

嗜水气单胞菌气溶素和溶血素基因的克隆与结构预测

刘明智^{1,2}, 叶星^{1*}, 田园园¹, 邓国成¹, 马冬梅¹, 白俊杰¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380; 2. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要:从患出血病草鱼体上分离出 1 个菌株, 传统分类学及 16S rRNA 基因鉴定其为嗜水气单胞菌, 人工感染实验显示该分离菌株为强毒株。克隆该菌株的气溶素 (*aerolysin*, *aeA*) 基因和溶血素 (*hemolysin*, *hlyA*) 基因, 序列分析显示这 2 个基因只有 46.7% 的同源性。BLAST 分析显示, *hlyA* 基因与 GenBank 上已登录的 *hlyA* 序列具有较高的同源性, 而 *aeA* 基因与已登录的 *aeA* 基因以及一些 *hlyA* 序列也具有较高的同源性。对与 *aeA* 基因同源性较高的这些 *hlyA* 序列进行结构域预测, 发现它们均具有 APT 结构域和气溶素结构域, 说明它们实际上应是 *aeA* 基因, 只是命名上与 *hlyA* 基因混淆。用 DNASTAR 软件预测 *aeA* 和 *hlyA* 的抗原区, 显示它们均具有很好的抗原性。用特异性引物检测菌株的 *aeA* 基因和 *hlyA* 基因, 结果显示 2 株毒力株均有特异条带, 而无毒株则未扩增到特异条带, 说明 *aeA* 和 *hlyA* 有可能作为鉴定嗜水气单胞菌毒力菌株的标记。

关键词:嗜水气单胞菌; 气溶素; 溶血素; 基因; 序列

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0356-07

Cloning and Structure Prediction of *aerA* Gene and *hlyA* Gene of *Aeromonas hydrophila*

LIU Ming-zhi^{1,2}, YE Xing^{1*}, TIAN Yuan-yuan¹,
DENG Guo-cheng¹, MA Dong-mei¹, BAI Jun-jie¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A bacteria strain was isolated from grass carp which suffered from hemorrhage. The bacteria strain was identified as *Aeromonas hydrophila* by both traditional taxonomic method and 16s rRNA identification, and it was identified as a virulent strain by artificial infection experiment. *Aerolysin* (*aeA*) gene and *hemolysin* (*hlyA*) gene of the strain were cloned. Sequence analysis showed that these two genes shared lower similarity (46.7%). BLAST analysis showed that *hlyA* genes had higher similarities with their counterparts registered in GenBank, while the *aeA* genes had higher similarities with their counterparts as well as some *hlyA* genes. Analysis of these *hlyA* genes which shared high similarities with *aeA* gene, showed that all these genes possessed APT (*Aerolysin*/pertussis toxin domain) domain and *aerolysin* domain, which indicated that they are actually *aeA* genes, but they were named mistakenly as *hlyA* genes. Prediction of the antigenicities of *aeA*

收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-03-04

基金项目: 广东省重点科技项目 (2008A020100016)、广东省海洋渔业科技项目 (A200899F01) 及广州市和荔湾区科技项目 (2009J1-C021、20084411115)

作者简介: 刘明智 (1985-), 男, 硕士生, 主要从事水产生物技术研究; *通讯作者: 叶星, 研究员, E-mail: gzyexing@163.com。

and *hlyA* by DNAStar software indicated that the two genes possess antigenicity. Specific primers for the two genes were designed and used to detect *aeA* and *hlyA* genes. PCR detection of the *aeA* and *hlyA* of two virulence strains showed *hlyA* and *aeA* positive. The non-virulence strain was *hlyA* and *aeA* negative. The result suggests that *aeA* gene could be used as a marker of *A. hydrophila* virulence.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; *aeA*; *hlyA*; gene; sequence

嗜水气单胞菌隶属弧菌科气单胞菌属,为一类嗜温性、运动性的气单胞菌,是气单胞菌的模式种。嗜水气单胞菌可引发养殖鱼类的暴发性败血症,是 20 世纪 80 年代末至今引发中国、菲律宾、泰国、印度等亚洲国家传统池塘养殖鱼类暴发性疾病的最重要的病原之一,水产养殖业因此遭受了严重的经济损失^[1]。

气溶素和溶血素均是嗜水气单胞菌重要的毒力因子,近年来对这 2 个毒力基因的研究越来越受到重视^[2-6]。气溶素是由气单胞菌属菌株以无活性、可溶的二聚体前体形式分泌的一类可溶性蛋白,由 463 个氨基酸(Amino acid, aa)组成,分子质量为 51.5 ku。该毒素具有溶血性、细胞毒性和肠毒性,是气单胞菌主要的毒力因子之一^[7-10]。溶血素(hemolysin/haemolysin),又称细胞溶素(cy-toxin),也是嗜水气单胞菌重要的毒力因子^[11]。Aoki 等从罐装牛奶中分离的 *A. hydrophila* ATCC7966 菌株中克隆测序 2 个溶血素基因(*AHH-1*, *AHH-2*)。 *AHH-2* 基因只在 *A. hydrophila* ATCC7966 中检测到; *AHH-1* 基因则在不同的 *A. hydrophila* 和 *A. salmonicida* 菌株中分布,分析氨基酸序列表明有一段高亲水性的 N-末端区域,具有导肽的特征^[12]。溶血素属于穿孔毒素(poreforming toxin),又名攻膜毒素(membrane disrupting type),能直接作用于宿主细胞的细胞膜,造成其结构和功能的紊乱,使大量细胞内成分泄漏,导致细胞死亡。溶血素不仅能溶解红细胞,还损害其它多种类型的真核细胞,包括血小板、成纤维细胞、心肌细胞、单核细胞、粒细胞和内皮细胞等。

本研究从草鱼病鱼体上分离了 1 株嗜水气单胞菌,克隆了该菌的气溶素和溶血素基因,进行序列与结构分析,并进行毒力株与非毒力株的此 2 个基因的 PCR 扩增检测,为鱼类嗜水气单胞菌毒力株的快速鉴定以及基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株、宿主菌和质粒

从草鱼病灶处分离了 2 株菌,即 *Wp3* 菌株和 *Zc1* 菌株,通过生理生化以及 16S rRNA 和 *gyB* 基因克隆与分析,鉴定其为嗜水气单胞菌。人工感染草鱼实验显示 *Wp3* 为强毒株, *Zc1* 为弱毒株^[13]。嗜水气单胞菌无毒株 *NT* 由本实验室保藏。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 宿主菌由本实验室保藏,克隆用质粒是 pDM-18T Vector System,购自 Takara 公司。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒(E Z N. A SQ Tissue DNA Kit),质粒提取试剂盒(E Z N. A Plasmid Miniprep Kit)和胶回收试剂盒(E Z N. A Gel Extraction Kit)为美国 Omega 公司产品,PCR 扩增试剂盒(Takara LA PCR Kit Ver2.1)购自宝生物(大连)工程有限公司。

1.3 引物设计与合成

分别比较分析已登录 GenBank 的气溶素基因全序列(DQ186611、EU650663、M16495)和溶血素基因全序列(AB206039、AY442273、DQ189994、U81555),根据这些序列的保守区域分别设计引物 P1 和 P2, P3 和 P4。P5 和 P6 则参照 Pollard 等^[14]设计的用于扩增 *aeA* 基因片段的特异性引物。引物由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

1.4 *aeA* 和 *hlyA* 基因的扩增

Wp3 菌株接种于普通 LB 培养基中,28℃ 培养 18 h。取 1 mL 菌液提取基因组 DNA,具体操作参照 E Z N. A SQ Tissue DNA Kit 推荐的方法。提取的基因组 DNA 用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,-20℃ 保存备用。

表 1 扩增气溶素和溶血素全基因以及气溶素片段使用的引物

Tab 1 Primers for amplification of the full length of *aerA* and *hlyA* genes and partial fragment of *aerA* gene of *A. hydrophila*

目标基因 Target genes	引物 Primers	序列 Sequence (5' - 3')	扩增长度 /bp Size
气溶素 <i>aerA</i>	P1	GGA TCGCA TATTGAA GCC	1 369
	P2	CCA TCACTACAACGCACT	
溶血素 <i>hlyA</i>	P3	GACA GGCAA GTA GAA TAA CGC	2 122
	P4	CCCGCTCA TCGAAAACAA GGC	
气溶素特异性片段 <i>aerA</i> specific fragment	P5	CCAR GGCTGCACA	209
	P6	TTTCW CCGGTAACA GGA TTG	

以 *Wp3* 菌株的基因组 DNA 为模板,分别以 P1 和 P2、P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增。引物 P1、P2 扩增采用热启动方式,反应条件为:95 预变性 7 min 后加入 *Taq* 酶,进入循环:94 变性 1 min,65 退火 45 s,72 延伸 2 min,共 34 个循环,最后一个循环结束时 72 延伸 10 min;引物 P3、P4 扩增的反应条件为:94 预变性 5 min 后进入循环,94 变性 1 min,58 退火 45 s,72 延伸 2 min,共 34 个循环,最后一个循环结束时 72 延伸 5 min,PCR 产物 4℃ 保存。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。切下目的带,胶回收试剂盒回收,回收产物与 pMD18-T Vector 连接并转化大肠杆菌 DH5 菌株感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃ 培养 12~16 h。挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 振荡过夜,取 2 μL 菌液为模板进行 PCR 鉴定,阳性克隆送测序。

1.5 嗜水气单胞菌强毒、弱毒与无毒株 *hlyA* 基因和 *aerA* 基因片段扩增

分别以 *Wp3*、*Zc1* 和 *NT* 菌株的基因组为模板,以 P3 和 P4 为引物扩增 *hlyA* 基因,反应条件同上。以 P5 和 P6 扩增 *aerA* 基因片段,反应条件为:94 预变性 7 min 后进入循环:94 变性 1 min,57 退火 1 min,72 延伸 1 min,共 33 个循环,最后一个循环结束时 72 延伸 5 min,4℃ 保存。

1.6 序列分析与结构预测

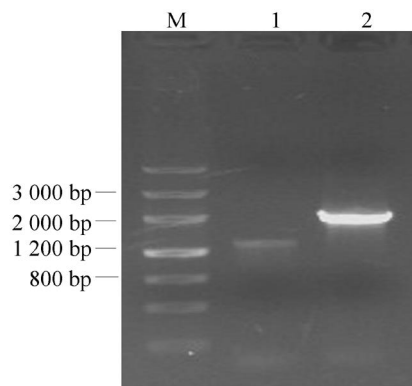
采用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 DNA vector NT8 软件进行序列同源性分析,Clustalx1.81 和 Mega4 软件构建进化树。应用 DNASTar 软件,采用 Kyte-Doolittle 等方法预测蛋白的亲水性 (hydrophilicity)^[15],Em in 法预测表面可及性 (accessibility)^[16],Jameson-Wolf 法预测抗原性 (antigenicity)^[17],当亲水性大于 0,抗原指数大于 0,表面可及性大于 1 时,形成表位的可能性大,综合其结果确定为抗原区。通过在线分析系统 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测序列的信号肽,将成熟肽氨基酸序列输入在线分析系统 Pfam HMMs (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) 分析 *aerA* 和 *hlyA* 基因特有的结构域。

2 结果与分析

2.1 *aerA* 和 *hlyA* 基因的扩增与序列分析

以嗜水气单胞菌 *Wp3* 菌株基因组为模板,引物 P1 和 P2、P3 与 P4 进行扩增,获得与预期相符的特异性条带 (图 1),长度分别为 1 392 bp 和 2 122 bp。扩增片段经克隆与测序,显示获得 *aerA* 和 *hlyA* 基因全长序列。

所克隆的 *aerA* 基因和 *hlyA* 基因序列分别通过 Blast 与 GenBank 上的序列进行比较。与 *aerA* 基因同源性最高的前 10 个序列包括:3 个气溶素基因,即 DQ186611、EF450824 和 M16495,同源性

M. DNA marker III; 1. *aerA* 扩增片段; 2. *hlyA* 扩增片段。

M. DNA marker III; 1. Amplified fragment of *aerA*;
2. Amplified fragment of *hlyA*.

图 1 嗜水气单胞菌 *aerA* 基因和 *hlyA* 基因的扩增

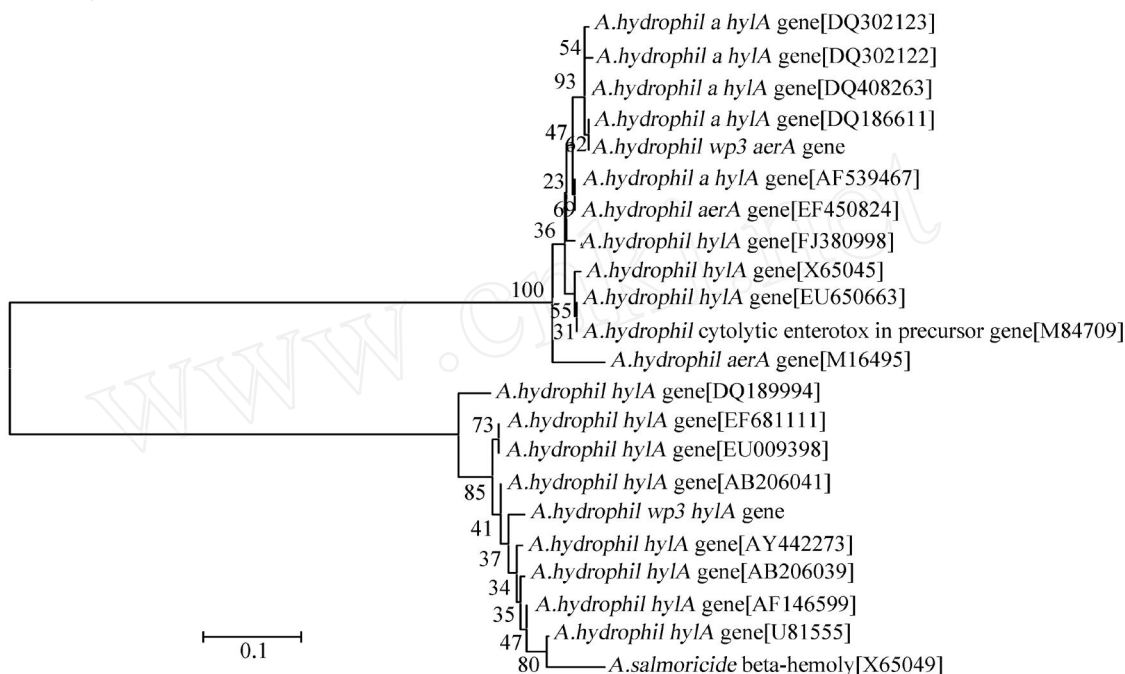
Fig 1 Amplification of *aerA* gene and
hlyA gene from the *A. hydrophila*

分别为 96.4%, 92.1% 和 90%; 即 6 个溶血素基因, DQ408263、DQ302123、DQ302122、FJ380998、AF539467、X65045 和 EF450824, 同源性为 94% ~ 99.6%; 1 个细胞溶解性肠毒素基因, M84709, 同源性为 93.6%。与 *hlyA* 基因同源性最高的前 10 个序列中有 9 个为嗜水气单胞菌溶血素基因, AY442273、U81555、AF146599、AB206039、AB206041、EU009398、AB206040、EF681111 和 DQ189994, 同源性为 94.7% ~ 99.7%; 1 个 *A. salmonicida* 溶血素基因, X65049, 同源性为 85.9%。本实验所克隆的气溶素基因和溶血素基因间的同源性则仅为 46.7%, 在 GenBank 上的登录号分别为 GU229024, GU229025。

2.2 *aeA* 和 *hlyA* 的系统进化分析

根据 *A. hydrophila* Wp3 的 *aeA* 和 *hlyA* 基因序列构建系统进化树 (图 2)。在此进化树中, *aeA* 和 *hlyA* 基因序列分成二个独立分支。*hlyA* 基因与 GenBank 中的其他 *hlyA* 基因聚类, 而在 *aeA* 基因的分支中, 除了有 GenBank 中登录的 *aeA* 基因序列外, 还有多个 *hlyA* 基因序列。

2.3 *aeA* 和 *hlyA* 的抗原性预测



“ [] ” 代表 GenBank 登录号。“ [] ” indicated the accession nos in GenBank

图 2 根据 *A. hydrophila* *aeA* 和 *hlyA* 序列建立的系统进化树

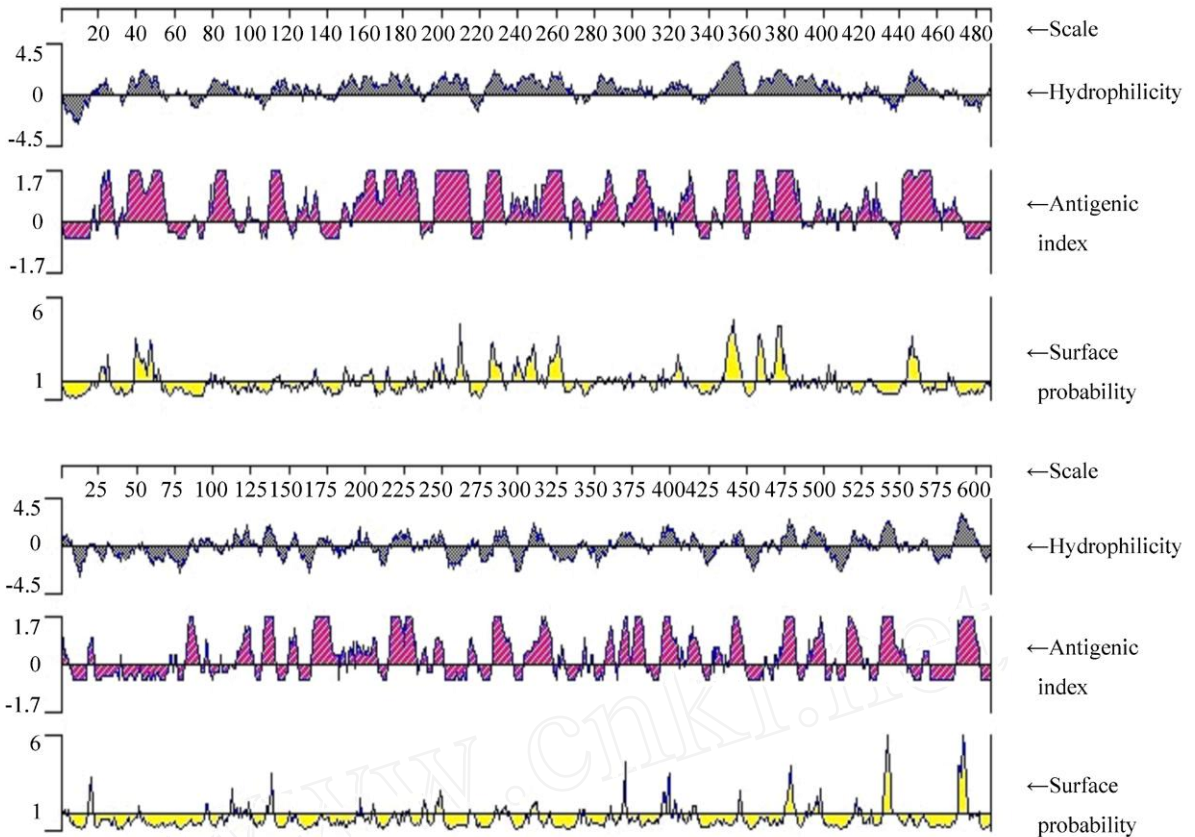
Fig 2 Phylogenetic tree based on sequences of *aeA* and *hlyA* genes of *A. hydrophila*

经 DNASTar 软件预测, 并综合亲水性、表面可及性以及抗原指数 3 项指标, 预测可形成抗原表位的氨基酸区域数为气溶素有 27 个, 溶血素有 22 个 (表 2, 图 3)。

表 2 DNASTar 预测抗原表位

Tab 2 Prediction of epitopes by DNASTar software

相关参数 Related parameters	预测区域 (氨基酸) Predicting regional (Amino acid)
<i>aeA</i> 抗原区综合分析 Antigenic regional of <i>aeA</i>	20 ~ 22, 38 ~ 51, 80 ~ 86, 111 ~ 116, 150 ~ 153, 148 ~ 153, 157 ~ 163, 170 ~ 171, 181 ~ 182, 195 ~ 197, 200 ~ 202, 204 ~ 213, 223 ~ 231, 234 ~ 252, 255 ~ 263, 281 ~ 283, 286 ~ 288, 290 ~ 294, 301 ~ 205, 323 ~ 325, 328 ~ 329, 347 ~ 356, 364 ~ 381, 397 ~ 398, 402 ~ 403, 422 ~ 424, 443 ~ 449
<i>hlyA</i> 抗原区综合分析 Antigenic regional of <i>hlyA</i>	18 ~ 20, 94 ~ 96, 119 ~ 120, 134 ~ 139, 226 ~ 228, 237 ~ 239, 247 ~ 249, 268 ~ 270, 285 ~ 286, 288 ~ 291, 307 ~ 312, 342 ~ 343, 367 ~ 371, 394 ~ 399, 402 ~ 403, 413 ~ 416, 444 ~ 446, 474 ~ 481, 490 ~ 498, 520 ~ 524, 539 ~ 547, 587 ~ 594



上图:气溶素 (*aeA*)基因;下图:溶血素 (*hlyA*)基因。

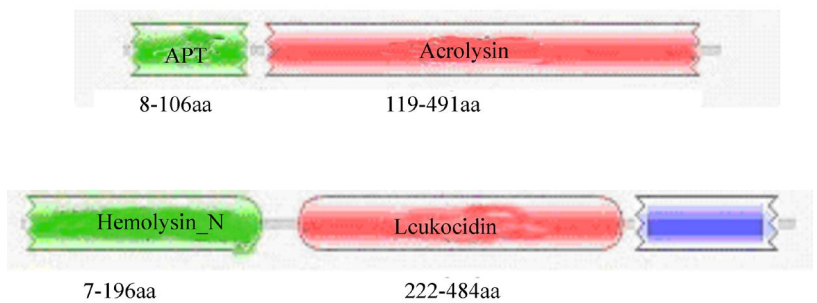
Up: Aerolysin (*aeA*) gene; Down: Hemolysin (*hlyA*) gene

图 3 气溶素 (*aeA*)基因和溶血素 (*hlyA*)基因的亲水性、表面可及性和抗原性预测

Fig 3 Prediction of hydrophilicity, surface probability and antigenicity of *aeA* gene and *hlyA* gene

2.4 *aeA* 和 *hlyA* 的结构域分析

通过在线分析系统 Pfam HMM s进行分析(图 4),*Wp3*菌株 *aeA* 基因的前 8 ~ 106 aa 为气溶素的 APT 结构域 (Aerolysin/pertussis toxin domain), 119 ~ 491 aa 区域为气溶素结构域; *Wp3* 菌株 *hlyA* 基因的前 7 ~ 196 aa 为溶血毒素 N 端 (Hemolytic toxin N terminal); 222 ~ 484 aa 区域属于白细胞素/溶血素家族结构域 (Leukocidin/Hemolysin toxin family)。



上图为 *aeA* 基因,下图为 *hlyA* 基因。

Up: Aerolysin (*aeA*) gene; Down: Hemolysin (*hlyA*) gene

图 4 *aeA* 基因和 *hlyA* 基因的 Pfam HMM s 结构域分析

Fig 4 Pfam HMM search of structure domains of aerolysin and hemolysin genes

分析与 *Wp3* 菌株 *aeA* 基因同源性高的前 5 个序列: DQ186611 (AH aerolysin)、DQ302123 (AH hemolysin)、DQ302122 (AH hemolysin)、DQ408263 (AH hemolysin)、AF539467 (AH hemolysin), 结构域预测发现它们也都具有 APT 结构域以及气溶素结构域, 说明它们实际上应是 *aeA* 基因, 只是命名上与 *hlyA* 基因混淆。

2.5 *aeA* 与 *hlyA* 基因毒力相关性分析

以 *aeA* 基因特异性扩增引物 P5 与 P6, *hlyA* 基因扩增引物 P2 和 P3, 分别扩增 *Wp3* 和 *Zc1* 菌株以及嗜水气单胞菌无毒株 *NT*。 *Wp3* 和 *Zc1* 菌株均有 209 bp 的 *aeA* 的特异性条带和 2 122 bp 的 *hlyA* 条带,

而 *NT* 菌株则无 *aeA* 的特异性条带和 *hlyA* 条带 (图 5), 说明 *aeA* 和 *hlyA* 可作为鉴定嗜水气单胞菌毒力菌株的标记。

3 讨 论

嗜水气单胞菌分泌的胞外产物有多种, 其中气溶素 (aerolysin)、溶血素 (hemolysin) 和蛋白酶是嗜水气单胞菌的重要致病因子, 与致病性相关^[11-13]。气溶素和溶血素属于溶血性毒素 (hemolytic toxic)^[18], 其毒力作用与结构特征有关。气溶素的 ATP 结构域能促进气溶素与靶细胞表面特异性受体的结合, 并使气溶素转化成为插入的状态, 导致产生细胞膜通道、细胞渗透压升高, 最终细胞裂解^[8,19]; 气溶素结构域则是气溶素、其它相关的溶血素毒素及杀白细胞毒素 (leukocidin S) 亚单位通道形成的部分^[19]。溶血素还具有水溶性跨膜毒素的特征结构—溶血毒素 N 端 (hemolytic toxin N terminal), 可与三段 α -折叠的溶血素结构域组成一个“门”^[20,21]。

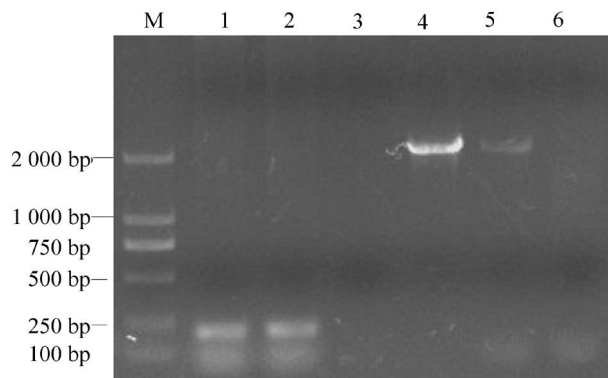
本实验克隆到的草鱼嗜水气单胞菌分离株 *Wp3* 菌株的 *hlyA* 基因序列与 GenBank 上的相应序列具有较高同源性 (94.7% ~ 99.7%)。但与 *Wp3* 菌株 *aeA* 基因高同源性的序列中除了有 *aerolysin* 基因 (同源性为 90% ~ 96.4%) 外, 还有 *hemolysin* 基因 (同源性为 94% ~ 99.6%)。在系统进化树中, 这些序列混合聚类于 *aeA* 基因分支中。对 *aeA* 基因以及与之同源性较高的这些 *hlyA* 序列结构域进行预测, 发现它们均具有气溶素典型的 ATP 和气溶素结构域, 缺少 *hlyA* 的溶血素 N 端结构域。序列与结构域的相似性说明这些与 *aeA* 基因聚类的 *hlyA* 基因实际上应是 *aeA* 基因, 只是命名上与 *hlyA* 基因混淆。

蛋白质的亲水性、表面可及性、柔韧性等在抗原的形成方面发挥着重要的作用, 用 DNA star 软件预测 *aeA* 和 *hlyA* 的抗原性, 显示它们分别有 28 个和 22 个氨基酸区域指标达到抗原区的标准, 说明两个基因均具有很好的抗原性。

嗜水气单胞菌有致病菌株和非致病菌株之分, 而嗜水气单胞菌的致病性与胞外产物密切相关^[9-10,22]。编码气溶素和溶血素的基因常被用于鉴别嗜水气单胞菌的毒力菌株^[23-24]。但嗜水气单胞菌的致病性菌株是否与这 2 个毒力基因相关不同的研究者有着不同的结论。有些发现致病性分离株均有 *aeA*, 大部分有 *hly* 基因^[25,13]; 有的则发现致病性分离株至少扩增到 *aeA* 或 *hlyA* 基因的一种, 而非致病性分离株中未扩增到 *aeA* 或 *hlyA* 基因^[26,13]; 有些则发现 *hlyA* 基因的存在与致病力无关, 而 *aeA* 基因的存在则与毒株的毒力相关, 且二个基因均呈阳性的菌株可能是强毒株^[13,27]。本实验在强毒株与弱毒株中均扩增到 *aeA* 和 *hly* 基因, 而非毒力株则均未扩增到, 说明 *aeA* 基因和 *hlyA* 基因的分布与菌株的毒力相关。但关于有毒与无毒株此二个基因的分布以及基因与毒力大小的相关关系仍需更多的菌株检测加以确证。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282 - 288.
- [2] Singh V, Somvanshi P, Rathore G, et al. Gene cloning, expression and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010: 8752 - 8755.
- [3] 宋铁英, 包晓东, 郑伟文. 中华鳖爆发性传染病研究. 不同生化类型嗜水气单胞菌 *aeA* 基因的 PCR 比较 [J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(2): 164 - 167.
- [4] 张翠娟, 于宙亮, 田莉瑛, 等. 嗜水气单胞菌溶血素基因的克隆表达及其类毒素的免疫原性分析 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 251 - 256.



M: DNA Marker; 1 ~ 3: *Wp3*, *Zc1* 和 *NT* 菌株 *hlyA* 扩增产物;
4 ~ 6: *Wp3*, *Zc1* 和 *NT* 菌株 *aeA* 片段扩增产物。
M: DNA Marker; 1 ~ 3: PCR products of *hlyA* of *Wp3*, *Zc1* and *NT*;
4 ~ 6: Products of *aeA* of *Wp3*, *Zc1* and *NT*.

图 5 3 株嗜水气单胞菌 *aeA* 基因片段和 *hlyA* 全基因的扩增

Fig 5 Amplification of *aeA* gene fragment and *hlyA* gene for the strains *Wp3*, *Zc1* and *NT*

- [5] 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.
- [6] Abdullah A I, Hart C A, W instanley C. Molecular characterization and distribution of virulence - associated genes amongst *Aeromonas* isolates from *Libya* [J]. Appl Microbiol, 2003, 95 (5): 1001 - 1007.
- [7] 卢强, 李连瑞, 付宝权, 等. 致病性嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆与高效表达 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 21 - 23
- [8] Parker M W, Buckley J T, Postma J P, et al Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water - soluble and membrane - channel states [J]. Nature, 1994, 367(87): 19 - 28.
- [9] Hardie K R, Schulze A, Parker M W, et al *Vibrio* spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulfide bond formation [J]. Mol Microbiol, 1995, 17 (6): 1035 - 1044.
- [10] 陈怀青. 嗜水气单胞菌外毒素研究进展 [J]. 国外医学: 微生物分册, 1992, 15 (4): 256 - 259.
- [11] Hirono I, Aoki T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. Micro Pathog, 1991, 11 (3): 189 - 197.
- [12] Wong C Y, Heuzenroeder M W, Flower R L. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model [J]. Microbiology, 1998, 144(2): 291 - 298.
- [13] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1170 - 1177.
- [14] Pollard D R, Johnson W M, Lior H, et al Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the Polymerase Chain Reaction [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28 (11): 2477 - 2481.
- [15] Kvtc J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157 (1): 105 - 137.
- [16] Em ini E A, Hughes J V, Perkw D S, et al Induction of hepatitis a virus - neutralizing antibody by a virus - specific synthetic peptide [J]. J Virol, 1985, 55 (3): 836 - 839.
- [17] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181 - 186.
- [18] Howard S P, Garland W J, Green M J, et al Nucleotide sequence of the gene for the hole - forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila* [J]. J Bacteriol, 1987, 169 (6): 2869 - 2871.
- [19] Hazes B, Boodhoo A, Cockle S A, et al Crystal structure of the pertussis toxin - ATP complex: a molecular sensor [J]. J Mol Biol, 1996, 258 (4): 661 - 671.
- [20] Han J H, Lee J H, Choi Y H, et al Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin [J]. J Biochim Biophys Acta, 2002, 1559 (1/2): 106 - 114.
- [21] Miles G, Jayasinghe L, Bayley H. Assembly of the Bi - component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (4): 2205 - 2214.
- [22] 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: 自然科学版, 2006, 45 (1): 82 - 85.
- [23] 卢强, 任瑞文, 王文东, 等. 致病性嗜水气单胞菌气溶素基因 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21 (4): 347 - 349.
- [24] 防兵, 李槿年, 祖国掌, 等. 应用多重 PCR 检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布 [J]. 水产学报, 2005, 29 (4): 473 - 477.
- [25] Wang G, Tyler K D, Munro C K, et al Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34 (12): 3203 - 3205.
- [26] Khan A A, Kim E, Cemiglia C E. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of a hemolytic toxin (aerolysin) gene from *Aeromonas trola* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (7): 2473 - 2478.
- [27] Song T, Toma C, Nakasone N, et al Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas venonii* biovar *sobria* [J]. J Med Microbiol, 2004, 53 (6): 477 - 482.