

嗜水气单胞菌外毒素和外膜蛋白双基因 融合表达载体的构建和高效表达

何鸣筱 叶巧真 陈 诚 谢俊锋 何建国

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 用基因融合方式, 以嗜水气单胞菌基因组 DNA 为模板, 设计引物通过聚合酶链式反应(PCR)把去除部分毒性活性编码区的细胞毒肠毒素基因(*act*)与去除信号肽的外膜蛋白基因(*OmpTS*)连接一起, 两基因之间插入一个 linker(Gly_4Ser)₃经 BamHI 和 HindIII 双酶切, 得到 2.1kb 的双基因融合片段, 克隆于表达质粒 pQE-30 中, 构建了双基因重组表达载体 pQE30/*actGSompTS*, 转化大肠杆菌 M15(pREP4), 经 IPTG 诱导, 表达出预期大小(81.0kD)的融合蛋白 *ActGSompTS*, 此蛋白占菌体总蛋白的 42%。Western blot 检测结果显示, 该蛋白与抗 Act 兔血清和抗 *OmpTS* 兔血清都呈阳性反应, 表明融合蛋白保留了外毒素和外膜蛋白的反应原性, 为进一步研究此融合蛋白作为疫苗候选成分提供了理论依据。

关键词: 嗜水气单胞菌; 细胞毒肠毒素基因; 外膜蛋白基因; 融合基因表达

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0169-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* (Chester) Stanier)普遍存在于淡水、污水及土壤中, 是一种人兽共患病菌, 对淡水养殖动物的危害尤为严重。该菌存在多种血清型, 随不同地域不同宿主而有所差异, 使得其全菌疫苗的使用受到限制, 现时仍未能得以广泛推广。因此寻求此菌共同的保护性抗原, 用于研制广谱、免疫保护性好的疫苗是此菌当前的研究重点之一。

有报道嗜水气单胞菌 S 层蛋白、外毒素和外膜蛋白具良好的免疫保护效果^[1-3]。气溶素类外毒素 HEC 对同型和异型的嗜水气单胞菌的攻击均显示出极显著的保护作用^[4]。而由于外毒素有毒性, 自然状况下分泌量少, 作为疫苗的成本将会较高。因此, 开展了嗜水气单胞菌外毒素及外膜蛋白基因工程亚单位疫苗的研究, 希望增加产量降低成本。嗜水气单胞菌细胞毒肠毒素(*Aeromonas cytotoxic enterotoxin*, Act)是气单胞菌气溶素类外毒素^[5], 分子流行病学研究表明气溶素类基因广泛存在于嗜温气单胞菌中^[6,7], 气单胞菌外毒素减毒基因工程亚单

位疫苗实验室试验有很高的保护率^[8], 在大田试验中能有效地抑制由该菌引起的鳖红底板病与穿孔病, 使养殖中华鳖的成活率提高 12%—19%^[9]; 嗜水气单胞菌外膜蛋白 *OmpTS* 基因工程疫苗的初步研究结果也显示了对该菌的攻毒有一定的保护效果(未发表资料)。*OmpTS* 基因是新近发现的基因(Genbank 登录号为: AF276639)。*OmpTS* 为嗜水气单胞菌 porin II 家族的外膜蛋白^[10], porin II 较为广泛的存在于嗜水气单胞菌中, 可激活补体的经典途径(C1q)^[11]。气单胞菌外毒素减毒基因工程亚单位疫苗虽有高保护率, 但其工程菌苗表达产物稳定性较差且表达量偏低; *OmpTS* 基因工程疫苗虽保护率不如前者, 而其工程菌苗表达产物稳定且表达量高达 51%^[12]。

基于上述研究, 拟将 *act* 基因(去除部分毒性活性编码区)和 *OmpTS* 基因(去除信号肽)融合一起, 构建双基因融合基因工程菌株, 以探索嗜水气单胞菌外毒素和外膜蛋白双基因融合产物作为二价疫苗成分的可行性。

收稿日期: 2002-12-10; 修订日期: 2003-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 30000128)

作者简介: 何鸣筱(1975—), 女, 广东阳江人; 硕士; 研究方向: 水生经济动物病害及分子生物学

通讯作者: 何建国, Email: lsbr05@zsu.edu.cn

材料与方法

菌株和质粒 所用嗜水气单胞菌(Ah961004)分离自患病濒死中华鳖,由中山大学寄生虫实验室分离保存。原核表达载体 pQE 30(Qiagen),表达菌株 M15(pREP4)(Invitrogen)均由中山大学生物防治国家重点实验室保存。

酶及其他试剂 DNA 限制性内切酶 BamH I, Hind I, T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司。Taq Plus 酶,PCR 回收试剂盒,质粒纯化试剂盒购自上海生物工程公司;胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;DNA 标准分子量 DL2000,DL15000 购自大连宝生物工程公司,D016 2 购自北京鼎国生物工程公司;抗 Act 兔血清,抗 OmpTS 兔血清由本实验室制备,保存;羊抗兔 IgG HRP 购自华美生物工程公司;低分子量标准蛋白质由上海生化所生产;其他试剂均为进口或国产分析纯。

分子生物学操作 细菌基因组 DNA 提取^[13]、PCR、质粒提取、基因克隆等操作参考文献^[14]或依照试剂盒说明书进行。

序列测定与分析 DNA 序列由上海基康生物工程有限公司测定并采用 DNASTar 软件进行序列分析。

双基因融合蛋白诱导表达条件的探讨 将重组质粒用常规 CaCl₂ 法转化表达菌株 M15,转化后的细菌用含 Amp 100ug/mL,卡那霉素 25ug/mL 的 LB 平板筛选。挑选单菌落于 37℃ 摇床 LB 活化过夜,再按 1% 的体积比转种,待吸光度 A₆₀₀ 达到 0.5~0.7,加入 IPTG 诱导。离心收集细菌。用 PBS 重新悬浮细菌,加入等量体积的 2×SDS 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳。优化表达条件时,采用 LB 培养基,对 IPTG 浓度,诱导时间,诱导温度,培养基 pH 值,培养基 NaCl 浓度均设梯度试验。另外,采用 LB,SOB,营养肉汤,TSB(tryptone soy broth),脑心培养基五种培养基观察融合蛋白表达量的差异。

电泳 按常规的方法在小型蛋白电泳仪上进行恒压电泳。所用的分离胶浓度为 12%,浓缩胶为 4%。考马斯亮蓝 R 250 染色液染色。

分析 将蛋白从凝胶转移至尼龙膜,10% 的脱脂奶粉溶液封闭 1h,分别加入一抗抗 Act 兔血清和抗 OmpTS 兔血清反应 1h,再加二抗羊抗兔 IgG-HRP (1:50) 反应 1h,最后加入显色底物 3,3'-二氨基联苯胺,具体操作参照文献^[14]。

结果

引物设计及表达载体的构建 设计扩增 *act* 基因(GenBank 登录号: M84709)部分片段的上游和下游引物分别为: P1: 5' AA G GAT CC GCAG AGC CCG TCT AT3' (23bp, 引入 BamHI 位点); P2: 5' ACC AGA ACC TCC ACC TCC AGA TCC ACC TCC ACC CTT GTC CCA CTG GTA 3' (48bp); 扩增 *OmpTS* 基因的上游和下游引物分别: P3: 5' TCT GGA GGT GGA GGT TCT GGT GGT GGA GGA TCT GCA GTG GTT TAT GAC 3' (48bp); P4: 5' CC AAG CTT TTA GAA GTT GTA TTG 3' (23bp, 引入 Hind III 位点)。上述引物均由上海生物工程公司合成,其中引物 P 2 5' 端的 21 个碱基和 P3 5' 端 21 个碱基互补。中间接头 (Gly₄Ser)₃ 共 45bp, 由引物 P 2 和 P 3 共同编码。

以嗜水气单胞菌的基因组 DNA 作为 PCR 反应模板,以 P1 和 P2 为引物,扩增 *act* 基因片段,回收产物;以 P3 和 P4 为引物,扩增 *OmpTS* 基因片段,回收产物。将以上两次 PCR 产物混合作为 PCR 反应模板,以 P1 和 P4 为引物,进行 PCR 扩增,得到双基因融合产物 *act-GS-OmpTS*。用 BamHI 和 Hind III 双酶切 *act-GS-OmpTS*, 克隆于表达载体 pQE-30 中,构建成 pQE-30/*act-GS-OmpTS*, 构建流程图如图 1 所示。

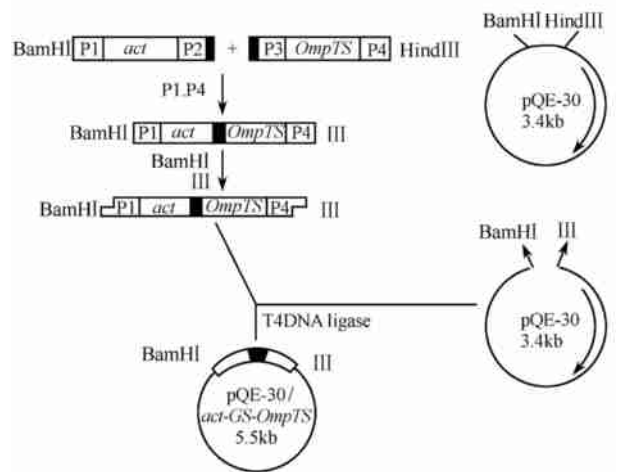


图 1 pQE 30/*act-GS OmpTS* 的构建流程图

Fig. 1 Construction of pQE 30/*act-GS OmpTS*

***act-GS-OmpTS* 鉴定和预期蛋白的分析** 图 2 为 PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果,可见在约 1000bp 和 2000bp 处有预期的特异带出现。用 BamHI 和 HindIII 分别酶切和共同酶切所构建的双基因融合表达质粒 pQE 30/*act-GS-OmpTS*, 酶切产

物的电泳结果可观察到约 3400bp 的线性化质粒和约 2000bp 的插入片段(图 3)。插入片段 DNA 序列测定结果与实验设计序列完全符合。DNASTar 软件的分析结果表明,融合基因编码 735 个氨基酸,预期表达蛋白分子量为 81.0kDa,等电点为 5.05。

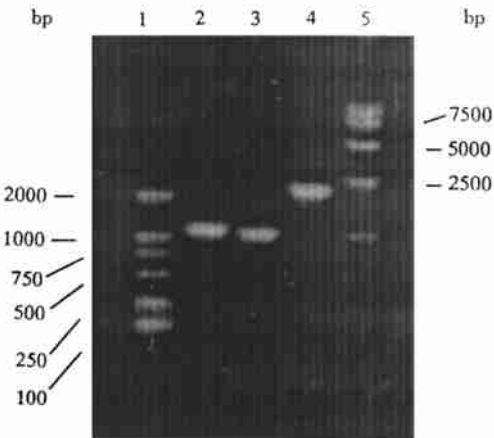


图 2 *ad*, *OmpTS* 和 *act-GS-OmpTS* 三个片段的 PCR 结果
Fig. 2 PCR of *ad*, *OmpTS* and *act-GS-OmpTS*
1. DL2000DNA ladder; 2. *ad* fragment; 3. *OmpTS* fragment;
4. *act-GS-OmpTS* fragment; 5. DL15000DNA ladder

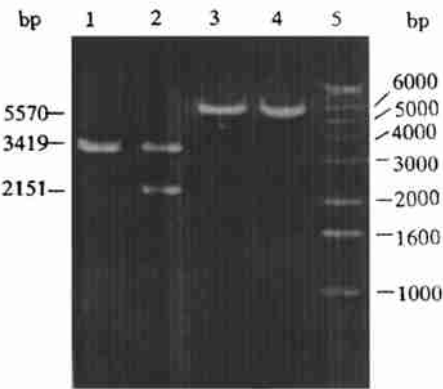


图 3 重组质粒 pQE 30/ *act-GS-OmpTS* 的酶切鉴定
Fig. 3 Restriction enzymes analysis of pQE 30/ *act-GS-OmpTS*
1. pQE 30 digested with BamHI /HindIII; 2. pQE 30/ *act-GS-OmpTS* digested with BamHI /HindIII; 3. pQE 30/ *act-GS-OmpTS* digested with BamHI ; 4. pQE 30/ *act-GS-OmpTS* digested with HindIII; 5. DL162 DNA ladder

表达产物的鉴定 表达菌经冻融处理、进行 SDS PAGE 电泳,一块胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,显示在预期大小处有特强的蛋白染色带(图 4),表明已表达出预期的重组蛋白。另一块胶用电转移方法把蛋白转移至硝酸纤维素膜进行 Western blot 分析,用抗 Act 兔抗血清和抗 *OmpTS* 兔抗血清分别检测也显示在预期大小处有阳性反应带出现(图 5)。利

用 CS-950 凝胶薄层扫描仪(SHIMADZU™)检测 SDS-PAGE 电泳胶,得出此融合蛋白占菌体总蛋白的 42%,显示目的双基因融合片段在 pQE-30 表达载体系统中得以高效表达。

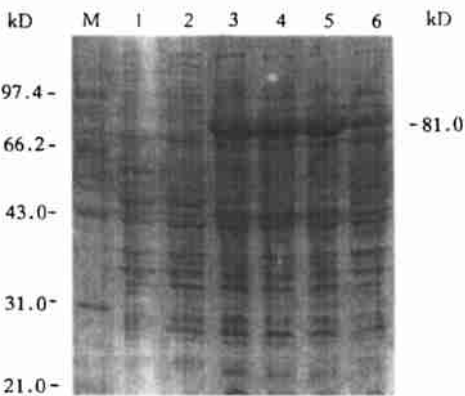


图 4 pQE 30/ *act-GS-OmpTS* 表达产物的 SDS PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of M15(pREP4) with pQE 30/ *act-GS-OmpTS*
lane M. Protein standard molecular weight marker; lane
1. M15(pREP4) with pQE 30;
lane 2, 3, 4, 5, 6. M15(pREP4) with pQE 30/ *act-GS-OmpTS*
induced by IPTG for respectively 0h, 3h, 4h, 5h, overnight

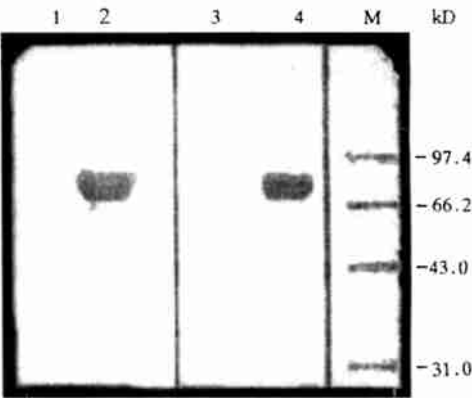


图 5 外源表达产物的 Western blot 分析
Fig. 5 Western blot analysis of pQE 30/ *act-GS-OmpTS* expressed in *E. coli* M15(pREP4)
lane M. Protein standard molecular weight marker; lane
1. M15(pREP4) with pQE 30 reacts to anti Act serum;
lane 2. M15(pREP4) with pQE 30/ *act-GS-OmpTS* reacts to anti Act serum; lane 3. M15(pREP4) with pQE 30 reacts to anti *OmpTS* serum; lane 4. M15(pREP4) with pQE 30/ *act-GS-OmpTS* reacts to anti *OmpTS* serum

表达条件的优化 表达条件优化实验结果表明,培养基的 NaCl 浓度(从 2g/L 到 14g/L)和 IPTG 浓度(从 0.2mmol/L 到 1.4mmol/L)不造成融合蛋白

表达量的明显差异(38.2%—42.0%)。在LB, SOB, TSB三种培养基中融合蛋白含量均为40%以上,而脑心培养基中次之(15.6%),营养肉汤中最少(仅5.0%)。在pH5—9时,融合蛋白表达量基本稳定(37.5%—41.0%),在pH6—7时,表达菌生长最快(诱导5h时OD_{600nm}为1.368)。诱导3—5h,融合蛋白含量不会明显变化(38.1%—40.3%),诱导过夜降低到17.2%。诱导温度梯度测试表明:在20℃, 25℃, 30℃, 37℃, 42℃都有较高量表达(均超过39%),融合蛋白表达量以30℃, 37℃两个温度时稍多(达42%)。这些结果说明含pQE30/*act-GS-OmpTS*的M15菌株在较广的培养和诱导范围内都可较好的表达目的融合蛋白。综合以上结果,较优,较经济的表达该融合蛋白的条件为在pH7.0, 0.2% NaCl的LB培养基中, 30℃培养,以0.2mmol/L IPTG诱导3—5h。

讨论

大肠杆菌肠毒素的ST编码基因和LT-B编码基因双基因融合,结果显示两基因间的接头的序列和距离对融合蛋白各部分的免疫活性存在影响^[15]。作者设计双基因中间的接头时,参考了吴秋茜等的设计方案^[16]。(Gly₄Ser)₃接头较长并且柔软,提供足够的空间和柔软性,使*Act*和*OmpTS*有可能各自折叠成具免疫活性的蛋白分子。接头共45bp,设计时把前12bp置于引物P2,中间21bp引物重复置于P2和P3,后12bp置于引物P3,通过P2, P3配对的方法,把*act*片段和*OmpTS*片段连接起来,并得到预期的接头。

由于融合蛋白一般都较大,表达相对困难,所以应选用稳定性好的高效表达载体。Qiagen公司的pQE系列表达载体,具有强启动子T5及两个强终止结构t₀和T1,保证转录的稳定,以及高水平的表达,并防止通读。另外,表达菌株M15中含有质粒pREP4,具有抗卡那霉素的能力,所以重组菌培养时加入两种抗生素,既可降低杂菌的污染,又有助于维持重组pQE-30的稳定性。从图4可看出,在诱导3h, 4h和5h后,目的融合蛋白的含量并无明显增加,这说明,表达的融合蛋白合成迅速并且较稳定。在诱导的过程中,表达菌的浓度一直都随时间增加,直到平台期。同时图4显示,目的融合蛋白的浓度在诱导过夜时会降低,可能是细菌本身的蛋白酶使之部分降解。另一方面,随着诱导时间的增加,死菌数量也在增大,所以收集时间在诱导3—5h时较宜。

由于注重上述考虑,双基因融合蛋白在pQE-30

表达系统中得以高效稳定的表达,占菌体总蛋白的42%,经Western blot分析显示该双基因融合蛋白与抗A α 兔血清和抗OmpTS兔血清均呈阳性反应,表明融合蛋白正确表达且具有外毒素Act和外膜蛋白OmpTS的反应原性,为进一步研究此融合蛋白作为疫苗候选成分提供了理论依据。

参考文献

- [1] Sun J H, Yan Y X, Chen H Q, *et al.* Analysis of the protective antigens of pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Zoonose*, 1997, (3): 20—23. [孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究. 中国人畜共患杂志, 1997, (3): 20—23]
- [2] Qiu D Q. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Tri-oryx sinensis* [D]. Zhongshan(Sun Yat-sen) University Ph. D Thesis. 1997. [邱德全. 嗜水气单胞菌的致病性研究. 中山大学博士学位论文, 1997]
- [3] Rahman M H, Kawai K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. *Fish Shelfish Immunol*, 2000, (4): 379—382
- [4] Shen Z H, Qian D, Cao Z, *et al.* Preliminary study on immunization with Crucian Carp of HEC toxoid from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Nature Science)*, 1999, (2): 124—128. [沈智华, 钱冬, 曹铮, 等. 嗜水气单胞菌HEC毒素苗对鲫鱼的免疫效果的初步研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 1999, (2): 124—128]
- [5] Chopra A K, Houston C W, Peterson J W, *et al.* Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Can J Microbiol*, 1993, (5): 513—523
- [6] Hirano I, Aoki T, Asao T, *et al.* Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. *Microb Pathog*, 1992, (6): 433—446
- [7] Dai W J, Ye Q Z, He Q Y, *et al.* Prevalence of aerolysin like toxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from Guangdong and Hainan, China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, Suppl. (26): 65—70. [戴伟君, 叶巧真, 何启勇, 等. 气单胞菌广东和南海株气溶素类毒素基因的分布研究. 水产学报, 2002, (26)增刊: 65—70]
- [8] Ye Q Z, He J G, Chan S M, *et al.* A fragment of *Aeromonas sobria* hemolysin expressed as a potential vaccine against the disease caused by *A. hydrophila* [C]. The Third World Fisheries Congress. Beijing China, 2000, 183
- [9] Li C Z, Zhang B J, Li B W, *et al.* Application of recombinant Act vaccine in prevention *Tri-oryx sinensis* disease caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2000, (5): 30—32. [李春枝, 张邦杰, 李本旺, 等. 基因工程疫苗在鳖病害防治中的应用. 淡水渔业, 2000, (5): 30—32]
- [10] Huang X, Ye Q Z, He J G, *et al.* Cloning and sequence analysis of *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein gene *OmpTS*. *Journal of Fisheries of China* [J], 2001, (6): 552—558. [黄晓, 叶巧真,

何建国, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *OmpTS* 的克隆与序列分析. 水产学报, 2001, (6): 552—558]

[11] Merino S, Noguera M M, Aguilar A, *et al.* Activation of the complement classical pathway (C1q binding) by mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein [J]. *Infect Immun*, 1998, : 3825—3831

[12] Xie J F, Ye Q Z, He J G, *et al.* Expression of *Aeromonas hydrophila* *OmpTS* gene and the immunogenicity of recombinant *OmpTS*. [J] *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, (3): 300—303. [谢俊锋, 叶巧真, 何建国, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 *OmpTS* 基因的高效表达及其免疫原性. 生物工程学报, 2002, (3): 300—303]

[13] Frederick M, Ausubel, Short protocols in molecular biology, (3rd ed) [M], John Wiley & Sons, Inc., 1995: 39

[14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning (2nd ed) [M], Cold spring harbor laboratory Press, 1989: 55—56, 891—898

[15] Clements J D. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat labile and heat stable enterotoxins [J]. *Infect Immun*, 1990, (5): 1159—1166.

[16] Wu Q Q, Jiang Y F, Chen W F, *et al.* Construction and expression of hIL-7 GM-CSF(7-127) Fusion protein in *E. coli* [J], *Chin J Microbiol Immunol*, 1998, (1): 52—57. [吴秋茜, 姜宇飞, 陈慰峰. hIL-7 GM-CSF(7-127) 融合蛋白的构建和 *E. coli* 表达. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, (1): 52—57]

! " # \$ % ! # & *act-OmpTS* & #
' ! & *AEROMONAS HYDROPHILA*

HE Ming-Xiao, YE Qiao Zhen, CHEN Cheng, XIE JurrFeng and HE Jiar-Guo
(Biopharmaceutical Centre, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

() * Cytotoxic enterotoxin and outer membrane protein have been proved to be protective antigens against *Aeromonas hydrophila*. Primers P1, P2, P3 and P4 were designed based on the sequences of cytotoxic enterotoxin gene (*act*) and outer membrane gene (*OmpTS*) of *Aeromonas hydrophila* in Genbank (primers P1, P2 for *act*, primers P3, P4 for *ompTS*). The genomic DNA of a strain of *Aeromonas hydrophila* isolated in Guangdong Province was extracted and used as PCR template. Then the partial *act* fragment and *ompTS* fragment without the signal sequence were amplified separately and purified by DNA agarose gel purification Kit. With these two fragments mixed together as the template, one target fragment about 2.1 kb was amplified with primer P1 and P4 after the second step PCR amplification. A linker, (Gly₄Ser)₃, was inserted between these two genes. The downstream primer of *act* overlapped the upstream primer of *OmpTS* in 21bp and the linker (Gly₄Ser)₃ was encoded by this two primers together. The 2.1 kb fragment was digested by BamH I and Hind III, ligated into BamH I / Hind III linearized pQE-30 plasmid (Qiagen Co.). pQE30/*act-GS-OmpTS*, an expression vector with the fusion fragment was then constructed. After transformed into *E. coli* M15 (pREP4) and induced with IPTG, pQE30/*act-GS-OmpTS* was hyper-expressed. To optimize the expression of the recombinant fusion protein, expression conditions ranging in salinity, pH value, IPTG concentration, induced time, induced temperature and medium type were tested. The optimal condition was proved to be pH7, 0.2% NaCl, LB, 30 °C and 0.2mmol/L IPTG for 3—5h. The recombinant fusion protein (Act-GS *OmpTS*) exhibited a molecular weight of about 81.0 kDa in 12% SDS-PAGE, which was identical to what had been anticipated. Scanned by CS-950 spot scanning densitometer (SHIMADZUTM), the band of the recombinant fusion protein showed about 42% of total *E. coli* proteins. Western blot analysis shown that rabbit polyclonal antibody to Act and *OmpTS* all reacted with Act-GS *OmpTS*, which indicated the fusion protein may have similar epitopes to those of the natural proteins.

+ , - . * *Aeromonas hydrophila*; Cytotoxic enterotoxin *act* gene; Outer membrane protein *ompTS* gene; Fusion gene expression