

坎氏弧菌热不稳定溶血素基因的克隆表达、蛋白纯化及其活性

孙婧, 孙铂光, 贾爱荣, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 坎氏弧菌 (*Vibrio campbellii*) 是水产养殖动物的重要致病菌。本研究构建了坎氏弧菌热不稳定溶血素 (TLH) 基因的重组表达质粒 pET26b(+)/*tlh*, 并转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达带有 6 个组氨酸的 TLH 融合蛋白, 然后利用 Ni 琼脂糖亲和层析柱进行纯化。SDS-PAGE 分析显示, 该溶血素能够大量表达, 分子量约为 42 kD。纯化的 TLH (0.41 mg/mL) 具有较强的溶血活性 (溶血圈直径为 16 mm) 及磷脂酶活性 (晕圈直径为 15 mm)。其溶血活力的最适温度为 37 ℃, 在 75 ℃ 下培养 30 min 即丧失活力; 最适 pH 为 6, pH 大于或小于 6 时都会导致其稳定性下降; 一价金属离子如 Na^+ 、 K^+ 对溶血活性几乎没有影响, 而部分二价金属离子如 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 会导致溶血活性降低。本研究结果对阐明坎氏弧菌的致病机理及基因工程疫苗开发有重要意义。[中国水产科学, 2010, 17(4): 745–752]

关键词: 坎氏弧菌; 溶血素; TLH; 表达; 蛋白纯化; 溶血活性

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-2010(04)-0745-08

细菌性病害是制约现代高密度海水养殖业持续发展的一大障碍, 其中又以弧菌病害居多^[1-3]。坎氏弧菌 (*Vibrio campbellii*) 是一种革兰氏阴性、兼性厌氧的海洋细菌, 可以感染养殖对虾, 引起养成期对虾暴发红腿病 (red leg-disease)^[4-7]。水温达到 16 ℃ 以上时, 还可引起细菌性败血症 (pyosepticemia), 且水温越高患病对虾的死亡率越高, 是养对虾业的主要流行病害之一^[8]。此外, 坎氏弧菌还与养殖幼鱼的发病密切相关^[9]。迄今, 坎氏弧菌的致病机理还不太清楚。由于坎氏弧菌给海水养殖业造成了巨大的经济损失, 因此对坎氏弧菌致病因子的研究具有重要的理论及现实意义。

弧菌是海洋环境中最常见的细菌类群之一, 其致病因子和致病机理多种多样, 主要包括吸附和侵入宿主组织, 通过分泌溶血素、蛋白酶、磷脂酶及脂多糖损伤宿主组织器官等^[1]。其中, 溶血素又被认为

是许多病原菌的主要致病因子, 也是致病弧菌中分布最为广泛的毒素之一^[10], 能导致红细胞膜破裂发生溶血, 在病原弧菌致病过程中发挥重要作用^[11-13]。

目前已经发现海洋弧菌中有 5 类具有代表性的溶血素家族^[10]。前期研究中王淑娟等^[10]利用 Southern Blot 技术, 检测了这 5 类溶血素基因在海洋弧菌中的分布, 发现坎氏弧菌与哈维氏弧菌的哈维氏弧菌溶血素 (VHH) 基因探针有强杂交信号。VHH 属于热不稳定性溶血素 (TLH), 也称为卵磷脂性溶血素, 在 60 ℃ 加热 10 min 即失去活性^[15], 且具有磷脂酶 B 活性^[16]。坎氏弧菌 VIB285 的 TLH 的核苷酸序列与哈维氏弧菌 VIB645 的 *vhhA* 和 *vhhB* 的相似性分别为 79.81% 和 79.73%^[14, 17], 其氨基酸序列与 VHH 的相似性为 85%, 且均在 147 ~ 406 位氨基酸处有一个脂酶结构域 (Lipase_GDSL), 故 TLH 可能也是一种磷脂酶。目前对哈维氏弧菌溶血素 (VHH) 的性质及其致病性

收稿日期: 2009-10-27; 修订日期: 2009-12-25.

基金项目: 国家自然科学基金委与香港研究资助局 (NSFC-RGC) 联合科研基金项目 (30831160512); 教育部科学技术研究重点项目 (108082)。

作者简介: 孙婧 (1985-), 女, 硕士研究生; 研究方向: 海洋微生物学。

通讯作者: 张晓华 (1965-), 女, 博士, 教授, 从事海洋微生物学和海水养殖动物病害研究。E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

已经有了较为系统的研究^[18-19],然而对坎氏弧菌溶血素TLH的了解较少,需要更为深入的研究。本研究克隆了坎氏弧菌的TLH基因,构建了其表达载体pET-26b(+)/*tlh*,对诱导表达的溶血素进行了纯化,并对其生物学性质进行研究,旨在为坎氏弧菌致病机理的研究及其病害防治提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

坎氏弧菌VIB 285由英国Heriot-Watt大学生物学系提供,在比利时根特大学微生物实验室菌种保藏中心的保藏号为LMG 11216^T。大肠杆菌JM109(New England Biolaboratories, USA)用来转化、贮存和扩增重组质粒。克隆载体pUCm-T购自上海生工生物工程有限公司。表达载体pET26b(+)(C末端含His标签)和大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)购自Novagen(USA),用于蛋白过量表达。

1.2 主要试剂与仪器

2216E培养基用于培养坎氏弧菌VIB 285, LB培养基用于常规培养大肠杆菌。利用牙鲆红细胞配置血平板,用蛋黄配置卵磷脂平板。

Ex *taq* DNA聚合酶、dNTP、IPTG及各种限制性内切酶(大连宝生物工程有限公司);Ni琼脂糖亲和柱(Novagen)。

I-Mupid电泳仪(COSMO BIO CO., LTD);凝胶成像仪(BIO-BEST);UV-2102PC分光光度计(Unico);PE2400型PCR仪(Applied Biosystem);蛋白电泳仪(Bio-Rad)。

1.3 TLH溶血素基因的克隆及表达载体的构建

根据坎氏弧菌TLH溶血素基因的核苷酸序列(GenBank: DQ356918.1),设计1对特异性引物:上游引物VCAF2: 5'-CGGAATTCATGAATAAGACCATTACGTTACTTAGT-3',下游引物VCAR2: 5'-CGCTCGAGGAATGGATGATTCGAAAGTTGGTC-3'。上游引物起始于起始密码子,在5'端加入*Eco*RI限制性酶切位点(加下划线处);下游引物终止于终止密码子前,在5'端加入*Xho*I限制性酶切位点(加下划线

处)。以坎氏弧菌VIB 285的基因组DNA为模板扩增*tlh*基因,产物为1 276 bp。将*tlh*的PCR扩增产物和质粒pET-26b(+)分别用*Eco*RI和*Xho*I于37℃酶切1.5 h,用DNA凝胶回收试剂盒纯化*tlh*和pET-26b(+)的酶切片段。将纯化后的*tlh*和pET-26b(+)用T4 DNA连接酶于16℃连接16 h,重组质粒转化大肠杆菌JM 109,在LB-Kan(含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基)上培养16 h,随机挑取单克隆,扩大培养8 h后提取质粒DNA,用*Eco*RI和*Xho*I双酶切鉴定阳性克隆,命名为pET-26b(+)/*tlh*。将pET-26b(+)/*tlh*转化大肠杆菌表达菌株BL21(DE3),重组菌命名为BL21(DE3)/pET-26b(+)/*tlh*。

1.4 TLH溶血素在大肠杆菌中的诱导表达

将重组菌BL21(DE3)/pET-26b(+)/*tlh*及转入空载体的BL21(DE3)对照菌BL21(DE3)/pET-26b(+)接种于5 mL LB-Kan液体培养基中,37℃振荡过夜培养。次日各取500 μL菌液分别接入2管含有5 mL相同培养基的试管中继续培养2~3 h(OD₆₀₀约0.6)后,将重组菌和转入空载体的对照菌各取一管加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,另一管重组菌作为对照不加入IPTG,于37℃振荡培养3 h,分别取菌液1 mL,5 000 g离心10 min,收集菌体。

1.5 SDS-PAGE检测

取上述诱导表达的重组菌及对照组菌体,按比例与5×上样缓冲液混合,100℃水浴3~5 min。配制12%的SDS-PAGE分离胶和5%的浓缩胶,取12 μL加样于凝胶,在浓缩胶中15 mA,分离胶中30 mA进行SDS-PAGE^[20]恒流电泳,以分子量约为43 kD的VHH作对照,电泳结束后将凝胶用聚丙烯酰胺凝胶染色液染色。

1.6 TLH溶血素大量表达及纯化

挑取BL21(DE3)/pET-26b(+)/*tlh*单克隆接种于5 mL LB-Kan液体培养基,过夜培养。次日接入495 mL相同培养基,同样条件下培养2~3 h。当OD₆₀₀达0.6时加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,25℃继续培养6 h。在4℃10 000 g离心30 min,收集菌体。用30 mL的1×Ni柱结合缓冲液重悬菌体,

将细胞悬液置于冰浴中用超声波处理 30 min, 4 ℃ 10 000 g 离心 30 min, 收集上清液。将上清液过 Ni 琼脂糖亲和柱和层析柱, 使用含不同浓度咪唑的洗涤缓冲液逐步除去杂蛋白, 再用 50 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱目的蛋白, 将纯化蛋白置于透析袋中 4 ℃ 透析 24 h, 蛋白透析液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.85% NaCl (W/V), 10% (V/V) 甘油。用 SDS-PAGE 进行蛋白质纯度鉴定, 蛋白质含量用 Bradford 法^[21]测定, 以牛血清蛋白为标准。

1.7 TLH 溶血素的溶血活性检测

抽取健康牙鲆的新鲜血液, 用 20 mmol/L Tris 盐溶缓冲液 (TBS, pH 7.5,) 洗涤 3 次 (2 000 g 4 ℃ 离心 3 min), 最后用 TBS 配制成 10% 的红细胞悬液。将 17 mL 55 ℃ 的 LB 固体培养基和 3 mL 10% 牙鲆红细胞悬液混合, 配置新鲜的鱼血平板。血平板上放置牛津杯, 向杯中加入 80 μL 纯化的蛋白于 16 ℃ 过夜, 以蛋白透析液为阴性对照。

1.8 TLH 溶血素的磷脂酶活性检测

将 55 ℃ 的 LB 固体培养基加入终浓度 1 % 的新鲜卵黄, 配置卵磷脂平板。平板上放置牛津杯, 向杯中加入 80 μL 纯化的蛋白于 37 ℃ 过夜^[22], 以蛋白透析液为阴性对照。

1.9 TLH 溶血素的溶血活力测定

在 96 孔板中, 以终质量分数为 2% 的牙鲆红细胞为底物测定 TLH 溶血素的溶血活力。取 100 μL 两倍稀释的 TLH 和等体积的 2% 红细胞悬液混合, TBS 作为阴性对照。将 96 孔板置于 37 ℃ 反应 1 h, 计算红细胞溶血一半时的稀释度, 即为溶血滴度。

1.10 温度对 TLH 溶血素溶血活力的影响

TLH 溶血素用 TBS 两倍稀释于 96 孔板中, 加入等体积 2% 红细胞悬液。分别在 4 ℃、16 ℃、25 ℃、37 ℃ 和 45 ℃ 孵育 1 h, 记录引起溶血的 TLH 稀释度, 测定其最适温度。另外将 TLH 在 4 ℃、16 ℃、25 ℃、37 ℃、45 ℃、55 ℃ 和 75 ℃ 孵育 30 min, 测定其溶血滴度, 确定 TLH 在各温度下的稳定性, 即其对不同温度的耐受程度。

1.11 pH 对 TLH 溶血素溶血活力的影响

10 μL TLH 溶血素与 90 μL (v/v, 1:9) pH 6 ~ 11

的缓冲液混合, 并分别两倍稀释于 96 孔板, 加入等体积 2% 红细胞悬液, 确定 TLH 的最适 pH。另外将 20 μL 的 TLH 溶血素与 pH 4 ~ 11 的缓冲液按上述同样的比例混合, 4 ℃ 反应 12 h, 测定其溶血滴度, 确定 TLH 溶血素的 pH 稳定性, 即其对不同 pH 的耐受程度。使用的 pH 缓冲液为: 20 mmol/L 柠檬酸钠/柠檬酸 (pH 4 ~ 6), 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7 ~ 9) 以及 20 mmol/L 碳酸氢钠/氢氧化钠 (pH 10 ~ 11)。

1.12 金属离子对 TLH 溶血素溶血活力的影响

各种金属离子用 TBS 配制。将不同浓度的金属离子与 TLH 溶血素混合 (v/v, 1:1), 测定其溶血滴度。

2 结果与分析

2.1 pET-26b(+)/tlh 表达质粒的构建及鉴定

为过量表达 TLH, 将坎氏弧菌 TLH 溶血素基因克隆到表达载体 pET-26b(+) 的 *EcoRI* 和 *XhoI* 位点之间, 构建出表达质粒 pET-26b(+)/tlh。其双酶切结果如图 1 所示, 其中 5.31 kb 处的片段是载体 pET-26b(+), 1.26 kb 处的片段是坎氏弧菌溶血素基因 *tlh*, 表明 *tlh* 已成功插入到表达载体中。阳性重组质粒送入上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果与坎氏弧菌 TLH 溶血素基因序列 (GenBank: DQ356918.1) 进行比对, 证实两者的序列完全一致。

2.2 坎氏弧菌 TLH 的诱导、表达及纯化

将重组表达质粒 pET-26b(+)/tlh 转化到大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃ 诱导 3 h。加入 IPTG 诱导后的重组菌株, 与未加 IPTG 诱导的重组菌株以及加入 IPTG 诱导的转化有空质粒菌株相比较, 其菌体蛋白在 SDS-PAGE 图谱中有一条明显增粗的、42 kD 左右的特异表达蛋白带 (图 2), 说明目的蛋白在表达菌株中得到了高效表达。SDS-PAGE 电泳分析纯化的 TLH 溶血素为单一的蛋白带, 分子量 42 kD 左右 (图 2), 略小于 VHH 溶血素 (43 kD 左右)。同时由图 2 可见, 等量菌液纯化出的 TLH 溶血素的浓度远小于 VHH 溶血素的浓度, 说明 TLH 溶血素纯化效率较低。Bradford 法测得纯化的 TLH 溶血素的浓度为 0.41 mg/mL。

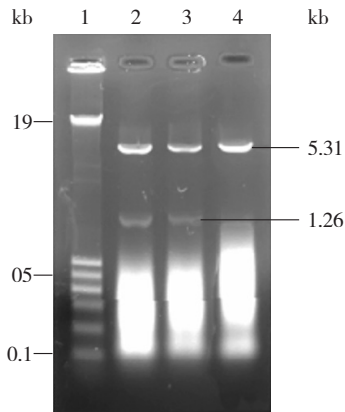


图1 pET-26b(+)*tlh*表达质粒的*Eco*RI和*Xho*I双酶切图谱
1. DNA marker; 2,3. 构建的表达载体pET-26b(+)*tlh*; 4. 空载体pET-26b(+).

Fig.1 Restriction profiles of the recombinant plasmid pET-24d(+)*tlh* digested with *Eco*RI and *Xho*I
1. Wide range DNA ladder marker; 2,3. the recombinant plasmid pET-26b(+)*tlh*; 4. plasmid pET-26b(+).

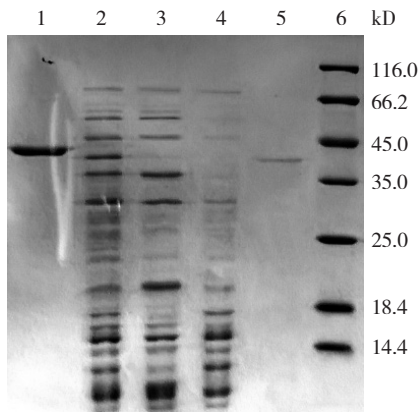


图2 坎氏弧菌TLH诱导重组菌BL21(DE3)/pET26b(+)*tlh*及纯化的TLHSDS-PAGE分析
1. 纯化的VHH溶血素; 2. 诱导的BL21(DE3)/pET26b(+)*tlh*菌体; 3. 未诱导的BL21(DE3)/pET26b(+)*tlh*菌体; 4. 诱导的BL21(DE3)/pET26b(+)*tlh*菌体; 5. 纯化的TLH溶血素; 6. 标准分子量蛋白marker.
Fig. 2 Analysis of the over-expressed recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET26b(+)*tlh* and the purified TLH hemolysin by SDS-PAGE
1. Purified VHH hemolysin; 2. The induced recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET-26b(+)*tlh*; 3. The uninduced recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET-26b(+)*tlh*; 4. The induced *E. coli* BL21(DE3)/pET-26b(+)*tlh*; 5. Purified TLH hemolysin; 6. Protein marker.

2.3 坎氏弧菌 TLH 溶血素的溶血活性测定

由图3可见,纯化的TLH溶血素(0.41 mg/mL)在血平板上有很强的溶血活性,溶血圈直径为16 mm。

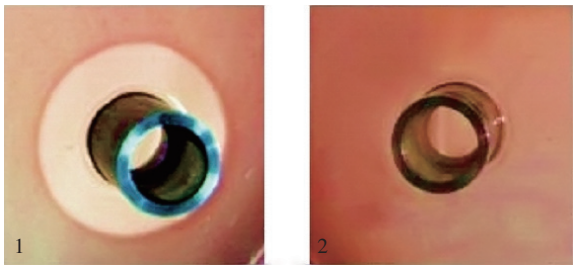


图3 坎氏弧菌TLH的鱼血平板溶血试验
1. 纯化的TLH溶血素; 2. 透析液.
Fig. 3 Hemolytic activity of purified TLH on fish blood agar plate
1. The purified TLH hemolysin; 2. Dialysate.

2.4 坎氏弧菌 TLH 的磷脂酶活性测定

由图4可见,纯化的TLH溶血素在卵磷脂平板上有很强的磷脂酶活性。形成一个外圈略透明内圈混浊的同心圆式溶解圈,浑浊内圈直径为11 mm,透明外圈直径为15 mm。

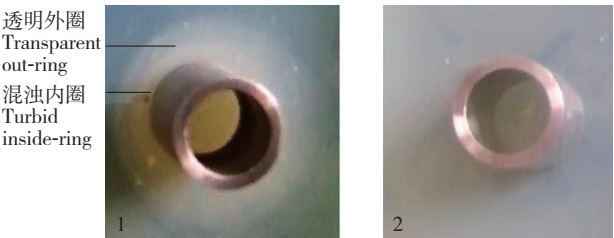


图4 坎氏弧菌TLH溶血素的卵磷脂平板磷脂酶活性试验
1. 纯化的TLH溶血素; 2. 透析液.
Fig. 4 Phospholipase activity of the TLH hemolysin on 1% egg yolk emulsion plate
1. The purified TLH hemolysin; 2. Dialysate.

2.5 温度对坎氏弧菌 TLH 溶血活力的影响

TLH溶血素溶血活性的最适温度为37℃。在温度≥45℃时,牙鲆红细胞自身发生破裂溶血。另外,VHH在4℃、16℃、25℃和37℃处理30 min后对其活力没有影响;45℃处理30 min其活力损失50%;55℃处理30 min其活力损失75%;温度75℃处理30 min其活力完全丧失(图5)。

2.6 pH对坎氏弧菌 TLH 溶血活力的影响

TLH溶血活性的最适pH值为6;在pH值为5和7时,只有50%的活力;牙鲆红细胞在pH<6时发生溶血。另外,TLH溶血素在pH 5~10较稳定;当

pH<5 及 pH>10 时其稳定性迅速下降; pH 4 和 pH 5 两组第一个孔未稀释的原液与血细胞作用 1 h 未发生溶血现象,但倍比稀释后则发生溶血现象,推测是原液 pH 过低对溶血产生影响。

2.7 金属离子对坎氏弧菌 TLH 溶血素溶血活力的影响

在所用的 10 种金属离子(表 1)中,当金属离子浓

度为 0.1 mmol/L 时, Co^{2+} 使 TLH 的溶血活力下降 50%, 其他离子对其活力没有影响; 当金属离子浓度为 1 mmol/L 时, Co^{2+} 使 TLH 溶血素的活力下降 50%, 其他离子对其活力没有影响, Zn^{2+} 本身可导致红细胞发生溶血现象; 当金属离子浓度增加到 25 mmol/L 时, Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 对其活力没有影响, Ca^{2+} 使其活力下降 50%, 其他离子使红细胞发生絮凝或导致红细胞溶血。

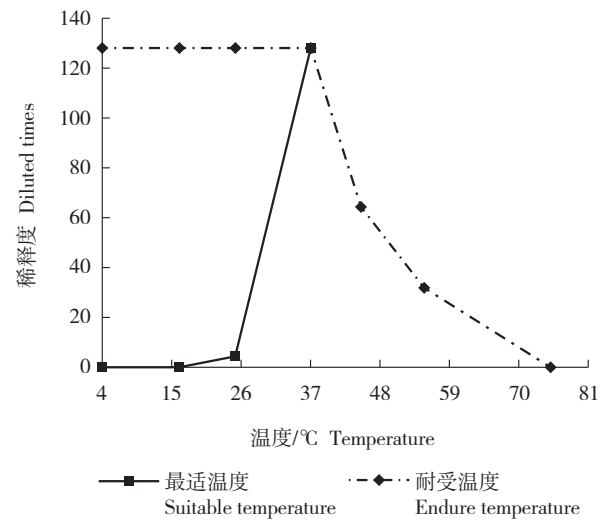


图5 温度对坎氏弧菌 TLH 溶血活力的影响
Fig. 5 Effect of temperature on hemolytic activity and stability

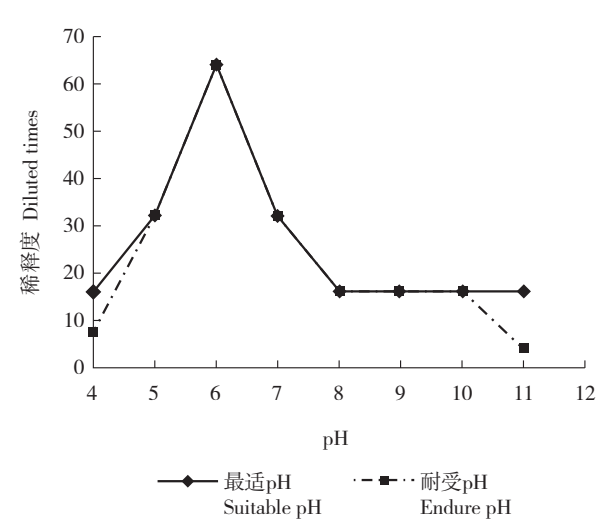


图6 pH对坎氏弧菌 TLH 溶血活力的影响
Fig. 6 Effect of pH on hemolytic activity and stability

表1 金属离子对坎氏弧菌 TLH 溶血活力 (相对活性) 的影响				%
金属离子 Metal ion	离子浓度 / (mmol · L ⁻¹) Ion concentration			
	0.1	1	25	
Control (none)	100	100	100	
Na ⁺	100	100	100	
K ⁺	100	100	100	
Zn ²⁺	100	ND	ND	
Mg ²⁺	100	100	100	
Ca ²⁺	100	100	50	
Co ²⁺	50	50	ND	
Ni ²⁺	100	100	ND	
Cu ²⁺	100	100	ND	
Ba ²⁺	100	100	ND	
Mn ²⁺	100	100	ND	

*ND: 未测, not done.

3 讨论

弧菌性病害是海水养殖业最重要的病害之一,溶血素在致病弧菌中广泛存在,在感染过程中发挥着重要的作用^[10-13]。不同弧菌分泌的溶血素并非完全相同,目前发现5类有代表性的溶血素家族,即副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)的热稳定性直接溶血素(TDH)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)的El Tor溶血素(HlyA)、哈维氏弧菌的溶血素(VHH)/副溶血弧菌的热不稳定性溶血素(TLH)、副溶血弧菌的热稳定性溶血素(δ -VPH)以及O1型霍乱弧菌的另一类溶血素(HLX),这5类溶血素的氨基酸序列均无同源性^[10]。有些溶血素通过磷脂酶活性发挥致病作用,可使宿主细胞膜上磷脂分子水解,从而导致细胞膜损伤^[16,19]。

坎氏弧菌VIB285的TLH属于热不稳定性溶血素,具有磷脂酶B活性^[16]。以往实验结果表明,纯化的坎氏弧菌TLH在新鲜的牙鲆鱼血平板上有很强的溶血活性,而且在卵磷脂平板上形成1个外圈略透明内圈混浊的同心圆式溶解圈,这与哈维氏弧菌VHH及副溶血弧菌的卵磷脂依赖型溶血素(LDH)相似^[16,18]。坎氏弧菌TLH的溶血活性与磷脂酶活性很可能与其在147~406位氨基酸的脂酶结构域(Lipase_GDSL)相关,这需要进一步研究其对磷脂的作用位点及作用方式来证明。

本研究利用Ni琼脂糖亲和层析柱成功地纯化了坎氏弧菌TLH。SDS-PAGE检测表明TLH略小于本实验室已经纯化的哈维氏弧菌VHH,且与VHH相比,坎氏弧菌的TLH较难纯化。对该蛋白进行多次纯化的结果表明,TLH与Ni琼脂糖亲和柱的特异性结合能力较差,洗脱液浓度达到50 mmol/L咪唑时就可将其洗脱,因此一次纯化得到的产物不纯。将第1次纯化的产物进行二次纯化后得到的TLH溶血素蛋白较为纯净,但是纯化过程中目的蛋白损失较大,得到的产物浓度较低。坎氏弧菌的TLH与VHH的氨基酸序列相似性高达85%,但两者与Ni琼脂糖亲和柱的结合能力差距较大,推测可能与2种溶血素蛋白的空间结构差异有关,具体原因有待进一步研究。

纯化的TLH在温度为75℃时保温30 min,其溶血活力完全丧失,说明TLH是一种热不稳定性溶血素,与VHH^[18]相似。TLH与VHH相比,其最适pH以及对不同pH的稳定性均有较大差别。TLH溶血活力的最适pH为6,当pH大于或小于6时溶血活力逐渐丧失,而VHH的最适pH为8~9,在pH 7~10时相对稳定,在酸性环境中活力迅速丧失^[18];且TLH在弱酸性条件下活性较强,而VHH在弱碱性条件下活力较稳定。另外本研究还发现,多数金属离子对TLH的溶血活力的影响较小,而 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Co^{2+} 等多种离子如对VHH的活力影响相对较大^[18]。因此,除温度对坎氏弧菌TLH溶血活力的影响与对哈维氏弧菌VHH溶血活力的影响结果相似以外,pH及不同浓度金属离子对TLH与对VHH的溶血活力的影响结果均有很大差异。这说明坎氏弧菌TLH与哈维氏弧菌VHH相比,虽然大小一致、氨基酸序列相似度高、都具有较强的溶血活性及磷脂酶活性,但其在蛋白质空间结构和功能上可能仍存在一定的差异,其作用机制可能也不尽相同,有待对其致病机理及作用机制进行深入研究。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish [M]. 3rd ed. Godalming: Springer-Praxis, 1999.
- [2] Zhang X-H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids [J]. Fish Dis, 2000, 23: 93-102.
- [3] Sunaryanto A, Mariam A. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries [J]. Bull Brack Water Aqu Dev Cent, 1986, 8: 105-112.
- [4] Sahul Hameed A S, Rao P V, Fanmer J J, et al. Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii* like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* larvae [J]. Aquac Res, 1996, 27: 853-863.
- [5] 许兵,纪伟尚,徐怀恕,等.中国对虾病原菌及其致病机理的研究[J].海洋学报,1993,15(1): 98-106.
- [6] Kong Jie, Ye Jun, Guo Huarong, et al. Rapid identification of shrimp bacterial pathogens by enzymatic amplification and digestion of 16S rRNA gene [J]. Oceanol Et Limnol Sin, 1997, 28(5): 449-452.
- [7] 牟海津,李筠,包振民,等.中国对虾养成期病害的细菌学分析

- [J]. 海洋学报, 1999, 21 (1): 139–145.
- [8] 马健民, 王琦, 马福恒, 等. 皱纹盘鲍脓毒败血症病原菌的发现及初步研究[J]. 水产学报, 1996, 20 (4): 323–336.
- [9] Diggles B K, Carson J, Hine P M, et al. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand [J]. Aquaculture, 2000, 183 (1–2): 1–12.
- [10] Zhang X-H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio species* [J]. J Appl Microbiol, 2005, 98: 1011–1019.
- [11] Iida T, Honda T. Hemolysins produced by vibrios [J]. J Toxicol-Toxin Rev, 1997, 16: 215–227.
- [12] Ludwig A, Goebel M. Haemolysins of *Escherichia coli*. In *Mechanisms of Virulence* [M]. ed. Sussman, M. Cambridge, Cambridge University Press, 1997, 281–329.
- [13] Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios [J]. J Nat Toxin, 1999, 8: 259–269.
- [14] 王淑娟, 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.
- [15] Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, et al. Cloning and expression of *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes [J]. J Bacteriol, 1985, 162: 510–515.
- [16] Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, et al. Purification and characterization of a lecithin-dependent hemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene [J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 2705–2711.
- [17] Zhang X-H, Meaden P G., Austin B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3161–3167.
- [18] Zhong Y, Zhang X-H, Chen J, et al. Overexpression, purification, characterization and pathogenitiy of *Vibrio harveyi* haemolysin VHH [J]. Infect Immun, 2006, 74: 6001–6005.
- [19] Sun B, Zhang X-H, Tang X, et al. A particular single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin (VHH) results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity to turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. J Bacteriol, 189, 2575–2579.
- [20] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 222: 680–685.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [22] Liu P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Lett Appl Microbiol, 1996, 22: 413–416.

Expression, purification and characterization of *Vibrio campbellii* hemolysin (TLH)

SUN Jing, SUN Boguang, JIA Airong, ZHANG Xiaohua

(College of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Vibrio campbellii*, a Gram-negative, facultative anaerobic marine bacteria, which is an important pathogen in aquaculture. *V. campbellii* can cause the outbreak of the red leg-disease of shrimp (*Penaeus orientalis*), and it can cause abalone suffering from the pyosepticemia when the temperature is higher than 16 °C. However, the pathogenicity mechanism of *V. campbellii* is not clear. Previous studies showed that *V. campbellii* VIB285 contained a heat-labile hemolysin (TLH) gene similar with the VHH hemolysin gene in *V. harveyi*. The deduced amino acids of TLH shared 85 % sequence identity to the VHH hemolysin of *V. harveyi* and it had a lipase domain (Lipase_GDSL) at the 147–406 amino acid, indicating that the TLH hemolysin may be a kind of phospholipase. In this study, the open reading frame of *tlh* (1254 bp) from *V. campbellii* VIB285 was amplified by using a specific primer set (VCAF2 and VCAR2). The forward primer (VCAF2: 5' –CGGAATTCATGAATAAGACCATTACGTTACTTACT –3') begins from the initiation codon and adds an EcoRI site at the 5' end of the gene, and the reverse primer (VCAR2: 5' –CGCTCGAGGAATGGATGATTCCGAAAGTTGGTC–3') ends before the stop codon, and adds an *Xho*I site. The PCR product was excised and inserted into the *Eco*RI/*Xho*I-cut expression vector pET–26b(+). The ligated plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for expression of the full-length *tlh* gene. The recombinant TLH hemolysin was successfully expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) as His-tag fused protein, with the induction of IPTG at a final concentration of 1 mmol · L⁻¹ and the incubation temperature of 37 °C for 3 h. The poly His-tagged TLH hemolysin was purified by Ni-NTA His-Bind Resin according to the manufacturer's instructions. The molecular weight of the recombinant TLH hemolysin was about 42 kD as assessed by SDS-PAGE. Hemolytic activity against flounder (*Paralichthys olivaceus*) erythrocytes was measured in 96-well microtiter plate, and the phospholipase activity was detected on 1% (v/v) egg yolk emulsion plates. The purified TLH (0.41 mg/mL) showed strong hemolytic activity against flounder erythrocyte (the diameter of hemolysis circle on fish blood agar plate was 16 mm) and phospholipase activity (the diameter of the clear ring on 1% egg yolk emulsion plate was 15 mm). The optimum temperature for the hemolytic activity of the TLH was 37 °C, and the hemolytic activity was destroyed entirely by treatment for 30 min at 75 °C, indicating it is a heat-labile hemolysin. The optimum pH for the hemolytic activity of the TLH hemolysin was pH6. The effect of cations on hemolysis was determined by addition of various concentrations of metallic cations (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Ba²⁺) as the chloride forms in 20 mmol/L TBS (pH 7.5). It was found that only a few divalent cations can cause the decrease of the hemolytic activity, such as Ca²⁺ and Co²⁺, but monovalent cations and other divalent cations did not affect the hemolytic activity. To our knowledge, this is the first report on purification and characterization of TLH from *V. campbellii*. Purified TLH could be useful for vaccine development and a diagnostic tool for vibriosis. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (4): 745–752]

Key words: *Vibrio campbellii*; hemolysin; TLH; expression; protein purification; hemolytic activity

Corresponding author: ZHANG Xiaohua. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn