

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (8) :956 - 961; 4 August 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.015

副溶血弧菌 ToxR 截短体蛋白的表达纯化及其 DNA 结合活性

胡小许¹, 张义全², 黄倩³, 王丽², 杨瑞馥², 黎晓敏³, 周冬生^{2*}, 钟青萍^{1*}

¹ 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

² 北京军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

³ 西南大学动物科技学院, 重庆 400715

摘要: 【目的】利用大肠杆菌 BL21 λ DE3 表达系统, 表达出有活性的副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) ToxR 截短体蛋白, 为进一步研究 ToxR 的转录调控机制奠定基础。【方法】以 VP 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 ToxR 蛋白 DNA 结合结构域 (ToxR-N) 的 DNA 片段, 并将其直接克隆入 pET28a 中, 获得重组质粒; 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21 λ DE3 中, 所得菌株经 IPTG 诱导后能表达出 His-ToxR-N 蛋白。利用限制级凝血酶切除 His-ToxR-N 中的 His-标签, 进而以 VP 的 *calR* 和 VP1687 为靶基因, 通过体外的凝胶阻滞实验 (EMSA) 验证 ToxR-N 蛋白的 DNA 结合活性。分别构建克隆有 *calR* 和 VP1687 上游启动子区的 LacZ 重组质粒, 并将重组质粒转入野生株 (WT) 和 *toxR* 突变株 (Δ *toxR*) 中, 通过测定 β -半乳糖苷酶活性来比较两株重组菌中靶基因启动子活性, 以验证 ToxR 对 *calR* 和 VP1687 的调控关系。【结果】成功表达出有活性的 ToxR-N 蛋白, 该蛋白对 *calR* 启动子区具有结合活性。LacZ 结果显示 ToxR 对 *calR* 的转录具有激活作用, 而对 VP1687 的转录具有抑制作用。【结论】所表达的 ToxR-N 可用于后续的转录调控机制研究; ToxR 通过直接激活 *calR* 的转录表达, 而间接抑制 T3SS1 相关基因的表达。

关键词: 副溶血弧菌, ToxR, DNA 结合活性, 转录调控

中图分类号: R392 文章编号: 0001-6209 (2014) 08-0-0

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种革兰氏阴性嗜盐弧菌, 广泛存在于浅海海水及虾、蟹、蛤、牡蛎等海产品中, 人们食用了被其污染的食物后, 可能会引起以发热、腹泻、恶心、呕吐等为主要症状的急性胃肠炎, 严重者可出现脱水、休克, 甚至死亡; 另外, 临床上偶见 VP 经伤口感染而引起败血症和组织感染^[1]。VP 能产生多种毒力因子, 主要包括直接耐热溶血素 (TDH) 及 TDH 相关溶血素 (TRH), 其中 TDH 是引起神奈川现象 (Kanagawa

phenomenon, KP) 的直接原因^[2]。VP 有两套 III 型分泌系统 (T3SS), 位于大小染色体上, 分别称为 T3SS1 和 T3SS2, T3SS1 主要和细胞毒性相关, 而 T3SS2 主要具有肠毒性^[2]。

ToxR 是一个跨膜调控子蛋白, 其 N-末端位于胞浆, 具有一个 winged-helix-turn-helix (wHTH) DNA 结合域; 而 C-末端位于周质, 具有一个二聚化结构域^[3]。ToxR 通常以二聚体的形式结合到靶基因启动子区而调节基因转录。在霍乱弧菌 (*Vibrio*

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271956, 31170127)

* 通信作者。钟青萍, E-mail: zhongqp@scau.edu.cn; 周冬生, E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

作者简介: 胡小许 (1987 -), 女, 河南漯河市人, 硕士研究生, 主要从事副溶血弧菌转录调控机制研究。

收稿日期: 2013-10-23; 修回日期: 2014-01-27

cholerae, VC) 中, ToxR 与另一跨膜蛋白 TepP 共同结合到 *toxT* 启动子区激活其转录表达, ToxT 再直接激活 *tcp* (编码菌毛粘附因子) 和 *ctx* (编码霍乱毒素) 操纵子的转录表达, 使 VC 表现出强毒性^[4]。另外, ToxR 还能通过直接激活 (和抑制) 外膜蛋白 OmpU (和 OmpT) 的表达来调节 VC 对外界环境的适应能力^[4]。在 VP 中, 已有研究表明 ToxR 能通过 CalR 抑制 T3SS1 基因的表达^[5], 但是并未阐明 ToxR 能否直接作用于它们的启动子区。ToxR 没有保守的识别基序, 但是对 TNAAA-N5-TNAAA 或其互补序列具有较高的亲和力^[6]。在 *calR* 启动子区有一段与上述重复序列相似的序列, 而在 T3SS1 基因 (如效应子基因 VP1687) 的启动子区却没有发现相似的序列, 这表明 ToxR 极可能是通过直接激活 *calR* 的转录, 而间接抑制 T3SS1 相关基因的表达。

VP 的 ToxR 由 292 个氨基酸组成, 其中第 1 - 176 氨基酸残基为胞浆区 (N-末端), 第 177 - 196 氨基酸残基为跨膜区, 余下的氨基酸残基为周质区 (利用网站 <http://phobius.sbc.su.se/> 预测)。本研究中, 我们利用大肠杆菌 BL21λDE3 的表达系统, 以 pET28a 质粒为载体, 克隆表达了 VP ToxR 蛋白的 N-末端 DNA 结合结构域 (第 1 - 176 氨基酸残基, 简称 ToxR-N), 进而以 *calR* 和 VP1687 为靶基因, 通过凝胶阻滞实验 (EMSA) 验证 ToxR-N 的 DNA 结合活性, 为后续 ToxR 的转录调控机制研究奠定基础。最后利用 LacZ 报告基因融合实验研究 ToxR 对 *calR* 和 VP1687 的调控关系, 结果表明 ToxR 确实是通过直接激活 *calR* 的转录来间接抑制 T3SS1 相关基因 (VP1687) 的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验所用的副溶血弧菌 RIMD2210633 株 (WT) 及其 *toxR* 突变株 ($\Delta toxR$)、大肠杆菌 BL21λDE3 和 DH5α, 质粒 pET28a (含有 His 标签, 卡那霉素抗性)、*calR*::pHRP309 及 VP1687::pHRP309 (pHRP309 质粒无启动子区的 β-半乳糖苷酶基因上游分别克隆入 *calR* 和 VP1687 的启动子区序列, 庆大霉素抗性) 等均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: 实验所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶和

dNTPs 为 MBI Fermentas 公司产品; DNA marker DL2000 为 TaKaRa Biotech 公司产品; 质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 产品; 蛋白分子量标准为 Thermo 公司产品; Gel Shift Assay System 和 β-Galactosidase Enzyme Assay System 为 Promega 公司产品; 限制级凝血酶为 Novagen 产品。

1.2 ToxR-N 的克隆表达

1.2.1 引物设计与 PCR 扩增: 用生物学软件 Primer Premier 5.0 设计扩增 *toxR* 基因的引物对 (见表 1), 并以 WT 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增参数为 95°C 5 min; 94°C 40 s, 54°C 40 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 5 min。

1.2.2 酶切与连接: 纯化回收 1.2.1 的 PCR 产物, 并提取 pET28a 质粒, 而后分别用 *Bam* HI 或 *Hind* III 对 PCR 产物和质粒进行单酶切。酶切体系为: 目的 DNA 片段 5 μL (约 200 ng/μL), *Bam* HI 或 *Hind* III 1 μL, 10 × 缓冲液 2 μL, 100 × BSA (小牛血清蛋白) 0.2 μL, 补加去离子水至 20 μL, 分别切 5 个体系。酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收。

将上述酶切产物进行连接, 体系如下: 酶切后的 PCR 产物和 pET28a 质粒各 1 μL (约 100 ng), T4 DNA 连接酶 1 μL, 10 × 缓冲液 1 μL, 补加去离子水至总体积为 10 μL, 4°C 下连接 8 - 12 h。

1.2.3 连接产物的转化: 取 50 μL 的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞加入到 10 μL 连接产物中, 冰浴 30 min 后于 42°C 热冲击 90 s, 再冰浴 3 min, 加入 600 μL 的 LB 肉汤, 置 37°C 下 200 r/min 活化 1 h, 取 100 μL 均匀的涂布于含卡那霉素抗性 (50 μg/mL) 的 LB 平板上, 置 37°C 下静置培养至出现单克隆。

挑取单克隆菌体于 50 μL 去离子水中, 沸水浴中作用 10 min, 12000 × g 离心 5 min, 取上清作为 PCR 模板, 用与 1.2.1 中相同的引物对, 进行 PCR 鉴定 (扩增参数同上), 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 阳性克隆应可见大小约为 548 bp 的条带。将阳性克隆送北京博迈德科技发展有限公司测序, 测序引物为 pET28a 通用引物 (T₇/T₇t, 见表 1)。

1.2.4 His-ToxR-N 的表达: 从大肠杆菌 DH5α 中提取经测序验证的重组质粒, 并利用热冲击法将其转入大肠杆菌 BL21λDE3 中。将 PCR 鉴定正确的单克隆接种至 LB 液体培养基中, 37°C 下 200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 1.0$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 18°C 下 100 r/min 诱导表达 16 - 18 h, 收集菌体, 分别取超

声裂解的上清、沉淀及全菌,进行 SDS-PAGE 电泳分析,鉴定 His-ToxR-N 的表达情况。

表 1. 本文所用引物汇总

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

target	sequences (5'→3')	restriction site
protein expression		
<i>toxR</i>	AGCGGGATCCATGACTAACATCGGCACCAA/GCGAAAGCTTTTAAGGATTCACAGCAGAAG	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
T ₇ /T ₇ t	TAATACGACTCACTATAGGG/GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
EMSA		
<i>calR</i>	GTTTGTCTGCTCGGATTGTTTG/CAAAGTGCTTTCCATACGGTAG	
VP1687	GCATTATTGACGCCACTATCG/GGCAACGGTGAGCAAAATC	
LacZ fusion		
<i>calR</i>	GCGGTCGACGTTTGTCTGCTCGGATTGTTTG/GCGTCTAGACAAAGTGCTTTCCATACGGTAG	<i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I
VP1687	GCGCGTCGACGCATTATTGACGCCACTATCG/GCGCTCTAGAGGCAACGGTGAGCAAAATC	<i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I

1.2.5 ToxR-N 的纯化:将能表达重组蛋白的阳性克隆接种至 200 mL LB 肉汤中,37°C 下 200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 1.0$,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,18°C 下 100 r/min 诱导表达 16–18 h,收集菌体。超声裂解菌体,4°C 下 12000 × g 离心 30 min,取上清,并让其缓慢的经 Ni-NTA 柱流下,分别用 pH7.4 的 wash buffer A 和 B (咪唑浓度分别为 20 mmol/L 和 40 mmol/L) 洗去杂蛋白,此时 His-ToxR-N 仍存在于 Ni-NTA 柱上。用 1 mL 预冷的 0.02 mol/L PB 缓冲液 (pH7.4) 配限制级凝血酶工作液 (3.6 U/mL),将该工作液加入结合有 His-ToxR-N 的 Ni-NTA 柱上,4°C 下作用 14–16 h,此时 His-ToxR-N 上的 His-标签将被特异性切除。ToxR-N 蛋白用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗脱,透析浓缩后,用紫外分光光度计测其 260 nm 和 280 nm 的吸光值,以计算其浓度 ($= OD_{280} \times 1.44 - OD_{260} \times 0.74$),分装后,置 -60°C 保存。取 30 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.3 凝胶阻滞实验^[7] (EMSA)

PCR 扩增 *calR* 和 VP1687 的启动子区 DNA 序列 (引物见表 1),并用 [γ -³²P] ATP (10 mCi/mL) 对其 5' 末端进行标记,以制备 EMSA 探针。将探针与不同浓度的 His-ToxR 在 10 μL 结合反应体系中,室温共孵育 20 min 后,进行 4% 聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳,放射自显影后,分析结果。

1.4 LacZ 报告基因融合实验

PCR 扩增 *calR* 和 VP1687 的整个启动子区 DNA 序列,并分别克隆入 pHRP309 质粒无启动子区 β-半乳糖苷酶基因的上游,构建 LacZ 重组质粒。分别将重组质粒转入 WT 和 $\Delta toxR$ 中,得 LacZ 菌株。将 LacZ 菌株接种至 15 mL 的 HI 肉汤中 (含 10 μg/mL 的庆大霉素),37°C 下 200 r/min 培养至平

台期,而后按 1:1000 稀释接种至新鲜的 15 mL HI 肉汤中,37°C 下 200 r/min 培养 $OD_{600} = 0.3 - 0.4$,收集菌体,用 β-Galactosidase Enzyme Assay System 分别检测 WT 和 $\Delta toxR$ 中的 β-半乳糖苷酶活性 (Miller Units),通过比较 Miller Units 数值的大小差异,即可判断 ToxR 对靶基因的调控关系 (以 t 检验的 $P < 0.01$ 为判定标准)。

2 结果

2.1 ToxR-N 的表达纯化

利用分子克隆的方法构建表达 ToxR-N 的重组质粒。将测序无突变的重组质粒转入大肠杆菌 BL21ΔDE3 中,按 1.2.4 的方法进行预表达,并利用 SDS-PAGE 电泳进行分析,结果如图 1-A 所示:上清 (泳道 1)、沉淀 (泳道 2) 和全菌 (泳道 3) 中均有目的蛋白存在 (箭头所指位置),且上清中目的蛋白条带亮度几乎和沉淀中的一样,这说明在该诱导条件

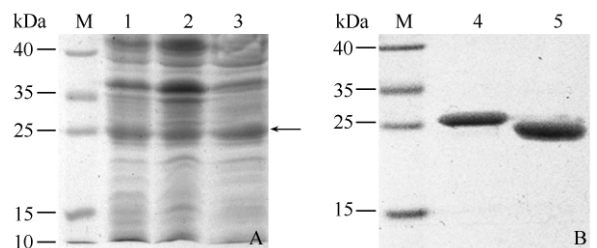


图 1. ToxR 重组蛋白预表达 (A) 与纯化后 (B) 的 12% SDS-PAGE 电泳图

Figure 1. SDS-PAGE analysis of the cell lysates (A) and the purified recombinant ToxR protein (B). M: Protein molecular weight standard; Whole (lane 1), pellet (lane 2) and supernatant (lane 3) of cell lysates; lane 4: His-ToxR-N; lane 5: ToxR-N. The band of His-ToxR-N was indicated by arrows.

下,可溶性表达所占比例较高,可以用于后续的纯化步骤。为了去除 His-标签对 ToxR-N 活性的影响,我们用限制性凝血酶切除了重组蛋白的 His-标签,并用 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 1-B 所示:当切除 His-标签后,ToxR-N 蛋白与 His-ToxR-N 相比,其分子量变小,且二者均与理论值一致。将 ToxR-N 透析浓缩后,用紫外分光光度计测其浓度约为 0.8 mg/mL。

2.2 ToxR-N 具有 DNA 结合活性

利用 EMSA 实验验证所纯化的 ToxR-N 是否具有 DNA 结合活性,其结果如图 2 所示:当 ToxR-N 蛋白量达到 0.6 pmol 时(泳道 3),*calR* 就出现了很微弱的阻滞带;当蛋白量达到 0.8 pmol 时,*calR*

出现了完全阻滞现象(泳道 4);当先加入未标记的启动子 DNA 片段(cold probe,泳道 5)作为竞争性冷探针时,由于 ToxR-N 先与冷探针结合,就不能再与探针结合,此时阻滞带就会减少甚至消失(泳道 5),但加入 16S rDNA (negative probe,泳道 6)作为阴性对照时就没有此效应;当只加入鼠疫菌 F1 抗原蛋白(un-related protein,泳道 7),而不加 ToxR-N 蛋白,就未见阻滞带。而在所有浓度梯度下,VP1687 和阴性对照 16S rDNA 均未出现阻滞条带。这些结果表明 ToxR-N 能特异性的结合到 *calR* 的启动子 DNA 上,而对 VP1687 的启动子 DNA 无结合作用。

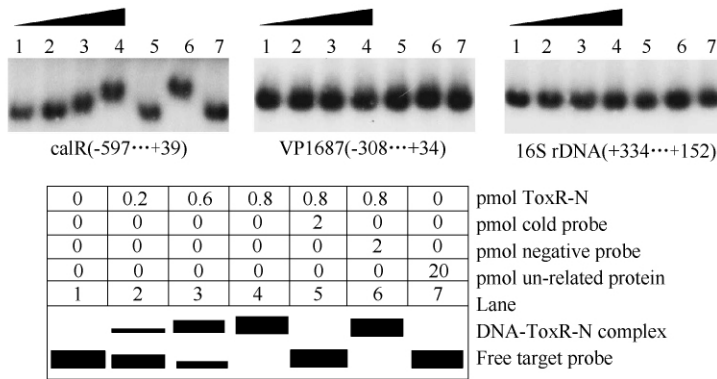


图 2. ToxR-N 对靶基因的 EMSA 放射自显影结果

Figure 2. EMSA assay of binding of ToxR-N to target promoter regions. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively. Shown below was the schematic representation of the EMSA design.

2.3 ToxR 能调控 *calR* 和 VP1687 的转录表达

我们利用 LacZ 报告基因融合实验来研究 ToxR 对 *calR* 和 VP1687 的调控关系。图 3-A 为 *calR* 的 LacZ 实验结果,可以看出:在 WT 中检测出的 β -半

乳糖苷酶活性 (Miller Units) 明显高于 $\Delta toxR$ 中的,且二者具有显著差异性 ($P < 0.001$),这表明 ToxR 能激活 *calR* 的转录表达;同理,从图 3-B 中可以看出 ToxR 能抑制 VP1687 的转录表达。

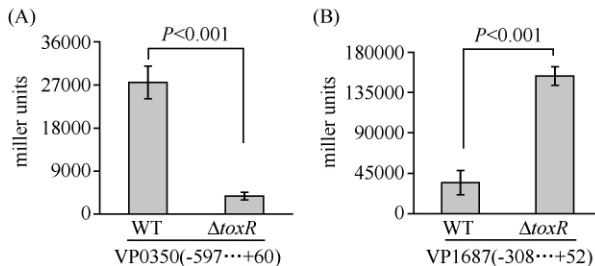


图 3. ToxR 能调控 *calR* (A) 和 VP1687 (B) 的转录表达

Figure 3. Transcription of *calR* and VP1687 was regulated by ToxR in *V. parahaemolyticus*. The target promoter-proximal DNA region was cloned into the *lacZ* fusion vector pHRP309, and then transformed into WT and $\Delta toxR$, respectively, to determine the promoter activity (Miller units) in the cellular extracts. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively.

3 讨论

VC 的 ToxR 蛋白由 297 个氨基酸构成,其中 N-末端的 1-182 氨基酸位于胞浆,包含一个 wHTH 结构域(第 20-123 氨基酸)和一个铰链区(hinge,第 139-181 氨基酸),铰链区能促进 ToxR 在体外条件下的二聚化;第 183-198 氨基酸为跨膜区;C-末端周质区由第 210-297 氨基酸组成,它通过一个 X 区域(199-209 氨基酸)与跨膜区相连,周质区具有感应环境信号和促进 ToxR 二聚化的功能^[3]。虽然只有二聚化后的 ToxR 才具有转录调节活性,但是其对 DNA 片段的特异性结合活性却不需要跨膜区和周质区的参与^[3],这为 ToxR 蛋白的可溶性表达提供了理论依

据。本研究中,我们利用大肠杆菌 BL21 λ DE3 的表达系统,成功表达了 VP 的 ToxR 截短体蛋白(1-176 氨基酸,ToxR-N),该蛋白为可溶性表达。进而我们以 *calR* 和 VP1687 为靶基因,利用 EMSA 实验研究 ToxR-N 的 DNA 结合活性,结果显示 ToxR-N 能结合到 *calR* 的启动子区,而不能结合 VP1687 的启动子区,这说明 VP 菌 ToxR 对 DNA 片段的特异性结合活性也不需要跨膜区和周质区的参与。

ToxR 是 VC 毒力基因表达的触发因子,它与 TcpP 共同结合到 *toxT* 的启动子区并促进其转录,ToxT 再激活 IV 型菌毛(由 *tcp* 操纵子编码)和霍乱毒素(由 *ctx* 操纵子编码)的表达,二者是该菌致病所必需的毒力因子^[4]。在胆汁酸盐的诱导下,ToxR 也能直接结合到 *ctx* 的启动子区并激活其表达^[8]。在 VP 中,已有研究表明 ToxR 能调控 T3SS1 相关基因^[5]、溶血素基因 *tdh*^[9] 及外膜蛋白 *ompU*^[5] 的表达,可见 ToxR 在 VP 毒力基因表达调控中同样起着重要的作用。本文中,我们利用 LacZ 实验证明了 ToxR 对 *calR* 的转录具有激活作用,而对 VP1687 的转录具有抑制作用。

CalR 是 LysR 家族的转录调控子,其表达受 Ca^{2+} 的抑制^[10]。CalR 能抑制 VP 菌的集群性爬动能力^[10]。另外,*calR* 突变株对中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的裂解能力明显强于野生株的^[10],由于 T3SS1 主要具有细胞毒性^[11],这说明 CalR 能抑制 T3SS1 基因的转录。Whitaker 等利用 LacZ 报告基因融合实验证明 CalR 确实能抑制 T3SS1 基因的转录表达^[5]。ExsA 是 AraC 家族的转录调控子,铜绿假单胞菌的 ExsA 能结合位于 T3SS 基因启动子区的 TNAAANA 相似序列,并激活 T3SS 基因的表达^[12]。在 VP 中,ExsA 能直接结合到 T3SS1 结构基因 VP1668 和效应子基因 VP1687 的启动子区并激活它们的转录^[13]。因此,VP 的 ToxR 对 T3SS1 基因的调控可能是通过直接激活 *calR* 的表达,CalR 再直接抑制 *exsA* 的表达,从而解除 ExsA 对 T3SS1 基因的转录激活作用而实现的。后续研究中,我们将通过具体的实验来验证这一假设。

参考文献

- [1] Yeung PS, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1 (2):74-88.
- [2] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (4):1772-1780.
- [3] Hennecke F, Muller A, Meister R, Strelow A, Behrens S. A ToxR-based two-hybrid system for the detection of periplasmic and cytoplasmic protein-protein interactions in *Escherichia coli*: minimal requirements for specific DNA binding and transcriptional activation. *Protein Engineering Design & Selection*, 2005, 18 (10):477-486.
- [4] Childers BM, Klose KE. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiology*, 2007, 2 (3):335-344.
- [5] Whitaker WB, Parent MA, Boyd A, Richards GP, Boyd EF. The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin-induced adult murine model. *Infection and Immunity*, 2012, 80 (5):1834-1845.
- [6] Goss TJ, Morgan SJ, French EL, Krukoni ES. ToxR recognizes a direct repeat element in the *toxT*, *ompU*, *ompT*, and *ctxA* promoters of *Vibrio cholerae* to regulate transcription. *Infection and Immunity*, 2013, 81 (3):884-895.
- [7] Zhang YQ, Gao H, Wang L, Luo Z, Tan YF, Guo ZB, Yang RF, Zhou DS. Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (5):615-621. (in Chinese)
张义全,高鹤,王丽,罗张,谭亚芳,郭兆彪,杨瑞馥,周冬生.鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析. *微生物学报*, 2011, 51 (5):615-621. (in Chinese)
- [8] Hung DT, Mekalanos JJ. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (8):3028-3033.
- [9] Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ, Nishibuchi M. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175 (12):3844-3855.
- [10] Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (22):6025-6038.
- [11] Pineyro P, Zhou X, Orfe LH, Friel PJ, Lahmers K, Call DR. Development of two animal models to study the

function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (11):4551-4559.

[12] Hovey AK, Frank DW. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa*

exoenzyme S regulon. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (15):4427-4436.

[13] Zhou X, Shah DH, Konkel ME, Call DR. Type III secretion system I genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Molecular Microbiology*, 2008, 69 (3):747-764.

Purification and DNA-binding of ToxR truncated protein of *Vibrio parahaemolyticus*

Xiaoxu Hu¹, Yiquan Zhang², Qian Huang³, Li Wang², Ruifu Yang², Xiaomin Li³, Dongsheng Zhou^{2*}, Qingping Zhong^{1*}

¹ College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

³ School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] The DNA-binding domain of ToxR protein of *Vibrio parahaemolyticus* was expressed using the *Escherichia coli* BL21λDE3 protein expression system, and its DNA-binding activity was characterized. [Methods] The fragment of DNA-binding domain at N-terminal of ToxR (ToxR-N) was amplified by PCR from *V. parahaemolyticus* strain RIMD2210633, and then cloned into the *Bam*HI and *Hind* III sites of the vector pET28a. The recombinant plasmid pET28a was transformed into BL21λDE3. Over-expression of His-ToxR-N in the LB medium was induced by adding 1 mmol/L IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside). The over-expressed protein was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham), and then the His-tag was removed by using restricted thrombin. The electrophoretic mobility shift assay was used to analyze the DNA-binding activity of ToxR-N to the promoter-proximal DNA regions of *calR* and VP1687, respectively. The promoter-proximal regions of *calR* and VP1687 were separately cloned into the pHRP309 vector containing a promoterless *lacZ* gene. Then, each of the two recombinant LacZ reporter plasmids was transformed into the wide-type strain (WT) and the *toxR* null mutant strain (Δ *toxR*), respectively, to measure the promoter activity (the β-Galactosidase activity) of the target genes in WT and Δ *toxR* by using the β-Galactosidase Enzyme Assay System. [Results] The purified ToxR-N protein had the ability to bind to the upstream DNA regions of *calR* but not VP1687. The LacZ fusion results showed that the transcription of *calR* and VP1687 was positively and negatively regulated by ToxR in *V. parahaemolyticus*, respectively. [Conclusion] The recombinant ToxR-N protein could be used for studying the transcriptional regulation mechanism in *V. parahaemolyticus*. ToxR fulfills a mechanism of negative regulation of T3SS1 genes by activating the expression of *calR* through protein-proximal promoter DNA association.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, ToxR, DNA binding activity, transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271956, 31170127)

* Corresponding author. Qingping Zhong, E-mail: zhongqp@scau.edu.cn; Dongsheng Zhou, dongshengzhou1977@gmail.com

Received: 23 October 2013/Revised: 27 January 2014