



## 嗜虫耶尔森氏菌 HlyA 及 HasA 外分泌表达系统的构建

黄晨燕<sup>1#</sup>, 郑茹萍<sup>2#</sup>, 黎钟秀<sup>1</sup>, 余云钦<sup>1</sup>, 罗雨琦<sup>1</sup>, 周建双<sup>1</sup>, 张飞萍<sup>1</sup>, 吴松青<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>福建农林大学林学院, 生态公益林重大有害生物防控福建省高校重点实验室 福建 福州 350002

<sup>2</sup>厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361000

**摘要:**【目的】构建一株具备外分泌蛋白功能的工程菌, 解决杀虫毒素无法由胞内分泌至胞外, 无法直接作用于虫体等问题, 为松墨天牛防治提供新思路。【方法】本研究先测定从松墨天牛肠道及其生境中分离出的嗜虫耶尔森氏菌(*CSLH88*)的生长特性及抗性, 进而对其进行分子改造。构建 HlyA (pGHKW2) 以及 HasA (pGHKW4) 外分泌表达载体, 利用电穿孔法将其转入 *CSLH88* 菌株, 获得能够表达绿色荧光蛋白的工程菌。利用稀释涂板及荧光体式镜检测技术对两个质粒进行遗传稳定性检测, 并采用 SDS-PAGE 及 Western blotting 技术验证蛋白外分泌功能。【结果】*CSLH88* 菌株培养 2–4 h 能够进入对数生长期, 并对卡那霉素(Kan)敏感。成功构建了含有 Kan 抗性基因的 pGHKW2 (GenBank: MK562405) 和 pGHKW4 (GenBank: MK562404) 两个外分泌表达载体的 *CSLH88* 工程菌株。其中, 发现 pGHKW4 质粒更加适合在嗜虫耶尔森氏菌中稳定遗传。SDS-PAGE 及 Western blotting 检测结果表明 HlyA 系统无法在 *CSLH88* 菌株中将目的蛋白分泌到胞外, 而 HasA 系统则可以有效地发挥外分泌表达功能。【结论】通过对 HlyA 及 HasA 两个外分泌表达系统进行研究, 从中筛选出 HasA 型血红素转运系统作为 *CSLH88* 菌株的外分泌表达系统, 为后续外分泌杀虫毒素蛋白菌株构建以及 *CSLH88* 菌株的致病性研究奠定基础。

**关键词:** 松墨天牛, 嗜虫耶尔森氏菌, 外分泌表达系统, 绿色荧光蛋白

松材线虫病被称为松树的癌症, 能够造成松树大面积枯死, 松墨天牛是该病的主要传播媒介<sup>[1]</sup>。因此, 有效控制松墨天牛种群数量是防控

松材线虫病的重要手段。松墨天牛的传统防治手段以清理枯死木、化学防治、诱捕器防治以及生物防治为主<sup>[2-3]</sup>。其中, 化学防治在实际生产应用

**基金项目:** 国家重点研发计划课题(2017YFD0600105); 国家自然科学基金(31601905); 福建省科技厅自然科学基金(2016J01097); 福建省科技计划项目(2018N5002); 福建农林大学科研基金(xjq201614); 福建农林大学林学院林学高峰学科项目(71201800720, 71201800753, 71201800779); 福建省大学生创新创业训练计划项目(201810389102); 福建省林业科学研究项目[Minlinke (2017) 03]

\*通信作者。E-mail: dabinyang@126.com

#共同第一作者。

收稿日期: 2019-02-23; 修回日期: 2019-05-30; 网络出版日期: 2019-06-21

上已经取得明显成效,但伴随着有害生物抗药性的产生、环境污染以及南方地区高温多雨等一系列问题的出现,极大地限制了化学杀虫剂的使用。而相比之下,生物防治手段具有对环境友好、持效期长且对靶标害虫针对性强等优点,使其成为当前研究的热点。目前,常用昆虫病原微生物作为杀虫剂对松墨天牛进行生物防治。但由于松墨天牛幼虫期生活隐蔽,导致杀虫物质难以接触虫体<sup>[4]</sup>,防治效果有待提高。而相较于一般的病原微生物,昆虫肠道微生物虽然在环境中的丰度不高,却能够有效地在昆虫肠道内富集。若能够对天牛肠道微生物菌群进行分子改造,进而表达杀虫毒素,则可以有效地杀死树干内的幼虫,为松墨天牛防治提供新途径。

近年来,利用肠道微生物菌群能够在昆虫肠道内富集的特点,使其表达所需的毒素基因,达到防治虫媒传播疾病的目的,并逐渐成为一种新型的生物防治手段。例如, Hurwitz 等通过对克氏锥虫肠道微生物菌群进行基因改造,使其能够表达杀虫毒素,进而达到防治美洲锥虫病的目的<sup>[5]</sup>。天牛科昆虫的肠道细菌种类丰富,以肠杆菌科细菌为常见优势菌群。项目组前期从松墨天牛肠道中分离出嗜虫耶尔森氏菌(*Yersinia* sp.),该菌是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的革兰氏阴性杆菌,存在于多种鞘翅目昆虫的肠道中<sup>[6-7]</sup>。然而,根据已有的利用肠道优势菌进行防治天牛的相关报道,发现其防治效果并不理想<sup>[8]</sup>。主要由于缺乏分泌型的表达原件,导致表达后的蛋白多停留于菌体内,无法释放到菌体外并作用于昆虫肠道上皮细胞<sup>[9]</sup>。由此可见仅将毒素富集到昆虫肠道,而毒素无法分泌至胞外,仍然无法提高杀虫效果。因此,寻找一种能够在细菌内将外源蛋白由胞内分泌至胞外的外分泌表达系统尤为重要。

细菌分泌系统是参与细菌蛋白分泌的重要途径,能够将蛋白从胞内分泌到胞外<sup>[10]</sup>。 $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统及 HasA 型血红素转运系统是细菌中常见的 I 型分泌表达系统<sup>[11]</sup>。王四宝等利用  $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统及 HasA 型血红素转运系统,分别对蚊子肠道的成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)和沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)进行改造,使得两种菌株均能够外分泌表达抗疟疾的效应蛋白,有效阻断了疟疾的传播<sup>[12-13]</sup>。同样,若利用 HlyA 及 HasA 外分泌表达系统进行外分泌菌株构建,对后续进行松墨天牛防治研究具有重要的意义。但是不同宿主菌对不同的外分泌表达系统的适应性不同,若能利用绿色荧光蛋白基因(*gfp*)作为报告基因,构建一个能操纵宿主菌合成 GFP 的外分泌表达载体,便于检测 HlyA 以及 HasA 两个表达系统在嗜虫耶尔森氏菌中的外分泌表达情况。

基于以上思路,本研究选用从松墨天牛肠道中分离得到的嗜虫耶尔森氏菌(*CSLH88*),以该菌为研究对象,绿色荧光蛋白为标记蛋白,构建分别含有  $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统和 HasA 型血红素转运系统的 *CSLH88* 工程菌。采用荧光检测手段,对其质粒遗传稳定性进行测定,并验证构建后的 *CSLH88* 菌株外分泌功能。通过两个外分泌系统的比较,筛选出适用于嗜虫耶尔森氏菌的外分泌表达系统,为后续进行高毒力菌株构建奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与试验材料

本文所采用的 pUC19-nptII-GFP-HlyA 和 pUC19-nptII-GFP-HasA 两个表达载体、pLB-Kan 质粒及 *CSLH88* 菌株均为实验室所保存。引物合成由福州擎科生物技术有限公司完成。

抗生素及使用浓度：氨苄西林(Amp)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kan)、四环素(Tcy)溶解在蒸馏水或者无水乙醇中,将每种抗生素均先配制成 100 mg/mL 的母液,配好的抗生素用一次性过滤器过滤除菌后,按不同的比例加入培养基中,使得培养基中抗生素的终浓度分别为 100、200、400、800 和 1000  $\mu\text{g/mL}$ 。

液体 LB 培养基(1 L): Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 调至 7.2(固体 LB 培养基加 1.8%琼脂条)。

含 kan 抗生素培养基:液体 LB 培养基中加入卡那霉素(Kan),使其工作液浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 1.2 菌株生长曲线及抗性测定

**1.2.1 菌株生长曲线测定:**取 50  $\mu\text{L}$  *CSLH88* 甘油菌按 1%接种于 5 mL 的培养基中,150 r/min、30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 12 h;将活化的菌液按 1%的量转接入新的 100 mL LB 培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养,以未接种的液体 LB 培养基作为空白对照。每隔 2 h 取 3 mL 样品测其 600 nm 波长吸光度值,重复 3 次并计算平均值,确定其生长特性并绘制菌株的生长曲线图。

**1.2.2 菌株抗性测定:**取 50  $\mu\text{L}$  活化过夜的 *CSLH88* 菌液,依次涂布于分别含有 Amp、Cm、Kan、Tcy 四种抗生素的固体 LB 培养基中,每种抗生素均有 100、200、400、800 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  这 5 种浓度的固体 LB 培养基,并以不含抗生素的固体 LB 培养基作为空白对照。涂布后置于恒温培养箱中(30  $^{\circ}\text{C}$ )倒置培养 12 h,观察 *CSLH88* 的生长情况。

## 1.3 重组菌株的构建

**1.3.1 含 Kan 抗性标记的外分泌重组质粒构建:**根据 NCBI 数据库中已有的 *Kan* 基因序列,设计

出特异性扩增引物(5'-GCTTACTAGTGCATGCG AAGCGGAACACGTAGAAAGCC-3', 3'-CGCCAA GCTTGCTTCAATTCAGAAGAAGACTCGTCA-5')。

PCR 反应总体系为 25  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , Primer (10 mmol/L)各 1.25  $\mu\text{L}$ , Q5<sup>®</sup>热启动超保真 2 $\times$ Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ 。将上述试剂依次加到 PCR 管中,反应混匀液置于 PCR 仪中进行扩增。反应体系为:98  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 57.7  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 进行 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

将 pUC19-nptII-GFP-HlyA 和 pUC19-nptII-GFP-HasA 两个表达载体进行线性化处理及凝胶回收后,利用 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒将回收的 PCR 产物与线性 DNA 片段进行连接,详细步骤参考试剂盒中说明书进行。将上述连接产物按常规转化方法转到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含有 Kan (终浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ) LB 固体培养基中,静置恒温培养箱(37  $^{\circ}\text{C}$ )中培养 12 h。

挑选转化单斑接种于含 Kan 抗生素的液体 LB 培养基,150 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h。随后,参照 OMEGA 公司的质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Protocol I 说明进行质粒提取,并选择相应限制性核酸内切酶进行双酶切,最后进行测序验证。得到含有 Kan 抗性标记的 pGHKW2 和 pGHKW4 两个外分泌表达质粒。

**1.3.2 电穿孔感受态制备:**以 1%的接菌量转接活化过夜的 *CSLH88* 于新的 LB 液体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床振荡 2-3 h。取出菌液冰浴 10 min 后离心 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min、5 min 弃上清。用 10%甘油重悬菌体后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次。最后用 100  $\mu\text{L}$  10%甘油轻轻重悬菌体,获得 *CSLH88* 电转感受态细

胞, 新制备的感受态细胞可保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以备电穿孔时使用。

**1.3.3 电转化:** 将 *CSLH88* 电转感受态细胞置于冰上冻融后分别加入  $5\text{ }\mu\text{L}$  重组质粒, 轻弹混匀后迅速转入冰浴后的电极杯, 用擦镜纸擦干电极杯外壁的水珠, 设置电压为  $2500\text{ V}$ 、电容  $25\text{ }\mu\text{F}$ 、电阻  $600\text{ }\Omega$  等参数后进行电击。电击结束后, 立即往电极杯中加入  $500\text{ }\mu\text{L}$  的 LB 培养基, 将所有液体移至  $1.5\text{ mL}$  离心管,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r/min}$  振荡培养  $1.5\text{ h}$ 。复苏后的细胞  $12000\text{ r/min}$  室温离心  $1\text{ min}$ , 弃上清液。最后, 吸取  $100\text{ }\mu\text{L}$  混匀沉淀液涂布于含有 Kan(终浓度为  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 的 LB 平板, 恒温培养箱( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ )中倒置培养  $12\text{ h}$ 。

**1.3.4 阳性转化子的验证:** 挑选转化单斑接种于含 Kan(终浓度为  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 抗生素的 LB 液体培养基,  $150\text{ r/min}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $12\text{ h}$ 。随后, 进行质粒提取, 并选择相应限制性核酸内切酶进行双酶切, 最后进行测序验证。

将活化过夜的 *CSLH88*-pGHKW2 及 *CSLH88*-pGHKW4 的菌液分别制片后在倒置荧光显微镜下直接观察, 以 *CSLH88* 的菌体形态为对照, 同时在明场和紫外激发光下观察荧光现象。

#### 1.4 遗传稳定性检测

取活化  $12\text{ h}$  的 *CSLH88*-pGHKW2 菌株及 *CSLH88*-pGHKW4 菌株划线于含 Kan 的 LB 固体培养基上培养, 挑取荧光体视镜下观察发绿色荧光的单菌落接种到含抗生素液体 LB 中培养  $12\text{ h}$ 。取  $1\text{ mL}$  菌液于  $1.5\text{ mL}$  EP 管中,  $12000\text{ r/min}$  离心  $1\text{ min}$ , 去上清后加入等量液体 LB, 重悬后离心, 按此步骤洗涤 3 次, 重悬于  $1\text{ mL}$  液体 LB 中。按 1% 的接种量接种于不含抗生素的液体 LB 中, 恒温摇床  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r/min}$  培养  $12\text{ h}$ , 之后重复

转接。分别取第 1、3、5 等奇数次转接后的菌液逐级稀释涂布于不含抗生素的固体 LB 培养基中, 置于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养  $24\text{ h}$ , 于荧光体视镜下统计发光菌落数, 直至无发光菌落数为止。每次稀释涂布做 3 次重复, 计算质粒丢失率, 以此检测重组质粒在非选择压力下的遗传稳定性, 并以相同条件进行处理的 *CSLH88* 菌株作为阴性对照。

#### 1.5 外分泌蛋白提取及验证

吸取  $30\text{ }\mu\text{L}$  菌液接种入  $3\text{ mL}$  含 Kan (终浓度为  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 的 LB 液体培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $150\text{ r/min}$  活化培养  $12\text{ h}$  后按 1% 接菌量将菌液转接入新的液体培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $150\text{ r/min}$  培养  $24\text{ h}$ 。

**1.5.1 胞外蛋白超滤浓缩:** 将培养后的菌液  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8000\text{ r/min}$  离心  $10\text{ min}$  收集上清液, 将其缓慢加到冰预处理的超滤管(Amicon Ultra-4centrifugal filter devices)中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5000\text{ r/min}$  离心  $20\text{ min}$ , 重复此操作直至浓缩完所有上清液。离心结束后, 将超滤管中的蛋白液用移液枪轻轻混匀并收集到离心管中, 即为胞外蛋白, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.5.2 胞内蛋白提取:** 上述离心后的菌体用 PBS 缓冲液重悬后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8000\text{ r/min}$  离心  $8\text{ min}$  后去上清, 重复此步骤 3 次。而后置于冰上进行超声波破碎处理( $50\text{ Hz}$ ), 破碎频率为  $10\text{ s}$ , 间歇  $5\text{ s}$ , 每管菌体破碎时间约为  $30\text{ min}$ , 破碎后的细胞溶液  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8000\text{ r/min}$  离心  $8\text{ min}$ 。得到的上清即为胞内蛋白, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.5.3 外分泌蛋白验证:** 参考分子克隆实验指南的方法制备 SDS-PAGE 胶, 蛋白制样后电压  $90\text{ V}$  进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 胶置于 R250 考马斯亮蓝染色液和脱色液慢摇染色和脱色, 最

后利用双向电泳扫描成像仪分析 SDS-PAGE 情况。同时,进行 Western blotting 分析,先进行 SDS-PAGE,而后将 SDS-PAGE 胶置于 200 mA 条件下 1 h 将蛋白转印至 NC 膜上,然后进行常规的 5%的奶粉、一抗及二抗孵育操作,一抗溶液为 1:4000 稀释后的 GFP-Tag Rabbite Polyclonal Antibody,二抗溶液为 1:5000 稀释后的 Goat Anti-Rabbit IgG,最终利用多功能成像系统 (FluorChem Q, ProteinSimple) 检测 NC 膜上荧光条带,分析 GFP 蛋白表达情况。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株生长曲线及抗性分析

菌株的生长特性是评定细胞活力的重要指标。试验通过分光光度法对 *CSLH88* 的生长特性进行测定,由该菌株的生长曲线图(图 1)可以看出,*CSLH88* 菌株于 30 °C 下培养 2–4 h 后进入生长对数期,生长速度达到最快。随后,菌株生长虽呈现上升趋势,但生长速率逐渐减缓(图 1)。通过分析 *CSLH88* 的生长特性,能够为后续使用电穿孔法构建转基因工程菌摸索最优的试验条件。

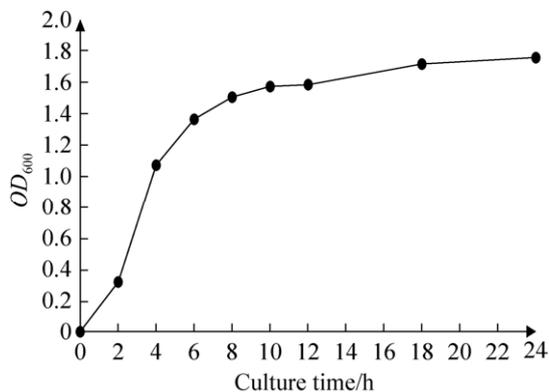


图 1. *CSLH88* 菌株的生长特性曲线

Figure 1. Growth characteristic curve of *CSLH88* strain.

此外,对 *CSLH88* 菌株进行抗性分析,如表 1 所示。结果表明,*CSLH88* 对 Amp 和 Cm 有抗性,即使在高浓度下仍能正常生长。相反,对 Kan 和 Tcy 无抗性,不能在含有 Kan 和 Tcy 的平板上生长。基因工程中常常利用抗性基因作为标记基因,用于筛选成功转化重组质粒的阳性克隆。通过对 *CSLH88* 抗性进行研究,为后期选择卡那基因作为重组质粒的抗性基因奠定基础。

### 2.2 抗性标记的重组质粒鉴定

通过 PCR 得到 *kan* 基因片段,预期大小为 1096 bp,可以在电泳图上观测到其 1000 bp 左右的扩增条带(图 2-A)。在 *Sph* I 处对 pUC19-nptII-GFP-HlyA 外分泌表达载体进行线性化处理,用 In-Fusion 克隆连接体系构建 pGHKW2 重组质粒。该重组质粒以 pUC19 载体为基本骨架,含 *nptII* 启动子, *gfp* 基因、*kan* 抗性基因以及 *HlyA*、*HlyB*、*HlyD* 三个外分泌系统构件(图 3),大小为 9425 bp。对构建的阳性克隆质粒用 *Sac* I、*Spe* I 进行双酶切验证,预期得到片段大小分别为 5666 bp 和 3759 bp,与电泳图条带大小大致相符(图 2-B)。测序验证结果与设计条带序列相符,证明 pGHKW2 分泌表达载体构建成功。同样的方法对 pUC19-nptII-GFP-HasA 外分泌表达载体进行处理,构建 pGHKW4

表 1. 嗜虫耶尔森氏菌(*CSLH88*)的抗性结果

Table 1. Resistance results of *Yersinia entomophaga* (*CSLH88*)

Type	Antibiotic concentration/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
	100	200	400	800	1000
Amp	+	+	+	+	+
Cm	+	+	+	+	+
Kan	-	-	-	-	-
Tcy	-	-	-	-	-

+: The strain can grow normally; -: The strain can't grow normally.

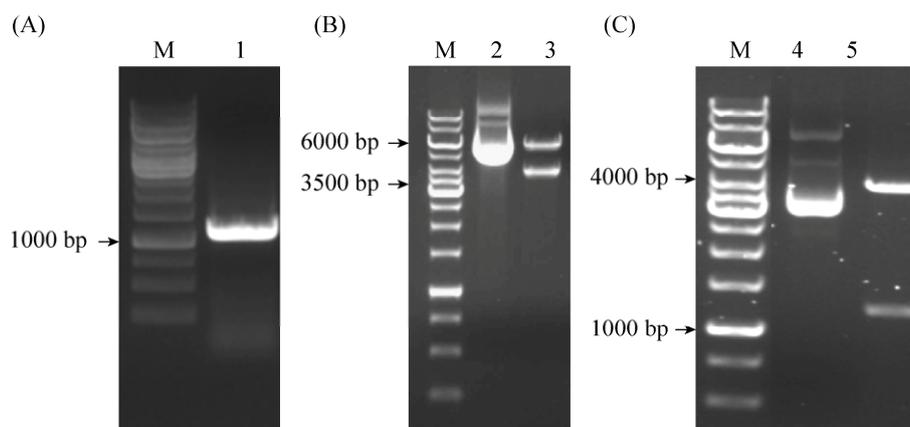


图 2. *kan* 基因 PCR 片段(A)和 pGHKW2 质粒(B)、pGHKW4 质粒双酶切验证(C)

Figure 2. PCR of *kan* gene and double digestion of pGHKW2 and pGHKW4 vector. A: PCR of *kan* gene; B: pGHKW2 Vector and Double digestion of pGHKW2; C: pGHKW4 Vector and Double digestion of pGHKW4. M: 1 kb marker (Thermo). Lane 1: PCR fragment of *kan* gene; lane 2: pGHKW2 plasmid; lane 3: Double digested by *Sac* I and *Spe* I; lane 4: pGHKW4 plasmid; lane 5: Double digested by *Sac* I and *Xma* I.

重组质粒。该重组质粒以 pUC19 载体为基本骨架, 含 *nptII* 启动子, *gfp* 基因、*Kan* 抗性基因以及 *HasA* 这一外分泌系统构件(图 3), 大小为 5494 bp。用 *Sac* I、*Xma* I 进行双酶切, 预期得到片段大小分别为 1142 bp 和 4352 bp, 与电泳图条带大小大致相符(图 2-C)。测序验证结果与设计条带序列相符, 证明 pGHKW4 分泌表达载体构建成功。后续将验证得到的质粒序列提交到 GenBank 中, 获得 pGHKW2 的序列登陆号为 MK562405, pGHKW4 的序列登陆号为 MK562404。

### 2.3 重组外分泌菌株荧光检测

利用电转化法将重组质粒 pGHKW2 及 pGHKW4 转入 *CSLH88* 菌株中, 使其能够表达和外分泌绿色荧光蛋白。将重组菌株制片后置于倒置荧光显微镜下观察菌体形态。从图 4 可以看出, *CSLH88* 菌体呈短杆状, 其本身不携带绿色荧光基因, 因此在紫外激发光源视野下一片暗黑; 相反, 含有 pGHKW2 分泌表达载体和 pGHKW4 分泌表达载体的工程菌, 在激发光源下能发出明亮的绿

色荧光, 证明其电转成功, 分别得到 *CSLH88*-pGHKW2、*CSLH88*-pGHKW4 两个重组菌株。

### 2.4 质粒遗传稳定性检测

在无选择压力的条件下对 *CSLH88*-pGHKW2、*CSLH88*-pGHKW4 两个带有荧光标记的菌株进行转接, 通过计算菌量粗略推测出隔代菌株的传代次数。利用荧光体视镜进行观察, 可以发现阴性对照处理的菌落均不发荧光, 其他两种菌株可以观察到荧光现象。但当 *CSLH88*-pGHKW2 转接 3 次时, 部分菌落开始出现重组质粒荧光消失现象。大约传代 22 次时, 质粒保有率为 46%, 传代 50 次时质粒保有率下降为 0%。当 *CSLH88*-pGHKW4 转接 9 次时, 大约传代 64 次, 重组质粒稳定性开始出现下降趋势。当传代 134 次时, 质粒保有率下降为 0%, 菌落荧光现象消失(表 2)。因此, 两个外分泌表达质粒遗传稳定性存在一定的差异。虽然两个重组菌株均出现质粒丢失的情况, 但 pGHKW4 质粒能够在嗜虫耶尔森菌株中稳定遗传。

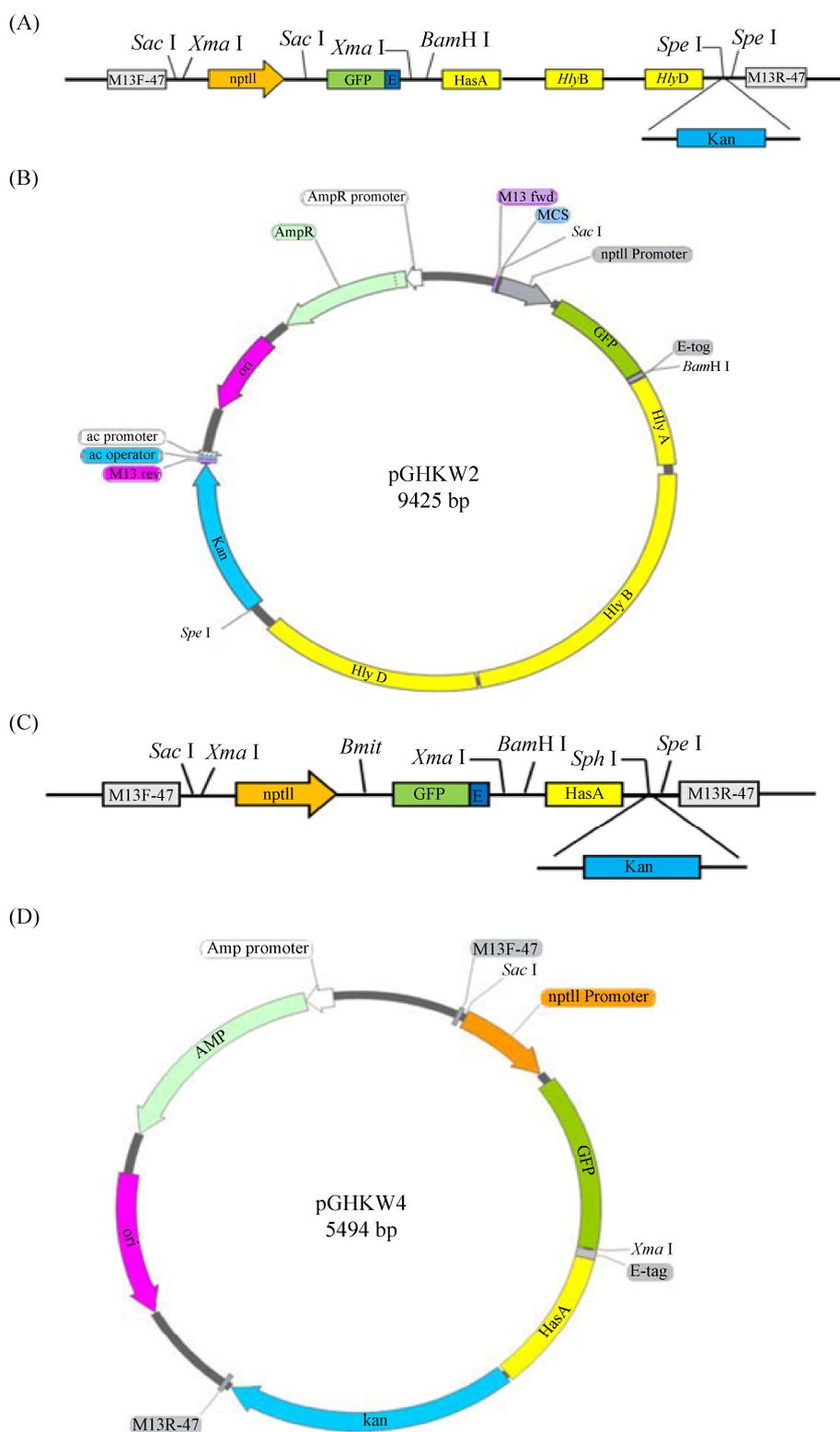


图 3. pGHKW2 及 pGHKW4 表达载体构建流程图

Figure 3. Map of pGHKW2 and pGHKW4 reconstructed plasmid. A: Insertion site of Kan gene in pGHKW2; B: pGHKW2 plasmid; C: Insertion site of Kan gene in pGHKW4; D: pGHKW4 plasmid.

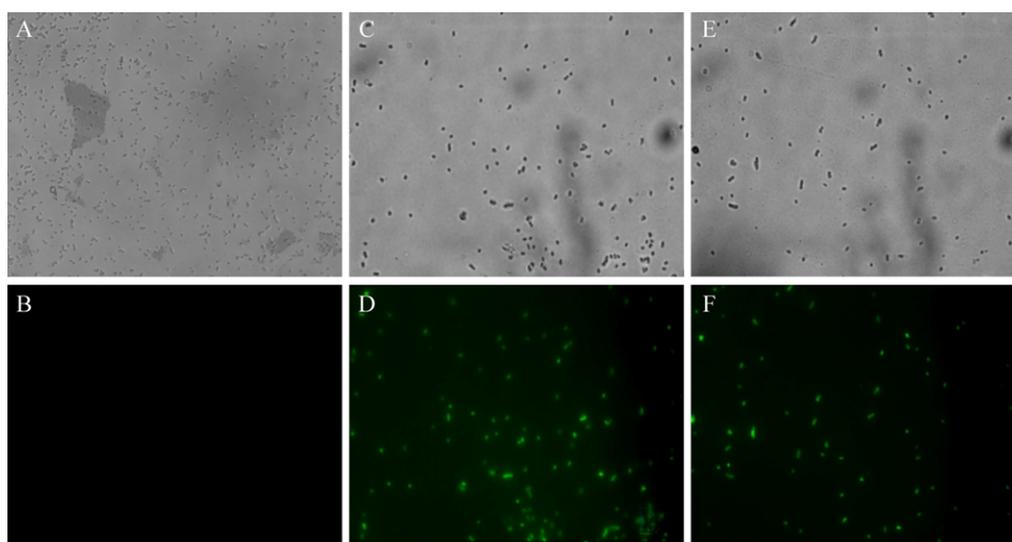


图 4. 荧光倒置显微镜下的菌体形态(40 倍)

Figure 4. Cell morphology under fluorescent inverted microscope (40 times microscopic observation). A, C, E: *CSLH88*, *CSLH88*-pGHKW2 and *CSLH88*-pGHKW4 observed under dark field of fluorescence microscope; B, D, F: *CSLH88*, *CSLH88*-pGHKW2 and *CSLH88*-pGHKW4 observed under bright field of fluorescence microscope.

表 2. 质粒遗传稳定性

Table 2. Genetic stability of plasmids

Number of transfers	Culture time/h	Generation	pGHKW2 Plasmid retention rate/%	pGHKW4 plasmid retention rate/%
1	12	8	100	100.00
3	36	22	46	100.00
5	60	36	25	100.00
7	84	50	0	100.00
9	108	64	0	64.35
11	132	78	0	50.00
13	156	92	0	20.20
15	180	106	0	5.97
17	204	120	0	3.51
19	228	134	0	0
21	252	148	0	0

## 2.5 外分泌绿色荧光蛋白表达与验证

*CSLH88*-pGHKW2 和 *CSLH88*-pGHKW4 菌株培养 24 h 后, 通过对其胞内和胞外蛋白提取, 分别进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 验证。由 SDS-PAGE 的结果可以看出, 两株工程菌都能够分泌蛋白。Western blotting 结果表明, 携带 HlyA 表达系统的 *CSLH88*-pGHKW2 菌株胞内能够检测

到 GFP 蛋白, 但胞外基本无目的蛋白分泌(图 5-B), 表明该系统在 *CSLH88* 菌株中虽有胞内蛋白的表达, 但无法分泌到胞外。而 GFP 与 HasA 蛋白能够在 *CSLH88*-pGHKW4 菌株中融合表达, 并且胞外和胞内均能检测到目的蛋白条带(图 5-D), 说明 HasA 系统能够在 *CSLH88* 菌株中发挥功能, 能够成功进行目的蛋白的外分泌表达。

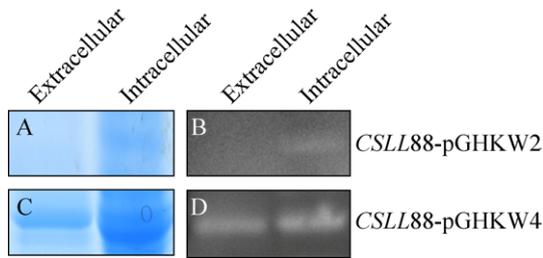


图 5. SDS-PAGE 和 Western blotting 分析 GFP 表达情况

Figure 5. SDS-PAGE and Western blotting analysis of expression product of GFP. A: SDS-PAGE analysis of *CSLL88*-pGHKW2 protein; B: Western blotting analysis of *CSLL88*-pGHKW2 protein; C: SDS-PAGE analysis of *CSLL88*-pGHKW4 protein; D: Western blotting analysis of *CSLL88*-pGHKW2 protein.

### 3 讨论

松墨天牛是松材线虫的重要传播媒介,有效控制松墨天牛数量对防止松材线虫病蔓延起到关键性作用<sup>[1]</sup>。但松墨天牛幼虫生活较为隐蔽,防治难度较大。过去几十年,寻找环境友好型的害虫防治系统一直都是科学界和商业界努力的目标。随着细菌、病毒、真菌、孢子虫、线虫等病原微生物杀虫剂相继被发现并使用,害虫防治的方法和途径日益趋于完善。尤其是昆虫肠道微生物具有能够在昆虫肠道富集的特点使其逐渐成为防治虫媒传播疾病的重要手段,取得显著的防治效果<sup>[12-13]</sup>。项目组前期从松墨天牛肠道中分离出嗜虫耶尔森氏菌(*CSLH88*),该菌能够在松墨天牛肠道富集。为了利用电转化法进行克隆改造,首先对 *CSLH88* 进行生长特性研究,结果发现 *CSLH88* 在 30 °C 下培养 2-4 h 后进入生长对数期。由于制备高转化效率的感受态细胞是影响电穿孔效率的重要因素之一,利用处在生长对数期的菌体制备感受态细胞时,能够提高转化成功率<sup>[14]</sup>。因此选用生长至对数期的 *CSLH88* 菌株制

备感受态细胞用于后续电转,进而提高了克隆成功的可能。

另一方面,为了选择合适的抗性基因,对嗜虫耶尔森氏菌进行抗性分析,结果表明 *CSLH88* 对氨苄西林及氯霉素存在抗性,对卡那霉素和四环素菌均无抗性。因此,选择卡那霉素为抗性基因,进而通过分子克隆等技术构建了分别携带  $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统和 HasA 型血红素转运系统的 pGHKW2 和 pGHKW4 载体,通过电穿孔法转化入 *CSLH88* 菌株中,构建能够外分泌表达绿色荧光蛋白的转基因工程菌。 $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统和 HasA 型血红素转运系统作为研究已久的两个外分泌表达系统<sup>[15-16]</sup>,其系统构件以及作用机理得到较为深入研究,两个外分泌系统都曾发现于肠杆菌科细菌中<sup>[17-18]</sup>。其中, $\alpha$ -溶血素(HlyA)分泌系统组成简单,系统转运通道主要由内膜组成蛋白 HlyB、HlyD 和形成外膜通用孔道的组成蛋白 TolC 构成<sup>[19]</sup>。此外,HasA 型血红素转运系统同属于革兰氏阴性菌分泌系统的 I 型分泌系统,最早发现于粘质沙雷氏菌。该系统主要由 HasD 蛋白、膜融合蛋白 HasE 以及 HasF 蛋白构成连接内外膜的通道。HasD 蛋白属于 ABC 蛋白(ATP-binding cassette),是执行识别信号肽、提供能量等作用的重要元件,而系统识别的信号序列是位于 hasA 的羧基端的 168 个的碱基<sup>[16]</sup>。本研究成功构建了含有 HlyA 和 HasA 外分泌功能的表达系统,为下一步对两种外分泌系统在嗜虫耶尔森菌株中的适应性进行研究提供了前提条件。

质粒的遗传稳定性检测是研究外源质粒在转基因工程菌中适应性的一个重要环节<sup>[20]</sup>,能为后续应用提供理论基础。本研究分别对 pGHKW2 和 pGHKW4 两个质粒进行遗传稳定性检测,两个重

组菌株均存在质粒丢失的现象。但 pGHKW2 质粒的稳定性较差, 传代 50 代时, 质粒保有率降为 0%, 而 pGHKW4 传代 100 代以上仍然具有一定的质粒保有率。质粒的遗传稳定性受宿主细胞的遗传特性、质粒自身的特性及培养条件等因素的影响<sup>[21]</sup>, 由此可见 pGHKW2 质粒的遗传稳定性较差可能与 HlyA 外分泌表达载体结构复杂有关系, 相比之下 HasA 表达载体元件较少, 更有利于其在嗜虫耶尔森氏菌中稳定遗传。尔后, 利用 SDS-PAGE 和 Western blotting 技术检测外源蛋白的表达和分泌情况, 结果表明 CSLH88-pGHKW2 菌株能够表达 GFP-HlyA 融合蛋白, 但无法分泌到胞外。这可能是由于嗜虫耶尔森氏菌中的 TolC 蛋白与 pGHKW2 所携带的 HlyA、HlyB 和 HlyD 无法兼容, 无法形成复合体完成分泌功能<sup>[22]</sup>。因此, 尽管 CSLH88-pGHKW2 菌株能够在荧光显微镜下观察到荧光现象, 外分泌系统构件不能有效发挥其外分泌功能, 进而造成胞内蛋白无法分泌到胞外, 导致 Western blotting 无法在胞外检测到 GFP 蛋白。而 pGHKW4 载体中的 *gfp* 基因能够和 HasA 蛋白融合表达, 并分泌到胞外, 说明含有 HasA 外分泌表达系统的工程菌构建成功。此外, pGHKW4 质粒在嗜虫耶尔森氏菌中具有较好的遗传稳定性, 因此, HasA 型血红素转运系统是在嗜虫耶尔森氏菌中的首选外分泌表达系统, 这也为后续将 *gfp* 基因替换成杀虫毒素基因, 从而为外分泌杀虫毒素蛋白菌株构建提供研究基础。

## 参考文献

- [1] Lu CH, Pu HP, Han B, Wang M, Yang Q. Study on the biological characteristic of *Monochamus alternatus* hope. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2000, 27(3): 243–246. (in Chinese)  
吕传海, 濮厚平, 韩兵, 王蒙, 杨琴. 松墨天牛生物学特性

- 研究. 安徽农业大学学报, 2000, 27(3): 243–246.
- [2] Chen JR, Peng XZ. Summary of prevention and control techniques of *Monochamus alternatus*. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2014, 4(12): 16–18. (in Chinese)  
陈井荣, 彭小忠. 松墨天牛防治技术综述. 农业灾害研究, 2014, 4(12): 16–18.
- [3] Liu HJ, Shu QL. Research progress on biological control of *Bursaphelenchus xylophilus* vector - *Monochamus alternatus* Hope. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2007, 13(8): 127–128. (in Chinese)  
刘洪剑, 束庆龙. 松材线虫病的传播媒介-松墨天牛生物防治研究进展. 安徽农学通报, 2007, 13(8): 127–128.
- [4] 王玲萍. 松材线虫病媒介昆虫——松墨天牛的研究. 福建农林大学硕士学位论文, 2002.
- [5] Hurwitz I, Fieck A, Read A, Hillesland H, Klein N, Kang A, Durvasula R. Paratransgenic control of vector borne diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, 7(9): 1334–1344.
- [6] Landsberg MJ, Jones SA, Rothnagel R, Busby JN, Marshall SDG, Simpson RM, Lott JS, Hankamer B, Hurst MRH. 3D structure of the *Yersinia entomophaga* toxin complex and implications for insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(51): 20544–20549.
- [7] Ward WW. Properties of the coelenterate green-fluorescent proteins//Deluca MA, McElroy WD. Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications. New York: Academic Press, 1981: 235–242.
- [8] He W, Wang ZK, Chen JH, Li Q, Cao YQ, Yin YP. Transformation of Bt pesticidal gene into predominant endogenetic bacterium isolated from *Apriona germari* (Hope) larvae intestines. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30(3): 5–10. (in Chinese)  
何伟, 王中康, 陈金华, 李强, 曹月青, 殷幼平. Bt 杀虫基因在桑粒肩天牛幼虫肠道内生优势菌中的转化研究. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 5–10.
- [9] Wang ZK, He W, Peng GX, Xia YX, Li Q, Yin YP. Transformation and pression of specific insecticide gene Bt cry3A in resident endogenetic bacteria isolated from *Apriona germari* (Hope) larvae intestines. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(9): 1168–1174. (in Chinese)  
王中康, 何伟, 彭国雄, 夏玉先, 李强, 殷幼平. 特异性杀虫基因 Bt cry3A 在桑粒肩天牛幼虫两种肠道常驻内生菌中的转化和表达. 微生物学报, 2008, 48(9): 1168–1174.

- [10] Yu JY, Jiang B, Zhang XP, Li S, Hu XM. Bacterial type VII secretion system. *Journal of Microbes and Infections*, 2015, 10(2): 127–132. (in Chinese)  
于俊媛, 姜北, 张骁鹏, 黎庶, 胡晓梅. 细菌VII型分泌系统的研究进展. *微生物与感染*, 2015, 10(2): 127–132.
- [11] Chang JH, Desveaux D, Creason AL. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52(1): 317–345.
- [12] Wang SB, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(31): 12734–12739.
- [13] Wang SB, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 2017, 357(6358): 1399–1402.
- [14] Akbari S, Ail Oshaghi M, Hashemi-Aghdam SS, Hajikhani S, Oshaghi G, Shirazi MH. Aerobic bacterial community of american cockroach *Periplaneta americana*, a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 2014, 9(1): 35–48.
- [15] Holland IB, Blight MA, Kenny B. The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from Gram-negative bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1990, 22(3): 473–491.
- [16] Li L, Liu MF, Cheng AC. Structural and functional reveal of the hemophore in Gram-negative bacteria. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1358–1365. (in Chinese)  
李岭, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌血红素载体蛋白 Hemophore 的结构及作用机制. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1358–1365.
- [17] Valeva A, Siegel I, Wylenzek M, Wassenaar TM, Weis S, Heinz N, Schmitt R, Fischer C, Reinartz R, Bhakdi S, Walev I. Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation. *Biological Chemistry*, 2008, 389(9): 1201–1207.
- [18] Cheng XJ, Liu MF, Cheng AC. Structural and functional properties of the Heme acquisition system in gram-negative bacteria. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30(9): 848–855. (in Chinese)  
程兴军, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌血红素转运系统结构及功能特点. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(9): 848–855.
- [19] 邵明非. 鳗弧菌基于大肠杆菌  $\alpha$ -溶血素分泌系统分泌表达外源蛋白的研究. 华东理工大学硕士学位论文, 2005.
- [20] Zhen YH, Han L, Liang AX, Wang QL, Yang LG. Study on genetic stability of Inhibin recombinant plasmid in the attenuated salmonella choleraesuis C500 strain. *Biotechnology Bulletin*, 2009, (S1): 300–304. (in Chinese)  
甄艳红, 韩丽, 梁爱心, 王庆玲, 杨利国. 含抑制素重组质粒的减毒猪霍乱沙门氏菌 C500 遗传稳定性研究. *生物技术通报*, 2009, (S1): 300–304.
- [21] Xiao S, Hong HZ, Peng JX. Research progress on plasmid stability in recombinant. *Biotechnology Bulletin*, 2008, (4): 9–12. (in Chinese)  
肖硕, 洪华珠, 彭建新. 基因工程菌中重组质粒的稳定性研究进展. *生物技术通报*, 2008, (4): 9–12.
- [22] Ning YL, Zhou LX, Zhang WJ, Lu DS, Xiao B, Mao XH, Zou QM. Extracellular secretion of recombinant hIL-6 utilizing UPEC  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) system. *Immunological Journal*, 2008, 24(4): 380–384. (in Chinese)  
宁亚蕾, 周立雄, 张卫军, 鲁东水, 肖斌, 毛旭虎, 邹全明. 利用  $\alpha$ -溶血素系统分泌表达重组人白介素-6. *免疫学杂志*, 2008, 24(4): 380–384.

# Construction of HlyA and HasA exocrine expression systems in *Yersinia pestis*

Chenyan Huang<sup>1#</sup>, Ruping Zheng<sup>2#</sup>, Zhongxiu Li<sup>1</sup>, Yunqin Yu<sup>1</sup>, Yuqi Luo<sup>1</sup>, Jianshuang Zhou<sup>1</sup>, Feiping Zhang<sup>1</sup>, Songqing Wu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Integrated Pest Management in Ecological Forest, Fujian Province University, Forestry College of Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

<sup>2</sup> College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] Construction of transgenic strain can effectively improve the insecticidal effect. But the insecticidal toxin cannot be secreted from intracellular to extracellular, so it cannot directly act on the insect body. Therefore, if we can construct an engineered strain with exocrine protein function, it is an effective way to solve these problems. [Methods] In this study, the growth characteristics and resistance of *Yersinia pestis* (CSLH88) isolated from the intestinal tract and habitat of *M. alternatus* were determined, and then the molecular modification was carried out. The exocrine expression vectors of HlyA (pGHKW2) and HasA (pGHKW4) were constructed and transformed into CSLH88 strain by electroporation to obtain engineering strain capable of expressing green fluorescent protein. The genetic stability of the two plasmids was tested, and the exocrine function of the proteins was verified by SDS-PAGE and Western blotting techniques. [Results] The strain of CSLH88 could enter logarithmic growth stage after 2–4 hours of culture and had no resistance to kanamycin (Kan). Two exocrine expression vectors, pGHKW2 (GenBank: MK562405) and pGHKW4 (GenBank: MK562404), were successfully constructed. It was found that pGHKW4 plasmid was more suitable for stable inheritance in *Y. pestis*. The results of SDS-PAGE and Western blot showed that the secretion of extracellular proteins in HlyA system protein was blocked, while the HasA system could play an exocrine expression function in CSLH88 strain. [Conclusion] By studying the exocrine expression systems of HlyA and HasA, HasA heme transport system was selected as the exocrine expression system of CSLH88 strain. It lays a foundation for the construction of exocrine toxin protein strain and the pathogenicity of CSLH88 strain.

**Keywords:** *Monochamus alternatus* Hope, *Yersinia pestis*, exocrine expression system, green fluorescent protein

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Project (2017YFD0600105), by the National Natural Science Foundation of China (31601905), by the Fujian Science and Technology Department Natural Science Foundation (2016J01097), by the Fujian Science and Technology Plan Project (2018N5002), by the Fujian Agricultural and Forestry University Scientific Research Fund (xjq201614), by the Fujian Agricultural and Forestry University Forestry College Forest Science Peak Discipline Project (71201800720, 71201800753 and 71201800779), by the Fujian College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (201810389102) and by the Fujian Forestry Science Research Project [Minlinke (2017) 03]

\*Corresponding author. E-mail: dabinyang@126.com

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 23 February 2019; Revised: 30 May 2019; Published online: 21 June 2019