

鱼类烂鳃病病原柱状黄杆菌溶血素基因的初步研究

李 焯^{1,2} 李 楠¹ 张晓林¹ 秦 婷¹ 聂 品¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

PRELIMINARY STUDY ON HAEMOLYSIN GENE IN *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE*, THE PATHOGEN OF COLUMNARIS DISEASE OF FISH

LI Ye^{1,2}, LI Nan¹, ZHANG Xiao-Lin¹, QIN Ting¹ and NIE Pin¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词: 柱状黄杆菌; 溶血素; 基因; 表达

Key words: *Flavobacterium columnare*; Haemolysin; Gene; Expression

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)03-0604-04

柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)隶属于拟杆菌门、黄杆菌纲、黄杆菌目、黄杆菌科, 是重要的水生动物致病菌且呈世界性分布, 鱼类感染柱状黄杆菌以后会引发柱形病(Columnaris disease), 在我国又称烂鳃病^[1]。鲑科(Salmonidae)、鲤科(Cyprinidae)、鲶科(Siluridae)等多科鱼类(几乎所有的淡水鱼类)都会感染柱形病^[2]。患病鱼体会出现烂鳃、体表溃疡、组织坏死及鳍条腐烂等症状, 死亡率可高达 100%, 全球每年因柱形病感染引起鱼类发病死亡所造成的经济损失极其严重^[3]。

柱状黄杆菌的致病性与环境因素^[4]、寄生虫感染或体表受损伤以及菌株自身毒力^[5]等密切相关。研究报道, 柱状黄杆菌的毒力因子包括黏附因子^[6]、硫酸软骨素酶^[7]等。该菌能在添加 5% (v/v) 无菌羊血的琼脂平板上产生 β 溶血^[8], 其产生的溶血素(Haemolysin)也是一类重要的毒力因子^[9]。溶血素作为细菌致病的重要毒力因子, 在疾病的发病过程中起着不容忽视的作用^[10], 但有关柱状黄杆菌溶血素及其作用机理的相关报道较少。本研究从已构建的柱状黄杆菌基因组注释中筛选到一个溶血素基因, 对其进行了克隆和表达, 为进一步研究溶血素的功能及柱状黄杆菌的致病机理奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种和质粒

柱状黄杆菌 G₄ 菌株由中国科学院水生生物研究所于 1972 年从患烂鳃病的草鱼体内分离并保存, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) M15、Top10 均由本实验室保存。质粒 pQE30 购于 Novagen 公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

将实验室保存的柱状黄杆菌 G₄ 菌株接种于含有托普霉素 100 μg/mL 的 Shieh 培养基(5 g/L 蛋白胨, 0.5 g/L 酵母粉, 0.0165 g/L CH₃COONa·3H₂O, 0.01 g/L BaCl₂·2H₂O, 0.1 g/L K₂HPO₄, 0.05 g/L KH₂PO₄, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.0067 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.001 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.05 g/L NaHCO₃, pH 7.2)^[11], 28 °C 150 r/min 振荡培养至细菌对数生长期, 采用基因组提取试剂盒(Omega)提取细菌基因组 DNA。

1.3 全菌蛋白和胞外蛋白样品的制备

取 20 mL 处于对数生长期的 G₄ 菌株的培养液, 6000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用 500 μL PBS 重悬, 于 -80 °C 保存备用。上清经 0.22 μm 滤膜过滤后, 用 30 kD 分子截留浓缩管(Millipore)浓缩, 4000×g 离心浓缩至 200 μL, 于 -80 °C 保存备用。

收稿日期: 2014-05-09; 修订日期: 2014-11-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB118703)资助

作者简介: 李焯(1989—), 女, 河北廊坊人; 硕士研究生; 主要从事鱼类病原微生物研究。E-mail: liye891212@163.com

通信作者: 聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

1.4 溶血素基因序列分析

根据本实验室构建的柱状黄杆菌基因组注释, 筛选到一个溶血素基因 *hly2031* (GenBank: KJ856900.1)。采用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源基因的搜索和蛋白序列保守结构域的分析, 通过 Translate 软件 (<http://web.expasy.org/translate/>) 进行开放阅读框的搜索、氨基酸序列的推断及蛋白分子量的预测。

1.5 溶血素基因的克隆及原核表达载体的构建

根据 *hly2031* 序列信息设计特异性引物。正向引物 *hly2031F-BamH* : 5'-CGCGGATCCATGGGTTTAGTCAC TGCCAA-3' 和反向引物 *hly2031R-Pst* : 5'-AAAAGCTGCA GTTTAGATTGTAGTTCATCAT-3', 分别含有 *BamH* (GGATCC) 和 *Pst* (CTGCAG) 酶切位点。以 G_4 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增溶血素基因 *hly2031*。PCR 反应程序: 95 °C 5min 预变性; 95 °C 30s, 52 °C 30s, 72 °C 1min 40s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10min, 16 °C 10min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 回收并纯化目的片段。

采用限制性内切酶 *BamH* 和 *Pst* 对目的片段和 pQE30 质粒分别进行双酶切, 酶切产物用 T_4 DNA 连接酶 16 h 连接过夜, 连接产物转化至大肠杆菌 M15 感受态细胞, PCR 筛选阳性克隆并测序鉴定有无移码或突变。

1.6 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

将含有溶血素基因的阳性克隆菌液按 1 : 100 的比例稀释于含有氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中, 37 °C 200 r/min 振荡培养至 A_{600} 约 0.5, 取出 1 mL 作为未诱导的阴性对照。加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 继续于 16 °C 低速诱导过夜。取 1 mL 诱导表达菌液及未诱导对照菌液 5000 r/min 离心 5min 回收菌体沉淀。为了检测目的基因的表达形式, 取出诱导后的表达菌液 4 mL, 离心收集菌体, 用 500 μL PBS 缓冲液重悬, 超声破碎处理, 离心分别收集上清和沉淀, 并将获得的沉淀重悬于 500 μL PBS。将以上获得的样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 重组蛋白的纯化及多克隆抗体的制备

根据以上 SDS-PAGE 分析结果, 用浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 200 mL 菌液大量表达重组蛋白。5000 r/min 离心 5min 收集菌体, 用 8 mL Binding Buffer 重悬沉淀并经超声波处理, 4 °C 14000 r/min 离心 30min 收集上清并经 0.22 μm 滤膜过滤。使用 His-Bind 树脂纯化蛋白, 详细步骤参考 His-Tag 融合蛋白纯化操作手册。

用以上纯化的重组蛋白对家兔进行如下免疫: 初次免疫用 400 μL (约 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 蛋白样品多点注射兔腭淋巴结及脚掌。2周以后加强免疫, 用 300 μL (约 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 蛋白样品多点注射于背部皮下及脚掌。4周以后再次加强免疫并于 6周后动脉取血, 将分离的血清分装并保存于 -80 °C。

1.8 溶血活性检测

取 10 μL 诱导表达菌液滴加到含 5% (v/v) 无菌脱纤维绵羊血的固体 LB 平板, 37 °C 培养箱静置培养; 取 500 μL

诱导表达菌经超声破碎后的上清液滴加到 5% (v/v) Shieh 血平板, 28 °C 培养箱静置培养; 将 5 μL 纯化后的重组蛋白 (约 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 滴加到 5% (v/v) Shieh 血平板, 28 °C 培养箱静置培养。

1.9 Western blot 检测

将 -80 °C 冻存的细菌菌体、上清样品及纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜上。5% 的脱脂牛奶 (溶于 PBS 缓冲液中) 室温封闭 1h, 加入 2% 脱脂奶粉 (溶于 PBST 中) 稀释的兔抗溶血素多克隆抗体室温孵育 2h, 再加入 2% 脱脂奶粉 (溶于 PBST 中) 稀释的碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 室温下孵育 1h。以上各步骤间用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5min, 最后 DAB 显色。

2 结果

2.1 溶血素基因的克隆及序列分析

hly2031 基因开放阅读框全长 1812 bp, 编码 603 个氨基酸, 分子量 69.4 kD, 理论等电点 8.36。软件预测显示, 在蛋白分子内没有糖基化位点, 没有信号肽, 无跨膜结构区。BLAST 比对结果表明, 该基因与柱状黄杆菌 ATCC49512 溶血素 (YP_004943259.1) 有 99% 的一致性和 100% 的相似性, 与嗜冷黄杆菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) 假设的溶血素 (YP_001295003.1) 有 85% 的一致性和 92% 的相似性。在实验室中同时构建了柱状黄杆菌 G_{18} 菌株的基因组注释, 从中筛选到溶血素 (G_{18} GL000072), 与 G_4 菌株溶血素有 100% 的一致性和 100% 的相似性。

2.2 溶血素在大肠杆菌中的表达及溶血活性检测

将构建好的重组表达载体转入宿主表达菌 M15, 在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 下 16 °C 低速过夜诱导。表达产物经 10% SDS-PAGE 分析, 与未诱导菌相比, IPTG 诱导菌在 70 kD 附近均有一条明显的蛋白条带, 与预期结果相符, 说明诱导表达成功。将 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的诱导菌超声破碎后收集上清和沉淀, 均可见大小约为 70 kD 的蛋白条带。以纯化的蛋白质作为免疫原制备了兔抗柱状黄杆菌溶血素的多克隆抗体。纯化蛋白经 Western blot 分析显示, 可检测到大小约为 70 kD 的蛋白条带 (图 1)。在 5% (v/v) 无菌羊血平板上, 诱导表达菌、诱导表达菌经超声破碎后的上清液及重组蛋白的周围均没有观察到明显的溶血环。

2.3 溶血素在柱状黄杆菌中的表达

Western blot 检测结果显示, 在柱状黄杆菌全菌蛋白和胞外蛋白中均能检测到大小约 70 kD 目的条带 (图 2), 并且胞外蛋白表达量约占全菌蛋白表达量的 64%。

3 讨论

在许多致病菌当中, 溶血素都作为重要的毒力因子参与细菌的致病过程。例如, 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 溶血素能裂解红细胞和其他多种哺乳动物细胞, 腹泻实

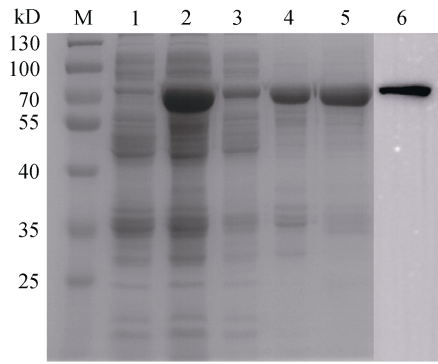


图 1 重组蛋白的表达、纯化和 Western blot 检测

Fig. 1 Expression and purification and western blot analysis of recombinant protein

M. 蛋白质 Marker; 1. 未诱导的 M15; 2. 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 M15; 3. 诱导后 M15 上清; 4. 诱导后 M15 沉淀; 5. 纯化的重组蛋白; 6. 重组蛋白的 Western Blot 分析

M. protein maker; 1. M15 without IPTG induction; 2. M15 with IPTG(0.5 mmol/L)induction; 3. supernatant of M15 lysate; 4. inclusion body; 5. purified recombinant protein; 6. Western blot analysis of recombinant protein

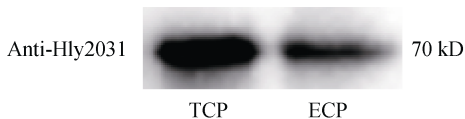


图 2 目的蛋白在 *G₄* 菌株中的表达

Fig. 2 Expression of the haemolysin protein in *Flavobacterium columnare* *G₄* strain

TCP. 全菌蛋白; ECP. 胞外蛋白

TCP. total cell protein; ECP. extracellular protein

验显示溶血素具有肠毒性, 在霍乱弧菌引起的胃肠炎发病过程中发挥着重要作用^[12]。

根据基因的结构与功能特点将溶血素分为重复子毒素家族(Repeats in toxin family, RTX)^[13]、硫醇活性胆固醇结合细胞溶素家族(Family of thiol-activated, cholesterol-binding toxins, CBTs)^[14]、沙雷氏菌属(*Serratia*)溶血素家族^[15]等。在基因的相互作用上, RTX 家族溶血素依赖于一个由四个功能相关的基因构成的操纵子发挥作用^[16]。黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)溶血素溶血活性的发挥依赖于两种蛋白的共同作用, 是由两个毗邻的相关基因共同控制的结果^[15]。本研究筛选了柱状黄杆菌 *G₄* 菌株的一个溶血素基因并对其进行序列分析, *G₄* 溶血素与柱状黄杆菌 ATCC49512 溶血素、嗜冷黄杆菌溶血素序列相似性都很高, 但在该溶血素序列中未发现上述溶血素家族的保守结构域, 在其上下游区域也未搜索到与溶血功能相关的基因存在, 分析该基因可能独立发挥作用或者和其他相关基因共同作用。

研究发现, 不同溶血素基因的体外表达模式具有一定的差异, 如鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)中有多个溶血素基因, 其中 *vah5* 编码 585 个氨基酸并表达一种大小为

66 kD 的溶血素蛋白, 且在大肠杆菌中能表达出具有溶血活性的 VAH5 蛋白, 表明其能单独发挥溶血功能^[17]。嗜冷黄杆菌溶血素和 VAH5 具有一定的相似性^[18], 都具有两个与酰基转移酶相关的功能域。然而, 由于密码子使用偏好性不同等原因, 嗜冷黄杆菌溶血素基因及其他多种基因在大肠杆菌中无法以可溶形式表达或产生分子量偏小的蛋白产物, 但在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中能表达分子量正确的嗜冷黄杆菌溶血素蛋白且具有可溶性, 推断副溶血弧菌可能是一种替代表达载体^[19]。为了进一步研究溶血素基因的体外表达模式, 本研究对柱状黄杆菌溶血素基因进行原核表达, 重组蛋白能以可溶形式表达在上清中。这为在大肠杆菌中表达柱状黄杆菌基因提供了一定的参考, 同时为后续深入研究重组蛋白活性奠定了基础。

溶血素是许多细菌的胞外产物, 如大肠杆菌 α -溶血素(HlyA)是通过 I 型分泌系统分泌的 RTX 蛋白, 能对红细胞、内皮细胞、单核细胞等多种类型的哺乳动物细胞产生毒素作用^[10]。本研究在柱状黄杆菌全菌蛋白和胞外蛋白中经 Western blot 均能检测到大小约为 70 kD 的目的条带, 证明该溶血素是一种分泌型蛋白, 与多数溶血素分泌后发挥作用的模式相同。但是, 在绵羊血平板上并未检测到该重组蛋白的溶血活性。在嗜冷黄杆菌中发现, 细菌胞外蛋白与红细胞共同孵育后也没有溶血现象, 该溶血素可能无法独立发挥作用或者合成后位于细菌表面而不是分泌至胞外, 其溶血功能的发挥可能具有接触依赖性, 可能依靠细菌细胞壁上的凝集素与红细胞膜上的唾液酸相结合促发后续溶血素蛋白的溶细胞过程^[20]。研究报道, 细菌凝集素在细胞裂解酶(例如溶血素)的溶细胞过程中起到协同作用, 凝集素与裂解酶形成一个大分子或者单独两个分子结合于细菌表面或者游离于细菌外^[21]。因此, 可以推论柱状黄杆菌的溶血素蛋白分泌至胞外后可能无法单独发挥溶血功能, 可能也需要细菌及其凝集素的参与, 这有待于进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] Declercq A M, Haesebrouck F, Van den Broeck W, et al. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 1—27
- [2] Bader J A, Shoemaker C A, Klesius P H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare* [J]. *Journal of Microbiology Methods*, 2003, 52(2): 209—220
- [3] Verma D K, Rathore G. Molecular characterization of *Flavobacterium columnare* isolated from a natural outbreak of columnaris disease in farmed fish, *Catla catla* from India

- [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2013, **59**(6): 417—424
- [4] Suomalainen L R, Tirola M A. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, **28**(5): 271—277
- [5] Shoemaker C A, Olivares-Fuster O, Arias C R, et al. *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, **127**(3-4): 353—359
- [6] Soto E, Mauel M J, Karsi A, et al. Genetic and virulence characterization of *Flavobacterium columnare* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, **104**(5): 1302—1310
- [7] Xie H X, Nie P, Chang M X, et al. Gene cloning and functional analysis of glycosaminoglycan-degrading enzyme chondroitin AC lyase from *Flavobacterium columnare* G₄ [J]. *Archives of Microbiology*, 2005, **184**(1): 49—55
- [8] Dash S S, Das B K, Pattnaik P, et al. Biochemical and serological characterization of *Flavobacterium columnare* from freshwater fishes of Eastern India [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2009, **40**(2): 236—247
- [9] Merle C, Faure D, Urdaci M C, et al. Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **94**(6): 1120—1127
- [10] Wiles T J, Mulvey M A. The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives [J]. *Future Microbiology*, 2013, **8**(1): 73—84
- [11] Decostere A, Haesebrouck F, Devriese L A. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, **35**(1): 322—324
- [12] Kothary M H, Lowman H, McCardell B A, et al. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis* [J]. *Infection and Immunity*, 2003, **71**(6): 3213—3220
- [13] Linhartová I, Bumba L, Mašín J, et al. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, **34**(6): 1076—1112
- [14] Gilbert R J. Cholesterol-dependent cytolysins [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, **677**: 56—66
- [15] Pramanik A, Könniger U, Selvam A, et al. Secretion and activation of the *Serratia marcescens* hemolysin by structurally defined ShlB mutants [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, **304**(3-4): 351—359
- [16] Jumpertz T, Chervaux C, Racher K, et al. Mutations affecting the extreme C terminus of *Escherichia coli* haemolysin A reduce haemolytic activity by altering the folding of the toxin [J]. *Microbiology*, 2010, **156**(8): 2495—2505
- [17] Rodkhum C, Hirono I, Crosa J H, et al. Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2005, **39**(4): 109—119
- [18] Sudheesh P S, Al-Ghabshi A, Al-Mazrooei N, et al. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish [J]. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, **2012**: 457264—457280
- [19] Devendra H S, Cain K D, Wiens G D, et al. Challenges associated with heterologous expression of *Flavobacterium psychrophilum* proteins in *Escherichia coli* [J]. *Marine Biotechnology*, 2008, **10**(6): 719—730
- [20] Högfors-Rönholm E, Wiklund T. Hemolytic activity in *Flavobacterium psychrophilum* is a contact-dependent, two-step mechanism and differently expressed in smooth and rough phenotypes [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, **49**(6): 369—375
- [21] Gillboa-Garber N, Garber N. Microbial lectin cofunction with lytic activities as a model for a general basic lectin role [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1989, **5**(3): 211—222