000; lanes 1-24: ddH₂O, *E. coli* BL21, 4332, W1, PBS10, BSK10, SPS103, SB94-7, SB94-5, MR-1, J-1, TPS30, TPS49, SBS106, HA9, DF2CC, DF43CC, DF42GC, DF850P, FPK-81, CHSO0-3, WC00-2, L316, AH9617.

2.3 *gneJ*基因的克隆和表达

经过IPTG诱导,pET-32a(+)-*gneJ*主要以包涵体形式表达重组*gneJ*蛋白,经凝胶扫描确定约占菌体总蛋白的26%,分子量与预期的大小基本一致,约为59.7 kD(图3),这表明所采用的表达体系和条件能高效表达该重组蛋白。转化至pET-32a(+)-BL21空载体的对照菌可诱导表达分子量为22.5 kD的特异蛋白(His片段),重组表达菌则诱导表达了

分子量59.7 kD的特异蛋白,与预期的重组蛋白分子量大小(22.5 kD + 37.2 kD)吻合,同时在22.5 kD处的蛋白带消失了,说明插入的外源基因与His所形成的融合基因成功在大肠杆菌BL21中表达。Western Blot结果显示,Ah J-1株抗血清可以识别分子量为59.7 kD的融合蛋白,表明该重组蛋白具备天然*gneJ*蛋白的部分抗原性(图4)。

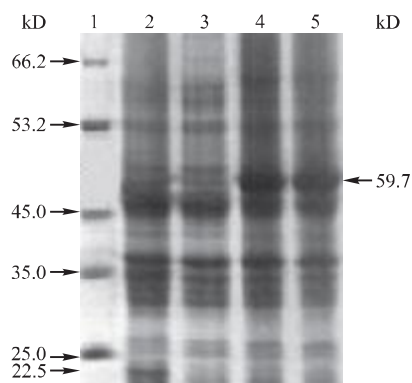


图3 pET32a-*gneJ*表达产物的SDS-PAGE

1: 蛋白Marker; 2: *E. coli* BL21/pET32a空载体诱导; 3: 重组蛋白诱导前; 4: 组蛋白37℃诱导2h; 5: 重组蛋白37℃诱导3h

Fig.3 Analysis SDS-PAGE of pET32a-*gneJ* proteins
lane 1, protein standard molecular weight marker; lane 2, *E. coli* BL21/pET32a(+)-induced by IPTG; lane 3, pET32a(+)-*gneJ* recombinant before induced.

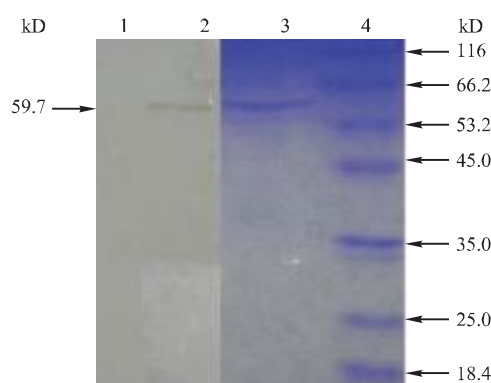


图4 纯化pET32a-*gneJ*表达产物的Western blot

1: *E. coli* BL21/pET32a空载体; 2,3: 纯化的重组蛋白; 4: 蛋白Marker

Fig.4 Western blot of recombinant *gneJ* protein
lane 1, *E. coli* BL21/pET32a(+); lane 2, Western blot of purified pET32a(+)-*gneJ* protein; lane 3, SDS-PAGE of purified pET32a(+)-*gneJ* protein; lane 4, protein standard molecular weight marker.

2.4 重组蛋白酶活性测定

酶活测试结果见表1。Ah J-1 野生株与 pET-32a(+)-*gneJ* 重组菌分别培养于含葡萄糖或半乳糖的 LB 培养基,两者均显示出高 Gal 和 GalNAc 4-epimerase 活性。而根据 Rocío Canals 等报道, Ah AH-3*gne* 基因缺失株完全失去 GalNAc 4-epimerase 活性,在缺失株中插入 *gne* 基因则可恢复 GalNAc

4-epimerase 活性^[10]。据此推断 *gneJ* 基因编码的蛋白更大可能为 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4- 差向异构酶。

2.5 重组蛋白的相对保护率

免疫组和对照组小鼠经 Ah 强毒株 J-1 攻毒后的死亡情况如表2所示,接种 10^7 CFU 组产生了较强的保护力,重组蛋白对免疫小鼠的相对保护率达到了 60%。

表1 AhJ-1 细胞提取物及 pET-32a-*gneJ* 重组蛋白 Gal 及 GalNAc 差向异构酶酶活测试结果

Tab.1 Gal and GalNAc 4-epimerase activities in cell extracts of AhJ-1 and recombinant *gneJ* protein in *E.coli*

$\bar{X} \pm SD$

菌株 Strain	碳源 Carbon source	半乳糖 -4 Gal 4-epimerase activity	乙酰半乳糖 -4- 异构酶 GalNAc 4-epimerase activity
Ah J-1	葡萄糖 Glucose	90.7 $\pm$ 1.4	22.7 $\pm$ 2.1
	半乳糖 Galactose	34.3 $\pm$ 1.1	14.8 $\pm$ 0.9
pET-32a- <i>gneJ</i>	葡萄糖 Glucose	90.1 $\pm$ 1.2	25.8 $\pm$ 1.7
	半乳糖 Galactose	32.6 $\pm$ 1.7	12.5 $\pm$ 1.1

表2 受免和对照组小鼠经 Ah J-1 株攻毒后的免疫保护力

Tab.2 Relative percent survival of immunized and control mice challenged by strain Ah J-1

组别 Trial (CFU/ 只)	攻毒小鼠总数 <i>n</i>	死亡总数 / 只 Death nos.	相对保护率 / % Relative percentage survival
10^7	10	4	60
10^5	10	6	40
对照组 (PBS)	10	10	

3 讨论

Rocío 等^[7] 在人源嗜水气单胞菌 AH-3 株中发现了 *gne* 基因,突变该基因可使细菌黏附性及对动物的毒力作用下降,从而首次证明了 *gne* 为嗜水气单胞菌一个重要的毒力因子。本实验克隆了 Ah J-1 株中的 *gneJ* 基因并在大肠杆菌中进行了高效表达,获得了高纯度、有生物活性的重组蛋白,经酶活性分析证明其为 UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4 差向异构酶。该酶存在于革兰氏阴性菌脂多糖 (LPS) 的核心,通过催化 UDP- 乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc) 和 UDP- 乙酰半乳糖胺 (UDP-GalNAc) 之间的转换在 LPS 的合成中起着关键作用。UDP- 乙酰葡萄糖胺 -4 差向异构酶调节 LPS 的合成,研究该酶对进一步研究嗜水气单胞菌的致病机理其具有一定意义。

目前可选择的 Ah 检测方法包括选择性培养基与生化鉴定、免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和单克隆抗体技术等。选择性培养基鉴别法操作简单,但培养时间较长,且只能用于粗略

检测;免疫荧光抗体标记技术比 ELISA 更敏感,但由于需要荧光显微镜,使其应用受到限制。而 PCR 检测方法具有简便快速、特异性强的优点。对不同来源、不同毒力的嗜水气单胞菌菌株进行 PCR 分布检测,结果显示,强致病性 Ah 菌株均存在 *gneJ* 基因,弱毒株与无毒株则未检测到该基因,推测 *gneJ* 基因普遍存在于强致病性 Ah 菌株中。本实验将抑制性差减杂交技术与 PCR 检测相结合,检测了可能的毒力基因在 Ah 菌株间的分布情况,以验证毒力基因的存在与菌株致病性强弱的相关性,从而探究了新的快速鉴定 Ah 菌株及菌株毒力类型的检测方法。

以重组 *gneJ* 蛋白为免疫原,对小鼠进行动物保护实验,结果显示该重组蛋白对小鼠有 60% 的保护率。Ah J-1 胞外产物的兔抗血清可以识别此融合蛋白,表明该蛋白与天然蛋白有相同的抗原性,可作为重组亚单位疫苗研制的候选成份。同时,对 *gneJ* 基因的分布检测证实了其在水生动物源

性嗜水气单胞菌强致病性菌株中广泛存在,可望用于建立嗜水气单胞菌强致病性菌的快速鉴别诊断方法。

参考文献:

- [1] Deodhar LP, Saraswathi K, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrhea disease [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(5): 853-856.
- [2] Handfield M, Simard P, Couillard M, et al. *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT229) [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (9): 3 459-3 461.
- [3] Altwegg M, Geiss H K. *Aeromonas* as a human pathogen [J]. Crit Rev Microbiol, 1989, 16: 253-286.
- [4] Janda J M, Duffey P S. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy laboratory identification and infectious disease spectrum [J]. Rev Infect Dis, 1988, 10: 980-997.
- [5] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppressions subtractive hybridization: A method for gene rating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93 (12): 6 025-6 030.
- [6] Stocki S L, Babiuk L A, Rawlyk N A, et al. Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K_12MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis [J]. Microb Pathog, 2002, 33 (6): 289-298.
- [7] Rocío Canals, Natalia Jiménez, et al. The UDP N-Acetylgalactosamine 4-Epimerase Gene Is Essential for Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Serotype O34 Virulence [J]. Infect Immun, 2006, 74, 537-548.
- [8] Cryz S J, Jr Pitt, Furer T L E, et al. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 1984, 44: 508-513.
- [9] Pier G B, Thomas D M. Lipopolysaccharide and high-molecular-weight polysaccharide serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Infect Dis, 1982, 148: 217-223.
- [10] Carole Creuzenet, Myriam Belanger, Wakarchuk W W, et al. Expression, purification, and biochemical characterization of WbpP, a New UDP-GlcNAc C4 epimerase from *Pseudomonas aeruginosa* Serotype O6 [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 19 060-19 067.
- [11] Hancock R E, Mutharia L M, Chan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains [J]. Infect Immun, 1983, 42, 170-177.
- [12] Schiller N L, Hatch R A. The serum sensitivity, colonial morphology, serogroup specificity, and outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from several clinical sites [J]. Diagn Microbiol Infect Di, 1983, 1: 145-157.
- [13] Goldberg J B, Pier G B. *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolysaccharides and pathogenesis [J]. Trends Microbiol, 1996, 4: 490-494.
- [14] Engles W, Endert J, Kamps, M A F, et al. Role of lipopolysaccharide in opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infect Immun, 1985, 49: 182-189.
- [15] Poole K, Krebs K, McNally C, et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon [J]. J Bacteriol, 1993, 175: 7 363-7 372.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] Wang L S, Huskic A, Cisterne D, et al. The O-antigen gene cluster of *Escherichia coli* O55: H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 2 620-2 625.

Cloning and expression of UDP N-acetylgalactosamine 4-epimerase gene from *Aeromonas hydrophila* and characteristics of the enzyme

GONG Xia, LU Cheng-ping, YAO Huo-chun

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

Abstract: The *gneJ* gene was subtracted from SSH between high virulent strain J-1 and low virulent strain MR-1 of aquatic *Aeromonas hydrophila* strains. It was highly homologous to *wbpP* gene of *Vibrio vulnificus* and *gne* gene of Ah AH-3. Full length of *gneJ* gene was amplified by PCR, and its distribution was detected. Then it was cloned into plasmid pET32a(+) and transformed into *E.coli* BL21, induced by IPTG and expressed. The results of SDS-PAGE showed that recombinant protein molecular weight was 59.7 kD. Enzyme activity assay showed that the recombinant protein was a UDP N-acetylgalactosamine 4-epimerase, which could catalyze the inter conversion of UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc. So the *gneJ* gene was identified to encode a UDP N-acetylgalactosamine 4-epimerase. The result of recombinant protein Western Blot with Ah J-1 antiserum revealed that *gneJ* recombinant protein had similar antigenicity to savageness protein. The mice were immunized with the recombinant protein, then challenged by Ah J-1 strain (50LD₅₀), showing that the relative percentage survival (RPS) of recombinant protein to the immunized mice was 60%. The research suggests that *gneJ* gene commonly present in the pathogenic Ah and play an important role in pathogenesis. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 106-112]

Key words: *Aeromonas hydrophila*; UDP N-Acetylgalactosamine 4-Epimerase; cloning and expression; antigenicity analysis

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