

## 霍乱弧菌 04-5a 糖发酵激活蛋白编码基因分析\*

吴庆刚<sup>1</sup>, 张敬平<sup>1</sup>, 马广源<sup>1</sup>, 李伯清<sup>2</sup>, 姜勇<sup>1</sup>

**摘要:**目的 比较霍乱弧菌 04-5a 株糖发酵激活蛋白编码基因与霍乱流行株与非流行株相关序列的差异, 明确其基因型。方法 采用基因克隆测序方法, 对霍乱弧菌 04-5a 株糖发酵激活蛋白编码基因进行序列分析, 并与相关序列进行比较。结果 霍乱弧菌 04-5a 株糖发酵激活蛋白编码基因由 771 个碱基对组成, 编码 258 个氨基酸的多肽, 流行株和非流行株相关序列比较发现, 04-5a 株与流行株两者基因完全相同, 与非流行株在 334、622 和 666 位核苷酸碱基的具有差异, 第 666 位碱基的差异导致了氨基酸的不同, 在非流行株与流行株分别为丙氨酸与苏氨酸。结论 霍乱弧菌 04-5a 株糖发酵激活蛋白编码基因序列符合流行株基因特征, 在非流行株与流行株第 666 位碱基差异可能与其致病性及流行有关, 值得深入研究。

**关键词:** 霍乱弧菌; 糖发酵激活蛋白; 基因测序

中图分类号: R 516.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)05-0647-03

**Cloning and sequencing of sugar fermentation stimulation protein gene from *Vibrio cholerae* 04-5a** WU Qing-gang, ZHANG Jing-ping, MA Guang-yuan et al. Laboratory Department, Wuxi Municipal Center for Disease Control and Prevention (Wuxi 214023, China)

**Abstract: Objective** To investigate the differences in the sequences of sugar fermentation stimulation protein genes between *Vibrio cholerae* 04-5a and epidemic and nonepidemic *V. cholerae* strains. **Methods** Cloning and sequencing methods were used to analyze the sequence of sugar fermentation stimulation protein genes from *V. cholerae* 04-5a and to compare the sequences with related gene sequences. **Results** The sequence of sugar fermentation stimulation protein genes from *V. cholerae* 04-5a is a 771bp gene, encoding 258 amino acid polypeptide, and is identical to the ones from the epidemic strain. According to the sequence of sugar fermentation stimulation protein gene, the *V. cholerae* 04-5a has mutations at 334th, 622th and 666th point compared with the nonepidemic strain, and is identical to the epidemic strain. The difference of the 666th point mutation led to the changes of the deduced amino acid level. **Conclusion** The sequence of sugar fermentation stimulation protein gene from *V. cholerae* 04-5a is identical to that of from the epidemic strains and the related pathogenic mechanism and epidemiology need to be further studied.

**Key words:** *Vibrio cholerae*; sugar fermentation stimulation protein; gene sequencing

霍乱是由定居小肠的非侵袭性霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 引起的烈性肠道传染病, 其爆发流行是许多国家危害人民健康的重要公共卫生问题, 目前主要由 O1 群和 O139 群霍乱弧菌引起。霍乱弧菌不同菌株间致病力存在明显差异, 流行株具有引起霍乱流行和大流行的能力, 而非流行株不致病或仅引起散发腹泻病例, 因此流行株与非流行株的区分对于霍乱的预防与控制十分重要。中国建立的霍乱弧菌噬菌体-生物分型方案, 在霍乱防治中发挥了重要作用, 其中山梨醇发酵试验在反映 O1 群埃尔托型霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌致病力方面具有一致性规律: 流行株为山梨醇慢发酵, 非流行株为山梨醇快发酵<sup>[1]</sup>。随着霍乱弧菌毒力蛋白及毒力相关基因研究的深入, 研究结果提示, 糖发酵激活蛋白 (sugar fermentation stimulation protein) 在流行株与非流行株的山梨醇发酵试验中存在明显差异<sup>[2]</sup>。本研究拟采用 PCR 定向克隆技术对江苏省无锡市锡山地区分离的一株霍乱菌株糖发酵激活蛋白编码基因序列测定, 并与其他菌株进行比较分析, 探讨糖发酵激活蛋白在流行株与非流行株中潜在的意义。

## 1 材料与方法

1.1 菌株与质粒 霍乱弧菌 04-5a 株系 2004 年 5 月江苏省无锡市锡山前州食物中毒事件的患者排泄物中分离鉴定的

O139 菌株, N16961 株与 92-3 株分别为糖发酵激活蛋白基因序列已经清楚的 O1 群埃尔托型流行株与 O139 非流行株<sup>[2-4]</sup>。菌株中国医学细菌保藏管理中心与无锡市疾病预防控制中心专业实验室提供, 霍乱弧菌流行株与非流行株的分类按我国噬菌体-生物分型方法进行。质粒载体 pMD18-T Vector (日本, TaKaRa 公司)。

1.2 试剂和仪器 DNA 提取应用 genomic DNA isolation kit (博大泰克公司), PCR 引物由上海 Sangon 公司合成, 三磷酸脱氧核糖核苷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)、Tag DNA 聚合酶、限制性内切酶和 DNA 标准分子量参照 (英国 TaKaRa 公司)。DNA 序列分别由上海 Sangon 和上海博亚生物技术公司完成。PCR 扩增仪为 PE4800。基因分析计算机软件为 primer5.0。

1.3 霍乱菌株糖发酵激活蛋白编码基因的 PCR 扩增 根据已发表的霍乱弧菌流行株 N16961 (NC\_002505) 基因序列设计引物<sup>[5-6]</sup>。糖发酵激活蛋白编码基因的引物序列为: 5'-TCAATTTTTTGTCACTTG 和 5'-ATGCCTTCGCCATTGGC。反应体系与反应条件如下: 10 × 扩增缓冲液 5 μL, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L 混合 4 种 dNTP 200 μmol/L, 混合 4 种引物各 20 pmol, 模板 DNA 10 ng 加 DDW 至 50 μL, 混合后加入高保真 TaqDNA 聚合酶 2 u。预变性 95 °C 7 min; 94 °C 1 min, 61 °C 1 min, 72 °C 1 min 3 个循环; 91 °C 1 min, 63 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.4 霍乱菌株 04-5a 糖发酵激活蛋白编码基因的克隆和序列分析 基因克隆、质粒提取和感受态细胞制备与重组质粒

\* 基金项目: 卫生部科研基金项目 (WKJA2006-2-10)

作者单位: 1. 无锡市疾病预防控制中心检验部, 江苏 214023;

2. 中国疾病预防控制中心传染病控制所

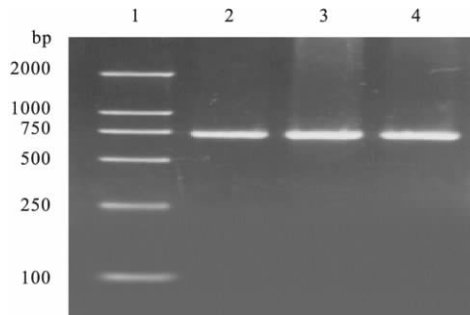
作者简介: 吴庆刚 (1966-) 男, 山东人, 副主任医师, 博士后, 主要从事病原生物学致病机制等方面的研究。

的酶切鉴定按常规方法进行。由上海 Sangon 公司完成重组质粒上插入片段序列测定。

2 结果

2.1 霍乱菌株糖发酵激活蛋白编码基因的 PCR 扩增 (图 1)

应用设计的 2 对引物扩增 3 株霍乱菌株的糖发酵激活蛋白,产生了预期的约 771 bp 的特异产物带,阳性扩增率为 100%。



注:1:分子量标准; 2:菌株 N16961; 3:菌株 04-5a; 4:菌株 92-3。

图 1 糖发酵激活蛋白编码基因 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳 (1.5%)

2.2 霍乱菌株 04-5a 糖发酵激活蛋白编码基因的序列分析 (图 2) 对江苏无锡锡山分离株 04-5a 与流行株 N16961 和非流行株 92-3 的相关序列比较发现,04-5a 株与 N16961 株两者基因完全相同。与非流行株在 334、622 和 666 位核苷酸碱基的差异(非流行株为 G、C 和 C,流行株分别为 A、T 和 T)。根据碱基推导其氨基酸序列可知,第 666 位碱基的差异导致编码蛋白的氨基酸由非流行株的丙氨酸变为流行株的苏氨酸。应用无意义链(转录链)对 04-5a 菌株的糖发酵激活蛋白的基因序列和推导的氨基酸序列与 92-3 株与 N16961 株的相关序列进行比较,结果表明,04-5a 株糖发酵激活蛋白的基因由 771 个碱基对组成,具有典型的原核基因结构特征。起始密码子 ATG 位于碱基的 0~3 处,终止密码子 TGA 位于碱基 769~771 处,从起始密码子到终止密码子的开放阅读框全长为 768 bp,共翻译 258 个氨基酸组成的蛋白质。推导信号肽序列由成熟肽的 NH<sub>2</sub>-端丙氨酸上游 33 个密码子组成,信号肽序列的-1、-3 位切割三联体为 ALF。04-5a 株糖发酵激活蛋白序列由编码基因推导氨基酸的组成为 3 个部分,即 NH<sub>2</sub>-端、Cys-Cys 环区和 COOH-端。其中-NH<sub>2</sub> 端、-COOH 端和信号肽序列为遗传高度保守区域。

92-3	1	ATG CCT TCG CCA TTG GCT ATG AAT AAG AAG AGA AAC ATG CAC TTT TCC CCA CCT CTA CAA
N16961		.....
04-5a		.....
AA		M P S P L A M N K K R N M H F S P P L Q
92-3	61	AAA GGA ACC TTA CTC AAA CGT TAC AAA CGC TTT TTG GCC GAT GTC GCG CTG GAA GAT GGT
N16961		.....A.....
04-5a		.....A.....
AA		K G T L L K R Y K R F L A D V A(T) L E D G
		-1 +1
92-3	121	TCG GTG ATC ACC ATG CAC TGT GCG AAC ACG GGC GCC ATG ACT GGC TGC GCC GAG CCG GGC
N16961		.....T.....A.....
04-5a		.....T.....A.....
AA		S V I T M H C A N T G A M T G C A E P G
		+10
92-3	181	AGT ACG GTG TGG TTT TCT ACA TCG GAT AAT CCC AAA CGC AAA TAC GCC CAC AGT TGG GAA
N16961		.....
04-5a		.....
AA		S T V W F S T S D N P K R K Y A H S W E
		+30
92-3	241	CTG ACG CAG ACC CAA GCA GGT CAC TGG ATT TGC GTG AAT ACC GCG CGA GCC AAC GCA TTG
N16961		.....
04-5a		.....
AA		L T Q T Q A G H W I C V N T A R A N A L
		+50
92-3	301	GTG GTC GAA GCG ATT TTG GCA GGA GAG ATC CCA CAA CTG CGG GGT TAT GAC GCA CTC AGT
N16961		.....
04-5a		.....
AA		V V E A I L A G E I P Q L R G Y D A L S
		+70
92-3	361	ACG GAG GTG AAG TAC GGT CAT GAA AAT AGC CGT ATC GAT ATC TTG CTA AAG TCA GAT TCT
N16961		.....
04-5a		.....
AA		T E V K Y G H E N S R I D I L L K S D S
		+90
92-3	421	CAA CCA CAC TGC TTT ATA GAA GTA AAA AGC GTC ACT CTT TTG GAT GAG ATT CAA GGC GAT
N16961		.....
04-5a		.....

AA	Q P H C F I E V K S V T L L D E I Q G D
	+110
92-3 481	AAA GGG CAA GGT TAC TTT CCT GAT GCG GTG ACA ACC CGT GGT CAG AAG CAT CTG CGT GAG
N16961	.....
04-5a	.....
AA	K G Q G Y F P D A V T T R G Q K H L R E
	+130
92-3 541	CTG GCG GAA GTC GCT AAA GAT GGA AGC AGG TCG ATA CTT TTA TTT GCC GTT TTG CAT TCA
N16961	.....
04-5a	.....
AA	L A E V A K D G S R S I L L F A V L H S
	+150
92-3 601	GGG ATT GAA AAA GTC GCT CCC GCT CTC CAT ATA GAC GCG AAT CAT TCA CAG TTA CTA AAA
N16961	.....
04-5a	.....
AA	G I E K V A P A L H I D A N Y S Q L L K
	+170
92-3 661	GCG GCA CAA GAA GCC GGA GTG GAA GTG TTG TGC TAC AAA GCG TCA CTT TCA AAA CAC GAG
N16961	.....
04-5a	.....
AA	A A Q E A G V E V L C Y K A S L S K H E
	+190
92-3 721	ATC CGA ATG GTA TCT GAG GTC AAA TTT GCC CAT CAA GTG ACA AAA AAT TGA
N16961	..... * * *
04-5a	..... * * *
AA	I R M V S E V K F A H Q V T K N
	+210

注:92-3: 92-3 菌株的糖发酵激活蛋白的基因序列; N: 16961: N16961 菌株的糖发酵激活蛋白的基因序列;  
04-5a: 04-5a 菌株的糖发酵激活蛋白的基因序列; AA: 推导的氨基酸序列; 黑体与(): 碱基与氨基酸的变化; \* \* \*: 终止密码。

图2 04-5a 菌株糖发酵激活蛋白基因和氨基酸序列与菌株 92-3 与 N16961 相关序列比较

### 3 讨论

霍乱是一种严重危害人类健康的烈性肠道传染病,其流行株与非流行株的致病性存在显著差异,因此,菌株的分型鉴定对于霍乱的预防与控制十分重要。本研究采用 PCR 克隆技术对霍乱 04-5a 株糖发酵激活蛋白编码基因序列测定,并与其他菌株进行比较分析发现,糖发酵激活蛋白编码基因与流行株完全相同,与非流行株在 334、622 和 666 位核苷酸碱基的差异(非流行株为 G、C 和 C,流行株分别为 A、T 和 T)。第 666 位碱基的差异导致编码蛋白的氨基酸由非流行株的丙氨酸变为流行株的苏氨酸。由于丙氨酸为非极性疏水氨基酸,苏氨酸为极性中性氨基酸并可在信号转导过程中磷酸化,而此处位置又恰在蛋白质的 NH<sub>2</sub>-端紧邻信号肽切割三联体(中间仅间隔 2 个氨基酸残基),本研究推测,这一改变有可能影响菌株糖发酵激活蛋白信号肽切割方式与细胞信号转导通路中蛋白的磷酸化,进而对快慢发酵产生直接影响,这一改变可能对区分霍乱菌株的流行株与非流行株具有分子标识的潜在价值。已有研究结果表明,霍乱弧菌流行株中存在许多外源基因片断,然而在细菌进化过程中流行株是否较非流行株更易接受外源基因片断,是否是造成这种差异的原因,至今仍未明确,这种差异的原因仍未明确<sup>[5-7]</sup>。结合本实验的研究结果,虽然流行株与非流行株在糖发酵激活蛋白编码基

因的改变具有一定的规律性,但影响霍乱弧菌甘露糖快慢发酵的内在机制可能复杂的多,有待进一步深入研究。

### 参考文献

- (1) 高守一. 埃尔托型霍乱弧菌流行株与非流行株两类菌株的研究及应用[J]. 中华流行病学杂志, 1988, suppl 3: 10-26.
- (2) 李柏生, 谭海玲, 王多春, 等. 广东省 O1/O139 群霍乱弧菌耐药监测分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(3): 321-322.
- (3) Mukherjee G, Biswas A, Banerjee KK, et al. *Vibrio cholerae* hemolysin is apoptogenic to peritoneal B-1a cells but its oligomer shepherd the cells for IgA response [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 266-270.
- (4) Colwell RR. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease [J]. Int Microbiol 2004, 7: 285-289.
- (5) Alam M, Sultana M, Nair GB, et al. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh [J]. Appl Environ Microbiol 2006, 72: 2849-2855.
- (6) Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Nair GB, et al. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae* [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10: 2057-2059.
- (7) Nair GB, Qadri F, Holmgren J, et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44: 4211-4213.

收稿日期: 2011-07-14

(宋艳萍编辑 李贵福校对)