

文章编号:1000-0615(2009)03-0410-07

溶藻弧菌溶血素基因反向 PCR 克隆及其原核表达

罗 鹏, 胡超群

(中国科学院南海海洋研究所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, 广东 广州 510301)

摘要:溶藻弧菌的胞外产物(ECP)在其致病过程中发挥重要作用,已经观察到溶藻弧菌 ECP 所致的溶血现象,关于溶藻弧菌溶血素的种类和其对溶藻弧菌的致病性贡献的报道非常稀少。利用已经报道的多种弧菌溶血素基因序列设计通用引物,检测溶血素基因在溶藻弧菌中的分布,发现 96 个菌株中有 74 株扩增出溶血素基因(*vah*)片段。对致病株 ZJ0451 的 *vah* 片段测序。根据已测得的片段序列设计引物,通过反向 PCR 扩增及后续克隆测序获得全长 *vah* 基因及部分侧翼序列。经比对证实溶藻弧菌 *vah* 与多种弧菌的 TLH 类溶血素高度相似,且其肽链 N 端有信号肽。利用 pET32a 载体构建了两种包含不同长度融合标签的 *vah* 表达载体,并均在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得可溶性表达。在 26 °C 的诱导温度下,9 h 时 *vah* 表达量达到相对最大。在原核表达系统中,*vah* 蛋白信号肽可以被切除。

关键词:溶藻弧菌;溶血素;反向 PCR;表达

中图分类号:Q 786; S 917

文献标识码:A

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)属于弧菌科、弧菌属,革兰氏阴性短杆菌,广泛分布于海洋及河口环境中^[1-2]。溶藻弧菌是海水养殖中对多种水产动物危害严重的一种病原菌^[3-4],同时也可引起人类感染^[2,5-7]。

已有的研究表明,溶藻弧菌的胞外产物(extracellular products, ECP)在其致病过程中发挥重要作用^[2,8-9]。溶藻弧菌 ECP 具有多种酶活性,目前已在其中分离纯化出丝氨酸蛋白酶,并证实了其毒性^[8-9]。尽管已经观察到溶藻弧菌 ECP 所致的溶血现象^[6,10-11],但是并没有从溶藻弧菌 ECP 中分离纯化出溶血素的报道。溶血素是弧菌病原中分布最广的一类细菌毒素,能攻击红细胞膜而引起溶血^[11-12]。不仅如此,弧菌溶血素还可作用于多种其它类型的细胞,通过引起组织损伤而增强其毒性^[13-14]。鉴于溶血素在弧菌物种中分布的广泛性及其毒性,推测溶血素很有可能在溶藻弧菌的致病过程中也扮演重要角色。然而迄今为止,关于溶藻弧菌溶血素的种类和其对溶

藻弧菌的致病性贡献的报道非常稀少。

本研究根据已报道的致病哈氏弧菌株的一种溶血素基因(GenBank no. 293430)及其它多种弧菌同源的溶血素基因序列设计通用引物,扩增出溶藻弧菌溶血素基因片段,再利用反向 PCR 技术扩增获得全长溶血素基因及部分侧翼片段,并将该基因克隆至表达载体,在大肠杆菌中获得了可溶性表达,为进一步研究其溶血作用及其对溶藻弧菌致病力的贡献打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 溶藻弧菌株及基因组 DNA 提取

溶藻弧菌环境分离株及致病株共 94 株,分离于广东、广西、海南沿海水体及海洋动物体内。APW 培养基过夜培养,以华舜细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行菌株 DNA 提取。

1.2 溶血素通用引物设计及溶血素在溶藻弧菌中分布检测

根据已经报道的多株哈氏弧菌(*Vibrio*

收稿日期:2008-03-15

修回日期:2008-09-18

资助项目:国家“九七三”计划项目(2006CB101803);国家自然科学基金(30700016)

通讯作者:胡超群, Tel: 020-89023218, E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

harveyi)、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)、弧菌(*Vibrio* sp.)溶血素基因保守序列设计通用引物。正向引物 Uvh1: 5'-CAATGGCGATTCCCCGAATCC-3'; 反向引物 Uvh2: 5'-GAGCGTTGATGTCTTGGC A-3'。PCR 程序:94 °C 4 min;94 °C 1 min, 58 °C 30 s,72 °C 1 min,共进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。1%的琼脂糖电泳检测扩增结果。

依据电泳结果,将一株致病株 ZJ0451 的阳性 PCR 扩增产物切胶回收,并递交公司(英韦创津)直接测序,获得序列 vah-S1。以 NCBI 数据库 Blastn 和 Blastx 命令搜索 vah-S1 的相似序列,对序列进行比对鉴定。

1.3 反向 PCR 扩增全长溶藻弧菌溶血素基因及部分侧翼序列

分别以限制性内切酶 *Nhe* I (Takara)、*Xba* I (Takara)、*Hae* III (Takara)对溶藻弧菌 ZJ0451 基因组 DNA 进行酶切,酶切条件见酶产品说明书。酶切后,65 °C 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(Takara)连接过夜。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 vah-S1 序列,设计反向巢式 PCR 引物。第一轮 PCR 引物: vah1F 5'-GAGTT CATCAAAGCACAAGCGA-3'; vah1R 5'-AATCA GAGCTTCAGCGTAATCC -3'。第二轮 PCR 引物: vah2F 5'- ACCTCGGCACCAGAAGAACAC-3'; vah2R: 5'-AGAAGTGACCCAAGAACCAGCT-3'。二次 PCR 反应条件均为 94 °C 4 min;94 °C 1 min, 54 °C 30 s,72 °C 3 min,共进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。二次扩增产物经琼脂糖电泳检测条带有无、特异性及大小后,确定对 *Hae* III 酶切后第二轮扩增产物进行切胶回收。回收片段连接至 pMD18-T 载体,转化 DH5 α 细胞,挑选阳性克隆递交公司测序,获得序列 vah-S2。

1.4 vah-S1、vah-S2 序列拼接、序列鉴定及溶血素基因 vah 种系发生分析

以 *Hae* III 酶切点对 vah-S2 分割,以 DNASTar 中 SeqMan 程序对 vah-S1、vah-S2 序列进行拼接,获得拼接序列 vah-S3。以 NCBI 数据库 Blastn 和 Blastx 命令搜索 vah-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 vah 基因。再次以 Blastn 和 Blastx 命令搜索 vah 的相似序列,并下载相似序列。以 Mega 3.0 软件进行多序列排列并绘制种系发生树。

采用 BIOEDIT 将 vah 序列翻译成氨基酸序列,并预测分子量。应用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测演绎蛋白信号肽。

1.5 溶藻弧菌全长 vah 克隆及重组表达菌构建

共设计 3 条 vah 表达引物: exF1 CC GGATCC ATGAAAAAACAATCACACT (划线为 *Bam*H I 酶切位点); exF2 GGG CATATG ATGAAAAAACAATCACACT (划线为 *Nde* I 酶切位点); exR1 CCG CTCGAGAAAGCGAAACT CTTCTAAGT (划线为 *Xho* I 酶切位点)。分别以 exF1/ exR1、exF2/exR1 为引物对,扩增溶藻弧菌株 ZJ0451 全长 vah。PCR 程序为 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 51 °C 30 s,72 °C 1.5 min,共进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。获得扩增产物 vah1 和 vah2。vah1 经 *Bam*H I/ *Xho* I 酶切后, vah2 经 *Nde* I/ *Xho* I 酶切后,分别克隆至 pET32a 空载体,获得表达载体 pET32a-vah1 和 pET32a-vah2。pET32a-vah1 的预期表达蛋白 N 端带有 pET32a 表达载体的 Trx, His, S 多肽标签,C 端带有 His 多肽标签。pET32a-vah1 的预期表达蛋白 N 端则不带有上述 3 种多肽标签。因此理论上 pET32a-vah1 的完整表达产物分子量比 pET32a-vah2 大约 20 ku。分别将两者转入 DH5 α 感受态细胞,扩大培养。一部分培养物直接递交测序,另一部分用于提取重组的表达质粒。分别将重组质粒转入宿主菌 BL21 (DE3) 中,获得重组表达菌 BL21-vah1 和 BL21-vah2。

1.6 vah 的原核可溶性表达

BL21-vah1、BL21-vah2 及 BL21-pET32a (不含外源基因的载体)均于 26 °C 的培养温度下诱导表达,IPTG 终浓度 1 mmol/L,分别诱导 0、6、12、16 取培养物。另取 BL21-vah1、BL21-vah2 不加 IPTG,同上培养条件作为对照。取培养物调整 OD₆₀₀至 0.6,取 100 μ L,离心沉淀,沉淀与 2 \times 上样缓冲液(0.1 mol/L Tris-Cl,4% SDS,0.2% 溴芬兰,20% 甘油,0.1 mol/L DTT)混合,用作 SDS-PAGE,以确定表达产物量及最佳的诱导时间。

取最佳诱导时间的培养物 0.5 mL,离心沉

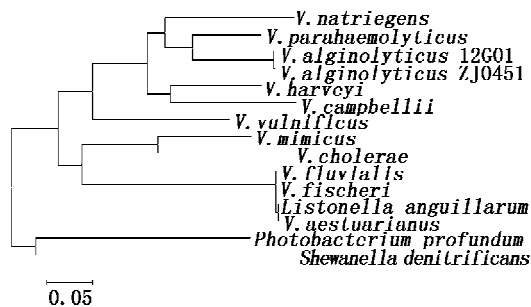


图 4 基于溶血素基因序列构建的种系发生树
Fig.4 Phylogenetic tree constructed with sequences of haemolysin genes

2.3 vah 原核可溶性表达

pET32a-vah1、pET32a -vah2 的质粒测序表明 vah1 和 vah2 的插入方向正确,其序列与前述利用 pMD18-T 载体测得的 vah 序列完全一致。BL21-vah1、BL21-vah2 于 26℃ 培养温度下诱导表达,分别取不同诱导时间的菌体做 SDS-PAGE(图 5,图 6)。可见 BL21-vah1 在约 65 ku 处出现一条较明显的特异表达蛋白带(空载体表达部分占 20.2 ku),BL21-Vah2 在约 44 ku 处出现一条较明显的特异表达蛋白带。两种特异表达蛋白的分子量与预期基本相符。以不同时间诱导时,两种重组 vah 均得到表达,其中在 9 h 后两者均达到相对最大表达量,因此 9 h 为最佳诱导表达时间。而不含目的基因的载体菌 BL21-pET32a 在 65 ku 及 44 ku 处均不出现明显的特异表达带。

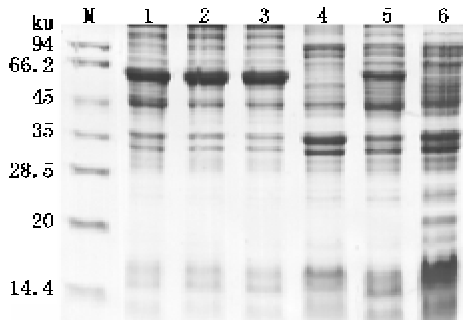


图 5 BL21-vah1 及 BL21-pET32a 菌的表达
M:蛋白 Marker;1~4:BL21-vah1 诱导 18、9、6、0 h;5:BL21-vah1 不加 IPTG 诱导 9 h;6: BL21-pET32 加 IPTG 诱导 9 h

Fig.5 The expression of BL21-vah1 and BL21-pET32a

M: protein marker; 1-4, BL21-vah2 was induced for 18, 9, 6, 0 h; 5: BL21-vah2 was cultured for 9 h without induction; 6: BL21-PET32 was induced for 9 h with IPTG

用 MagneHis™ 蛋白纯化试剂盒对处于最佳的诱导时间两种表达产物进行纯化,并 SDS-PAGE(图 7)。由图可见,细胞裂解沉淀物无明显蛋白带出现(图 7,泳道 1 和 6)而裂解上清中有明显目的蛋白(图 7,泳道 3 和 4),说明绝大部分的表达蛋白以可溶形式存在。另外发现 BL21-vah1 实际上共产生了两条特异表达蛋白带,主带如前所述出现在约 65 ku 处,副带则出现在约 44 ku 处。而 BL21-vah2 只产生了一条特异表达带,位于约 44 ku 处。

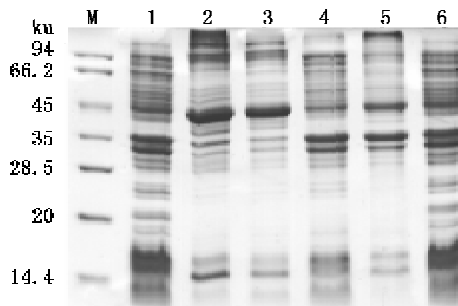


图 6 BL21-vah2 及 BL21-pET32a 菌的表达
M:蛋白 marker;1~4:BL21-vah2 诱导 18、9、6、0 h;5:BL21-vah2 不加 IPTG 诱导 9 h;6: BL21-pET32 加 IPTG 诱导 9 h

Fig.6 The expression of BL21-vah2 and BL21-pET32a

M: protein marker; 1-4, BL21-vah2 was induced for 18, 9, 6, 0 h; 5: BL21-vah2 was cultured for 9 h without induction; 6: BL21-PET32 was induced for 9 h with IPTG

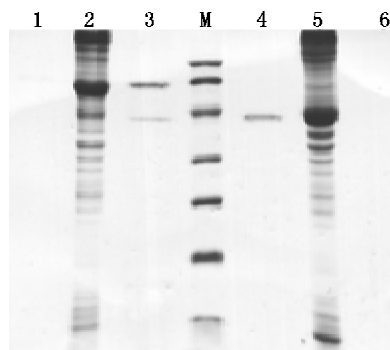


图 7 BL21-vah1 及 BL21-vah2 表达蛋白纯化
M:蛋白 marker;1:BL21-vah1 细胞裂解沉淀;2:BL21-vah1 菌体;3:BL21-vah1 细胞裂解上清纯化;4:BL21-vah2 细胞裂解上清纯化;5:BL21-vah1 菌体;6:1:BL21-vah1 细胞裂解沉淀

Fig.7 Purification of expressed protein from BL21-vah1 and BL21-vah2

M: protein marker; 1: the pellet of lysed BL21-vah1 cells; 2: the whole BL21-vah1 cells; 3: purified supernatant from lysed BL21-vah1 cells; 4: purified supernatant from lysed BL21-vah2 cells; 5: the whole BL21-vah2 cells; 6: the pellet of lysed BL21-vah2 cells

3 讨论

溶血素是弧菌病原中分布最广的一类细菌毒力因子,已有的研究表明,不同弧菌分泌的溶血素有相似性,但并非完全相同^[15]。目前已发现有代表性的溶血素主要有4类:副溶血弧菌热稳定性直接溶血素(TDH)家族、El Tor型霍乱弧菌溶血素(Hly A)家族、副溶血弧菌的热不稳定性溶血素(TLH)家族以及副溶血弧菌的热稳定性溶血素(δ -VPH)家族^[16]。目前对副溶血弧菌的TDH类溶血素和霍乱弧菌的Hly A类溶血素都有非常深入的研究,对其致病机制也了解的比较清楚。然而对TLH和 δ -VPH类溶血素的研究还不深入,它们与弧菌致病性的关系至今也不明确。曾有报道指出在某些溶藻弧菌株中发现了存在于致病副溶血弧菌中的基因^[17]和基因^[18]。但是我们曾对不同来源的136株溶藻弧菌(包括致病株)是否携带基因和基因进行了调查,发现这些株均不带有这两个基因。极低的、tdh>出现频率并不能解释溶藻弧菌溶血活性存在的广泛性和溶藻弧菌感染的多发性。因此溶藻弧菌中很可能有另外类别的溶血素基因在发挥溶血作用。

对整个弧菌属细菌基于16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *pyrH*等基因的进化分析表明,溶藻弧菌与哈氏弧菌、坎氏弧菌的亲缘关系非常近^[2,19]。关于致病哈氏弧菌、坎氏弧菌的-TLH类溶血素已见报道。考虑到溶藻弧菌与哈氏弧菌、坎氏弧菌非常近的亲缘关系,我们设想溶藻弧菌也存在类似于致病哈氏弧菌、坎氏弧菌的-TLH类溶血素,因此设计了这类溶血素的通用引物,用于PCR检测TLH类溶血素在溶藻弧菌中的分布并试图揭示它们与致病株的出现是否有某种联系。结果发现该类溶血素广泛分布于溶藻弧菌中,其出现频率为77.1%,这与林业杰等^[6]报道的具溶血活性的溶藻弧菌株出现比例接近(88.1%)。另外,根据该*vah*与致病哈氏弧菌、坎氏弧菌的-TLH类溶血素的高度相似性,我们推测*vah*产物是具有溶血活性的。但是溶血素在溶藻弧菌株中具备这样高的出现频率似乎也无法将其作为毒力和非毒力株区分的依据,因为毒力株毕竟在环境中只占少数。溶藻弧菌株ZJ0451与12G01的*vah*及aa序列存在差异,使我们猜想是否该溶血素基因在溶藻弧

菌种内就具有较高的异质性,并最终导致毒力和非毒力株溶血能力的差别。或者在不同的溶藻弧菌株中*vah*的拷贝数是不一样的因而造成毒力有强弱差别。可以支持这种推测的例子来自溶藻弧菌的近缘种-哈维氏弧菌。Zhang等^[20]发现致病力最强的哈维氏弧菌VIB645中存在两个碱基序列非常相似的TLH类溶血素基因,而其它株则只有一个该基因或无此基因。此外,也有可能大多数毒力和非毒力株均存在溶血素,但是其相关的毒力基因调控体系是完全不同的,造成了大多数的溶藻弧菌环境株虽然携带该溶血素基因,但并不表达。

由于两条上游表达引物引入了不同的酶切位点, BL21-*vah1*表达蛋白N端应带有一个Trx蛋白、S蛋白、His标签,加上C端用于方便纯化的6×His标签(共计约20.4 ku),表达的融合蛋白分子量预期约67 ku, *vah1*则居于肽链中部。而BL21-*vah2*摒除了上游的3个标签,融合蛋白预期分子量与*vah2*的实际分子量接近,约为47.3 ku。但是在BL21-*vah1*纯化蛋白SDS-PAGE电泳中(图7)可见与BL21-*vah2*纯化蛋白分子量一致的一条带,只有当部分BL21-*vah1*表达蛋白从信号肽位点处切除而保留了与BL21-*vah1*表达的成熟蛋白相同的部分时才会出现这种情况。当信号肽位于一个天然分泌蛋白前体的N端时,信号肽的细胞导向及切除是肯定的,但是当该蛋白由异源的表达系统产生时,是否发生切除未知。当信号肽位于中部时,不一定切除。部分BL21-*vah1*表达蛋白的切除和加工证明该信号肽能够被大肠杆菌原核表达系统识别并切除,即使该信号肽位于融合蛋白前体序列的中部。*vah*蛋白的肽链结构、在BL21菌中这种表达特点充分表明了它是一个分泌性蛋白。

本文采用反向PCR获得了全长溶藻弧菌溶血素基因及部分侧翼片段,并对该基因进行了原核可溶性表达,为下一步研究表达产物的活性及研究*vah*功能打下了基础,这将有助于进一步研究溶藻弧菌的致病机理并最终为免疫保护和疾病预防控制做出贡献。

参考文献

- [1] Kaneko T, Colwell R R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and related organisms in the Atlantic

- Ocean of South Carolina and Georgia [J]. Appl Microbiol, 1973, 28:1009-1017.
- [2] Thompson F L, Austin B, Swings J. The biology of vibrios[M]. Washington DC: ASM Press, 2006.
- [3] 潘晓艺,沈锦玉,尹文林,等. 水生动物的弧菌病及其致病机理[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3):272-277.
- [4] 陈 强,鄢庆枇,马 甡. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(8):83-88.
- [5] 马 甡,郝秀红,杨蓬勃,等. 东南沿海解藻酸弧菌伤口感染能力研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(4): 45-46.
- [6] 林业杰, 欧剑鸣, 董新平, 等. 溶藻弧菌的病原学研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(1):45-46.
- [7] Schmidt U, Chmei H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans[J]. J Clin Microbiol, 1979, 10(5):666-668.
- [8] Cai S H, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus erythropterus* (Bloch) [J]. J Fish Dis, 2007, 30:493-500.
- [9] Lee K K, Yu S R, Liu P C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Curr Microbiol, 1997, 34(2): 110-117.
- [10] Kahla-Nakbi A B, Besbes A, Chaieb K, et al. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells [J]. Mar Environ Res, 2007, 64: 469-478.
- [11] 金 珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 439-441.
- [12] 王淑娴, 张晓华, 孙铂光, 等. 不同海洋弧菌中 5 类溶血素基因的分布及其与溶血活性和磷脂活性的相关性[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4):570-578.
- [13] Lida T, Honda T. Hemolysins produced by vibrios [J]. J Toxic Toxin Res, 1997, 16: 215-227.
- [14] Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios [J]. J Nat Toxin, 1999, 8(2): 259-269.
- [15] 钟英斌, 张晓华, 陈吉祥, 等. 哈维氏弧菌溶血素基因 *vhhA* 在大肠杆菌中的表达及活性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(1): 97-102.
- [16] Zhang X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98:1011-1019.
- [17] González-Escalona N, Blackstone G M, DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(12):7925-7929.
- [18] Cai S H, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*) [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103: 289-296.
- [19] Wilk R, Stackbrandt E, Valle O, et al. Classification of fish-pathogenic vibrios based on comparative 16S rRNA analysis[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(3): 421-428.
- [20] Zhang X H, Meaden P G, Austin B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolates of *Vibrio harveyi* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7):3161-3167.

Cloning haemolysin gene of *Vibrio alginolyticus* through reverse PCR and expression of the gene in prokaryotic cell

LUO Peng, HU Chao-qun

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

Abstract; Extracellular products (ECP) play an important role in the pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*. In some studies, it has been observed that ECP of *V. alginolyticus* could cause haemolysis. However, there are few reports regarding the types of haemolysins from *V. alginolyticus* and the contribution of the haemolysins to the pathogenicity of *V. alginolyticus*. In the present study, based on reported haemolysin gene sequences from *Vibrio*, universal primers were designed and used for detecting the distribution of haemolysin gene among *V. alginolyticus* strains. 74 out of 96 *V. alginolyticus* strains produced amplification segments of haemolysin gene (*vah*). *vah* segment from pathogenic strain ZJ0451 was sequenced and the primers for reverse PCR were designed based on obtained sequence. Through reverse PCR, and the following gene cloning and sequencing, complete *vah* gene and flanking sequences were obtained. By blast, it was confirmed that the *vah* from *V. alginolyticus* has high similarity with TLH haemolysin gene from various vibrios. The predicted peptide strand has a signal peptide at its N-end. With pET32a vector, *vah* expression vectors were constructed, containing fusion tags with different lengths. They were successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). At 26 °C, induced proteins reached the relatively highest amount. *vah* expressed protein has a signal peptide and it can be cut out in the prokaryotic expression system.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; haemolysin; reverse PCR; expression