

文章编号:1000 - 0615(2002)01 - 0552 - 07

## 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 ompTS 的克隆与序列分析

黄 晓, 叶巧真, 何建国, 谢俊峰, 王顺强

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:**根据已发表的外膜蛋白基因 *ompII* 的核苷酸序列设计引物, 从分离自患红底板病的中华鳖的嗜水气单胞菌中扩增得到了 *ompTS* 基因。对 *ompTS* 基因进行序列分析, 发现其与 *ompII* 基因的核苷酸序列有 83.5% 的同源性。*ompTS* 基因最长的开放阅读框(ORF)为 1068nt, 编码由 355 个氨基酸组成, 分子量为 38.9 kDa 的蛋白质 OmpTS, 其氨基酸序列的前 20 个氨基酸残基可能组成信号肽。由 *ompTS* 基因推导的编码氨基酸序列与其它细菌外膜蛋白的氨基酸序列的比较结果, 进一步证实细菌外膜蛋白氨基酸序列的 N 端存在高度保守区。根据序列分析结果推测, *ompTS* 基因很可能是一个新的基因, 编码 38.9 kDa 的嗜水气单胞菌外膜蛋白 OmpTS, 该蛋白质在膜中极有可能形成孔道, 具备与孔蛋白相似的性质。

**关键词:**嗜水气单胞菌; 外膜蛋白; *ompTS* 基因

**中图分类号:** Q132.1; Q343.1 **文献标识码:** A

### Cloning and sequence analysis of outer membrane protein gene *ompTS* of *Aeromonas hydrophila*

HUANG Xiao, YE Qiao-zhen, HE Jian-guo, XIE Jun-feng, WANG Shun-qiang  
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** In this paper, a pair of primers were designed according to the nucleotide sequence of the *ompII* gene of *Aeromonas hydrophila* reported. With the specific primers, one target fragment about 1kb was amplified from the *A. hydrophila* genomic DNA via PCR. The target fragment was inserted into the linearized plasmid vector pRSET A. The nucleotide sequence of the inserted fragment, containing *ompTS* gene, was determined. The longest open reading frame (ORF) of 1068nt was identified and predicted to encode a 355-aa protein OmpTS with the molecular weight of 38.9 kDa. Hydrophobicity analysis suggested that except for a potential 20-amino-acid signal peptide, the protein was hydrophilic. The nucleotide sequence of *ompTS* gene showed 83.5% homology to the sequence of *ompII* gene. A Genbank search using the BLASTP program found that, the predicted amino acid sequence of the *ompTS* gene showed substantial identity with those of the outer membrane proteins reported in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Photobacterium profundum* and *Citrobacter freundii*. Based on the amino acid sequence comparison, a high degree of amino acid sequence conservation at N-terminal was revealed. These analysis indicated that the *ompTS* gene is probably a novel structural gene that codes for OmpTS, which most likely forms pores in the outer membrane.

收稿日期: 2001 - 09 - 28

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30000128)

作者简介: 黄 晓(1976 - ), 女, 广东潮州人, 助教, 硕士。E-mail: xiao-huang@163.net

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; outer membrane protein; *ompTS* gene

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是引起水产动物疾病的重要病原,给水产养殖业造成极大的经济损失。由于此菌的血清型多,使其灭活疫苗的使用受到限制,商品化生产不理想。解决此问题的关键在于找出嗜水气单胞菌的共同保护性抗原,以制备对不同血清型菌株均有保护作用的疫苗。研究根据已发表的外膜蛋白基因 *ompII* 的核苷酸序列<sup>[1]</sup>,设计了一对特异引物,从嗜水气单胞菌中扩增得到了外膜蛋白基因 *ompTS*,并对其序列进行详细的分析,以期为在大肠杆菌中进行 *ompTS* 基因的表达,研制嗜水气单胞菌外膜蛋白基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试菌株:嗜水气单胞菌分离自患红底板病的濒死中华鳖,由中山大学寄生虫研究室保存。

宿主菌和质粒载体:大肠杆菌 XL1-Blue 购自 CLONTECH Laboratories, Inc.,其基因型为: *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *lac*<sup>-</sup>, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi*-1, [*F lac*<sup>f</sup> *Z* M15, *proAB*, *Tn10*]。质粒载体 *pRSETA* 由香港大学动物系陈博士惠赠。

培养基:营养肉汤培养基购自广东省环凯微生物科技公司。LB 培养基购自 Oxoid Ltd.。

酶类:限制性内切酶购自 Promega 公司。

引物:由上海基康生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

细菌培养条件:嗜水气单胞菌接种于营养肉汤培养基,28℃ 培养 24 h。大肠杆菌接种于 LB 培养基,37℃ 培养 16~20h。

PCR 反应模板的制备:取一定浓度的嗜水气单胞菌悬液 200μL,100℃ 加热 10min,5 000r·min<sup>-1</sup> 离心 10min,取上清,即可用于扩增。

目标片段的 PCR 扩增:PCR 试剂盒购自华美生物工程公司。反应程序如下:(1) 94℃ 5min;(2) 94℃ 变性 1min,55℃ 复性 1min,72℃ 延伸 1min;35 个循环;(3) 72℃ 10min。

目标片段的回收与纯化:PCR 产物于 1% 琼脂糖进行凝胶电泳,目标片段回收根据 GibcoBRL 公司胶回收试剂盒操作说明书进行。

目标片段的克隆:参照 Sambrook 等<sup>[2]</sup>方法进行。回收的 PCR 片段经 *Bam*HI 酶切,克隆于质粒 *pRSETA* 的 *Bam*HI 和 *Pvu*II 位点,酶切和 PCR 筛选阳性克隆子。

测序:重组质粒送上海基康生物技术有限公司测序。正向引物为 T7 Promoter Primer,反向引物如下:5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

本研究根据外膜蛋白基因 *ompII* 的核苷酸序列设计的特异性引物,上游引物(F1)为 23nt,其核苷酸序列为:5'-CCG GAT CCA TGA AAA AGA CAA TT-3'。其中,CC 为另外加入的保护性碱基,GGATCC 为引入的 *Bam*HI 酶切识别序列,之后的 ATG 为 *ompII* 基因的起始密码子,该引物的 GC 含量为 55%。下游特异性引物(R1)有 21nt,核苷酸序列为:5'-TTA GAA GTT GTA TTG CAG GGC-3'。该引物的 GC 含量为 55%。这对特异性引物预计将扩增出一个约 1kb 的 DNA 片段。

PCR 扩增结果如图 1 所示,在约 1kb 处有亮带出现,表明已得到与预期大小相符的片段。

### 2.2 重组质粒的酶切鉴定

如图 2 所示,将重组质粒经 *Bam*HI/*Eco*RI 酶切后,得到大小分别为约 3kb 和 1kb 的两条片段,与预

期结果相符,表明此质粒是含插入片段的阳性重组子。

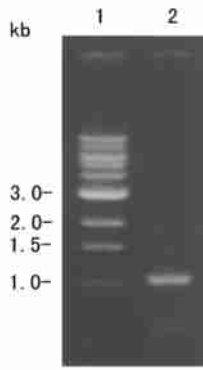


图1 嗜水气单胞菌 *ompTS* 基因的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of *ompTS* gene of *A. hydrophila*  
1. 1 kb DNA 分子量标准; 2. PCR 产物

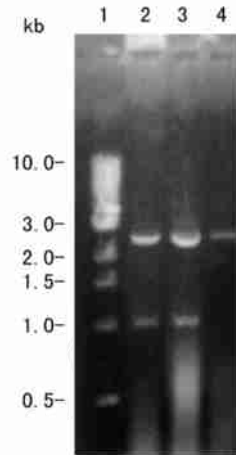


图2 重组质粒的 *Bam*HI/ *Eco*RI 酶切鉴定结果  
Fig. 2 Characterization of the recombinant plasmids

by *Bam*HI/ *Eco*RI digestion  
1. 1 kb DNA 分子量标准; 2 - 3. 经 *Bam*HI/ *Eco*RI 酶切的重组质粒; 4. 载体 pRSET A

### 2.3 测序

重组质粒的 DNA 序列测序结果显示一段全长为 1068nt 的核苷酸序列。因该核苷酸序列的来源菌株分离自中华鳖 (*Trionyx sinensis*), 取中华鳖拉丁文种属名的首字母, 将其命名为 *ompTS* 基因。将 *ompTS* 基因 (1068nt) 与 *ompII* 基因 (1056nt) 的核苷酸序列进行比较, 结果如图 4 所示。从比较结果可以看到, 两者有较高的同源性, 达 83.5%。

使用 DNA Tools 软件对 *ompTS* 基因进行分析, 发现其最长的开放阅读框 (ORF) 为 1068nt, 编码一个由 355 个氨基酸组成、分子量为 38.9 kDa 的蛋白质, 将它命名为 Omp TS, 见图 4。Omp TS 有 112 个带电荷的氨基酸, 等电点 (pI) 为 4.65, 与 Omp II 的氨基酸序列有 81.4% 的一致性。

### 2.4 疏水性分析

对 Omp TS 的氨基酸序列进行疏水性分析<sup>[3]</sup>, 结果显示由 *ompTS* 基因推导出的编码氨基酸序列中, 前 20 个氨基酸残基构成一明显的疏水区。根据信号肽的共同特征推测, *OmpTS* 氨基酸序列的前 20 个氨基酸残基可能组成信号肽。故成熟的 Omp TS 由 335 个氨基酸组成, 分子量为 36.9 kDa。

### 2.5 *ompTS* 基因编码的蛋白质与其它细菌外膜蛋白氨基酸序列一致性的比较

用 BLASTP 在 Genbank 查找时发现, 由 *ompTS* 基因推导出的编码氨基酸序列与其它细菌外膜蛋白的氨基酸序列有较高的一致性, 这些外膜蛋白包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 OmpN<sup>[4,5]</sup>、Omp YEDS<sup>[4]</sup> 和 PhoE<sup>[6]</sup>, 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的 Omp K36<sup>[7]</sup> 和 Omp K37<sup>[8]</sup>, 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 的 OmpS1<sup>[9]</sup> 和 OmpS2, 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的 OmpF<sup>[10]</sup>, 深海发光杆菌 (*Photobacterium profundum*) 的 OmpL<sup>[11]</sup>, 弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 的 PhoE<sup>[12]</sup> 等。查找结果如表 1 所示。

## 3 讨论

孔蛋白是外膜蛋白中的一种, 每个细胞大约有 105 个孔蛋白分子<sup>[13]</sup>, 其主要功能是形成非选择性通道将离子和亲水性小分子运输通过外膜。Omp II 是从分离自虹鳟的 *A. hydrophila* Ah65 中得到的一种 39 kDa 的外膜蛋白<sup>[14]</sup>, 具有孔道形成性质<sup>[15]</sup>, 与 *E. coli* 的孔蛋白 OmpF、OmpC 和 PhoE 的功能相

似<sup>[16,17]</sup>。有研究者克隆并测序了嗜水气单胞菌 AH-3 株(O:34)孔蛋白 *OmpII* 的基因,结果表明 *OmpII* 是一种重要的外膜蛋白,具有抗原性和 C1q 结合能力<sup>[1]</sup>。

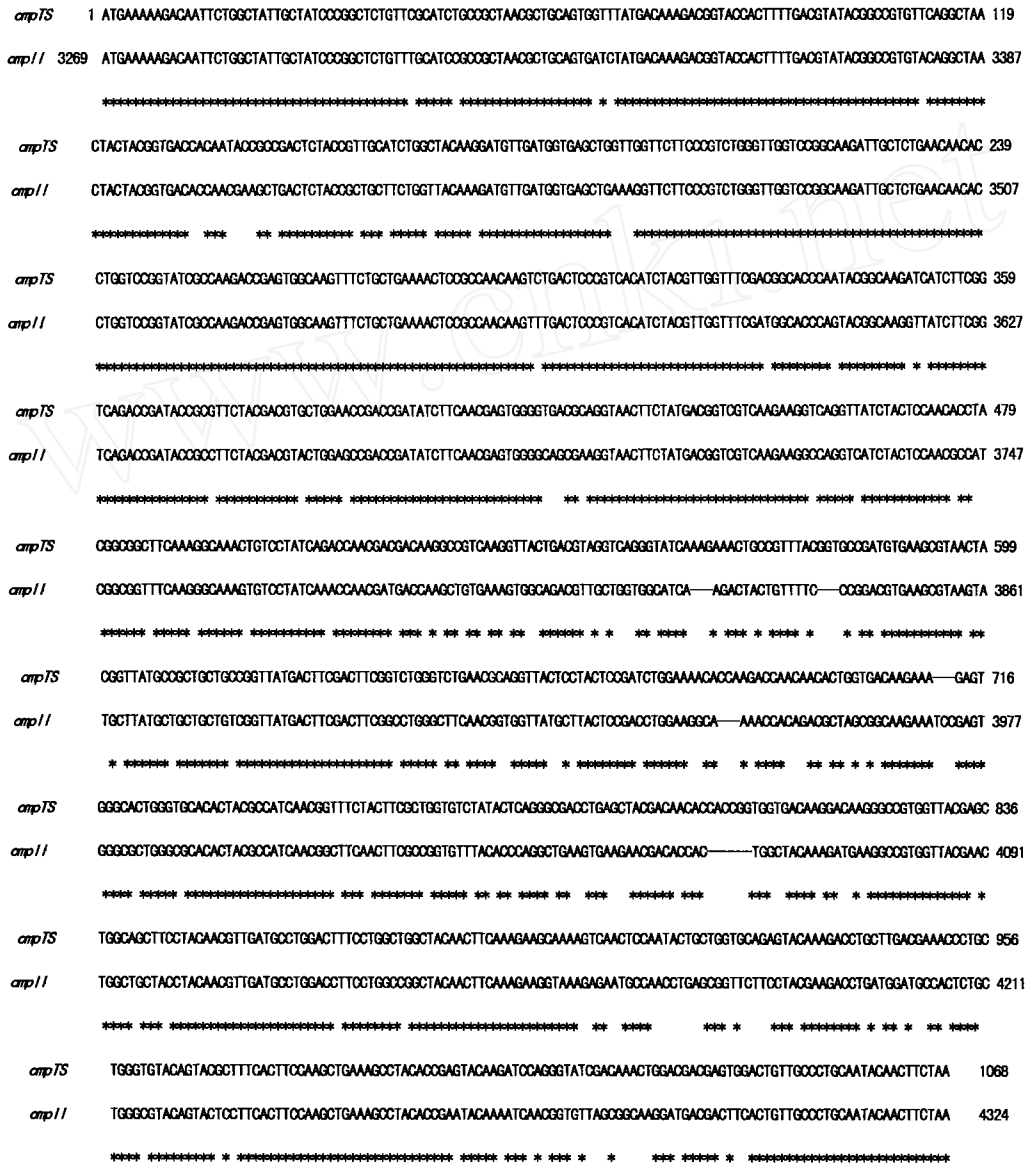


图 3 基因 *ompTS* 与 *ompII* 的核苷酸序列同源性比较

Fig. 3 Alignment of the nucleotide sequences of *ompTS* gene and *ompII* gene.

Identical nucleotides in two genes are indicated by an asterisk

表 1 ompTS 基因推导的编码氨基酸序列与其它细菌外膜蛋白的氨基酸序列比较结果

Tab.1 Induced amino acid sequence analysis of ompTS gene as compared to those of the outer membrane proteins of other strains reported-10 best alignments

Proteins	Strains	Length	Percent Similarity (%)	Percent Identity (%)
OmpN	<i>Escherichia coli</i>	398	61.558	31.658
Omp YEDS	<i>E. coli</i>	416	60.337	27.163
PhoE	<i>E. coli</i>	389	58.355	29.049
Omp K36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	394	61.168	28.173
Omp K37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	391	62.404	30.946
OmpS1	<i>Salmonella typhi</i>	416	58.654	27.404
OmpS2	<i>Salmonella typhi</i>	404	61.386	29.208
OmpF	<i>Serratia marcescens</i>	415	56.145	27.229
OmpL	<i>Photobacterium profundum</i>	371	63.881	28.841
PhoE	<i>Citrobacter freundii</i>	383	59.008	30.026

OmpN 是从 *E. coli* BE 中分离出的一种孔蛋白,与 *E. coli* K-12 的孔蛋白 OmpC 的功能非常相似<sup>[4,5]</sup>。PhoE 是一种由磷酸盐限制诱导的孔蛋白,由 *phoE* 基因编码。*E. coli* K12 的孔蛋白 PhoE 具有一由 21 个氨基酸组成的信号肽,成熟的 PhoE 由 330 个氨基酸组成,分子量为 36.782kDa,将其与 *E. coli* 孔蛋白 OmpF 的氨基酸序列比较,发现有 210 个相同的氨基酸残基<sup>[6]</sup>。有研究者用 *E. coli* 的 *ompF* 基因作为异源探针从 *Salmonella typhi* 中扩增出了 *ompS1* 基因,该基因编码一由 373 个氨基酸组成的蛋白质 OmpS1。推算出 OmpS1 的成熟产物具有由 21 个氨基酸组成的导肽,包含有可能涉及孔道形成的高度保守的氨基酸残基<sup>[9]</sup>。在对小鼠的胃肠感染进行研究时发现,*Salmonella typhi* 菌株的毒力与其孔蛋白有关,但确切机制尚未清楚<sup>[18,19]</sup>。

*Klebsiella pneumoniae* 的 Omp K36 显示了孔蛋白的性质,比如热可修改性、对胰岛素有抵抗性等。它与肠道细菌孔蛋白家族有很近的关系,与 *E. coli* 的孔蛋白 OmpC、PhoE 和 OmpF 有很高的同源性。研究显示,Omp K36 能结合 C1q 补体成分,激活补体经典途径<sup>[7]</sup>。Omp K37 也是 *Klebsiella pneumoniae* 的一种孔蛋白。当菌株表达的孔蛋白为 Omp K37,而不是 Omp K35 或 Omp K36 时,菌株对 - 内酰胺类抗生素的敏感性降低<sup>[8]</sup>。*Serratia marcescens* 对 - 内酰胺类抗生素的敏感性也与其孔蛋白 OmpF 有关,一般来说,当孔蛋白 OmpF 的数量减少时,菌株对 - 内酰胺类抗生素的抵抗力会随之增加<sup>[10]</sup>。

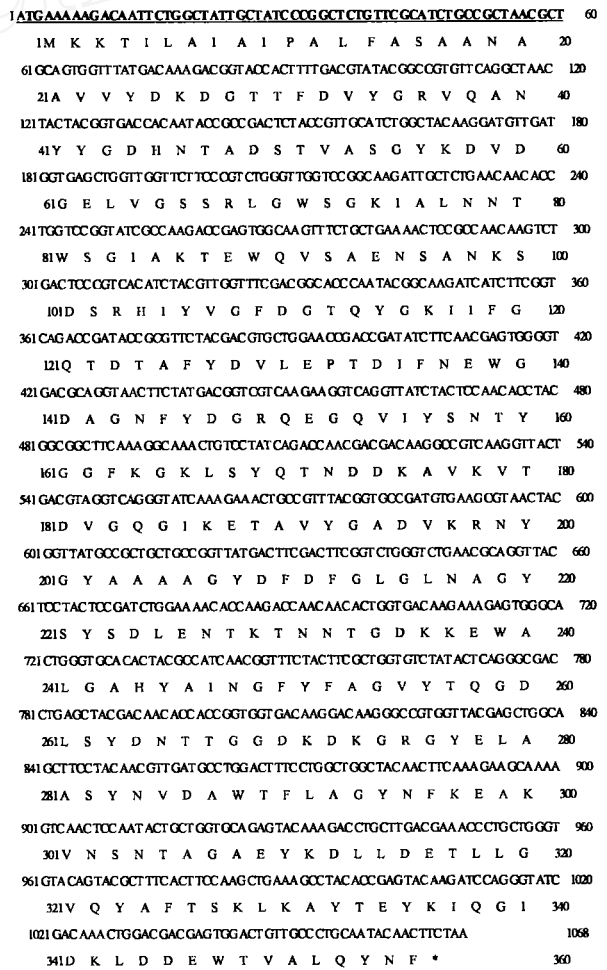


图 4 ompTS 基因核苷酸序列及其推导出的编码氨基酸序列 Fig.4 Nucleotide sequence and induced amino acid sequence of ompTS gene.

The amino acid sequence is numbered sequentially from the first amino acid of the mature protein. The proposed signal peptide is underlined and in boldface type.

综上所述推断,本研究得到的 *ompTS* 基因很可能是一个新的基因,编码 38.9 kDa 的嗜水气单胞菌外膜蛋白 Omp TS。该蛋白质在膜中极有可能形成通道,具备与孔蛋白相似的性质。

Omp TS 的氨基酸序列具有一个保守区,如图 5 所示。该保守区位于 Omp TS 成熟蛋白质的氨基酸序列的 N 端,在第 1 位和第 19 位氨基酸残基之间,这与 Jeanteur 的研究结果一致<sup>[15]</sup>。从图 5 可以看到,第 1 位(Ala)、第 4 位(Tyr)和第 15 位(Gly)氨基酸残基在所比较的不同菌株外膜蛋白的氨基酸序列中是相同的,这说明了 Ala1、Tyr4 与 Gly15 在外膜蛋白氨基酸序列中是高度保守的。该外膜蛋白氨基酸序列保守区所涉及的功能尚未有资料可询。对 Omp TS 的氨基酸序列进一步分析发现,其第 37、75、106 和 126 位氨基酸残基分别为 Arg、Arg、Asp 和 Arg。Arg37、Arg75、Asp106 和 Arg126 在肠道细菌外膜蛋白 PhoE、OmpC、OmpF、NmpC 和噬菌体 PA - 2 Lc 中是保守的。据报道,如果大肠杆菌 OmpF 和 OmpC 的氨基酸残基在以上所述的位置发生突变,将会改变孔道的通透性,允许更大的分子扩散通过孔道<sup>[20,21]</sup>。Arg37、Arg75、Asp106 和 Arg126 突变相应于嗜水气单胞菌外膜蛋白的作用,还有待研究。

## 参考文献:

- [1] Noguera M M, Merino S, Aguilar A, et al. Cloning, sequencing, and role in serum susceptibility of porin II from mesophilic *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68 (4) : 1849 - 1854.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory Manual* (2nd ed) [M]. New York: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [3] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105 - 132.
- [4] Blattner F R, Plunkett G, Bloch C A, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Science*, 1997, 277(5331) :1453 - 1474.
- [5] Prilipov A, Phale P S, Koebnik R, et al. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* BE [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(13) :3388 - 3392.
- [6] Overbeeke N, Bergmans H, van Mansfeld F, et al. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12 [J]. *J Mol Biol*, 1983, 163(4) :513 - 532.
- [7] Alberti S, Rodriguez-Quinones F, Schirmer T, et al. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(3) :903 - 910.
- [8] Domenech-Sanchez A, Hernandez-Alles S, Martinez-Martinez L, et al. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(9) :2726 - 2732.
- [9] Fernandez-Mora M, Oropeza R, Puente J L, et al. Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene [J]. *Gene*, 1995, 158(1) :67 - 72.
- [10] Hutsul J A, Worobec E. Molecular characterization of the *Serratia marcescens* OmpF porin, and analysis of *S. marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation [J]. *Microbiol*, 1997, 143 ( Pt 8) :2797 - 2806.
- [11] Welch T J, Bartlett D H. Isolation and characterization of the structural gene for OmpL, a pressure-regulated porin-like protein from the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9 [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(16) :5027 - 5031.
- [12] Spierings G, Ockhuijsen C, Hofstra H, et al. Characterization of the *Citrobacter freundii* *phoE* gene and development of *C. freundii*-specific

	+1	+4	+15
OmpTS	-	AVVYKDKGTTFDVYGRVQANY-	
OmpII	-	AVIYKDKGTTFDVYGRVQANY-	
OmpK36	-	AEIYNKDGKLDLYGKIDGLH-	
OmpS1	-	AEIYNKNGKLDLYGKVDGLR-	
OmpYEDS	-	AEIYNKDGKLDLYGKVVGLH-	
OmpF	-	AEIYNKDGKLDLYGKVDGLH-	
OmpK37	-	AEIYNKDGKLDLYGKVDGLH-	
OmpS2	-	AEIYNKDGKLDLYGKVDGLH-	
OmpN	-	AEIYNKDGKLDLYGKVDGLH-	
PhoE_C	-	AEIYNKNGKLDLYGKVKAMH-	
PhoE_E	-	AEIYNKDGKLDLYGKVKAMH-	
OmpL	-	AEVYSDETSSLAVGGRPEARA-	
	*	*:*. . . . . *: . .	

图 5 12 种细菌外膜蛋白的氨基酸序列高度保守区

Fig. 5 A high degree of amino acid sequence conservation of outer membrane proteins from *E. coli*

(OmpN, Omp YEDS, PhoE-E), *Klebsiella pneumoniae* (Omp K36, Omp K37), *Salmonella typhi* (OmpS1, OmpS2), *Serratia marcescens* (OmpF), *Photobacterium profundum* (OmpL) and *Citrobacter freundii* (PhoE-C). Amino acids identical in all species are indicated by an asterisk.

Conservative substitutions are indicated by a dot

- oligonucleotides [J]. FEMS Microbiol Lett , 1992 ,78 (2 - 3) :199 - 204.
- [13] Nikaido H , Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability [J]. Microbiol Rev , 1985 ,49 :1 - 32.
- [14] Lee S Y , Yin Z , Ge R , et al. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion [J]. J Fish Dis , 1997 ,20 :169 - 175.
- [15] Jeanteur D , Gletsu N , Pattus F , et al. Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins : N - terminal sequence analysis and channel-forming properties [J]. Molecular Microbiol , 1992 ,6 :3355 - 3363.
- [16] Inokuchi K , Mutoh N , Matsuyama S , et al. Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *E. coli* K - 12 [J]. Nucleic Acids Res , 1983 ,10 :6957 - 6968.
- [17] Mizuno T , Chou M , Inouye M. A comparative study on the genes for three porins of the *E. coli* outer membrane [J]. J Biol Chemistry , 1983 ,258 :6932 - 6940.
- [18] Isibasi A , Ortiz V , Vargas M , et al. Protection against infection in mice after immunization with *Salmonella typhi* outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9 ,12 ,d ,Vi [J]. Infection and Immunity , 1988 ,56 :2953 - 2959.
- [19] Muthukkumar S , Muthukkaruppan V R. Detection of porin antigen in serum for early diagnosis of mouse infections with *Salmonella typhi* [J]. FEMS Microbiol Immun , 1992 ,89 :147 - 154.
- [20] Benson S A , Occi J L L , Sampson B A. Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of *E. coli* K - 12 [J]. J Mol Biol , 1988 , 203 :961 - 970.
- [21] Misra R , Benson S A. Genetic identification of the pore domain of the OmpC porin of *E. coli* K - 12 [J]. J Bacteriol , 1988 ,170 :3611 - 3617.