

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0566 - 05

·研究简报·

鳗源嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因克隆及其表达

欧阳岁东¹, 林天龙¹, 陈孝煊²,
俞伏松¹, 龚 晖¹, 陈红燕¹, 方勤美¹

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所 福建 福州 350003;
2. 华中农业大学水产学院 湖北 武汉 430070)

关键词 嗜水气单胞菌 鳗 主要外膜蛋白基因 克隆 表达

中图分类号 S 917 文献标识码 A

Cloning and expression of the major membrane protein gene of *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Anguilla anguilla*

OUYANG Sui-dong¹, LIN Tian-long¹, CHEN Xiao-xuan², YU Fu-song¹,
GONG Hui¹, CHEN Hong-yan¹, FANG Qin-mei¹

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;
2. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract : A pair of primers were designed according to the published nucleotide sequence of a putative outer membrane protein gene (omp) of *Aeromonas hydrophila*. With the specific primers, a target fragment about 1.1 kb was amplified from *Aeromonas hydrophila* ML316 via PCR. The target fragment was inserted into the linearized pGEM-T easy vector. After enzyme restriction and sequencing analysis, the nucleotide data had been further analyzed by DNAMAN and ClustalW software. The analysis results showed that the cloned DNA fragment had a longest open reading frame (ORF) of 1035 nt, it predicted to be encoded a 344-aa protein with the molecular weight of 36 kD. Hydrophobicity analysis suggested that the protein was highly hydrophilic, especially at the first 24 amino-acid, this region could function as signal peptide. The homologous comparison proved the cloned gene had 96% homology to the sequence of the omp gene, and the alignment of the amino acid sequence was 98%. The recombinant plasmid was constructed with the target gene and the expressing vector pGEX-4T-1 and then was transformed into *E. coli* BL21(DE3) by BamH and Sal I. The fusion protein was expressed under the IPTG inducing condition, and exhibited about 62 kD in size, very close to the predicted molecular weight of GST-MOMP, furthermore, the fusion protein was specifically recognized by anti-serum which raised against the major outer membrane protein of AHML316. Considering all these together, it proved that the cloned gene represented the major outer membrane protein gene of AHML316, and the expressed gene products shared identical antigenicity with the natural main outer membrane protein and also provided technical support for developing an advanced gene engineering vaccine against *Aeromonas hydrophila*.

Key words : *Aeromonas hydrophila*; *Anguilla anguilla*; major outer membrane protein gene; cloning; expression

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AH)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

收稿日期 2005-04-28

资助项目 福建省科技厅资助项目(B0410025)福建省科技重大专项(2004N203)

作者简介 欧阳岁东(1975-)男,湖南冷水江人,硕士,主要从事水产动物病原微生物分子生物学研究。Tel:0591-87817514, E-mail:ouyangsd@sina.com

通讯作者 林天龙, Tel:0591-87817514, E-mail:Lint@pub3.fz.fj.cn

物的危害尤为严重,是引起鱼类暴发性疾病的重要病原之一^[1-3]。由于此菌抗原成分复杂,存在众多血清型,不同地区流行的菌株在毒力和免疫原性方面存在着明显差异,灭活疫苗的使用受到限制,商品化生产不理想^[4]。因而关键在于能否找出此嗜水气单胞菌的共同保护性抗原,以制备针对不同血清型菌株均有保护性的疫苗。

细菌外膜蛋白具有良好的免疫原性,不仅可激发机体的体液免疫,而且还可引起细胞免疫可与其他血清型的嗜水气单胞菌有免疫交叉反应,具有异种血清型的免疫交叉保护作用,是一种潜在的共同保护性抗原^[5]。嗜水气单胞菌 S 层蛋白、外毒素和外膜蛋白具有良好的免疫保护效果。因此,我们克隆嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因,在大肠杆菌中进行 MOMP 基因表达并分析其抗原性,为研制嗜水气单胞菌外膜蛋白基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

嗜水气单胞菌 ML316 由本实验室于 2001 年 3 月 16 日从福建省长乐患病欧鳊肝上分离鉴定, *E. coli* DH5 α 为本室保存, *E. coli* BL21(DE3), pGEX-4T-1 为福建省农科院遗传工程重点实验室惠赠, pGEM-T Easy Vector 试剂盒为 Promega 公司产品。

1.2 主要试剂

dNTP, *Taq* 酶, 限制性内切酶, PCR 纯化试剂盒, IPTG, X-gal, 甲丙烯酰胺, N, N'-亚甲双丙烯酰胺, TEMED 购自上海生工公司产品, LB 培养基为 Sigma 公司产品, PCR 引物由上海生工公司合成。

1.3 PCR 的扩增、克隆和鉴定

PCR 扩增 AHML316 DNA 的抽提参照文献 [6] 进行, 根据 GenBank 中发表的嗜水气单胞菌外膜蛋白(序列号 AF146597), 辅用分子生物学引物设计软件 Oligo 6.0 设计了 1 对 PCR 引物。引物 1: 5' - GCGGGATCCATGAAAATGGCTCCTTC(含 *Bam*H I 位点); PCR 引物 2: 5' - CGCATTATCTGAACTAAGTC。反应体系: 反应总体积 25 μ L, ddH₂O 16.75 μ L, 10 \times PCR buffer(内含 1.0 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2.5 μ L, PI(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, P2(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, dNTP(2 mmol \cdot L⁻¹) 2.5 μ L, *Taq* 酶(5 U) 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 7 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖上恒压 60 V 电泳约 1 h, 紫外灯下观察结果, 自动凝胶成像扫描仪拍照及处理。

PCR 产物的克隆和鉴定 PCR 扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 按照 pGEM-T Easy Vector 使用说明连接到 pGEM-T Easy Vector 上, CaCl₂ 转化法转化大肠杆菌 DH5 α , 在涂有 IPTG, X-Gal 和 100 μ g \cdot mL⁻¹ Amp⁺ 的 LB 平板上涂布进行初步筛选, 挑取白色菌落抽

提重组质粒, 用 *Bam*H I, *Sal* I 酶切进行鉴定, 阳性重组质粒命名为 Tomp。将阳性重组质粒 Tomp 送至上海生工公司测序。

1.4 表达载体的构建和鉴定

用 *Bam*H I, *Sal* I 酶切 pGEX-4T-1 质粒与重组的 pGEM-T Easy 载体质粒得到的目的 DNA 片段通过 T4 连接酶连接, CaCl₂ 转化 *E. coli* BL21(DE3), 涂布于含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ Amp⁺ 的 LB 平板上, 随机挑取菌落, 抽提重组质粒, 用 *Bam*H I, *Sal* I 酶切鉴定其为阳性克隆重组子, 命名为 Pomp。

1.5 MOMP 基因在大肠杆菌中的表达和检测

嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因在大肠杆菌中的表达 挑阳性重组单菌落接种于 2 mL 含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 活化过夜, 次日以 1:100 转接入含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡至 OD_{600nm} 为 0.6~0.8 之间时, 加入 IPTG 使其终浓度为 0.1 mmol \cdot L⁻¹, 继续培养 3 h 后, 分装于 Eppendorf 管, 离心取菌体, 加入 200 μ L ddH₂O 振荡, 超声波 100 W 的功率破碎 6 次, 每次 10 s, 间隔 10 s, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 取上清, 再加入 40 μ L 5 \times 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 离心 1 min, 上清用于 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测。

SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表达产物 按常规的方法在小型蛋白仪上进行。所用分离胶的浓度为 12%, 浓缩胶为 4%, 考马斯亮蓝染色。Western-blot: 按常规的方法进行恒压 100 V 1 h, 胶上的蛋白转移到 NC 膜上, 加 1:500 稀释的一抗(鼠抗嗜水气单胞菌主要外膜蛋白抗血清), 加 1:20 000 稀释的标记 AP 酶的羊抗鼠血清, NBT-BCIP 显色。

2 结果

2.1 PCR 扩增和重组质粒的鉴定

PCR 反应可以扩增出约 1.1 kb 的 DNA 片段, 与预期扩增的目的片段大小相符合, 回收目的片段(图 1), 将它克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定, 可得到阳性重组质粒, 命名为 Tomp(图 2), 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 Tomp 质粒得到目的基因, 并把它克隆到 pGEX-4T-1 表达质粒上, 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 可以得到阳性重组质粒 Pomp(图 3)。

2.2 MOMP 基因的同源性分析

MOMP 基因的 Genbank 登录号为 DQ008470。应用 DNASTAR 软件进行序列分析, 证实嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因(Momp)有 1 个核苷酸长度为 1035 nt 的开放阅读框, 其 GC% 的含量为 60.29%, 编码 344 个氨基酸, 所编码的蛋白大小为 36.08 kD, 等电点为 5.315, 含有 30 个碱性氨基酸, 36 个酸性氨基酸, 133 个疏水性氨基酸, 79 个极性氨基酸。经 Blast 比较, 它与 GenBank 中的非鳃源嗜水

嗜水气单胞菌外膜蛋白基因(AH-omp),杀鲑气单胞菌外膜蛋白基因 *ompII* 基因(AS-OMP_{II}),鳖源嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS* 基因(AH-omp_{TS})的核苷酸的同源性分别为

95% ,89% ,11% ;而氨基酸的同源性达 98% ,89% ,11% (图4)。

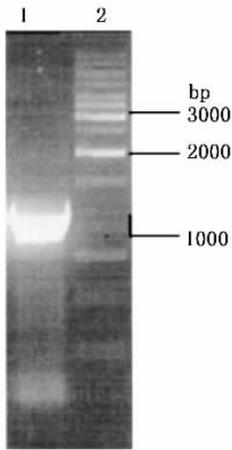


图1 嗜水气单胞菌 Momp 基因的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.1 PCR amplification of Momp gene of *A. hydrophila*

1. PCR 扩增产物 2. 1 kbDNA 标准分子量
1. PCR amplification products ; 2. 1 kb DNA Marker

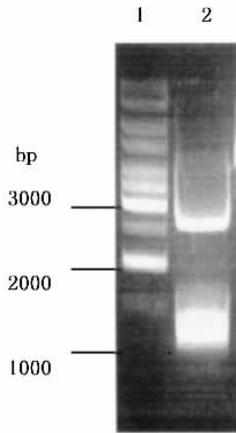


图2 重组质粒 Tomp 的 *Bam*HI/*Sal*I 酶切鉴定结果

Fig.2 Characterization of recombinant plasmids by *Bam*HI/*Sal*I digestion

1. 1 kb DNA 标准分子量 ; 2. Tomp 的酶切鉴定
1. 1 kb DNA Marker ;
2. Tomp digested by *Bam*HI/*Sal*I

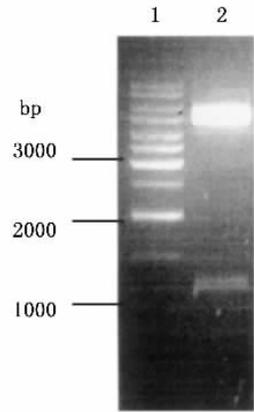


图3 重组质粒 Pomp 的 *Bam*HI/*Sal*I 酶切鉴定结果

Fig.3 Characterization of recombinant plasmids by *Bam*HI/*Sal*I digestion

1. 1 kb DNA 标准分子量 ; 2. Pomp 酶切鉴定
1. 1 kb DNA Marker ;
2. Pomp digested by *Bam*HI/*Sal*I

2.3 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因在大肠杆菌中表达

将阳性重组质粒 Pomp 转化大肠杆菌菌 BL21(DE3)感受态细胞中 ,37 ℃ 恒温培养 18 h ,提取质粒 ,双酶切及 PCR 鉴定正确后 ,将转化菌接种于含 AMP⁺ 的 LB 培养基 ,培养至对数生长期后 ,经 IPTG 诱导 ,SDS-PAGE 电泳检测显示 ,在质粒 Pomp 表达的全菌体蛋白中 ,在约 62 kD 处可见一条明显的蛋白特征带 ,这与预期估计的相对分子量一致 ,蛋白表达形式为包含体表达(图5) 。通过嗜水气单胞菌 ML316 主要外膜蛋白经 Western-blot 实验后 ,在相应的 62 kD 处可见带出现 ,而对照组没有 ,表明通过基因工程手段表达的此主要外膜蛋白(MOMP)具有免疫原性(图6)。

3 讨论

嗜水气单胞菌 S 层蛋白 ,外毒素和外膜蛋白均具有良好的免疫保护能力 ,龚晖等^[6]曾克隆表达了嗜水气单胞菌外毒素基因 ,并及其制备了其表达产物 ISCOMs ,免疫欧鳗取得了良好的免疫保护力。但是由于外毒素有毒性 ,表达分泌量比较少 ,作为疫苗的成本会增加 ,故探索嗜水气单胞菌外膜蛋白基因工程亚单位疫苗的研究 ,以期能降低生产成本。

细菌的外膜蛋白具有良好的免疫原性 ,不仅可以刺激体液免疫而且对细胞免疫亦有刺激作用。外膜蛋白按其在细胞中的拷贝数高低分为主要蛋白和微量蛋白 ,而主要蛋白包括外膜 A 蛋白(OmpA) ,微孔蛋白(Porins) ,脂蛋白(Lpp) 。目前除了克隆表达的鳖源的嗜水气单胞菌的外膜蛋白 *ompTS* 基因外 ,对鳗源嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因研究仍无任何相关的报道^[7,8]。我们克隆了嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因全长为编码 344 个氨基酸 ,分子量为 36.08 kD 的蛋白 ,并在大肠杆菌中进行了高效表达 ,对进一步研究该基因蛋白的结构和功能 ,作为候选的疫苗蛋白提供了物质来源。

实验中诱导表达的融合蛋白为包含体 ,但是经超声破碎等处理后仍与外膜蛋白抗血清有很强的反应 ,而 Western-blot 反应中由于血清可能没有进行足够的吸附处理 ,所以背景仍然较深 ,需在后续的实验中进一步的进行处理研究。

实验所用的 AHML316 来自福建省某鳗场患暴发性败血症病鳗上分离到的菌株 ,经血清学分型表明此菌株是福建省两大主要血清型之一(待数据发表) ,并且这株菌的主要外膜蛋白与其他血清型的嗜水气单胞菌有免疫交叉反应 ,具有异种血清型的免疫交叉保护作用^[9] ,因此 ,克隆 AHML316 的 MOMP 基因可为进一步研制嗜水气单胞菌外膜蛋白基因工程疫苗奠定基础。

	11%	
AH-MOMP	-MMKMAPSLIAIAMAAMGATAAHAADDIYFGAGAGAAHFNGLNKIGGGGYAGTEDAAAAAN	59
AH-OMP	-MMKMAPSLIAIAMAAMGATAAHAADDIYFGAGAGAAHFNGLNKIGGGGYAGTEDAAAAAN	59
AS-OMPII	MKMKMAPALIALAIAAMGTSTAQAADDWYTGIGAGWAYGHDLNDFG---KDADKDATAALS	57
AH-OMPTS	----MKKTI LAIAI PALFASAANA AVVYDKDGTTFDVYGRVQANYYGDHNTADSTVASGY	56
AH-MOMP	AFVGYNFTE NFGTEFGYQYAGRGNTDGLRYENQGATLSGIARLPLGGDFSAFAEGGAYWA	119
AH-omp	AFVGYNFTE NFGTEFGYQYAGRGNTDGLRYENQGATLSGIARLPLGGDFSAFAEGGAYWA	119
AS-OMPII	LFGGYNFN DYAAELG YLYAGKAGVD---FKTQGATLSGLARLPLNDIFSVFAEGGAYFN	114
AH-ompTS	KDVGDEL VGSSRLGWSGKIALNNTWSGIAKTEWQVSAENSANKSDSRHIYVGFDTQYGK	116
AH-MOMP	HTDGLGTS DTKVSPLAGLVTYKVN DALDLQARYRYMWDVADLHAGDAPDDVRYKSNQS	178
AH-omp	HTDGLGTS DTKVSPLAGLVTYKVN DALDLQARYRYMWDVADLHAGDAPDDVRYKSNQS	178
AS-OMPII	HVNGNGSNDNGTAPLAGLGTAKLSDLIDVQARYRYMWNLGDEQK-----TWETNMS	166
AH-ompTS	IIFG-OTDTAFYDVLEPTDIFNEWGDAGNFYDGRQEGQVIYSNTYGGFKGKLSYQTNDK	175
AH-MOMP	VATLEAVYHPFRTSYVAPAPAPVVEEAPAPAPQVVEKNFALNSDVLFAFGKDSLK----P	234
AH-omp	VATLEAVYHPFRTSYVAPAPAPVVEEAPAPAPQVVEKNFALNSDVLFAFGKDSLK----P	234
AS-OMPII	VATLELVMPNRTSYVAPVAAP--APEPVPEPVVDKSFALSSDVLFAFGKSTLK----P	220
AH-ompTS	AVKVTDVGGOGIKETAVYGADVKNRYGYAAAAGYDFDFGLGLNAGYSYSDLENTKTNNTGD	235
AH-MOMP	EGVAALNGLYQQIVEFQPKDGNVAVVGYTDRIGSDAYN---QKLSEARARTVANFLVSKG	291
AH-omp	EGVAALNGLYQQIVEFQPKDGNVAVVGYTDRIGSDAYN---QKLSEARARTVANFLVSKG	291
AS-OMPII	EGVAALNTLYHQNVDVQPKDGSVAVVGYTDRIGSDAYN---LKLSEARARTVADFLVSKG	277
AH-ompTS	KKEWALGAHYAINGFYFAGVYTGQDLSYDNTTGGDKDKGRGYELAASYNVDWTFFLAGYN	295
AH-MOMP	MAASKVAIEGRGEANPVTGKCGVKKAKAQLISCLAPDRRVEVRVSGVQEVQK-----	344
AH-omp	MAASKVAIEGRGEANPVTGKCGVKKAKAQLISCLAPDRRVEVRVSGVQEVQK-----	344
AS-OMPII	LPAGKVAIEGRGEASPVGTGQCDGIKAKAQLIACLAPDRRVEVRVTGIQEVQK-----	330
AH-ompTS	FKEAKVNSNTAG---AEYKDLLDETL LGVQYAFSTSKLKAYTEYKI QGIDKLDDEWTVALQ	352
AH-MOMP	---	
AH-omp	---	
AS-OMPII	---	
AH-ompTS	YNF355	

图 4 AHML316 MOMP 基因与 AH-omp ,AS-ompII 基因和 AH-ompTS 基因的所推导的氨基酸序列比较

Fig.4 Compared to deduced amino acid sequence of the outer membrane protein gene from *Aeromonas hydrophila*

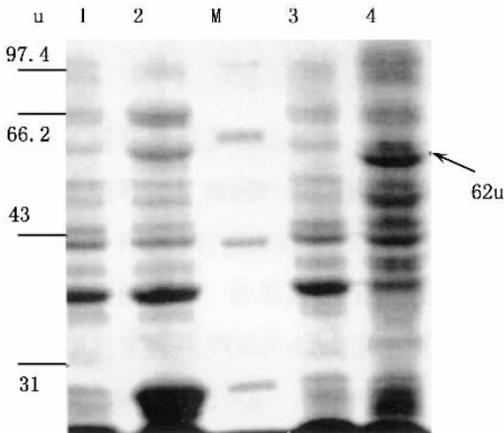


图5 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression protein

1 诱导前的 pGEX4T-1 ; 2 诱导后的 pGEX4T-1 ;

M. 蛋白质标准分子量 ; 3 诱导前的 Momp-pGEX4T-1 ;
4 诱导后 Momp-pGEX4T-1

1. pGEX4T-1 without IPTG induction ; 2 pGEX4T-1 with
IPTG induction ; M : Protein marker ; 3 Momp-pGEX4T-1 without
IPTG induction ; 4 Momp-pGEX4T-1 with IPTG induction

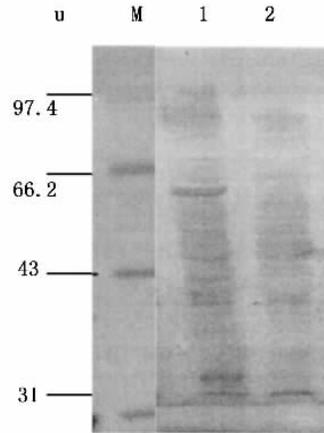


图6 用主要外膜蛋白抗体进行 Western-blot 分析

Fig.6 Western-blot analysis using the antibody

of major outer membrane protein

M : 蛋白质标准分子量 ; 1 诱导后的 Momp-pGEX4T-1 ;
2 诱导前的 Momp-pGEX4T-1

M Protein marker ; 1 Momp-pGEX4T-1 with IPTG
induction ; 2. pGEX4T-1 without IPTG induction

参考文献 :

- [1] Anonymous. Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in Asia-Pacific region [R]. Food and Agriculture Organization of United Nations TCP/RAS/4508. Bangkok ,1986.
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报 , 1992 , 16(4) : 282 - 288.
- [3] 黄琪炎. 水产动物疾病学 [M]. 上海 : 上海科学技术出版社 , 1993. 103 - 112 , 118 - 121 , 137 - 139.
- [4] 钱 冬 陈月英 沈锦玉. 引起鱼类爆发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型毒力及溶血性 [J]. 微生物学报 , 1995 , 35 : 460 - 464.
- [5] RaRahman M H , Kawai K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. Fish Shellfish Immunol , 2000 , 10(4) : 379 - 382.
- [6] 龚 晖 林天龙 俞伏松 等. 鳃源嗜水气单胞菌溶血性基因的克隆及表达 [J]. 水产学报 , 2003 , 27(2) : 124 - 130.
- [7] 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 [J]. 水产学报 , 2001 , 25(6) : 552 - 558.
- [8] 谢俊峰 , 叶巧真 , 何建国 , 等. 嗜水气单胞菌胞外膜蛋白基因 ompTS 的高效表达及其免疫原性 [J]. 生物工程学报 , 2002 , 18(3) : 300 - 303.
- [9] 董传甫 林天龙 俞伏松 等. 嗜水气单胞菌胞外膜蛋白及 S 层蛋白分析 [J]. 中国水产科学 , 2003 , 16(3) : 201 - 205.