

7株鳃鲈致病性气单胞菌毒力基因 胞外产物及其活性比较

熊静^{1,2,3} 赖晓健^{1,2,3} 余钦¹ 郭松林^{1,2} 徐继松^{1,2,3} 黄文树^{1,4}

1.集美大学水产学院,厦门 361021; 2.鳃鲈现代产业技术教育部工程研究中心,厦门 361021;

3.集美大学水域环境与渔业资源监测中心,厦门 361021; 4.福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心,厦门 361021

摘要 为探讨致病性气单胞菌的致病力与其胞外产物和毒力因子之间的关系,联合利用PCR、SDS-PAGE、平板扩散及分子进化等方法对7株鳃鲈气单胞菌的胞外毒力因子进行比较研究。结果显示,该7株致病菌所含有的胞外毒力基因(*hly*、*aer*、*ast*、*act*、*alt*、*ahpA*、*epr*和*exu*)种类和数量上差异显著,其中*hly*可能是鳃鲈气单胞菌重要的致病因子;不同致病菌的胞外蛋白在种类和数量上都存在差异,其中分子质量约为50.7 ku的蛋白,其分泌量高且在鳃鲈气单胞致病菌中较保守;该7株致病菌胞外产物均具有溶血、酪蛋白酶和卵磷脂酶活性,胞外产物活性与毒力基因的分布一致;胞外毒素基因*hly*和*ahpA*具有较高的属间保守性,而*exu*则具有较好的种间特异性。

关键词 气单胞菌;胞外产物;生物活性;毒力基因

中图分类号 S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0076-10

气单胞菌属(*Aeromonas*)为兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌,广泛存在于淡水、半咸水,乃至海水中^[1]。目前已报道的嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和简达气单胞菌(*A. jandaei*)等30种^[1-5]。嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌等是最常见、危害最严重的人-鱼共患致病性气单胞菌^[4,6],可引起水产动物的烂鳃、赤皮、穿孔、肠炎、竖鳞和出血性败血症等,给水产养殖业带来巨大的经济损失^[4,7-9];也可引起人类的腹泻、创伤感染、胃肠炎、败血症等^[4,10-11],严重感染可导致患者死亡^[10,12],严重威胁人类生命与健康。

致病性气单胞菌的毒力因子主要包括外毒素、胞外蛋白酶和转移酶等胞外产物^[1,4]。外毒素是一类由致病菌分泌的可溶性毒性蛋白,常见的包括溶血素(其编码基因*hly*)、气溶素(编码基因*Aer*)和肠毒素(包括热稳定细胞兴奋性肠毒素(编码基因*ast*)、热不稳定性细胞兴奋性肠毒素(编码基因*alt*)

及细胞毒性肠毒素(编码基因*act*)等^[6,13]。溶血素可导致机体组织溃疡、败血和坏死等病理变化,临床表现为败血症^[1,14-16];气溶素是细胞通道形成毒素,具有溶血性、细胞毒性、肠毒性^[1,7,16-19];肠毒素通过与宿主细胞发生不可逆结合,引起水样腹泻、肠胃炎、严重时导致宿主死亡^[20-21],此外,有报道肠毒素也具有溶血性、细胞毒性和肠毒性^[7,13,19,21-22]。胞外蛋白酶也是一类分泌型蛋白,常见的有丝氨酸蛋白酶(编码基因*ahpA*)、热敏感胞外蛋白酶(编码基因*epr*)和其他胞外蛋白等^[1,23]。丝氨酸蛋白酶具有直接毒性,能够攻克宿主的免疫防御机制,引起组织损伤,还有助于细菌的营养吸收、对宿主细胞吸附、扩散、繁殖并引起感染^[19,23-26];热敏感胞外蛋白酶(编码基因*epr*)可协同其他毒力因子共同作用于宿主^[26];其他胞外蛋白酶具有活化致病因子的作用,可酶解外毒素前体变成具有活性的外毒素发挥其生物学作用^[1]。转移酶作为另一类胞外分泌蛋白,主要包括核酸酶(编码基因*exu*)和磷脂酶(编码基因*lip*)。核酸酶虽无直接致病性,但是其参与了几乎

收稿日期:2016-03-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31172438和U1205123);福建省科技厅重点项目(2013Y0089);福建省教育厅项目(JA12195;JA15260);厦门市科技局项目(3502Z20133015);鳃鲈现代产业技术教育部工程研究中心开放基金项目(ZK2013004;RE201304;RE201306;RE201307);校预研启动基金项目(ZQ2012007)

熊静,博士,助理研究员。研究方向:水产动物病害防治。E-mail: xiongjing@jmu.edu.cn

通信作者:黄文树,博士,副教授。研究方向:水产动物病害防治。E-mail: wshuang@jum.edu.cn

所有毒力因子的分泌和转运过程^[7,27-28]; 磷脂酶是能够催化水解二酰基甘油和所有的甘油磷脂, 从而破坏质膜, 损坏细胞, 在不产溶血素的杀鲑气单胞菌中起到溶血素的作用^[1,29]。

鳗鲡(*Anguilla* spp.) 是世界重要的经济鱼类, 中国鳗鲡养殖产量约占全球的 70%, 其主要养殖种类包括日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*) 和美洲鳗鲡(*A. rostrata*)^[30-31]。近 30 年来, 养殖鳗鲡细菌性疾病频繁发生, 制约了中国鳗鲡养殖业的健康可持续性发展, 其中致病性气单胞菌是最常见的一类致病菌^[32]。笔者所在课题组前期从具有不同症状的鳗鲡体内分离鉴定了 7 株气单胞菌, 人工感染发现不同菌株间致病性差异大, 为探讨其原因及揭示菌株致病性与毒力因素间的关系, 笔者从基因、蛋白质和生物活性等方面对这 7 株气单胞菌进行研究, 旨在为鳗源性气单胞菌的致病

机制研究提供参考, 并为鳗鲡疾病的防控与安全施治积累数据。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

1) 气单胞菌株: 笔者所在课题组分离自罹病鳗鲡, 经人工感染试验确认其致病性(表 1)。该 7 株致病菌经过生化鉴定和管家基因(*gyrB*) 全序列分析, 鉴定结果为: B09、B69 和 B79 为维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*); B11、B48 和 B52 为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*); B14 为豚鼠气单胞(*A. caviae*) (表 1)。

2) 其他非气单胞菌株: B81 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、B88 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、B1002 溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 为本课题组收集菌株; 金黄色葡萄球菌(*Staphylo-*

表 1 气单胞菌菌株来源

Table 1 Sources of the 7 *Aeromonas* strains isolated from eels

种属 Genus	菌株 Strains	鳗鲡种类 Species	病灶 Lesions	主要症状 Symptoms	人工感染致死率/% Lethality rates
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B09	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	肝脏 Liver	肠道水肿, 皮肤出血点 Intestinal swelling & dermorrhagia	7(1/15)
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B69	日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	肾脏 Kidney	臀鳍充血, 烂鳃, 肝肾肿大 Fins dermorrhagia, rotten gill, swelling of liver & kidney	100(7/7)
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B79	日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	肝脏 Liver	败血症, 肝穿孔 Septicemia, liver perforation	100(15/15)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B11	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	鳃 Gill	严重烂鳃, 败血症 Rotten gill, septicemia	100(15/15)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B48	日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	鳃 Gill	肾脏肿大, 肠道水肿 Swelling of liver & kidney	85(6/7)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B52	美洲鳗鲡 <i>A. rostrata</i>	肾脏 Kidney	烂鳃, 败血症 Rotten gill, septicemia	100(7/7)
豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	B14	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	肝脏 Liver	严重烂鳃, 败血症 Rotten gill, septicemia	53(8/15)

coccus aureus) ATCC6583、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC13883 购自广东省微生物保藏中心; 嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumotropica*) ATCC12555, 为中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所邢进副研究员惠赠。

1.2 毒力基因的克隆与鉴定

根据已报道气单胞菌 2 个管家基因(*gyrB* 和 *DnaK*) 与 8 个胞外毒力基因(*hly*、*aer*、*ahpA*、*ast*、*alt*、*act*、*epr*、*exu*), 采用表 1 中的引物, 分别以 7 株气单胞菌和 7 株其他菌株基因组模板进行 PCR 扩

增。PCR 程序参数为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系: 基因组模板 0.2 μL, 上下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L), 2 × HS™ Reaction Mix 12.5 μL, Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.1 μL, 超纯水加至 25 μL。PCR 扩增结束, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 在凝胶成像仪中观察并拍照, PCR 产物纯化、连接载体和测序等参照本课题组的研究报道^[33-34]; 产物回收利用 Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(OMEGA 公司); 在南京金斯瑞生物科技有限公司测序。在毒性基因检测时, PCR 阳性结果用“+”表示; 阴性结果用“-”表示。

表 2 气单胞菌 2 个管家基因和 8 个毒力基因的引物序列

Table 2 Sequences and sources of the primers used for amplification of the different virulence genes

靶基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增大小/bp Sequence size	参考文献 Reference
<i>gyrB</i>	TCCGGCGTCTGCACGGCGT TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	1 124	[35]
<i>DnaK</i>	ATGAAGAAGACCGCCGAAG TGCAGCACGTGAATGGTC	816	[36]
<i>hly</i>	GGCGTGATTTCGACAAGGAGA ACATCCAGATTCGGCACGA	1 203	本研究 This study
<i>aer</i>	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCCAGTCCCACCACT	431	[37]
<i>ast</i>	ATCGTCAGCGACAGCTTCTT CTCATCCCTTGGCTTGTGT	504	[38]
<i>alt</i>	TGACCCAGTCCTGGCACGGC GGTGATCGATCACCACCAGC	442	[39]
<i>act</i>	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAACTC	232	[39]
<i>ahpA</i>	TGCCCATCGCTTCAGTTCA GTGCGGCTGAACATGTAGTCA	719	本研究 This study
<i>epr</i>	CTAGGAGGCGGGCA ATGACACTCTTGCTCACCACCC	432	[40]
<i>exu</i>	GGACATGCACAACCTCTTCC GATTGGTATTGCCTTGCAAG	323	[37]

1.3 胞外蛋白的制备及分析

分别挑取单菌落至 10 mL LB 液体培养基(胰蛋白胨:0.1 g, 酵母提取物:0.05 g, 氯化钠:0.1 g)中,于 28 ℃,100 r/min 培养 36 h 后,取培养液于 4 ℃ 5 000 r/min 离心 10 min 取上清液,经孔径为 0.22 μm 滤膜过滤后,4 ℃ 3 318 r/min 离心超滤(截流分子质量为 10 ku,Pierce/Thermo Scientific, Rock-ford,IL,USA)60 min,体积浓缩为 50 μL(浓缩倍数约为 200 倍)。取 10 μL 浓缩液分别与 5× SDS 凝胶加样缓冲液按 4:1 混和,98 ℃ 加热 5 min,进行 SDS-PAGE,采用 5% 浓缩胶,15% 分离胶,Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液(250 mmol/L 甘氨酸,25 mmol/L Tris,0.1% SDS,pH 8.3),120 V 电泳约 2.5 h。LB 培养基做阴性对照。

1.4 胞外蛋白活性测定

采用琼脂平板打孔法^[27,41],分别用超纯水配制无菌的酪蛋白(0.4%)、蛋黄(2.5%)、淀粉(0.2%)、明胶(0.4%)、吐温 80(1.0%)及尿素(2.0%)LB 琼脂平板(1.5%琼脂)及血平板(含 5%脱纤维羊血),购自南京便诊生物科技有限公司,测定该 7 种致病性气单胞菌的酪蛋白酶、卵磷脂酶、淀粉酶、明胶酶、脲酶及溶血活性。在相应的孔中加 2 μL 处于对数生长期的菌液或 LB 培养基(阴性对照),28 ℃ 培养 10 h(延迟期)、18 h(对数期)、24 h(平台期)和 48 h

(衰亡期),观察结果。

结果判定如下。明胶酶活性:以加入沉淀试剂(HgCl₂ 15 g,浓盐酸 20 mL,加蒸馏水至 100 mL)后,含明胶的培养基出现透明圈;淀粉酶活性:以加入卢戈氏碘液(5.88 g I₂和 1.18 g KI溶于 100 mL 蒸馏水)后,含淀粉的培养基出现透明圈;溶血性:血平板中出现透明圈;酪蛋白酶活性:以加入 10%的三氯乙酸后酪蛋白培养基出现不透明圈;卵磷脂酶活性:含蛋黄的培养基出现不透明圈;脲酶:含尿素的培养基变红。若出现上述现象,为阳性结果,用“+”表示。阴性结果用“-”表示。

1.5 序列比对与同源性分析

利用 NCBI 数据库、生物学软件 Clustalx1.83 和 MEGA5.05,对 7 株病原菌扩增获得的部分毒力基因序列进行氨基酸序列进行比对及同源性分析,并利用邻接法(N-J 法)构建基于核苷酸序列的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 毒力基因的差异分析

利用 PCR 技术分析了 2 个气单胞菌管家基因(*gyrB* 和 *DnaK*)及 8 个常见胞外蛋白毒力基因(2 个胞外蛋白酶,5 个外毒素及 1 个转移酶基因)在 14 株试验菌(7 株气单胞菌和 7 株非气单胞菌)中分布情况。结果显示:7 株非气单胞菌中均未检测到

上述任何基因,7 株气单胞菌中均检测到 2 个管家基因(*gyrB* 和 *DnaK*)和 2 个毒力基因(*epr* 和 *aer*);其余 6 个毒力基因在 7 株气单胞菌中的检出率因种属而异。其中,*aphA* 在嗜水气单胞菌(3/3)和部分维氏单胞菌(1/3)呈阳性;*ast* 在维氏气单胞菌(3/3)和部分嗜水气单胞菌(2/3)呈阳性;*hly* 在部分嗜水气单胞菌(2/3)和部分维氏气单胞菌(2/3)呈阳性;*act* 在部分嗜水气单胞菌(1/3)和部分维氏

气单胞菌(1/3)呈阳性;*alt* 仅在部分嗜水气单胞菌(2/3)呈阳性;*exu* 在维氏气单胞菌(3/3)呈阳性和豚鼠气单胞菌(1/1)呈阳性,却在嗜水气单胞菌(3/3)中呈阴性;3 个肠毒素基因在豚鼠气单胞菌却均呈阴性。不同气单胞菌株所携带的毒力基因的个数不同,除 B14 仅含有 3 个毒力基因外,其余 6 株菌均检测到 5~6 个毒力基因,且每个菌株所检测到的毒力基因种类也各不相同(表 3)。

表 3 2 个管家基因及 8 个毒力基因在 14 株菌中的分布情况

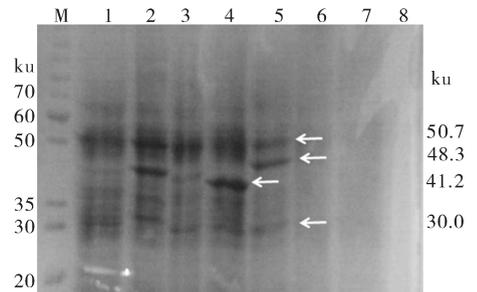
Table 3 Distribution of the two house-keeping genes and the eight virulence genes in 14 strains

种属 Species	菌株代码 Strains number	人工感染致死率/% Lethality rates	管家基因和毒力基因 Housekeeping genes and virulence genes										
			<i>gyrB</i>	<i>DnaK</i>	<i>epr</i>	<i>aer</i>	<i>hly</i>	<i>aphA</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>alt</i>	<i>exu</i>	
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B52	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B11	100	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B69	100	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B79	100	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B48	85	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B09	53	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	B14	7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	B81	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	B88	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	B1002	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	ATCC6583	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	ATCC9027	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺炎克雷伯氏菌 <i>K. pneumoniae</i>	ATCC13883	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
嗜肺巴斯德杆菌 <i>P. pneumotropica</i>	ATCC12555	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”表示为阳性,“-”表示阴性,“/”表示未检测。下表同。Note:“+” denotes positive result,“-” denotes negative result,“/” denotes no detection. The same as below.

2.2 胞外产物的电泳分析

致病菌于 28℃ 培养 36 h,培养液经超滤管浓缩后,通过 SDS-PAGE 电泳分析其胞外蛋白。以已知标准蛋白质分子质量的对数与其在 SDS-PAGE 电泳相对迁移率作图,进行线性回归,得到线性关系方程 $y = -0.023x + 2.148, R^2 = 0.992$ 。计算出图 1 中箭头所指的蛋白质分子质量分别为 50.7、48.3、41.2 和 30.0 ku。结果显示,除 2 株维氏气单胞菌(B69 和 B79)胞外蛋白分泌量过低外,其余 5 株气单胞菌的胞外蛋白分泌量较多,其产物的分子质量为 30~70 ku。不同菌株间电泳条带数目和条带的浓度差异较大,然而,分子质量为 50.7 和 30.0 ku 的条带是 5 株气单胞菌共有条带,且 50.7 ku 条带含量最高(图 1)。此外,分子质量为 48.3 和 41.2 ku 的条带为 3 株嗜水气单胞菌所特有。



泳道 M:标准蛋白质标记;泳道 1~7:分别为 B09、B11、B14、B48、B52、B69 和 B79;泳道 8:LB 培养基(阴性对照)。Lane M: Protein marker; Lane 1-7: Extracellular proteins of B09, B11, B14, B48, B52, B69 & B79, respectively; Lane 8: LB medium (negative control).

图 1 7 株气单胞菌胞外蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis profile for extracellular proteins from seven *Aeromonas* strains

2.3 胞外产物的生物活性分析

不同致病菌在不同生长阶段所分泌的胞外产物的活性可能存在差异,因此,本研究分别选取了10 h(延缓期)、18 h(指数期)、24 h(平台期)和 48 h(衰亡期)4 个时间点测定了试验菌株的胞外产物的生物活性(表 4)。结果显示:这 7 株致病性气单胞菌

在该 4 个时间点均检测到明显的溶血、酪蛋白酶和卵磷脂酶活性,同时,均无法检出脲酶和淀粉酶活性。2 株嗜水气单胞菌(B11 和 B48)在 4 个时间点均可检出明胶酶活性,另 1 株(B52)仅在平台期(24 h)和衰亡期(48 h)检测到明胶酶活性;维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌均未测到明胶酶活性。

表 4 7 株病原菌在不同培养时间胞外产物生物活性测定结果

Table 4 Extracellular protein biological activities of 7 *Aeromonas* strains from eels at different cultural times

种属 Species	菌株 Strains	时间/h Time	胞外蛋白生物活性 Extracellular protein bioactivities					
			溶血性 Hemolysis	酪蛋白酶 Caseinase	卵磷脂酶 Lipase	明胶酶 Amylase	脲酶 Urease	淀粉酶 Amylase
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	B11	10	+	+	+	+	-	-
		18	+	+	+	+	-	-
		24	+	+	+	+	-	-
		48	+	+	+	+	-	-
	B48	10	+	+	+	+	-	-
		18	+	+	+	+	-	-
		24	+	+	+	+	-	-
		48	+	+	+	+	-	-
	B52	10	+	+	+	-	-	-
		18	+	+	+	-	-	-
		24	+	+	+	+	-	-
		48	+	+	+	+	-	-
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	B11	10	+	+	+	-	-	-
		18	+	+	+	-	-	-
		24	+	+	+	-	-	-
		48	+	+	+	-	-	-
	B48	10	+	+	+	-	-	-
		18	+	+	+	-	-	-
		24	+	+	+	-	-	-
		48	+	+	+	-	-	-
B52	10	+	+	+	-	-	-	
	18	+	+	+	-	-	-	
	24	+	+	+	-	-	-	
	48	+	+	+	-	-	-	
豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	B14	10	+	+	+	-	-	-
		18	+	+	+	-	-	-
		24	+	+	+	-	-	-
		48	+	+	+	-	-	-

2.4 毒力基因的氨基酸序列同源性分析

为了研究毒力基因在种属间的特异性,克隆并测定了 3 类代表性的毒力基因片段(外毒素中的溶血素基因 *hly*、胞外蛋白酶中的丝氨酸蛋白酶基因 *ahpA* 和转移酶中的核酸酶基因 *exu*)核苷酸序列,

利用 Clustalx1.83 对其氨基酸序列进行同源性分析,并利用 MEGA5.05 进化树邻接法(N-J 法)构建系统进化树。多重序列比对结果显示:本研究克隆的 4 条溶血素 *hly* 序列在气单胞菌属内较保守,属内相似度为 94.27%,种内相似度大于 98%,该结果

与进化树结果一致;分别选取气单胞菌属、弧菌属、金黄色葡萄球菌及芽孢杆菌属等细菌共 20 条序列进行邻接法(N-J 法)系统进化树构建,结果显示本研究的 4 条 *hly* 氨基酸序列与数据库中的嗜水气单

胞菌,包括同是气单胞菌属杀鲑气单胞菌的 *hly* 氨基酸序列聚成一支,支持率约为 99%;而与弧菌科、金黄色葡萄球菌及芽孢杆菌属相似基因的氨基酸序列距离越来越远(图 2)。

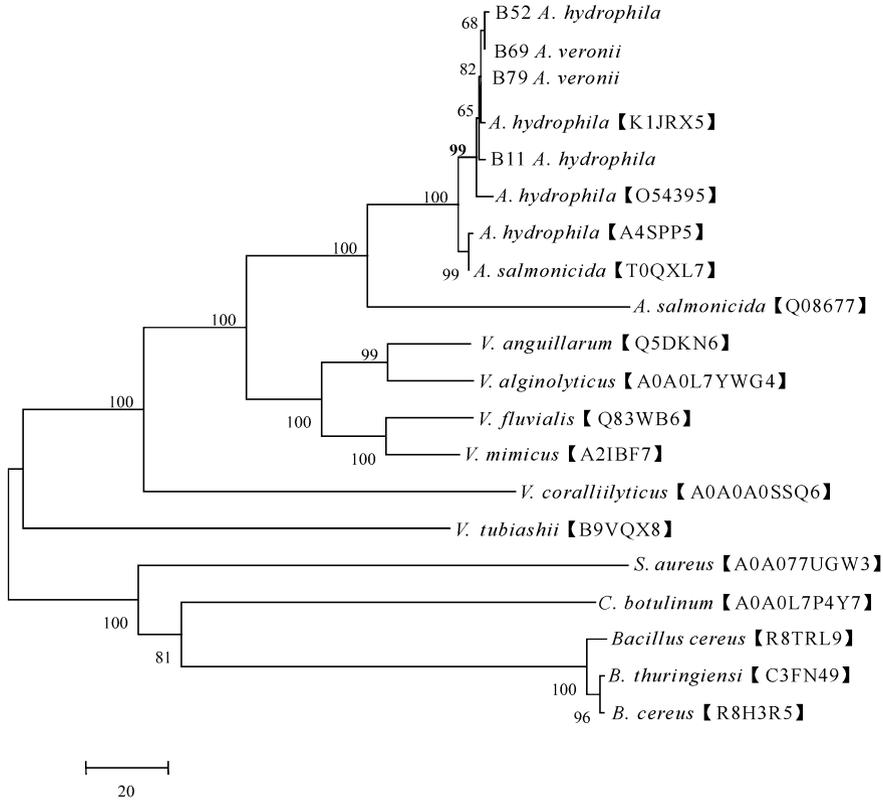


图 2 溶血素基因 *hly* 部分氨基酸序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic trees based on *hly* sequences showing the relationships of *Aeromonas* species

丝氨酸蛋白酶基因 *ahpA* 多重序列比对结果显示:本研究克隆的 4 条 *ahpA* 序列在气单胞菌属内亦保守,属内相似度约 86.51%,种内相似度约 90%,该结果与进化树结果基本一致;分别选取气单胞菌属、弧菌属、假单胞菌属等细菌共 19 条序列以邻接法(N-J 法)构建系统进化树,结果显示本研究的 4 条 *ahpA* 与数据库中气单胞菌属 *ahpA* 聚成一支,支持率为 100%;而与假单胞菌属、弧菌属等其他序列明显位于不同的分支上(图 3)。

核酸酶基因 *exu* 多重序列比对结果显示:本研究克隆的 4 条 *exu* 序列在气单胞菌属内具有较高种间特异性,属内相似度为 95.98%,种内相似度则大于 99%,该结果与进化树结果相一致;分别以气

单胞菌属、大肠杆菌、弧菌属、沙门氏菌等 21 条序列构建进化树,结果显示:本研究中克隆的 3 条维氏气单胞菌 *exu* 序列与数据库中的维氏气单胞菌 *exu* 序列聚成一支,支持率为 70%;1 条豚鼠气单胞菌 *exu* 序列与数据库中的豚鼠单胞菌 *exu* 序列聚成一支,支持率为 99%;4 条气单胞菌 *exu* 序列与数据库中其他气单胞菌聚成一支,支持率为 100%;均与其他大肠杆菌、弧菌属、沙门氏菌的序列明显位于不同的分支上(图 4)。

由此看出,本研究中鳎源气单胞菌 *hly* 和 *ahpA* 具有较高的种属保守性,而鳎源气单胞菌 *exu* 序列则具有较好的种间特异性。

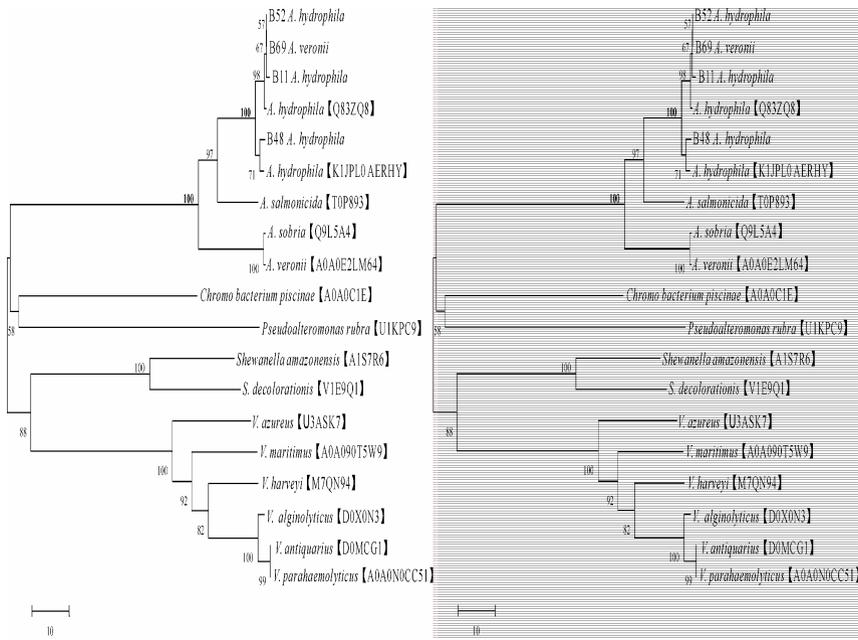


图 3 丝氨酸蛋白酶基因 *ahpA* 部分氨基酸序列系统进化树

Fig.3 Phylogenetic trees based on *ahpA* sequences showing the relationships of *Aeromonas* species

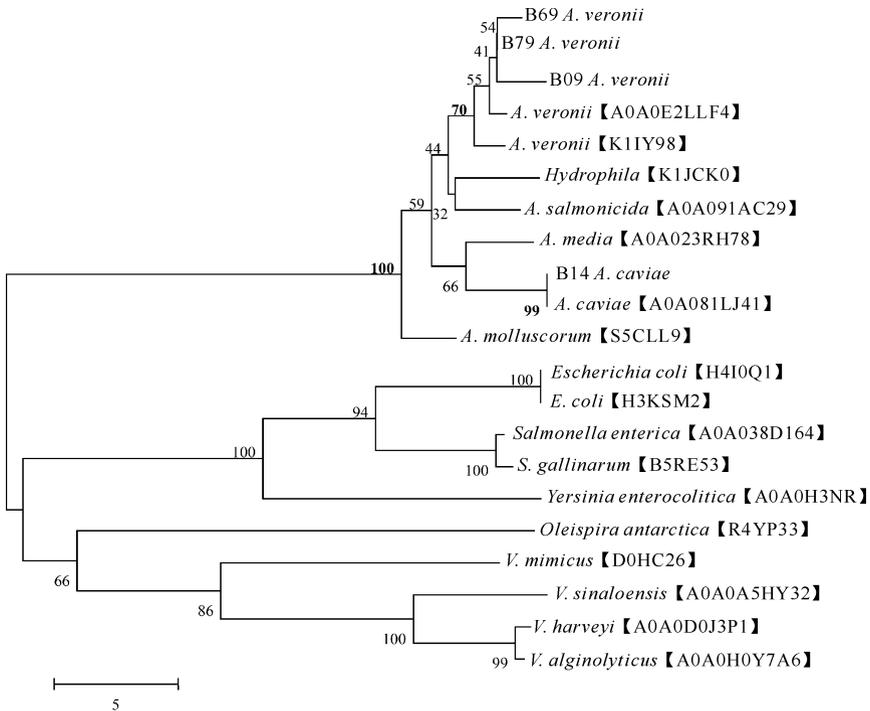


图 4 核酸酶基因 *exu* 部分氨基酸序列系统进化树

Fig.4 Phylogenetic trees based on *exu* sequences showing the relationships of *Aeromonas* species

3 讨论

3.1 毒力基因是决定鳗源气单胞菌菌株致病力的重要因素

菌株所携带的毒力基因是不同菌株间致病力差

异的重要原因^[3,6-8,11-13-14,16,19,21,28,42]。研究表明 *hly* 基因是鱼、虾等水生动物致病性气单胞菌的重要致病因子。Heuzenroeder 等^[14] 和 Wang 等^[21] 通过免疫学试验和基因敲除等方法在幼鼠模型实验中证实 *hly* 是鱼源性和食源性(其他水产品)气单胞菌致病

力的主要毒力因子;Zhou等^[16]也发现在发病鱼体样本中 *hly* 检出率明显高于环境样品;刘杰等^[43]分析了47株黄沙鳖源的气单胞菌毒力基因型,提出将携带 *hly* 基因作为气单胞菌有毒株鉴定标准的建议。与上述研究相似,本研究发现,尽管大多数菌株被检测到5~6个毒力基因,然而,毒力基因 *hly* 是鳃鲈致病(致死)的最重要毒性基因之一。7株气单胞菌中 *hly*(+)菌株的人工感染使鳃鲈的致死率达到100%,而 *hly*(-)菌株致死率明显下降(最高达85%)。此外,Albert等^[13]发现 *ast*(+)*alt*(+)菌株在腹泻样品中的检出率明显高于正常样品和环境样品,本研究发现 *aphA*(+)*ast*(+)*alt*(+)*act*(-)菌株的人工感染鳃鲈致死率为85%,而 *aphA*(-)*ast*(-)*act*(-)*alt*(-)菌株的人工感染的死亡率仅为7%,因此,推测 *ast*(+)*alt*(+)可能是鳃鲈致病菌的重要毒力基因。本研究还发现 *aphA*(-)*ast*(+)*act*(+)*alt*(-)菌株的人工感染致死率为53%,因此,*ast*和*act*二者之一,或二者共同也可能在鳃鲈致病(致死)中起重要作用,然而,由于本研究数据有限,该结论有待进一步研究确认。

3.2 胞外产物生物活性与菌株毒力基因直接相关

不同菌株胞外产物的生物活性与菌株对机体的致病机理及临床症状等相关。如外毒素的溶血活性可直接破坏鱼体血细胞引发败血症等^[24];一些蛋白酶如酪蛋白酶、卵磷脂酶和明胶酶等具有分解胶原、蛋白质、脂类等生物活性,起到溶解机体肌肉组织、结缔组织等作用,间接为病原菌提供营养物质^[4]。分析本研究结果发现,致病菌的胞外产物活性与毒力基因直接相关,如本研究的7株试验菌株均表现出明显的溶血活性(表4),除豚鼠气单胞菌B14外,其他6株致病菌都检测到至少1种以上的溶血活性相关的外毒素基因,即这7株气单胞菌的溶血活性可能与其编码的外毒素基因直接相关。至于豚鼠气单胞菌B14具有溶血活性,却未能检测到溶血相关毒力基因存在,可能由于该菌株溶血性毒力基因超出本研究检测的基因范围,前人也有类似的毒力基因与相关胞外蛋白生物活性不相符的情况^[26,41,44]。此外,7株试验菌株的酪蛋白酶和卵磷脂酶活性表现与基因 *epr* 和 *ahpA* 密切相关。Tsong等^[45]指出 *epr* 编码的胞外蛋白与其他的锌金属蛋白酶序列同源,具有酪蛋白酶活性;而 *ahpA* 编码的蛋白则可水解卵磷脂、蛋白酶及弹性蛋白等^[19]。

3.3 分子质量为50.7 ku条带可能是气溶素

Chopra等^[46]发现气单胞菌胞外产物中1条分子质量约为52 ku的保守条带,通过分子克隆的方式将该蛋白的基因得以扩增和重组表达,发现该蛋白具有细胞毒性、肠毒性和溶血活性,并将该蛋白称为肠毒素。Buchley等^[47]却提出将该蛋白^[46]归类为气溶素更准确,他指出气溶素与上述蛋白有着很多的相似性,在气单胞菌保守、分子质量约为51.5 ku,且同样具有细胞毒性、肠毒性和溶血活性。Wang等^[48]也从患病鲫分离到的嗜水气单胞菌培养液上清中分离到的1种分子质量为55.2 ku的具有溶血性、肠毒素和细胞毒性的HEC毒素,且对同型和异型的嗜水气单胞菌的攻击均显示出极显著的保护作用。除此之外,董传甫等^[44]也在9株气单胞菌的胞外产物中发现了分子质量约为50 ku的共同蛋白条带。本研究发现在5株气单胞菌的胞外产物中均有一分子质量约为50.7 ku的条带,高度保守,且含量最高(图1)。尽管本研究中还未来得及对该蛋白进行更加细致深入的研究,但根据目前的实验结果推测该蛋白可能是气溶素。首先,根据毒力基因检测结果的保守性发现,在这5株菌检测结果均为阳性的仅有 *aer* 和 *epr* 基因,而 *aer* 基因编码的蛋白分子质量约为51 ku,恰好与SDS-PAGE电泳图谱上保守蛋白的分子质量相符;其次,这5株菌的胞外蛋白均表现出明显的溶血活性(表4),这与气溶素生物活性相吻合;因此,推测本研究发现的50.7 ku蛋白可能是气单胞菌中保守性的具有溶血活性的气溶素。此外,本研究还发现 *hly* 和 *ahpA* 具有较高的种属保守性,有望用于属内种间的分子检测;而 *exu* 则具有较好的种间特异性,可望用于开发种内诊断试剂或毒力菌株分型。

参 考 文 献

- [1] BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS M J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease [J]. *J Fish Dis*, 2013, 36(4): 371-388.
- [2] 朱大玲, 李爱华, 钱冬, 等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28(1): 80-84.
- [3] ZHU D L, LI A H, WANG J G, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. *Front Biol China*, 2007, 2(2): 176-179.
- [4] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(1): 35-73.

- [5] 王玉,冯建军,郭松林,等.鳃鲙病原性嗜水气单胞菌与爱德华氏菌基因工程二联外膜蛋白的表达及其初步免疫原性[J].华中农业大学学报,2015,34(1):96-102.
- [6] YI S W, YOU M J, CHO H S, et al. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*) [J]. Vet Microbiol, 2013, 31, 164(1/2): 195-200.
- [7] NAWAZ M, KHAN S A, KHAN A A, et al. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish [J]. Food Microbiol, 2010, 27(3): 327-331.
- [8] 朱大玲,李爱华,汪建国,等.嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J].中山大学学报,2006,45(1):82-85.
- [9] HOSSAIN M J, SUN D, MCGAREY D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish [J]. MBio, 2014, 5(3): e00848-14. DOI: 10.1128/mBio.00848-14.
- [10] PARKER J L, SHAW J G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease [J]. J Infect, 2011, 62: 109-118.
- [11] SENDEROVICH Y, KEN-DROR S, VAINBLAT I, et al. A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhea in Israel [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): 1-6.
- [12] 李任文,李 峥,黄武军,等.1 例豚鼠气单胞菌致感染性休克死亡病例报道[J].中国现代医生,2015,53(11):143-145.
- [13] 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.
- [14] HEUZENROEDER M W, WONG C Y, FLOWER R L. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 174(1): 131-136.
- [15] SINGH V, SOMVANSHI P, RATHORE G, et al. Gene cloning, expression and homology modeling of hemolysin gene from *Aeromonas hydrophila* [J]. Protein Expr Purif, 2009, 65(1): 1-7.
- [16] ZHOU Q L, WANG Y J, XIE J, et al. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment [J]. Pol J Microbiol, 2013, 62(3): 299-302.
- [17] SINGH V, RATHORE G, KAPOOR D, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water [J]. Ind J Microbiol, 2008, 48(4): 453-458.
- [18] SINGH V, SOMVANSHI P, RATHORE G, et al. Gene cloning, expression, and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160: 1985-1991.
- [19] LI J, NI X D, LIU Y J, et al. Detection of three virulence genes *alt-ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish [J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(3): 823-830.
- [20] 邱德全,何建国,钟英长,等.嗜水气单胞菌的致病性和免疫性研究[J].中山大学学报,1996,35(5):99-110.
- [21] WANG G H, CLARK C G, LIU C Y, et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1048-1054.
- [22] KINGOMBE C I, D' AOUST J Y, HUYS G, et al. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(2): 425-433.
- [23] YU H B, ZHANG Y L, LIU Y L, et al. Identification and characterization of putative virulence of genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8): 4469-4477.
- [24] YU H B, KAUR R, LIM S, et al. Characterization of extracellular proteins of *Aeromonas hydrophila*-AH-1 [J]. Proteomics, 2007, 7(3): 436-449.
- [25] 储卫华,陆承平.聚合酶链反应(PCR)法检测嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因[J].中国兽医学报,2003,23(5):463-464.
- [26] HU M, WANG N, PAN Z H, et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China [J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 55(3): 224-233.
- [27] PRIDGEON J W, KLESIUS P H, SONG L, et al. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabam isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak [J]. Vet Microbiol, 2013, 164(3/4): 336-343.
- [28] PUTHUCHEARY S D, PUAH S M, CHUA K H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e30205.
- [29] SEN K, RODGERS M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification [J]. J Appl Microbiol, 2004, 97: 1077-1086.
- [30] 赵金平,段丽华,郭松林.鳃鲙病原菌外膜蛋白三联表达载体的构建、表达与表达产物的纯化[J].华中农业大学学报,2015,34(3):104-110.
- [31] 冯建军,郭松林,林鹏.欧洲鳃鲙免疫球蛋白轻链基因的克隆及表达分析[J].华中农业大学学报,2015,34(5):81-89.
- [32] 郭松林.鳃鲙病原菌的分类鉴定及相关免疫基础研究[D].武汉:中国科学院水生生物研究所,2006.
- [33] 段利朋,黄贝,周立红,等.拟穴青蟹两种新 C-型凝集素基因的克隆与表达分析[J].水生生物学报,2015,39(2):321-330.
- [34] 张芳芳,熊静,段明珠,等.日本鳃鲙 COX-2 基因的克隆、鉴定及表达分析[J].集美大学学报(自然科学版),2015,20(5): 321-332.
- [35] YÁÑEZ M A, CATALÁN V, APRÁIZ D, et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(3): 875-883.
- [36] FRÉDÉRIC R, HÉLÉNE M, ESTELLE J B, et al. Multilocus

- genetics to reconstruct aeromonad evolution [J]. *BMC Microbiol.*, 2012, 12: 62.
- [37] 边宇. 致病性维氏气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [38] 付乔芳, 邱军强, 胡鲲, 等. 嗜水气单胞菌国内分离株的毒力因子分布与致病性相关性分析[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(6): 53-57.
- [39] 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [40] 郭婧. 嗜水气单胞菌分离株毒力基因型分析、胞外蛋白酶的表达、提取和蛋白分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [41] 王春林, 曹雪, 刘晓丹, 等. 嗜水气单胞菌不同分离株生化特性及胞外蛋白酶的检测[J]. *畜牧与兽医*, 2008, 40(6): 16-19.
- [42] YANO Y, HAMANO K, TSUTSUI I, et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds [J]. *Food Microbiol.*, 2015, 47: 21-27.
- [43] 刘杰, 黄艳华, 黄钧. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 698-706.
- [44] 董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌胞外产物的生物活性及主要蛋白型分析[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(5): 57-61.
- [45] TSONG M C, CHING C L, MING C C. Cloning and sequencing analysis of the gene (*eprA1*) encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Gene*, 1997, 199: 225-229.
- [46] CHOPRA A K, HOUSTON C W, PETERSON J W, et al. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Can J Microbiol.*, 1993, 35(9): 513-523.
- [47] BUCHLEY J T, HOWERD S P. The Cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin [J]. *Infect and Immun.*, 1999, 67(1): 466-467.
- [48] WANG J, LIU H L, XU C M, et al. Detection of erythrocytes deficient in glycosylphosphatidylinositol anchored membrane proteins in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by the toxin HEC secreted by *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. *Hematology*, 2003, 8(1): 41-46.

Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels

XIONG Jing^{1,2,3} LAI Xiaojian^{1,2,3} YU Qin¹ GUO Songlin^{1,2} XU Jisong^{1,2,3} HUANG Wenshu^{1,4}

1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Xiamen 361021, China;

4. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, China

Abstract To clarify the roles of virulence genes and extracellular products played in the pathogenicity of *Aeromonas*, PCR amplification, SDS-PAGE electrophoresis, plate diffusion and phylogenetic analysis were used in this study to investigate into the differences of extracellular virulence factors from 7 strains of pathogenic *Aeromonas* isolated from diseased eels. The results showed that these 7 strains were significantly different in the amount and types of virulence genes (*hly*, *aer*, *ast*, *act*, *alt*, *ahpA*, *epr* and *exu*), of which *hly* may be mainly responsible for the pathogenicity of *Aeromonas*. The extracellular products of the 7 *Aeromonas* strains were different in both the amount and types, but 5 strains contained an ~50.7 ku protein which might be the product of *aer* gene. All the 7 *Aeromonas* strains exhibited hemolytic activity, protease activity of casein and lecithin in all the different growth phases tested, and their detectable activities were consistent with expression of virulence genes. Genes *hly* and *ahp* were highly conserved between genus, while *exu* was specific even within species.

Keywords *Aeromonas*; extracellular products; biological activity; virulence genes