

从迟缓爱德华氏菌 *fosmid* 文库克隆编码寡肽透过酶的 *opp* 基因簇

杨佳银^{1, 2}, 莫照兰¹, 茅云翔³, 李杰³, 叶旭红³, 王波^{1, 2}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 从迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) LSE40 *fosmid* 文库克隆到编码寡肽透过酶的 *opp* 基因簇。该基因簇全长 6 741 bp, 含有 5 个 ORF, 依次编码 OppA-B-G-D-F 5 个蛋白; 位于 *oppA* 翻译起始位点上游 385 bp 处有一个推测的转录起始位点, 在该转录起点的 -35 和 -10 区分别有 TAGACA 和 TATATT 两个特征性启动子序列; 位于 *oppA* 和 *oppB* 的间隔区和 *oppF* 之后的非编码区各有一个茎环结构, 推测分别为 *oppA* 和 *opp* 基因簇的转录终止子。氨基酸序列分析表明该基因簇编码的各个蛋白与同属细菌鲶鱼爱德华氏菌 (*E. ictaluri*) 对应的各个蛋白高度相似, 相似性在 96%~98%; 与其他革兰氏阴性菌相似性在 56%~89%; 与革兰氏阳性菌的相似性在 27%~53%。以细菌 OppA 的保守结构域 SBP_bac_5 构建系统发生树, 结果显示 *E. tarda* LSE40 与同属细菌 *E. ictaluri* 的亲缘关系最近, 与肠杆菌科细菌的亲缘关系较近, 与革兰氏阳性细菌的亲缘关系较远, 表明 *oppA* 的 SBP_bac_5 结构域可作为细菌分类鉴定的依据。*opp* 基因簇的获取为深入了解 *E. tarda* 适应环境和宿主的生存机制奠定了基础。

关键词: 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*); *fosmid* 文库; *opp* 基因簇

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0013-07

细菌的寡肽透过酶 (Oligopeptide permease, Opp) 输送系统负责从环境中摄取和运送寡肽营养物质进入细菌细胞内^[1]。*opp* 基因簇由 *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* 和 *oppF* 5 个基因组成, 其编码产物形成跨膜通道, 主要负责输送 3~5 个氨基酸的小肽, 属于 ABC 输送机 (ATP binding cassette transporter) 家族, 在革兰氏阳性菌和阴性菌中均有发现^[1]。Opp 不仅为细菌生长提供碳源和氮源^[2], 而且参与基因表达、趋化性、孢子形成、接合介导的 DNA 转移、感受态发生、密度感应系统和细菌毒力等方面的调控^[3-7]。

迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 可以感染鱼类、两栖类、爬行类和包括人在内的哺乳动物^[8]。由 *E. tarda* 引起的爱德华氏菌病是养殖鱼类的重要疾病, 对我国的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 养殖构成严重危害^[8]。已经报道很多毒力因子参与了 *E. tarda* 的致病作用, 如, *E. tarda* 具有黏附、侵入上皮细胞并在上皮细胞繁殖的能力^[9], 抵御宿主血清和巨噬细胞介导的杀伤能力^[10], 产生溶血素和过氧化氢酶等胞外毒素的能力^[11, 12]。最近, 有报道认为 III 型分泌系统和 VI 型分泌系统也参与了 *E. tarda* 的致病作用^[13, 14]。一般情况下, *E. tarda* 可以生活在寡营养的海水和淡水环境, 在适宜的条件下侵入宿主并在

宿主体内生存。因此, 了解 *E. tarda* 的营养输送机制, 对揭示该菌在水环境中的生存机制具有重要的意义, 也有助于了解该菌的致病机制。目前, *E. tarda* Opp 输送系统的研究尚未见报道。作者报道了从 *E. tarda* *fosmid* 文库克隆 *opp* 基因簇的工作, 为进一步研究 *E. tarda* 的寡肽营养摄取机制奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

E. tarda LSE40 由本实验室从发病大菱鲆中分离和保存, 用胰大豆蛋白胨肉汤 (TSB) 28℃ 振荡培养。*Fosmid* 文库末端测序由杭州华大基因研究中心完成, 其他测序由上海博尚完成。

1.2 Fosmid 文库构建

Fosmid 文库构建按照 CopyControlTM *Fosmid*

收稿日期: 2008-03-20; 修回日期: 2008-04-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA100310); 国家重点基础研究发展计划项目 (2006CB101803); 国家海洋局 908 专项项目 (908 01ZH3); 国家自然科学基金项目 (30671613)

作者简介: 杨佳银 (1982), 男, 河南虞城人, 硕士, 从事海洋微生物与水产动物病害研究, E-mail: yangjiayin@gmail.com; 莫照兰, 通讯作者, 电话: 0532-82898561, E-mail: zhlm0@m.s.qdio.ac.cn

Library Production Kit(Epicentre) 进行。具体步骤为: *E. tarda* LSE40 置于 TSB 培养基 28 °C 过夜振荡培养, CTAB/NaCl 法提取细菌基因组 DNA^[15], 脉冲场电泳分离, 回收 48.5~63.5 kb 片段 DNA, 按照试剂盒方法进行末端修饰、连接、包装和筛选。获得文库送交杭州华大基因研究中心进行末端测序。

1.3 opp 基因簇克隆

E. tarda 与同属细菌鲶鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 基因组序列相似性很高, 而 *E. ictaluri* 的全基因组序列测定正在进行 (http://microgen.ouhsc.edu/e_ictal/e_ictal_home.htm)。通过与 *E. ictaluri* 基因组初步组装序列(2007年10月5日数据)进行比对, 发现从 *E. tarda* fosmid 文库得到的序列 070802-4p 和 2 个 fosmid 克隆 (p16-G09

和 p5-D08) 可以定位到 *E. ictaluri* contig 76 上(图 1)。根据 *E. ictaluri* contig 76 的限制性酶切位点信息, 以 *SacI* 和 *BamHI* 消化 p16-G09 质粒 DNA, 回收 1.8 kb 左右的片段连接至 pUCm-T(上海生工)进行序列测定。根据所得序列和 070802-4p 设计引物 oppAB-F (5'-GAA GT GA CCG AT GT GA ACCG-3') 和 oppAB-R (5'-GCGGTGCGGATAAAGT-TAGAGT-3') 扩增 oppAB 的部分序列, 根据 p5-D08 和 p16-G09 的末段序列设计引物 oppDF-F (5'-CGGTAAGGTGGACTCGGTGAT-3') 和 oppDF-R (5'-GCCAAGCGGGTATTGAGG-3') 扩增 oppC-DF 的部分序列, 所得 PCR 产物连接到 pUCm-T 进行序列测定。将得到的序列进行比对、拼接, 得到 *E. tarda* 的 opp 基因簇。

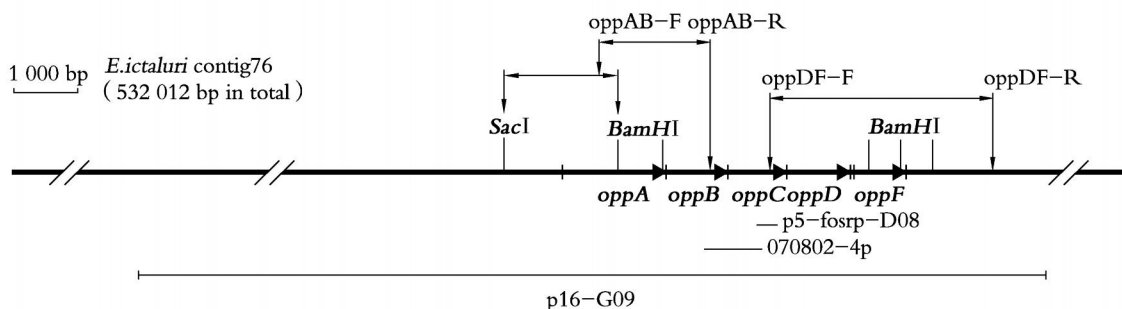


图 1 opp 基因簇全长克隆策略

Fig. 1 Cloning strategy of opp gene cluster

E. tarda LSE40 070802-4p 及 fosmid 克隆 p16-G09、p5-D08 定位于 *E. ictaluri* contig76(简称 contig76)的物理图谱。Contig76 全长 532 012 bp, oppA-F 为预测的 *E. ictaluri* opp 基因簇位置; *SacI*, *BamHI* 均为 contig76 上的酶切位点; oppAB F/R, oppDF-F/R 均为对应位置的引物名称 Physical mapping of sequence of 070802-4p and the fosmid clone p16-G09 and p5-D08 of *E. tarda* LSE40 on the *E. ictaluri* contig76 (ab. contig76). Contig76 has a total length of 532 012 bp, oppA-F shows the predicted position of opp gene cluster of *E. ictaluri* in contig76; Both *SacI* and *BamHI* indicate the restriction enzyme sites on contig76; oppAB F/R and oppDF-F/R are primers indicated in the corresponding positions

1.4 生物信息学分析

核酸及氨基酸序列比对采用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; <http://blast.genome.jp/>); ORF 确定采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>); 蛋白预测及氨基酸组成分析采用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>); 核酸二级结构预测采用 Oligo6 (www.olygo.net/olygo.htm); 蛋白质结构功能域分析采用 Motif Scan (http://myhits.isr.sib.ch/cgi-bin/motif_scan); 蛋白质跨膜预测采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 启动子预测采用 BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); 系统

进化分析由 Clustalx 和 Mega 4.0 (www.megasoftware.net) 完成。

2 结果及讨论

2.1 opp 基因簇克隆

从 *E. tarda* fosmid 文库得到 925 bp 的序列 070802-4p, 经 Blast 发现与克雷白氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 的 oppB 和 oppC 相似性很高, 由此以 070802-4p 作为定位 opp 基因簇的标签。与已经公布的 *E. ictaluri* contigs 核酸序列进行比对, 发现 070802-4p 定位在 *E. ictaluri* contig76 上。进一步以 *E. ictaluri* contig76 的序列为标签, 发现 *E. tarda* LSE40 fosmid 克隆 p16-G09 和 p5-D08 也可以定位在 *E. ictaluri* contig76 上。根据上述分析结果, 得到

E. tarda LSE40 fosmid 克隆对应于 *E. ictaluri* contig76 的物理图谱(图 1)。推测 p16-G09 克隆含有 *E. tarda* LSE40 的 *opp* 基因簇序列, 070802-4p 含有 *oppB-C* 部分序列, 而 p5-fosrp_D08(p5-D08 的末端序列) 含有部分 *oppC* 序列。

为了获得 *opp* 基因簇全序列, 作者设计了如下实验: 首先以 p5-D08 和 p16-G09 的末段序列为上下游序列, 设计引物对 oppDF-F 和 oppDF-R 进行 PCR, 得到 3.82 kb 的 DNA 片段, 测序证明该片段含有 *oppD* 和 *oppF* 的全基因序列以及 *oppC* 3' 端的 520 bp 序列。然后根据 *E. ictaluri* contigs 76 的限制性酶切位点信息, *SacI* 和 *BamHI* 消化的 1.8 kb 左右的 DNA 片段含有包括起始密码子 ATG 在内的 *oppA* 的部分序列。因此, 以 *SacI* 和 *BamHI* 消化 p16-G09 克隆的质粒 DNA, 回收目的 DNA 片段并测序, 序列测定和比对分析证实所得片段含有 *oppA* 5' 端的 884 bp 序列。最后根据所得到的 *oppA* 的部分序列以及 070802-4p 的序列, 设计引物 oppAB-F 和 oppAB-R 进行 PCR, 得到 1574 bp 的序列, 该序列包括了 *oppA* 3' 端的 870 bp 和 *oppB* 5' 端的 626 bp 序列。将上述获得的片段序列进行比对、

拼接, 获得了 *E. tarda* LSE40 的 *opp* 基因簇序列 *oppA-BCDF*, Genbank 登录号 EU 414840。

2.2 *opp* 基因簇序列分析

作者从 *E. tarda* LSE40 基因组得到序列长度为 8 001 bp 的核酸片段, 该片段包括了 *opp* 基因簇的 6 741 bp(图 2), 以及基因簇的 5' 端旁侧序列 194 bp 和 3' 端旁侧序列 1 066 bp。*E. tarda* LSE40 *opp* 基因簇含有 5 个 ORF, 依次编码 OppA-B-C-D-F(图 2), 基因排列顺序与鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) 等菌一致^[16,17]。氨基酸序列分析表明该基因簇编码的各个蛋白与 *E. ictaluri* 高度相似, 相似性在 96%~98%; 与其他种属的革兰氏阴性菌也具有较高的相似性, 比如与 *Escherichia coli* 的相似性在 71%~89%; 而与革兰氏阳性菌的相似性较低, 比如与变异链球菌(*Streptococcus mutans*) 的相似性在 27%~53%(表 1)。同为输送机结构组分, OppD 和 OppF 的保守性要比 OppB 和 OppC 高。

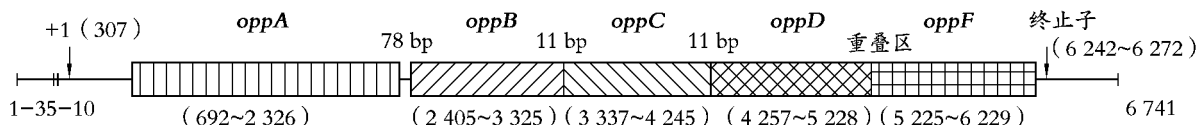


图 2 *E. tarda* LSE40 *opp* 基因簇遗传结构

Fig. 2 Genetic organization of the *opp* gene cluster of *E. tarda*

opp 基因簇全长 6 741 bp, 图示转录起始位点(+ 1)、- 10 区、- 35 区、*oppA-F*、终止子(Terminator)及 *opp* 各基因间间隔区。The *opp* gene cluster has a total length of 6 741 bp. Fig. 2 shows the transcriptional start site, possible promoters (- 10 and - 35), *oppA-F* and terminator of *opp*, as well as the spacer regions between the adjacent genes of *opp*

OppA 为底物结合蛋白, 负责捕获寡肽或作为细胞膜表面受体, 在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞中的位置不同。革兰氏阳性菌的 OppA 一般通过 N 末端锚定在细菌细胞膜中, 而革兰氏阴性菌的 OppA 一般位于细胞周质^[1]。*E. tarda* LSE40 的 OppA 由 544 个氨基酸组成, 预测分子质量大小为 61.3 ku。与 *E. ictaluri* OppA 有 96% 的相似性, 与 *S. typhimurium* 和 *E. coli* 的 OppA 分别有 73% 和 71% 的相似性(表 1)。Motif Scan 发现 OppA 在 82-465aa 具有高度保守的 SBP_bac_5 (Bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle, PF00496) 结构域, 该结构域在其他革兰氏阴性菌的 OppA 中普遍存在。SBP_bac_5 结合二肽和寡肽类溶质并通过与某些膜整合蛋白作用转运它们^[18], 是 ABC 输送机结合蛋白的一般特征。

E. tarda LSE40 OppB 和 OppC 分别由 306 和 302 个氨基酸组成, 与 *E. ictaluri* 的相似性均为 98%, 与 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 的相似性分别为 89% 和 74%, 87% 和 73%(表 1)。TMHMM 和 SMART 预测 OppB 和 OppC 均为六次跨膜蛋白且 N 末端和 C 末端位于细胞膜内。Motif Scan 发现 OppB(94-306aa) 和 OppC(101-302aa) 都具有 BPD_transp_1 (Binding-protein dependent transport system inner membrane component, PF00528) 结构域, 该结构域是某些膜整合蛋白的保守结构域, 其功能是转运底物通过细胞膜。在 *S. typhimurium* 和 *E. coli* 中, OppB 和 OppC 共同形成寡肽运输通道^[19]。

E. tarda LSE40 OppD 和 OppF 分别由 323 和 334 个氨基酸组成, 彼此之间有 41% 的相似性, 在 *V. fluvialis* 中也有类似特征^[16]。OppD 的 42~

49aa 和 155~ 169aa, OppF 的 57~ 64aa 和 165~ 179aa 分别具有 ABC 输送机成员特征性的 ATP 酶结构域, 具有该结构域蛋白一般具有 ATP 酶活性, 水解 ATP 提供能量。另外, OppD 和 OppF 分别

在 234~ 298aa 和 244~ 311aa 具有 oligo_HPY(Oligopeptide/ dipeptide transporter, C-terminal region, PF08352) 结构域, 该保守区域为 ABC 输送机成员的特征区域⁷¹。

表 1 Opp 氨基酸组成及相似性比较

Tab. 1 Amino acid composition and identity percentages of Opp between various bacteria

菌株	氨基酸序列(相似性, %)				
	OppA	OppB	OppC	OppD	OppF
<i>E. tarda</i>	544aa	306aa	302aa	323aa	334aa
<i>E. ictaluri</i>	544aa (96%)	306aa (98%)	302aa (98%)	324aa (97%)	334aa (97%)
<i>E. coli</i>	543aa (71%)	306aa (89%)	302aa (74%)	337aa (87%)	334aa (85%)
<i>S. typhimurium</i>	543aa (73%)	306aa (87%)	302aa (73%)	335aa (87%)	334aa (87%)
<i>V. fluvialis</i>	543aa (56%)	306aa (66%)	300aa (69%)	324aa (78%)	306aa (73%)
<i>S. mutans</i>	549aa (27%)	304aa (37%)	343aa (34%)	350aa (48%)	308aa (53%)
<i>S. aureus</i>	551aa (29%)	308aa (44%)	356aa (29%)	360aa (51%)	326aa (49%)

序列来源(Genbank 登录号): *E. coli*, NC_000913(genome); *S. typhimurium* NC_003197(genome); *V. fluvialis* OppA-F, AAT84261~AAT84265; *S. mutans*, NC_004350(genome); *S. aureus*, NC_007793(genome); *E. ictaluri* Opp 氨基酸序列由 contig76 中 *oppA B C D F* 核酸序列翻译得来

Genbank accession number of related sequences: *E. coli*, NC_000913(genome); *S. typhimurium* NC_003197(genome); *V. fluvialis* OppA-F, AAT84261~ AAT84265; *S. mutans*, NC_004350(genome); *S. aureus*, NC_007793(genome); the amino acid sequences of Opp of *E. ictaluri* were translated from *oppA B C D F* of contig76

2.3 opp 基因簇非编码区

以 BDGP 对 *E. tarda* LSE40 的 *opp* 基因簇进行启动子预测, 得到转录起点位于 *oppA* 翻译起始密码子 ATG 上游 385 bp 处, 在该转录起点的- 35 和- 10 区分别有 TAGACA 和 TATATT 两个特征性启动子序列(图 3), 推测的核糖体结合位点(SD 序

列) 位于 *oppA* 上游 10 bp 处。作者根据序列推测的启动子是否真正为 *opp* 基因簇的启动子需验证。*V. fluvialis opp* 基因簇的转录起始位点位于 *oppA* 翻译起始位点上游的 331 bp 处^[6], 与本实验结果基本吻合。

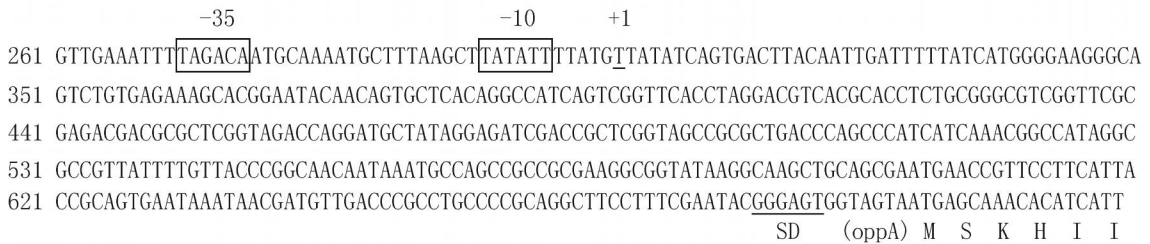


图 3 *E. tarda* LSE40 *opp* 启动子预测

Fig. 3 Promoter prediction of *opp* operon of *E. tarda* LSE40

E. tarda LSE40 的 *oppA* 和 *oppB* 之间有 78 bp 的间隔区。*oppA* 终止密码子后 12~ 34 bp 处, 长度为 23 bp 的序列可以形成茎环结构(- 64.9 kJ/mol)。在 *L. monocytogenes*^[17], 化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)^[20] 的 *oppA* 终止密码子后也存在类似的茎环结构。第二处茎环结构(- 92.5 kJ/mol) 位于

oppF 终止密码子后 13~ 42 bp, 该茎环结构与其他细菌 *opp* 基因簇转录的终止子一致^[17]。在 *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* 和 *S. pyogenes* 中, 已经发现 *oppA B C D F* 基因簇的基因以操纵子方式一起进行转录, 但是 *oppA* 也可以单独转录, 并且单独转录方式占主要地位^[17, 20]。或许通过这种方式

可以提高 OppA 丰度满足细菌的需要, 有实验证实当培养基营养丰富时, OppA 表达明显增加^[21]。因此作者分析, 和上述细菌一样, 在 *E. tarda* LSE40 *opp* 基因簇发现的第一茎环结构可能是 *oppA* 单独转录的终止子, 而第二茎环结构则是 *opp* 基因簇的转录终止子。

oppB 和 *oppC*, *oppC* 和 *oppD* 之间的间隔区均为 11 bp, *oppD* 和 *oppF* 之间有 4 个碱基的重叠(图 2), 这些结构特征和其他菌如 *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* 等基本一致^[17]。

2.4 基于 OppA 保守结构域的进化地位分析

已经报道细菌有 3 种肽输送系统, 分别为二肽透过酶 (Dpp)、三肽透过酶 (Tpp) 和寡肽透过酶 (Opp) 系统^[16]。在 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 中 Dpp 和 Opp 的基因序列和功能高度相似, 均由一个肽结合蛋白(DppA 或 OppA)、两个穿膜蛋白(DppB-C 或 OppB-C)、两个 ATP 结合蛋白(DppD-F 或 OppD-F) 组成^[1]。DppA 主要结合 2 个氨基酸的小肽, 而 OppA 可以结合 3~ 5 个氨基酸的小肽。目前, 在

革兰氏阴性细菌只发现一个拷贝的 OppA, 而在一些革兰氏阳性细菌, 发现了 2~ 5 种拷贝的 OppA^[2, 21] 和一套以上的 Opp 系统^[22]。OppA 直系同源(orthologue)蛋白具有保守的 SBP_bac_5 结构域, 但在不同种属细菌中又具有一定程度的变化, 因此可以用来分析细菌的进化地位。为了确定 *E. tarda* LSE40 OppA 的进化地位, 作者从 GenBank 获取了 13 种细菌的 OppA SBP_bac_5 结构域序列。以 Mega4.0 软件进行聚类, 用 Neighbor-Joining 方法构建系统发生树。如图 4 显示, 系统发生树明显分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两个分支。在革兰氏阴性菌分支中, *E. tarda* LSE40 首先与 *E. ictaluri* 聚类, 然后依次与其他肠杆菌、弧菌、螺旋体聚类。从结果可以看出, *E. tarda* 和 *E. ictaluri* 的亲缘关系最近, 该结果与两者的 *opp* 基因簇序列高度相似的结果一致。因此, 作者认为 OppA 的 SBP_bac_5 保守结构域可以用来进行细菌分类地位和进化地位的分析。

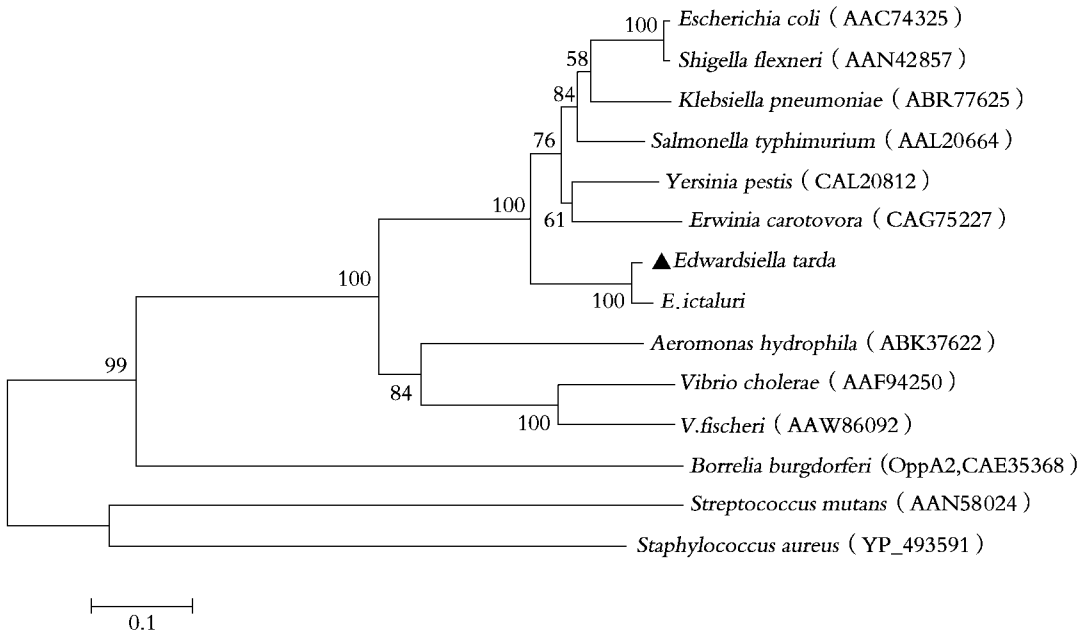


图 4 OppA 保守结构域 SBP_bac_5 系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of SBP_bac_5 domain of OppA

采用 Neighbor Joining 法构建进化树, Bootstrap 检验设定 1 000 个重复。各序列 GenBank 登录号标于菌种名称后。 *E. ictaluri* OppA 序列由核酸序列翻译得到

A phylogenetic tree was constructed using the Neighbor Joining method; the reliability of each branch was tested by 1 000 bootstrap replications. Sequences used in this phylogenetic tree could be obtained according to the Genbank accession number behind the bacteria name. The sequence of *E. ictaluri* OppA was translated from *oppA* on *E. ictaluri* contig76

3 结论

Opp 属于 ABC 输送系统家族成员。ABC 输送系统是细菌中最大的旁系同源蛋白质家族之一, 占据细菌 5% 的基因组, 控制着必需营养物质进出细胞^[23]。根据本实验室的前期工作, 从 *E. tarda* LSE40 fosmid 文库随机获取的 1 962 个末端序列, 与 ABC 输送系统相关的序列高达 8.09% (未发表资料), 由此可见 ABC 输送器对 *E. tarda* 有着重要的生物学功能。作为 ABC 家族的成员, 许多研究表明细菌的 Opp 具有多种生物功能^[3-7]。本研究得到的 *E. tarda opp* 基因簇, 为了解 *E. tarda* 在自然环境的生存机制以及与宿主的作用机制打下了基础。

参考文献:

- [1] Detmers F J M, Lanfermeijer F C, Poolman B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters [J]. **Res Microbiol**, 2001, **152**(3): 245-258.
- [2] Orchard S S, Goodrich Blair H. Identification and functional characterization of a *Xenorhabdus nematophila* oligopeptide permease [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, **70**(9): 5 621-5 627.
- [3] Gominet M, Slamti L, Gilois N, et al. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis pleR* regulon and for virulence [J]. **Mol Microbiol**, 2001, **40**(4): 963-975.
- [4] Solomon J, Su L, Shyn S, et al. Isolation and characterization of Mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport [J]. **J Bacteriol**, 2003, **185**(21): 6 425-6 433.
- [5] Leonard B A, Podbielski A, Hedberg P J, et al. *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation [J]. **Proc Natl Acad Sci US A**, 1996, **93**(1): 260-264.
- [6] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria [J]. **Annu Rev Microbiol**, 2001, **55**(1): 165-199.
- [7] Cundell D R, Pearce B J, Sandros J, et al. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells [J]. **Infect Immun**, 1995, **63**(7): 2 493-2 498.
- [8] 王波, 莫照兰. 迟缓爱德华氏菌及其致病机理 [A]. 中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊 [C]. 北京: 科学出版社, 2007. 48: 133-139.
- [9] 欧阳志明, 陈怀青, 陆承平. 迟缓爱德华氏菌的粘附特性 [J]. 南京农业大学学报, 1997, **20**(3): 87-91.
- [10] Ling S H M, Wang X H, Xie L, et al., Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in vivo and in vitro fish models [J]. **Soc General Microbiol**, 2000, **146**: 7-19.
- [11] Chen J D, Huang S L. Hemolysin from *Edwardsiella tarda* strain ET16 isolated from eel *Anguilla japonica* 2 identified as a hole forming toxin [J]. **Fish Sci**, 1996, **62**: 538-542.
- [12] Srinivasa Rao P S, Yamada Y, Leung K Y, A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte mediated killing in *Edwardsiella tarda* [J]. **Soc General Microbiol**, 2003, **149**(9): 2 635-2 644.
- [13] Tan Y P, Zheng J, Tung S L, et al. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence [J]. **Microbiology**, 2005, **151**(7): 2 301-2 313.
- [14] Zheng J, Leung K Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda* [J]. **Mol Microbiol**, 2007, **66**(5): 1 192-1 206.
- [15] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 (中译版) [M], 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 39-39.
- [16] Lee E M, Ahn S H, Park J H, et al. Identification of oligopeptide permease (*opp*) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2004, **240**(1): 21-30.
- [17] Borezee E, Pellegrini E, Berche P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival [J]. **Infect Immun**, 2000, **68**(12): 7 069.
- [18] Cho W J, Yoon W J, Moon C H, et al. Molecular cloning of a novel chaperone like protein induced by rabdovirus infection with sequence similarity to the bacterial extracellular solute binding protein family 5 [J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(44): 41 489-41 496.
- [19] Pearce S, Mimmack M L, Gallagher M P, et al. Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium* [J]. **Mol Microbiol**, 1992, **6**(1): 47-57.
- [20] Podbielski A, Pohl B, Woischnik M, et al. Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (Opp) and its effect on cysteine protease production [J]. **Mol Microbiol**, 1996, **21**(5): 1 087-1 099.
- [21] Wang X G, Lin B, Kidder J M, et al. Effects of environmental changes on expression of the oligopeptide permease (*opp*) genes of *Borrelia burgdorferi* [J]. **J Bacteriol**, 2002, **184**(22): 6 198-6 206.
- [22] Diep B A, Gill S R, Chang R F, et al. Complete ge-

nome sequence of USA300, an epidemic clone of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. **Lancet**, 2006, **367**(9512): 731-739.

[23] Higgins C F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism: an overview [J]. **Res Microbiol**, 2001, **152**(3-4): 205-210.

Cloning the Oligopeptide Permease (*opp*) gene cluster from *Edwardsiella tarda* fosmid library

YANG Jia-yin^{1, 2}, MO Zhao-lan¹, MAO Yun-xiang³, Li Jie³, YE Xu-hong³, WANG Bo^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar., 20, 2008

Key words: *Edwardsiella tarda*; fosmid library; *opp* gene cluster

Abstract: The Oligopeptide Permease (*opp*) gene cluster was cloned from fosmid library of *Edwardsiella tarda* LSE40. The obtained *opp* gene cluster spanned 6 741 bp which contains five ORFs encoding five putative proteins, OppA, OppB, OppC, OppD and OppF, respectively. A putative transcriptional start site locates 385 bp upstream from the *oppA* start codon, and there are TATATT and TAGACA sequences at positions - 10 and - 35 from the transcriptional start site, respectively. Two potential stem-loop structures located in the spacer region between *oppA* and *oppB*, and at downstream of *oppF*, are presumed as the terminators of *oppA* and *opp*, respectively. Opp of *E. tarda* showed 96% ~ 98% identities with *E. ictaluri*, 56% ~ 89% identities with other gram negative bacteria and 27% ~ 53% identities with gram positive bacteria. Phylogenetic tree was constructed based on the OppA conserved domain SBP_bac_5. The results showed that *E. tarda* LSE40 is most closely related to *E. ictaluri*, closely related to other Enterobacteriaceae bacteria, and less related to gram positive bacteria, suggesting domain SBP_bac_5 of OppA can be used as a molecular marker in the bacterial identification. The obtained *opp* lays the foundation for studying the survival mechanisms that how *E. tarda* adapts to the environment and the host.

(本文编辑: 张培新)