

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

张翠娟¹, 于宙亮¹, 田莉瑛², 赵宝华¹

1 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

2 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026

摘要: 根据嗜水气单胞菌溶血素保护性抗原基因序列(GenBank Accession No. AF539467)设计一对引物, 以嗜水气单胞菌河北分离株基因组为模板, 经 PCR 扩增得到 *hly* 基因。序列分析表明, 该基因产物大小为 1485 bp, 经测序与 GenBank 报道的多个嗜水气单胞菌 *hly* 基因序列一致性高于 99%。将得到的 *hly* 基因定向克隆到原核表达载体 pET-28a 中构建原核重组质粒 pET-28a-*hly*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)中, 得到重组菌株 BL21(DE3)(pET-28a-*hly*), 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析可见一条 56 kD 的特异条带。Western blotting 分析结果显示表达的 Hly 蛋白能与抗体发生特异性结合, 说明其具有较好的免疫原性。将表达的溶血素蛋白制成类毒素疫苗免疫小鼠后, 具有较高的保护效力, 表明该类毒素疫苗有望作为预防由嗜水气单胞菌引起疾病的基因工程类毒素疫苗。

关键词: 嗜水气单胞菌, 溶血素, 类毒素, 免疫原性

Cloning and expression of a hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* and the immunogenicity of the toxoid

Cuijuan Zhang¹, Zhouliang Yu¹, Liying Tian², and Baohua Zhao¹

1 College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 Hebei Chemical Engineering and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China

Abstract: According to the GenBank sequences (GenBank Accession No. AF539467), one pair of primers was designed to amplify *hly* gene of *Aeromonas hydrophila* by PCR. After sequencing, homology analysis indicated that a DNA fragment of 1485 bp was amplified from isolated DNA from *Aeromonas hydrophila*, and it shared more than 99% homology in nucleotide sequence compared with other reference strains in GenBank. The gene was cloned in pET-28a vector to construct a recombinant plasmid pET-28a-*hly*, which was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the recombinant strain BL21(DE3)(pET-28a-*hly*) was obtained. The hemolysin was highly expressed when the recombinant strain BL21 (DE3) (pET-28a-*hly*) was induced by IPTG. The expressed protein was 56 kD as estimated by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The immunogenicity of the expressed Hly protein was confirmed by Western blotting. Mice were immunized with inactivated whole bacteria vaccine and the genetic engineering vaccines showing promise that all these vaccines have a high protective ability. The results showed that the recombinant strain BL21 (DE3)(pET-28a-*hly*) could be candidate of hemolysin toxoid vaccine to provide protective immunity against diseases caused by *Aeromonas hydrophila*.

Received: August 27, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, China (No. 2004000154).

Corresponding author: Baohua Zhao. Tel: +86-311-86268437; Fax: +86-311-86268313; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

河北省自然科学基金项目(No. 2004000154)资助。

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, hemolysin, toxoid, immunogenicity

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是兼性厌氧的革兰氏阴性短杆菌,在自然界尤其是水中广泛分布,是一种典型的人-兽-鱼共患病原菌^[1]。嗜水气单胞菌是养殖鱼类暴发性疾病的主要病原,可引起淡水鱼类、蛙类、鳖类及多种哺乳动物的感染病症,甚至可以导致人类的腹泻、胰腺脓肿^[2],引起人的败血症、脑膜炎、肠炎、脓毒症、坏死性筋膜炎^[3]、肺炎^[4,5]。嗜水气单胞菌可产生多种致病因子,包括气溶素(Aerolysin)、溶血素(Hemolysin)、溶血毒素(Hemolytic toxin)、细胞毒性肠毒素(Cytolyticenterotoxin)、胞外蛋白酶(Extracellular protease)等^[6],外膜蛋白作为嗜水气单胞菌重要的黏附因子和保护性抗原,与细菌的毒力也密切相关^[7]。嗜水气单胞菌的致病因子繁多复杂,它们对机体发挥毒性作用时也不是单个因子独立作用,而是相互协同作用于机体的^[8]。

目前对于嗜水气单胞菌引起疾病的防治主要依赖于抗生素,虽然有一定效果,但是并不能从根本上控制该病,而且极易引起耐药性,造成体内、河水的药物残留等环境污染问题。随着鱼用疫苗的大力发展,由该菌引起的疾病可以通过免疫疫苗的方法获得很好的控制,但现有的疫苗主要是全菌灭活疫苗,虽然其针对性较强,但特异性抗原含量少,不能产生足够的母源抗体,免疫效果差,因此构建基因工程疫苗^[9]来防治嗜水气单胞菌引起的疾病具有重要的意义。为了制备高保护效力的基因工程类毒素疫苗,本实验扩增得到了溶血素毒素保护性抗原基因,并在大肠杆菌中得到了高效表达,又对其免疫原性进行了初步研究,为今后进一步研制预防嗜水气单胞菌引起疾病的基因工程类毒素疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体

所用嗜水气单胞菌分离自患病牙鲈鱼,由本实验室分离保存。原核克隆载体 pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pET-28a,受体菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)和 *Escherichia coli* DH5 α 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂及工具酶

Taq 酶与限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III 等工具酶均购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.3 分子生物学操作

细菌基因组 DNA 提取、PCR、质粒提取、基因克隆表达等操作参照《分子克隆实验指南》^[10]或依照试剂盒说明书进行。

1.4 嗜水气单胞菌 *hly* 基因的克隆及序列分析

根据 GenBank 报道的嗜水气单胞菌 *Hly* 毒素基因全长序列,设计扩增嗜水气单胞菌分离株 *hly*(*hemolysin*)基因的上下游引物, P1: 5'-CCA TGG TGA AAA AAC TAA AAA TAA CTG-3', P2: 5'-AAG CTT TTA TTG ATT GGC AAC TGG CGT C-3',引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,使用之前用灭菌蒸馏水将浓度稀释至 20 pmol/ μ L。以 CTAB 法^[10]提取的嗜水气单胞菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应在 25 μ L 体系中进行,扩增条件为: 94°C 5 min, 然后 94°C 1.5 min、56°C 1 min、72°C 1.5 min, 进行 30 个循环后, 72°C 再延伸 10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 连接到 pMD19-T Simple Vector, 然后转化至 *E. coli* DH5 α 。通过 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白斑法筛选, 并用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。用 DNASTar 软件对测序结果进行序列分析, 并进行同源性比较。

1.5 重组表达质粒 pET-28a-*hly* 的构建及表达

1.5.1 重组表达质粒 pET-28a-*hly* 的构建

将阳性重组克隆质粒与表达载体 pET-28a 分别以 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切后连接构建重组表达质粒 pET-28a-*hly*, 并转化至 *E. coli* BL21, Kan 抗性筛选阳性克隆, 并用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

1.5.2 重组菌株的诱导表达

将重组菌株活化后以 1%的接种量接入 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养至 $OD_{600}=0.6\sim 0.8$, 再加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导, 5 h 后收集菌体, 同时以不加 IPTG 诱导的重组菌及空载体 pET-28a 转化菌分别作为阴性及空白对照, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.5.3 表达产物在大肠杆菌细胞中的分布

取诱导的菌液 5 mL, 离心收集菌体, 弃上清, 称重湿重后按 1 g : 3 mL 加入 STE (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 重悬。将重悬液在超声波下破碎, 破碎 8 s, 间歇 8 s, 总时长 10 min。破碎结束后细胞裂解物 4°C 高速离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 沉淀重悬于 9 体积的 STET (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 8.0) 中, 室温放置 5 min, 再次 4°C 高速离心 15 min, 弃上清后用 200 μ L TE 重悬。取超声破碎获得的上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 确定表达产物在大肠杆菌细胞中的分布^[10]。

1.5.4 表达产物的 Western blotting 分析

将诱导后的重组菌和粗提包涵体经 SDS-PAGE 分析后转印 PVDF 膜, 100 V 转印 1.5 h 后, 以鼠抗 Hly 蛋白高免血清为一抗, HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blotting 分析, 具体操作方法参照文献[10]。

1.6 疫苗的制备及其免疫原性分析

1.6.1 嗜水气单胞菌灭活疫苗的制备

将嗜水气单胞菌分离株活化, 以 1% 接种量接种于 50 mL LB 液体培养基中, 28°C、160 r/min 振荡培养过夜并采用活菌计数法计算菌数。向菌液中加入甲醛至终浓度 0.4%, 于 28°C 条件下灭活过夜, 其间振荡 2~3 次。将灭活过的菌液检测无菌后, 离心收集菌体, 所得菌体用 0.9% 生理盐水洗涤 2 次后重悬至终浓度 1.5×10^9 CFU/mL, 并按照 1 : 1 的比例与福氏不完全佐剂混合备用。

1.6.2 重组菌株灭活基因工程类毒素疫苗的制备

按 1.5.2 中方法诱导 100 mL 重组菌, 取 50 mL 诱导菌液, 采用 1.6.1 中的方法灭活菌液并洗涤菌体, 用 5 mL 0.9% 生理盐水重悬, 并按照 1 : 1 的比例与福氏不完全佐剂混合备用。

1.6.3 重组菌株包涵体疫苗的制备

取余下的 50 mL 诱导菌液, 离心收集菌体, 弃上清, 加入 10 mL 0.9% 生理盐水重悬菌体。按 1.5.3 中方法将重悬液在超声波下破碎后高速离心, 收集沉淀并用 0.9% 生理盐水洗涤 2 次, 再次高速离心弃上清后用 5 mL 0.9% 生理盐水重悬, 并按照 1 : 1 的比例与福氏不完全佐剂混合备用。

1.6.4 疫苗的安全性测定

取 3 种疫苗分别接种 5 只小鼠, 每只腹腔接种 0.2 mL, 对照组腹腔注射 0.2 mL 0.9% 生理盐水, 观察 14 d, 记录小鼠存活情况。

1.6.5 动物免疫实验

选取雌性健康昆明系小鼠 50 只, 平均体重为 18 g, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 进行腹腔注射: 第 1 组注射 0.2 mL 嗜水气单胞菌灭活疫苗; 第 2 组注射 0.2 mL 重组菌灭活基因工程类毒素疫苗; 第 3 组注射 0.2 mL 重组菌包涵体灭活疫苗; 第 4 组注射 0.2 mL 空载体灭活疫苗; 第 5 组为对照组, 注射 0.9% 生理盐水和福氏不完全佐剂按体积比为 1 : 1 配制的混合物 0.2 mL。14 d 后采用同样剂量加强免疫 1 次。加强免疫 7 d 后用嗜水气单胞菌分离株最小致死剂量 (2×10^9 CFU/mL) 攻毒, 观察小鼠死亡情况, 判断疫苗的保护作用。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌 hly 基因的克隆及序列分析

以本实验室分离菌株的基因组 DNA 为模板, 利用设计的引物成功扩增出约 1.5 kb 的特异性片段, 其大小与预期扩增片段一致(图 1)。重组克隆质粒用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 约在 2.7 kb 和 1.5 kb 处有特异带, 与理论分子量相符(图 2)。将经过酶切鉴定后的阳性重组菌送 TaKaRa 公司进行 DNA 序列测定, 并将测序结果及其编码的氨基酸序列分别在 GenBank 上通过 BLAST 与其他基因进行序列比对, 结果表明克隆得到的 *hly* 基因及其编码的 Hly 毒素蛋白与其他多种嗜水气单胞菌 *hly* 基因及 Hly 蛋白序列一致性都达到 99%。

2.2 嗜水气单胞菌 hly 基因重组表达质粒的构建及表达

2.2.1 重组表达质粒 pET-28a-hly 的构建

用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a-*hly* 重组表达质粒, 电泳结果显示约在 5.4 kb 和 1.5 kb 处有特异条带, 与预期分子量相符, 证明重组表达质粒构建正确, 可进一步诱导表达(图 3)。

2.2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析及表达产物在大肠杆菌中的分布

对重组菌株 BL21(DE3)(pET-28a-*hly*) 进行 IPTG 诱导, 并进行 15% SDS-PAGE, 可见分子量约

为 56 kD 的目的条带，这与预期分子量一致。将诱导后菌液超声破碎后，将上清液(可溶性蛋白)和沉淀(包涵体)分别进行 SDS-PAGE 分析，结果显示表达的目的蛋白主要以包涵体的形式存在(图 4)。

2.2.3 表达产物的 Western blotting 分析

以鼠抗 Hly 蛋白高免血清为一抗，HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗，对诱导后的重组菌和粗提包涵体进行 Western blotting 分析，结果显示仅在 56 kD 处出现特异性条带，表明目的蛋白具有特异的反应原性(图 5)。

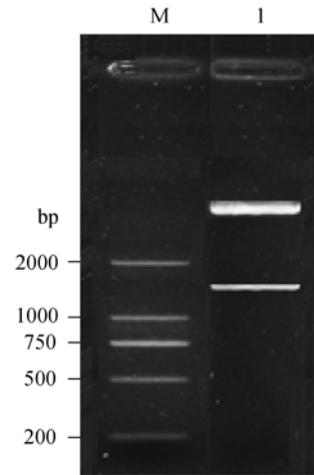


图 3 重组质粒 pET-28a-hly 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-28a-hly. 1: DNA marker DL2000; 2: pET-28a-hly/ Nco I+ Hind III.

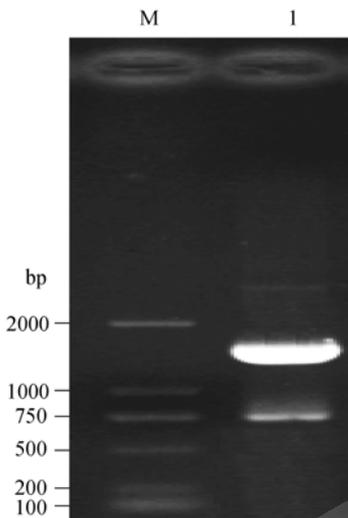


图 1 嗜水气单胞菌 hly 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of hly gene by PCR. M: DNA marker DL2000; 1: PCR amplified hly gene.

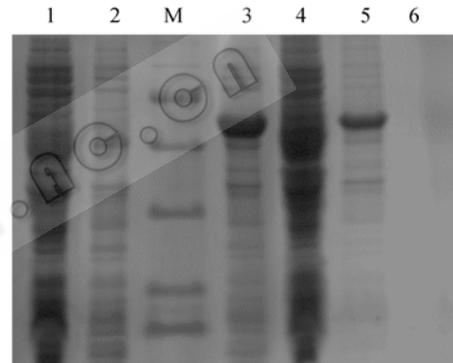


图 4 重组 Hly 蛋白的表达及其在大肠杆菌中的分布

Fig. 4 Expression of recombinant Hly protein and distribution in *E. coli*. M: molecular weight marker (97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3 kD); 1: non-recombinant BL21 *E. coli* cells without IPTG; 2: non-recombinant BL21 *E. coli* cells with 1mM IPTG; 3: recombinant BL21 *E. coli* with 1mM IPTG; 4: recombinant BL21 *E. coli* without IPTG; 5: inclusion body of expression protein; 6: soluble fraction of expression protein.

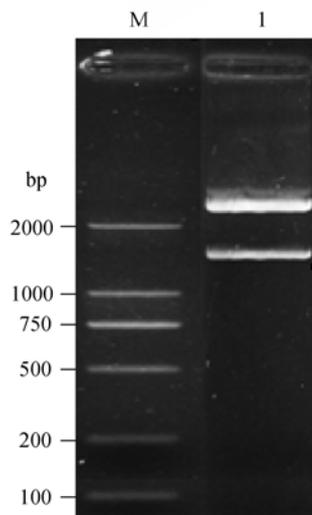


图 2 重组质粒 pMD-hly 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD-hly. M: DNA marker DL2000; 1: pMD-hly/ Nco I + Hind III.

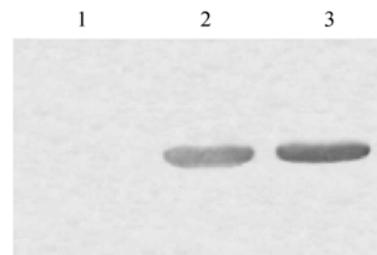


图 5 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of expressed products. 1: control of BL21 (pET-28a); 2: expressed productions of *E. coli* BL21(pET-28a-hly); 3: inclusion body of *E. coli* BL21(pET-28a-hly).

2.3 疫苗的制备及其免疫原性分析

2.3.1 疫苗安全性测定

将嗜水气单胞菌灭活疫苗、重组菌株灭活基因工程类毒素疫苗及包涵体疫苗分别腹腔注射 5 只小鼠, 14 d 后全部存活, 均无临床症状出现, 剖检无病理变化。

2.3.2 动物免疫试验

将 3 种疫苗分别和等量福氏不完全佐剂乳化, 腹腔注射每组小鼠, 各经过 2 次免疫后, 用嗜水气单胞菌分离株的最小致死剂量攻毒(表 1)。可以看出对照组 2 h 后开始死亡, 24 h 内全部死亡; 嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫组保护率为 80%, 重组菌基因工程灭活疫苗免疫组保护率为 90%, 包涵体疫苗免疫组保护率为 90%, 可见 3 种疫苗均具有一定保护效力。死亡小鼠口鼻流出液体, 表皮出现轻微出血点, 剖检发现肝脏呈暗红色、肿大、充血。

表 1 疫苗免疫保护结果测定

Table 1 The protection results of mice immune experiment

Groups	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
Died mice	2/10	1/10	1/10	10/10	10/10
Protective rate	80%	90%	90%	0	0

3 讨论

嗜水气单胞菌是一种条件致病菌, 对水产动物、禽类和人类均有致病性, 尤其该菌引起的暴发性鱼类疾病在我国普遍流行, 给水产养殖业带来巨大的经济损失。我国在全菌灭活疫苗、减毒活疫苗和菌体成分亚单位苗的制备上已取得了一定的成果, 然而由于嗜水气单胞菌血清型众多, 不同地区、不同鱼种之间分离的致病菌株存在明显差异, 以及基于鱼类水生生活和免疫应答能力较低的特殊性, 传统全菌灭活疫苗和减毒活疫苗又有自身难以解决的劣势。灭活疫苗使用剂量大, 机体的免疫应答水平较低, 腹腔注射的方法费时费力不适用于鱼类, 而使用制备好的灭活疫苗对鱼类进行一次浸泡免疫不能诱导血清抗体产生或仅能观察到很弱的免疫反应^[11,12]。弱毒疫苗存在毒力反强等原因较难控制, 不便于大量的生产且成本较高, 免疫效果并不优于全菌灭活疫苗, 对嗜水气单胞菌同源菌的保护率仅有 80%^[13]。近些年研究多针对嗜水气单胞菌的保护性抗原基因构建基因工程疫苗以及更新一代的核酸疫

苗。由于此类疫苗往往锁定某一主要致病因子或毒力蛋白, 针对性较强, 具有较好的免疫保护效果, 同时成本较低便于大量生产且没有毒性, 其自身的众多优点使该类疫苗成为目前鱼类致病菌免疫疫苗研制的重点。国内外众多学者致力于此类疫苗的研制, 对嗜水气单胞菌起到了较好的防治效果^[14,15]。基因工程疫苗及核酸疫苗仍处于试验探索阶段, 尚无商品化的疫苗投放市场, 因此开发新型疫苗以针对多种血清型菌株仍是今后防治嗜水气单胞菌引起疾病的重要研究方向。

溶血素作为气单胞菌属菌株的重要致病因子^[16,17], 在嗜水气单胞菌所致水产疾病中起到举足轻重的作用, 其作用机制尚不明确, 可能为溶血素蛋白插入到肠上皮细胞顶侧膜的离子通道中并且激活蛋白激酶 C, 从而使 Cl⁻的分泌减少^[18]。本实验获得的国内分离株溶血素基因全长序列与 GenBank 公布的序列有很高的同源性, 说明该基因在种属内比较保守。构建的原核表达载体 pET-28a-hly 在大肠杆菌中高效表达了重组毒素蛋白, 并且表达产物以包涵体形式存在。经 Western blotting 分析表明, 重组毒素蛋白具有特异的免疫原性。在此基础之上, 使用所构建的基因工程菌株制备基因工程类毒素疫苗及包涵体疫苗, 分别免疫小鼠, 保护率达 90%, 表明该重组菌株具有较高的保护效力。

本实验成功地克隆、表达了嗜水气单胞菌溶血素毒素保护性抗原基因, 构建了该基因的高效表达菌株, 其较高的保护效力使该重组菌株有望作为预防由嗜水气单胞菌引起的疾病的基因工程类毒素疫苗的候选生产菌株, 为由嗜水气单胞菌导致疾病的基因工程防治方法提供了一定实验依据, 使大规模地将溶血素基因工程类毒素疫苗应用于田间水产动物成为可能, 对嗜水气单胞菌所引起疾病的防治研究具有参考价值。

REFERENCES

- [1] Lu CP. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. *J Fish China*, 1992, 16(4): 282-288.
陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(4): 282-288.
- [2] De Gascun CF, Rajan L, O'Neill E, et al. Pancreatic abscess due to *Aeromonas hydrophila*. *J Infect*, 2007,

- 54(2): 59–60.
- [3] Monaghan SF, Anjaria D, Mohr A, *et al.* Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity. *Surg Infect*, 2008, **9**: 459–467.
- [4] Miyake M, Iga K, Izumi C, *et al.* Rapidly progressive pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* shortly after near-drowning. *Int Med*, 2000, **39**: 1128–1130.
- [5] Kao HT, Huang YC, Lin TY. Fatal bacteremic pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila* in a previously healthy child. *J Microbiol Immunol Infect*, 2003, **36**(3): 209–211.
- [6] Fivaz M, Abrami L, Tsitrin Y, *et al.* Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, **257**: 35–52.
- [7] Gryllos I, Shaw JG, Gavin R, *et al.* Role of flm locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect Immun*, 2001, **69**(1): 65–74.
- [8] Yu HB, Zhang YL, Lau YL, *et al.* Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4469–4477.
- [9] Khushiramani R, Girisha SK, Karunasagar I, *et al.* Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish. *Protein Expr Purif*, 2007, **51**(2): 303–307.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Lamers CHJ. Bath vaccination and development of immunological memory in carp. *Fish Immunol*, 1985, **231**(7): 81–86.
- [12] Lamers CHJ, de Hass MJH, van Muiswinkel WB. The reaction of the immune system of fish to vaccination: development of immunological memory in carp, following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J Fish Dis*, 1985, **8**: 253–262.
- [13] Karunasagar I, Rosalind G. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *J Fish Dis*, 1991, **14**: 413–417.
- [14] Wong H, Flower RL. Distribution of two hemolytic genes in clinical and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174**(1): 131–136.
- [15] Lorenzen E, Katja EJ. DNA vaccination of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia viral. *Aquatic Health*, 2000, **12**: 181–188.
- [16] Wang G, Clark CG, Liu C, *et al.* Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(3): 1048–1054.
- [17] Erova TE, Sha J, Horneman AJ, *et al.* Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **275**(2): 301–311.
- [18] Epple HJ, Mankertz J, Ignatius R, *et al.* *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). *Infect Immun*, 2004, **72**(8): 4848–4858.