

文章编号: 1674-5566(2010)02-0151-06

温和气单胞菌 TL97528株丝氨酸蛋白酶基因片段 克隆与序列分析

沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 尹文林, 曹 铮

(浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

摘 要: 中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 细菌性疾病主要由气单胞菌感染引起的, 通过脱脂奶平板检测及酶活性试验得出温和气单胞菌 TL97528株分泌的胞外蛋白酶为丝氨酸蛋白酶, 而丝氨酸蛋白酶是气单胞菌的主要毒力因子。根据已发表的嗜水气单胞菌的丝氨酸蛋白酶基因序列保守区域设计引物, PCR扩增出一长度为 809 bp 大小的特异片段, 该序列在 Genbank 上的登录号为 FJ357446。对该序列进行分析发现, 已发表的温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号为 AF253471) 同源率为 98%, 与其他几株已发表的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号分别为 AF126213、AY841795、DQ127822、CF000462、CF000644、AF159142) 同源率分别为 98%、82%、82%、82%、81%、81%, 与杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号为 X67043) 同源率为 80%。用 DNAstar 软件分析, 与鳖源温和气单胞菌 TK961010 株的同源率为 98%, 与鱼源嗜水气单胞菌 BSK-10、TPS-30 和 J-1 株有较高的同源率, 均为 81%。同时分析了丝氨酸蛋白酶基因的进化关系, 发现中华鳖分离的气单胞菌 TL97528 株与 TK961010 株关系较近; 从鱼分离的气单胞菌 BSK-10、TPS-30 和 J-1 株聚为一簇, 亲缘关系较近。

关键词: 中华鳖; 气单胞菌; 丝氨酸蛋白酶; 基因; 克隆

中图分类号: S917 文献标识码: A

Cloning and sequence analysis of serine protease gene of *Aeromonas sobria* strain TL97528 from *Trionyx sinensis*

SHEN Jin-yu, LI Xinhua, PAN Xiaoyi, YIN Wenlin, CAO Zheng

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: *Aeromonas sobria* TL97528 isolated from soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) is the pathogen of *Trionyx sinensis* bacterial disease. And serine protease is the major virulence factor of *aeromonas*. A pair of primers was designed according to the nucleotide sequences of the serine protease gene of *aeromonas* species reported in GenBank. Desired fragment about 809 bp was amplified from TL97528 genome by the specific primers. The PCR product was cloned into pMD18-T vector and sequenced. The sequence has been deposited in the GenBank database (accession number FJ357446) and was compared with the corresponding regions of *aeromonas* strains registered in GenBank and TK961010, BSK-10, TPS-30, J-1 by DNAstar. The nucleotide sequence of TL97528 showed 98% homology to AF253471, 98% to AF126213, 82% to AY841795, 82% to DQ127822, 82% to CF000462, 81% to CF000644, 81% to AF159142, 80%

收稿日期: 2009-02-02

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD03B05)

作者简介: 沈锦玉 (1963-) 女, 研究员, 主要从事水生动物病害方面的研究。TEL: 0572-2041403 E-mail: sjnyu@126.com

homology to X67043 and 98% homology to TK961010 81% homology to BSK-10 TPS30 J1. Phylogenetic tree of serine protease gene sequence showed that strain TI97528 clustered together with TK961010. BSK-10 TPS30 and J1 were clustered together.

Key words: *Trionyx sinensis*; aeromonas; serine protease; gene cloning

中华鳖 (*Trionyx sinensis*)是我国名特优水产养殖种类,随着养殖规模的扩大及养殖时间的增加,病害威胁日益凸现。气单胞菌已被证实为中华鳖肠道出血性败血症、穿孔病、腐皮病和红脖子红底板病等的主要病原^[1-3],其分泌的胞外产物中主要包括的外毒素和胞外蛋白酶都是重要的致病因子^[4-6]。目前,防治水生动物气单胞菌病主要使用抗生素,抗生素的残留和抗药性已严重危害人类公共卫生安全;同时由于气单胞菌血清型较多,单价灭活疫苗保护性并不好,因此,通过对不同的气单胞菌菌株蛋白酶基因序列的比较有助于发现具有共同基因序列的片段。本试验通过在气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因序列保守区域设计引物进行 PCR 扩增获得气单胞菌 TI97528 丝氨酸蛋白酶基因序列片段,并对其进行分析,以期能为气单胞菌快速检测或确诊、基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗的开发、蛋白酶的结构和进化关系等研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒载体

气单胞菌菌株 TI97528、TK961010、BSK-10、TPS30 和 J1 为本单位分离或保存; TI97528 和 TK961010 为温和气单胞菌,分离自患病的中华鳖^[1], BSK-10 和 TPS30 为嗜水气单胞菌分离自患病的鲫和鲢^[7], J1 株由南京农业大学分离自鲫^[5]。E. coli DH5 α 为浙江大学动科院动物传染病实验室保存, BMD 18-T Vector 连接试剂盒购自宝生物工程公司。

1.2 酶和其它试剂

Taq 酶、dNTP 限制性内切酶 PstI 和 EcoRI、蛋白酶 K 和溶菌酶均购自宝生物工程公司, LB 培养基所用蛋白胨和酵母粉为 OXOD 公司产品, PCR 纯化试剂盒为上海申能博采公司产品;引物合成和产物测序委托上海申能博采公司完成。

1.3 蛋白酶活性检测

参照李焕荣等^[8]的方法,在 TSA 固体培养基

中加入 1% 的脱脂奶,划线接种待检气单胞菌菌株 TI97528、TK961010、BSK-10、TPS30 和 J1, 30 °C 培养过夜。

1.4 蛋白酶鉴定

参照 Li 等^[9]稍微改动:气单胞菌接种 TSB 液体培养基, 30 °C 培养过夜,菌液离心取上清,截留为 10 kD 的超滤杯浓缩即为粗制蛋白酶;取一底物为 1% 酪蛋白的琼脂平板打孔,孔内分别加入 30 μ L 含有 EDTA、EGTA、HMSF、碘乙酸, L-半胱氨酸, SDS、DTT、2-巯基乙醇, CuCl₂、ZnCl₂、CaCl₂ 和 MgCl₂ (浓度见表 1) 的粗制蛋白酶,并设一阳性对照 (只加蛋白酶) 和阴性对照 (TSB 液体培养基), 30 °C 过夜, 10% 三氯乙酸终止;分别测溶蛋白圈直径,与阳性对照作比较 (两者的比值乘上 100%) 即为蛋白酶相对活性。

1.5 PCR 检测

1.5.1 细菌 DNA 提取

细菌 DNA 提取用蛋白酶 K/SDS 法^[10]进行,挑取 TI97528 单菌落接种 TSB 液体培养基, 30 °C 摇床培养过夜;取 1.0 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min 弃上清; 500 μ L 溶液 I 重悬浮细菌;加入溶菌酶至终浓度为 5 mg/mL, 37 °C 作用 30 min 加入蛋白酶 K 至终浓度为 0.1 mg/mL 和 50 μ L 的 10% SDS 65 °C 水浴 3 h 用等体积苯酚,氯仿抽提 3 次;取上清加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠 (NaAc) 和 2 倍体积无水乙醇,轻摇析出 DNA, 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 70% 乙醇洗涤 2 次,自然干燥, TE 溶解备用。

1.5.2 PCR 引物设计

从 GenBank 上读取气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因序列, DNASTAR 软件分析后在 AF126213 最保守部位设计引物。上游引物 P₁: 5' - TCGGTAGCAACATCTTCTGAG-3', 下游引物 P₂: 5' - CGATTGCCGTAGAACTTGT-3', 其中上游引物与丝氨酸蛋白酶基因 AF126213 的 890 ~ 912 bp 相同, 下游引物与丝氨酸蛋白酶基因 1 679 ~ 1 698 bp 相同, 预计扩增片段长度为 809 bp。

1.5.3 PCR扩增

根据所设计引物的 T_m 值,设定 PCR退火温度 54 °C; PCR程序为: 94 °C预变性 5 min 94 °C变性 40 s 54 °C退火 1 min 72 °C延伸 1 min 35个循环后 72 °C延伸 10 min PCR反应体系为 50 μ L,其中包括 100 pM的模板, 10 \times Buffer(不含 $MgCl_2$) 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 5 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各 1 μ L, Taq酶 0.5 μ L(2.5 U), Milli-Q水补足至 50 μ L。

1.5.4 PCR产物鉴定

用 1%琼脂糖进行电泳,在凝胶成像仪 (BioRad)中观察,拍照,检测片段长度是否与预计长度一致。

1.6 PCR产物克隆

上述 PCR产物用 PCR产物试剂盒纯化,按 EMD 18-T Vector试剂盒说明进行连接,取 5 μ L连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,涂布含 100 μ g/ml氨苄青霉素 (AMP)的 LB平板,37 °C过夜;次日挑单菌落,碱裂解法抽取质粒。

1.7 重组质粒的鉴定

1.7.1 酶切鉴定

用限制性内切酶 PstI 和 EcoRI 对抽取的质粒进行双酶切,酶切产物用 1%琼脂糖电泳,并以 PCR产物为对照。

1.7.2 PCR鉴定

用上述合成的引物,按 1.5.3所述方法以抽提的重组质粒为模板进行 PCR。

1.8 DNA序列分析

重组质粒委托上海申能博采生物公司测序,所得序列在 GenBank上与其他气单胞菌菌株丝

氨酸蛋白酶基因进行同源性比较。同样方法获得本实验室保存的另 4株气单胞菌 TK961010、BSK-10、TPS30和 J-1丝氨酸蛋白酶基因序列,用 DNAstar比较同源性。

1.9 进化树构建及分析

将完成测序的 T197528、TK961010、BSK-10、TPS30和 J-1丝氨酸蛋白酶基因序列与已发表的 6株嗜水气单胞菌 (GenBank登录号分别为: AF126213、AY841795、DQ127822、CF000462、CF000644、AF159142)及杀鲑气单胞菌 (X67043)、温和气单胞菌 (AF253471)丝氨酸蛋白酶基因序列用 DNAstar Megalign软件构建进化树,分析进化关系。

2 结果

2.1 蛋白酶活性检测

在培养箱过夜后,平板上单菌落周围出现明显的溶蛋白圈,说明 T197528、TK961010、BSK-10、TPS30和 J-1 5株气单胞菌均表现出较强的蛋白酶活性,细菌分泌的蛋白酶将培养基中的脱脂奶消化,使得菌落周围形成透明圈,而未长菌落的培养基部分则可见脱脂奶的乳白色。

2.2 蛋白酶鉴定

通过各种酶活抑制剂对酶活性的影响,得出丝氨酸蛋白酶抑制剂 EMSF对该蛋白酶有明显抑制作用,而金属蛋白酶抑制剂 EDTA和 EGTA及半胱氨酸蛋白酶抑制剂碘乙酸对酶活影响则不是很明显(表 1),由此初步确定菌株 T197528分泌的蛋白酶为丝氨酸蛋白酶。

表 1 酶活抑制剂、螯合剂及金属离子对蛋白酶活性影响

Tab 1 Effects of Protease inhibitors, chelating agents and metal ions on purified ECP Protease

试剂	浓度 (mmol/L)	相对活性 (%)	试剂	浓度 (mmol/L)	相对活性 (%)
EDTA	5	100	2-巯基乙醇	5	75
EGTA	5	113	$CuCl_2$	10	58
EMSF	5	54	$ZnCl_2$	10	58
碘乙酸	10	75	$CaCl_2$	10	130
L-半胱氨酸	5	120	$MgCl_2$	10	100
SDS	10	140	阳性对照		100
DIT	2.5	75	阴性对照		0

2.3 PCR产物

以 $\Pi 97528$ 菌株基因组为模板, 经 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物大小为 800 bp 左右, 与预计片段大小相符 (图 1)。

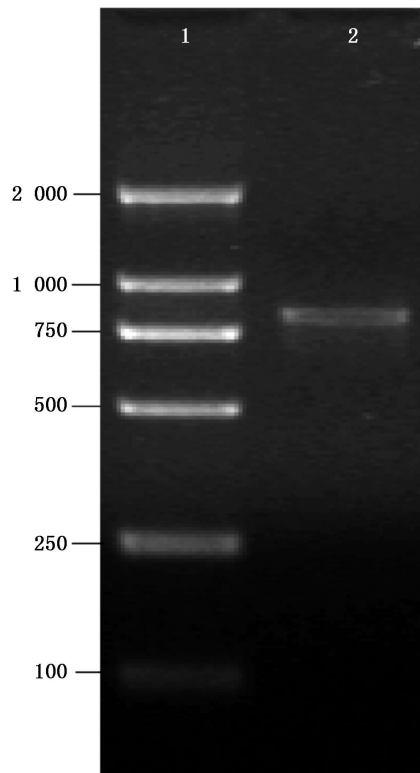


图 1 $\Pi 97528$ 基因组 PCR 产物
Fig. 1 PCR amplification of $\Pi 97528$ serine protease gene
1 标准分子量 DL2000, 2 PCR 产物。

2.4 重组质粒的鉴定

重组质粒经 *Pst*I 和 *Eco*RI 双酶切, 出现预期的两个条带, 较小的条带片段大小与以重组质粒为模板 PCR 扩增获得的产物大小相当 (图 2)。说明 PCR 产物连接 T 载体 EMD 18-T 成功。

2.5 DNA 序列分析

$\Pi 97528$ 菌株丝氨酸蛋白酶基因片段测定的序列递交 GenBank 该序列在 Genbank 上的登录号为 FJ57446。同时进行同源性比较, 结果表明 $\Pi 97528$ 菌株丝氨酸蛋白酶基因片段与 GenBank 上已发表的温和气单胞菌 (*A. sobria*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号为 AF253471) 同源性为 98%, 与其他几株已发表的嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号

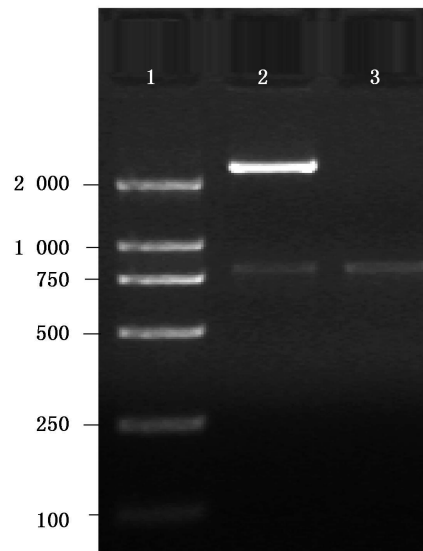


图 2 重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant Plasmid

1 标准分子量 DL2000, 2 经双酶切鉴定; 3. PCR 鉴定。

分别为 AF126213、AY841795、DQ127822、CR000462、CR000644、AF159142) 同源性分别为 98%、82%、82%、82%、81%、81%, 与杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 丝氨酸蛋白酶基因 (GenBank 登录号为 X67043) 同源性为 80%。用 DNAstar 软件分析, 与肇源温和气单胞菌 TK961010 株的同源性为 98%, 与鱼源嗜水气单胞菌菌株 BSK-10、TPS30、J1 株的同源性均为 81%。

2.6 系统进化关系

根据序列同源性比对结果, 选取同源性高的菌株的序列构建系统进化树 (图 3) 发现其中分离自国内的菌株中, 肇源分离株 $\Pi 97528$ 株与 TK961010 株聚为一簇; 从鲫、鳊等鱼源的分离株 HB99、BSK-10、J1 和 TPS30 株聚为一簇; 欧洲鱼源分离株 MT0004、A449 和 AC2 聚为一簇。从此系统进化树可看出, 国内分离株的丝氨酸蛋白酶基因与宿主存在一定的相关性。

3 讨论

蛋白酶是气单胞菌的主要致病因子之一, 与菌株毒力密切相关^[1]。气单胞菌能产生多种蛋白酶, 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, 同时也为细菌增殖提供营养^[12-13]。李瑾年等^[6]研究认为气单胞菌的胞外蛋白酶和外毒素如溶血素等在致病性

方面起协同作用,蛋白酶能活化溶血素。其他的一些研究也证实了蛋白酶是气单胞菌重要致病因子, Cumberbatch等^[14]发现,在细菌培养过程中加入丝氨酸蛋白酶抑制剂 EMSF降低了一株 Ah

胞外产物的毒性;储卫华等^[15]用转座子 Tr916诱变 AhJ1株的蛋白酶缺失株 MJ1,发现该菌株对鲫致病力明显降低。

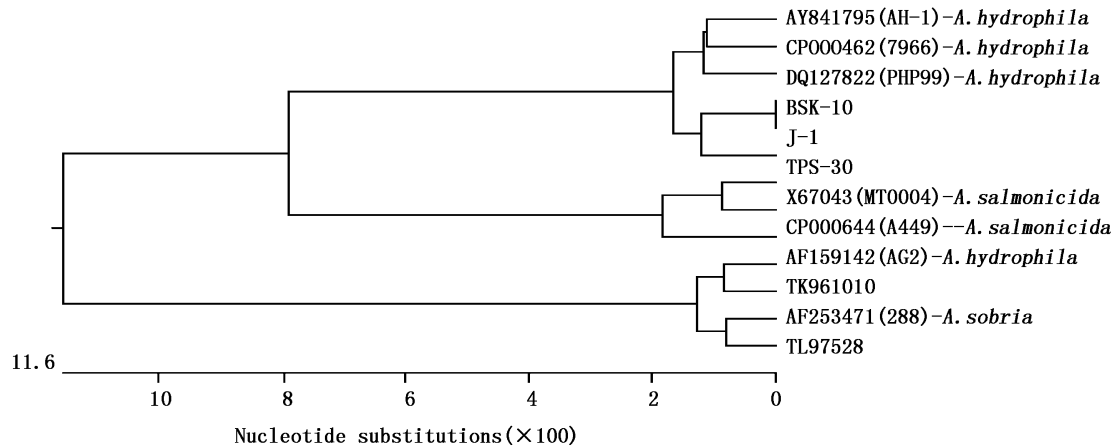


图3 气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Aeromonas* based on serine protease genes

检测气单胞菌能否分泌胞外蛋白酶是判定该菌株有无致病性的重要依据,而气单胞菌胞外蛋白酶的分泌受到环境、营养成分及培养温度等因素影响,体外培养往往不能分泌胞外蛋白酶^[16]。因此通过PCR扩增细菌蛋白酶基因可以方便、准确地检测到细菌是否具有分泌胞外蛋白酶的能力。PCR检测细菌毒力基因关键在于引物的设计^[17],本试验所用的PCR引物基于GenBank上已发表的气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因保守区域设计,不仅适用于试验菌株 TL97528而且另一株分离自中华鳖的气单胞菌 TK961010以及分离自鱼的气单胞菌 BSK-10、TPS30与 J1均能通过PCR扩增获得特异性的丝氨酸蛋白酶基因片段,扩增获得基因序列比较发现同源性相差较大,充分说明了试验所用PCR引物保守性较高;结合底物平板试验更说明了PCR检测蛋白酶基因的特异性和准确性。

通过 TL97528与其他来源的气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因同源性比较及构建进化树发现, TL97528与同样分离自中华鳖的气单胞菌 TK961010株丝氨酸蛋白酶基因同源性最高,进化关系近,同样分离自鱼的气单胞菌 PHP99、BSK-10、TPS30与 J1株丝氨酸蛋白酶基因同源性也

最高,进化聚为一类,而与其他来源的气单胞菌菌株丝氨酸蛋白酶基因则有一定的差异,提示气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因可能跟宿主存在相关性。这可能与宿主生理条件差异、不同养殖环境有一定关系,细菌生长条件的改变导致基因的变异。因此,基于这种考虑,在寻找气单胞菌胞外丝氨酸蛋白酶基因保守区域的同时,也寻找基因变异区域,对于研究亚单位疫苗、蛋白酶的结构以及对宿主的致病机理可能更有帮助,也有利于发现更有针对性的诊断方法和治疗方法。关于气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因的报道,国内仅有储卫华等^[18]报道的嗜水气单胞菌 J1株丝氨酸蛋白酶基因片段,本实验研究中华鳖源和鱼源分离株的气单胞菌中克隆丝氨酸蛋白酶基因,并对不同地区和不同来源的气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因进行系统进化分析,初步得出国内分离株的气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因可能跟宿主存在相关性。由于气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因序列资源的限制,本研究的样品量受到限制,对于不同种或不同来源的气单胞菌菌株的丝氨酸蛋白酶基因分析留待以后进一步深入研究。期望本实验的研究结果,能对气单胞菌感染水生动物的致病机理研究有所帮助。

参考文献:

- [1] 沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 养殖鳖主要细菌性疾病病原的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报, 1999 (1): 29—33
- [2] 孙佩芳, 蔡完其. 中华鳖温和气单胞菌的病原研究[J]. 淡水渔业, 1998 28(4): 3—5.
- [3] 杨先乐, 周剑光, 柯福恩, 等. 中华鳖出血性肠道坏死症流行病学[J]. 中国水产科学, 1998 5(2): 73—78.
- [4] 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: 3785—3790.
- [5] 崔树玉, 孙启华, 李景学, 等. 260株气单胞菌的表型特性与毒素原性研究[J]. 微生物学通报, 1997 24(4): 227—230
- [6] 李耀年, 余为一, 魏梅芳. 36株气单胞菌外毒素溶血性和致病性的测定[J]. 中国预防兽医学报, 2000 22(2): 130—132
- [7] 沈锦玉, 陈月英, 沈智华, 等. 浙江省养殖鱼类暴发性流行病病原的研究 I. 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 分离、致病性及生理生化特性[J]. 科技通报, 1993 9(6): 391—401
- [8] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的检测[J]. 水生生物学报, 1997 21(1): 97—100
- [9] Liu P C, Lee K K, Tuete C C. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*[J]. *Current Microbiology* 1997 35: 32—39
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory 1989
- [11] 凌红丽, 陆承平, 陈怀青. 6株嗜水气单胞菌的毒力因子及其对小白鼠的致死性[J]. 中国兽医学报, 1999 19(3): 255—257.
- [12] Ljungh A, Wadstrom T. Toxins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila*[J]. *Toxicol Toxicin Rev* 1983 1: 257—307
- [13] Shieh H S. Protection of atlantic salmon against motile aeromonad septicemia with *Aeromonas hydrophila* protease[J]. *Microbios Lett* 1987 36: 133—138
- [14] Cumberbatch N, Gurwith M J, Langston C, et al. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates diarrheal disease[J]. *Infect Immunol* 1979 23: 829—837.
- [15] 储卫华, 陆承平. 筛选用转座子 Tn916诱变的具有免疫原性的嗜水气单胞菌蛋白酶缺失株[J]. 水产学报, 2001 25(3): 244—248.
- [16] 储卫华, 陆承平. 培养条件对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶合成与分泌的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001 24(3): 65—68
- [17] 陆承平, 陈怀青. 用 PCR检测嗜水气单胞菌毒素基因[J]. 中国动物检疫, 1995 12(5): 5—7.
- [18] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌 J-1株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2004 28(1): 84—88