

迟钝爱德华氏菌外膜蛋白基因工程 表达产物的免疫原性

段丽华 冯建军 郭松林 陈义航 阮彩章

集美大学水产学院/鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021

摘要 构建迟钝爱德华氏菌外膜蛋白重组表达载体后, 表达纯化获得分子质量约 53 ku 的外膜蛋白。将 100 尾日本鳗鲡均分为 2 组, 分别腹腔注射牛血清白蛋白(BSA, 0.5 mg/mL)和迟钝爱德华氏菌外膜蛋白(Omp, 0.5 mg/mL)0.2 mL/尾。于免疫后第 7、14 和 28 天采集鳗鲡血液、粘液、肝脏和肾脏, 测定各时间点的补体活性、溶菌酶活性、全血细胞转化水平和血清抗体效价。结果发现, 外膜蛋白组鳗鲡的补体活性于免疫后第 7 天极显著高于对照组; 其抗体效价于第 14 天和第 28 天显著或极显著高于对照组。免疫后第 28 天以迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌和创伤弧菌(1.0×10^7 cfu)腹腔注射感染鳗鲡。结果发现, 外膜蛋白组鳗鲡对迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌和创伤弧菌的相对免疫保护率分别为 71.4%、50.0% 和 12.5%。表明鳗鲡注射迟钝爱德华氏菌基因工程表达外膜后显著提高了其对迟钝爱德华氏菌感染的抵抗力, 对嗜水气单胞菌的感染也有明显的交叉保护效果, 但对创伤弧菌的交叉保护效果较弱。

关键词 日本鳗鲡; 迟钝爱德华氏菌; 外膜蛋白; 免疫原性; 相对免疫保护率

中图分类号 S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0097-08

养殖鳗鲡现已成为我国产业化和出口创汇最多的水产品之一^[1-2], 年出口创汇约 7 亿~10 亿美元。随着养殖品种的增多和养殖面积的扩大, 养殖中细菌性疾病发生频繁, 感染后死亡率较高^[3-4]。迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是养殖鳗鲡的主要致病病原菌之一^[5-6]。目前已在爬行动物、鸟类、哺乳动物、人类及环境水^[7-8]等样品中分离到迟钝爱德华氏菌。最近的研究致力于找到一种对不同血清型的迟钝爱德华氏菌具有普遍抗原性的蛋白。作为重要的保护性抗原, 革兰氏阴性细菌表面的外膜蛋白(outer membrane protein, Omp)在宿主体内具有良好的免疫原性^[9-10]。研究表明, 对于同属不同种或同种不同血清型菌株的感染, 某些外膜蛋白可产生交叉保护作用, 因此外膜蛋白现已成为亚单位疫苗研究中最具潜力的抗原候选成分之一^[11-13]。获得外膜蛋白的方法主要有分离纯化和重组表达 2 种方法。有研究将提取的迟钝爱德华氏菌外膜蛋白(Omp)37 ku 制备成疫苗并对乌鳢进行免疫, 结果发现其具有抗体水平高、出现时间早、持续时间较长

等优点^[14]; 提取的外膜蛋白免疫牙鲆后第 10、30 和 100 天进行攻毒试验, 分别获得了 30%、71% 和 53% 的相对免疫保护率^[15]。但国内外以重组表达的方法获得迟钝爱德华氏菌外膜蛋白并对其免疫原性进行的研究尚未见报道。因此, 本试验采用基因工程手段获取迟钝爱德华氏菌重组外膜蛋白, 腹腔注射免疫日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)后检测其全血细胞转化的刺激指数、补体活性、溶菌酶活性和抗体水平等, 从 4 个方面分别探讨其对日本鳗鲡非特异性和特异性免疫功能的影响, 从而确定其免疫原性, 为迟钝爱德华氏菌外膜蛋白亚单位疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

EcoR I、BamH I 酶, 氨苄青霉素(Amp), OPD, SDS, BSA, DTT, G-250, R-250, IPTG, 咪唑, 尿素, DMSO, 弗氏不完全佐剂(Sigma), RPMI1640 细胞培养液, MTT, 肝素钠, 羊抗兔 IgM, APS; 超声

收稿日期: 2015-11-10

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2015J01143); 福建省教育厅项目(JA15283)

段丽华, 硕士研究生。研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: lhduan65@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

波破碎仪(Scientz),冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),SDS-PAGE 蛋白电泳装置(BIO-RAD)。

1.2 菌株、质粒及鳊鱼

迟钝爱德华氏菌(B79)、嗜水气单胞菌(B11)和创伤弧菌(B88)由鳊鱼病原菌菌种库提供,3株菌种经 Biolog 菌种鉴定系统鉴定到种^[16-18]。

pGEX-2T-Omp-Edwa-His 重组质粒:Amp 抗性,经测序成功连接的目的基因序列完整,无颠倒。

100尾健康无病史的日本鳊鱼购自福建福清养殖场,体质量(30±10)g。

1.3 重组蛋白诱导条件及其表达形式鉴定

将37℃过夜摇床培养的含重组质粒的BL21菌以1:100的比例稀释,37℃,250 r/min 摇床培养,待 $\Delta D_{600\text{ nm}}$ 值为0.8时,加入IPTG使其终浓度为0.25 mmol/L,分别诱导0、3、5、7、9 h。待 $\Delta D_{600\text{ nm}}$ 值分别为0.1、0.3、0.6、0.8、1.0时,加入IPTG使其终浓度为0.25 mmol/L,诱导5 h。待 $\Delta D_{600\text{ nm}}$ 值为0.8时,加入IPTG使其终浓度为0.25 mmol/L,16℃,250 r/min 摇床培养过夜,超声波破碎,离心,取沉淀和上清。

1.4 重组蛋白的纯化与复性

菌液于16℃经IPTG诱导5 h后,5 000 r/min 4℃离心10 min;以超纯水离心洗涤,分别加入40 mL 2 mol/L 尿素结合缓冲液和400 μL PMSF,4℃超声破碎菌体5 min(90 W,破碎1 s,停3 s),4℃10 000 r/min 离心5 min;PBS重悬,同样条件离心。以4℃预冷的结合缓冲液重悬,4℃20 000 r/min离心5 min,上清即为待纯化的粗提外膜蛋白样品。

将得到的粗提蛋白样品与变性平衡液等量混匀后上镍柱,涡旋振荡器上振荡30 min后同条件离心,弃废液。取变性清洗液6 mL加入柱内,4℃2 425 r/min离心2 min,弃废液,重复3次。取变性洗脱液3 mL加入柱内,4℃2 425 r/min离心2 min,重复3次,收集3次的液体。

以0.01 mol/L的PBS(pH=7.4)分别配制0、1、2、4、6和8 mol/L的尿素缓冲液各1 000 mL,调pH至7.9,4℃放置;将蛋白样品装入透析袋,分别放置于8 mol/L和6 mol/L的尿素PBS缓冲液中透析12 h;放置于4、2、1和0 mol/L的尿素PBS缓冲液中各透析8 h;移至双蒸水中16 h,中途换水

1次,透析过程在4℃进行。复性液置-70℃过夜后,冷冻干燥至呈粉末状,备用。

1.5 鳊鱼免疫注射和样品采集

将100尾鳊鱼均分为2组,暂养1周。分别腹腔注射0.5 mg/mL的外膜蛋白和BSA,每尾0.2 mL。于免疫后的第7、14和28天采样,每组每次6尾。取每尾鳊鱼的抗凝血用于分离全血细胞,进行培养与转化实验。制备鳊鱼血清并分别采集鳊鱼体表粘液、肝脏和肾脏各0.1 g,加入0.5 mL的PBS(0.01 mol/L,pH=7.4),匀浆,10 000 r/min离心10 min,取上清-70℃保存,用于测定补体活性、抗体效价和溶菌酶活性。

1.6 血细胞培养与转化

根据已有研究^[19]方法,向2.7 mL RPMI 1640细胞培养液中加入300 μL 灭活补体的鳊鱼血清(终质量分数10%),称作A培养液。向2.1 mL RPMI 1640细胞培养液中加入300 μL 灭活补体的鳊鱼血清和600 μL 质量浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的ConA(终质量浓度20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),称作B培养液。将A、B 2种培养液分别加入96孔细胞培养板中,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。血细胞悬液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,每个样品设2个平行。25℃培养48 h,加入5 mg/mL MTT,15 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。继续25℃培养4 h,2 528 r/min离心15 min,用灭菌的纸巾吸出上清,加入DMSO,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。充分振荡混匀。酶标仪上测 $\text{OD}_{570\text{ nm}}$,根据公式计算样品的细胞刺激指数(SI值): $\text{SI值} = \text{B培养液中某一样品的 } \text{OD}_{570\text{ nm}} \text{ 平均值} / \text{A培养液中该样品的 } \text{OD}_{570\text{ nm}} \text{ 平均值} - 1$ 。

1.7 补体活性测定

按表1所列加入所需试剂,水浴过后测 $\text{OD}_{542\text{ nm}}$,该样品最终的补体活性等于与50%溶血标准管OD最接近的样品所对应的补体活性^[16]。采集鳊鱼新鲜血液的红细胞后,按照1:49的比例加入巴比妥缓冲液(BBS)得到2% ERBC。取20 μL 的2% ERBC,80 μL 蒸馏水,混匀;加入80 μL 17 g/L的高渗盐水,混匀;加入20 μL 的2% ERBC制得50%溶血标准管。以巴比妥缓冲液(BBS)作为空白对照。

1.8 溶菌酶活性测定

将配制好的应用菌液、标准品应用液和待测样品(血清、粘液、肝脏、肾脏匀浆悬液)置于32℃恒温培养箱中10 min,向每孔酶联板中加入10 μL 的待

表 1 补体溶血活性测定方法

Table 1 The assay of the hemolytic activity of the complement

编号 Number	巴比妥 缓冲液/ μL Barbital buffer solution	1 : 20 稀释血清/ μL Serum diluted at the ratio 1 : 20	2% 鳎鲷红细 胞悬液/ μL 2% eels red blood cells	2 单位溶血素/ μL 2 units of hemolysin	水浴温度/ $^{\circ}\text{C}$ Waterbath temperature	水浴时间/min Waterbath time	补体溶 血活性 Complement activities
1	56	4	20	20	37	30	200.0
2	54	6	20	20	37	30	133.0
3	52	8	20	20	37	30	100.0
4	50	10	20	20	37	30	80.0
5	48	12	20	20	37	30	66.6
6	46	14	20	20	37	30	57.1
7	44	16	20	20	37	30	50.0
8	42	18	20	20	37	30	44.4
9	40	20	20	20	37	30	40.0
10	60	0	20	20	37	30	—
11	100 μL 50% 溶血标准管 100 μL 50% standard hemolysis tubes						
12	100 μL 巴比妥缓冲液 100 μL barbital buffer solution						

注:“—”表示未加入样品对应的无补体溶血活性。Note:“—” there is no complement activities without serum added.

测样品和标准品,迅速用排枪加入 100 μL 应用菌液,酶标仪中振荡 20 s,分别于 30 s 和 4.5 min 测定 OD_{530 nm} 值。溶菌酶的计算方法为:血清的溶菌酶浓度(U/mL)=(样品孔 OD_{4.5 min}—该样品孔 OD_{30 s})/(标准孔 OD_{4.5 min}—标准孔 OD_{30 s}) $\times$ 标准品质量浓度(2.5 $\mu\text{g/mL}$ 或 200 U/mL);粘液/肝脏/肾脏溶菌酶浓度(U/mL)=(样品孔 OD_{4.5 min}—该样品孔 OD_{30 s})/(标准孔 OD_{4.5 min}—标准孔 OD_{30 s}) $\times$ 标准品质量浓度(2.5 $\mu\text{g/mL}$ 或 200 U/mL)/样品质量浓度(0.2 g/mL)。

1.9 ELISA 法测定鳎鲷血清抗体效价

向 96 孔板中加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 的重组外膜蛋白(用包被稀释液稀释),每孔 100 μL ,空白对照加包被稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。次日,PBST 洗涤液洗涤,200 $\mu\text{L/孔}$,洗涤 3 次,每次 5 min。加 1% 的 BSA/PBST 封闭液,200 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。洗板 3 次,每次 5 min。加封闭液倍比稀释的鳎鲷血清(2¹~2⁹等 6 个稀释度),阴性对照和空白对照加封闭液,100 $\mu\text{L/孔}$,30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗板 3 次,每次 5 min。加封闭液稀释的兔抗鳎鲷 IgM(1 : 1 500),100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗板 3 次,每次 5 min。加封闭液稀释的羊抗兔酶标抗体(1 : 15 000),每孔加入 100 μL 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗板 4 次,每次 5 min。加底物溶液 OPD,50 $\mu\text{L/孔}$,显色 15 min,以 2 mol/L 的终止液终止,50 $\mu\text{L/孔}$ 。测定 OD_{492 nm} 值。样品的血清效价为(样品 OD—空白对

照 OD)/(阴性对照 OD—空白对照 OD) ≥ 2 的最高稀释倍数,最终血清效价为经 Log₂ 转化后的数值。

1.10 攻毒感染与免疫保护率测定

免疫后第 28 天,2 组鳎鲷分别采用迟钝爱德华氏菌(1.1 $\times 10^8$ cfu/mL)、嗜水气单胞菌(0.5 $\times 10^8$ cfu/mL)和创伤弧菌(4.0 $\times 10^8$ cfu/mL)腹腔注射感染,0.20 mL/尾。注射后放入不同的水族箱中,8 尾/箱,做好标记,对鳎鲷 14 d 内的死亡情况进行记录并按公式计算外膜蛋白组相对保护率。计算公式为:相对免疫保护率=(1—外膜蛋白组死亡率/BSA 组死亡率) $\times 100\%$ 。

1.11 统计学分析

2 组数据间的差异显著性用 SPSS Statistics 20.0 中的独立样品 *t* 检验进行检测。以数据的平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SE)为依据,利用软件 Origin 7.5 作图^[20]。用卡方检验(Chi-Square, Likelihood Ratio)确定免疫保护率结果的差异显著性。

2 结果与分析

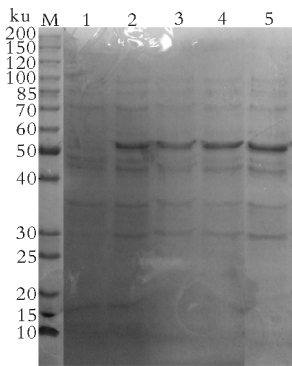
2.1 不同诱导时间与 OMP 的表达

经 IPTG 诱导 3 h(图 1,泳道 2)、5 h(图 1,泳道 3)、7 h(图 1,泳道 4)、9 h(图 1,泳道 5)后,重组菌均能表达目的蛋白且无明显差异。

2.2 不同菌液初始浓度与 OMP 的表达

经 IPTG 诱导,不同浓度的菌液均能表达目的蛋白(图 2)。菌液初始浓度 $\Delta D_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.3 至 0.8

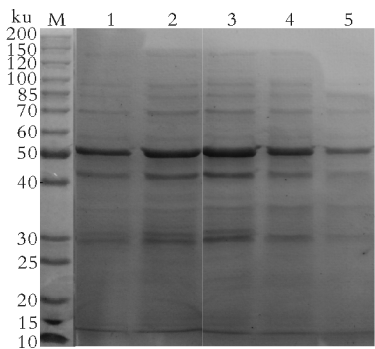
时,目的蛋白表达量较多且无明显差异(图 2,泳道 2,3,4)。



M:Marker; 1~5 表示诱导 0、3、5、7、9 h 后目的蛋白表达结果
The expressed protein induced by IPTG after 0,3,5,7 and 9 h respectively.

图 1 不同诱导时间对目的蛋白表达情况影响的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the expressed protein induced by IPTG after different time of *E. coli* BL21



M: Marker; 1~5 表示诱导菌液初始浓度分别为 $\Delta D_{600\text{ nm}} = 0.1, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0$ 时目的蛋白的表达结果 The expressed protein of BL21 induced respectively by IPTG at 0.1,0.3,0.6,0.8 and 1.0 of the $\Delta D_{600\text{ nm}}$ value.

图 2 不同诱导菌浓度对目的蛋白表达情况影响的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the expressed protein induced by IPTG at different concentration of *E. coli* BL21

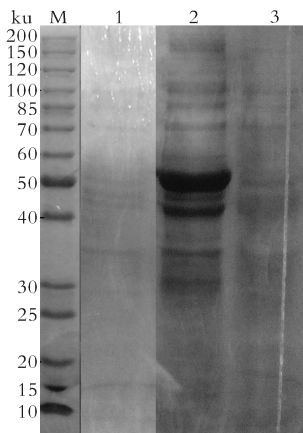
2.3 目的蛋白表达形式鉴定

重组菌未加入 IPTG 诱导表达时,无目的蛋白(图 3,泳道 3)。加 IPTG 诱导表达后,在上清中未发现目的蛋白(泳道 1),其主要存在于沉淀中(泳道 2),表明该目的蛋白的表达形式为包涵体形式。

2.4 蛋白的纯化与复性

对外膜蛋白的复性情况进行检测,发现在约 53

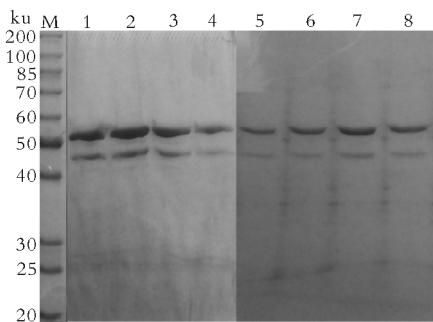
ku 处有一蛋白条带(图 4,泳道 5~8),与目的蛋白大小(53.22 ku)相符,表明蛋白没有发生断裂或降解,说明目的蛋白的复性效果良好。



M:Marker; 1:诱导表达超声破碎离心后重组菌上清 Supernatants of the expressed recombinant BL21; 2:诱导表达超声破碎离心后重组菌沉淀 Pellet of the expressed recombinant BL21; 3:未诱导重组菌 Expression of recombinant BL21 without induction.

图 3 鉴定目的蛋白表达形式的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.3 SDS-PAGE electrophoretic analysis of the expressed protein's form



M:Marker; 1~4:纯化后蛋白 Purified protein; 5~8:复性后蛋白 Renaturated protein.

图 4 纯化与复性后蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析结果

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis results of the expressed protein after purifiing and renaturing

2.5 血细胞转化试验

在免疫后第 7 和 14 天,外膜蛋白组的全血细胞转化水平高于 BSA 组,但是由于个体差异较大(SE 值较大)并未达到显著水平(图 5)。

2.6 补体活性

免疫后第 7 和 28 天,外膜蛋白组的补体活性显著高于 BSA 组(图 6, $P < 0.05$),在第 14 天,外膜蛋白组的补体活性高于 BSA 组,但并未出现显著性差异。

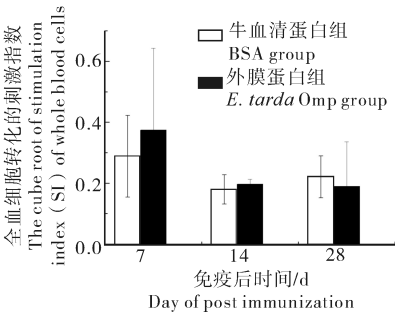
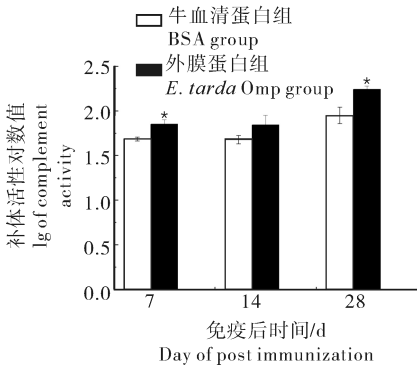


图 5 鳗鲡免疫后不同时间全血细胞转化的刺激指数 (mean±SE;n=6)

Fig.5 SI of whole blood cellsat different days of the immunized eels



* :同一时期两组间差异显著($P<0.05$)。* indicate significant ($P<0.05$) differences between immune and control group.

图 6 鳗鲡免疫后不同时间补体活性 (mean±SE;n=6)

Fig.6 Complement activity at different days of the immunized eels

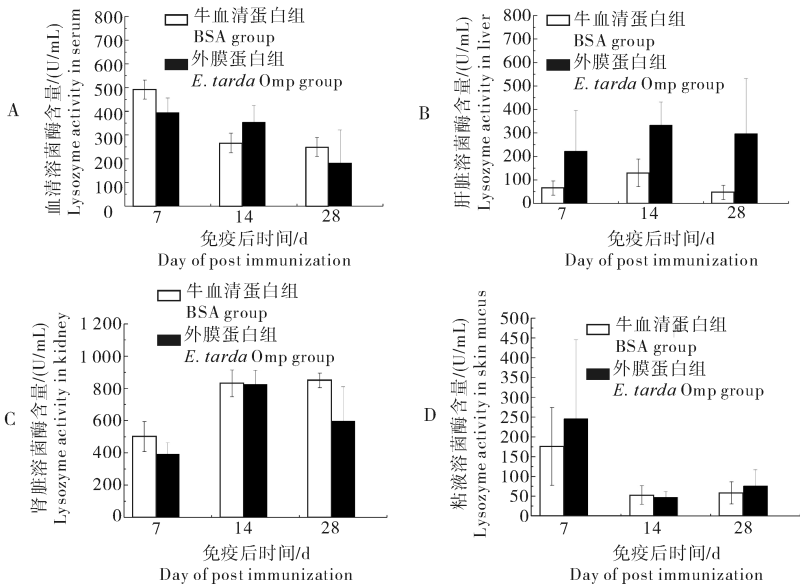


图 7 鳗鲡免疫后不同时间血清(A)、肝脏(B)、肾脏(C)、粘液(D)溶菌酶活性 (mean±SE;n=6)

Fig.7 Lysozyme content in serum(A) ,liver(B) ,kidney(C) ,skin mucus(D) at different days of the immunized eels

2.7 溶菌酶活性

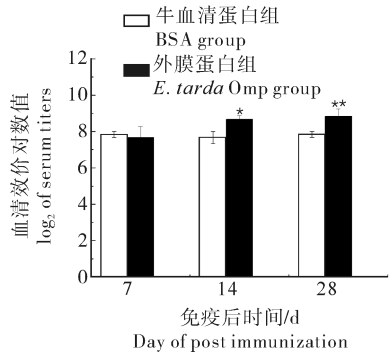
免疫处理后,外膜蛋白组和 BSA 组鳗鲡血清(图 7A)、肝脏(图 7B)、肾脏(图 7C)和粘液(图 7D)中的溶菌酶活性并未出现显著性差异。第 7、14 和 28 天,外膜蛋白组肝脏中的溶菌酶活性均明显高于 BSA 组,但未达到显著性水平。第 14 天,外膜蛋白组血清中溶菌酶活性高于 BSA 组,但无显著性差异。

2.8 血清抗体效价

从图 8 可以看出,免疫后第 14 天和 28 天,外膜蛋白组的抗体效价显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于 BSA 组。

2.9 鳗鲡攻毒感染后的相对免疫保护率

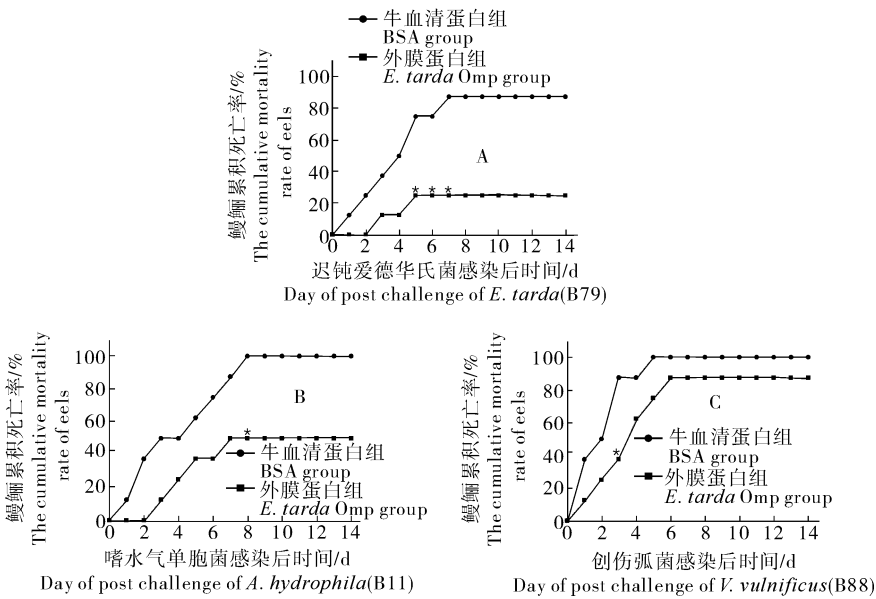
攻毒试验结果中,外膜蛋白组的鳗鲡分别对创伤弧菌、嗜水气单胞菌及迟钝爱德华氏菌产生了 12.5%、50.0%及 71.4%的相对免疫保护率(图 9)。以迟钝爱德华氏菌攻毒后 14 d 内 BSA 组和外膜蛋白组鳗鲡的死亡率分别为 87.5%(死亡 7 条)和 25%(死亡 2 条)。卡方检验表明,免疫后外膜蛋白组与 BSA 组累积死亡率存在显著性($P<0.05$)差异。以嗜水气单胞菌攻毒 14 d 内 BSA 组和外膜蛋白组鳗鲡的死亡率分别为 100%(死亡 8 条)和 50%(死亡 4 条)。卡方检验表明,免疫后外膜蛋白组与 BSA 组累积死亡率存在显著性($P<0.05$)差异。感染创伤弧菌后 BSA 组和外膜蛋白组的鳗鲡在 14 d 内的死亡率分别为 100%(死亡 8 条)和 87.5%(死



** 与 * :外膜蛋白组与 BSA 组分别存在极显著差异($P<0.01$)和显著($P<0.05$); * * and * indicate mark significant ($P<0.01$) and significant($P<0.05$) differences respectively between immune and control group.

图 8 不同时间包被 B79 血清抗体效价(mean±SE; n=6)

Fig.8 Serum titers of immunized eels at different days to B79



* :该时期外膜蛋白组和 BSA 组存在显著性差异($P<0.05$). * : There is significant($P<0.05$) differences between test and control group at one time.

图 9 B79(A)、B11(B)和 B88(C)攻毒感染鳊鱼的累计死亡率

Fig.9 The cumulative mortality rate of immunized eels after challenged by B79 (A), B11(B) and B88(C)

亡 7 条),外膜蛋白组的累积死亡率与 BSA 组的累积死亡率于攻毒后第 3 天出现显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

本试验采用基因工程手段获取迟钝爱德华氏菌重组外膜蛋白,腹腔注射免疫日本鳊鱼后检测其全血细胞转化的刺激指数、补体活性、溶菌酶活性和抗体水平,从而对其免疫原性和鳊鱼免疫后病原菌攻

毒感染的保护率进行了初步研究。

有研究表明,细菌重组外膜蛋白能否成功表达与诱导条件存在一定的相关性^[17,21-22],诱导条件通常包括诱导时间、诱导温度、诱导时菌液初始浓度和诱导剂浓度等。本研究对诱导时间和菌液初始浓度进行探讨,得到了与已有研究一致的结果^[17],即诱导 3、5、7 或 9 h 对目的蛋白的表达量无明显影响。菌浓度 $\Delta D_{600\text{ nm}}$ 为 0.3、0.6 或 0.8 时表达量较高且无明显差异。

免疫后第7和14天,外膜蛋白组的全血细胞转化水平平均高于BSA组,但差异不显著,这可能与试验鳗鲡个体间差异较大相关^[13]。

免疫处理后,本研究外膜蛋白组和BSA组鳗鲡血清(图7A)、肝脏(图7B)、肾脏(图7C)和粘液(图7D)中的溶菌酶活性并未出现显著差异。本研究对照组采用BSA代替了其他研究采用的PBS,同时,对照组采用等量弗氏不完全佐剂与BSA均匀混合,由于细胞产生的溶菌酶主要用于吞噬菌体或弗氏佐剂等异物,故本研究结果与其他对照组未加佐剂的研究结果存在较大的差异^[13,16-18,23]。另外,溶菌酶活性也受鱼体的健康状况、规格、环境温度、pH值、离子强度、季节等多种因素的影响^[23-25],这也可能是本研究溶菌酶测定中个体差异较大的原因。

免疫后的第7、14和28天,外膜蛋白组的平均补体活性均高于BSA组(图6),且在第7天和第28天均达到显著性水平($P < 0.05$)。有趣的是,免疫后第14天并未出现显著性差异,原因有待于进一步分析。

免疫后第14天和第28天,外膜蛋白组的抗体效价显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)高于BSA组,这与已有的许多研究结果一致^[16-18],表明本研究使用的迟钝爱德华氏菌表达外膜蛋白具备较强的免疫原性。

本次攻毒试验中,经免疫的鳗鲡分别对迟钝爱德华氏菌和嗜水气单胞菌获得了71.4%和50.0%的相对免疫保护率。表明表达的外膜蛋白不但可增强鳗鲡对迟钝爱德华氏菌感染的抵抗力,其对嗜水气单胞菌的攻毒感染也有明显的交叉保护效果。有研究表明^[26],嗜水气单胞菌的外膜蛋白和海洋弧菌、迟钝爱德华氏菌及部分肠杆菌科细菌外膜蛋白具有一定的同源性,其也可对迟钝爱德华氏菌产生交叉保护作用。

参 考 文 献

- [1] 娄甜甜,齐兴柱,尹绍武,等.鳗鲡种质资源的研究进展[J].水产科学,2007,26(6):366-369.
- [2] 吴成业,刘兆钧.中国鳗业面临的问题与决策[J].福建水产,2004,12(4):16-19.
- [3] 樊海平,徐娟儿,黄晓讽.福建省养殖鳗鲡细菌性疾病的调查与防治[J].海洋湖沼通报,1996(2):66-67.
- [4] 艾红,李永振.养殖鳗鲡的主要疾病与防治现状[J].湛江海洋大学学报,1998,18(4):71-76.
- [5] MOHANTY B R, SAHOO P K. Edwardsielliosis in fish: a brief review[J]. Biosciences, 2007, 32: 1331-1344.
- [6] MEYER F, BULLOCK G. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Appl Microb, 1973, 25(1): 155-156.
- [7] WYATT L E, NICKELSON R, VANDERZABT C. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment [J]. Appl Environ Microbiol, 1979, 38: 710-714.
- [8] TAMURA K, SAKAZAKI R, MCWHORTER A C, et al. *Edwardsiella tarda* serotyping scheme for international use [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26: 2343-2346.
- [9] 熊静,关瑞章,郭松林,等.鱼类病原菌外膜蛋白及其免疫原性研究进展[J].水生生物学报,2011,35(1):163-169.
- [10] 程顺峰,邓灯,张毅,等.牙鲆秦皇岛弧菌HQ010712-1外膜蛋白及其抗原性分析[J].中国水产科学,2010,17(6):1271-1277.
- [11] 伦镜盛,袁腾飞,夏常艳,等.弧菌外膜蛋白OmpK免疫交叉反应性分析[J].汕头大学学报,2013,28(3):52-63.
- [12] KAWAI K, LIU Y, OHNISHI K, et al. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate [J]. Vaccine, 2004, 3(9): 3411-3418.
- [13] 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.
- [14] KUMAR G, RATHORE G, SENGUPTA U, et al. Isolation and characterization of outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and its application in immunoassays [J]. Aquaculture, 2007, 27(2): 98-104.
- [15] TANG X Q, ZHAN W B, SHENG X Z, et al. Immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* [J]. Fish & shellfish immunology, 2010, 28(2): 333-343.
- [16] 赵金平,段丽华,郭松林.鳗鲡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[J].华中农业大学学报,2015,34(3):104-110.
- [17] 王玉,郭松林,冯建军,等.嗜水气单胞菌与迟钝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.
- [18] 郭松林,冯建军,陆盼盼,等.嗜水气单胞菌与爱德华氏菌二联表达外膜蛋白的免疫原性[J].中国水产科学,2015,22(1):113-120.
- [19] 郭松林,关瑞章,冯建军.欧洲鳗鲡淋巴细胞转化试验条件的建立[J].中国水产科学,2007,14(3):403-411.
- [20] 郭松林,关瑞章,冯建军,等.嗜水气单胞菌感染对美洲鳗鲡血液和生化指标的影响[J].集美大学学报,2009,14(2):13-17.
- [21] 吴伟,陈静娟,宋宁,等.几种因素对重组大肠杆菌目标蛋白表达的影响[J].四川大学学报,2002,39(增刊):149-151.
- [22] 任增亮,堵国成,陈坚,等.大肠杆菌高效表达重组蛋白策略[J].中国生物工程杂志,2007,27(9):103-109.
- [23] 董卫星,刘淑鑫,钟丹,等.溶菌酶测定方法的研究进展[J].中草药,2012,10(1):58-61.
- [24] BACHLI S, JAGER M, HASSANIN A, et al. Phylogenetic anal-

ysis of invertebrate lysozymews and evolution of lysozyme function[J].Journal of molecular biology, 2002, 54 (5): 652-664.

[25]王宏田,徐永立,张培军.假雄牙鲈不同组织中溶菌酶比活性的研究[J].海洋科学,2000,24(10):7-8.

[26] REKHA M K,BISWAJIT M,MALATHI S,et al.Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* [J].Research in microbiology, 2012, 163:286-291.

Immunogenicity of outer membrane protein expressed
by gene engineering of *Edwardsiella tarda*

DUAN Lihua FENG Jianjun GUO Songlin CHEN Yihang RUAN Caizhang

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

Abstract The expressed outer membrane protein (Omp,about 52 ku) of *Edwardsiella tarda* was purified after the recombinant expression vector was constructed,transferred into *E.coli* BL21 and induced.A total of 100 healthy Japanese eels (*Anguilla japonica*) was divided into 2 groups and intraperitoneally injected (*i.p*) with bovine serum albumin (BSA,0.5 mg/mL) and the outer membrane protein (Omp,0.5 mg/mL), respectively.On 7,14 and 28 d post-vaccination,the blood,skin mucus,liver and kidney of eels were collected to evaluate the lysozyme and complement activities,stimulation index and specific antibody titers. The complement activities in the Omp group were extremely significantly ($P<0.01$) higher than that of the BSA group on 7 d.The specific antibody titers in the Omp group were significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$) higher than that of the BSA group on 14 d and 28 d.The lysozyme activities and stimulation indexes showed no significant difference ($P>0.05$) between two groups.The relative percent survival (RPS) of Omp were 71.4%,50.0% and 12.5% respectively after challenged by *E. tarda*,*A. hydrophila* or *V. vulnificus*.These results suggested that the recombinant expressed Omp could significantly improve the immune function and resistance of *A. japonica* against *E. tarda*.It also had significant cross protection against *A. hydrophila*,but had weak cross protection against *V. vulnificus*.

Keywords *Anguilla japonica*; *Edwardsiella tarda*; outer membrane protein; immunogenicity; relative percent survival (RPS)

(责任编辑:边书京)