

# 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 的克隆、 表达与免疫原性研究\*

黄 辉<sup>1</sup> 毛芝娟<sup>2\*\*</sup> 陈吉刚<sup>2</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100

**摘要** 根据已发表的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)外膜蛋白 OmpU 的基因序列设计 1 对特异性引物,应用聚合酶链式反应(PCR)方法,自哈维氏弧菌致病菌株基因组中扩增获得一段约 1 000 bp 的序列,构建重组载体 pMD18-T-OmpU;测序结果表明,该基因与已发表的哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 序列存在 98% 以上的相似性,该序列在 GenBank 上的登录号为 FJ919231。构建表达质粒 pET-30a(+)-OmpU 后转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3),在 IPTG 诱导下实现高效表达,SDS-PAGE 显示重组蛋白分子质量约为 41 ku,与预期基本相符。重组蛋白以包涵体形式表达。以脲素法得到初步纯化的重组蛋白,以 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量注射免疫大黄鱼幼鱼,经间接 ELISA 法检测了 4~8 周后特异性抗体的效价,同时检测了注射后 4 周的免疫保护率。结果表明,4~8 周内特异性抗体效价持续升高,达到  $\log_2$  8.0 以上,4 周时的相对免疫保护率为 85%。试验结果显示了重组哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 具有良好的免疫原性,可作为亚单位疫苗的开发对象。

**关键词** 哈维氏弧菌; 外膜蛋白 OmpU; 克隆; 原核表达; 免疫原性

**中图分类号** S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0346-05

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种能产生单极端鞭毛的革兰氏阴性杆菌,是海水养殖中常见的致病菌,由其引起的弧菌病是水产养殖经济动物中最为严重的疾病之一,可造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。外膜蛋白(outer membrane proteins, Omps)是革兰氏阴性菌特有的外膜主要结构成分,在维持细菌细胞结构稳定、细胞的物质交换及细菌的致病过程中起着十分重要的作用,同时,部分病原菌的 Omp 也具有有良好的免疫原性,不仅可以激发机体的体液免疫应答,而且还可引起细胞免疫,有可能作为疫苗的有效成分<sup>[2-4]</sup>。外膜蛋白 OmpU 是弧菌的一种重要孔蛋白,在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中起到抗胆盐和粘附因子的作用,同时也是一种保护性抗原<sup>[5]</sup>;在创伤弧菌(*V. vulnificus*)中,OmpU 同样具有免疫原性<sup>[6-7]</sup>。关于鳃弧菌 Ompu 免疫原性的研究也已展开<sup>[8]</sup>,相关研究工作在哈维氏弧菌中尚未见报道。本试验开展哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 的基因克隆、原核表达和免疫原性研究,旨在为进一步研制疫苗提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原菌株、质粒和表达菌株

病原株哈维氏弧菌 ZJ2008 分离自浙江省象山港海水网箱中的患病大黄鱼(*Rseudosciaena crocea*); *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)菌株由浙江万里学院生物与环境重点实验室保存。

### 1.2 分子生物学试剂

DNA Marker、限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Bam*H I、*Hand* III、pMD18-T 载体克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、琼脂糖、PCR 纯化试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司。其余试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 哈维氏弧菌总 DNA 的提取及 OmpU 基因的克隆

取超低温冻存的 ZJ2008 甘油菌 1 支,在 TCBS 平板上划线接种复苏,28  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h,选取单克隆,挑斑转接于 Zobell 2216E 培养基,28  $^{\circ}\text{C}$ ,60 r/min 振荡培养 12 h 以上,取 1.5 mL 菌液于 Ependoff 离

收稿日期:2010-01-05; 修回日期:2010-03-01

\* 浙江省自然科学基金项目(Y308408)、宁波市科技局择优委托项目(2007C10037)资助

\*\* 通讯作者. E-mail: zhijuanmao@tom.com

黄 辉,男,1983 年生,硕士研究生. 研究方向:水产动物病害与防治. E-mail: huanghui111111@tom.com

心管中,5 000 r/min 离心 1 min,弃上清;灭菌水悬浮细菌,6 000 r/min 离心 4 min,洗涤 2 次;加入 35  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 和 35  $\mu\text{L}$  TZ 缓冲液(4% TritonX-100, 5.0 mg/mL NaN<sub>3</sub>,溶于 25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 中),-20 °C 放置 30~40 min;沸水浴 10 min;冰浴 10 min;5 000 r/min 离心 5 min,收集上清作为 PCR 模板,于-20 °C 保存。

根据 GenBank 上已登录的哈维氏弧菌外膜蛋白(OmpU)基因成熟肽编码序列(登录号:AY332563)设计 1 对引物,上游引物 1:5'-CGG-GATCCG CTG AAC TTT ACA ACC AAG AC-3';下游引物 2:5'-CCC AAGCTT TTA GAA GTC GTA ACG TAG ACC-3',分别在引物的 5'端引入 BamH I 和 Hind III 酶切位点。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,60.5 °C 45 s,72 °C 90 s,共 30 个循环,再 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后割胶回收并用试剂盒纯化,最后以物质的量之比 1:3(载体/插入片段)的比例克隆入 pMD18-T 载体,在含氨苄青霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 平板上挑取阳性克隆,经双酶切和 PCR 鉴定后送上海英俊公司测序。

#### 1.4 表达质粒构建

对测序正确的阳性克隆提取质粒 DNA 并进行 BamH I、Hind III 酶切,同时用相同的内切酶对表达质粒 pET-30a 酶切。胶纯化回收酶切的目的基因片段和 pET-30a 载体片段,建立连接反应。连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布 LB(含卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )平板,挑取单个菌落,接种于 5 mL LB(含卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )培养基中,37 °C 振荡培养过夜。碱裂解法抽提质粒,经酶切鉴定、PCR 反应阳性后鉴定为含重组表达质粒的阳性重组子。

#### 1.5 重组蛋白的表达和纯化

将含有重组质粒的表达菌液以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基(含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素)中,37 °C 继续振荡培养至  $D_{600}$  达到 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导表达。表达产物的检测采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)<sup>[8]</sup>进行,采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳,分离胶质量分数为 12%。

确定重组蛋白形成包涵体后,在最佳条件下诱

导菌体表达,菌液用缓冲液 A[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl]漂洗,8 000 r/min 离心 15 min,重复 1 次。将漂洗过的菌体细胞悬浮于缓冲液 B[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1% Triton X-100](V/V)中,调节使悬浮液密度约为每毫升含 0.1 g 菌体细胞,超声波破碎,镜检,破碎率高于 95%,5 000 r/min 离心 15 min,收集包涵体沉淀。将包涵体沉淀分别用 Buffer I [50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,0.5% TritonX-100(V/V),4 mol/L 脲素]、Buffer II [50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,3% TritonX-100(V/V)]中、Buffer III [50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,0.5% TritonX-100(V/V),2 mol/L 盐酸胍]中,超声波振荡洗涤 1 次,5 000 r/min,离心 15 min 收集包涵体。最后溶解在含高浓度脲素的缓冲液 C(8 mol/L 脲素,10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA,2 mol/L 脱氧胆酸钠)中,室温放置 30 min,8 000 r/min,离心 30 min,取上清。上清过 Ni-NTA 亲和层析柱进一步纯化。将纯化产物置于透析袋中,用 PBS 缓冲液(0.02 mol/L,pH 7.4)透析,透析液每 8 h 换 1 次,透析 6 次。

#### 1.6 大黄鱼的免疫和人工攻毒

平均质量为 50 g 的健康大黄鱼购自浙江省象山港养殖网箱,在室内水泥池(3.0 m $\times$ 1.6 m $\times$ 2.0 m)充气暂养 1 周后进行免疫试验。试验开始之前先取 5 尾鱼的血清,作为阴性对照。试验分 3 组,分别为灭活全菌苗免疫组[0.5% 福尔马林灭活的全菌疫苗(formalin killed whole cells,FKC),菌浓度 $1.0\times 10^9$  cfu/mL]、重组外膜蛋白 OmpU(0.5 mg/mL)免疫组和对照组。每组 40 尾,以腹腔注射法分别注射 0.2 mL 上述抗原,对照组则注射相同剂量的灭菌 PBS。以沙滤海水充气暂养,每日早晚各投喂 1 次海水鱼湿颗粒饵料,投饵率为 8%,每日吸污换水 1 次。免疫注射 4 周后进行攻毒试验,每尾分别注射 0.2 mL  $1.0\times 10^8$  cfu/mL 的活菌液,观察 2 周,记录每日的发病和死亡鱼情况,统计死亡率,计算免疫保护率(relative percent survival,

RPS);对死亡鱼进行无菌解剖和病原分离,以确定是否死于攻毒菌引起的感染。攻毒菌液浓度由前期预备试验确定,并收集预试中感染 2 周后存活鱼的血清,−80 ℃ 保存。试验期间水温为自然水温,范围为 20~24 ℃。

免疫保护率:RPS/% = (1 - 免疫组死亡率/对照组死亡率) × 100<sup>[15]</sup>

### 1.7 免疫与抗体的 ELISA 检测

在免疫试验开始前,取 10 尾健康鱼的血清,作为阴性对照。以注射器从尾椎静脉取血,室温静置 2 h 后,移入 4 ℃ 冰箱过夜,次日,以 4 000 r/min 离心 10 min,分离血清,−80 ℃ 保存。在免疫后 4~8 周,从每组中随机取 5 尾试验鱼,采集血清,4 ℃ 保存,检测抗体效价。

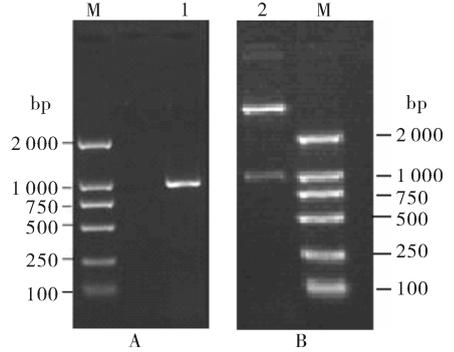
ELISA 检测按照常规方法进行。在预备试验中以方阵法分别测定抗原的包被浓度, OmpU 8 μg/mL。全菌抗原为经煮沸的哈维氏弧菌 ZJ2008 的菌悬液,以 pH 9.6 的碳酸钠缓冲液稀释至 1 × 10<sup>9</sup> 个/mL。96 孔酶标板分别以上述抗原包被,大黄鱼抗血清以 2 倍系列稀释度加到各孔中,初始稀释度为 1:8,每个稀释度加并排的两孔作为重复;第 12 孔加 100 μL PBS 作为空白对照。以兔抗大黄鱼免疫球蛋白血清(稀释度 1:500)和 HRP 标记的羊抗兔 IgG(稀释度 1:1 000,鼎国生物,北京)检测结合到抗原上的特异性抗体。以邻苯二胺 OPD 显色缓冲液显色 30 min 后,加 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在酶标仪(Thermo labsystems)492 nm 波长处读取 OD 值。试验血清吸光度值(P) = 待检血清 OD 值 - 空白 OD 值,阴性对照血清吸光度值(N) = 阴性血清 OD 值 - 空白 OD 值,当两者比值 P/N > 2.1 时,则判断为阳性;阳性孔的最大稀释度即为抗体效价。以 Student-t 检验在置信度水平 P < 0.05 计算显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 OmpU 的 PCR 克隆与原核表达载体的构建

以新鲜提取的哈维氏弧菌菌株的 DNA 为模板,以相应的引物经 PCR 扩增出 1 条约 1 000 bp 的特异性条带,经 T-A 克隆连入 pMD18-T 载体。阳性克隆提取质粒经 PCR 反应(图 1A)和酶切鉴定(图 1B),分别出现相应大小的目的片段。重组 T 载体测序结果经 BLAST 软件搜索比对,与已登录的

哈维氏弧菌外膜蛋白基因 *OmpU* 同源性达 97%,表明克隆到的序列是 OmpU 成熟肽编码序列,长 963 bp,预期编码 320 个氨基酸残基,DNASTAR 预测的分子质量为 40.09 ku,该序列在 GenBank 上的登录号为 FJ919231。



M. 核酸分子质量标准 DNA marker;

1. PCR 产物 PCR products;

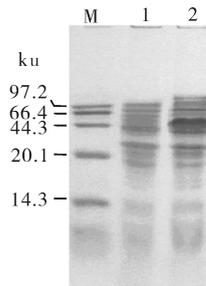
2. 重组质粒的酶切 Restriction enzyme results of the recombinant.

图 1 外膜蛋白 OmpU 的 PCR 产物及重组质粒 pET30a-OmpU 的酶切鉴定

Fig. 1 PCR production of OmpU and identification of recombinant plasmid pET30a-OmpU by restriction enzyme

### 2.2 重组蛋白的表达

12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱显示,诱导后含重组质粒 BL21 在 40.09 ku 位置出现了 1 条明显的表达蛋白带,而不含重组质粒的对照 BL21 菌体中无此蛋白条带(图 2);SDS-PAGE 显示的此蛋白条带分子质量约为 41 ku,与 DNASTAR 推导的融合表达蛋白(40.09 ku)相符。重组蛋白出现在表达液的沉淀中,上清中无,表明目的蛋白以包涵体的形式表达。



M. Protein marker;

1. 诱导前 Un-induced; 2. 诱导后 After induced.

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression products

### 2.3 重组外膜蛋白对大黄鱼的免疫保护

免疫 4 周后对各试验组鱼进行活菌人工攻毒,

OmpU 免疫组相对免疫保护率为 67.6%，达到了有效免疫保护；同期灭活菌苗组的免疫保护率稍高，为 75.7% (表 1)。

表 1 人工攻击后各免疫组的死亡率和免疫保护率

Table 2 Cumulative percent mortality and RPS of vaccinated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)

| 分组<br>Group | 剂量/<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<br>Dose | 样本数<br>Sample | 死亡数<br>No. of<br>death | 死亡率/%<br>Mortality | 免疫保<br>护率/%<br>RPS |
|-------------|--|---------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| OmpU        | 50   | 40            | 12                     | 30.0               | 67.6               |
| FKC         | 50   | 40            | 9                      | 22.5               | 75.7               |
| Control     | 50   | 40            | 37                     | 92.5               | 0.0                |

## 2.4 ELISA 检测结果

在不同免疫时期分别取血清用间接 ELISA 方法检测特异性抗体。结果表明，4~8 周内特异性抗体效价持续升高，达到  $\log_2 8.0$  以上。

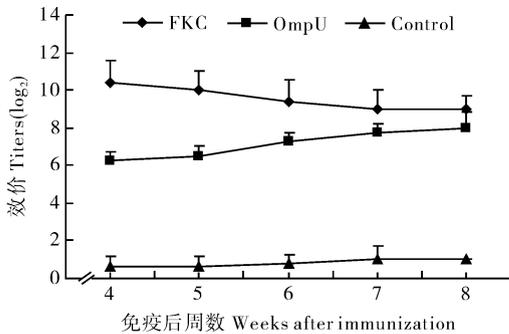


图 3 OmpU 免疫后抗体检测

Fig. 3 Detection of antibody after immunized with OmpU

## 3 讨论

关于弧菌外膜蛋白 OmpU 已经开展了较多的研究。现有报道表明，弧菌外膜蛋白 OmpU 是一类保守性较高的孔蛋白<sup>[10]</sup>；在霍乱弧菌中，OmpU 已被证实是一种具有免疫保护作用的孔蛋白从而被应用于疫苗研制<sup>[5]</sup>。在创伤弧菌中，一种分子质量为 36 ku 的主要外膜蛋白诱导了保护性免疫，该蛋白 N 端氨基酸序列与该 OmpU 同源<sup>[6-7]</sup>。对鳗弧菌 OmpU 的基因克隆和免疫原性的研究也已展开，大肠杆菌表达的重组蛋白能与鳗弧菌外膜蛋白抗体很好地反应，指示了该蛋白具有免疫反应性，可能是良好的免疫原<sup>[8]</sup>。在副溶血弧菌中，OmpU 对大黄鱼的免疫原性已被证实<sup>[11]</sup>。同时，推导的氨基酸序列比对结果表明，哈维氏弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌等的 OmpU 存在 60% 以上的同源性，提示了 OmpU 是弧菌种类中较为保守的一类功能蛋白。OmpU 有可能作为一种共同保护性

抗原成分用于开发亚单位疫苗来防治水产动物弧菌病。

本研究成功克隆到哈维氏弧菌 ZJ2008 株的 OmpU 成熟肽的编码基因，构建了原核表达载体 pET30a-OmpU；表达和纯化的重组蛋白免疫大黄鱼获得了有效的保护性免疫，免疫后的 4~8 周内，在试验鱼血清中检测到了高水平的特异性抗体，提示了抗体应答与保护性免疫的相关性。研究表明，鱼类抗体的产生需要一定的时间周期，多数鱼类受抗原刺激后往往在 2 周时才有少量可测的抗体，以后抗体效价经历一个缓慢升高的过程，在 4 周后达到比较高的效价值<sup>[12-14]</sup>。研究结果显示了哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 具有较强的免疫原性，在感染过程中是良好的保护性抗原。

值得一提的是，本研究中全菌苗免疫组的保护率和抗体效价水平均略高于 OmpU 免疫组，但是，一旦攻击菌株或自然感染的菌株血清型发生改变，那么，全菌苗免疫的这种有效性就不确定了，而采用相对保守性的外膜蛋白免疫鱼类，则有可能对各种血清型毒株的感染均有效。进一步工作中有必要开展多种血清型分离株中该种蛋白的保守性及重组蛋白免疫对不同来源毒株攻毒的保护力研究，为开发安全系数高、免疫效果理想的亚单位疫苗和基因工程疫苗奠定理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] 毛芝娟, 由振强, 魏永伟, 等. 副溶血弧菌 ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 563-569.
- [2] 徐建国. 分子医学细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 76-80.
- [3] 闫茂仓. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究[D]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2005.
- [4] 张崇文, 于涟, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 9-14.
- [5] CHAKRABARTI S R, CHAUDHURI K, SEN K, et al. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU [J]. J Bacteriol, 1996, 178(2): 524-530.
- [6] SUNG Y G, HYUN-JU L, WOO H K, et al. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(10): 5586-5594.
- [7] CHO-ROK J, MIN-JUNG P, MOON-SOO H. Immunization with major outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model[J]. The Journal of Microbiology, 2005, 43(5): 437-442.
- [8] 杨慧, 陈吉祥, 公衍军, 等. 致病性鳗弧菌 W-1 外膜蛋白 ompU

- 基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2006, 36(z1):105-108.
- [9] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1228-1236.
- [10] 李小飞, 李槿年, 季晶晶, 等. 拟态弧菌外膜蛋白 OmpU 基因的原核表达及其免疫保护性研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2):307-312.
- [11] 董传甫, 林天龙, 许斌福, 等. 电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(7):619-623.
- [12] CAIN K D, JONES D R, RAISON R L. Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen[J]. Devel Compar Immunol, 2002, 26(2):181-190.
- [13] DAVIDSON G A, LIN S H, SECOMBES C J, et al. Detection of specificand “constitutive” antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*) [J]. Veter Immunol Immunopath, 1997, 58(3/4):363-374.
- [14] HOUGHTON G, HEALEY L J, MATTEWS R A. The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of tetrahymena pyriformis with ichthyophthirius multifiliis in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Devel Compar Immunol, 1992, 16(4):301-312.
- [15] 肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼鳃弧菌病疫苗的制备[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 32(2):226-232.

## Cloning, Expression and Immunogenicity Analysis of OmpU of *Vibrio harveyi* ZJ 2008

HUANG Hui<sup>1</sup> MAO Zhi-juan<sup>2</sup> CHEN Ji-gang<sup>2</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

**Abstract** According to OmpU gene sequence published in GenBank, primers were designed and the DNA fragment of about 1 000 bp was amplified by PCR from genomic DNA of *Vibrio Harveyi* ZJ2008, isolated from disease *Pseudosciaena crocea*. The gene was cloned into pMD18-T vector and sequenced, then submitted to GenBank with an accession number FJ919231. BlastN result showed that the sequence shared identity of 99.0% with OmpU of *Vibrio harveyi*. The sequence was subcloned into pET-30a resulted with the recombinant plasmid pET30a-OmpU which was further transferred into host bacteria *E. coli* BL21(DE3) with IPTG induction for expression. SDS-PAGE profiles showed the expected MW of the recombinant OmpU was around 41 ku. The protein was expressed in the form of insoluble fusion bodies and was preliminary purified by urea method. Forty pieces of large yellow croaker were individually immunized with 50  $\mu$ g of the recombinant protein by intraperitoneal injection. Four weeks after vaccination, ten pieces were artificially challenged by intraperitoneal injection with live bacteria and the mortality was recorded in the following 14 d. Relative percentage of the survival rate of the immunized group reached 85%. Specific antibody level was detected by indirect ELISA after 4-8 weeks post vaccination. Resulting an increase of antibody titers to the immunized recombinant protein. The present study demonstrated strong immunogenicity of the recombinant OmpU. OmpU of *V. harveyi* should be given enough attention for their potential application in vaccine development.

**Key words** *Vibrio harveyi*; OmpU; cloning; prokaryotic expression; immunogenicity

(责任编辑:边书京)