

# 迟钝爱德华氏菌 FimA 基因的克隆及序列分析

郭立新, 李寿崧, 江树勋, 陈文炳, 邵碧英, 杨 婕  
(福建出入境检验检疫局 福建 福州 350001)

**摘 要:**以迟钝爱德华氏菌 Et、XA、EA 分离株的 DNA 为模板, 采用 PCR 技术, 扩增菌毛亚基(FimA)基因的 DNA 片段, 将其克隆到 pMD18-T 载体上。通过序列测定, 分析结果表明: Et、XA、EA FimA 基因由 534 个核苷酸组成, 编码 177 个氨基酸。Et、XA、EA 之间 FimA 基因核苷酸同源率为 99%, 与其它分离物核苷酸同源率为 76%~77%, 氨基酸同源率为 81%~82%。

**关键词:**迟钝爱德华氏菌; 菌毛亚基; 克隆; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis to Fimbrial Subunit Gene (fimA) of *Edwardsiella tarda*

GUO Li-xin, LI Shou-song, JIANG Shu-xun, CHEN Wen-bing, SHAO Bi-ying, YANG Jie  
(Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of PRC, Fuzhou 350001, China)

**Abstract:** Fimbrial subunit gene (fimA) of Et, XA and EA isolates were cloned and sequenced. The sequence analysis showed that the fimbrial subunit gene of Et, XA and EA isolates contained 534 nucleotides, encoding a protein of 177 amino acids. The similarity of nucleotide (nt) sequence of fimA gene among Et, XA and EA isolates were 99%. The nucleotide and amino acid(aa) sequence of fimA gene of these isolates shared 76% to 77% and 81% to 82% similarities to that of other *Edwardsiella tarda* isolates, respectively.

**Key words:** *Edwardsiella tarda*; FimA; cloning; sequence analysis

中图分类号: S961.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)11-0045-04

迟钝爱德华氏菌归属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)爱德华氏菌属(*Edwardsiella* Ewing and McWhorter 1965)<sup>[1]</sup>。从第一次报道开始, 该病原菌所感染的地域范围持续扩展, 寄主范围不断扩大。除中国和日本外, 在美国、德国、意大利、南非都有相关的病例报道<sup>[2]</sup>。该病菌可侵染鱼、鸟、哺乳动物、爬行动物及人类<sup>[3]</sup>。其中在水产方面, 已报道迟钝爱德华氏菌可侵染二十多种鱼类, 这给淡水、海水养殖产业带来了很大的经济损失<sup>[2][4]</sup>。

迟钝爱德华氏菌有致病株与非致病株之分, 在体外试验中, 致病株与非致病株均可侵染培养的细胞, 但只有致病株能侵入寄主体内、繁殖、扩散到各器官中, 最终导致寄主死亡<sup>[5]</sup>。在致病株与非致病株中共存有十四种毒力基因, 但其中七种毒力基因, 即 *orfA*、*citC*、*fimA*、*gadB*、*katB*、*mukF* 及 *ssrB*, 仅存在于致病株中<sup>[4]</sup>。

迟钝爱德华氏菌致病株侵染寄主, 首先必须通过 *fimA* 基因的作用, *fimA* 基因又名菌毛亚基基因, 参与细菌与寄主细胞的结合<sup>[3][6,7]</sup>。目前关于迟钝爱德华氏菌 *fimA* 基因的研究较少, 国内尚未见相关报道, Genbank 中已公布的该基因的序列仅有两条, 均为国外报道, 这使我国对该病菌的研究带来了不便, 为此本研究对迟钝爱德华氏菌 *fimA* 基因进行了克隆与序列测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与培养条件

迟钝爱德华氏菌 Et 分离株由福建淡水水产研究所惠赠, 分离于日本鳗鲡(*Japanese eel*); XA 分离株为厦门检验检疫局动物检疫实验室保存, 分离于中华乌塘鳢

收稿日期: 2006-06-25

基金项目: 福建省科技厅科技攻关计划重点项目(2004Y046); 国家质检总局科技司资助项目(2006IK115)

作者简介: 郭立新(1976-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

(*Bostrichthys sinellisis* Lacepede), 即鲟虎; EA 分离株为厦门检验检疫局动物检疫实验室保存, 分离于鳄鱼 (*Crocodylus*)。嗜水气单胞菌标准株 BZ 从中国科学院微生物菌种保藏中心购买。所有菌株用 LB 液体培养基室温过夜培养。

### 1.1.2 分子生物学试剂

Taq DNA polymerase、MgCl<sub>2</sub> 等 上海 Promega 公司; dNTPs、克隆载体 pMD18-T、胶回收试剂盒等 TaKaRa 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 的提取

取 1.5ml 细菌培养液于微量离心管中, 8000r/min 离心 5min, 收集沉淀; 加 300μl 双蒸水煮沸 5min, 冰浴 5min, 反复 3 次; 10000r/min 离心 30s; 收集上清液, 即模板 DNA。

### 1.2.2 PCR

(1) 引物: 根据 GenBank 中已登录的迟钝爱德华氏菌核苷酸序列, 设计并合成了一对引物, fimA-Ph1: 5' - ATG ATA ATG AAG AAA ATT TTA CTG CCT G -3'; fimA-Pc1: 5' - TTA TTT ATA TTC GAT GGT GAA CGG GC -3'。引物 FimA-Ph1 与迟钝爱德华氏菌 (GenBank 登录号 AB100170) 基因的 2083~2110 nt 相对应, 引物 fimA-Pc1 与 2597~2622 nt 相互补<sup>[3]</sup>。(2) 以 DNA 为模板, 进行 PCR。50μl 反应体系含 36.5μl 灭菌重蒸水, 5μl Taq DNA polymerase 10 × Buffer, 1μl dNTPs (2.5mmol/L), 1μl MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L), 0.5μl 引物 fimA-Ph1 (20μmol/L), 0.5μl 引物 fimA-Pc1 (20μmol/L), 0.5μl Taq DNA polymerase (5U/μl), 2.5μl DNA (100ng/μl)。反应条件: 94 8min; 然后 94 45s, 45 45s, 72 50s, 35 个循环; 72 10min。

### 1.2.3 目的片段克隆和序列分析

PCR 反应产物, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的 DNA 片段。将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T Vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5<sup>+</sup>, 经蓝白斑筛选、细菌 PCR 法和质粒 PCR 法获得阳性克隆。核苷酸序列测定由上海博亚公司完成。利用 OMIGA2.0 和 BLAST 对所测序列进行比较分析。

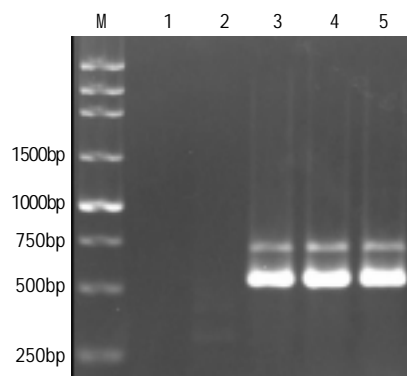
## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

以迟钝爱德华氏菌三个分离株 DNA 为模板通过 PCR 扩增到大小为 540bp 的目标片段, 而水、嗜水气单胞菌未出现特异性扩增 (图 1)。

### 2.2 迟钝爱德华氏菌 fimA 基因的克隆及序列分析

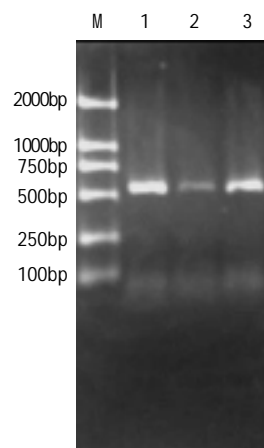
将三个分离株扩增出的 540bp 的特异性片段分别克



泳道 M: 分子标记 250bp DNA Ladder Marker; 泳道 1: 水; 泳道 2: 嗜水气单胞菌 BZ; 泳道 3: Et 分离株; 泳道 4: EA 分离株; 泳道 5: XA 分离株。

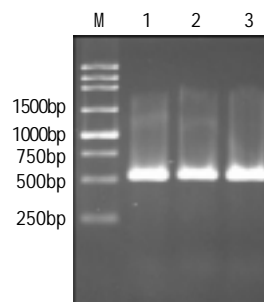
图 1 迟钝爱德华氏菌 fimA 基因的 PCR 结果  
Fig.1 The results of PCR

隆到 pMD18-T 载体上, 进行菌落 PCR 鉴定 (图 2) 后提取质粒, 对质粒进行 PCR 鉴定 (图 3)。序列分析和测定结果表明, 所克隆的 540bp 片段中含有全长的 fimA 基因,



泳道 M: 分子标记 DL2000; 泳道 1: Et 分离株菌斑; 泳道 2: EA 分离株菌斑; 泳道 3: XA 分离株菌斑。

图 2 菌落 PCR 筛选阳性克隆子  
Fig.2 Positive clones selected by PCR



泳道 M: 分子标记 250bp DNA Ladder Marker; 泳道 1: Et 质粒; 泳道 2: EA 质粒; 泳道 3: XA 质粒。

图 3 质粒的 PCR 结果  
Fig.3 The results of recombinant plasmid PCR

大小为 534bp, 编码产生 177 个氨基酸, 核苷酸和推导的氨基酸序列见图 4~6。

### 2.3 迟钝爱德华氏菌 Et、XA、EA 分离株与其它分离物 fimA 基因序列的比较

利用 BLAST 和 OMIGA2.0 对 Et、XA 和 EA fimA 基因序列与 GenBank 中已登录的序列进行比较分析, 结果表明, Et、XA 和 EA 三个分离物 fimA 基因之间的核苷酸序列同源性为 99%, 与其它分离物核苷酸序列同源性为 76%~77%, 氨基酸序列同源性为 81%~82%。

### 3 讨论

GenBank 中登陆号为 AF491964 的序列 fimA 基因大小为 540bp, 其 SD 序列(核糖体结合位点)位于起始密码子上游 2 个核苷酸位置。Takamitsu Sakai 研究表明, 迟钝爱德华氏菌 fimA 基因大小为 534bp, 编码产生 177 个氨基酸, 生成 19.3kDa 的产物, 信号肽由 22 个氨基酸组成, SD 序列位于起始密码子上游 8 个核苷酸位置<sup>[3]</sup>。由于 SD 序列起着协助辨认起始密码子的作用, Whi tehorn, E. A. 报道 SD 序列应位于起始密码子上游 3~11 个核苷酸

```

1  ATGATAATGAAGAAAATTTTACTGCCTGTTATGGCCCTGAGCGCTAGCGTGATGAGTGGT
    M  K  K  I  L  L  P  V  M  A  L  S  A  S  V  M  S  G
61  CAGGTCAGCGCCGCAACGGTACTGTTAATTTTACCGGTGAAATCATTAACTCTACTTGT
    Q  V  S  A  A  N  G  T  V  N  F  T  G  E  I  I  N  S  T  C
121 CAGGTGAGTGGTGATTCAAAAAATATCGACGTATACCTGGGCAAGTATCCGACCTCCGCG
    Q  V  S  G  D  S  K  N  I  D  V  Y  L  G  K  Y  P  T  S  A
181 TTTAAGGCGATCGGTGATAAATCTGCCTCTAAGGCCTTCCAGATTAACCTGGAACAGTGT
    F  K  A  I  G  D  K  S  A  S  K  A  F  Q  I  N  L  E  Q  C
241 GAGCCGGGGACTTATACCGTGCGTTTCGACGGTAACACCGTCGCAGGGCATCCCGATTG
    E  P  G  T  Y  T  V  R  F  D  G  N  T  V  A  G  H  P  D  L
301 CTGGCGGTCAGTGGTGACGGTTCTACCGCCGCGACACAAGGGCTCGGTATCGAGATCACC
    L  A  V  S  G  D  G  S  T  A  A  T  Q  G  L  G  I  E  I  T
361 GATATTAATGGTAAGCATTTTGCCATTGCTAACAAGGCGACAGGTGAGGAACCGACGGTG
    D  I  N  G  K  H  F  A  I  A  N  K  A  T  G  E  E  P  T  V
421 AAAGTTGTTGGTGATAAGAAGGCTGTCTTCAATTTGCAAGCGGTTATCGCTCTTACGCC
    K  V  V  G  D  K  K  A  V  F  N  L  Q  A  R  Y  R  S  Y  A
481 GATACGGTTACCGCCGGTCTGGCTAACGCGACCGCCGTTTACCATCGAATATAAATAA
    D  T  V  T  A  G  L  A  N  A  T  S  P  F  T  I  E  Y  K  *
  
```

终止密码子以星号表示。该序列在 NCBI GenBank 上的登录号为 DQ914634。

图 4 迟钝爱德华氏菌 Et 分离株核苷酸与推导的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the fimA gene of *E. tarda* Et

```

1  ATGATAATGAAGAAAATTTTACTGCCTGTTATGGCCCTGAGCGCTAGCGTGATGAGTGGT
    M  K  K  I  L  L  P  V  M  A  L  S  A  S  V  M  S  G
61  CAGGTCAGCGCCGCAACGGTACTGTTAATTTTACCGGTGAAATCATTAACTCTACTTGT
    Q  V  S  A  A  N  G  T  V  N  F  T  G  E  I  I  N  S  T  C
121 CAGGTGAGTGGTGATTCAAAAAATATCGACGTATACCTGGGCAAGTATCCGACCTCCGCG
    Q  V  S  G  D  S  K  N  I  D  V  Y  L  G  K  Y  P  T  S  A
181 TTTAAGGCGATCGGTGATAAATCTGCCTCTAAGGCCTTCCAGATTAACCTGGAACAGTGT
    F  K  A  I  G  D  K  S  A  S  K  A  F  Q  I  N  L  E  Q  C
241 GAGCCGGGGACTTATACCGTGCGTTTCGACGGTAACACCGTCGCAGGGCATCCCGATTG
    E  P  G  T  Y  T  V  R  F  D  G  N  T  V  A  G  H  P  D  L
301 CTGGCGGTCAGTGGTGACGGTTCTACTGCCGCGGACACAAGGGCTCGGTATCGAGATCACC
    L  A  V  S  G  D  G  S  T  A  A  A  Q  G  L  G  I  E  I  T
361 GATATTAATGGTAAGCATTTTGCCATTGCTAACAAGGCGACAGGTGAGGAACCGACGGTG
    D  I  N  G  K  H  F  A  I  A  N  K  A  T  G  E  E  P  T  V
421 AAAGTTGTTGGTGATAAGAAGGCTGTCTTCAATTTGCAAGCGGTTATCGCTCTTACGCC
    K  V  V  G  D  K  K  A  V  F  N  L  Q  A  R  Y  R  S  Y  A
481 GATACGGTTACCGCCGGTCTGGCTAACGCGACCGCCGTTTACCATCGAATATAAATAA
    D  T  V  T  A  G  L  A  N  A  T  S  P  F  T  I  E  Y  K  *
  
```

终止密码子以星号表示。该序列在 NCBI GenBank 上的登录号为 DQ914636。

图 5 迟钝爱德华氏菌 XA 分离株核苷酸与推导的氨基酸序列

Fig.5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the fimA gene of *E. tarda* XA

```

1  ATGATAATGAAGAAAATTTTACTGCCTGTTATGGCCCTGAGCGCTAGCGTGATGAGTGGT
    M K K I L L P V M A L S A S V M S G
61  CAGGTCAGCGCCGCCAACGGTACTGTTAATTTTACCGGTGAAATCATTAACCTCTACTTGT
    Q V S A A N G T V N F T G E I I N S T C
121 CAGGTGAGTGGTGATTCAAAAAATATCGACGTATACCTGGGCAAGTATCGACCTCCGCG
    Q V S G D S K N I D V Y L G K Y P T S A
181 TTTAAGGCGATCGGTGATAAATCTGCCTCTAAGGCCTTCCAGATTAACCTGGAACAGTGT
    F K A I G D K S A S K A F Q I N L E Q C
241 GAGCCGGGGACTTATACCGTGCGTTTCGACGGTAACACCGTCGCAGGGCATCCCGATTG
    E P G T Y T V R F D G N T V A G H P D L
301 CTGGCGGTCAAGTGGTGACGGTCTACCGCCGCGGCACAAGGGCTCGGTATCGAGATCACC
    L A V S G D G S T A A A Q G L G I E I T
361 GATATTAATGGTAAGCATTTTGCCTTCTAACAAGGCGACAGGTGAGGAACCGACGGTG
    D I N G K H F A I A N K A T G E P T V
421 AAAGTTGTTGGTGATAAGAAGGCTGTCTTCAATTTGCAAGCGCGTTATCGCTCTTACGCC
    K V V G D K K A V F N L Q A R Y R S Y A
481 GATACGGTTACCGCCGGTCTGGCTAACGCGACCAGCCCGTTACCATCGAATATAAATAA
    D T V T A G L A N A T S P F T I E Y K *

```

终止密码子以星号表示。该序列在NCBI GenBank上的登录号为DQ914635。

图6 迟钝爱德华氏菌EA分离株核苷酸与推导的氨基酸序列

Fig.6 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the fimA gene of *E. tarda* EA

位置<sup>[8]</sup>。故本人支持fi mA基因大小为534bp的观点。

本研究对迟钝爱德华氏菌三个分离物的fi mA基因进行了克隆,这为进一步构建原核表达载体、表达菌毛亚基蛋白和相应的分子定向研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergeys' manual of determinative bacteriology (ninth edition) [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, 178, 204, 225.
- [2] 郑大海, 麦康森. 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2004, (1): 52-59.
- [3] Takami tsu Sakai, Ki nya Kanai, Ki yoshi Osatomi, et al. Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 226: 127-133.
- [4] Putanae S Srinivasa Rao, Tit Meng Lim, Ka Yin Leung. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2003, 71 (3): 1343-1351.
- [5] Sharon H M Ling, Xian Hui Wang, Tit Meng Lim, et al. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 194: 239-243.
- [6] Soto G E, Hultgren S J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly[J]. J Bacteriol, 1999, 181: 1059-1071.
- [7] Abraham S N, Jonsson A B, Normark S. Fimbriae mediated host-pathogen cross-talk[J]. Curr Opin Microbiol, 1998, (1): 75-81.
- [8] Whitehorn E A, Livak K J, Petteway S R. The effect of hybrid ribosome-binding-site variants on the expression of human interferon- $\alpha$  in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1985, 36: 375-379.



## 美国科学家发现开发鼠疫疫苗的新方法

马萨诸塞大学医学院的Egil Lien教授近日宣布,他领导的研究小组最近发现一种开发鼠疫疫苗的新方法,可以有效预防人感染鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)。Lien教授发现鼠疫杆菌表面的蛋白和多糖比较特殊,使其不能像其他普通细菌一样激发人体的免疫反应,从而使鼠疫杆菌在数百年来不断给人类制造麻烦。

针对鼠疫杆菌的这一特点,Lien教授利用基因工程技术制造了一种新的鼠疫杆菌,其表面蛋白可以激发鼠的免疫反应,并使其获得有效抵御各种亚型鼠疫杆菌感染的能力。Lien教授表示,利用这种技术也可以开发出更为有效的人用疫苗,从而使人类远离鼠疫这一重大疫病。

相关的研究结果已在近期的《Nature Immunology》杂志上发表。