

文章编号: 1674 - 5566(2012)04 - 0509 - 07

产河鲀毒素细菌水平转移相关基因的鉴定

刘 静, 杨桂梅, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 多种进化关系并不密切的细菌均能合成河鲀毒素, 揭示了产河鲀毒素细菌间可能存在水平基因转移现象, 但通过何种途径并不清楚。为调查产河鲀毒素的气单胞菌(*Aeromonas* sp.) 质粒中是否存在与水平基因转移相关的元件, 通过 PCR 扩增分别发现该质粒中存在 *tra*, *rum* 及 *virD4* 基因, 扩增出的 906 bp 的 *tra*, 681 bp 的 *rum* 及 1 319 bp 的 *virD4*, 分别与多种菌株的转座酶、松弛酶和 IV 型分泌系统中的 ATP 酶基因具有高度的序列同源性, 并具有这些酶的保守结构域, 结果表明产河鲀毒素的气单胞菌具有通过接合转移和转座方式转移基因的能力, 同时具有转移河鲀毒素至宿主的能力。对于进一步了解产河鲀毒素细菌之间以及产河鲀毒素细菌与河鲀之间的关系有重要的帮助。

研究亮点: 本研究首次在产河鲀毒素的气单胞菌质粒中明确鉴定出与水平转移相关的基因, 表明该细菌不但具有通过接合转移和转座方式转移基因的能力, 而且具有转移河鲀毒素至宿主的能力。

关键词: 河鲀毒素; 细菌; 水平基因转移; 接合转移; IV 型分泌系统; 转座

中图分类号: S 917

文献标志码: A

河鲀肉味鲜美但有毒, 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*) 在中国已成功开展繁殖和养殖^[1], 通过人工控制养殖条件, 养殖的河鲀毒性较低^[2]。目前认为野生河鲀体内的河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX) 主要来自食物链和水环境中的细菌^[3-5]。通过投喂人工饲料和控制水环境隔绝产 TTX 细菌, 在一定程度上可以降低养殖河鲀体内 TTX 的含量, 但我们对产 TTX 细菌的了解还非常少。多种细菌已证明能合成 TTX, 如芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、河鲀毒素假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis tetraodonis*)、交替单胞菌(*Alteromonas* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、达松维尔类诺卡菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.) 等^[6-13]。这些不同种属的细菌均具有产 TTX 的能力, 提示我们这些产 TTX 的细菌可能通过水平基因转移(horizontal gene

transfer, HGT) 的方式传播 TTX 合成相关基因。

细菌性接合转移是水平基因转移的一种主要方式, 也是质粒和接合转座子的一个特征, 涉及到相邻细菌间的 DNA 转移^[14]。我们在前期的研究中, 已从暗纹东方鲀卵巢中分离到一株产 TTX 的气单胞菌(*Aeromonas* sp.)^[7], 发现该细菌含有大型质粒(> 70kb), 可能是一种接合性质粒。接合性质粒一般较大(> 40kb), 拷贝数较低(每个宿主细胞中只有 1~4 个拷贝), 在细菌间能够通过接合自我转移^[15]。TTX 是毒力因子, 目前已知的 IV 型分泌系统(T4SS) 既能转移 DNA, 也能分泌毒力因子, 如根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 通过 T4SS 将致癌 DNA 和蛋白质传递给植物细胞, 导致植物细胞的遗传物质发生改变^[16]; 幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*) 分泌出的 *cagA* 等相关毒素透过 T4SS 注入人体细胞引起疾病^[17]。接合转移系统由转移体(IV 型分泌系统)、偶联蛋白及松弛体 3 部分组成。IV 型分泌

收稿日期: 2011-12-08 修回日期: 2012-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(41176108); 上海市浦江计划项目(11PJ1404400); 上海市教育委员会重点学科建设项目(S30701)

作者简介: 刘 静(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子遗传。E-mail: lj19850402@126.com

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

系统在分泌毒素、传递毒力基因方面起了关键作用,其中 VirD4 是一种被称为“伴侣蛋白”的 ATPase,和胞质中另外 2 种 ATP 酶 VirB4、VirB11 一起为分泌系统装配提供能量,将要转移的 DNA 传递给分泌系统的其他组分^[18-19]。松弛体是转移起始区加工 DNA 的蛋白复合体,其中 DNA 松弛酶是启动接合转移的关键酶,在转移起始区特异性地催化 *oriT* 中 *nic* 位点上的磷酸二酯键的切割。另外转座子(即跳跃基因)也是基因水平转移的一种方式,极易在同类生物中横向传递,所携带的毒力基因可以随转座插入并表达传播。其中转座酶是执行转座功能的酶,特异性识别转座子两端的序列,把转座子从相邻序列中脱离出来再插入到新的 DNA 靶位点。

本研究通过调查产 TTX 的气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) 质粒中是否含 IV 型分泌系统及转座子,为下一步调查产 TTX 合成相关基因的水平转移机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株来源

气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) Ne-1 菌株为本实验室保存菌种。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒抽提

前期已证实从暗纹东方鲀卵巢组织内分离得到的菌株 Ne-1 能够产生河鲀毒素^[7]。培养扩增 Ne-1 菌株,采用碱裂解的方法提取 Ne-1 细胞内共生质粒 DNA^[20]。将细菌沉淀重悬于 100 μ L 预冷的溶液 I (0.05 mol/L 葡萄糖、0.025 mol/L Tris-Cl、0.01 mol/L EDTA, pH = 8.0) 中,剧烈振荡,使菌体分散混匀;加 200 μ L 新鲜配制的溶液 II (0.2 mol/L NaOH、10 g/L SDS),颠倒数次混匀(不要剧烈振荡),并置于冰上 2 min;加入 150 μ L 预冷的溶液 III (3 mol/L 乙酸钾、2 mol/L 冰乙酸),将试管温和颠倒数次混匀冰上放置 3 min;加入 450 μ L 的苯酚/氯仿/异戊醇,振荡混匀,4 $^{\circ}$ C 离心 12 000 g \times 10 min;小心移出上清于一新离心管中,加入 2/3 倍体积异丙醇,混匀,4 $^{\circ}$ C 离心 12 000 g \times 5 min;1.0 mL 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 1 ~ 2 次,沉淀在室温下晾干;沉淀溶于 50 μ L TE (含 RNaseA 20 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 以降解 RNA 分子,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物设计

选择 3 类典型的与基因水平转移相关的基因 *tra*, *rum* 以及 *virD4*, 根据 GenBank 数据库序列信息比对,通过 BLAST 分析选择其中较保守肽段,设计特异性引物扩增相关基因,引物序列如表 1 所示。引物设计时,优先考虑密码子的偏好,并且 3' 末端避免采用第三位密码子,引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增所用引物
Tab. 1 Primers used for amplification

引物	序列	保守肽段
TRAf:	5'-TTACGAGATAAACGAGAAATAC-3'	LRDKREIR
TRAr:	5'-CATCATCGCCTCTGCACTTC-3'	GSAEAMM
RUMf:	5'-ATTCATATGCTGAGAAGCGTG-3'	ISYAEKRA
RUMr:	5'-TTCAATTTGTCGATTAAGCC-3'	GFNRQIE
VirD4f:	5'-GTTTTTGTCTTTACATTGGC-3'	VFVFTLA
VirD4r:	5'-GGAAACAAAATCGGCTTTTCAAG-3'	LEKPILFP

1.2.3 转移相关基因的克隆

分别以质粒 DNA 为模板,PCR 扩增目标基因。PCR 反应体系: 5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液, 1 μ L 0.002 5 mol/L dNTP, 1U *Taq* 酶,各 1 μ L 0.01 mol/L 的上下引物, DNA 模板为 50 ng。PCR 反应经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,进行 30 个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (axygen biosciences) 回收 PCR 产物,具体操作参见试剂盒说明。回收产物连接于 pGEM-T Easy 载体 (premega),连接体系:PCR 产物 3 μ L, 1 μ L (50 ng/ μ L) pGEM-T Easy 载体,1 μ L T_4 连接酶,以及 5 μ L 2 \times 连接缓冲液,4 $^{\circ}$ C 过夜连接。

连接产物转化感受态细胞 TOP10 菌株,感受态细胞制备及质粒转化具体参见分子克隆实验指南^[20]。阳性克隆送上海生物工程服务公司测序。

1.2.4 DNA 序列分析

以 NCBI 数据库中 BLASTX 命令搜索 *tra*, *rum*, *virD4* 的相关序列,将测序结果与 GenBank 数据库中转移相关基因的氨基酸序列进行比较分析后,共同用 Clustal X 1.83 校准排齐进行多序列比较。用 MEGA 4 软件以邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树,可靠性验证设定为 1 000 次,计算自引导值 (bootstrap) 以评估系统发育树的置信度^[21]。

2 结果与分析

2.1 水平转移相关基因 tra 序列分析

用引物 TRAf/TRAr PCR 扩增得到预期 tra 片段长 906 bp,将所测得的气单胞菌 tra 序列进行 BLASTX 分析,该基因编码的氨基酸序列与许多转座酶在序列上有较高的同源性,如黄热芽孢杆菌(Anoxybacillus flavithermus)的转座酶,地芽孢杆菌属(Geobacillus sp.)的转座酶,以及其他的一些转座酶。进一步将 tra 编码的氨基酸序列同已知

的转座酶绘制系统进化树(图 1)。tra 编码产物长 302 个氨基酸,虽然与多种细菌转座酶同源,但与黄热芽孢杆菌(Anoxybacillus flavithermus)的转座酶最为相似,相似度为 51%。对这两种转座酶序列进行 Clustal W 排列后发现,尽管它们的转座酶在长度上不一致,遗传距离较远,但是比对区域高度相似(图 2),且在第 156~226 个氨基酸的位置含有转座酶的保守结构域,因此气单胞菌 tra 基因为转座酶基因。

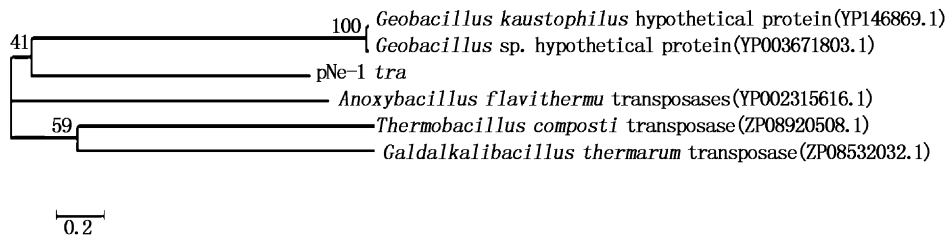


图 1 tra 基因推导的氨基酸序列所构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on deduced amino acid sequences of tra

应用 MEGA 4 构建 Neighbor-joining 系统进化树,bootstrap 为 1 000 次重复;标尺代表 0.2 进化距离。Geobacillus kaustophilus:嗜热地芽孢杆菌;Geobacillus sp.:地芽孢杆菌属;Anoxybacillus flavithermus:黄热芽孢杆菌。

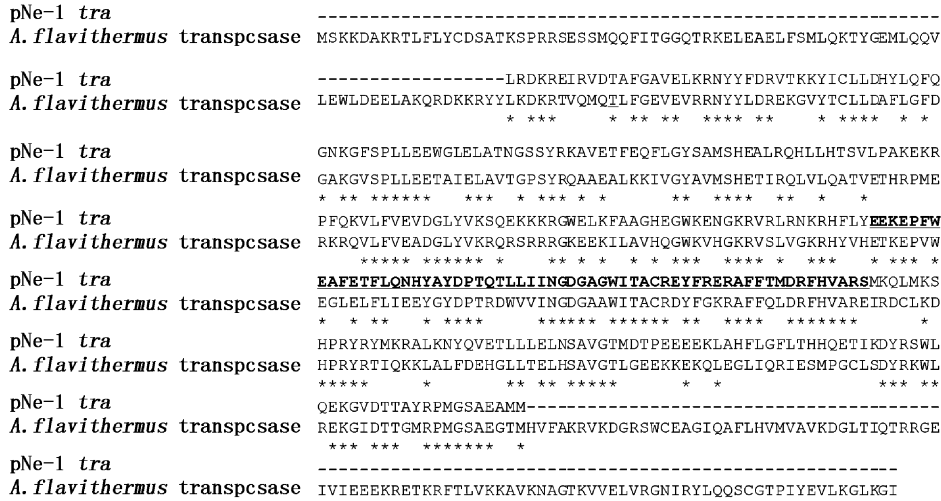


图 2 pNe-1 tra 与黄热芽孢杆菌转座酶编码氨基酸序列特征比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of tra and transposase gene of Anoxybacillus flavithermus

文字框区域为 PCR 引物;* 为两序列同源氨基酸;粗体加下划线为转座酶结构域。

2.2 水平转移相关基因 rum 序列分析

用引物 RUMf/RUMr PCR 扩增得到预期 rum 基因片段长 681 bp,其推导的编码产物长 227 个氨基酸,NCBI 搜索发现气单胞菌 rum 编码蛋白与多个松弛酶蛋白较相似,其中与巨大芽孢杆菌

(Bacillus megaterium) 松弛酶蛋白相似度最高(58%)。选取 5 个最相似的蛋白进行比对并绘制种系发生树图(图 3)。根据 BLAST 搜索结果及种系发生树图可以判定 rum 编码蛋白应当属于一个松弛酶超级家族。蛋白保守性位点分析

发现在第 1~225 个氨基酸的位置含有松弛酶的保守结构域(图 4),因此气单胞菌 *rum* 为松弛酶

基因,和其他辅助蛋白一起形成松弛体,是细菌性接合转移系统中重要组成部分。

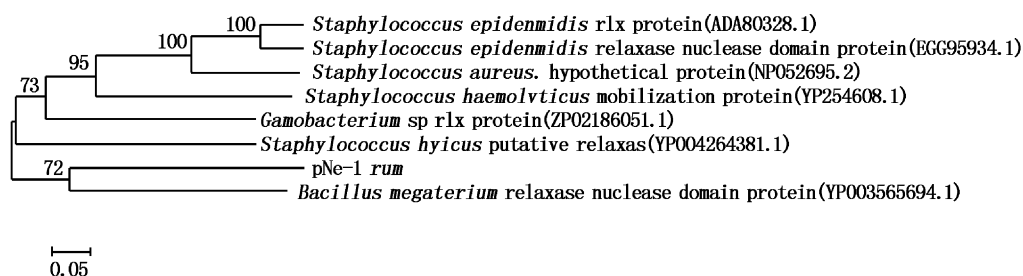


图 3 *rum* 基因推导的氨基酸序列所构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on deduced amino acid sequences of *rum*

应用 MEGA 4 构建 Neighbor-joining 系统进化树,bootstrap 为 1 000 次重复;标尺代表 0.05 进化距离。*Staphylococcus epidermidis*:表皮葡萄球菌;*Staphylococcus aureus*:金黄色葡萄球菌;*Staphylococcus haemolyticus*:溶血葡萄球菌;*Carnobacterium*:肉杆菌属;*Staphylococcus hyicus*:猪葡萄球菌;*Bacillus megaterium*:巨大芽孢杆菌。

```

ISYAEKRADQREGVNCFAEYAKSQMKATRELWGKEGGIQAHVVIQSFKPG
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EVSPELANKIGODLAKEIAPGHECVVYTHTRDKDHIHNIHIVINSVSYEDGR
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
KFAHNGKEAIEKVRASDRLLCKERNLSVVKEPSAEQRYARAAYGLAKRGV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSWKDEIREVIDHEKQIAKNYDEFKKNLTDKYNIEVKERGNISFRHPDS
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
QKFEVRGKTLGLAYERGTIEDGFNRQIE
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

图 4 pNe-1 *rum* 基因编码氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence of pNe-1 *rum*

文字框区域为 PCR 引物;“*”为进化树同源氨基酸;粗体加下划线为松弛酶结构域。

2.3 水平转移相关基因 *virD4* 序列分析

用引物 VirD4f/VirD4r PCR 扩增得到预期 *virD4* 基因片段长 1 319 bp,气单胞菌 *virD4* 编码的氨基酸序列与数据库中许多 IV 型分泌系统的 VirD4 蛋白有很高的同源性,且与戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) VirD4 蛋白相似度最高为 43% (图 5)。气单胞菌 *virD4* 编码的蛋白长 439 个氨基酸,N-端有 1 个跨膜螺旋结构域,具有保守的 Walker A 和 Walker B 模体(图 6),气单胞

菌 *virD4* 是 IV 型分泌系统的重要组成部分。

3 讨论

水平基因转移是包括不同进化谱系间进行遗传交换的一种进化现象,对细菌的进化具有重要意义。不同种属甚至不同门细菌之间的基因水平转移现象很常见^[22]。已知细菌可移动遗传元件包括噬菌体、质粒、转座子、插入序列、整合子、基因组岛等,接合性质粒是目前抗生素抗性转移的主要途径^[23]。例如抗生素基因通常与质粒和转座子等高度可移动遗传因子相联,因此抗生素抗性基因容易在不同的分类群间转移,细菌接合转移一般由自我转移质粒或可移动质粒介导^[24]。质粒一般携带编码某些功能的基因(耐药基因,毒力基因等),它对细菌是有用的,但对于细菌的生存繁殖却不是必要的。接合可以发生在亲缘关系不是很密切的细菌中,越来越多的研究发现多种亲缘关系并不密切的微生物能够产 TTX^[6-13]。

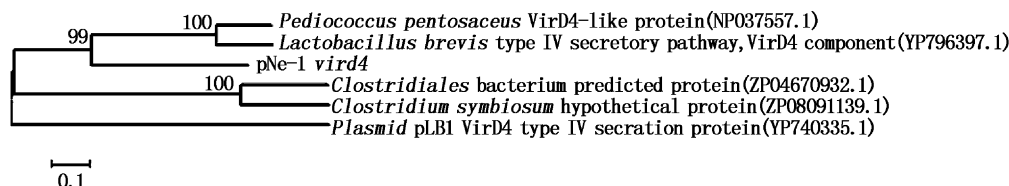


图 5 *virD4* 基因推导的氨基酸序列所构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on deduced amino acid sequences of *virD4*

应用 MEGA 4 构建 Neighbor-joining 系统进化树,bootstrap 为 1 000 次重复;标尺代表 0.1 进化距离。*Pediococcus pentosaceus*:戊糖片球菌;*Lactobacillus brevis*:短乳杆菌;*Clostridiales*:梭菌目;*Clostridium symbiosum*:共生梭菌。

跨膜结构域

```

VFVFTLALYLFIKGSPHLLIVCGFILAIQGI GFL LKKLMGPKPNNGLLGKAKFS TAEDLKKN 65
Walker A
GLTNGI VFGKVKGLIEKPP TKDGHVLMGGTGTGKSRGHAI PTLIRWKTGLAIDIKGE LNQL 130
* * * * *
TSHIMPS IVFSTKAQKAR YNP LDWI VEI EDVQEMGRNI FPKPEKGD PFWAQAQAI F SAACWEFK 195
* * * * *
GKMSFSEVCQWLCSNPNEEIVKKS GSSEMETKILI STVLNLKVETLGG IFAELRGKLATI AIDK 260
* * * * * Walker B
NIQYATSRSDFS PNDIESNMI FLEVAEHQIKQ FGA VFTV IVGQFLRHLT RRAEHQNP EVLVLLDE 325
* * * * *
FPRLGKMSEIVGGLATLR SRNVHMLLI IQSLSQLDS IYSKEERKVI VDN CGYKLVLNATDVTQK 390
* * * * *
YLSDMAGQTSAIKSYSS DIKSIRVNTQEQT VPLIR PEEFG LEKPIIF 439
* * * * *

```

图 6 pNe-1 *vird4* 基因编码氨基酸序列Fig. 6 Amino acid sequence of pNe-1 *vird4*

文字框区域为 PCR 引物; * 为进化树同源氨基酸;粗斜体为跨膜结构域;粗体加下划线为 Walker 模体。

本文通过对产 TTX 的 Ne-1 菌株内所携带的质粒进行分析,成功克隆得到与水平转移相关的基因 *tra*, *rum* 及 *vird4* 部分序列。*tra* 为转座酶基因,由此推测质粒中存在转座子,转座子可在质粒与染色体上转座,所携带的基因可以随着转座插入,并表达传播。近年来,国内外大量文献报道,转座子等可移动的遗传元件可以介导各种耐药基因的水平转移^[25],水平基因转移的机制已受到广泛的关注。气单胞菌 *rum* 编码的氨基酸序列与多个 *rlx* 蛋白相似,也与多株细菌的 MobA 蛋白比较相似,并具有松弛酶超级家族的保守结构域,气单胞菌 *rum* 编码的蛋白应属于一个松弛酶超级家族。松弛酶在细菌接合性转移过程中水平转移质粒遗传信息具有重要意义,它和几个辅助蛋白一起形成接合转移系统的松弛体,在转移起始位点通过特殊的方式切割双链 DNA。气单胞菌 *vird4* 编码的蛋白与多种细菌的 IV 型分泌系统 *vird4* 蛋白相似,具有 ATP 结合位点(Walker A 和 Walker B 模体)的保守区域,该蛋白直接与 DNA 作用,帮助 DNA 在细菌结合过程中从质粒转移到宿主菌的染色体上,也可帮助转移毒力因子至宿主^[17,26],因此,产河鲀毒素的气单胞菌 Ne-1 菌株也应具有转移基因和河鲀毒素的能力。

综合以上分析表明,质粒 pNe-1 含有转座酶的基因(*tra*)以及与细菌接合性转移系统相关的两个基因(*rum*, *vird4*),因此可以推断该质粒具有基因水平转移的潜力,由转座子或接合性质粒介导。我们有理由相信包括宿主菌 Ne-1 在内的产河鲀毒素细菌可能通过基因水平转移的方式将合成 TTX 的功能导入受体菌株,使之能够快速

地、高效地和更有竞争性地开发新的生态环境,导致许多不同种属的细菌获得产 TTX 合成能力,有利于细菌进化。但是目前 TTX 合成所需基因在产 TTX 细菌之间的水平转移方式及具体途径还不得而知,而探究 TTX 合成相关基因的水平分布、来源、转移,将是一件重要、艰巨的工作,还需以后对质粒序列进行细致的功能验证。

参考文献:

- [1] 姬广闻,李先明. 暗纹东方鲀驯化养殖及发展[J]. 河南水产,1999(1):10-11.
- [2] 姜仁良,张崇文,丁友坤,等. 池养无毒暗纹东方鲀的人工繁殖[J]. 水产学报,2000,24(6):539-543.
- [3] 杨桂梅,鲍宝龙. 河鲀和河鲀毒素之间关系的研究进展[J]. 上海水产大学学报,2008,17(6):734-739.
- [4] 杨桂梅,唐文乔,鲍宝龙,等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的弧菌菌落组成[J]. 上海水产大学学报,2006,15(3):257-263.
- [5] NOGUCHI T, ARAKAWA O, TAKATANI T. TTX accumulation in pufferfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2006, Part D1:145-152.
- [6] NOGUCHI T, HWANG D F, ARAKAWA O, et al. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis* [J]. Marine Biology, 1987, 94: 625-630.
- [7] YANG G M, XU J L, LIANG S H, et al. A novel TTX-producing bacteria *Aeromonas* isolated from the ovary of *Takifugu obscurus* [J]. Toxicon, 2010, 56:324-329.
- [8] WU Z L, XIE L P, XIA G L, et al. A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardioopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes* [J]. Toxicon, 2005, 45: 851-859.
- [9] SUGITA H, UEDA R, DEGUCHI Y, et al. Identification of a tetrodotoxin-producing bacterium isolated from the xanthid

- crab *Atergatis floridis* [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1987, 53(9):1693.
- [10] RITCHIE K B, NAGELKERKEN I, JAMES S, et al. A tetrodotoxin-producing marine pathogen [J]. Nature, 2000, 404: 354.
- [11] HWANG D F, ARAKAWA O, SAITO T, et al. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus, *Octopus maculosus* [J]. Marine Biology, 1989, 100:327 - 332.
- [12] LU Y, YI R Z. *Bacillus horikoshii*, a tetrodotoxin-producing bacterium isolated from the liver of puffer fish [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59 (3):453 - 458.
- [13] WANG J, FAN Y H. Isolation and characterization of a *Bacillus* species capable of producing tetrodotoxin from the puffer fish *Fugu obscurus* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26: 1755 - 1760.
- [14] FUNNELL B E, PHILLIPS G J. 质粒生物学[M]. 陈惠鹏, 张惟材, 于学玲, 等, 译. 北京: 化学工业出版社, 2009: 201 - 202.
- [15] 蒋培余, 潘劲草. 细菌遗传元件水平转移与抗生素抗性研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4):167 - 171.
- [16] CHRISTIE P J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1694: 219 - 234.
- [17] RAMBOW-LARSEN A A, WEISS A A. Temporal expression of pertussis toxin and Ptl secretion proteins by *Bordetella pertussis*[J]. Bacteriology, 2004, 186(1): 43 - 50.
- [18] 王景龙, 张瑞, 王兴龙. 细菌 IV 型分泌系统结构的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (23): 13979 - 13980, 14020.
- [19] 赵岩, 李明, 胡福泉. 细菌的 IV 型分泌系统[J]. 生命的化学, 2011, 31(1):128 - 133.
- [20] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 金东雁, 黎孟枫, 黄培堂, 等, 译. 北京: 科学出版社, 1999:26 - 27.
- [21] 刘芳, 都立辉, 沙莎, 等. 利用 16S rRNA 基因同源性分析鉴定两株明串珠菌[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(6): 427 - 429.
- [22] GOGARTEN J P, TOWNSEND J P. Horizontal gene transfer, genome innovate on and evolution [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 679 - 687.
- [23] GROHMANN E, MUTH G, ESPINOSA M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67: 277 - 301.
- [24] OCHMAN H, LAWRENCE J G, GROISMAN E A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation [J]. Nature, 2000, 405: 299 - 304.
- [25] 糜祖煌, 李爽, 秦玲. 万古霉素耐药肠球菌接合型转座子、I 类整合子遗传标记研究[J]. 世界感染杂志, 2008, 8 (1):23 - 25.
- [26] JUHAS M, CROOK D W, HOOD D W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence [J]. Cellular Microbiology, 2008, 10 (12): 2377 - 2386.

Identification of HGT-related genes in plasmid pNe-1 from tetrodotoxin-producing *Aeromonas* sp.

LIU Jing, YANG Gui-mei, BAO Bao-long

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Many unrelated bacteria in phylogenetic relationship with TTX-producing ability were isolated from various animals and environment, reminding us that horizontal gene transfer (HGT) might exist among various TTX-producing bacteria, but the exact mechanism is unclear. The objective of this study is to investigate whether HGT-related genes exist in the plasmid pNe-1 isolated from tetrodotoxin-producing *Aeromonas* sp. The *tra*, *rum* and *virD4* genes were amplified by PCR. The 906 bp-length *tra* fragment, 681 bp-length *rum* fragment and 1 319 bp-length *virD4* fragment had significant homology to some transposase, relaxase and *virD4* in sequence and contained conserved domains of these putative proteins respectively. The results indicate that the tetrodotoxin-producing *Aeromonas* sp. has the ability to transfer genes by conjugation and transposition, and also has the ability to transfer TTX to the hosts. The result of research in this study is believed to be significant for the further understanding of the relationship among tetrodotoxin-producing bacteria and the relationship between tetrodotoxin-producing bacteria and the puffer fish.

Key words: tetrodotoxin; bacteria; horizontal gene transfer; conjugation transfer; type IV secretion system; transposition