

## \* 研究简报 \*

# 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) *FlaI* 基因的合成及其克隆与鉴定\*

周化民 苏永全\*\* 王军 张纹 鄢庆枇 池信才

厦门大学海洋学系, 亚热带海洋研究所, 厦门 361005

**摘要** 根据副溶血弧菌野生型菌株 BB22 *FlaI* 基因 cDNA 序列, 通过合理的引物设计、链延伸反应、PCR 反应以及分子克隆等技术, 成功地合成出编码极鞭毛蛋白的 *FlaI* 基因全长片段, 并将其克隆至 pMD18-T 载体质粒上。序列分析和酶切鉴定显示 *FlaI* 基因得到了正确的合成和克隆。

**关键词** 副溶血弧菌 *FlaI* 基因 合成 克隆与鉴定

DNA 免疫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。DNA 免疫是近年来兴起的制备疫苗的最新方法。目前已对病毒、细菌、寄生虫、肿瘤基因等进行了有益的尝试, 尤以病毒和肿瘤基因开展的工作最多<sup>[1]</sup>。但有关海洋弧菌 DNA 免疫未见有公开的报道, 而副溶血弧菌是海水鱼虾类重要病原菌之一<sup>[2]</sup>, 因此, 我们开展了副溶血弧菌 DNA 免疫的工作。副溶血弧菌鞭毛基因系统复杂, 其极鞭毛约有 57 个基因和 3 个开放读码框编码<sup>[3-7]</sup>, 可能要几个基因产物才能起到免疫保护作用, 我们将克隆和构建若干个副溶血弧菌极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

新的更有效的方法。本文首先化学合成和克隆副溶血弧菌极鞭毛蛋白 *FlaI* 基因, 用于构建 *FlaI* 基因真核表达载体。可见, *FlaI* 基因合成和克隆是副溶血弧菌 DNA 疫苗工作的基础之一。

## 1 材料和方法

### 1.1 引物设计与合成

根据副溶血弧菌野生型菌株 BB22 *FlaI* 基因 306bp cDNA 序列 (GenBank Accession No: AF069392)<sup>[7]</sup>, 设计 6 条引物, 其中正向引物 3 条 (分别命名为 F1, F2, F3), 反向引物 3 条 (分别命名为 R1, R2, R3)。每条引物平均长 70 bp, 其中 F1 和 F2, F2 和 F3, F3 和 R3, R3 和 R2, R2 和 R1 有约 20 bp 的重复部分。F1 5' 端加有 *Cla* I 位点 ATCGAT, R1 5' 端加有 6 个组氨酸密码子 CATCATCATCATCAT 和 *Eco*R I 位点 GAATTC (表 1)。所以合成的核苷酸序列全长共 336bp。6 条引物分别在全自动 DNA 合成仪上合成。

表 1 *FlaI* 基因合成引物核苷酸序列

名称	核苷酸序列
F1	ATCGATATGCAAAATGAACTCATAGAAATAGTGATATAGATCAACTAATTACGCAAGAGCTGGAAAAAG
F2	TACGCAAGAGCTGGAAAAAGTTGACTTTAATACTGAAGAAATCTTCGCTTGGTCGATATCAGGGAACGGTTATTGCAAA
F3	CAGGGAACGGTTATTGCAAAACCTGTTACCAATTATCAACAAAAATCCCTTGGTAAAGCAGGATGTAGAGTGCCAAGACT
R1	GAATTCATGATGATGATGATGATGTTAAATAAAATTTTTTGTACTGCTGAAGCGAACGTTGGCCATA
R2	TGAAGCGAACGTTGGCCATAACGGAATTTGTGAAGCTCTTTCCGACCTTTGACGTTTCT
R3	TTCCGACCTTTGACGTTTCTGATTGCATCAGCTCGACAATCTTTTGGTACGAGTCAGCAAGTCTTGCCACTCTACATCC

2001-04-16 收稿, 2001-05-22 收修改稿

\* 福建省自然科学基金(批准号: B001004)和国家“八六三”(批准号: 863-819-0212)项目资助

\*\* 联系人, E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

## 1.2 Taq 酶聚合反应

链延伸反应体系为: F3 和 R3 各 5  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu$ L, dNTP 16  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 63  $\mu$ L. 置 94 $^{\circ}$ C, 10 min 后于 55 $^{\circ}$ C 加 Taq 酶 1  $\mu$ L 后保温 5 min, 然后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 获得命名为 Frag I 的反应液.

第 1 次 PCR 反应体系为: F2 和 R2 各 1  $\mu$ L, Frag I 1  $\mu$ L, dNTP 10  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu$ L, 10 $\times$  Taq 酶 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 76  $\mu$ L. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 共 30 个循环, 获得的 PCR 产物命名为 Frag II.

第 2 次 PCR 反应体系为: F1 和 R1 各 1  $\mu$ L, Frag II 1  $\mu$ L, dNTP 10  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu$ L, 10 $\times$  Taq 酶 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 76  $\mu$ L. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 共 30 个循环, 获得的 PCR 产物经乙醇沉淀后溶解于 100  $\mu$ L 的 TE 缓冲液中, 命名为 Frag III.

连接反应体系为: Frag III 2  $\mu$ L, pMD18-T 1  $\mu$ L (约 50 ng), H<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L, T<sub>4</sub> DNA 连接酶 5  $\mu$ L, 16 $^{\circ}$ C 保温 30 min. 连接液全量转化 *E. coli* JM109 感受态细胞.

随机挑出转化平板上单菌落培养并抽提质粒 DNA, 经 *Cla* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定是否获得重组质粒. 对含重组质粒菌落重新培养, 提取质粒进行 DNA 测序.

## 2 结果和讨论

尽管寡聚核苷酸化学合成每步缩合反应产率可高达 98% 以上, 但为了提高寡聚核苷酸的产率, 合成的寡聚核苷酸不宜太长. 因此 *Fla*I 基因分成 6 个片段分别合成, 由于其相邻两片段间核苷酸有一定

的重复, 所以通过 PCR 酶促合成得到 *Fla*I 基因全长序列, 它的双链 3' 端都带有一突出的核苷酸 A, 由 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接到 3' 端带有一突出的核苷酸 T 的 pMD18-T 载体上. 连接后的反应液转化 *E. coli* JM109 感受态细胞. 转化平板上有分散的 *E. coli* JM109 阳性菌落生成, 可见合成的 *Fla*I 基因外源片段已插入 pMD18-T 载体中.

随机挑出了 6 个单菌落培养并提取质粒 DNA, 用 *Cla* I 和 *Eco*R I 酶切, 5 个菌落中有 2.96 kb 和 336 bp 两条电泳带. 表明合成的 *Fla*I 基因大小正确 (图 1).

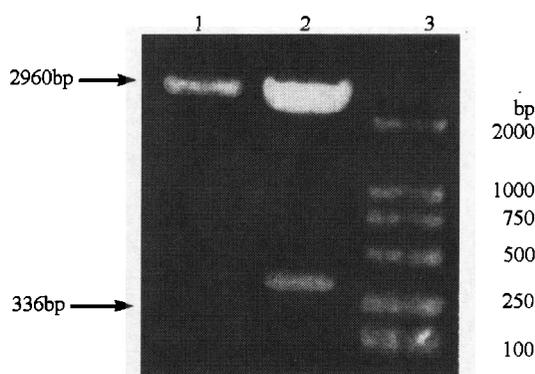


图 1 重组质粒 pMD18-*Fla*I 的 *Cla* I / *Eco*R I 酶切鉴定结果

1. pMD18-T 载体 (2.96 kb);
2. pMD18-*Fla*I 重组质粒 *Cla*I/*Eco*RI 双酶切;
3. DL2000 DNA 分子量参照物

全自动序列分析显示, pMD18-*Fla*I 的插入片段为完全正确的副溶血弧菌极鞭毛蛋白 *Fla*I 基因 (图 2). 本文将其命名为 pMD18-*Fla*I.

```

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

```

图 2 副溶血弧菌 *Fla*I 基因核苷酸及其编码的氨基酸序列

应用人工合成的方法克隆基因, 优点在于快速(一般只需2~3个星期)、准确, 而且可以根据需要对密码子进行大规模改造, 提高外源基因的表达水平或为表达产物的纯化与检测提供便利的条件. 一般情况下, 克隆已知基因也可使用PCR或RT-PCR, 但由于Taq酶的特点, 扩增有可能出现碱基错配; 而RT-PCR, 还需要严格mRNA的制备和cDNA合成技术; 另一方面, 不同的表达系统对同义密码子的使用频率有很大差别, 高水平表达的基因有不正常比例的同义密码子与相应丰富的tRNA<sup>[8]</sup>, 如毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统, 因此, 克隆得到的基因有可能不适合在某一特定表达系统中表达. 通过体外定点突变技术来修改密码子, 如果修改的密码子较多, 会异常费时费力.

在我们的实验中, 从连接反应后的转化平板上随机挑出单菌落, 经培养后, 抽提质粒DNA, 用内切酶Cla I和EcoR I酶切质粒DNA, 获得线状的2.96 kb的载体pMD18及预计的约336bp的Fla I片段两条电泳带, 且序列分析显示, pMD18-Fla I的插入片段序列完全正确, 可见Fla I基因得到了正确的合成和克隆, 另外, 对Fla I来讲, 由于没有相应的抗体来检测表达的产物, 应用人工合成的方法我们在其基因下游非常方便地增加6个组氨酸密

码子, 6个组氨酸可以和金属离子形成络合物, 可用于其表达产物的纯化与检测. 目前, 还不了解鱼类细胞的密码子偏爱性, 我们未对Fla I基因密码子作修改. Fla I基因的正确合成和克隆为Fla I基因亚克隆入表达载体奠定了基础.

### 参 考 文 献

- 1 姬新颖, 等. 基因免疫研究的最新进展. 国外医学病毒学分册, 1999, 6(1): 6
- 2 陈奖励, 等. 水产微生物学. 北京: 农业出版社, 1993. 363~370
- 3 McCarter L L, et al. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol, 1993, 175: 3361
- 4 McCarter L L. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol, 1995, 177: 1595
- 5 Shinoda S, et al. Antigenic difference between monotrichous and peritrichous flagella of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol, 1974, 120: 923
- 6 McCarter L L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999, 1: 51
- 7 Kim K. et al. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol, 2000, 182(13): 3693
- 8 陈士怡. 酵母遗传学. 北京: 科学出版社, 1989. 62~88