

溶藻弧菌溶血活性检测及溶血素基因、 启动子区功能

苏婷 罗鹏 陈偿 任春华 胡超群*

(中国科学院南海海洋研究所 中国科学院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: 【目的】研究溶藻弧菌的溶血现象, 溶血素基因 *vah* 的分布及 *vah* 基因、*vah* 启动子区对溶藻弧菌溶血活性的贡献。【方法】对 46 株分离自华南沿海水生动物体内和海水的溶藻弧菌环境株及溶藻弧菌标准株 1.1587 进行溶血实验; 比较具有溶血活性的溶藻弧菌野生株 ZJ051、*vah* 基因大肠杆菌 BL21 重组表达株、*vah* 缺失突变株和基因回补株间溶血能力的差异; 检测 *vah* 基因在溶藻弧菌中的分布, 比较溶血株与非溶血株 *vah* 基因及上游启动子区的序列差异。【结果】47.8% 的溶藻弧菌菌株产生溶血活性, 因此溶血现象普遍存在于溶藻弧菌环境株中; *vah* 基因的表达产物具有溶血活性, *vah* 基因缺失突变株不具有溶血活性, 而 *vah* 基因回补株恢复溶血活性。*vah* 基因普遍存在于溶藻弧菌中, 且基因序列非常相似, 氨基酸序列完全相同, 然而不同菌株的启动子区第 188–190 碱基位点存在差异。【结论】溶藻弧菌 *vah* 基因是造成溶藻弧菌溶血的直接原因, 但溶藻弧菌溶血能力的差异并非是由 *vah* 基因本身差异决定, 极有可能与启动子区第 188–190 碱基位点相关。

关键词: 溶藻弧菌, 溶血活性, 溶血素基因, 缺失突变

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070106); 中科院知识创新工程重要方向项目(No. KZCXZ-EW-Q212); 青年人才领域前沿项目(No. SQ200801); 广东省/中科院全面战略合作项目(No. 2012B091100269)

*通讯作者: Tel: 86-20-89023218; 信箱: hucq@scsio.ac.cn

收稿日期: 2012-08-20; 接受日期: 2012-12-06

Hemolytic activities of *Vibrio alginolyticus* and functional analysis of a hemolysin gene and its promoter

SU Ting LUO Peng CHEN Chang REN Chun-Hua HU Chao-Qun*

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

Abstract: [Objective] We studied the hemolytic activity of *Vibrio alginolyticus* strains, and the distribution of a hemolysin gene *vah* in these strains; we analyzed the functions of *vah* gene and the related promoter, and assessed their contributions to the hemolytic activity. [Methods] Hemolytic test was performed using 47 *V. alginolyticus* strains, including one type strain 1.1587 and 46 environmental strains isolated from seawater and various marine animals. The difference of hemolytic ability was compared among a wild *V. alginolyticus* strain ZJ051 that showed hemolytic activity, a recombinant *Escherichia coli* BL21 aiming at a predicted *vah* gene, a *vah*-deletion mutant, and a *vah*-recovery strain. The distribution of *vah* gene was further detected in *V. alginolyticus* followed by the sequence analysis of *vah* genes and their promoters among the hemolytic and non-hemolytic strains. [Results] Among the *V. alginolyticus* strains 47.8% showed hemolytic activities, and thus hemolysis was ubiquitous in environmental *V. alginolyticus* strains. Hemolysis was observed in the recombinant *Escherichia coli* BL21 and the *vah*-recovery strain but not in the *vah*-deletion mutant. The *vah* gene widely distributed in *V. alginolyticus*. The *vah* sequences of *V. alginolyticus* strains were highly similar, and they shared identical amino acid sequences. Through the *vah* promoter comparison between the hemolytic and non-hemolytic strains, a difference in 188–190 base sites of the promoters was discovered. [Conclusion] Hemolysis is directly caused by the *vah* gene, and the discrepancy of hemolytic ability among various *V. alginolyticus* strains has no relation with the difference of *vah* sequences, which is likely determined by the diversity in 188–190 base sites of *vah* promoters.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*, Hemolytic activity, Hemolysin gene, *vah*-deletion mutant

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 属弧菌科 (Vibrionaceae), 弧菌属, 为嗜盐嗜温性、兼性厌氧海生弧菌^[1], 广泛存在于海洋、河口及海水养殖池等水体环境中, 可引起人和多种海洋动物发病。据张灵芝等^[2]报道, 溶藻弧菌可引起细菌性食物中毒, 引起患者头痛、腹痛、腹泻。在过去几十年时间里, 人类对溶藻弧菌的生理生化特性

进行了不少研究, 但对毒力因子和致病机理等方面, 特别是溶藻弧菌关键毒力基因的研究仍十分有限。由于溶藻弧菌分布的广泛性及可引起人类或水产动物感染, 近些年溶藻弧菌的致病因子及其疾病发生分子机制的研究逐渐受到重视。

一些研究表明溶血素是弧菌胞外产物 (Extracellular product, ECP) 的主要致病成分, 是弧菌

的重要毒力因子,如霍乱弧菌的 HlyA、HLX,副溶血弧菌的 TDH、TRH 和 TLH,哈氏弧菌的 VHH 等^[3]。罗鹏等^[4]发现溶藻弧菌中存在与副溶血弧菌 *tth* 溶血素基因高度相似的溶血素基因 *vah*,并构建了 *vah* 基因的表达载体,在大肠杆菌中获得了可溶性表达^[4]。在此基础上,本文对 46 株分离自华南沿海水生动物体内和海水的溶藻弧菌环境株及溶藻弧菌标准株 1.1587 进行了溶血实验,并构建 *vah* 基因的缺失突变株和基因回补株,以确定 *vah* 基因的功能。此外,检测了 *vah* 基因在溶藻弧菌中的分布及溶藻弧菌溶血株和非溶血株 *vah* 基因和基因启动子序列的差异,以期探索 *vah* 基因及其启动区对溶藻弧菌溶血活性的贡献。

1 材料与方法

1.1 菌株

46 株溶藻弧菌环境菌株分离自华南沿海水生动物体内和海水。溶藻弧菌 1.1587 (ATCC 33787)购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。重组表达菌 BL21-*vah1* 由本实验室保存^[4]。以溶藻弧菌野生株 ZJ051 (又名 A056)构建 *vah* 基因缺失株 Δ *vah*-ZJ051 和溶藻弧菌 *vah* 基因回补株 ϕ *vah*-ZJ051 (另文发表)。

1.2 溶藻弧菌的溶血能力分析

30 g TSB (BD)加入 900 mL 蒸馏水搅拌均匀后灭菌,调节 pH 至 8,缓慢倒入无菌脱纤维兔血 100 mL (广州芯特生物科技有限公司),搅拌均匀后倒入一次性培养皿。将 47 株溶藻弧菌分别点种到 TSB 兔血平板上,37 °C 培养 24 h 观察结果。

1.3 *vah* 基因对溶藻弧菌溶血能力影响分析

1.3.1 *vah* 基因的重组表达菌和溶藻弧菌 *vah* 基因缺失、回补株的溶血差异分析:配置上述 TSB 兔血平板,观察 BL21-*vah1*、 Δ *vah*-ZJ051 和 ϕ *vah*-ZJ051 在 TSB 兔血平板上的溶血差异。溶

藻弧菌菌落周围出现一透明的溶血圈(完全溶血),判定为 β 溶血;溶藻弧菌菌落周围出现一大或小的不透明的溶血圈(不完全溶血),判定为 α 溶血;不出现溶血圈则为不溶血。

1.3.2 *vah* 基因在溶藻弧菌中分布的检测:根据已报道的多株哈氏弧菌、坎氏弧菌等弧菌溶血素基因保守序列设计通用引物^[4]: *uvh1*: 5'-CAATGGCGATTCCCGAATCC-3'; *uvh2*: 5'-GAGCGGTTGATGTCTTGCA-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。PCR 扩增结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,随机挑选 3 株细菌(HN041、E0666、E381)的 PCR 产物,送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

1.4 不同溶血能力的溶藻弧菌中 *vah* 基因差异检测

1.4.1 溶血差异株的全长 *vah* 基因克隆和测序:设计扩增全长 *vah* 基因的引物: *vahF1*: 5'-ATGAAAAACAATCACACT-3'; *vahR1*: 5'-AAAGCGAACTCTTCTAAGT-3'。分别对溶血株 ZJ051 和 1 株随机选择的非溶血株 E0601 进行全长 *vah* 基因扩增。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 8 min。PCR 扩增结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物直接送上海英潍捷基贸易有限公司做常规克隆及测序。

1.4.2 *vah* 基因与上游 *asp* 基因间区扩增及测序:根据 GenBank 中溶藻弧菌 12G01 中 *vah* 基因及上游毗邻碱性丝氨酸蛋白酶基因(*asp*)的序列特征设计引物 *asp2*: 5'-AGCCGCRAAYGCTGACAT-3'; *ldh1*: 5'-GCTGGTGATAAGGTTGGCTC-3', 用于扩增 47 株溶藻弧菌株 *vah* 和 *asp* 基因间区,该间区序列包含了完整的 *vah* 启动子区。PCR 反应条件同 1.4.1。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,阳性 PCR 产物直接送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 溶藻弧菌的溶血实验结果

47株溶藻弧菌中有22株出现 α 溶血,其中包括溶藻弧菌标准株1.1587,1株出现 β 溶血(图1)。46株环境溶藻弧菌中溶血株出现的比率为47.8%(表1)。

2.2 *vah* 基因对溶藻弧菌溶血能力的影响

2.2.1 *vah* 基因的重组表达菌和溶藻弧菌 *vah* 基因缺失、回补株的溶血差异: *vah* 基因的重组表达菌 BL21-*vah1* 在血平板上表现出 α 溶血, *vah* 基因缺失突变株 Δ *vah*-ZJ051 无溶血, *vah* 基因回补株 ϕ *vah*-ZJ051 在血平板上显现明显的 α 溶血(图2)。由此可见, *vah* 基因的表达产物具有溶血能力, *vah* 基因的缺失直接导致溶藻弧菌的溶血能力丧失, 而溶藻弧菌重新获得 *vah* 基因后, 其溶血能力恢复。这些结果表明, *vah* 基因是造成溶藻弧菌溶血的直接原因或必要条件。

2.2.2 溶藻弧菌溶血差异株中 *vah* 基因的检测结果: 以 *uvh1/uvh2* 为引物, 采用 PCR 方法检测了

vah 基因在所有溶藻弧菌中的分布, 结果发现 47 株溶藻弧菌(包括溶血株和非溶血株)均能扩增出长度为 595 bp 的片段(图 3)。随机抽取 3 株细菌(HN041、E0666、E381)的 PCR 产物测序, 结果表明, 扩增的片段均来自于溶藻弧菌的 *vah* 基因。这一结果表明, 溶藻弧菌的溶血株和非溶血株均存在 *vah* 基因, 没有溶血能力的溶藻弧菌并非是因为缺失 *vah* 基因而不溶血。

2.3 不溶血和溶血的溶藻弧菌全长 *vah* 基因序列分析

通过扩增和克隆测序, 分别获得了不溶血株 E0601 和溶血株 ZJ051 的 *vah* 基因全长序列(GenBank: JX064517、JX064518), 序列分析发现不溶血株 E0601 和溶血株 ZJ051 的 *vah* 基因全长序列有95%以上的相似性, 氨基酸序列 100%相似, 且与公布的溶藻弧菌 12G01 株(NCBI: NZ_AAAPS00000000)氨基酸序列 100%相似。这一结果结合前述 2.2 部分的结果表明, 溶藻弧菌间溶血能力的差异并非是由 *vah* 基因的存在与否

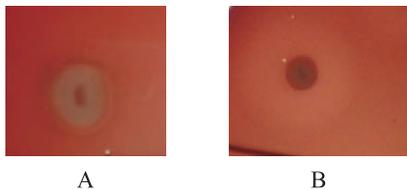


图1 溶藻弧菌 β 溶血(E333)与 α 溶血(ZJ051)现象
Fig. 1 Typical β hemolysis of *V. alginolyticus* E333 and typical α hemolysis of *V. alginolyticus* ZJ051
Note: A: E333; B: ZJ051.

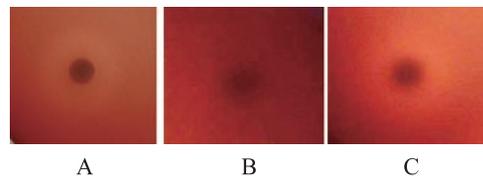


图2 BL21-*vah1*、 Δ *vah*-ZJ051 和 ϕ *vah*-ZJ051 溶血图
Fig. 2 The hemolysis of strains BL21-*vah1*, Δ *vah*-ZJ051 and ϕ *vah*-ZJ051
Note: A: BL21-*vah1*; B: Δ *vah*-ZJ051; C: ϕ *vah*-ZJ051.

表1 溶藻弧菌溶血活性检测结果
Table 1 Result of hemolysis of *V. alginolyticus*

溶血类型 Type of hemolysis	数量 Number	株号 Strain No.
α 溶血类 Typical α hemolysis	22	E0645、E0666、E236、E242、E259、E264、E269、E280、E381、A066、A139、ZJ051 (A056)、HN045、HN076、HN131、HN179、HN261、HN266、HN401、HN473、HN590、1.1587
β 溶血类 Typical β hemolysis	1	E333
非溶血类 Non-hemolysis	24	E0601、E0610、E0627、E06155、E167、E184、E208、E232、E233、E234、E235、E238、E239、E252、E265、E329、E330、E334、A017、A028、ZJ003、NA025、HN041、HN497

决定,也并非由 *vah* 基因自身差异引起。

2.4 不同菌株 *vah* 基因启动子区差异分析

对所有 47 株溶藻弧菌的 *asp* 基因和 *vah* 基因间区分析后发现, *vah* 基因上游包含一个完整的启动区,存在启动子常见的核糖体结合位点(Ribosome binding site, RBS)、-10 区和-35 区,此外还存在一个富含 AT 的 UP 元件区。其中不同溶血能力菌株 *vah* 基因的 RBS、-10 区和-35 区完全一致,其它区域也基本相同,只有 UP 元件区存在较大差别(图 4),溶血菌株的 UP 元件区第 188-190 个碱基均为 CCG (E0666、E381 和 ZJ051) 或 TCG (E0645、E333); 不溶血菌株(E0601、E0610 和 ZJ003)的 UP 元件区第 188-190 个碱基均为 TAA。

3 讨论

弧菌中存在多种溶血素基因,虽然已经证实

副溶血弧菌存在 *tdh*、*trh*、*tlh* 3 种溶血素基因,但是只有 *tdh* 和 *trh* 的功能得到证实,目前并未从实验角度证实 *tlh* 的溶血功能^[5]。有关溶藻弧菌溶血现象、溶血素基因的种类及其明确的功能未见报道,作为副溶血弧菌 *tlh* 基因的高度类似物,对溶藻弧菌 *vah* 基因功能的探索也有助于从理论水平预测副溶血弧菌 *tlh* 基因功能。

本文首先对华南沿海溶藻弧菌环境株和溶藻弧菌标准株 1.1587 的溶血现象进行了分析,其中溶藻弧菌标准株 1.1587 发现 α 溶血; 46 株溶藻弧菌环境株有 22 株出现溶血现象,溶血株出现的比率为 47.8%,说明环境溶藻弧菌株普遍存在溶血活性。为了深入探索 *vah* 基因对溶藻弧菌溶血性的贡献,我们分别构建了 *vah* 基因的大肠杆菌表达株 BL21-*vah*1 和 *vah* 基因缺失菌株 Δ *vah*-ZJ051 及回补菌株 ϕ *vah*-ZJ051,结果证明 BL21-*vah*1 能在 TSB 兔血平板上产生溶血,

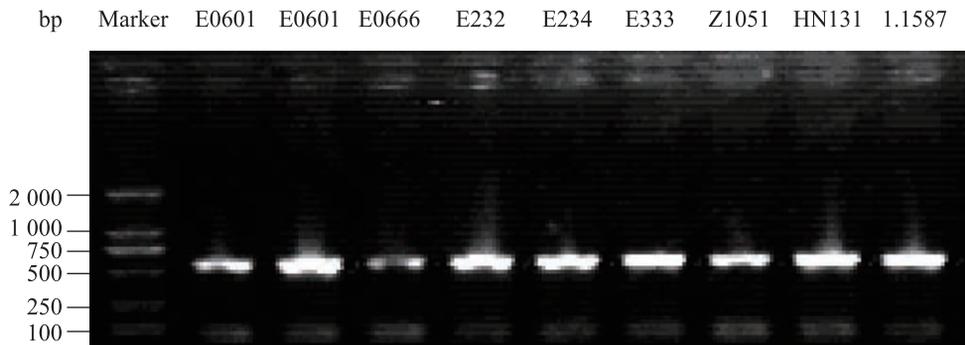


图 3 典型的溶藻弧菌中 *vah* 基因扩增电泳图

Fig. 3 Typical electrophoresis of PCR products from *vah* gene amplification of *V. alginolyticus*

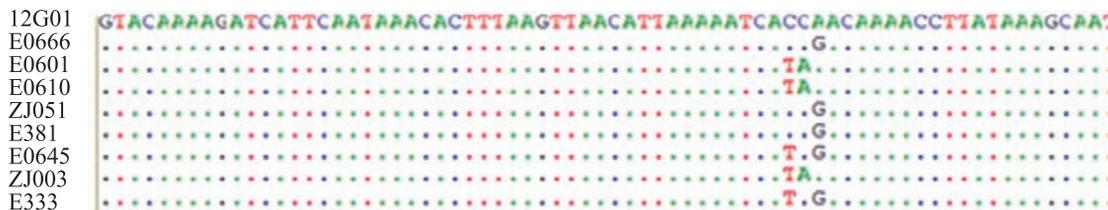


图 4 典型的具不同溶血能力菌株 *vah* 基因启动子区中 UP 元件区的差异

Fig. 4 The difference of the UP element of promoter region of the *vah* gene in typical strains that have different hemolytic ability

Δvah -ZJ051不溶血, 而 ϕvah -ZJ051溶血现象恢复, 说明 *vah* 基因是导致溶藻弧菌产生溶血的直接原因, 从而证实了 *vah* 基因的功能就是产生破裂血细胞的溶血素使其溶血。

进一步的实验则发现所有47株实验菌株中均存在*vah*基因, 且序列分析表明不溶血株E0601和溶血株ZJ051的*vah*基因编码氨基酸完全相同。此结果显示溶藻弧菌间溶血能力的差异不是由*vah*基因的存在与否或基因本身差异决定的, 因此*vah*基因存在与否并不能作为判断溶藻弧菌是否溶血的指标。因此, 这一结果提示溶藻弧菌毒力基因的携带株并非一定就表现出毒力。与这一结果类似的是, Xie等^[6]发现溶藻弧菌的毒力与毒力基因携带之间并没有相关性。因此, 我们在评估溶藻弧菌潜在的毒力时, 仅仅依靠毒力基因的存在与否是不准确的。

Okuda等^[7]研究证实, 在副溶血弧菌*tdh2*基因启动子序列中的两个位点(-24和-34)的不同导致了*tdh1*和*tdh2*基因不同的转录强度。在神奈川现象(KP)阴性菌中的*tdh1*基因相对于*tdh2*基因的启动子是关闭的, 这两个基因启动子序列的-24位点相同, 但-34位点不同, 因此对于KP阴性菌而言, 当启动子中-34位点改变后可以变成KP阳性菌。这说明启动子区的关键位点对于溶血素基因转录的影响是非常重要的。启动子(Promoter)是DNA中一段特定的核苷酸序列, 这段核苷酸序列是RNA聚合酶在转录起始时对模板DNA的识别部位, 也是转录起始时RNA聚合酶与模板DNA的结合部位, 是转录过程是否起始的决定部位。原核生物启动子共有5个保守区域: 起始位点(Transcription start site)、-10区、-35区、间隔区(The separation between -10 and -35 sequence)和UP元件(UP element)。其中-10区能影响转录起始的速度, -35区影响启动子对全酶的亲和性, UP元件是-35区上游40-60 bp范围内

的一段富含AT的DNA序列, 为RNA聚合酶提供了另外的作用位点, 起增强转录频率的作用。许多研究已证明, 核心启动子上游的序列能够在体内提高转录起始的效率^[8]。Josaitis等^[9]证明, 位于*E. coli* rRNA启动子*rrnB* P1 -35区上游的DNA序列即UP元件, 能够在体内和体外提高转录效率30倍。根据本文的实验结果结合以上启动子功能分析, 我们推测溶藻弧菌菌株间溶血能力的差异极可能与启动子区的差异有关。为了证实这一推测, 我们对47个溶血或不溶血的溶藻弧菌*vah*基因的启动子区及上游基因部分进行了扩增和测序, 并与GenBank中溶藻弧菌12G01相应部分进行了比对, 结果发现*vah*基因虽然均与碱性丝氨酸蛋白酶基因(位于*vah*上游)毗邻, 但其单独为一个操纵子, *vah*基因的上游存在*vah*基因独立的启动子区。*vah*基因启动子区具有与其它原核生物基因启动子区相同的特征: 起始位点、-10区、-35区和间隔区, 此外还包括一个UP元件区, 这是第一次在弧菌中报道基因的启动子区有UP元件存在。进一步分析发现, 不同溶血能力株的起始位点、-10区和-35区均完全相同, 唯一有区别的是UP元件区。当UP元件区的第188-190个碱基为CCG或TCG时, 菌株均能在血平板上溶血; 当UP元件区的第188-190个碱基为TAA时, 菌株均不能在血平板上产生溶血。这个结果提示我们, 不同菌株溶血能力的差异极有可能与启动子中UP元件区的第188-190个碱基相关。当然, 这一推测还需要采用其它实验手段(例如关键位点突变)来证实*vah*基因启动子区中UP元件区的功能及第188-190个碱基的功能。

参 考 文 献

- [1] Hörmansdorfer S, Wentges H, Neugebauer-Büchler K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria[J]. International Journal of Hygiene and

- Environmental Health, 2000, 203(2): 169-175.
- [2] 张灵芝, 闫冰, 曲桂娟. 一起溶藻弧菌引起的食物中毒事故的调查报告[J]. 医学动物防制, 2005, 21(4): 312-313.
- [3] 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酶活性的相关性[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 570-578.
- [4] 罗鹏, 胡超群. 溶藻弧菌溶血素基因反向 PCR 克隆及其原核表达[J]. 水产学报, 2009, 33(3): 410-416.
- [5] Zhang XH, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005(98): 1011-1019.
- [6] Xie ZY, Hu CQ, Chen C, et al. Investigation of seven *Vibrio virulence* genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(2): 202-207.
- [7] Okuda J, Nishibuchi M. Manifestation of the kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(3): 499-511.
- [8] Gourse RL, de Boer HA, Nomura M. DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination[J]. Cell, 1986, 44(1): 197-205.
- [9] Josaitis CA, Gaal T, Ross W, et al. Sequences upstream of the -35 hexamer of *rrnB* P1 affect promoter strength and upstream activation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1050(1/3): 307-311.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2013年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413