

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

罗鹏, 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, 广州 510301)

摘要:【目的】调查类似霍乱弧菌毒力岛(VPI)转座酶(*vpiT*)的基因是否在溶藻弧菌中分布, 并了解其全序列及侧翼序列的分子生物学特征。【方法】对 94 株溶藻弧菌是否携带类似 VPI 的 *vpiT* 基因进行 PCR 检测, 对阳性株进行了 PCR 产物直接测序, 根据获得的部分已知序列, 设计引物, 通过反向 PCR 扩增出全长类似 *vpiT* 的基因 *valT* 及部分侧翼片段, 对反向 PCR 产物进行克隆测序, 然后对获得的 *valT* 及侧翼序列进行生物信息学分析。【结果】发现 94 株溶藻弧菌中只有从粤东对虾池水分离的 2 个株 E06011、E0612 在 PCR 检测中产生了预期扩增片段。测序表明两者序列 (*valT*-S1) 完全一致。根据反向 PCR 及克隆最终获得的溶藻弧菌 E0601 全长 *valT* 基因及部分侧翼序列 *valT*-S3。对 *valT*-S3 生物信息学分析表明: *valT* 是一个高度类似于霍乱弧菌毒力岛 *vpiT* 的转座酶基因。【结论】根据上述结果及相关文献, 有理由相信 *valT* 基因及其侧翼片段是异源获得, 霍乱弧菌 VPI 元件或整体很可能在包括溶藻弧菌在内的弧菌种间转移。

关键词: 溶藻弧菌; 霍乱弧菌; 毒力岛; 转座酶

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1367-06

弧菌广泛分布于世界各地的海洋与河口环境中, 绝大部分属于弧菌属, 包括至少 63 个种^[1], 其中霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)是对人类健康危害最为严重的 3 种致病弧菌^[1,2]。弧菌的致病性是其存在毒力基因及相关调控基因的表现。已有的研究表明霍乱弧菌的流行致病株都存在毒力岛(VPI), 而非致病株则不存在该 VPI^[3,4], 说明 VPI 是霍乱弧菌致病性的重要基因元件。对引起第 6 次和第 7 次霍乱大流行的典型株 VPI 岛测序表明: 尽管两者有少部分碱基和氨基酸位点的差异, 但均包含 *tcp* 基因簇、*acfs*、*toxT*、*aldA*、*mop*、*vpiT* 等重要毒力及毒力调控基因, 两者长度接近, 介于 41.2~41.3 kb 之间^[3]。VPI 长达几十 Kb, 明显低的 G+C 含量、转座酶基因的存在及类似

于噬菌体 att 位点, 说明该毒力岛属于可移动元件, 很可能是通过水平转移获得^[3]。此外, 在霍乱弧菌的近缘种—拟态弧菌(*V. mimicus*)中也发现该岛的存在, 证实了这种可能性^[5]。毒力岛或毒力基因的水平转移很可能造成新的致病株出现并扩大疾病流行的范围^[6,7], 因此, 调查重要致病菌毒力岛或毒力基因在环境细菌株中的分布对于掌握疾病流行规律、探索病原菌致病机理是十分重要的, 但是迄今为止, 并没有受到广泛的重视。

溶藻弧菌是海洋中最为常见的弧菌属细菌之一, 它是海水养殖中一种危害严重的病原菌, 同时也可引起人类感染^[2,8]。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^[8], 但是缺乏进一步的实验证实, 因此对于其致病机理还不能形成统一的认识。

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

*通讯作者。Tel/Fax: +86-20-89023218; E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

作者简介: 罗鹏(1977-), 男, 湖北十堰人, 助理研究员, 博士, 主要从事海洋微生物学研究。E-mail: luopengli@163.com

收稿日期: 2008-03-15; 修回日期: 2008-06-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

总体来说,溶藻弧菌的致病性研究目前还处在较为初级的阶段^[8],至今还少见从基因水平揭示溶藻弧菌的致病机理的文献报道。我们以 VPI 中转座酶基因 *vpiT* 为对象,调查类似 *vpiT* 的基因是否存在于溶藻弧菌环境分离株中,以期有助于了解 VPI 的水平散播及溶藻弧菌的致病机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 溶藻弧菌株及基因组 DNA 提取: 溶藻弧菌共 94 株,分离自沿海水体及海洋动物体内。分离地点及株数:广东省湛江、阳江、深圳、汕头、汕尾市,共计 86 株;广西壮族自治区北海市共计 5 株;海南省海口、三亚市,共计 3 株。其中 45 株来源于水体,49 株分离于海洋动物体内。其中溶藻弧菌 E0601 分离自汕尾市马宫镇某虾苗厂池水,溶藻弧菌 E0612 分离自汕头市濠江区对虾养殖池水。细菌分离时间:2004 年 9 月~2006 年 12 月。

1.1.2 主要试剂和仪器: APW 培养基购自 BD 公司(Becton Dickinson);细菌基因细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海华舜公司;引物由上海生工生物技术公司合成。*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Dra* I、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体、DNA 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司(大连);限制性内切酶 *Vsp* I、*Rsa* I 购自深圳中晶生物技术公司。PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 类 *vpiT* 基因在溶藻弧菌中分布的 PCR 检测、PCR 产物测序及序列鉴定

1.2.1 DNA 提取: 所有溶藻弧菌株经 APW 培养基过夜培养后,以细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行菌株 DNA 提取。

1.2.2 PCR 扩增和序列测定: 扩增霍乱弧菌 VPI 岛 *vpiT* 基因片段引物 *vpiT*-F: 5'-GCAATTTAGGGGCG-CGACGT-3'; *vpiT*-R: 5'-CCGCTCTTTCTTGATCTG-GTAG-3'^[9]。PCR 条件参见文献[9]。扩增产物经琼脂糖电泳检测大小后,对阳性片段进行切胶回收,递交测序公司直接测序,获得序列 valT-S1。以 NCBI 数据库中 Blast 命令搜索 valT-S1 的相似序列,对序列进行比对鉴定。

1.3 反向 PCR 扩增全长溶藻弧菌类 *vpiT* 基因 *valT* 及部分侧翼片段

以限制性内切酶 *Dra* I、*Vsp* I、*Rsa* I 对溶藻弧菌 E0601 基因组 DNA 分别进行酶切,酶切条件见酶

产品说明书。酶切后,65℃灭活内切酶。加入 0.1 倍体积 3 mol/L NaAc、2.5 倍体积无水乙醇,沉淀纯化酶切产物。酶切产物以 T4 DNA 连接酶连接过夜,连接条件见酶说明书。连接产物再以无水乙醇沉淀纯化,用作反向 PCR 扩增模板。

根据已经获得的 valT-S1 序列,设计反向套式 PCR 引物。第一轮 PCR 引物: Rvpi1F: 5'-ATCAAGTTTCGCCCAAATAACC-3'; Rvpi1R: 5'-AACCCG-ATAGCGAGAGCAGTCA-3'。第二轮 PCR 引物: Rvpi2F: 5'-GTGGGGTTGGAAGAACTGGAC-3'; Rvpi2R: 5'-GGCGCTCATATCTTTGGAAATC-3'。二次 PCR 反应条件均为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 54℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30 个循环; 72℃ 8 min。二次扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带有无、特异性及大小后,确定对 *Dra* I 酶切、扩增产物进行切胶回收。回收片段连接至 pMD18-T 载体,转化 DH5a 细胞,挑选阳性克隆递交测序公司测序,获得序列 valT-S2。

1.4 valT-S1、valT-S2 序列拼接以及拼接序列鉴定

以 *Dra* I 酶切点对 valT-S2 分割,以 DNASTar 软件中 SeqMan 程序对 valT-S1、valT-S2 序列进行拼接,获得拼接序列 valT-S3。以 NCBI 数据库 Blastn 和 Blastx 命令搜索 valT-S3 的相似序列,对序列进行比对鉴定。以 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找 ORF,确定出全长类似 *vpiT* 的基因 *valT* 及其它可能存在的编码基因。将序列 valT-S3 递交 NCBI,获得登录号: EU 787499。

1.5 valT 氨基酸序列分析及种系发生关系分析

以 BIOEDIT 将 *valT* 序列翻译成氨基酸序列 val-A,并预测分子量。以 NCBI 数据库 Blastp 命令搜索 val-A 的相关序列,将相关序列以 Mega 4.0 进行排列并绘制系统发育图,进行种系发生关系分析。

以 Hits 程序(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)寻找 val-A 基序或核心结构域。val-A 及相关序列用 Clustal W 排列后,寻找同功能蛋白保守性位点。运用 Hopfield (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)对蛋白质序列进行二级结构预测。

2 结果

2.1 类 *vpiT* 基因在溶藻弧菌中分布及 valT-S1 比对

94 株溶藻弧菌中,发现有两个株 E0601、E0612 各自产生了预期的 680 bp 扩增片段(图 1,显示 2 个

阳性株和 2 个阴性株电泳结果)。出现频率为 2.1%。对 E0601 和 E0612 PCR 产物均进行了直接测序, 结果两者的序列完全相同, 命名为 valT-S1。

valT-S1 经 Blastn 比对, 发现与多种细菌的转座酶相似, 其中与多株来自霍乱弧菌毒力岛 *vpiT* 基因相似度明显高于与其它转座酶的相似度, 达到 94%。

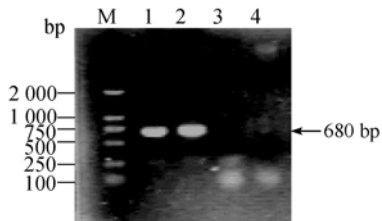


图 1 溶藻弧菌中类 *vpiT* 基因 PCR 检测典型结果

Fig. 1 Typical results of PCR detection for *vpiT*-like gene among *V. alginolyticus* strains. M. Marker DL2000; 1. *V. alginolyticus* E0601; 2. *V. alginolyticus* E0612; 3. *V. alginolyticus* E0666; 4. *V. alginolyticus* ZJ0451.

2.2 全长溶藻弧菌类 VPI 转座酶基因 valT 及部分侧翼片段分析

以内切酶酶切并连接处理的 DNA 为模板, 通过反向 PCR, 发现内切酶 *Dra* I、*Vsp* I、*Rsa* I 均产生了扩增片段。但只有 *Dra* I 酶切后连接的模板扩增产生的片段较长且不存在非特异性扩增片段 (图 2)。

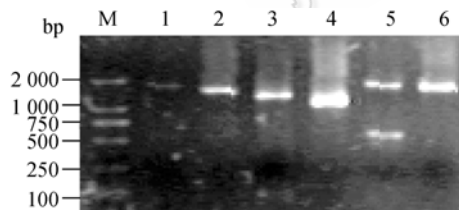


图 2 溶藻弧菌 E0601 反向 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of reverse PCR products from *V. alginolyticus* E0601. M. Marker DL2000; 1 and 2. The first and the second round PCR products from the template generated by *Dra* I digestion; 3 and 4. Generated by *Vsp* I digestion; 5 and 6. Generated by *Rsa* I digestion.

Dra I 酶切后并 PCR 产生的扩增产物经克隆测序后, 获得了已知序列 valT-S1 两侧序列 valT-S2, 经与 valT-S1 拼接获得了最终正确顺序的序列 valT-S3 (GenBank 登录号: EU787499)。valT-S3 全长 1928 bp, 包括完整的推测基因 *valT*, *valT* 长 978 bp。*valT* 的 ORF 起始于 valT-S3 的第 113 个碱基。该完整的 *valT* 经 Blastn 搜索发现其与多株来自霍乱弧菌毒

力岛 *vpiT* 基因相似度明显高于与其它转座酶的相似度, 达到 94% (以推导的氨基酸序列构建的种系发生树见图 3)。该完整的 *valT* 经 Blastx 搜索发现结果类似于 Blastn 搜索结果。并且溶藻弧菌的任何序列均不出现在搜索结果之中, 包括已经公布溶藻弧菌 12G01 全基因组鸟枪序列。此外, 94 株溶藻弧菌中只有两个株出现预期扩增片段, 说明 *valT* 并非是溶藻弧菌固有的。

对 *valT* 上游 112 bp 片段 Blastn 搜索表明: 紧邻 *valT* 上游的第 67 ~ 112 bp 所形成的区域同样与致病霍乱弧菌 *vpiT* 上游相应区域高度相似。另外, 该区域中的一段 (第 67 ~ 97 bp) 和一种大肠杆菌转座酶上游同样位置的区域高度相似, 后者属于倒置重复序列 (IR)。然而, 在 *valT* 的右侧并没有找到与 valT-L 相对应右端倒置重复序列。

对 *valT* 下游 838 bp 片段 Blastx 搜索表明: *valT* 下游片段与多种弧菌可编码基因中的小片段高度相似, 有典型的马赛克特征。这些碎片所在的基因均表达推测的蛋白, 功能未知。其中包括与溶藻弧菌 12G01 一个推测蛋白的基因相似的片段。同时, 对 *valT* 下游 838 bp 片段进行了 ORF 预测, 第 473 ~ 622 bp 处形成一个 ORF, 编码 49 个 aa 的肽链, 功能未知。

2.3 valT 推导氨基酸序列特征

valT 推导编码产物 valT-A 长 325aa, 理论分子量为 38.5 kDa。它与多种细菌转座酶及整合酶同源, 但与多株霍乱弧菌 *vpiT* 的氨基酸序列最为相似 (图 3), 两者长度一致。与霍乱弧菌 0395、N19691 等仅存在 36 个位点差异, 相似度为 89%, 与霍乱弧菌 MZO-3 仅存在 38 个位点差异, 相似度达到 88%。

Hits 程序分析表明: valT-A 的第 129-284aa 所形成的区域与整合酶核心结构域高度相似。对来自不同种属细菌 (亲缘关系较远, 图 3) 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, 但是在长 303aa 的比对区内共有 22 个保守性位点。其中 16 个保守性残基位于核心结构域内, 占保守性残基比例为 72.7%。在核心结构域内, 位于位点 156、195、240 处的保守性残基构成了 D-D-E 模体 (图 4)。

valT-A 的二级结构, 主要以 α -螺旋 (44.92%), 随机卷曲 (42.77%) 为蛋白最大量的结构元件, β -折叠 (延伸主链, 12.31%) 则散布其中。但是总计 6 个 β -折叠区, 其核心结构域占有 4 个 (图 4)。

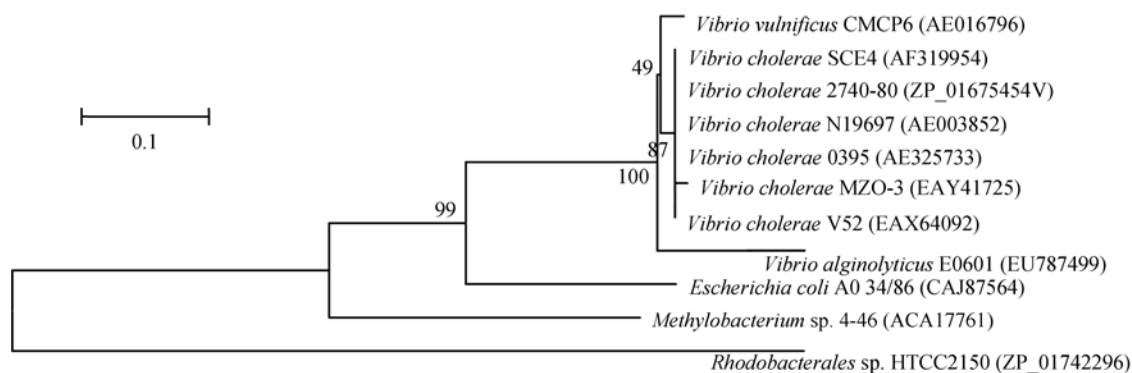


图3 基于溶藻弧菌 E0601 *valT* 及其它细菌的转座酶序列构建的种系发生树

Fig. 3 Constructed phylogenetic tree based on *valT* sequence from *V. alginolyticus* E0601 and transposase sequences from other bacteria. Numbers in parenthesis represent accession number of sequences in GenBank. The number at branch points is the percentage supported by bootstrap (1000 replications). The scale bar, 10% sequence divergence.

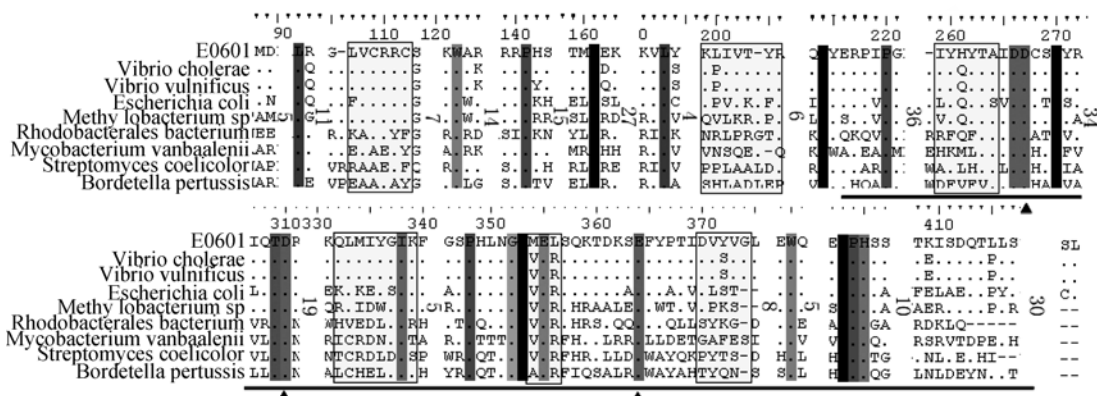


图4 溶藻弧菌 E0601 *valT*-A 及其它细菌的转座酶序列特征比较

Fig. 4 Sequence comparison of *valT*-A from *V. alginolyticus* E0601 and transposases from other bacteria. The underline: the region similar with core domain of integrase. The black podetium: conserved sites of amino acids. Light gray pane: the region that can form β -sheet. "▲": the residue of D-D-E motif. Number in the sequences: the number of omitted sites after sequence alignment.

3 讨论

为了获得完整的 *valT* 序列及尽可能长侧翼未知序列, 我们采用了反向 PCR 的方法。该法的基本原理是: 将含已知序列的 DNA 用合适的限制性内切酶进行酶切, 产生大小适于 PCR 扩增的片段。将该片段的两端连接成环状分子, 用一对与核心区两侧互补的引物进行 PCR 扩增。对已知区域而言, 引物的延伸是沿环状分子的未知序列区进行^[10]。为了减少非特异性扩增, 通常对第一轮 PCR 产物再进行套式 PCR。这种方法克服了传统未知序列分析法的克隆、亚克隆和文库筛选的繁琐步骤^[10]。由于内切酶切点必须存在于未知序列中, 因此内切酶的筛选是实验必须的一步, 本研究所选用的三种内切酶经酶切、连接后产生的模板均能获得的正确的 PCR 产物。*Dra* I 与 *Rsa* I 酶切后产生模板的第二轮 PCR 产物长度基本相同, 均长

于 *Vsp* I 酶切后最终产生的 PCR 产物长度, 但 *Dra* I 不存在非特异性扩增, 因此只需对 *Dra* I 酶切后最终产物 PCR 产物进行克隆测序。

蛋白的功能与其序列、空间构象密不可分。经鉴定, *valT*-A 发挥功能的结构域为类似于整合酶核心结构域的区域, 整合酶和转座酶同属于一个蛋白家族, 执行类似的功能^[10]。研究发现各种插入序列、转座子中的转座酶以及反转录转座子中的整合酶均存在包含 D、D、E 氨基酸残基的 D-D-E 模体^[11-13], D-D-E 模体形成一个催化结构域, D、D、E 氨基酸残基负责对 Mg^{2+} 等二价阳离子的捕获^[14,15]。本研究中, *valT*-A 核心结构域同样包含 D-D-E 模体, 提示 *valT*-A 很可能具有相同功能。

此外, *valT*-A 的二级结构预测显示, 在其核心结构域共有 4 个 β -折叠, 类似数量的 β -折叠同样出现于

其它转座酶的核心结构域内^[11]。*valT* 与霍乱弧菌 *vpiT* 序列的高度相似性以及上述模体和二级结构分析, 说明 *valT* 是一个高度类似于霍乱弧菌 *vpiT* 的转座酶基因。

转座酶是转座因子中具体执行遗传物质移位的核心部件。紧邻 *valT* 的上游同样存在与 *vpiT* 上游侧翼^[3]和一种大肠杆菌转座酶上游侧翼倒置重复序列^[16]高度相似的区域(*valT-L*, 长 32bp)。绝大多数情况下, 倒置重复序列或正向重复序列是一个转座因子中伴随转座酶的特征序列^[17], 这进一步表明了 *valT* 的转座特征。然而, 在 *valT* 的右侧并没有找到与 *valT-L* 相对应右端倒置重复序列, 这一点与霍乱弧菌的 VPI 中 *vpiT* 的情况相同。在紧邻 *valT* 的下游, 发现了至少长 800 bp 的马赛克样的基因碎片, 这些碎片与多种弧菌的多种推测蛋白有较高的相似性, 具有明显的拼接特征。另外 800 bp 的下游片段中发现一个未知功能的 ORF。与此类似, 在霍乱弧菌 VPI 岛中紧邻 *vpiT* 的下游(VPI 左区)也是几个未知功能的 ORF 及一些序列碎片^[3]。

对于原核生物而言, 其转座因子主要包括 3 类: 插入序列、复合转座子、TnA 家族^[18]。插入序列是最简单的转座因子, 它们除具有转座所必须的部分外, 不带有其它任何遗传信息, 插入序列的两臂含有倒置重复序列; 复合转座子是一类带有某些抗药性基因的转座子, 其两翼往往是两个相同或高度同源的插入序列; TnA 家族的转座因子只带有 3 个基因, 一个编码 β -内酰胺酶, 另两个分别编码转座必须的转座酶和解离酶^[18]。综合上述 *valT* 及上下游序列特征及转座因子分子特征分析, 可以断定 *valT* 所在的转座因子并非是简单的插入序列(IS)、TnA 转座子或常规的复合转座子, 极有可能是一种特殊的类似霍乱弧菌 VPI 的大型转座子。

霍乱弧菌 VPI 具有类似于噬菌体的结构特点, 这说明 VPI 是霍乱弧菌较晚从外界获得的并且可以水平转移^[3,19,20]。在拟态弧菌中发现 VPI 组件, 进一步说明了 VPI 可以产生水平转移^[5]。VPI 本身携带毒力基因及调控基因, 以及 VPI 对霍乱弧菌致病性的贡献使我们有理由相信 VPI 种间的水平转移很可能导致新的致病株出现并扩大疾病流行的风险。尽管本文调查的 94 株溶藻弧菌绝大部分来源分布于广东省各地, 但只有 2 个株有 *valT* 基因, *valT* 在溶藻弧菌中极低的出现频率以及上述对 *valT* 和侧翼序列的生物信息

学分析, 使我们有理由相信 *valT* 并非溶藻弧菌所固有, 而是异源获得的。此外, 2 个 *valT* 阳性株仅出现于粤东汕头、汕尾的海水中, 是否侧面说明该地区具有较高的 VPI(或霍乱弧菌致病株)出现频率, 从而导致毒力基因水平转移的概率要大于其它地区? 由于基因的水平转移和微生物基因组的进化、疾病的流行、传染都是一系列复杂事件, 又缺乏针对性的统计、调查资料, 这样的推测远缺乏有说服力的证据。而探究毒力及相关基因的水平分布、来源、转移, 将是一件庞大、艰巨的工作。

本研究发现了环境分离的溶藻弧菌 E0601 中存在类似霍乱弧菌 VPI 岛重要组分 *vpiT* 的基因 *valT*, 根据 *valT* 及侧翼序列分析, 推测 *valT* 并非溶藻弧菌所固有, 而是异源获得。VPI 的元件或整体很可能在包括溶藻弧菌在内的弧菌种间水平转移。是否溶藻弧菌 E0601 确实存在完整的 VPI 元件? 是否该元件与溶藻弧菌的致病性存在联系? 还需要以后对侧翼部分继续测序验证和毒力、致病机理分析才能较好的解答这些问题。

参 考 文 献

- [1] Thompson FL, Austin B, Swings J. The biology of vibrios. Washington DC: ASM Press, 2006.
- [2] Daniels NA, Shafaie A. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infect Med*, 2000, 17(10): 665-685.
- [3] Karaolis DK, Lan R, Kaper JB, et al. Comparison of *Vibrio cholerae* pathogenicity islands in sixth and seventh pandemic strains. *J Infect Immun*, 2001, 69(3): 1947-1952.
- [4] Zhang DL, Rajanna C, Sun W, et al. Analysis of the *Vibrio* pathogenicity island-encoded Mop protein suggests a pleiotropic role in the virulence of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 225: 311-318.
- [5] Boyd EF, Moyer KE, Shi L, et al. Infectious CTXF and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect Immun*, 2000, 68: 1507-1513.
- [6] 徐建国. 毒力岛和细菌毒力的进化. 中华微生物学和免疫学杂志 (*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 1999, 19(2): 169-171.
- [7] 谢珍玉, 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展. 热带海洋学报(*Journal of Tropical Oceanography*), 2005, 24(3): 86-95.
- [8] 陈强. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学(*Marine Sciences*), 2006, 30(8): 83-89.

- [9] Sechi LA, Dupre I, Deriu A, *et al.* Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. *J Appl Microbiol*, 2000, 88: 475–481.
- [10] 颜静宛, 林琳, 王锋. 获得基因侧翼序列位点信息的几种扩增方法. 福建农业学报(*Fujian Journal of Agricultural Sciences*), 2005, 20(增刊): 125–129.
- [11] Ohta S, Tsuchida K, Choi S, *et al.* Presence of a characteristic D-D-E motif in IS1 transposase. *J Bacteriol*, 2002, 184(22): 6146–6154.
- [12] Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, *et al.* A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 942–946.
- [13] RezsÖhazy RB, Hallet J, Delcour M, *et al.* The IS4 family of insertion sequences: evidence for a conserved transposase motif. *Mol Microbiol*, 1993, 9: 1283–1295.
- [14] Baker TA, Luo L. Identification of residues in the Mu transposase essential for catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6654–6658.
- [15] 唐江涛, 何勇强, 唐纪良. 细菌转座子 Tn5 转座机理的研究进展. 广西农业生物科学(*Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*), 2003, 22(4): 316–321.
- [16] Hu ST, Yang MK, Spandau DF, *et al.* Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene*, 1987, 55: 157–167.
- [17] Li WH, Graur D. Fundamentals of molecular evolution. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, 1991.
- [18] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [19] Mukhopadhyay A, Chakraborty S, Takeda Y, *et al.* Characterization of VPI pathogenicity island and CTX prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 2001, 183(16): 4737–4746.
- [20] 王洪敏, 马文丽, 郑文岭. 霍乱弧菌的致病性与流行性研究进展. 生物化学与生物物理进展(*Progress In Biochemistry and Biophysics*), 2003, 30(1): 38–42.

Analysis of molecular biological characteristic of the gene and its flanking sequences, similar with transposase in *Vibrio cholerae* pathogenicity island, among *V. alginolyticus* strains

Peng Luo, Chaoqun Hu *

(South China Sea Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, CAS, Guangzhou 510301, China)

Abstract: [Objective] To investigate whether the gene similar with transposase gene (*vpiT*) from pathogenicity island of *Vibrio cholerae* exists in *V. alginolyticus* strains, and to analyze molecular biological characteristic of the gene and its flanking sequences. [Methods] PCR detection of the gene, similar with *vpiT* in pathogenicity island of *V. cholerae* was done among 94 strains of *V. alginolyticus*. PCR products from positive strains were directly sequenced. Based on acquired partial sequences, we designed primers for reverse PCR, and got the amplification fragment containing complete gene (*valT*) from *V. alginolyticus* E0601, which was similar with *vpiT* gene. The reverse PCR product was cloned and sequenced, and the acquired sequence was analyzed with bioinformatic methods. [Results] We found that among 94 *V. alginolyticus* strains, only *V. alginolyticus* E0601 and E0612, from east coastal areas of Guangdong province, produced predicted positive amplification fragments in PCR detection. Sequencing indicated that amplification fragments from *V. alginolyticus* E0601 and E0612 had identical DNA sequence (named valT-S1). Sequence valT-S3 from *V. alginolyticus* E0601, containing complete *valT* gene and flanking segments, was finally obtained through reverse PCR, cloning, and sequencing. Bioinformatic analysis on valT-S3 suggested that *valT* was transposase gene, highly similar with *vpiT* in *V. cholerae* VPI. [Conclusion] According to above result and related references, we believe that *valT* and its flanking segments were acquired from heterogenous bacteria, and VPI or its component probably transfers among *Vibrio* species including *V. alginolyticus*.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio cholerae*; pathogenicity island; transposase