

文章编号: 1674-5566(2009)03-0257-06

副溶血弧菌耐热直接溶血毒素基因的 克隆及原核表达

丁莹¹, 潘迎捷¹, 赵勇¹, 孙晓红¹, 金维荣², 徐晓晶², 秦红友²

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2. 上海生物芯片有限公司, 上海 201203)

摘要: 根据 GenBank 上已有的副溶血弧菌耐热直接溶血毒素的基因序列, 设计并人工合成引物。将耐热直接溶血毒素的基因全长克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4T-1 上, 构建重组表达载体 *tdhA/pGEX-4T-1* 和 *tdhS/pGEX-4T-1*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到表达的工程菌株。优化诱导表达条件, 表达耐热直接溶血毒素。转化有重组质粒 *tdhA/pGEX-4T-1*, *tdhS/pGEX-4T-1* 的 BL21 可稳定高效地表达可溶形式的目的蛋白。表达产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 用 GSI 琼脂糖珠柱亲和层析纯化。溶血实验表明, 表达的蛋白具有溶血活性。

关键词: 副溶血弧菌; 耐热直接溶血毒素; 克隆; 纯化蛋白

中图分类号: S188 **文献标识码:** A

Clone and expression of the most stable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*

DING Ying, PAN Ying-jie, ZHAO Yong, SUN Xiaohong,

JIN Weirong, XU Xiaojing, QIN Hongyou

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

2. Shanghai Biotech Corp., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: According to the gene sequence of the most stable direct hemolysin in GenBank, the most stable direct hemolysin gene was subcloned into an *Escheria coli* expression vector pGEX-4T-1. Recombined plasmids *tdhA/pGEX-4T-1* and *tdhS/pGEX-4T-1* were then transformed into *Escheria coli* BL21 (DE3). The recombinant plasmid *tdhA/pGEX-4T-1* and *tdhS/pGEX-4T-1* had stable and efficient expression in BL21. The high pure fused protein could be obtained by using affinity chromatography method. The result of hemolytic test showed that the protein had hemolytic activity.

Key words: *Vibrio Parahaemolyticus*; the most stable direct hemolysin; clone; Purified Protein

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* Vp) 是一种嗜盐性细菌, 属弧菌科、弧菌属。存在于近海岸的海水和鱼类、贝类中, 是一种重要的食源性致病菌, 具有致病性的菌株可引起食物中毒或腹泻、反应性关

收稿日期: 2008-10-08

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 2006 第 10-5 号)

作者简介: 丁莹 (1984-), 女, 上海市人, 硕士研究生, 专业方向为食品生物技术。E-mail: dingying_l@163.com

通讯作者: 潘迎捷, E-mail: yjpan@shou.edu.cn

节炎等^[1-5]。由该菌引起的食物中毒案例在世界各地均有报道^[6]。目前研究认为副溶血性弧菌的主要致病因子是其产生的多种溶血毒素,主要有耐热直接溶血毒素(thermostable direct hemolysin, TDH),不耐热溶血毒素(thermolabile hemolysin, TLH)和相对耐热直接溶血毒素(TDH-related hemolysin, TRH)。大多数具有致病能力的副溶血性弧菌(99%来源于临床和约1%来源于海水)菌株都可产生神奈川现象,因此TDH被认为是该菌的主要毒力因子^[7]。TDH阳性株含有2个tdh基因,即tdhA和tdhS两者编码的TDH仅7个氨基酸不同,而其溶血活性相同,抗原性有交叉,不能区分,但大于90%的TDH阳性株中tdhA基因具有表达优势。本研究采用聚合酶链反应(PCR)技术扩增tdhA、tdhS基因全长,克隆至融合表达载体PGEX-4T1上。实现tdhA、tdhS基因在原核细胞中的可溶性、融合性表达,为制备抗TDH的多克隆和/或单克隆抗体打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33846, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33847)购自中国科学院微生物研究所。TG1菌株、BL21菌株及表达质粒PGEX-4T1由上海华冠生物有限公司提供。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶BamH和EcoRI、T₄DNA连接酶、Taq酶、dNTPs、pyrobes酶、异丙基β-D-硫代半乳糖苷(Isopropylβ-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)购自Takara公司,其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 副溶血弧菌基因组

DNA提取,载体和目的基因片段的酶切、回收、连接转化及阳性克隆的筛选鉴定均参照分子克隆和试剂盒说明的方法进行。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank公布的副溶血弧菌tdhA(gi_28899855, 1391810-1392679)、tdhS(gi_28899855, 1450728-1451497)基因设计两对特异性的引物。

序列(5' to 3') 5'端分别包含BamH和EcoR两个限制性内切酶酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 目的基因全长获得

以副溶血弧菌基因组DNA为模板,以引物tdhS-Rv和tdhS-Fw扩增tdhS基因,以引物tdhA-Rv和tdhA-Fw扩增tdhA基因。反应体积为25 μL,引物各600 μmol/L, dNTPs各50 μmol/L,模板50 ng, 95 °C预变性5 min,然后按95 °C 50 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s循环35次,最后在72 °C延伸至10 min,结束PCR后,产物行2%琼脂糖凝胶电泳并在紫外灯下快速挖取目的片段,割胶后按QIAquick Gel Extraction Kit说明书操作回收,得到目的基因^[8]。

1.5 重组质粒的构建

用低熔点琼脂糖法将PCR产物回收纯化,经BamH和EcoR两个限制性内切酶双酶切。同时用相同的内切酶对表达质粒PGEX-4T1酶切。得到酶切片段并与表达载体连接、转化、质粒提取,再进行双酶切分析和PCR鉴定及测序^[9]。

1.6 重组质粒tdhS/PGEX-4T1、tdhA/PGEX-4T1的测序

由上海华冠生物有限公司完成测序工作。

表1 扩增tdh基因的PCR引物序列

Tab 1 Sequence of PCR Primers for specific amplification of the tdh gene

名称	引物序列(5' to 3')
tdhS-Fw	CGCGGATCCATGAAACACCAATATTTTTC
tdhS-Rv	CGGAATCTTATIGTIGATGTTTACATTC
tdhA-Fw	CGCGGATCCATGAAGTACCGATAATTTTTC
tdhA-Rv	CGGAATCTTATIGTIGATGTTTACATTC

1.7 序列同源性分析

将测序结果与 GenBank 数据库进行 blast 同源性分析比较,并推导出其编码的氨基酸序列。

1.8 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

1.8.1 诱导条件的优化

(1)最适 IPTG 浓度的确定:在重组菌株生长至 OD_{600} 为 1.0 时,分别向 5 个摇瓶中添加不同浓度的 IPTG 使其终浓度为 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导 5 h 作全菌 SDS-PAGE 电泳^[10-11]; (2)菌株最佳诱导起始生长量的确定:工程菌分别培养至 OD_{600} 值为 0.1, 0.3, 0.5 和 1.0 时,向培养基中添加最佳浓度的 IPTG 进行诱导; (3)最佳诱导温度的确定:向处于最佳诱导起始生长量的摇瓶中添加最适浓度的 IPTG 分别在 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C 和 37 °C 继续诱导 5 h 作全菌 SDS-PAGE 电泳; (4)最佳诱导时间的确定:向处于最佳诱导起始生长量的摇瓶中添加最适浓度的 IPTG 分别诱导 1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h 作全菌 SDS-PAGE 电泳; (5)最适诱导转速的确定:向处于最佳诱导起始生长量的摇瓶中添加最适浓度的 IPTG 分别在转速为 150 r/min、180 r/min 和 250 r/min 37 °C 继续诱导 5 h 作全菌 SDS-PAGE 电泳。

1.8.2 表达产物的纯化

将培养液以 6 000 离心 10 min, 收集菌体,按 10 倍体积的量加入 PBS 缓冲液重悬沉淀,加入溶菌酶,冰上放置 30 min 后,超声破菌(工作 15 s, 间隙 15 s, 共 15 次,功率 400 W)。将超声裂解液 4 °C 下 15 000 离心 30 min, 收集上清液;上清液过 GST Sepharose 4 B 凝胶柱,收集含 TDH 的洗脱物,浓缩脱盐。

1.9 表达蛋白的溶血活性测定

分别取诱导前与诱导后的 BL21, *tdhS*/pGEX-4T1, *tdhA*/pGEX-4T1 和 VP ATCC 33847 过夜培养液 10 μ l 于兔血琼脂平板上,待菌液吸干后倒置平板于 37 °C 温箱过夜培养。观察菌落周围是否有溶血现象^[12]。

1.10 Western blot 印迹法检测表达蛋白

将 SDS-PAGE 电泳凝胶上的蛋白质电转移到硝酸纤维素滤膜上,将电转移后的膜置于一平皿中,向其中加入约 10 ml 封闭液,室温振荡 2 h 倒掉平皿中的封闭液,用 TBS 洗涤硝酸纤维素滤膜,用兔抗鼠 GST 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 鉴定,最后在溶液中显色^[13]。

2 结果

2.1 耐热直接溶血毒素基因的克隆

2.1.1 PCR 扩增 *tdhS* *tdhA* 基因全长

tdhS *tdhA* 基因全长的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果表明大小与预期的 570 bp 相符。

2.1.2 序列分析

运用 AlignX 和 ClustalW 进行序列分析,证实副溶血弧菌的 *tdhA* *tdhS* 基因有一个长度为 570 bp 的开放阅读框,全序列包含启动子和终止密码子,编码 189 个氨基酸,分子量为 23 ku。获得的 *tdhS* 基因测序结果与 GenBank 中的副溶血弧菌 *tdhS* 基因序列 (gi_28899855, 1450728-1451497) 具有 100% 的同源性。获得的 *tdhA* 基因测序结果与 GenBank 中的副溶血弧菌 *tdhA* 基因序列 (gi_28899855, 1391810-1392679) 具有 98.95% 的同源性。在第 57 位 (A-G), 第 78, 79, 80 位 (GCT-TTA), 第 97, 98 位 (CC-TA)

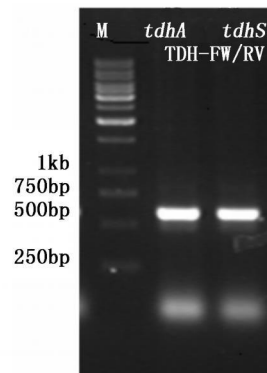


图 1 PCR 扩增获得 *tdhS* *tdhA* 基因全长

Fig 1 *tdhS* *tdhA* gene amplified by PCR was characterized by agarose electrophoresis

有碱基差别,但它们所编码的蛋白质序列是相同的。

2.1.3 *tdhS*/PGEX-4 T₁, *tdhA*/PGEX-4 T₁表达载体的构建及鉴定

分别对 *tdhS*/PGEX-4 T₁, *tdhA*/PGEX-4 T₁ 重组质粒和载体 PGEX-4 T₁ 进行 BamH 和 EcoR 双酶切。按比例进行连接反应,连接产物转化 C₄₃法制备的 BL21感受态。提取转化菌质粒进行双酶切及 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果显示,重组质粒是由 PGEX-4 T₁、*tdhS*和 *tdhA*所组成。

2.2 耐热直接溶血毒素的蛋白表达

2.2.1 最适 IPTG 浓度的确定

重组菌株生长至 OD₆₀₀为 1.0 时,分别向 5 个摇瓶中添加不同浓度的 IPTG 37 °C 诱导 5 h 目的蛋白的表达量随着 IPTG 终浓度的不同而改变,当 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时为最高。

2.2.2 菌株最佳诱导起始生长量的确定

重组菌株分别生长至 OD₆₀₀值约为 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 时,用 0.1 mmol/L IPTG 进行诱导。在重组菌生长至 OD₆₀₀为 0.3 时诱导获得的目的蛋白占总蛋白的比值最大,随后目的蛋白的产量随 OD₆₀₀值的增加而降低。这说明,菌体出于不同生长时期时,自身活力具有较大差异,所以目的蛋白的表达量也受到一定的影响。

2.2.3 最佳诱导温度的确定

在重组菌株生长至 OD₆₀₀为 0.3 时诱导, IPTG 浓度为 0.1 mmol/L,分别在 10 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C 继续诱导 5 h。37 °C 时 *TDHS* 诱导表达量虽大,但是融合蛋白表达的量较 20 °C 时低。实验结果显示重组菌株在 20 °C 时,诱导融合蛋白表达的量最大。

2.2.4 最佳诱导时间的确定

向处于最佳诱导起始生长量的摇瓶中添加最适浓度的 IPTG 于诱导后 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h 各取出一瓶作全菌 SDS-PAGE 电泳。通过正交实验比较得出重组菌在 20 °C, 诱导 4 h 时,诱导表达融合蛋白的量最大。

2.2.5 最适诱导转速的确定

向处于最佳诱导起始生长量的摇瓶中添加最适浓度的 IPTG 分别在转速为 150 r/min, 180 r/min, 250 r/min, 37 °C 继续诱导 5 h。通过正交实验比较得出重组菌在 20 °C, 180 r/min 时,诱导表达融合蛋白的量最大。

2.3 蛋白的纯化

按前述 1.8.2 的方法对诱导产物进行纯化。将收集的部分样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。实验结果表明, *tdhS*, *tdhA* 经诱导表达后有一明显的 49 ku 左右的新生蛋白带,与预计的融合蛋白大小基本一致 (GST 带 26 ku, *tdhA*, *tdhS* 带 23 ku)。纯化的融合蛋白里含少量的 GST 带,尝试过梯度洗脱的办法,仍无法将其彻底清除。目的蛋白带下有细微杂带,系在实验过程中目的蛋白的降解。

2.4 表达蛋白的溶血活性

诱导前的 BL21, *tdhS*/PGEX-4 T₁, *tdhA*/PGEX-4 T₁ 无溶血环,诱导后的 *tdhS*/PGEX-4 T₁, *tdhA*/PGEX-4 T₁ 和 VP ATCC 33847 菌落周围均有一透明的溶血环,表明表达蛋白具有溶血活性。

2.5 Western blot 结果

将纯化的融合蛋白电泳后转膜,用兔抗鼠 GST 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 鉴定。结果在 49 ku, 26 ku 处检测出条带,分别为重组的 *TDH* 蛋白和 GST 蛋白。

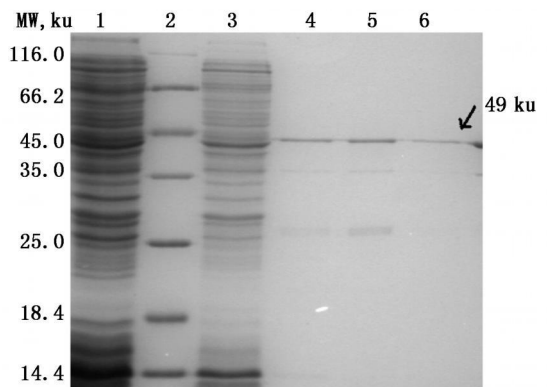


图 2 纯化产物的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig 2 SDS-PAGE analysis of the purified protein
1 总蛋白; 2 蛋白 marker 4-6 纯化蛋白

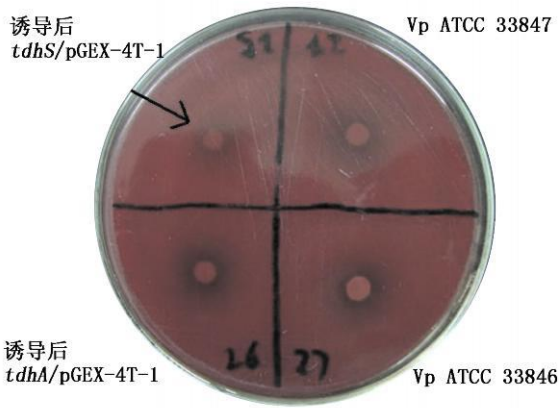


图3 溶血实验

Fig 3 Hemolytic test on rabbit blood agar

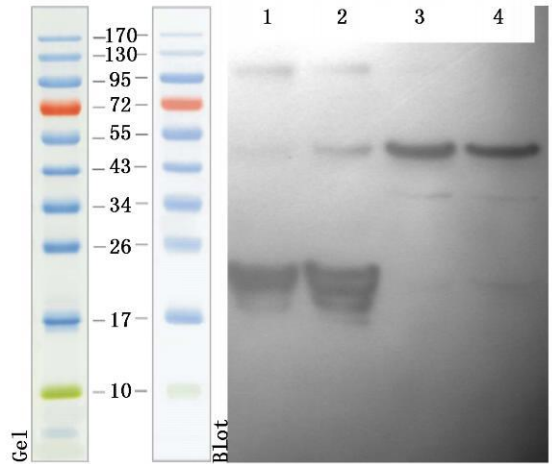


图4 重组蛋白的Western blot分析

Fig 4 Western blot analysis of recombinant proteins

M: Marker; 1, 2: GST表达蛋白;

3: TDH-A表达蛋白; 4: TDH-S表达蛋白

3 讨论

副溶血性弧菌广泛生存在近岸海水和鱼贝类食物中,海产鱼虾的带菌率平均为45%~48%,夏季高达90%。副溶血性弧菌食物中毒占细菌性食物中毒的第三位,有的沿海城市可占第一位^[14]。目前研究认为副溶血性弧菌产生的耐热性溶血毒素(TDH)是重要的致病因子。

1985年Nishibuchi等^[15]克隆了相应基因,对 tdh 基因进行了核苷酸序列的测定。发现TDH由两条相同的氨基酸链组成,每条氨基酸由567个碱基编码成189个氨基酸,其开放阅读框长为570 bp。其中前24个氨基酸为信号肽,后165个氨基酸为功能区。

本研究构建的 tdh 基因原核表达系统所表达的蛋白为单链,分子量为同源二聚体的一半,SDS-PAGE分析证实表达蛋白的M值与预期的结果23 000一致。为了后续实验制备多单克隆抗体,使表达的蛋白呈可溶性形式存在,在构建的原核表达系统中,包含了翻译成信号肽的编码区。信号肽可引导前提蛋白跨细胞膜输出,使表达蛋白主要以可溶性形式存在于细胞质腔中。此种形式存在的蛋白易于分离纯化,且无需变性复性,使表达产物的生物学活性得以保持。

为使表达的蛋白更好地进行可溶性表达,需要对诱导表达条件进行更为精细的研究及优化。本文深入研究了IPTG诱导剂的浓度、诱导起始生长量、诱导温度、诱导时间等对TDH表达量的影响,从中寻找最适合 $tdhA/pGEX-4T-1$ 、 $tdhS/pGEX-4T-1$ 的表达条件。结果表明,在优化的诱导表达条件下,TDHS呈可溶性高效表达。在实验中,纯化后的目的蛋白带有细微杂带,系在实验过程中目的蛋白的降解。因破碎细胞提取蛋白质的同时会释放出蛋白酶,这些蛋白酶极易使蛋白质降解。因此在蛋白质提取过程中,可加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白水解。

在抗体制备过程中,影响抗血清特异性的重要因素是抗原的质量。为提高抗原质量,本实验选用了高效的大肠杆菌表达载体pGEX-4T1作为克隆表达载体。该表达载体的前端带有GST-Tag多肽系列标签,利用该标签可以增加融合蛋白的可溶性表达,因为可将直接进行纯化后的蛋白作为免疫的抗原。用本实验制备的TDHS蛋白制备的多克隆抗体可以特异性地识别纯化的TDHS蛋白,也可识别副溶血弧菌天然分泌的TDHS蛋白,说明我们制备的针对副溶血弧菌的TDHS多克隆抗体具有良好的免疫学活性,能够满足针对副溶血弧菌的耐热直接溶血毒素的免疫印迹及ELISA等检测的实验要求,为后续深入研究耐热直接溶血毒素的蛋白功能,抗副溶血弧菌的单克隆抗体,建立免疫学检测方法和副溶血弧菌的保护性疫苗等研究奠定了良好的物质基础。

参考文献:

- [1] Center for disease control and prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters. Pacific Northwest 1997 [J]. *JAMA*, 1998, 280(2): 126—127
- [2] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin [J]. *Rev Med Microbiol*, 1993, 4: 106—113.
- [3] Nishibuchi M, Fasano A, Kaper R G. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct haemolysin [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(9): 3539—3545
- [4] Shirai H, Itoh H, Hayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct haemolysin (TDH) and TDH2 related haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(11): 3568—3573.
- [5] Lozano Leon A, Torres J, et al. Identification of tdh⁺ positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 226: 281—284
- [6] 陈瑞英, 鲁建章, 苏意诚, 等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析, 检测与预防控制 [J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 341—346
- [7] Jay JM. *Modern food microbiology* [M]. 6th ed. Aspen Publishers, Inc., 2000: 179—186
- [8] 黄培堂. *分子克隆实验指南* [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1228—1236
- [9] Goodrich JA, Depaola A, Kaysner CA, et al. Evaluation of two Direct Plating methods using monoclonal probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters [J]. *Appl and Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 721—724.
- [10] Iida T, Park K S, Suhienkul Q, et al. Close proximity of tdh⁺ and ure genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiology*, 1998, 144(9): 2517—2523
- [11] Ellison R K, Mahanti E, Depaola A, et al. Population of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters from Florida using two methods [J]. *Food Prot*, 2001, 64(5): 682—686.
- [12] 吴振龙, 聂军, 鲍慧宁. 副溶血性弧菌直接溶血毒素基因的原核表达及产物的性质 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 17(5): 426—427
- [13] Hatsumi T, Hiromi Q, Midori Q, et al. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct haemolysin and thermo-labile haemolysin genes [J]. *J Bacteriol*, 1985, 162(2): 510—515.
- [14] Bej A K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Detection of total and haemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification [J]. *Microbiol Methods*, 1999, 36(3): 215—225
- [15] Nishibuchi M, Kaper JB. Nucleotide sequence of thermostable direct haemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J Bacteriol*, 1985, 162: 558—564