

鳃鲰病原菌外膜蛋白三联表达载体的构建、 表达与表达产物的纯化

赵金平 段丽华 郭松林

集美大学水产学院/鳃鲰现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021

摘要 为研制能同时预防鳃鲰3种常见病原菌感染的三联外膜蛋白疫苗, 分别选择创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)外膜蛋白的 *ompU*、*ompA* 和 *omp porin II* 基因, 设计特异性引物后分别扩增基因中表达外膜蛋白膜外区域且抗原决定簇丰富的3个基因片段并通过融合 PCR 技术进行连接。根据表达载体(pGEX-2T-his)的限制性酶切位点, 在连接片段的两端引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 两个酶切位点, 将3个外膜蛋白基因片段与质粒连接后成功构建了重组表达载体。重组表达载体成功转化大肠杆菌(*E. coli* BL21)后, 当菌液浓度($D_{600\text{nm}}$)为0.8时加入0.25 mmol/L IPTG, 16℃培养过夜后得到了高效表达。表达产物用镍柱进行洗脱纯化后经梯度尿素复性获得了分子质量约85 ku的高纯度蛋白。

关键词 迟缓爱德华氏菌; 创伤弧菌; 嗜水气单胞菌; 三联外膜蛋白; 表达与纯化

中图分类号 S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0104-07

近20年来, 养殖鳃鲰疾病发生越来越频繁, 在很大程度上制约了我国鳃鲰养殖业的发展, 其中细菌性疾病对鳃鲰养殖的影响最大^[1-2], 而创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌是3种鳃鲰最常见的病原菌^[3-5]。治疗这些细菌性疾病的化学药物因其残留或产生抗药性等原因难以应用于养殖实践。近年来, 鱼类病原菌外膜蛋白的免疫原性研究成为热点, 研究发现以上3种病原菌均具有免疫原性较好的外膜蛋白^[6-8]。一般而言, 同属不同种的病原菌之间存在共同的外膜蛋白保护性抗原成分, 这些成分免疫后产生的抗体能抵抗属内多种病原菌的感染^[9]。然而, 通过 GenBank 数据库比对分析发现, 不同属病原菌外膜蛋白基因的同源性低, 无法筛选到共同外膜蛋白抗原。因此, 本研究分别选取弧菌属、爱德华氏菌属和气单胞菌属的3个常见鳃鲰病原菌种, 设计特异性引物分别扩增 *ompU*、*ompA* 和 *omp porin II* 三个外膜蛋白基因全长序列, 选取其理论上免疫原性较好且表达多肽位于膜外的3个基因片段, 采用融合 PCR 的方法拼接这3个片段, 将拼接好的序列与质粒连接后构建了重组表达载体,

在适宜条件下该重组表达载体得到了高效的表达。表达的基因工程三联外膜蛋白可为其进一步的免疫原性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

创伤弧菌(B88)、迟缓爱德华氏菌(B79)和嗜水气单胞菌(B11)取自鳃鲰菌种库, 均采用功能基因测序分析和 biolog 微生物鉴定系统鉴定到种^[10]。pGEX-2T-his 质粒: 国家海洋局第三海洋研究所馈赠, 在商业化质粒 pGEX-2T 加入 His 标签后兼具 Gst 和 His 标签, 含 *Eco*R I 和 *Bam*H I 等多个酶切位点, 并具有 Amp 抗性。

1.2 外膜蛋白基因片段的選擇与引物设计

通过对3种菌外膜蛋白基因全长所表达蛋白的结构、亲水性和抗原决定簇等的分析^[11], 根据嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌3个外膜蛋白基因序列的分析结果, 在3个基因的膜外区域选择免疫原性和亲水性都比较好的 DNA 片段, 分别为嗜水气单胞菌 II 型孔蛋白基因(172~711 bp)的

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001136); 鳃鲰现代产业技术教育部工程研究中心开放课题(RE201506)

赵金平, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: zhaojinping199001@163.com

通信作者: 郭松林, 博士, 副教授。研究方向: 鱼类病害与免疫防治。E-mail: gsl@jmu.edu.cn

540 bp、迟缓爱德华氏菌 *ompA* 基因(181~609 bp)的 429 bp 和创伤弧菌 *ompU* 基因(319~831 bp)的 513 bp。扩增 3 个片段的引物设计方法如下:

第 1 步:分别在 B88、B79、B11 两端设计 1 对引物(5'-3'): B88 (F1: GGCGCAAGTTTGGT-GAAGTG; R1: TTGGCTGTTCGTTTCTGCGT-TG), B79 (F2: GCTTTCTTCGCTACCAA; R2: CGGAGCAGCGACTTCATC), B11 (F3: TTC-TACGACGTGCTGGAACC; R3: AGAAGAGC-CACTCACGTTGG)。

第 2 步:根据要求分别在 R1 和 F3 的 5'端设计接头区域(阴影部分), 2 个接头分别与 B79 两端的 15 个碱基互补。即: R1-1 = 5' **GTAGCCGAAGAAAGC** + R1 3'; F3-1 = 5' **GAAGTCGCTGCTCCG** + F3 3'。如下:

F2: 5' **GCTTTCTTCGCTAC** CAA3';

3' CTA **CTTCAGCGACGAGGC** 5'; R2

3' R1 + **CGAAAGAAGCCGATG** 5'; R1-1

F3-1: 5' **GAAGTCGCTGCTCCG** + F3 3'

第 3 步:在 F1 和 R3 的 5'端加上酶切位点(阴影部分)和保护性碱基: CGC **GGATCC** (*Bam*H I) 和 CCG **GAATTC** (*Eco*R I)。最终合成的引物序列为(5'-3'): B88 (F1-1: CGCGGATCC + F1; R1-1: GTAGCCGAAGAAAGC + R1), B79 (F2; R2), B11 (F3-1: GAAGTCGCTGCTCCG + F3; R3-1: CCGGAATTC + R3)。

1.3 外膜蛋白基因片段的扩增与体外连接

按如下 50 μ L 体系分别扩增 3 个菌的外膜蛋白基因片段: 超纯水 37.5 μ L; 10 \times *Taq* Buffer (含有 KCl 5 μ L); MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L; dNTP (10 mmol/L) 1 μ L; DNA 模板 2 μ L; 正反向引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L; *Taq* DNA Polymerase 0.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 分别于 52 $^{\circ}$ C (B88)、51 $^{\circ}$ C (B79) 和 62 $^{\circ}$ C (B11) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳检验扩增到的片段大小。扩增的目的片段用 DNA 胶回收试剂盒回收并测定浓度。两步法 PCR^[13-14] 连接上述 3 个片段:

第 1 步 PCR (B88 和 B79 片段连接): 10 \times *Pfu* Buffer (含 MgSO₄ 5 μ L); dNTP (10 mmol/L) 1 μ L; B79 胶回收片段 250 ng; B88 胶回收片段 250 ng; *Pfu* DNA Polymerase 0.7 μ L; 超纯水补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变

性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 13 个循环。此时获得少量的连接产物。

第 2 步 PCR: 10 \times *Pfu* Buffer (含 MgSO₄ 5 μ L); dNTP (10 mmol/L) 1 μ L; 第 1 步的 PCR 连接产物 10 μ L; B88 正向引物(10 mmol/L) 1 μ L; B79 反向引物(10 mmol/L) 1 μ L; *Pfu* DNA Polymerase 0.7 μ L; 超纯水补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 13 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳检验扩增到的连接片段大小。胶回收连接片段并测定浓度。

以上 2 步骤获得 B88 和 B79 的连接片段, 再用同法将该连接片段与 B11 连接。

1.4 拼接片段与质粒 pGEX-2T-his 的连接

质粒和拼接片段分别双酶切: *Bam*H I 酶 1 μ L; *Eco*R I 酶 1 μ L; 缓冲液 2 μ L; 提取的质粒(或拼接片段) 8 μ L; 超纯水 8 μ L。小离心机上离心 30 s 后置 PCR 仪, 37 $^{\circ}$ C 3 h, 80 $^{\circ}$ C 20 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测并胶回收, 测定浓度。连接反应体系: 双酶切过的 pGEX-2T-his 30 ng; 双酶切过的目的基因与载体物质的量之比 3 : 1; 10 \times T4 Buffer 2 μ L; T4 DNA 连接酶 1 μ L; 超纯水补足 20 μ L; 置 PCR 仪, 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h。

1.5 重组载体的转化、筛选和鉴定

取 10 μ L 本文“1.4”中拼接片段与质粒连接成的重组载体加入 200 μ L -70 $^{\circ}$ C 保存的 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 轻轻吸吹 20 次。冰浴 40 min, 置于水浴锅内 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s 后(不能摇动)立即埋入冰中 2 min。加入 600 μ L 37 $^{\circ}$ C 预热的 LB 液体培养基, 置于培养箱中 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 复壮 60 min。分别取 150 μ L、450 μ L 涂平板(含 Amp 80 μ g/mL), 待表面液体渗进培养基后倒置培养基, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 16 h。

用牙签挑取 10 个单克隆于含 300 μ L LB 液体培养基(含 Amp 80 μ g/mL)的 1.5 mL 离心管里, 37 $^{\circ}$ C、280 r/min 培养 80 min。采用如下体系(50 μ L)扩增表达载体上的连接基因序列: 10 \times Buffer 5 μ L; 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L; 引物 F1-1 和 R3-1(终浓度 0.1 μ mol/L) 各 0.2 μ L; *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L; DNA 模板 2 μ L; 补无菌水至 50 μ L。梯度 PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55~60 $^{\circ}$ C 梯度退火(每个梯度约相差 0.5 $^{\circ}$ C) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10

min, 4 °C 保存。1% 琼脂糖电泳检测。

1.6 蛋白诱导表达及其表达形式鉴定

IPTG 浓度在 0.25~2.00 mmol/L、诱导温度 16~37 °C、诱导时间 1.5~7 h 时产生的目的蛋白表达量一般无明显差异^[12]，在此探讨不同菌液初始浓度时 IPTG 诱导对蛋白表达的影响。将含有重组载体的 BL21(DE3) 划平板(含 Amp 80 μg/mL)，37 °C 过夜培养后挑取单菌落到 LB 液体培养基中(含 Amp 80 μg/mL)过夜培养，再按 1:100 的比例用 LB 液体培养基稀释，16 °C 250 r/min 培养，待 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1、0.3、0.6、0.8、1.0 时，分别加入 1 mol/L IPTG 使其终浓度为 0.25 mmol/L，诱导 5 h 后进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。当 $D_{600\text{nm}} = 0.8$ 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L，16 °C 250 r/min 过夜培养后取诱导重组菌全菌，将部分菌液超声波破碎，离心取沉淀和上清，同时取未诱导的重组 BL21 全菌作为对照进行电泳检测。

1.7 表达蛋白纯化、复性与冻干浓缩

取 500 mL 经 IPTG 诱导过夜的菌液，4 °C 5 000 r/min 离心 10 min；菌体加入适量 4 °C 预冷的超纯水重悬后离心；菌体加入 40 mL 2 mol/L 尿素结合缓冲液和 400 μL PMSF，冰浴超声破碎菌体(90 W，破碎 1 s，停 3 s；共 5 min)；4 °C，10 000 r/min 离心 5 min；沉淀用 4 °C 预冷的 PBS 重悬，同条件离心，沉淀加适量(6 mL)预冷的结合缓冲液(A 液)重悬菌体(避免气泡)；平衡后 4 °C 20 000 r/min 离心 5 min，取上清并转移到新的离心管，即为粗提的外膜蛋白样品。

镍柱纯化外膜蛋白变性后 SDS-PAGE 电泳检测。

蛋白复性与冻干：以 0.01 mol/L PBS(pH = 7.4) 分别配制 8、6、4、2、1 和 0 mol/L 的尿素缓冲液各 1 000 mL，调 pH 至 7.9，置 4 °C 备用；将镍柱纯化的蛋白样品装入预处理好的透析袋，置 8 mol/L 和 6 mol/L 尿素 PBS 缓冲液各 12 h，依次置 4、2、1 和 0 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液 8 h，双蒸水中 16 h，更换双蒸水 1 次。取 10 μL 复性液 SDS-PAGE 电泳检测。蛋白样品置 -70 °C 过夜后冷冻干燥为粉末，分装后置 -70 °C 备用。

1.8 连接产物的亲水性和免疫原性预测

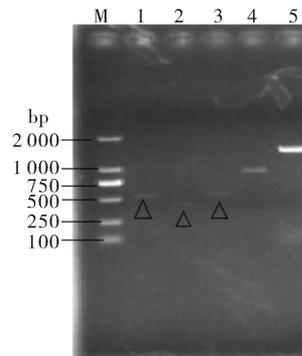
将连接产物的碱基序列转换成氨基酸序列后，用 DNA star 软件的 Editseq 和 Protean 程序分别

对该蛋白质进行亲水性和免疫原性的分析预测^[11]，再对 B88、B79、B11 的外膜蛋白片段进行免疫原性分析。

2 结果与分析

2.1 3 个基因膜外片段的扩增和连接

采用 3 对引物进行 PCR 扩增后，3 个外膜蛋白基因片段均得到扩增(图 1，泳道 1、2、3)，序列分析表明扩增的基因片段大小与预期相符(B88:513 bp、B79:429 bp、B11:540 bp)。B88 与 B79 的连接片段与预期大小(942 bp)相符(泳道 4)，泳道 5 是 3 个基因连接后的片段，可见 1 482 bp 处有一清晰的条带，与预期大小相符，将该连接片段胶回收后用于下一步的双酶切。



M: Marker; 泳道 1~3 分别为 B88、B79 和 B11 外膜蛋白基因 PCR 的扩增结果；泳道 4 为 B88 与 B79 连接的 PCR 扩增结果；泳道 5 为 3 个基因连接的 PCR 扩增结果。M: Marker; 1-3: PCR amplified results of three omp gene fragments; 4: The fused sequence of B88 and B79; 5: The fused sequence of three fragments.

图 1 PCR 扩增 3 个外膜蛋白基因片段与其连接产物的琼脂糖凝胶电泳结果

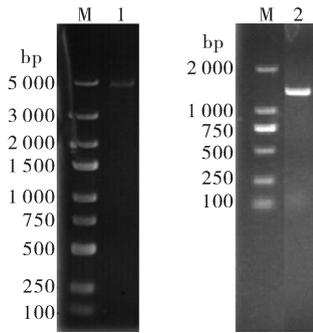
Fig. 1 Agarose gel electrophoretic results of three gene fragments and two fused sequences

2.2 质粒和基因拼接片段的双酶切

分别将质粒 pGEX-2T-his(图 2，泳道 1)和 3 个基因连接产物(泳道 2)用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现条带清晰，无杂带，表明酶切效果良好，酶切位点选择正确。

2.3 不同菌液初始浓度诱导表达结果

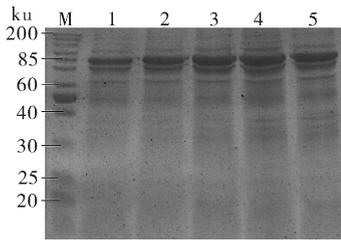
从图 3 可以看出，重组菌初始菌浓度 $D_{600\text{nm}}$ 在 0.1~1.0 范围时，通过 IPTG 诱导均能表达目的蛋白。当 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1 和 0.3 时，目的蛋白的表达量比较少(泳道 1、2)，但是当 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 至 1.0 时，目的蛋白表达量较多且无明显差异(泳道 3~5)。



M: Marker; 1: 双酶切后的质粒; 2: 双酶切后连接片段。M: Marker; 1: The digested plasmid; 2: The digested fused fragment.

图 2 质粒和 3 个基因拼接片段双酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic results of the plasmid and the fused fragment of three omp gene fragments digested by *EcoR* I and *Bam*H I



M: Marker; 1~5 表示 D_{600} 分别为 0.1、0.3、0.6、0.8、1.0 时以 IPTG 诱导重组菌表达目的蛋白的结果。M: Marker; 1-5: The expressed protein induced by IPTG at 0.1, 0.3, 0.6, 0.8 and 1.0 of the $D_{600\text{ nm}}$ value of BL21 respectively.

图 3 不同菌液初始浓度 IPTG 诱导表达目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

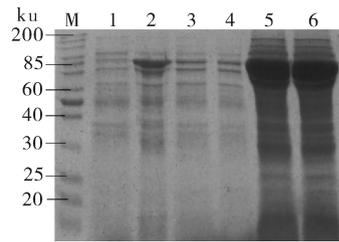
Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretic results of the expression protein induced by IPTG at different concentration of *E. coli* BL21

2.4 目的蛋白表达形式的鉴定

从图 4 可知,未加与加入 IPTG 诱导的重组菌分别不表达或表达目的蛋白(泳道 1、2)。加 IPTG 诱导表达的目的蛋白主要存在于超声波破碎菌液后的沉淀中(泳道 3、4),在上清中没有发现目的蛋白(泳道 5~6),表明该目的蛋白是以包涵体形式表达的。

2.5 表达蛋白的纯化与复性

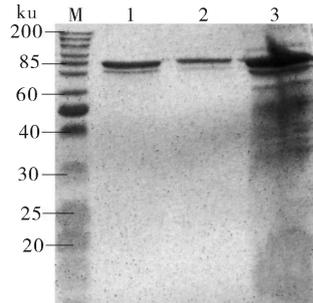
经复性的目的蛋白在透析袋中透明无沉淀,表明复性成功。取 10 μL 透析袋中液体进行 SDS-PAGE 电泳检测。发现在 85 ku 处有一蛋白条带(图 5,泳道 1),虽然比较微弱,但是无杂带且与目的蛋白大小(85 ku)相符,表明复性效果良好,蛋白没有发生断裂或降解。



M: Marker; 泳道 1: 未诱导的重组菌; 泳道 2: 诱导的重组菌; 泳道 3~4: 重组菌诱导表达超声破碎离心后的上清; 泳道 5-6: 重组菌诱导表达超声破碎离心后的沉淀。M: Marker; 1: Without IPTG induced recombinant BL21; 2: IPTG induced recombinant BL21; 3-4: Supernatants of ultrasonication and centrifugation of the recombinant BL21; 5-6: Pellet of ultrasonication and centrifugation of the recombinant BL21.

图 4 目的蛋白表达形式的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoretic results of the form of the expressed protein



M: Marker; 泳道 1: 纯化蛋白; 泳道 2: 复性蛋白; 泳道 3: 未纯化蛋白。1: Purified protein; 2: Renatured protein. 3: Unpurified protein.

图 5 纯化与复性蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

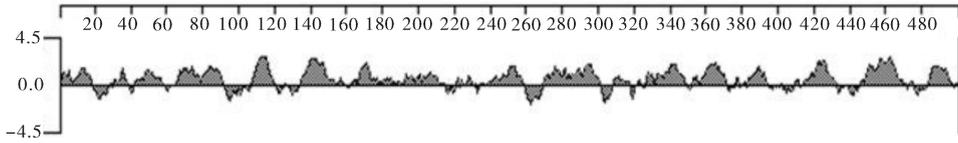
Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the purified and renatured expressed protein

2.6 重组表达蛋白的亲水性分析

经 Plot-Kyte-Doolittle 法预测重组外膜蛋白的亲水性(纵坐标正值越大,表明蛋白亲水性越强),结果发现重组蛋白 95% 以上的区域处于正值,说明该蛋白具有良好的亲水性,属水溶性蛋白(图 6)。

2.7 连接片段与未连接片段表达蛋白的免疫原性预测

经 Joneson-Wolf 法预测重组外膜蛋白的免疫原性(纵坐标正值越大,蛋白的免疫原性越强)。结果表明,重组外膜蛋白约 90% 的区域大于 0,表明该蛋白具有良好的免疫原性。根据图 7 的主要峰型,可以推测重组蛋白主要有 25 个抗原决定簇位点,在蛋白质上的氨基酸序列分别为 2-7、13-19、35-40、42-49、69-76、82-89、107-117、136-149、168-175、204-212、225-230、238-243、248-258、271-277、291-299、



编号为氨基酸位置 Scale number denotes the position of amino acids. 下同 The same as below.

图 6 重组蛋白亲水性分析

Fig. 6 Hydrophicity analysis of recombinant protein

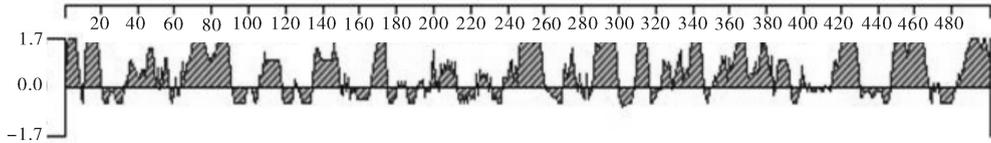


图 7 重组蛋白抗原决定簇分析

Fig. 7 Immunogenicity analysis of the expressed protein

310-316、337-347、352-359、362-370、376-381、385-41-46、65-75、76-85、105-114、133-143、164-171。
 392、420-428、449-455、458-465、490-496。 B79 有 7 个抗原决定簇,氨基酸序列分别为 29-38、

经 Jomeson-Wolf 法分别预测 B88、B79、B11 所选外膜蛋白片段的免疫原性(图 8),发现 B88 有 9 个抗原决定簇,氨基酸序列分别为 1-6、8-15、32-40、50-55、63-70、72-84、95-104、113-124、135-143。 B11 有 10 个抗原决定簇,氨基酸序列分别为 6-17、21-28、34-41、46-51、59-66、68-75、102-112、130-138、

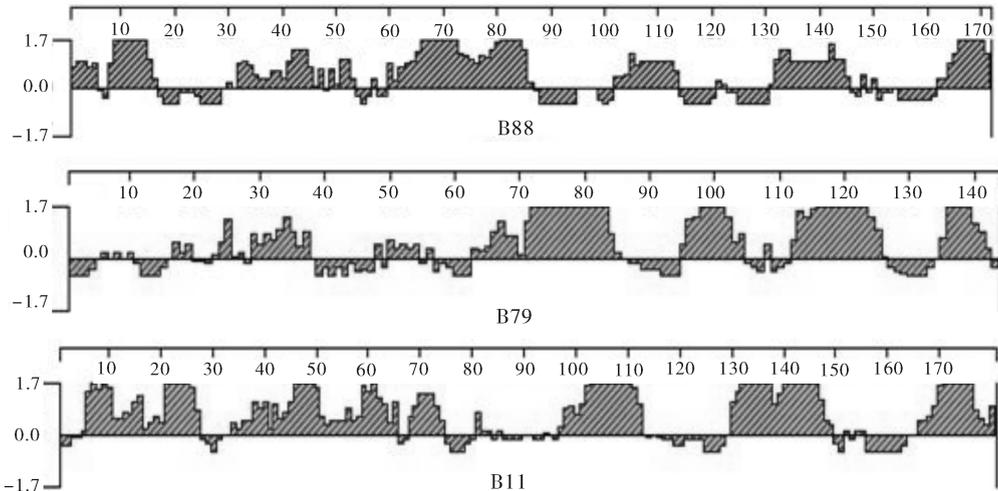


图 8 B88、B79、B11 外膜蛋白片段表达蛋白的抗原决定簇分析结果

Fig. 8 Immunogenicity analysis of B88, B79, B11 outer membrane protein sequences

139-148、170-177。

3 讨论

有研究表明,目的蛋白对应的基因序列对蛋白表达有一定影响,当基因片段的 G + C 含量在 50%~70%之间且当表达蛋白分子质量在 5~100 ku 时蛋白更易表达^[15]。同时,表达多肽位于膜外

且抗原决定簇丰富的蛋白能产生较好的免疫保护作用。在选择基因片段进行拼接时,本研究综合考虑了以上因素并选择了合适的基因片段。本研究所表达蛋白的分子质量为 85.16 ku,拼接基因表达的重组外膜蛋白亲水性和免疫原性分析结果表明,所选基因片段长度合适,表达的蛋白亲水性和免疫原性良好(图 6,7)。

本研究所选择的外膜蛋白表达基因片段自身不含 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点,且质粒 pGEX-2T-his 含有这 2 个酶切位点。因此,在设计基因片段引物时于 B88 正向和 B11 反向引物的 5'端分别加上 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。为将 3 个基因片段连接起来,需在 B88 反向和 B11 正向引物 5'端加上接头,有文献将 GSGGSGG 或 SPPPPSP 作为接头区^[12,16],但本次研究选择 B79 外膜蛋白(*ompA*)基因片段两端各 15 bp 的碱基互补序列作为接头区,这样通过“两步 PCR 法”^[13-14]就可逐步将 3 个基因片段连接起来。测序结果表明碱基配对和密码子排列顺序无误,酶切位点选择正确,接头区选择无误。在连接 B88、B79 和 B11 外膜蛋白基因片段时,本研究先用“两步法 PCR”连接 B88 和 B79 的基因片段,将上述连接好的基因片段割胶回收之后再与 B11 的基因片段连接,这样就达到了将 3 个外膜蛋白基因片段连接在一起的目的。

在将拼接基因与质粒 pGEX-2T-his 连接时,先将拼接基因与 T 载体连接,然后重组 T 载体转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞中,LB 液体扩大培养后,提取重组 T 载体,双酶切重组 T 载体之后,胶回收可获得大量带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的外膜蛋白基因片段,再将该片段与质粒 pGEX-2T-his 连接,这样就避免了拼接基因直接与质粒 pGEX-2T-his 连接时造成的连接困难等问题。

本研究所选择的载体 pGEX-2T-his 同时具有 GST 和 His 标签,因所表达的蛋白为包涵体蛋白,故利用 His 标签亲和层析进行该蛋白的纯化。笔者所在课题组以前采用 AKTA purifier 100 自动蛋白核酸层析系统,但是这种方法操作复杂,并且一次纯化所需时间较长。本试验采用镍柱离心柱亲和层析方法纯化蛋白,镍柱中的氯化镍能与含有 His 标签的蛋白结合,通过调整咪唑的浓度可以将目的蛋白与杂蛋白高效分离,最终得到高纯度的目的蛋白,此种方法操作简单、省时省力,并且蛋白的纯化效果良好。用镍柱纯化蛋白时需严格按照说明书处理待纯化的样品,当镍柱中的树脂床颜色明显变浅时应该对镍柱进行复性。

以外膜蛋白作为抗原成分进行单价疫苗的研究较多^[17-19],尽管研究结果均发现外膜蛋白是一种较好的细菌疫苗抗原,但单价疫苗只能预防一种或同属内几种病原菌的感染。有人将病原菌脂多糖和病毒主要衣壳蛋白制成二联疫苗,发现对细菌感染的

相对免疫保护率达到了 62.97%^[20]。秦磊等^[21]将嗜水气单胞菌 HEC 毒素和胞外蛋白酶分别与 38 株迟缓爱德华氏菌的脂多糖及脱毒多糖偶联,结果表明三联疫苗能同时保护小鼠免受 2 种病原菌的感染。最近有研究^[22]将嗜水气单胞菌 *Omp porin II* 和迟缓爱德华氏菌 *OmpS2* 基因表达膜外多肽的序列连接后进行表达,发现表达产物免疫后能使美洲鳎同时抵抗 2 种病原菌的感染。本研究首次将 3 个基因(B88、B79、B11)的外膜蛋白连接起来,以期达到一种疫苗同时预防 3 种常见鱼类病原菌感染的效果,此次研究发现该重组蛋白预测有 25 个抗原决定簇(图 7),而选择的 B88、B79、B11 外膜蛋白片段一共有 26 个抗原决定簇(图 8),表明该连接表达蛋白的抗原决定簇位点基本未被遮盖,此研究结果为该蛋白后续三联外膜蛋白的免疫原性研究准备了良好的材料。

参 考 文 献

- [1] 樊海平,徐娟儿,黄晓讽. 福建省养殖鳎细菌性疾病的调查与防治[J]. 海洋湖沼通报,1996(2):66-67.
- [2] 艾红,李永振. 养殖鳎的主要疾病与防治研究现状[J]. 湛江海洋大学学报,1998,18(4):71-76.
- [3] 龚新勇,欧阳岁东,主性. 鱼嗜水气单胞菌疫苗研究进展[J]. 贵州畜牧兽医,2004,28(3):19-20.
- [4] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病[J]. 河北科技师范学院学报,2004,18(3):70-76.
- [5] 陈艳,付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学:卫生学分册,2008,35(2):91-96.
- [6] 刘明智,叶星,田园园,等. 嗜水气单胞菌气溶素和溶血素基因的克隆与结构预测[J]. 江西农业大学学报,2010,32(2):356-362.
- [7] 王玉,冯建军,郭松林,等. 嗜水气单胞菌与迟缓爱德华氏菌二联外膜蛋白的表达及其初步免疫原性[J]. 华中农业大学学报,2015,34(1):96-102.
- [8] 王忠,邓灯,刘慧,等. 两种致病性弧菌外膜蛋白抗原特性的分析[J]. 大连海洋大学学报,2011,26(2):184-187.
- [9] GUAN R Z, XIONG J, HUANG W S, et al. Enhancement of protective immunity in European eel (*Anguilla anguilla*) against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by a recombinant *Aeromonas* outer membrane protein[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica,2011,43(1):79-88.
- [10] 杨求华. 养殖鳎致病性气单胞菌的分离与鉴定[D]. 厦门大学图书馆,2012.
- [11] 郭松林,王玉,关瑞章,等. 鳎病原性气单胞菌外膜蛋白基因全长的克隆与抗原决定簇分析[J]. 生物技术通报,2013(7):144-152.
- [12] 王玉. 鳎病原菌外膜蛋白二联基因工程产物的表达与免疫原

- 性初步研究[D]. 厦门:集美大学图书馆,2012.
- [13] 熊静. 鳃鲙病原菌共同外膜蛋白基因片段的筛选及其重组表达产物的免疫原性研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所图书馆,2009.
- [14] 李敏,杨谦. 一种高效构建同源重组DNA片段的方法——融合PCR[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(8):53-58.
- [15] 吕宪禹. 蛋白质纯化实验方案与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [16] 丁轲. 鹅细小病毒VP3基因与鹅白细胞介素-2基因分泌性融合表达载体的构建及在乳酸杆菌中表达的研究[D]. 雅安:四川农业大学图书馆,2006.
- [17] MAO Z, YU L, YOU Z, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23:567-575.
- [18] JUNG C R, PARK M J, HEO M S. Immunization with major outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model [J]. Microbiol, 2005, 43: 437-442.
- [19] KHUSHIRAMANI R, GIRISHA S K, KARUNASAGAR I. Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish [J]. Protein Expr Purif, 2007, 51:303-307.
- [20] 张国军. 鳃病毒和嗜水气单胞菌二联疫苗研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学图书馆,2006.
- [21] 秦磊,姚火春,陆承平. 嗜水气单胞菌与迟缓爱德华氏菌亚单位二联疫苗对小鼠的免疫效果[J]. 中国兽医学报,2000,20(2):163-166.
- [22] GUO S L, WANG Y, GUAN R Z, et al. Immune effects of a bivalent expressed outer membrane protein to American eels (*Anguilla rostrata*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2):213-220.

Construction, expression and purification of triple expression vector of outer membrane protein of three pathogens isolated from diseased eels

ZHAO Jin-ping DUAN Li-hua GUO Song-lin

Fisheries College of Jimei University/Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China

Abstract In order to acquire vaccine antigen of triple outer membrane protein (omp) which can simultaneously prevent three common pathogens in eel, three genes of *ompU*, *ompA* and *omp porin II* were selected from *Vibrio vulnificus*, *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*, respectively. Three gene fragments which encoded the outer regions of the three omps and showed rich epitopes were amplified and combined by two times of “two-steps” fusion PCR. According to the restriction sites of the expression vector (pGEX-2T-his plasmid), two restriction sites of *Bam*H I and *Eco*R I were added to the 5' points of two primers which are used to amplify fragments of *ompU* and *omp porin II*, respectively. The fusion fragment was connected with pGEX-2T-his plasmid and the recombinant expression vector which expressed the fusion omp was constructed. After the vector was transformed into *E. coli* BL21, the fusion omp with a molecular weight of 85 ku was highly expressed by using 0.25 mmol/L IPTG to induce the transformant (*E. coli* BL21) overnight at 16 °C in a suitable bacteria concentration ($D_{600\text{ nm}} = 0.8$). The expressed protein was eluted and purified by nickel column, and then renatured by dialysis with gradient of urea.

Key words *Edwardsiella tarda*; *Vibrio vulnificus*; *Aeromonas hydrophila*; triple outer membrane protein; expression and purification

(责任编辑:边书京)