

含副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) *FlaI* 基因真核表达重组质粒的构建

周化民,王 军,苏永全*,丁少雄,鄢庆枇,张朝霞

(厦门大学海洋学系 亚热带海洋研究所,福建 厦门 361005)

摘要: 用 *Cl*₁ / *EcoR* 双酶切带有副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 极鞭毛蛋白 *FlaI* 基因的质粒 pMD18-*FlaI*, 回收目的基因片段, 插入到真核细胞表达载体 pIRESneo 同样经 *Cl*₁ / *EcoR* 切开的窗口中, 成功地将 *FlaI* 克隆到 pIRESneo 中, 获得有意义的重组质粒 pIRESneo-*FlaI*。构建的 pIRESneo-*FlaI* 真核表达重组质粒, 将为海水经济鱼类副溶血弧菌 DNA 疫苗的研制奠定基础。

关键词: 副溶血弧菌; *FlaI* 基因; 真核表达载体

中图分类号: Q 781

文献标识码: A

DNA 免疫 (DNA immunization) 又称基因免疫或核酸免疫, 是将编码某种抗原的基因序列与适当载体重组成哺乳动物表达质粒, 将其以 DNA 形式直接导入宿主体中, 使抗原基因在机体组织细胞内表达抗原蛋白来刺激机体产生免疫应答, 以达到免疫接种的目的。自从 1990 年 Wolff 等^[1]首次使用裸重组质粒 DNA 免疫动物成功后, DNA 疫苗研究已经成为当前的一个热点。目前已对病毒^[2~4]、细菌^[5]、寄生虫^[6]、肿瘤基因^[7]等进行了有益的尝试, 有的具有一定的效果。建立了包括鼠、猪、牛、猴、鸡、兔等的动物模型, 还对其免疫方法、接种剂量、免疫佐剂^[8]作了探讨, 但有关海洋弧菌 DNA 免疫至今未见公开报道, 因此, 我们开展了副溶血弧菌 DNA 免疫的工作。在复杂的鞭毛基因系统中, 目前还不清楚究竟哪一或哪一些基因产物是较好的免疫保护性抗原, 我们尝试从鞭毛丝及其相关基因入手构建一系列副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 鞭毛蛋白基因真核表达载体, 筛选最佳保护性抗原, 为海水经济鱼类副溶血

弧菌 DNA 疫苗的研制奠定基础。本文报道鞭毛蛋白基因之一 *FlaI* 基因真核表达载体 pIRESneo-*FlaI* 的构建。

1 材料与方法

1.1 材料

内切酶 *Cl*₁、*EcoR*、*EcoR* 及 T₄DNA 连接酶为大连宝生物工程有限公司产品, DNA 胶回收试剂盒为购自 Omega Bio-tek, Inc, 小量柱离心式质粒抽提试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品, 其他试剂均为分析纯或生物技术级 (Biotech grade)。

真核细胞表达载体 pIRESneo 购自 Clontech 公司, 由 CMV 早期启动子/增强子区 P_{CMV IE}、多克隆位点 MS、合成内含子 IVS、ECMV 的 IRES (Internal Ribosome Entry Site)、新霉素抗性基因 *neo^r* 及氨苄青霉素青霉素抗性基因 *Amp^r* 等部分组成 (图 1)。P_{CMV IE} 和 IRES 合作, 使得对于同一双顺反子, 核糖体既可以从 5 端翻译目的基因, 也可从 IRES 翻译抗性基因, 在这样的选择压力下, 转染的细胞能长期稳定表达目的基因。

质粒 pMD18-*FlaI*, 其副溶血弧菌极鞭毛蛋白 *FlaI* 基因由本室合成并克隆至 pMD18-T 载体上, 得到质粒 pMD18-*FlaI*, *FlaI* 基因两端分别有 *Cl*₁ 和 *EcoR* 位点。

收稿日期: 2001-10-09

基金项目: 国家“863”计划 (863-819-0212) 和福建省自然科学基金资助项目 (B0010004)

作者简介: 周化民 (1964 -), 男, 博士后。

* 通讯联系人, 电话: 0592-2181589, E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

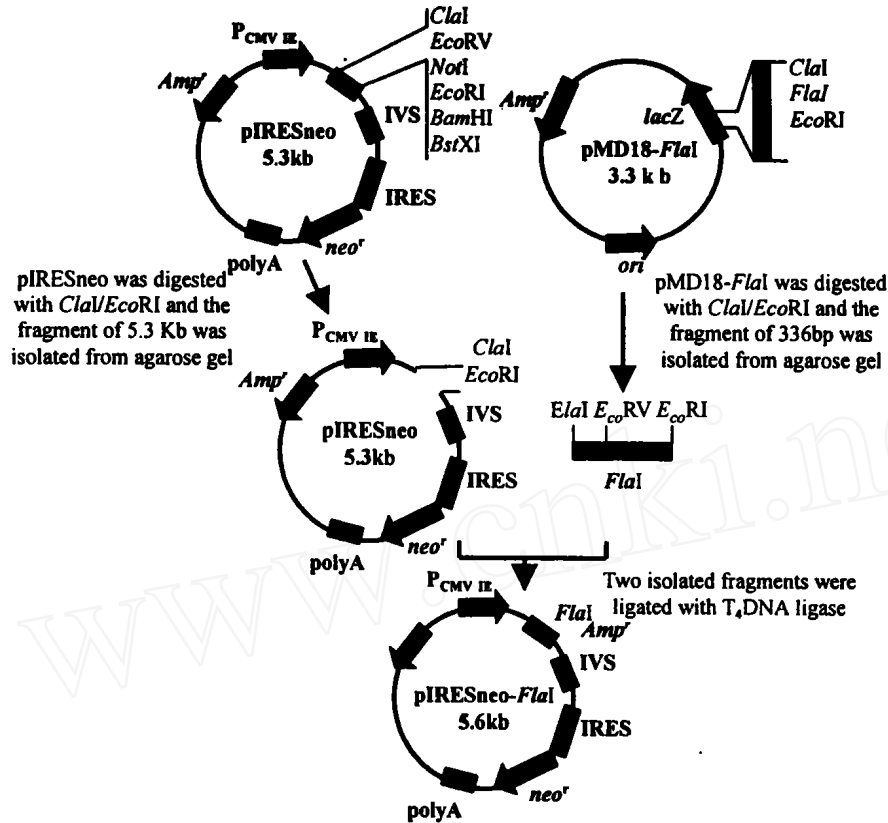


图1 pIRESneo-FlaI质粒构建示意图

Fig.1 Construction of the recombinant plasmid pIRESneo-FlaI

1.2 质粒和酶切片段的回收

参照文献[9]进行,略作改进.具体过程为,由于质粒pIRESneo之ClaI位点被dam甲基化酶甲基化,为了更好地消化该质粒,先将质粒转化一种非甲基化(dam⁻)的*E. coli* GM33感受态细胞,然后抽提质粒,用ClaI/EcoRI双酶切质粒DNA,琼脂糖电泳,DNA胶回收试剂盒回收线状载体pIRESneo.质粒pMD18-FlaI也用ClaI/EcoRI双酶切,琼脂糖电泳,胶回收试剂盒回收外源基因FlaI.

1.3 线状质粒载体与目的基因片段的连接

在反应管内加酶切后线状pIRESneo 200 ng、FlaI 200 ng、1 μL 10 × T₄DNA连接酶缓冲液,1 Weiss单位T₄DNA连接酶,然后加灭菌三蒸水至10 μL,16 °C温育20 h.同时设阴性对照连接反应.质粒构建过程见图1.

1.4 大肠杆菌感受态细胞的制备

感受态细菌JM109的制备及连接产物的转化参照文献[9]进行.

1.5 重组质粒的筛选鉴定

挑取转化培养板上的单菌落,氨苄青霉素阳性

LB培养基振荡培养后抽提质粒DNA,由于质粒DNA之ClaI位点此时已被甲基化,因此用FlaI基因内酶切位点EcoRI以及EcoRI作酶切鉴定.

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

用内切酶ClaI和EcoRI酶切质粒pIRESneo及质粒pMD18-FlaI获得线状5.3 kb的载体pIRESneo及约336 bp的FlaI片段.连接反应后的转化平板上可见有散在菌落生成.随机挑出单菌落培养并抽提质粒DNA,用EcoRI/EcoRI双酶切,若为重组质粒则可获得5.4 kb和220 bp两条电泳带.由于采用的是双酶切定向克隆,FlaI的插入肯定是正向的.以此筛选获得重组质粒,本文将命名为pIRESneo-FlaI(图2).

2.2 序列测定

全自动序列分析(上海生物工程有限公司完成)显示,pIRESneo-FlaI的插入片段为完全正确的副溶血弧菌极鞭毛蛋白FlaI基因. FlaI基因核苷酸及其编码的氨基酸序列见图3.

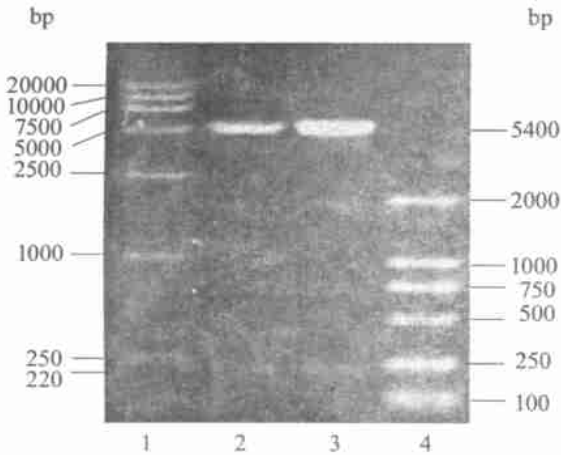


图2 重组质粒 pIRESneo-FlaI EcoR / EcoR 的酶切鉴定结果

1. DL2000 标准 DNA 分子; 2,3. EcoR / EcoR 双酶切质粒 pIRESneo-FlaI; 4. DL15000 标准 DNA 分子

Fig. 2 Characterization of pIRESneo-FlaI by EcoR / EcoR digestion

3 讨论

副溶血弧菌是海水鱼虾类重要病原菌之一^[10], 其致病菌株还能引起人类食物中毒^[11]. 副溶血弧菌有三类抗原: H 抗原(鞭毛抗原)、K 抗原(表面抗原)、O 抗原(菌体抗原), 其鞭毛抗原为所有菌株的共同抗原. 副溶血弧菌有两个鞭毛系统: 当生活在底物表面或粘性环境中, 细菌表达周生鞭毛系统^[12];

当生活在底物表面或非粘性的液体中, 细菌表达极鞭毛系统^[13]. 遗传分析指出两者的基因系统不同, 其结构和装配成分并不分享^[14]. 副溶血弧菌极鞭毛约有 57 个基因和 3 个开放读码框编码^[15], 其 FlaI 基因开放读码框为 306 bp, 编码蛋白大小类似于大肠杆菌 fliT 基因产物, 与其它种菌鞭毛相比无类似物. 可见副溶血弧菌鞭毛基因系统复杂, 可能要几个基因产物才能起到免疫保护作用.

本实验用内切酶 Cla 和 EcoR 酶切质粒 pIRESneo 及质粒 pMD18-FlaI, 连接反应后转化大肠杆菌 JM109, 挑取单菌落培养, 此时连接反应所恢复的质粒 DNA Cla 位点被甲基化, 而 pIRESneo 质粒自身的 EcoR 位点由于用 Cla / EcoR 双酶切时, 此位点已被切除, 因此用 FlaI 基因内酶切位点 EcoR 以及 EcoR 作双酶切鉴定. 这样, 只有重组质粒经 EcoR / EcoR 双酶切时才可获得 5.4 kb 和 220 bp 两条电泳带. 由于采用的是双酶切定向克隆, 将副溶血弧菌 FlaI 基因插入到 pIRESneo 载体的 Cla / EcoR 窗口中, FlaI 的插入肯定是正向的. 因此, 本实验成功地构建了重组质粒 pIRESneo-FlaI (图 1). 由于副溶血弧菌鞭毛基因系统复杂, 我们还将克隆和构建若干个副溶血弧菌鞭毛基因的真核表达载体, 然后单独或组合这些基因的真核表达载体免疫海水重要经济鱼类, 建立副溶血弧菌极鞭毛基因免疫鱼类模型, 寻找最佳保护性抗原, 最终研制出副溶血弧菌 DNA 疫苗, 为鱼类弧菌病预防寻找新的

	M	Q	N	E	L	I	E	I	S	D	I	D	Q	L	I	T	Amino Acid	
ATC	GAT	ATG	CAA	AAT	GAA	CTC	ATA	GAA	ATT	AGT	GAT	ATA	GAT	CAA	CTA	ATT	ACG	Nucleotide
Q	E	L	E	K	V	D	F	N	T	E	E	I	L	R	L	V	D	Amino Acid
CAA	GAG	CTG	GAA	AAA	GTT	GAC	TTT	AAT	ACT	GAA	GAA	ATT	CTT	CCC	TTG	GTC	GAT	Nucleotide
I	R	E	R	L	L	Q	N	L	L	P	I	I	Q	Q	N	P	L	Amino Acid
ATC	AGG	GAA	CGG	TTA	TTG	CAA	AAC	CTG	TTA	CCA	ATT	ATT	CAA	CAA	AAT	CCC	TTG	Nucleotide
V	K	Q	D	V	E	W	Q	D	L	L	T	R	T	K	R	I	V	Amino Acid
GTA	AAG	CAG	GAT	GTA	GAG	TGG	CAA	GAC	TTG	CTG	ACT	CGT	ACC	AAA	AGA	ATT	GTC	Nucleotide
E	L	M	Q	S	E	T	S	K	V	G	K	E	L	H	K	F	R	Amino Acid
GAG	CTG	ATG	CAA	TCA	GAA	ACG	TCA	AAG	GTC	GGA	AAA	GAG	CTT	CAC	AAA	TTC	CGT	Nucleotide
Y	G	Q	R	S	L	Q	Q	Y	K	K	F	I		H	H	H	H	Amino Acid
TAT	GCC	CAA	CGT	TCG	CTT	CAG	CAG	TAC	AAA	AAA	TTT	ATT	TAA	CAT	CAT	CAT	CAT	Nucleotide
H	H																	Amino Acid
CAT	CAT	GAA	TTC															Nucleotide

图3 副溶血弧菌 FlaI 基因核苷酸及其编码的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and coded amino acid sequence of FlaI from Vibrio parahaemolyticus

更有效的方法. 可见, pIRESneo-*FlaI* 真核表达载体的构建是副溶血弧菌 DNA 疫苗工作的基础之一.

参考文献:

- [1] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. *Science*, 1990, 247: 1 465 - 1 468.
- [2] Lagging L M, Meyer K, Hoft D, et al. Immuneresponse to plasmid DNA encoding the Hepatitis C virus core protein[J]. *J Virol*, 1995, 69:5 859 - 5 863.
- [3] Xiang Z Q, Spitalnik S, Tran M, et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the Rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against Rabies virus[J]. *Viriology*, 1994, 199(1):132 - 140.
- [4] 郭仁锋,孙蕾,程云,等. HBsAgS 与 GM CSF 融合基因在 L929 细胞中的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, 15(4):259 - 262.
- [5] 姬新颖,杨为松,王海涛. 基因免疫研究的最新进展[J]. *国外医学病毒学分册*, 1999, 6(1):6 - 9.
- [6] 谢文凯,陈启宇,王群斌,等. 重组恶性疟原虫 DNA 质粒免疫小鼠及抗原表达的调控[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1):39 - 42.
- [7] 卢方安,杨洁,罗超权,等. 癌胚抗原 cDNA 真核表达重组质粒的构建[J]. *邵阳医学院学报*, 1999, 18(2):63 - 65.
- [8] 张彤,张光磊,阮丽荣,等. 细胞因子对乙肝病毒基因疫苗诱导产生抗体的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*. 1997, 10(6):421 - 424.
- [9] 萨姆布鲁布 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁,黎孟枫译. 北京:科学技术出版社,1992. 1 - 320.
- [10] 陈奖励,何昭阳,赵文. 水产微生物学(第一版)[M]. 北京:农业出版社,1993. 363 - 370.
- [11] Blake P A, Weaver R E, Hollis D G. Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios[J]. *Annu. Rev. Microbiol*, 1980, 34:341 - 367.
- [12] Mccarter L L, Wright M E. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *J. Bacteriol.*, 1993, 175:3 361 - 3 371.
- [13] Mccarter L L. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J. Bacteriol.*, 1995, 177:1 595 - 1 609.
- [14] Mccarter L L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J. Mbl. Microbiol. Biotechnol*, 1999, 1: 51 - 57.
- [15] Yur-kyeong Kim, Linda L Mccarter. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J. Bacteriol.*, 2000, 182(13):3 693 - 3 704.

Construction of Eukaryotic Expression Recombinant Plasmid of *FlaI* Gene from *Vibrio parahaemolyticus*

ZHOU Hua-min, WANG Jun, SU Yong-quan,

DING Shao-xiong, YAN Qing-pi, ZHANG Zhao-xia

(Dept. of Oceanog. and Instit. of Subtropical Oceanog., Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: The plasmid pMD18-*FlaI* containing the polar flagellar protein *FlaI* gene of *Vibrio parahaemolyticus* was digested with *Cla* / *EcoR*, and *FlaI* fragment was recovered and inserted into the eukaryotic expressing vector pIRESneo, which was also digested with *Cla* / *EcoR*. After ligation with ligase, *FlaI* was successfully cloned into pIRESneo, and the significant eukaryotic expression recombinant plasmid pIRESneo-*FlaI* was obtained, which will be used for future gene vaccination.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *FlaI* gene; eukaryotic expression recombinant plasmid