

框镜鲤维氏气单胞菌 CY0806 株鞭毛 *flaA* 基因的克隆与生物信息学分析

单晓枫^{1†}, 吴同垒^{1†}, 孟庆峰², 王伟利², 钱爱东¹

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062)

摘要:以框镜鲤 *Cyprinus carpio* 维氏气单胞菌 *Aeromonas veronii* CY0806 株细菌基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 获得 *flaA* 基因, 将其克隆并测序, 测序结果与气单胞菌属的不同菌株进行相似性分析, 并对 *flaA* 基因编码蛋白质进行生物信息学分析. 结果显示: 获得框镜鲤维氏气单胞菌鞭毛 *flaA* 基因, 长 915 bp, 编码 304 个氨基酸, 系统进化树分析, 其与其他维氏气单胞菌 *flaA* 基因处于同一分支, 相关生物信息学分析显示, *flaA* 基因编码的蛋白质相对分子质量 32 098.66, 等电点 5.57, 半衰期 30 h, 不稳定性系数为 32.31, 脂肪系数 81.05, 不存在信号肽和跨膜区, 二级结构预测: *flaA* 基因以 α 螺旋和 β 折叠为主, 同时, 以同源建模法预测了 *flaA* 基因编码蛋白的三维立体结构.

关键词:框镜鲤; 维氏气单胞菌; *flaA* 基因; 生物信息学

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)01-0092-04

Cloning and Bioinformatic Analysis of Flagellum *flaA* Gene of *Aeromonas veronii* CY0806 from *Cyprinus carpio*

SHAN Xiao-feng^{1†}, WU Tong-lei^{1†}, MENG Qing-feng², WANG Wei-li², QIAN Ai-dong¹

(1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: The *flaA* gene was amplified from genome template of *Aeromonas veronii* CY0806 of *Cyprinus carpio* by PCR. Homogeneous analysis was carried out by comparing the sequencing results with other strains of *Aeromonas* and bioinformatic analysis was done on the protein coded by *flaA*. The results showed that *flaA* Gene with a length of 915 bp, coding 304 amino acids, was obtained; phylogenetic tree analysis results showed that it was on the same branch with other strains of *Aeromonas*. Bioinformatic analysis results showed that the relative molecular mass of the protein was 32 098.66, pI 5.57, half-life 30 h, unstability index 32.31, fat index 81.05 whereas there was no signal sequence and transmembrane domain. Results of secondary structural analysis showed that the main secondary structures were α -helix and β -sheet. At the same time the tertiary structure was also predicted by homology modeling.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Aeromonas veronii*; *flaA* gene; bioinformatic analysis

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*, AV)隶属于弧菌科气单胞菌属, 是一种人-兽-鱼共患病原菌. 其不仅在人抵抗力下降时, 感染机体引发人的坏死性脑炎、败血症、腹泻等疾病^[1-3]; 而且也可引发水生动物

收稿日期: 2011-04-28

作者简介: 单晓枫(1977—), 男, 实验师, 博士研究生; 吴同垒(1987—), 男, 硕士研究生; † 对本文贡献相同; 通信作者: 钱爱东(1960—), 男, 教授, 博士, E-mail: qianaidong0115@163.com

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2010BAD04B01); 吉林省科技支撑计划重点项目(20080218); 吉林农业大学青年启动基金

物的疾病,给水产养殖业造成巨大损失^[4-6]. AV 有多种毒力因子,主要包括外毒素、蛋白酶、鞭毛、外膜蛋白等,其中,鞭毛作为大多数细菌的主要运动器官,在细菌致病性方面,起着举足轻重的作用. 目前,国内 AV 的研究正处于起步阶段,本研究以框镜鲤 *Cyprinus carpio* AV CY0806 为研究对象,克隆其鞭毛 flaA 基因,并对其编码蛋白质进行了生物信息学分析,以期阐明框镜鲤 AV 的发病机理、基因工程疫苗等研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

框镜鲤 AV CY0806 株分离自患病框镜鲤,为吉林农业大学预防兽医学研究室保存;大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 为吉林农业大学动物科学技术学院生物技术研究室保存;pMD18-T vector 为宝生物工程(大连)有限公司产品.

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP 均为宝生物工程(大连)有限公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒为爱思进生物技术有限公司产品;质粒小量抽提试剂盒为北京索莱宝科技有限公司产品;气单胞菌培养基 RS 为北京陆桥技术有限责任公司产品;其他试剂均为进口或国产分析纯.

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 上发表的 AV 鞭毛 flaA 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 1 对引物:上游引物 P1:5'-GCGGAATTCATGGGCCTT-TATATCA-3',下游引物 P2:5'-ACGAAGCTTTTAGC-CTTGCCAACAGA-3',预计扩增片段长 915 bp,该引物由宝生物工程(大连)有限公司合成.

1.4 鞭毛 flaA 基因的 PCR 扩增

将低温保存的 AV CY0806 划线接种于 RS 培养基上,30 ℃ 培养 24 h,挑取特征菌落接种于普通 LB 液体培养基中,30 ℃ 培养 18 h,取 1 mL 菌液,提取细菌基因组 DNA,具体操作参照细菌基因组 DNA 提取手册. 以菌株 CY0806 基因组 DNA 为模板,P1、P2 为引物,采用 50 μ L 反应体系进行 PCR 扩增 flaA 基因,反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 1 min、58 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min、循环 32 次,最后 72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物于 4 ℃ 保存.

1.5 鞭毛 flaA 基因的克隆及鉴定

将 PCR 扩增产物用 0.01 kg/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,并与

pMD18-T vector 连接,转化至 DH5 α 感受态细菌. 将转化产物涂布于含氨苄青霉素 LB 固体培养基上,37 ℃ 培养 12 ~ 16 h,挑取单个菌落、增菌,用小量质粒抽提试剂盒提取质粒并进行 PCR 验证,筛选出阳性重组质粒送至宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定.

1.6 鞭毛 flaA 基因的序列分析及系统进化树构建

将所测 flaA 基因序列用 Blastn 进行比对,并从 NCBI 上下载气单胞菌属不同菌种的 flaA 基因,应用 Mega4.0 软件构建系统进化树.

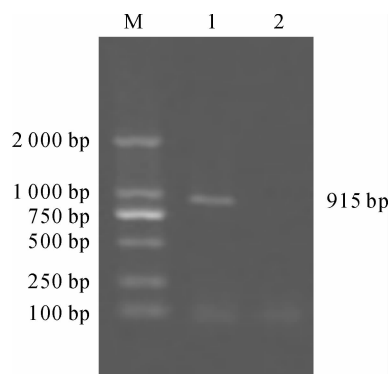
1.7 鞭毛 flaA 基因编码蛋白的生物信息学分析

将 flaA 基因开放阅读框录入 DNASTar 的 Editseq 工作区,用 Translate DNA 功能翻译 flaA 氨基酸序列;利用 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam> 预测蛋白质基本理化性质;利用 SingalP v 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SingalP>) 对氨基酸序列信号肽进行分析;利用 TMHMM v 2.0 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 对序列跨膜区分析;利用 BioEdit 和 DNASTar 分析序列亲水性和疏水性;利用 DNASTar 软件的 Proteam 分析氨基酸序列的二级结构;利用 Swiss-Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/wospace>) 对蛋白质结构做同源建模.

2 结果与分析

2.1 鞭毛 flaA 基因的 PCR 扩增和鉴定

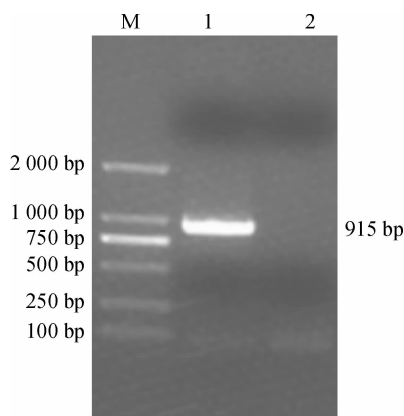
以菌体基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增出约 915 bp 的特异性条带(图 1). 将扩增的 flaA 基因片段纯化后与 pMD18-T vector 连接,经氨苄青霉素抗性筛选后,阳性重组质粒通过 PCR 鉴定,得到与目的基因大小一致的片段(图 2).



M: DNA marker DL2000;1:框镜鲤 AV CY0806 flaA 基因的 PCR 产物;2:阴性对照.

图1 框镜鲤 AV CY0806 flaA 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplified flaA gene from *Cyprinus carpio* AV CY0806 by PCR



M: DNA marker DL2000;1: 重组质粒的 PCR 产物;2: 阴性质粒对照.

图2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR

2.2 鞭毛 *flaA* 基因的序列分析与系统进化树构建

经序列测定, *flaA* 基因全长 915 bp, 编码 304 个氨基酸. 序列比对与系统进化树分析(图3)结果表明: 维氏气单胞菌 CY0806 株 *flaA* 基因与维氏气单胞菌 EU410309 和 EU410323 的 *flaA* 基因进化距离近.

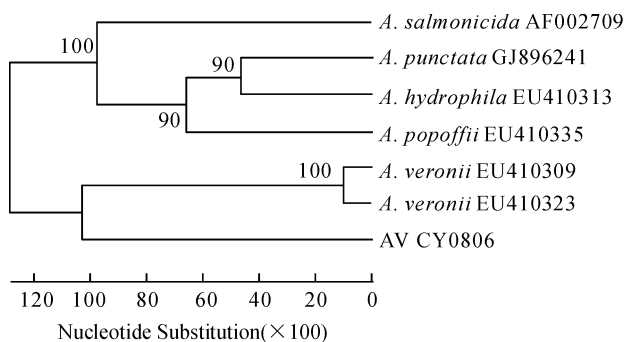


图3 框镜鲤 AV CY0806 *flaA* 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Cyprinus carpio* AV CY0806 *flaA* gene

2.3 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白生物信息学分析

2.3.1 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白分子特征 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白推导相对分子质量 32 098.66, 含有 23 个强碱性氨基酸(K、R)、24 个强酸性氨基酸(D、E)、105 个疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V)、121 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y), 等电点为 5.57, 推测分子式 $C_{1853}H_{2229}N_{409}O_{474}S_9$, 消化系数 7 450, 半衰期为 30 h(体外哺乳动物类网状细胞)、大于 20 h(在酵母体内)及 10 h(在大肠埃希菌体内), 不稳定系数 32.31(稳定蛋白), 脂肪系数 81.05.

2.3.2 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白的信号肽与跨膜区分析 通过 SingalP 软件预测分析, 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白分子无信号肽; TMHMM 分析结果显示: 此蛋白分子不存在跨膜区.

2.3.3 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白的亲水性和疏水性分析 利用 BioEdit 和 DNASTar 分析: 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白最大疏水指数 1.86, 最小疏水指数 -2.68; 最大亲水指数 2.68, 最小亲水指数 -1.86. 其分析结果如图4所示.

2.3.4 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白的二级结构预测 通过 Gamier-Robso 方法预测蛋白质二级结构发现, 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白分子存在 11 处 α 螺旋、21 处 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲则相对较少; 而应用 Chou-Fasman 方法, 发现有 10 处 α 螺旋、11 处 β 折叠、 β 转角则多至 18 处.

2.3.5 鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白的三维结构预测 将推导的氨基酸序列利用 Swiss-Model Workspace 进行同源建模, 以第 2~303 位氨基酸序列预测鞭毛 *flaA* 基因编码蛋白的三维结构(图5).

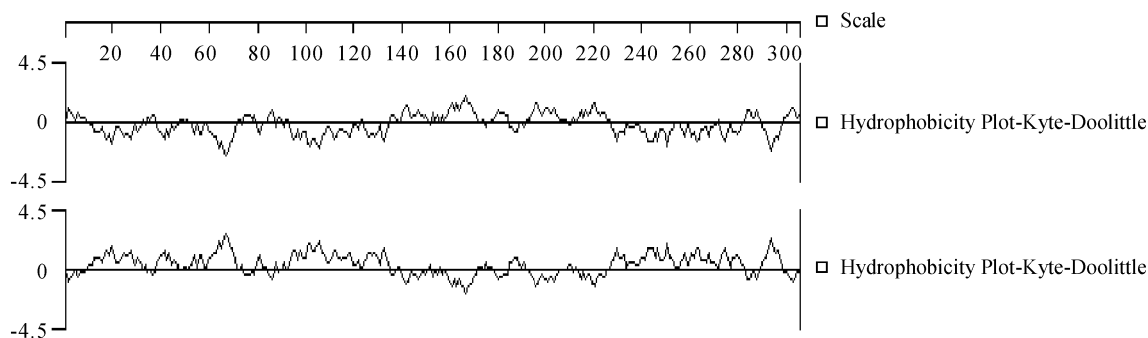


图4 框镜鲤 AV CY0806 *flaA* 蛋白的疏水性和亲水性分析

Fig. 4 Hydrophilicity prediction and hydrophobicity prediction of *Cyprinus carpio* AV CY0806 *flaA*

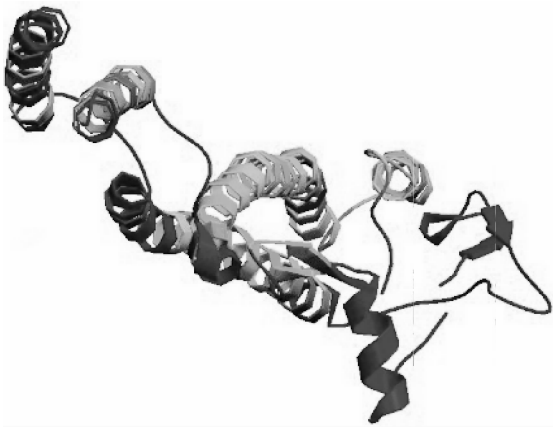


图5 flaA 三维结构预测

Fig.5 3D structure prediction of flaA

3 讨论

维氏气单胞菌作为一种较新型的人-兽-鱼共患病原菌,在引发人的各种疾病的同时,近年来,已有相当多的报道,证明其可以感染多种水生动物并引发多种疾病的流行.本研究所用菌株即为框镜鲤败血症病原菌^[7],该菌株经试验证实,可以感染多种鱼类并引起相应的病症,但其发病机理尚不清楚.而鞭毛作为多种细菌的运动器官,在细菌感染、免疫等方面发挥重要作用,其主要化学组成为蛋白质,具有良好的免疫原性.目前,从基因水平研究病原菌的鞭毛,是研究病原菌致病的分子机制和研发基因工程疫苗的基础^[8-9].为此,本试验对框镜鲤源 AV 鞭毛 flaA 基因进行了克隆并对其编码蛋白进行了相关生物信息学的分析.

本研究从框镜鲤 AV CY0806 株中克隆了 flaA 基因,经 PCR 与测序分析,成功地获得了长 915 bp 的 flaA 基因,其编码 304 个氨基酸,与其他气单胞菌属的菌株进行相似性分析,发现菌株 CY0806 flaA 基因与 GenBank 上的维氏气单胞菌 EU410309、EU410323 进化距离较近,进化树在同一分支上.但也发现,有部分基因存在差异,可能与菌株来源、地域差异有很大关系.

预测蛋白质的三维立体结构,是了解蛋白质空间结构信息的重要途径,其预测方法以同源建模、线串法和从头建算法为主^[10],其中,同源建模法是最为成功和准确的方法.本研究以同源建模法预测了 flaA 三维立体结构.预测结果,将有利于对蛋白质结构进行改造,使蛋白质的相应特性更趋于理想;另一方面还可进行分子设计,使可能成为药物的蛋白质

更好地与受体结合,充分发挥药物的功效^[11].

本试验克隆了维氏气单胞菌 CY0806 株的 flaA 基因,构建了系统进化树,并对其编码的蛋白进行了生物信息学分析,为以后研究维氏气单胞菌的发病机制、诊断方法的建立及研发疫苗以预防由 AV 引起的疾病提供了理论依据,为更好地研究这一新型人-兽-鱼共患病原菌奠定了基础.

参考文献:

- [1] SHIINA Y, LI K, IWANAGA M. An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* infection with disseminated intravascular gas production[J]. J Infect Chemother, 2004, 10 (1):37-41.
- [2] GRBNER S, BISSINGER A L, RAIBLE A, et al. Severe diarrhea caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in a patient with metastasised GIST[J]. Polish Journal of Microbiology, 2007, 56(4):277-279.
- [3] CUI Hong-yi, HAO Sun-yang, AROUS E. A distinct cause of necrotizing fasciitis: *Aeromonas veronii* biovar *sobria*[J]. Surgical Infections, 2007, 8 (5):523-528.
- [4] RAHMAN M, COLQUE-NAVARRO P, KLIHN I, et al. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh[J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68 (2):650-655.
- [5] 房海,陈翠珍,张晓君,等.中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验[J].中国人兽共患病学报,2008,24(1):45-49.
- [6] 潘晓艺,沈锦玉,李建应,等.青虾“软壳综合症”病原及其特性[J].微生物学通报,2009,36(10):1571-1576.
- [7] 龚倩,高淑琴,单晓枫,等.框镜鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J].中国预防兽医学学报,2010,32(12):981-983.
- [8] MARUYAMARU Y, MOMMA M, MIKAMI B, et al. Crystal structure of novel bacterial cell-surface flagellin binding to a polysaccharide[J]. Biochemistry, 2008, 47 (5):1393-1402.
- [9] YONEKURA K, MAKI S, NAMBA K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy[J]. Nature, 2003, 424(32):643-650.
- [10] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,2010.
- [11] 翟军军,窦永喜,张海瑞,等.小反刍兽疫病毒 P 基因的克隆及其结构与功能分析[J].中国农业科学,2010, 43(11):2355-2362.

【责任编辑 柴 焰】