

文章编号:1000-0615(2004)01-0084-05

嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析

储卫华, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:根据已发表的气单胞菌胞外蛋白酶基因核苷酸序列,设计和合成了一对引物,以嗜水气单胞菌 AhJ-1 的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 技术,扩增到约 900bp 的丝氨酸蛋白酶基因片段,并克隆到质粒载体 pGEM-T 中进行测序和分析,结果表明扩增的丝氨酸蛋白酶基因片段与已发表的嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶 Ahe2 的同源性有 87%,扩增片段编码 343 个氨基酸,推测的分子量为 35 700,计算机软件分析表明编码的氨基酸有较高的抗原性,可作为核酸疫苗的候选基因片段。

关键词:嗜水气单胞菌;丝氨酸蛋白酶基因;克隆

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A

Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1

CHU Wei-hua, LU Cheng-ping

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

Abstract: A pair of primers were designed according to the nucleotide sequences of the protease gene of *Aeromonas* species reported. With the specific primers, one target fragment about 900bp was amplified from *Aeromonas hydrophila* strain AhJ-1 genomic DNA via PCR. The PCR products were cloned into pGEM-T vector and sequenced. The sequence was compared with the corresponding regions of the GenBank strains and analyzed by DNASTAR software. The nucleotide sequence showed 87% homology to the sequence of Ahe2 gene. The nucleotide sequence was predicted to encode a 343-aa protein with the molecular weight of 35 700 and with high antigenicity. It suggested that the sequence of serine-protease gene can be used as a candidate fragment for DNA vaccine.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; serine-protease gene; cloning

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 是引致水生动物疾病的重要病原,给水产养殖业造成极大的经济损失^[1]。嗜水气单胞菌的保护性抗原很多,如 S 层蛋白^[2],外膜蛋白^[3],蛋白酶等,其致病性与胞外致病因子有密切关系。嗜水气单胞

菌的胞外致病因子有毒素、蛋白酶、载体等,其中毒素和蛋白酶是主要的致病因子^[4],蛋白酶能引起组织的损伤,而毒素活性的发挥需要蛋白酶的酶解,才能使无活性的毒素前体活化成为活性的毒素。由于嗜水气单胞菌的血清型很多,因此

收稿日期:2002-10-16

资助项目:江苏省水产“三项工程”项目

作者简介:储卫华(1972-),男,江苏人,讲师,主要从事动物病原微生物与免疫的研究。E-mail:chuweihua2002@yahoo.com.cn

通讯作者:陆承平(1945-),男,上海人,教授,主要从事病原微生物与免疫的研究。Tel:025-84396517

灭活疫苗的效果受到限制,为解决这一问题,寻找保护性抗原,以制备对不同血清型的菌株均有保护作用的疫苗势在必行。根据已经发表的蛋白酶序列设计一对特异性引物,从嗜水气单胞菌 J-1 株中扩增得到丝氨酸蛋白酶的部分序列,并对其序列进行分析,以期研制嗜水气单胞菌保护性抗原的基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及质粒载体

嗜水气单胞菌 J-1 株(AhJ-1)系陈怀青等从江苏省某养殖场患病的鲫(*Carrassius auratus*)分离鉴定^[5],由南京农业大学动物医学院兽医微生物组保存。大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 由本室保存,克隆载体 pGEM-T system 购自 Promega 公司。AhJ-1 接种于营养肉汤培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 24h,大肠杆菌接种于 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 12-20h。

1.2 主要试剂

蛋白酶 K,为美国生命技术公司产品,Taq 酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.3 蛋白酶检测

采用脱脂奶平板法。将细菌接种在含 1.5% 脱脂奶的 TAS 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24h,观察溶蛋白圈。有透明圈的菌株,说明其产生蛋白酶,无透明圈的,说明不产生蛋白酶^[6]。

1.4 PCR

引物设计 从 GenBank 中读取鱼源 Ah 丝氨酸蛋白酶基因 Ahe2,随后利用 Primer5.0 在其 ORF 内高度保守序列中设计一对引物,正引物 5' 端加酶 Bam HI 切位点,反引物 5' 端加 Hind III 酶切位点。其序列为:

上游引物(P1):

5' - attgcatcctgctcctatgcttcagtca - 3'

下游引物(P2):

5' - gctaagcttgcatcctgcttcattcc - 3'

其中 P1 与丝氨酸蛋白酶基因的 49~69 位核苷酸相同,P2 与丝氨酸蛋白酶基因的 923~941 位的核苷酸互补。这对引物可扩增出长度为 893bp 的一段 DNA 片段。

引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,用 ddH₂O 按 50pmol $\cdot\mu$ L⁻¹ 稀释,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

DNA 的提取 参照文献[7]稍加改进,步骤如下:将过夜培养的细菌液 1.5mL 10000r \cdot min⁻¹

离心 5min,沉淀用 567 μ L 的 TE 缓冲液(pH8.0)重悬,加入 30 μ L 的 10% SDS 和 3 μ L 20mg \cdot mL⁻¹ 的蛋白酶 K,充分混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 1h,加入 100 μ L 5mol \cdot L⁻¹ NaCl,充分混匀再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液,混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 10min,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,12000r \cdot min⁻¹ 离心 10min,吸取上清加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,12000r \cdot min⁻¹ 离心 10min,吸取上清,加入 0.6 体积的异丙醇,使 DNA 充分沉淀,12000r \cdot min⁻¹ 离心 20min,沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次,然后在室温下干燥,使乙醇挥发,沉淀用 50 μ L 的 TE(pH8.0)溶解。

PCR 扩增丝氨酸蛋白酶基因 在灭菌的 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入 10 \times reaction buffer 10 μ L,dNTP(2.5mmol \cdot L⁻¹)8 μ L,引物各 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,模板 1 μ L,超纯水补足 100 μ L;然后采用以下步骤进行 PCR 循环:94 $^{\circ}$ C,60s,55 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 90s,35 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 维持 10min。PCR 产物于 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳。PCR 产物的纯化 GibcoBRL 回收试剂盒回收。

1.5 丝氨酸蛋白酶基因的克隆

连接反应 使用 pGEM-T 载体,载体与外源 DNA 的摩尔比 1:3。10 μ L 连接反应体系。组成如下:10 \times buffer 1 μ L,pGEM-T 载体 1 μ L,纯化的 PCR 产物 5 μ L,T4 连接酶 1 μ L,灭菌超纯水补至 10 μ L,4 $^{\circ}$ C 连接过夜。

大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备和转化 采用 CaCl₂ 制备 DH5 α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上挑取白色菌落。

1.6 重组质粒的 PCR 鉴定

把初步筛选到的阳性克隆以碱裂解法提取质粒,以质粒为模板,用引物 P1、P2 按前述方法进行 PCR 扩增,电泳观察扩增结果。

1.7 重组质粒测序

重组质粒由宝生物工程(大连)有限公司测序。正向引物为 T7Promoter Primer,反向引物为 SP6 Promoter Primer。

1.8 丝氨酸蛋白酶氨基酸序列预测

一级结构的预测用 DNASTAR 软件进行。

2 结果

2.1 PCR 法扩增结果

采用 P1、P2 引物对嗜水气单胞菌 AhJ-1 株

进行 PCR 扩增后,取 1 μL 的扩增产物进行电泳,结果可检测到一条约 900bp 带(其中有 18bp 为加入的酶切位点和保护碱基)(图 1)。

2.2 扩增产物的克隆和重组质粒的 PCR 鉴定

将扩增得到的约 900 bp 的片段克隆到 pGEM-T 载体上,并转化到 DH5 α 感受态菌中。挑取

白色菌落,以碱裂解法提取质粒。以重组质粒、载体质粒以及 AhJ-1 基因组作模板,用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增,重组质粒能扩增出 900bp 的片段,载体质粒扩增结果为阴性,阳性对照 AhJ-1 基因组扩增结果为阳性(图 2)。

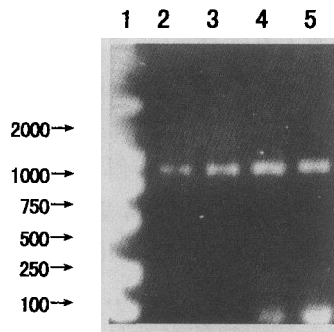


图 1 嗜水气单胞菌 AhJ-1 株
丝氨酸蛋白酶基因扩增结果

Fig.1 PCR results of AhJ-1 serine-protease gene
Lane1. 2000bp Marker; 2-5. products of PCR

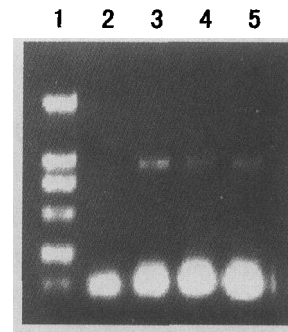


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.2 PCP analysis of the recombinant plasmid

1. 2000bp Marker; 2. 载体质粒扩增结果; 3. 重组质粒扩增结果;
4,5. AhJ-1 基因组扩增结果

Lane 1. 2000bp Marker; 2. pGEM-T amplified by PCR; 3.
recombinant plasmid amplified by PCR; 4,5. PCR products of AhJ-1
genome

2.3 序列分析

重组质粒 DNA 序列测定结果显示 pGEM-T 的插入片段由 911 个核苷酸组成,因该核苷酸序列分离自异育银鲫 (*Carrassius auratus ibelio*) 的嗜水气单胞菌,取异育银鲫拉丁文种名的首字母,将其命名为 SerCAI(图 3)。

2.4 SerCAI 核苷酸序列与其他细菌核苷酸序列比较

用 BLAST 在 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 核酸序列库中对 SerCAI 序列进行同源性分析,结果发现与嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶 Ahe2 基因 (AF159142) 有 87% 的同源性,与杀鲑气单胞菌杀鲑亚种丝氨酸蛋白酶 aspA (S51030) 有 84% 的同源性,与其他细菌的核苷酸序列也有一定的同源性。

2.5 丝氨酸蛋白酶结构预测

使用 DNASTAR 软件对所扩增的 SerCAI 核苷酸序列进行分析,发现其编码一个由 343 个氨基酸组成(图 4),分子量 35700 的蛋白质,其中有 51 个带电荷的氨基酸 (K, R, D, E), 118 个疏水氨基

酸 (A, I, L, F, W, V), 110 个极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y), 等电点 (pI) 为 5.3, 具有抗原性。

3 讨论

嗜水气单胞菌是我国淡水鱼重要的致病菌之一,其不同菌株致病力不同,研究表明嗜水气单胞菌的致病性与其胞外产物有着密切的关系,而其胞外蛋白酶又是其中的不可缺少的致病因子。许多研究都将蛋白酶的产生与致病性联系在一起。Cumberbatch 等^[8]发现,在细菌培养过程中,丝氨酸蛋白酶抑制剂 (PMSF) 可降低嗜水气单胞菌胞外产物的毒性。Kanai 和 Wakabayashi^[9]报道,在自然条件下将金属蛋白酶注射到豚鼠体内会导致出血。Thune 等^[10]研究表明,热敏感丝氨酸蛋白酶 (P1) 与中等热稳定蛋白酶 (P3) 对鲈的半数致死量分别为 $3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Hsu 等^[11]指出,产弹性蛋白酶多的 1 株菌株比产酶少的 9 株致病性强。Sakai^[12]研究表明,杀鲑气单胞菌突变菌株毒力丧失与蛋白酶缺失有关。将纯化的嗜水气单胞菌的蛋白酶肌肉注射到异育银鲫,导致注射部

ACGTCGCATGCTCCCGCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTGGATCCCTGCCTATCGCTTCAGTTCAG
 GCAAGTGAGAGTTGACCCCATGACCGCAAGGAAGCCGCTCGATACCGCCGAGCAGCGAGCGCTGCCTGC
 CCGGCATCAACCCGCTGCAGGATCAGCAGTGGCACCTGCTCAACAGCGCCAGAATGCCTTCAGTCCCGCGCGCGCT
 GGCAGGCAACGACCTCAACCTCTGGTGGGCACACCGTACCGCGTGCAGGGTCAGGGCATCAACGTGGCCGTGGTGGAT
 GACGGCTGGCCATCGCTCATCCGACTTGGCCGACAATGTGCGCCCTGGCTCGAAGAAGTGGTACCGGCAGTAGCG
 ACCCCACCCGACCGATCCGGACAGTGTACGGCACCTCGGTCTCCGGCCTGATCGGGCGGTGCAATAGCATCGG
 CACCCTGGGGTGGCCCCCGTGTCCAGTGCAGGGTTCACCTGCTGGATGAGCGCAGCAAGCAGCTGCAGAAAGAC
 TGGATCTATGCGCTGGCGGCAGCACCACCAGCCGACAACCGGTCTTCAACCAGAGCTACGGCATGAGCCTGGTGG
 ATCCGAAAAGCGCCAGCGGGCTGGATCAGGTTAGCTCGATCGCCTGTTGAGCAGCAGACCCAGCAGCGCAGGGCGC
 GGCTACATCAAGCGCGCAGGCAACGGCTTCAACCGCATCGCCGCGGTGACTACATGTTAGCCGACCGCGCTCTG
 CCCAAGTGCCTTCGAGAACGCAACATAGACCCCTCAACAGCAACTTCTGAACTGGTGGTGGTGGCCATCAACG
 CCGACGGAATACGTTCTCTACTCCAGGTCGGCAGCAACGCTTCTGAGCGCCCCGGCGGGAATACGGCACGGA
 TGCAAGCTTAGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGTGGATGC
 ATAGCT

图 3 嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因序列

Fig.3 Sequence of serine - protease gene of Ah J-1

TSHAPGRHGGRNSIIIGSLPIASVQASESCTPLTGKEAGLDTGRSSAARCLPGINPLQDQQWHLNLSGQNAFSSR
 GGVAGNDLNLWVAHRTGVQGGINVAVDDGLAIHPDLADNVRPGSKNVVTGSSDPTPTDPSAHGTSVSLIGAVDN
 SIGTLGVAPRVQLQGFNLLDERSKQLQKDWIYALGGSTATADNRVFNQSYGMSLVDPQSASGLDQVQLDRLFEQQTQA
 QGAAYIKAAGNGFNRIAAGDYMSRTGVLPKLPFENSNIIDPSNSFNWLVVSAINADGIRSSYSSVGSNVFLSAPGGEY
 GTDASLAITSEFAAACRSTIWESSQVGCIA

图 4 丝氨酸蛋白酶基因 SerCAI 推测的氨基酸序列

Fig.4 Sequence of deduced protein of SerCAI

位组织液化,而整个胞外产物注入会引起更严重的病理反应^[13]。对于嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的免疫原性,Hasting 和 Ellis^[14]用福尔马林灭活的杀鲑气单胞菌胞外产物免疫家兔,发现毒素和蛋白酶的抗体均产生。秦磊等^[15]的研究表明嗜水气单胞菌蛋白酶与迟缓爱德华菌脱毒多糖对小鼠有免疫保护力。

蛋白质的性质主要取决于氨基酸序列和空间构象,但一级结构决定高级结构。通过对嗜水气单胞菌 Ah J-1 株的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列的比较有助于对蛋白酶的高级结构和功能的了解。通过 BLAST 进行同源性比较,与另一丝氨酸蛋白酶 Ahe2 的同源性有 87%,这给疫苗的研究增加了一定的难度,但由于抗原的决定簇仅由十几个氨基酸决定,且扩增的蛋白酶片段的氨基酸有很高的抗原性。因此,可以选用蛋白酶保守部分作为疫苗和诊断用品的抗原。

参考文献:

- [1] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. J Fish China, 1992, 16(3):282-288. [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病[J]. 水产学报, 1992, 16(3):282-288.]
- [2] Dooley J G, Trust T J. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-layer protein [J]. J Bacteriol, 1988, 170:499-506.
- [3] Nandapalan N. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Aeromonas sobria* surface antigen [J]. FEMS Microbiol Immunol, 1989, 47:515-524.
- [4] Allan B J, Stevenson R M W. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1981, 27:1114-1122.
- [5] Chen H Q, Lu C P. Study on the pathogen of epidemic septicemia occurred in cultured cyprinoid fishes in southeastern China[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1991, 14(4):87-91. [陈怀青, 陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(4):87-91.]
- [6] Li H R, Chen H Q, Lu C P. Assay of extracellular protease (ECPase) from *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1997, 21(1):97-100. [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.]
- [7] Lian G D. The new technique of molecular biology [M]. Beijing: Scientific Technique Publisher, 2001. [梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001.]
- [8] Cumberbatch N, Gurwith M J, Langston C, et al. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates diarrheal disease[J]. Infect Immun, 1979, 23:829-837.
- [9] Kanai K, H Wakabayashi. Purification and some propertise of protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. Bull Jan Soc Sci Fish, 1984, 50:1367-1374.
- [10] Thune R L, Graham T E, Riddle L M, et al. Extracellular products and endotoxin from *Aeromonas hydrophila*: effects on age-0 channel catfish[J]. Trans Am Fish Soc, 1982, 111:749-754.
- [11] Hsu T C, Waltman W B, Shotts E B. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. Dev Biol Stand, 1981, 49:101-111.
- [12] Sakai D K. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida* [J]. Infect Immun, 1985, 48:146-152.
- [13] Chu W H, Lu C P. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* extracellular protease [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2000, 23(2):80-84. [储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2):80-84.]
- [14] Hasting, TS, Ellis A E. The humoral immune response of rainbow trout; Salmogairdner Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products [J]. J Fish Dis, 1998, 11:147-160.
- [15] Qin L, Yao H C, Lu C P. Immune Effect of Conjugated *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* submit Vaccine on Mice [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2000, 20(2):163-166. [秦磊, 姚火春, 陆承平. 嗜水气单胞菌与迟缓爱德华氏菌亚单位二联苗对小鼠的免疫效果[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(2):163-166.]