

文章编号: 1000-0615(2003)02-0124-07

# 鳗源嗜水气单胞菌 $\beta$ 溶血素基因的克隆及表达

龚 晖, 林天龙, 俞伏松, 董传甫, 陈日升, 杨金先, 陈振海  
(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003)

**摘要:**应用 PCR 技术, 从 1 株鳗源嗜水气单胞菌 ML316 中扩增得到  $\beta$  溶血素基因 AHL316HEM, 将 AHL316HEM 克隆到 pGEM-T Easy Vector, 经分析验证后重组到 pcDNA3.0 中, 构建了重组质粒 PDLH。转化重组质粒 PDLH 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  能在血琼脂培养基中形成明显的  $\beta$  溶血斑, 重组菌纯化的胞外产物溶血价为  $1.28 \times 10^4 \text{HU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 同时重组菌的胞外产物能被原始菌株的高免血清特异性地识别。结果证实, 克隆到鳗源嗜水气单胞菌  $\beta$  溶血素基因, 重组质粒 PDLH 能够表达具有天然生物学活性的  $\beta$  溶血素, 为构建嗜水气单胞菌核酸疫苗奠定了基础。

**关键词:**嗜水气单胞菌;  $\beta$  溶血素基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A

## Cloning and expressing of the $\beta$ -hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Anguilla anguilla*

GONG Hui, LIN Tian-long, YU Fu-song,

DONG Chuan-fu, CHEN Ri-sheng, YANG Jin-xian, CHEN Zhen-hai

(Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** With the technology of PCR, the completed  $\beta$  hemolysin gene AHL316HEM was obtained from the amplification of an *Aeromonas hydrophila* strain ML316 (isolated from diseased *Anguilla anguilla*). The gene was cloned into pGEM-T Easy Vector. After analysis, the gene was inserted into pcDNA3.0 vector to construct the recombinant plasmid PDLH. The *E. coli* DH5 $\alpha$  with PDLH could lead to obvious  $\beta$  hemolysis plaque in blood Agar. The hemolysis activity of crude purified transformant's extracellular products (ECP) was  $1.28 \times 10^4 \text{HU} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Furthermore, the transformant's ECP could be recognized by anti-serum which was raised against original bacterial strain. The above results demonstrated that the  $\beta$  hemolysin gene of ML316 had been cloned and the recombinant plasmid PDLH could express the product with native biological function. The success of cloning and expressing the  $\beta$  hemolysin gene of *A. hydrophila* will speed up the development of DNA vaccine against *A. hydrophila*.

**Key word:** *Aeromonas hydrophila*;  $\beta$  hemolysin gene; cloning; expression

嗜水气单胞菌是导致鱼类暴发性疾病的主要致病菌之一<sup>[1-4]</sup>。目前嗜水气单胞菌病的防治仍以

收稿日期: 2002-05-27

资助项目: 国家 863 资助(2001AA622050)和福建省科技项目资助(2000Z077)

作者简介: 龚 晖(1971-), 男, 福建建瓯人, 助理研究员, 主要从事水产养殖动物病原微生物研究。Tel: 0591-7817514, E-mail: ghxf

@sina.com

使用化学药品为主, 化学药品的大量使用, 导致病原菌广泛耐药, 药物残留威胁着人类健康。嗜水气单胞菌病的免疫预防工作已成为鱼病学者关注的焦点, 嗜水气单胞菌菌体抗原成分复杂, 存在众多血清型<sup>[3,5]</sup>, 不同地区流行的菌株在毒力和免疫原性方面差异明显, 这些因素严重影响嗜水气单胞菌疫苗推广和普及<sup>[6]</sup>。进一步研究嗜水气单胞菌的毒力因子, 探讨主要毒力因子在免疫保护方面的作用及其在免疫原性方面差异有助于构建高效、广谱的疫苗, 有助于嗜水气单胞菌病免疫预防工作的深入开展。嗜水气单胞菌能产生多种毒力因子如: 溶血素(hemolysin)、胞外酶(extracellular protease, ECPase)、S层蛋白(S layer protein)、菌毛(pili)、转铁蛋白(siderophores)及外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)<sup>[7-11]</sup>。其中溶血素是重要的毒力因子, 许多学者对嗜水气单胞菌溶血素展开广泛而深入的研究并证实溶血素同时具有溶血性、肠毒性及细胞毒性作用<sup>[12,13]</sup>, 对鳗鲡、鲫、小白鼠等受试动物具有独立的致病作用。我们克隆、表达了鳗源嗜水气单胞菌 $\beta$ -溶血素基因, 试图在单因子水平研究 $\beta$ -溶血素在介导免疫保护方面的作用, 同时, 利用pcDNA3.0能在真核细胞内表达的优势探索构建抗嗜水气单胞菌核酸疫苗的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、血清与质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ 为福建省卫生防疫站艾滋病重点实验室提供, 嗜水气单胞菌 ML316为本研究室从病鳗肝脏分离鉴定, pGEM-T easy Vector试剂盒(Premega公司产品), 质粒载体 pcDNA3.0(美国Invitrogen公司产品), PCR引物由上海生工公司合成, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(Sigma), 兔抗 ML316全菌血清由本室制备。

### 1.2 酶和试剂

Taq 酶、dNTP、GeneRulerTM 1kb DNA Ladder(MBI公司产品), CIP、限制性内切酶 EcoR I、T4连接酶、X-gal、IPTG(Promega公司产品), PCR纯化试剂盒、DNA回收试剂盒、氨苄青霉素(上海生工公司产品), LB培养基(Sigma公司产品), 含5%兔血平板由福建省卫生防疫站细菌科提供。

### 1.3 PCR扩增、克隆与鉴定

#### 1.3.1 引物的合成及PCR扩增

提取嗜水气单胞菌 ML316基因组, 用作PCR反应模板<sup>[14]</sup>。PCR引物 I: 5'-GCTATGAAAAACTAAAAATAACTG-3', PCR引物 II: 5'-CAGTATAAGTGGGGAAATGGAAAG-3'<sup>[15]</sup>, PCR引物 III 5'-CCAAGGGGTCTGTGGCGACA-3', PCR引物 IV: 5'-TTTCACCGGTAACAGGATTG-3'<sup>[16]</sup>(引物由上海生工公司合成)。

PCR反应的总体积为30 $\mu$ L, 混合物中含有模板100 pg, 10倍缓冲液(含MgCl<sub>2</sub>) 3 $\mu$ L, 2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTP 3 $\mu$ L, 1  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>引物 I、引物 II各3  $\mu$ L, TaqDNA聚合酶0.2  $\mu$ L(1 U)。反应参数为预变性95 $^{\circ}$ C, 10 min; 变性94 $^{\circ}$ C, 1min; 引物结合52 $^{\circ}$ C, 1 min; 引物延伸72 $^{\circ}$ C, 2 min; 反应循环30次, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 终止反应。扩增产物按PCR纯化试剂盒使用说明纯化后经引物 III、引物 IV PCR验证备用。

#### 1.3.2 PCR产物克隆与鉴定

PCR扩增产物纯化后, 按pGEM-T Easy Vector试剂盒使用说明, 连接到pGEM-T Easy Vector上, 并转化*E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布在含IPTG、X-gal及100 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>氨苄青霉素的LB平板上, 筛选白色菌落, 提取质粒<sup>[17]</sup>, 重组质粒命名为:pGEMtLH。经PCR及EcoR I酶酶切鉴定, 电泳条件: 0.8%琼脂糖, 60V电压电泳1h, 按DNA胶回收试剂盒说明, 回收目的基因, 通过上海博亚生物技术有限公司对重组质粒中的目的基因片段进行测序。

## 1.4 表达质粒的构建与鉴定

将目的基因片段克隆到经 *EcoR*I 酶酶切去磷酸化的 pcDNA3.0 *EcoR*I 酶切位点之间,用重组质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 平板上,随机挑取菌落,移接于血平板,挑选具有溶血斑的单菌落,提取质粒,经 PCR 和 *EcoR*I 酶酶切鉴定重组质粒,电泳条件同上。重组表达质粒命名为 PDLH。

## 1.5 基因表达产物的制备与分析

### 1.5.1 胞外表达产物制备

将含 PDLH 质粒的大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) 接种于 LB 培养基中,置  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养 20 h,  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 30 min,收集上清,用 60% 硫酸铵  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  沉淀 24 h,  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 30 min,弃上清,以  $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.0 PBS 重悬沉淀。PBS 透析除盐,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.5.2 表达产物溶血价测定

将经 60% 硫酸铵粗提,蛋白浓度为  $800\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) 胞外产物、*E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) 胞外产物以及 ML316 的胞外产物以  $0.01\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  灭菌 PBS 作倍比稀释,分别加入 V 型 96 孔凝集板,每孔各加 25  $\mu\text{L}$ ,每孔再加 25  $\mu\text{L}$  1% 兔红细胞,置  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  1h,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  2h,观察结果,以 50% 溶血的最高稀释度为溶血价<sup>[18]</sup>。

### 1.5.3 半致死量测定

将经 60% 硫酸铵粗提的 *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) 胞外产物稀释成  $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $12.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  5 个蛋白浓度梯度,每个稀释度分别注射 8 只 18g 的健康小白鼠(福建省医学科学研究所购买),接种量为 0.5 mL;对照组注射  $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) 胞外产物,连续观察 96h。

### 1.5.4 酶联免疫吸附试验

将经 60% 硫酸铵粗提的嗜水气单胞菌 ML316、*E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) 及 *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) 的胞外产物及 ML316 菌体裂解液用  $0.01\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  pH 7.0 PBS 稀释至蛋白浓度为  $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,包被 ELISA 板,每孔包被 50 $\mu\text{L}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜,含 2% 牛血清的 PBS-Tween 封闭 2h。一抗为兔抗 ML316 全菌血清以 1:1000 起倍比稀释(血清使用前每 100 $\mu\text{L}$  血清用 50 mg *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) 菌体吸附 30min),二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (1:15 000),底物 pNPP(BioRad),反应时间为 60min。

### 1.5.5 蛋白浓度测定

用 DU Series 7000 分光光度计(BECKMAN)按 Bradford 法<sup>[19]</sup>进行,在波长 595nm 处测定 A 值,参照标准曲线得出蛋白的浓度。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增反应

以 ML316 基因组 DNA 为模板,经引物 I、II 扩增获得一个大小约为 1 500bp 的条带,与预期设计相符。经引物 III、IV 扩增证实为嗜水气单胞菌溶血素基因。命名为 AHL316HEM(图 1)。

### 2.2 溶血素基因 pGEM-T 重组质粒的构建

AHL316HEM 按 pGEM-T Easy Vector 试剂盒使用说明重组到 pGEM-T 质粒中,获得重组质粒 pGEM $\Delta$ LH,酶切鉴定证明重组质粒含有与 AHL316HEM 大小一致的 DNA 片段,经引物 I、II 扩增证实为溶血素基因(图 2)。测序结果表明 ML316 溶血素基因 AHL316HEM 有一长度为 1 493bp 的读码框架,可编码 493 个氨基酸。AHL316HEM 基因已登录 GenBank,序号为 AF539467。

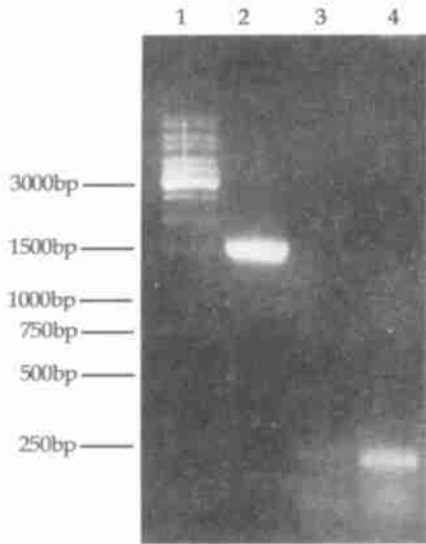


图 1 ML316 基因组 DNA PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR amplified product of ML316

1. 1kb DNA 分子量标准; 2. ML316 经引物 I 和 II 扩增 PCR 产物; 3. ML316 经引物 III 和 IV 扩增 PCR 产物; 4. AHL316HEM 经引物 III 和 IV 扩增 PCR 产物

1. 1kb DNA Ladder; 2. PCR product of ML316 with primer I and II; 3. PCR product of ML316 with primer III and IV; 4. PCR product of AHL316 HEM with primer III and IV

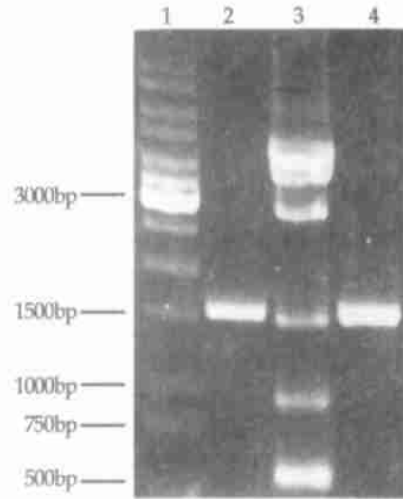


图 2 pGEMtLH 质粒酶切 PCR 产物电泳分析

Fig. 2 Analysis of plasmid pGEMtLH by EcoR I digestion and PCR amplification

1. 1kb DNA 分子量标准; 2. ML316 经引物 I 和 II 扩增 PCR 产物; 3. pGEMtLH 质粒 EcoR 酶酶切产物; 4. pGEMtLH 引物 I 和 II 扩增产物

1. 1kb DNA Ladder; 2. PCR product of ML316 with primer I and II; 3. pGEMtLH partial digestion with EcoR I; 4. PCR product of pGEMtLH with primer I and II

### 2.3 溶血素基因 pcDNA3.0 重组质粒的构建

从 pGEMtLH 切下目的基因重组到 pcDNA3.0 中获得重组表达质粒 PDLH, 质粒经 PCR 和酶切证明含有与 AHL316HEM 大小一致的 DNA 片段(图 3)。重组菌在血琼脂上培养呈现  $\beta$ -溶血, 证实 PDLH 确含有溶血素基因, 其表达产物具有溶血活性(图 4)。

### 2.4 溶血价的测定

*E. coli* DH5 $\alpha$  (pcDNA3.0) 胞外产物无溶血性, *E. coli* DH5 $\alpha$  (PDLH) 胞外产物的溶血价与 ML316 胞外产物的溶血价均为  $1.28 \times 10^4 \text{HU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

### 2.5 半致死量测定

半致死量测定结果见表 1, 根据文献<sup>[20]</sup> 计算出经硫酸铵粗提的 *E. coli* DH5 $\alpha$  (PDLH) 胞外产物对小白鼠的  $\text{LD}_{50} = 39.8 \mu\text{g}$ 。

### 2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA) 分析

酶联免疫吸附试验结果表明 *E. coli* DH5 $\alpha$  (PDLH)

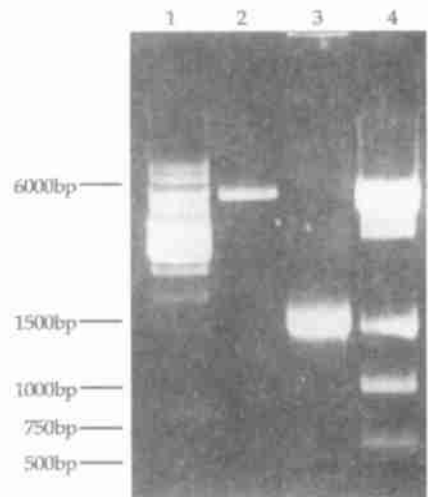


图 3 质粒 pcDNA 3.0 和 PDLH EcoR I 酶切电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of plasmid pcDNA3.0 AND PDLH digested with EcoR I

1. 1kb DNA 分子量标准; 2. pcDNA3.0 质粒 EcoR I 酶酶切产物; 3. PDLH 质粒经引物 I 和 II 扩增产物; 4. PDLH 质粒 EcoR I 酶不完全酶切产物

1. 1kb DNA Ladder; 2. pcDNA 3.0 digestion with EcoR I; 3. PCR product of PDLH with primer I and II; 4. PDLH partial digestion with EcoR I

胞外产物能与兔抗 ML316 血清呈阳性反应, 反应强度与 ML316 的胞外产物相近, 而弱于 ML316 菌体裂解物, *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) 胞外产物与兔抗 ML316 血清反应呈阴性(图 5)。

表 1 *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH)与 *E. coli*

DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0)胞外产物对小白鼠致病性试验

Tab. 1 Virulent tests of the ECP of *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) and *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0) on healthy mouse

组别 group	注射剂量( $\mu$ g) inject dose	死亡数/实验数 dead nos/ experiment nos
	200	8/8
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (PDLH)	100	8/8
胞外产物	50	6/8
ECP of <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (PDLH)	25	0/8
	12.5	0/8
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0)	200	0/8
胞外产物		
ECP of <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0)		

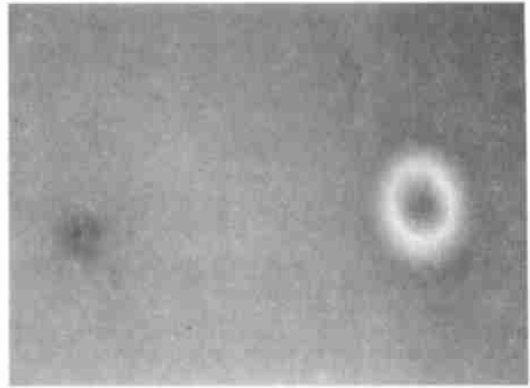


图 4  $\beta$ -溶血素基因在 *E. coli* DH5 $\alpha$  上的表达

Fig. 4 The expression the  $\beta$ -hemolysin gene in *E. coli* DH5 $\alpha$   
left: *E. coli* DH5 $\alpha$ (pcDNA3.0); right: *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH)

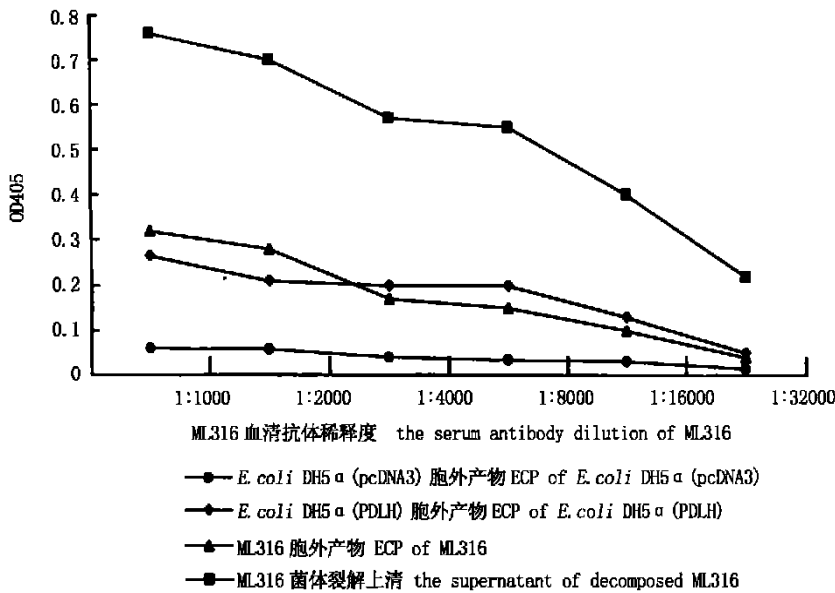


图 5 溶血素基因表达产物原性分析

Fig. 5 The antigenicity analysis of expressed hemolysin gene products

### 3 讨论

败血是冷血动物罹患嗜水气单胞菌病的主要临床表现<sup>[21]</sup>, 溶血素是嗜水气单胞菌的重要毒力因子之一<sup>[22, 23]</sup>, 研究表明, 在气单胞菌中存在不同的溶血素基因, 即使是同一菌株, 也可能同时有不同的溶血素基因型存在<sup>[24- 27]</sup>。本文从鳗源嗜水气单胞菌 ML316 中克隆了  $\beta$ -溶血素基因 AHL316HEM, AHL316HEM 编码 493 个氨基酸, 与嗜水气单胞菌溶血素基因 AHTPS30HEM (accession No. A B021152)、AH28SHEM (accession No. X 65043)、斑点气单胞菌溶血素基因 (accession No. U 40711)、温和气单胞菌溶血素基因 (accession No. AF443393)、梭菌属败毒梭菌溶血素基因 (accession No. 2011222A) 金黄色葡萄球菌  $\beta$ -溶血素基因 (accession No. S72497) 编码的氨基酸序列同源率分别为 98%、

94%、84%、72%、28%和4%，这一结果暗示气单胞菌溶血素基因可能有共同的起源。利用蛋白分析软件 Antheprot V5.0 对 AHL316HEM 基因编码的氨基酸序列进行分析，发现它前 23 个氨基酸组成一个明显疏水区，可能形成信号肽。抗原位点几乎均分布在亲水区，无跨膜区，等电点为 5.625，编码蛋白大小为 54.2kD，与 AHTPS30HEM 一致。由于 AHL316HEM 在读码框架第 987bp 处存在限制性内切酶 EcoR I 的位点，因此含 AHL316HEM 的重组质粒经 EcoR I 不完全酶切后，除了完整的目的基因外，还出现了 1000bp 和 607 bp 两个片段。

AHL316HEM 构建到 pcDNA3.0 中，并能在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中表达具有溶血活性和致死性的溶血素，血琼脂培养和酶联免疫吸附试验表明 *E. coli* DH5 $\alpha$ (PDLH) 胞外产物的溶血活性与 ML316 胞外产物溶血活性接近，说明嗜水气单胞菌 ML316 的溶血功能可能主要是由 $\beta$ 溶血素基因决定的。酶联免疫吸附试验表明， $\beta$ 溶血素能够诱导宿主产生体液免疫，但这些抗体是否有中和 $\beta$ 溶血素毒性作用，能否介导保护性免疫有待进一步实验加以证实。

pcDNA3.0 是一种可在真核细胞和细菌中表达的穿梭质粒，由于 pcDNA3.0 含有源于细胞巨化病毒(CMV)启动子和猿猴病毒 40(SV40)启动子、增强子等基因表达元件，因此，可以在绝大多数动物细胞中表达外源基因，是当前核酸疫苗构建过程中常用的载体之一<sup>[28]</sup>。 $\beta$ 溶血素基因-pcDNA3.0 重组质粒的成功制备，并能表达具有天然生物学活性的 $\beta$ 溶血素，为构建抗嗜水气单胞菌的核酸疫苗提供了可供测试的模型，同时也为在单因子水平测定嗜水气单胞菌 $\beta$ 溶血素在致病、诱导宿主产生免疫保护等多方面的作用提供便利的手段。至于 $\beta$ 溶血素基因-pcDNA3.0 重组质粒在鱼体内表达的水平、稳定性，以及能否诱导鱼类产生免疫应答，产生相应的抗体，这些抗体能否中和 $\beta$ 溶血素的溶血功能和毒性，能否产生抗嗜水气单胞菌的免疫保护力有待用重组表达质粒直接接种鳗鲡加以证实。

## 参考文献:

- [1] Cascon A, Anguita J, Hemanz C, et al. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group I by PCR assays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1167- 1170.
- [2] Pasquale V, Baloda S B, Dumortet S, et al. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles(*Pseudemys scripta*) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 1678- 1680.
- [3] Lu C P. Pathogenic aeromonas hydrophila and the fish diseases caused by it [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(4): 282- 288. [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(4): 282- 288.]
- [4] Huang Q Y. Aquatic animal disease [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1993. 103- 112, 118- 121, 137- 139. [黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 103- 112, 118- 121, 137- 139.]
- [5] Qian D, Chen Y Y, Shen J Y. Serogroups, virulence and hemolytic activity of *Aeromonas hydrophila* which caused fish bacterial septicaemia [J]. Acta Microbiol Sin, 1995, 35: 460- 464. [钱冬, 陈月英, 沈锦玉. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型[J]. 微生物学报, 1995, 35: 460- 464.]
- [6] Munn C B, Trust T J. Infection of rainbow trout by opportunist pathogens following subcutaneous injection of Freund's adjuvant [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1983, 7: 193- 194.
- [7] Chen H Q. Research progress of *Aeromonas hydrophila* [J]. Foreign Medical Sciences(Section of Microbiology), 1992, 15: 256- 259. [陈怀青. 嗜水气单胞菌外毒素研究进展[J]. 国外医学(微生物分册), 1992, 15: 256- 259.]
- [8] Dooley J S, McCubbin W D, Kay C M, et al. Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain [J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170: 2631- 2638.
- [9] Kirou S M, Barnett T C, Pepe C M, et al. Investigation of the role of type IV *Aeromonas pilus* (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas gastrointestinal* infection [J]. Infection and Immunity, 2000, 68: 4040- 4048.
- [10] Li H R, Chen H Q, Lu C P. Purification and characterization of extracellular protease ecpase54 from *Aeromonas hydrophila* [J]. J Nanjing Agricultural Univ, 1996, 19: 88- 94. [李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase54 的纯化及特性分析[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19: 88- 94.]
- [11] Ma X D, Lu C P, Chen H Q, et al. Purification and identification of siderophore from *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Microbiol Sin, 2000, 40: 91- 94. [马向东, 陆承平, 陈怀青, 等. 嗜水气单胞菌铁载体的提纯及特性分析[J]. 微生物学报, 2000, 40: 91- 94]
- [12] Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, et al. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin [J]. Infection and Immunity, 1984, 46: 122- 127.

- [13] Asao T, Kozaki S, Kato K, et al. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin[J]. J Clinical Microbiol, 1986, 24: 228- 232.
- [14] Lu C P, Chen H Q. Detection of the aerolysin gene of *Aeromonas hydrophila* with polymerase chain reaction [J]. China Animal Quarantine, 1995, 12: 5- 7. [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- 7.]
- [15] Xia C, Rahman H M, Ma Z H, et al. Cloning and detection of the  $\beta$ -hemolysin gene by polymerase chain reaction(PCR) from *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and soft-shelled turtle in China [Z].
- [16] Baloda S B, Krovacek K, Eriksson L, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction [J]. Immun Microbiol Infect Dis, 1995, 18: 17- 26.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. (2nd edn) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989: 19- 22.
- [18] Tu X L, Lu C P. Purification and characterization of HEC toxin produced by *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Microbiol Sin, 1992, 32: 432 - 438. [涂小林, 陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析 [J]. 微生物学报, 1992, 32: 432- 438.]
- [19] Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Current protocols in molecular biology [J]. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987, 2: 10. 1- 10. 2. 1.
- [20] Wang Y S. Biological products in medicine [M]. Zhejiang Science & Technology Press, 1992, 146- 153. [王益寿. 医用生物制品学 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992. 146- 153.]
- [21] Hazen T C, Fliemans C B, Hirsch R P, et al. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1978, 36: 731- 738.
- [22] Ljungh A, Wretling B, Mollby R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Pathol Microbiol Scand Sect (B), 1981, 89: 387- 397.
- [23] Thune R L J, Graham T E, Riddle L M, et al. Extracellular products and endotoxin from *Aeromonas hydrophila*: effects in age-0 channel catfish. [J]. Trans Amer Fish Soc, 1982, 111: 404- 408.
- [24] Hirono I, Aoki T, Asao T, et al. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. Microb Pathog, 1992, 13: 433- 446.
- [25] Howard S P, Buckley J T. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila* [J]. Molecular General Genetics, 1986, 204: 289- 295.
- [26] Chakraborty T, Huhle B, Bergbauer H, et al. Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K- 12 [J]. Journal of Bacteriology, 1986, 167: 368- 374.
- [27] Aoki T, Hirono I. Cloning and characterization of the haemolysin determinants from *Aeromonas hydrophila* [J]. J Fish Dis, 1991, 14: 303 - 312.
- [28] Sun S H. DNA Vaccine [M]. Second Military Medical University Press, 2000. 63- 67. [孙树汉. 核酸疫苗 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000. 63- 67.]