

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):162-168; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

溶藻弧菌质粒 pVAE259 全序列测定与分子生物学特征分析

苏婷, 罗鹏, 任春华, 胡超群*

(中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广州 510301)

摘要:【目的】获得溶藻弧菌环状质粒 pVAE259 全序列, 分析其分子生物学特征并探索该质粒可能具备的功能。【方法】使用酶切、克隆测序的方法获得 pVAE259 的全序列, 利用软件分析 DNA 序列和可能的编码蛋白, 推测质粒的生物学信息。【结果】pVAE259 为闭合环状质粒, 全长 6,075 bp, GC 含量为 42.16%。在 NCBI 中比对发现 pVAE259 与 *Vibrio* sp. 41 隐蔽性质粒 pPS41 具有较高的相似性。我们在序列中找到一个 *oriT* 位点, 另外全序列的 4118-5494 bp 推测为质粒复制区域。pVAE259 中存在 7 个氨基酸序列长度大于 100 的开放式阅读框 (ORF): ORF1-ORF7。其中 ORF1 编码蛋白属于释放酶超级家族 (Relaxase Super-family) 蛋白, 在 NCBI 数据库中它与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 MobA-like 蛋白最相似; ORF2 编码蛋白属于复制酶超级家族 (Replicase Super-family), 它与嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的复制蛋白 RepA 最相似; ORF5 与伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata*) 质粒 pHE1 的转移蛋白 MobC 相似。【结论】根据上述结果及相关文献分析, pVAE259 可能是具有转移能力的质粒, 该质粒是否影响宿主菌的表型性状还不清楚。

关键词: 溶藻弧菌; 质粒; 复制区域; 开放性阅读框

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0162-07

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 广泛分布于海洋及河口环境中, 属嗜盐性海生弧菌^[1]。溶藻弧菌不仅可以引起人类感染^[2], 还是海洋动物中最为常见的致病性弧菌种类^[3], 对大黄鱼、石斑鱼、牙鲆、鳎、对虾等许多名贵经济鱼虾类都有强烈致病性^[3-4]。溶藻弧菌的致病性是致病株存在毒力因子 (基因) 的表现, 不同的研究者从不同的角度分析了溶藻弧菌可能的致病因子^[3], 但是均缺乏进一步的实验证实, 总体而言, 溶藻弧菌的致病性研究还处于较为初级的阶段^[5]。

细菌质粒是细菌染色体外具有自主复制和转录能力的遗传物质, 以超螺旋状态存在于宿主细胞胞浆中^[6]。已有的研究表明: 质粒是促进细菌毒性和

抗生素耐药性在细菌间迅速传播的一个重要介质^[7]。目前在一些重要的弧菌物种中均发现携带质粒, 并且发现一些菌株的质粒与其宿主的致病性有着密切联系。例如, 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)^[8]、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[9]。Roig 等根据不同的生物型和血清型在 112 株创伤弧菌中发现 28 种不同的质粒, 所有第二生物型菌株都含有分子量约为 68-70 kb 的毒力质粒, 其中 89.65% 的菌株含有约 52-56 kb 假定的转移性质粒^[10]。1980 年, Jorge 等曾报道溶藻弧菌的一个质粒与其毒力相关的摄铁系统有密切关系^[11]。另据报道, pJM1 质粒是鳎弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 菌株 775 载铁体的主要遗传物质, Tolmasky 等证实有多种与 pJM1 同源

基金项目: 国家“973 项目” (2006CB101803); 国家自然科学基金 (30700016)

* 通信作者。Tel: +86-20-89023218; E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

作者简介: 苏婷 (1985-), 女, 广西桂林人, 硕士研究生, 从事海洋微生物学研究。E-mail: yatoust@163.com |

收稿日期: 2009-07-21; 修回日期: 2009-09-26

性很高的质粒存在,其中 JHC1 质粒能高效地表达产生大量的载铁体,明显增强该菌株的毒力^[12]。

根据质粒对于部分弧菌株毒力的贡献,我们有理由相信溶藻弧菌株中可能存在与其毒力紧密相关的质粒。然而迄今为止,对于溶藻弧菌的质粒国内外还十分缺乏研究,更没有分离单个质粒并获得溶藻弧菌质粒的任何核酸序列信息的报道。我们培养了本实验室保存的一株溶藻弧菌 E259,从中分离出一个质粒 pVAE259,经限制性内切酶酶切,克隆测序最终获得了 pVAE259 的全序列,之后对全序列进行了分子特征分析,期望探索溶藻弧菌 E259 的质粒可能具备的功能及其与溶藻弧菌抗性、毒力之间的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 购于 BD,电泳仪购于北京市六一仪器厂,PCR 仪为 BioRad 的 PTC-100,本研究中使用的其余试剂均购于 Axygen、TaKaRa 和 NEW ENGLAND BioLabs。

1.2 细菌培养与质粒提取

溶藻弧菌株 E259 于 2004 年 10 月分离自深圳大亚湾近海海水。将细菌接种于 TSB 中,28℃、200 r/min 培养,AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit 提取质粒。取 3 μL 上样 0.6% 琼脂糖凝胶,电压 120 V,电泳 30 min。

1.3 限制性内切酶的筛选与克隆测序

分别采用酶切位点为平末端的限制性内切酶 *EcoR* V、*Hae* III、*Sma* I、*Rsa* I、*Dra* I、*Dpn* I 对质粒进行酶切,反应条件为 37℃ 孵育 6 h,64℃ 灭活 10 min。酶切产物用 AxyPrep™ PCR Cleanup Kit 纯化。

用 DNA A-Tailing Kit 在酶切产物的平滑末端加一个碱基 A。加 A 后的酶切片段与 pMD18-T 载体连接,16℃ 反应 3 h。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,转化方法、平板配制和细菌培养方法见说明书。

在平板上挑取白色菌落,液体培养后提取质粒鉴定阳性克隆,再将阳性克隆菌株直接递交上海英俊生物技术有限公司测序。获得质粒 pVAE259 全序列,递交 NCBI,登录号为:GQ395338。

1.4 pVAE259 核苷酸序列分析

使用 NCBI 中 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找全序列的 ORF,BLAST 查找相似的核酸序列和蛋白序列。以

序列分析软件 DNAMAN 翻译 ORF 并查看核酸与蛋白序列的各项基本参数,进行重复序列、回文结构查找并分析限制性酶切位点和绘制质粒图谱。以 Mega4.0 软件对相关基因的氨基酸序列进行排列并绘制种系发生树图。

2 结果

2.1 E259 质粒 pVAE259 酶切分析

溶藻弧菌 E259 提取的质粒电泳后显示有 3 条大小不同的条带 (图 1),分别位于约 20 kb、8.5 kb 和 6 kb 处。其中 6 kb 处条带最亮,DNA 拷贝数最多,命名为 pVAE259。质粒 pVAE259 经 *EcoR* V、*Hae* III、*Dra* I、*Dpn* I、*Rsa* I 和 *Sma* I 酶切后,只有 *EcoR* V 切出单一清晰的条带,因此把 pVAE259 的 *EcoR* V 酶切产物用于克隆测序。

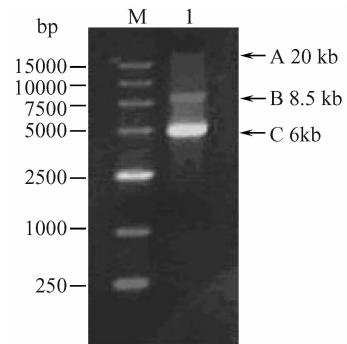


图 1 溶藻弧菌 E259 提取质粒电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of the plasmids isolated from *V. alginolyticus* E259. M. represents a DNA size marker (DL 15000, TaKaRa); I. represents plasmids isolated from the bacterium. A band; 20 kb; B band; 8.5 kb; C band; plasmid pVAE259, 6 kb.

2.2 pVAE259 全序列分析

2.2.1 核苷酸组分分析及与其他已知序列相似性比对:经测定,质粒 pVAE259 为闭合环状质粒,全长 6075 bp。其中碱基 A 占 32.64%,G 占 20.87%,T 占 25.20%,C 占 21.28%,G + C 为 42.16%,低于 Baumann (1981) 报道的海洋弧菌科染色体中 G + C (约 45% - 48%) 的比率^[13],及 Larsen 等从环境和人体中分离出来的 59 株溶藻弧菌致病株染色体中 G + C 比率 (45.9% - 46.8%)^[14]。

根据测序结果,我们把位点 1 定位在限制性内切酶 *EcoR* V 的位点上^[15]。将质粒 pVAE259 全序列输入 NCBI,经 Blastn 比对发现:(1) pVAE259 全序列的 654 - 2837 bp 和 4447 - 4955 bp 与弧菌属一株细菌 (*Vibrio* sp. 41) 质粒 pPS41^[16] (NCBI: AF149757) 全序列的 2629 - 4815 bp 和 443 - 957 bp 相似性分别为 68% 和 65%。(2) pVAE259 的 5128

-5344 bp 与河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 菌株 BD146 质粒 pBD146 (NCBI: EU574928) 全序列的 2841 - 3057 bp 有 75% 相似性, 同时还与 O1 型霍乱弧菌质粒 pVN84 (NCBI: AB200915) 中包含 *dfi6*, *repA*, *orf1*, *ibpI* 等基因的完整片段 911 - 1127 bp 有 75% 相似性。(3) pVAE259 的 2586 - 2820 bp 与 *Vibrio* sp. 121 质粒 pTM121 (NCBI: AF031570) 复制起始区 39 - 271 bp 有 72% 相似性, 同时也与 *Vibrio* sp. 41 质粒 pTM41 (NCBI: AF020625) 复制起始区 2069

-2318 bp 有 70% 相似性。

使用 DNAMAN 中的酶目录分析序列, 发现有 39 种限制性内切酶在序列中只有一个酶切位点 (图 2)。在 ORF2 上游 3355 - 3361 bp 处我们发现一个 *oriT* 序列 5'-CAACCTG-3'。根据 Pansegrau 等在 1994 年的报道, *oriT*: 5'-[C/T]A[A/T]C[C/T]TG-3' 是目前已知的唯一一个 DNA 转移所必需的顺式作用位点^[17]。在 *oriT* 上游 2259 - 2271 bp 处, 有两段无间隔的反向重复序列 5'-TTACGGAGGCATT-3'。

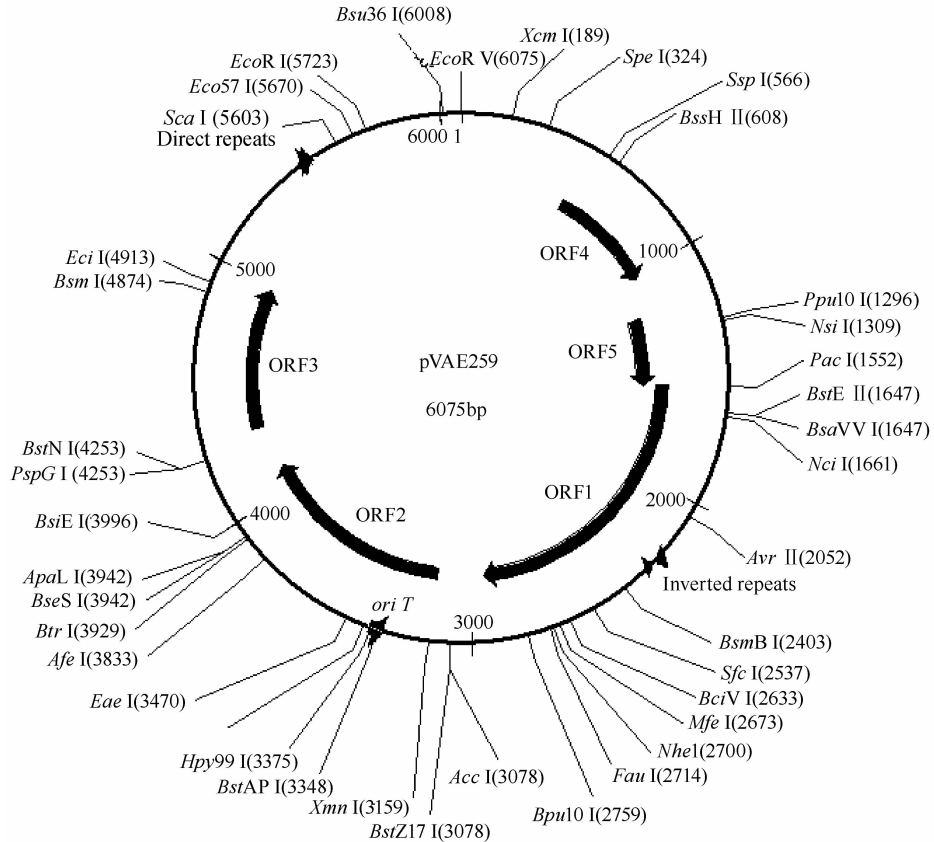


图 2 质粒 pVAE259 物理图谱和遗传结构图

Fig. 2 Physical map and genetic organization of the plasmid pVAE259. Bold arrows represent ORFs. Direct repeats and inverted repeats are indicated by "▲". The putative *oriT* sequence is indicated by "■". Unique restriction sites are given.

2.2.2 开放式阅读框 (ORF) 分析: 在 pVAE259 中共找到 7 个氨基酸序列长度大于 100 的 ORF, 按长度由大到小编号 ORF1-ORF7 (表 1)。7 个 ORF 全都在正向链上, 它们覆盖了质粒基因组 68.77% 的区域 (约 4178 bp)。

在 GenBank 中对这 7 个 ORF 推导的氨基酸序列分析显示, 它们均能翻译出具有明显生化特征的蛋白质, 其中 ORF1-ORF5 与数据库中一些蛋白具有较高相似性 (表 2)。ORF6、ORF7 虽然与数据库中的蛋白相似性较低, 但也可能具有特定功能。

NCBI 搜索发现, ORF5 与伸长盐单胞菌

(*Halomonas elongata*) 质粒 pHE1 的转移蛋白 MobC 相似。ORF1 编码蛋白与多个转移蛋白 MobA 较相似, 其中与 *E. coli* 的 MobA-like 蛋白最相似, 我们选取 10 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 ORF1 编码蛋白应当属于一个释放酶超级家族 (Relaxase Super-family), ORF2 编码蛋白与多个复制蛋白 RepA 相似, 其中与嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的 RepA 最相似, 我们选取 10 个最相似的蛋白进行比对并绘制种系发生树图 (图 4), 根据 BLAST 搜索结果及种系发生树图

可以判定 ORF2 编码蛋白应当属于复制酶超级家族 (Replicase Super-family)。

表 1 质粒 pVAE259 开放式阅读框的特征

Table 1 Characteristics of predicted open reading frames (ORFs) in the plasmid pVAE259

ORF	Strand	length	Position/bp	G + C%	AA Num	MV (Daltons)	Sequence
1	Plus	1377	1555 - 2931	42.77	458	51775	ccgATGatagt. . . ttcggTAGcgt
2	Plus	963	3155 - 4117	46.21	320	36942	tatATGaacaa. . . aaaacTGAAtca
3	Plus	654	4321 - 4974	45.41	217	24204	taaATGtgcca. . . ccaagTAAcgt
4	Plus	525	499 - 1023	40.19	174	19715	aacATGaaaa. . . acaagTAAatt
5	Plus	357	1209 - 1565	40.34	118	13265	accATGagtaa. . . atagtTAAgtt
6	Plus	351	2249 - 2599	47.29	116	13185	tatATGgcaaa. . . acaaaTAAaca
7	Plus	312	5535 - 5846	33.97	103	12179	caaATGaaaa. . . cacttTGAat

表 2 质粒 pVAE259 ORF 推测蛋白的同源性蛋白分析

Table 2 Analysis of homologous proteins of proteins encoded by ORFs in plasmid pVAE259

ORF	Gene or function of closest relative (source)	Data bank reference	Identities (%)	E Value
1	hypothetical protein pPS41_00025 [<i>Vibrio</i> sp. 41]	ref YP_001687831.1	113/159 (71%)	3e-63
2	hypothetical protein RED65_01853 [<i>Oceanobacter</i> sp. RED65]	ref ZP_01308685.1	114/343 (33%)	8e-39
3	hypothetical protein pPS41_00005 [<i>Vibrio</i> sp. 41]	ref YP_001687827.1	79/159 (49%)	2e-27
4	hypothetical protein pPS41_00010 [<i>Vibrio</i> sp. 41]	ref YP_001687828.1	86/111 (77%)	2e-25
5	hypothetical protein pPS41_00015 [<i>Vibrio</i> sp. 41]	ref YP_001687829.1	59/114 (51%)	6e-26

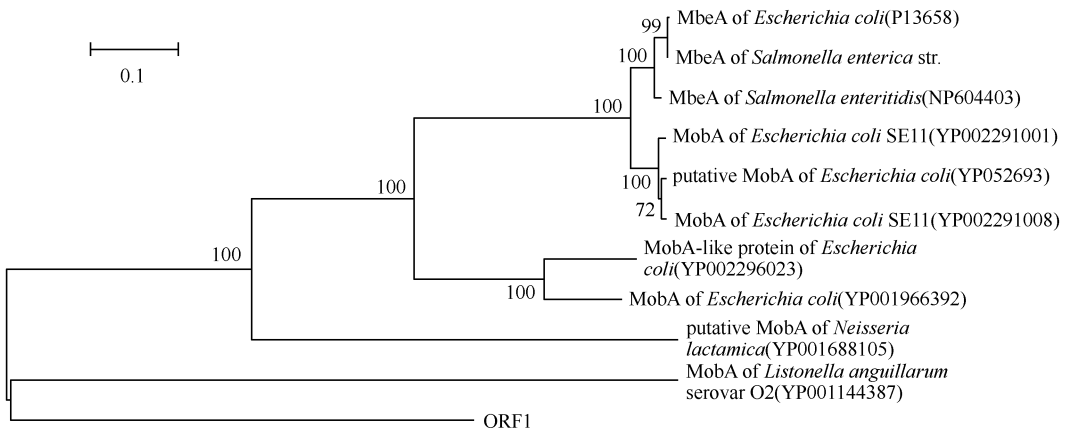


图 3 基于 pVAE259 ORF1 编码蛋白与其他相似蛋白序列构建的种系发生树

Fig. 3 Constructed Phylogenetic tree based on protein encoded by ORF1 and the other homoplasic protein. Numbers in parenthesis represent accession number of sequences in GenBank. Numbers at branch points are the percentage supported by bootstrap (1000 replications). The scale bar represents 10% sequence divergence. The numbers of branches represent branches bootstrap validation of the credibility of the percentage.

2.2.3 pVAE259 的复制区域分析: pVAE259 的复制区域分析见图 3。在 pVAE259 的 5450 - 5494 bp 处,有一段长度为 45 bp 的 5 bp 重复序列 (5'-CTTGC-3'), 而其前端 5410 - 5449 bp 是一个高度富含 AT 的区域: 5'-GAATTATCGCCACATCACTTTCC TTTCATCTTATAATTT-3', AT 含量达到 70%, 明显高于质粒基因组 (57.84%) 水平。AT 丰富区之前, 5376 - 5409 bp 是一个 6 bp 的回文结构, 5'-TGTCTG...N22...CAGACA-3'。而疑似编码复制蛋白 RepA 的区域为 3155 - 4117 bp, 在 4118 - 5375 bp 之间, 有 3 个 dam 甲基化位点 (GATC) [18],

分别位于 4171 bp、4219 bp 和 4311 bp。另外根据 Schaefer 等 [19] 研究的 DnaA box 共有序列 5' - (T/C) (T/C) (A/T/C) T (A/C) C (A/G) (A/C/T) (A/C)-3' 分析, 在这段区域里有 3 个可能的 DnaA 结合位点, 分别为 4522 bp: 5'-TCATACATC-3'、4654 bp: 5'-CTATGCGCT-3' 和 4926 bp: 5'-TTTTGCGAA-3'。在质粒的复制起点 (ori) 中, 重复子和富含 AT 的片段是它最显著的特征 [20], 而 Sobecky 等也曾报道正向重复序列在质粒中作为复制起始蛋白的结合位点 [16], 因此基于这些序列特征, 4118-5494 bp 可以判定为质粒 pVAE259 的复制区域 (图 5)。

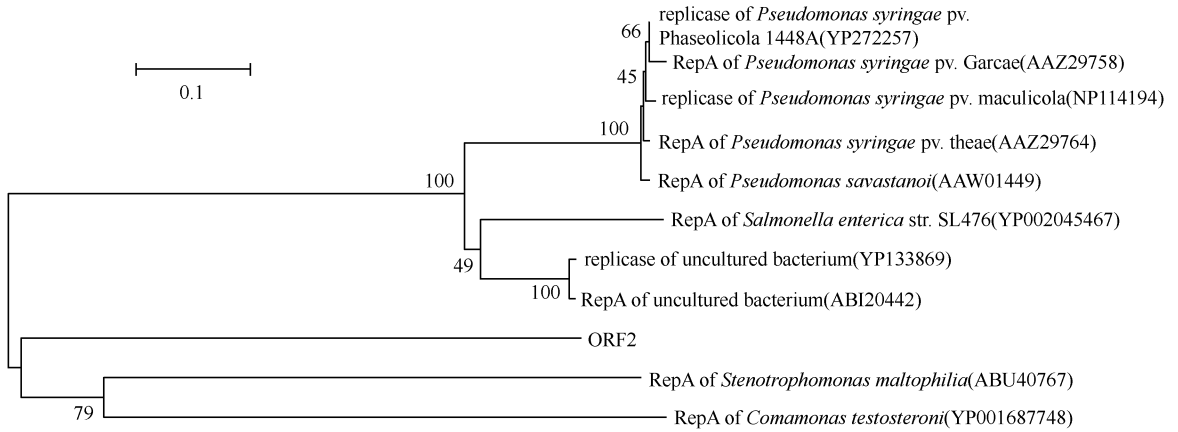


图 4 基于 pVAE259 ORF2 编码蛋白与其他相似蛋白序列构建的种系发生树

Fig. 4 Constructed Phylogenetic tree based on protein encoded by ORF2 and other homoplastic protein. Numbers in parenthesis represent accession number of sequences in GenBank. Numbers at branch points is the percentage supported by bootstrap (1000 replications). The scale bar, 10% sequence divergence. The numbers of branches represent branches bootstrap validation of the credibility of the percentage.

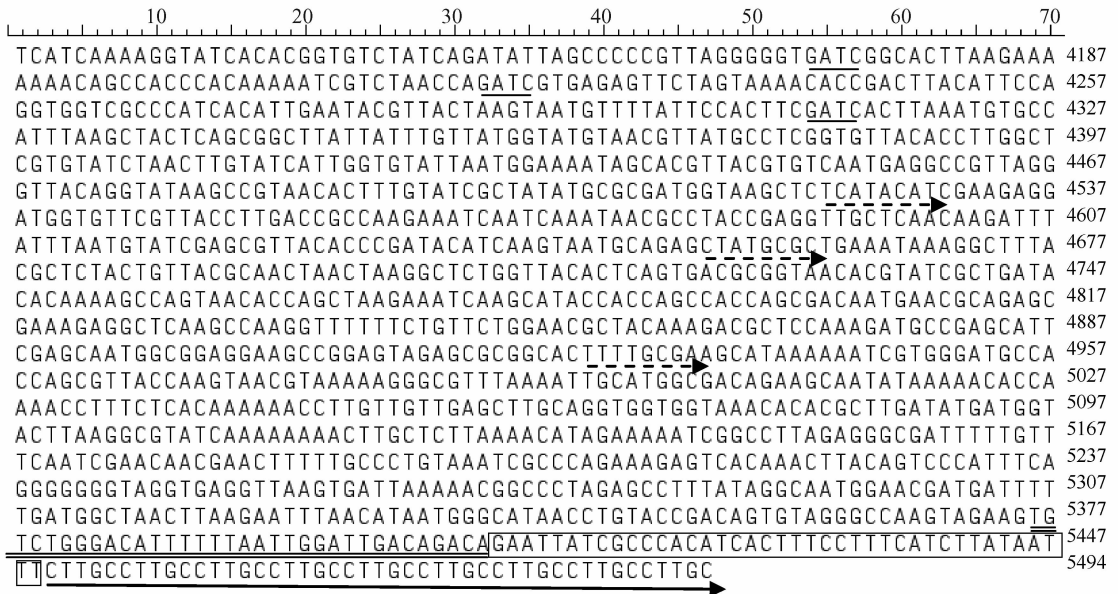


图 5 质粒 pVAE259 的复制区域分析

Fig. 5 Analysis of replication region of the plasmid pVAE259. The region locates in the part of 4118 - 5494 bp in the plasmid. Putative Dam methylation sites are underlined. Putative DnaA boxes are indicated by discontinuous arrows. Double lines in the sequence indicate palindromes. The pane indicates AT rich region. Direct repeats are indicated by arrows.

3 讨论

质粒具有以下特征：①不相容性，指相似的质粒在同一细胞中不能共存。②可转移性，最重要的一种方式是通过接合转移。③质粒携带的基因往往赋予宿主细菌新的表型，如 F 质粒。④质粒的丢失与消除。⑤自主复制，大的质粒倾向于严紧型控制，细胞中只有 1 - 3 个拷贝，小质粒一般为松弛型控制，细胞中可多达 40 个拷贝^[6]。根据质粒提取方法的不同，提取的质粒在电泳时有时会出现 3 条大小不

同的条带，分别为线状、开环和超螺旋形式，其中超螺旋形式移动最快，开环形式移动最慢，但是 3 种形式的质粒在电泳时其指示分子量相差不大^[21]。在本研究中，溶藻弧菌 E259 提取的质粒电泳后显示出 3 个分子量相差十分悬殊的条带，我们将 A 和 B 两个条带回收后用 EcoR V 酶切，结果证明 A 和 B 为不同于 pVAE259 的 DNA，且在 A、B 中不止一个 EcoR V 酶切位点（数据未显示）。另外本研究采用了商业化试剂盒提取质粒，能最大限度地减少线性基因组 DNA 和线性质粒的污染。综合以上分析，可

以认为条带 A、B、C 分别为 3 种大小不同的质粒, 并且这 3 种质粒的拷贝数也十分符合质粒自主复制控制规律, 以 pVAE259 的拷贝数为最多, 其它质粒拷贝数随分子量增加而减少。pVAE259 的大小及拷贝数非常适合下游的克隆测序操作。在本研究中, 溶藻弧菌 E259 至少存在 3 种不同大小的质粒, 这与我们以前发现其它不同溶藻弧菌株携带多个质粒的情况相似(数据未出版)。溶藻弧菌多种质粒共存的情况与其它弧菌(如: 霍乱弧菌^[8]、副溶血弧菌^[9])的质粒携带情况一致。

质粒与宿主染色体 G + C 比率的相似度, 暗示着该质粒是否为宿主原本携带或已在该宿主中存在相当长一段时间^[13]。质粒 pVAE259 的 GC 含量低于溶藻弧菌基因组 GC 含量, 提示 pVAE259 可能较晚从外界获得。此外, 我们在 pVAE259 全序列中找到了一个 *oriT* 位点, Pansegrau 等在 1994 年曾经报道过, 这是目前已知的唯一一个 DNA 转移所必需的顺式作用位点^[17], 而 ORF1 编码蛋白也与多株细菌的 MobA 比较相似。另外经证实, 与 pVAE259 最相似的隐蔽性小质粒 pPS41 是一个可转移质粒, 在它的序列中也找到了 *oriT* 位点。因此根据 GC 含量、*oriT* 位点及 MobA 相似蛋白的存在, 我们推测质粒 pVAE259 也极可能具有转移功能。假如质粒 pVAE259 存在毒力或抗性基因, 那么它对于溶藻弧菌的毒力或抗性的水平转移可能存在媒介作用。

虽然我们没有在 pVAE259 全序列中找到与已经报道的弧菌毒力基因或抗生素抗性相似的基因, 但并不能排除 pVAE259 与其宿主表型性状的关系。这主要是因为 pVAE259 存在 4 个编码未知功能蛋白的 ORF, 而且关于弧菌的毒力因子研究还比较少, 数据库中能够比对的弧菌基因也比较少。如果需要完全确定 pVAE259 对于宿主菌表型的影响, 需要对 pVAE259 进行移除或对其上特定的基因进行敲除。

参考文献

[1] 林业杰, 欧剑鸣, 董新平, 等. 溶藻弧菌的病原学研究. 海峡预防医学杂志 (*Strait Journal of Preventive Medicine*), 2001, 7(1): 45-46.

[2] Daniels NA, Shafaie A. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infections in Medicine*, 2000, 17(10): 665-685.

[3] 陈强, 鄢庆枇, 马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学 (*Marine Sciences*), 2006, 30(8): 83-89.

[4] 彭喜春, 张宁, 冉艳红, 等. 海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究. 现代食品科技 (*Modern Food Science and Technology*), 2008, 24(4): 312-315.

[5] 罗鹏, 胡超群. 溶藻弧菌中类霍乱弧菌毒力岛转座酶基因及侧翼序列分子生物学特征分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(10): 1367-1372.

[6] 刘辉. 细菌质粒 DNA 基因的研究进展. 北京医学 (*Beijing Medical Journal*), 2007, 29(2): 101-103.

[7] Zhang RF, Wang YL, Gu JD, et al. Identification of environmental plasmid-bearing *Vibrio* species isolated from polluted and pristine marine reserves of Hong Kong, and resistance to antibiotics and mercury. *Abponie van Leeuwenhoek*, 2006, 89: 307-315.

[8] 陈爱平, 陈允川, 林成水, 等. 霍乱弧菌的质粒研究进展. 海峡预防医学杂志 (*Strait Journal of Preventive Medicine*). 2000, 6(3): 14-16.

[9] 程苏云, 梅玲玲, 任锦玉, 等. 副溶血性弧菌质粒携带及生物学特性研究. 中国卫生检验杂志 (*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*). 2006, 16(1): 102-103.

[10] Roig FJ, Amaro C. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. *Microbiology*, 2009, 155(2): 489-97.

[11] Jorge HC. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature*, 1980, 284(10): 566-568.

[12] Tolmasky ME, Salinas PC, Aetis LA, et al. Increased production of the siderophore anguibactin mediated by pJM1-like plasmids in *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 1988, 56(6): 1608-1614.

[13] Leigh GP, John TM, Patricia AS, et al. Complete nucleotide sequence of a cryptic plasmid from the marine bacterium *Vibrio splendidus* and identification of open reading frames. *Plasmid*, 2000, 43: 99-102.

[14] Larsen JL, Farid AF, Dalsgaard I, et al. A comprehensive study of environmental and human pathogenic *Vibrio alginolyticus* strains. *Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene*, 1981, 251(2): 231-222.

[15] Zhang RF, Wang YL, Leung PC, et al. pVC, a small cryptic plasmid from the environmental isolate of *Vibrio cholerae* MP-1. *The Journal of Microbiology*, 2007, 6: 193-198.

[16] Sobecky PA, Mincer TJ, Chang MC, et al. Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria. *Environmental Microbiology*, 1998, 64: 2822-2830.

[17] Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, et al. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPa plasmids: Compilation and comparative analysis. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 239: 623-663.

- [18] 吴海珍,张惠展,李刚,等. 海洋鱼类致病菌鳗弧菌 MVM425 毒力质粒 pEIB1 复制区域的最小化分析. 食品与药品(*Food and drug*), 2007, 9(4): 1-4.
- [19] Schaefer C, Messer W. DnaA protein/DNA interaction. Modulation of the recognition sequence. *Molecular & General Genetics*, 1991, 226: 34-40.
- [20] Barbara EF, Gregory JP. 质粒生物学. 陈惠鹏, 张惟材, 等译. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [21] 徐英黔, 吴蕾, 甘一如, 等. CTAB 法制备超螺旋质粒 DNA. 过程工程学报(*The Chinese Journal of Process Engineering*), 2007, 7(2): 390-394.

Complete nucleotide sequence of a plasmid pVAE259 from *Vibrio alginolyticus* and analysis of molecular biological characteristic of the plasmid

Ting Su, Peng Luo, Chunhua Ren, Chaoqun Hu*

(South China Sea Institute of Oceanology, the Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, cas, the Key Laboratory of Applied Marine Biology of Guangdong, Guangzhou 510301, China)

Abstract: [**Objective**] To obtain the complete nucleotide sequence of the plasmid pVAE259 from *Vibrio alginolyticus*, to analyze molecular characteristic of the plasmid, and to explore its potential function. [**Methods**] We got the whole sequence of pVAE259 by the steps including of enzyme digestion, cloning, analysis of the acquired sequence and putative encoded protein using the softwares followed by speculation of its potential biological function. [**Results**] pVAE259 was a covalently closed circular plasmid. The complete sequence consists of 6075 bp in length, with a 42.16% GC content, and it is similar to the cryptic plasmid pPS41 of *Vibrio* sp. 41. There is an origin of transfer (*oriT*) region in the sequence and a replication region located in the part from 4118 to 5494 bp. Seven open reading frames that longer than one hundred amino acids were found in pVAE259, ORF1-ORF7. The protein encoded by ORF1 should be classed into the members of relaxase superfamily, which is closest related to the MobA-like protein of *Escherichi coli*. The protein encoded by ORF2 should be classed into the members of the replicase superfamily, which is closest related to the protein RepA of *Stenotrophomonas maltophilia*. The protein encoded by ORF5 is similar to the protein MobC in the plasmid pHE1 of *Heliampora longata*. [**Conclusion**] *The plasmid pVAE259 might have the ability to transfer between different bacterial strains.*

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; plasmid; replication region; open reading frames

(本文责编:王晋芳)