

嗜水气单胞菌与迟顿爱德华氏菌二联外膜蛋白的表达及其初步免疫原性

王 玉 冯建军 郭松林 林 鹏

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 在构建鳗鲡病原性嗜水气单胞菌与爱德华氏菌二联外膜蛋白重组表达载体的基础上, 采用不同的诱导剂(IPTG)浓度、诱导温度、诱导时间和诱导时菌液浓度对重组表达载体的表达条件进行探讨。结果表明, 不同诱导剂(IPTG)浓度、诱导温度、诱导时间和诱导时菌液浓度对该载体的表达无明显影响。在菌液浓度 $D_{600\text{ nm}} = 0.8$ 时, 采用 0.25 mmol/L 的 IPTG 经 $16\text{ }^\circ\text{C}$ 诱导培养过夜后表达。表达产物采用 ÄKTA purifier-100 蛋白质纯化仪, 结合 His 标签柱亲和层析后获得分子质量 87.1 ku 的高纯度蛋白。蛋白经透析复性后免疫鳗鲡以初步研究其免疫原性。结果表明, 免疫后第 28 天, 重组蛋白不同剂量注射组的鳗鲡血清中抗体效价均显著高于 PBS 注射对照组, 初步表明该重组表达蛋白具有良好的免疫原性。

关键词 二联外膜蛋白; 嗜水气单胞菌; 迟顿爱德华氏菌; 鳗鲡; 免疫原性

中图分类号 S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0096-07

鳗鲡养殖长期受细菌性疾病的困扰。已发现的鳗鲡细菌性病原有十几种, 包括嗜水气单胞菌、嗜气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、威隆气单胞菌、迟顿爱德华氏菌、致伤弧菌、鳗弧菌和非 O1 群霍乱弧菌等^[1-4]。我们近 10 年来从发病的养殖鳗鲡分离到 87 株病原菌, 其中有 61 株病原性气单胞菌和 13 株迟顿爱德华氏菌。革兰氏阴性病原菌表面的外膜蛋白(outer membrane proteins, OMP)是一种重要的保护性抗原, 在宿主体内具有良好的免疫原性^[5-6]。某些 OMP 可对同属不同种或同种不同血清型菌株的感染产生交叉保护, 从而成为亚单位疫苗最具潜力的抗原候选成分之一^[7-8]。养殖鳗鲡长期受气单胞菌和爱德华氏菌 2 个病原菌属的感染^[9-11], 而这 2 个病原菌属外膜蛋白基因的同源性很低, 研制的单种外膜蛋白亚单位疫苗无法产生交叉保护。因此, 笔者采用这 2 个菌属的代表菌种嗜水气单胞菌和迟顿爱德华氏菌的基因组为模板, 分别扩增其外膜蛋白基因全长, 选取其表达外膜蛋白膜外多肽部分的基因片段进行体外连接后构建了外膜蛋白双基因重组表达载体^[12]。为进一步获得该表达蛋白并研究其免疫原性, 本研究拟探讨该表达

载体的表达条件, 以选择适宜的表达条件进行该二联外膜蛋白的高效表达和纯化, 同时采用表达蛋白背部肌肉注射免疫美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)以初步确定该蛋白的免疫原性, 从而为外膜蛋白基因工程二联疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

OPD, BSA, SDS, DTT, G-250, IPTG, 弗氏佐剂(Sigma); 咪唑(Amresco); R-250(Tris GENERAY BIOTECH); 预染蛋白 Marker(Tiagen); 未预染蛋白 Marker(Fermentas); 羊抗兔 IgG(Thermo); APS(上海生工); AKTA purifier 10, Ni-Sepharose-Fastflow(GE); 鱼安定(MS-222); 超声破碎仪(Scientz); 冷冻离心机(Sigma); 蛋白电泳装置(Biorad); 气浴摇床(Thermo)。

1.2 质粒、菌株和鳗鲡

pGEX-2T-OMP-his 重组质粒: 嵌入质粒的目的基因序列完整, 无颠倒, 质粒具有 Amp 抗性。E. coli BL21(DE3)为高效原核表达工程菌。嗜水气单胞菌(B11)和迟顿爱德华氏菌(B79)由集美大学水

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001136); 福建省海洋与渔业厅项目(201212140006)

王 玉, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类病害免疫防治。E-mail: 254748944@qq.com

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

产学院鳗鲡病原菌菌种库提供,2株菌经 Biolog 菌鉴系统分别鉴定到种,其16S rDNA序列已经递交至 GenBank,其序列与其他网上已经递交的相应菌种的同源性均在99%以上^[12]。50尾用于免疫原性研究的美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)购自集美大学鳗鲡养殖场,平均体质量50g,健康无发病史。

1.3 外膜蛋白诱导表达及其表达形式

含 pGEX-2T-OMP-his 的 BL21 菌于 37 °C 过夜培养,按约 1 : 100 的比例加入 LB 液体培养基 (pH 6.88, 含 50 μg/mL Amp), 混匀后 37 °C 250 r/min 培养约 4.5 h。

①诱导剂(IPTG)浓度:待吸光度值 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.8 时,加 IPTG 溶液至终浓度分别为 0、0.1、0.25、0.5、1.0 和 2.0 mmol/L。作为对照,将 IPTG 加入含空质粒(pGEX-2T-his)的 BL21 菌至终浓度为 1.0 mmol/L,37 °C 诱导表达 5 h 后进行 SDS-PAGE 电泳检测。

②诱导温度:待 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.8 时,加 IPTG 溶液至终浓度为 0.25 mmol/L,分别于 16、25 和 37 °C 诱导过夜后电泳。

③诱导时间:待 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.8 时,加 IPTG 溶液至终浓度为 0.25 mmol/L,37 °C 分别诱导 0、1.5、3、5 和 7 h 后电泳。

④诱导时菌浓度:BL21 菌 OD 值分别为 0.1、0.3、0.6、0.8 或 1.0 时,加入 1 mol/L IPTG 溶液至 0.25 mmol/L,37 °C 诱导 5 h 后电泳。

⑤蛋白表达形式:待 $D_{600\text{nm}} = 0.8$ 时,加 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L,250 r/min,16 °C 过夜培养后取诱导重组菌全菌,参照文献[4]进行超声波破碎,取其沉淀和上清,同时取未诱导重组 BL21 全菌经超声波破碎的沉淀和上清作为对照进行电泳检测。

1.4 SDS-PAGE 电泳

分离胶和压缩胶的制备参照文献[13]进行。上样前,分别取经 IPTG 诱导和未经诱导的菌液 1 mL 离心收集菌体,40 μL 无菌双蒸水重悬,加等量 2×上样缓冲液,煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 3 min,取上清 10 μL。纯化蛋白可直接取 5 μL 样品和等量 2×上样缓冲液在 PCR 管内混合后 95 °C 5 min 变性。装好电泳装置后加电泳缓冲液至上下贮槽内,加样孔加入样品或 Marker 10 μL/孔。接通电源,恒流 (10 mA) 至样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后,加大电流 (18 mA) 至溴酚蓝指示剂达到

距离底部约 1 cm 时停止电泳。取出凝胶用双蒸水漂洗后采用考马斯亮蓝 G-250 染色液染色 20 min,再放入脱色液中脱色,待蛋白条带清晰后拍照。

1.5 外膜蛋白纯化、复性与冻干浓缩

取 500 mL 经 IPTG 16 °C 诱导的菌液,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,菌体加适量灭菌水重悬后离心洗涤。菌体加 40 mL 2 mol/L 尿素结合缓冲液和 400 μL PMSF,冰浴超声破碎菌体(70%功率,破碎 1 s,停止 3 s;5 min),10 000 r/min,4 °C 离心 5 min,沉淀(包涵体蛋白)用 PBS 重悬后离心,沉淀加适量预冷的结合缓冲液(约 6 mL)重悬菌体;平衡后 20 000 r/min 4 °C 离心 5 min,上清再离心一次后取上清备用。

打开 AKTA purifier 100 蛋白核酸层析系统,超纯水冲洗系统 10 min 后用 4~8 个柱体积(CV)的结合缓冲液预平衡 His 亲和层析预装柱,流速 2 mL/min,上清样品缓慢上样后用 7 CV 的结合缓冲液(20 mmol/L 咪唑)洗除杂蛋白;用 5~10 CV 的洗脱缓冲液(500 mmol/L 咪唑)洗脱表达蛋白并按峰体积收集。

透析法复性蛋白简述如下:配制含 6、4、2、1 和 0 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液各 1 000 mL (pH 7.9),将用 8 mol/L 尿素适度稀释的纯化蛋白样品(0.2~0.5 mg/mL)装入透析袋,4 °C 置 6 mol/L 尿素 PBS 缓冲液 12 h、依次置 4、2、1 和 0 mol/L 的尿素 PBS 缓冲液中 8 h,透析袋转移至双蒸水中 4 °C 透析 8 h,更换双蒸水透析 1 次。蛋白样品置 -80 °C 过夜冻存后冻干成粉末,备用。

1.6 鳗鲡抗外膜蛋白抗血清的制备

将冻干的二联蛋白用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 稀释为 1 mg/mL (高质量浓度组) 和 0.5 mg/mL (低质量浓度组),取适量与等体积的弗氏不完全佐剂充分混合,同时设 PBS 注射对照组。取混合液或 PBS 每尾鳗鲡背部肌肉注射 0.2 mL,于注射后第 14 天和第 28 天每组麻醉鳗鲡 5 尾,断尾取血,血液室温静置 1 h,4 °C 放置过夜,2 500 r/min 离心 10 min 后取血清,分装后 -20 °C 冻存,备用。

1.7 间接 ELISA 法测定鳗鲡血清抗体效价

以包被液稀释外膜蛋白干粉至 500 μg/mL,100 μL/孔加于酶标板,每个样品加 2 个孔,同时设 2 个包被液空白对照孔,4 °C 包被过夜;次日用洗涤液(PBST)洗板 3 次,5 min/次;加 1% BSA 200 μL/孔,30 °C 孵育 2 h,PBST 洗板 3 次,5 min/次;

加经 50 倍稀释的鳗鲡血清样品 100 μL /孔, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板 3 次; 加经 200 倍稀释的兔抗鳗鲡 IgM 抗血清^[14] 100 μL /孔, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板 3 次; 加 1 000 倍稀释的羊抗兔酶标抗体 100 μL /孔, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min; 洗板 4 次; 充分拍干, 加 OPD 底物溶液 50 μL /孔, 室温放置 10 min, 加终止液 50 μL /孔后测 $D_{492\text{ nm}}$ 值。

1.8 数据统计与分析

采用 SPSS 13.0 软件将 $D_{492\text{ nm}}$ 值进行方差分析 (Anova), 同时采用多重比较 (Duncan 法, 双尾) 确定其差异显著性。数据以平均值 \pm 标准差表示 (mean \pm S D) 后输入 Origin8.0 软件^[15] 作图。

2 结果与分析

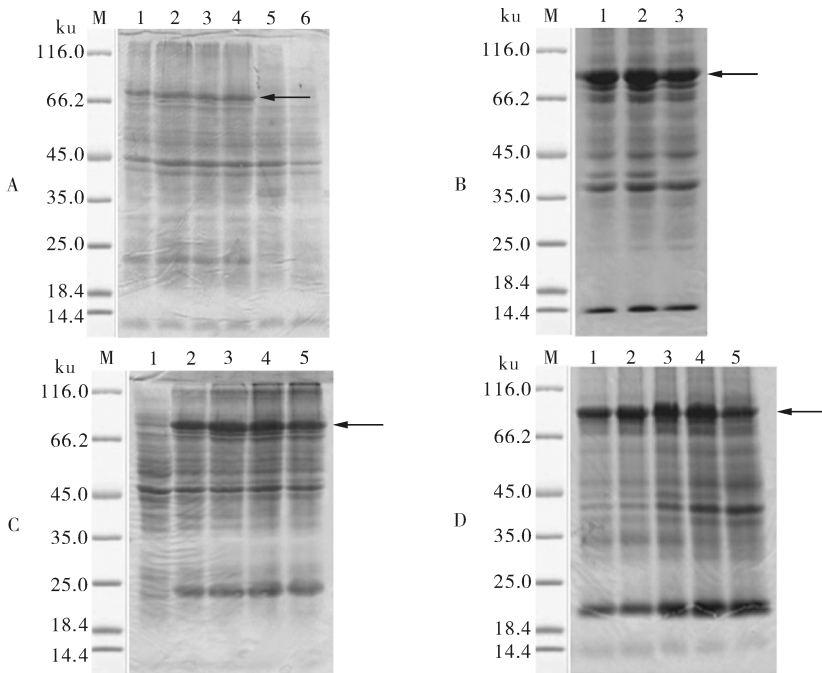
2.1 IPTG 诱导表达的条件

在 0.25~2.00 mmol/L 范围内, 不同 IPTG 浓

度均能诱导表达分子质量 87.1 ku 的融合二联外膜蛋白 (图 1A, 泳道 1~4), 其诱导重组菌 BL21 的表达量无明显差异; 空质粒和无 IPTG 诱导的重组菌均未表达该外膜蛋白 (图 1A; 泳道 5~6)。IPTG 终浓度为 0.25 mmol/L, 16、25 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜诱导的重组菌都可表达该融合蛋白, 且表达量也无明显差异 (图 1B, 泳道 1~3); 重组菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 1.5~7.0 h 时均能产生重组蛋白且表达量亦无明显差异 (图 1C, 泳道 2~5), 但 0 h 诱导时未能产生目的蛋白 (图 1C; 泳道 1); 0.25 mmol/L 的 IPTG 在重组菌 5 个不同菌浓度 ($D_{600\text{ nm}}$ 0.1~1.0) 诱导时都能产生特异性重组融合蛋白, 但 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 和 0.8 时的菌浓度诱导产生的目的蛋白量较多 (图 1D; 泳道 1~5)。

2.2 目的蛋白的表达形式

本研究结果表明, 特异性重组融合蛋白主要存在于超声波破碎菌液后的沉淀中 (图 2, 泳道 3~4),

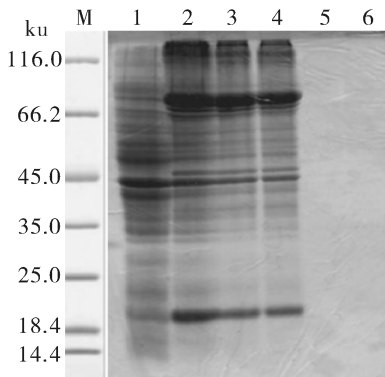


M: Marker; A: 泳道 1~4: IPTG 浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L; 泳道 5: 0.5 mmol/L IPTG 诱导未重组菌; 泳道 6: 无 IPTG 诱导的重组菌; B: 泳道 1~3: 16、25 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导重组菌的表达; C: 泳道 1~5: 诱导 0、1.5、3、5、7 重组菌 BL21 的表达; D: 泳道 1~5: IPTG 诱导时菌浓度 ($D_{600\text{ nm}}$) 分别为 0.1、0.3、0.6、0.8、1.0 时重组菌的表达。M: Marker; A 1-4: IPTG induced at 0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L, respectively; 5: Non-recombinant BL21 induced by 0.5 mmol/L IPTG; 6: Recombinant BL21 without IPTG. B 1-3: IPTG induced at 16 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ respectively. C 1-5: 0.25 mmol/L IPTG induced recombinant BL21 for 0, 1.5, 3, 5 and 7 h, respectively. D 1-5: 0.25 mmol/L IPTG induced recombinant BL21 at different the optical density (600 nm) of 0.1, 0.3, 0.6, 0.8 and 1.0, respectively.

图 1 不同 IPTG 诱导浓度 (A)、诱导温度 (B)、诱导时间 (C)、诱导时菌浓度 (D) 对重组菌表达目的蛋白影响的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the effect of different IPTG concentration (A), temperatures (B), time (C) and concentration of BL21 (D) on the expression of target protein

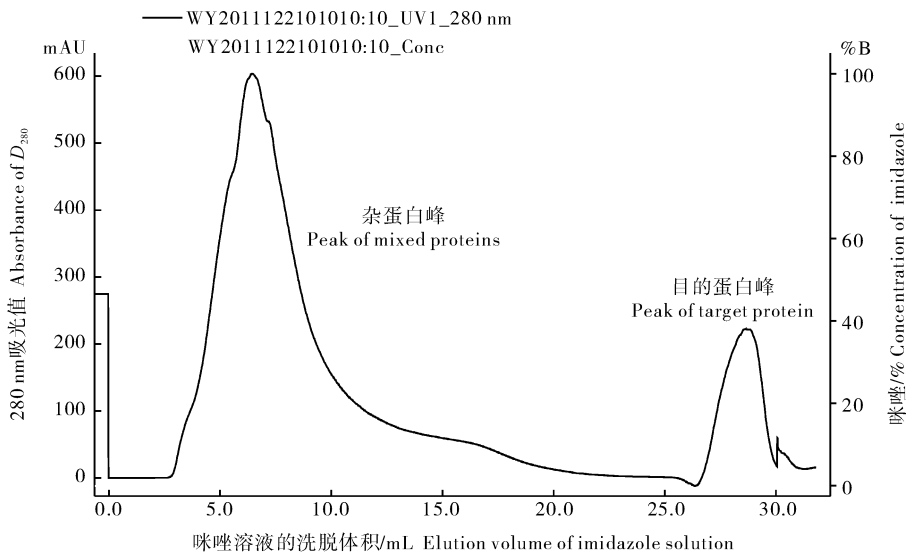
而在上清中没有检测到表达蛋白(图 2,泳道 5~6)。表明该目的蛋白是以包涵体形式表达的。



M: Marker; 泳道 1: 未诱导重组菌; 泳道 2: 诱导重组菌; 泳道 3-4: 超声破碎并离心后沉淀; 泳道 5~6: 超声破碎离心后上清。M: Protein marker; 1: Recombinant BL21 without IPTG induction; 2: Recombinant BL21 with IPTG induction; 3-4: Pellet of the expressed recombinant BL21 after ultrasonication and centrifugation; 5-6: Supernatants of the expressed recombinant BL21 after ultrasonication and centrifugation.

图 2 目的蛋白表达形式的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis analysis of different expression form on the target protein expression



%B: 500 mmol/L 咪唑溶液的使用百分数/% Percent of 500 mmol/L imidazole solution

图 3 目的蛋白 AKTA purifier 100 蛋白核酸层析系统的亲和层析纯化

Fig. 3 Affinity chromatography purification of target protein by AKTA purifier 100

3 讨 论

表达载体的选择对于外源蛋白能否在大肠杆菌中正确表达起着非常重要的作用。本研究构建了非融合表达载体(pET-His)和融合表达载体

2.3 目的蛋白(OMP-Arom-Edwa)的亲和层析纯化

选择 280 nm 检测紫外吸收曲线,从咪唑浓度为 20 mmol/L 时开始洗脱(% B 为 0),洗脱约 3 mL 后出现杂蛋白峰,至约 20 mL 时,杂蛋白已经被完全洗脱;此时改用 500 mmol/L 咪唑溶液洗脱(% B 为 100),至约 26.5 mL 时出现目的蛋白洗脱峰(图 3)。

2.4 表达蛋白的复性

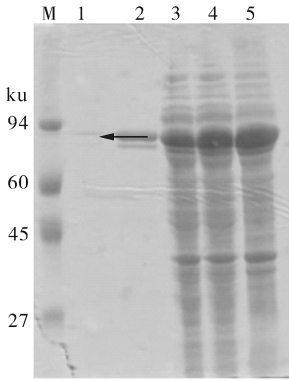
重组融合外膜蛋白经梯度尿素和双蒸水透析后最终溶解于 PBS 中,发现透明无沉淀,表明复性成功。取 10 μ L 复性液进行 SDS-PAGE 电泳检测,发现在 87.1 ku 处有一条微弱的蛋白条带(图 4 泳道 1 箭头处),表明复性效果良好,蛋白没有降解和断裂。

2.5 表达蛋白的免疫原性

鳗鲡经不同剂量的表达蛋白免疫后,于第 14 天产生了一定效价的抗体,其中高剂量蛋白免疫组略高于低剂量组,后者又高于 PBS 注射对照组。至第 28 天,表达蛋白免疫注射组(包括低剂量和高剂量组)均显著($P < 0.05$)高于对照组,高剂量和低剂量注射组也存在一定的差异,但未达到显著性水平(图 5)。

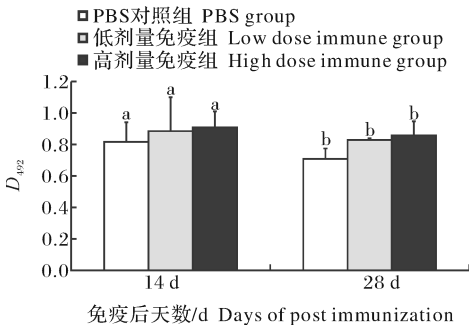
(pGEX-2T-His)并均进行蛋白表达,结果发现仅融合表达载体(pGEX-2T-His)能成功表达出目的蛋白。2 个表达载体都含有启动子、Lac 操纵子基因和 SD 序列,但融合表达载体(pGEX-2T-His)SD 序列的上游具 GST 标签。本研究结果表明,非融合蛋白

表达载体 pET-His 可以构建重组载体,但无法表达出重组蛋白,这与之之前单外膜蛋白表达的研究结果^[16]类似,可能与不明原因导致控制表达的相关基因缺失有关,确切原因有待于进一步研究证实。



M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 复性蛋白条带; 泳道 2: 纯化蛋白条带; 泳道 3~5: 重组菌表达全菌蛋白条带。M: Protein marker, 1: Band of the renatured protein; 2: Band of the purified protein; 3-5: Band of the expressed protein of whole lysed recombinant BL21.

图 4 纯化及复性后蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the purified and renatured expressed protein



同一时间内小写字母不同表示不同处理间存在显著 ($P < 0.05$) 差异。Each bar represents the mean of 5 eels of each group at each time point. Within a time point, means with different lowercase letters are significant ($P < 0.05$).

图 5 外膜蛋白二联表达产物低剂量 (50 µg/尾) 与高剂量 (100 µg/尾) 免疫后鳊鱼血清特异性抗体的 ELISA 效价 ($D_{492 \text{ nm}}$ 值, mean \pm S. D., $n = 5$)

Fig. 5 Optical density (492 nm) value of serum antibody titers in eels injected with PBS or expressed protein at the dose of 50 µg/eel (low dose) and 100 µg/eel (high dose)

为获得能高效表达并能快速纯化的目的蛋白转化菌株,我们同时构建了 3 种表达载体来分别转化 2 种不同的表达菌株^[12]。研究过程中,我们首先分别构建了携带目的基因的 3 个表达载体 pGEX_2T-

His、pGEX_4T-2 和 pET-32a 并成功转化至表达型大肠杆菌 *E. coli* BL21 和 *E. coli* DE3,结果发现载体 pET-32a 转化进入 2 种大肠杆菌后均无法正常表达外膜蛋白,而表达载体 pGEX_4T-2 转化至 2 种大肠杆菌后虽然均能大量表达,但表达产物不易纯化^[17]。另外,我们还构建了携带目的基因的 3 个重组表达载体 pET-His、pET-21a 和 pGEX_4T-2 并分别转化入表达型大肠杆菌 *E. coli* BL21 和 *E. coli* DE3,但尽管进行了多次条件优化,这 3 个未携带谷胱甘肽 S-转移酶基因的载体在 2 种表达菌株中均未能获得表达,这可能与密码子的嗜性和表达载体的调控因子相关,有待于进一步的研究证实。因此,在进行细菌外膜蛋白表达过程中应慎重选择表达载体^[18-19],可同时采用多种表达载体和表达菌株进行试验以筛选载体与表达菌株的最佳组合。

大量研究表明,诱导条件与重组蛋白表达存在一定的相关性^[20-22],如诱导剂浓度、诱导温度、诱导时间和诱导时菌液浓度。本研究结果表明,诱导剂 IPTG 浓度可在 0.25~2.0 mmol/L 之间,诱导温度可选择 16、25 或 37 °C,诱导时间在 3~9 h 对表达量的影响仅略有差异,诱导时菌液浓度 $D_{600 \text{ nm}}$ 0.1~1.0 间的 5 个水平都有相近的表达。因此,这些因素的差异对 pGEX-2T-His 载体转化的大肠杆菌外膜蛋白表达影响不明显。有研究表明^[23],低温诱导表达有利于表达蛋白的折叠和构象等形成,故本研究采用 16 °C 进行外膜蛋白的诱导表达。目的蛋白基因序列对其蛋白表达也有一定影响,如蛋白的亲疏水性,蛋白基因的 G+C 含量和表达蛋白的分子质量大小等。另有研究表明^[24],亲水性强的区域表达量比较高,小于 5 ku 或大于 100 ku 的蛋白都难以表达。另外,表达基因 G+C 含量大于 70% 时会导致大肠杆菌的表达量下降。本研究选择的基因表达片段亲水性强,G+C 含量在 50%~70%,蛋白分子质量为 87.1 ku,故得到了高效表达。

在表达蛋白纯化方面,本研究中表达载体 pGEX-2T 同时具有 GST 和 His 亲和标签。含 His 标签的表达蛋白可进行组氨酸亲和层析。具 GST 标签的表达载体在表达外源蛋白时会增加一个约为 26 ku 大小的融合蛋白,该蛋白为谷胱甘肽硫转移酶,而 His 标签表达的外源多肽分子质量不足 1 ku。由于本研究表达的二联外膜蛋白以包涵体形式存在,并且携带 His 标签,故使用含尿素的结合缓冲液使之变性后以 Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化柱和

自动蛋白核酸层析系统 AKTA purifier 100 来纯化^[25]。试验中采用的蛋白纯化方法是较经典的方法,我们进行了适度的改良,即在菌体超声波之前加入一定量的 β -巯基乙醇和甘油以在纯化过程中保护表达蛋白。此外,使用 2 mol/L 尿素结合缓冲液可显著洗涤杂蛋白,纯化过程中将更大程度地减少干扰。另外就是在纯化过程中应尽量保持低温,以避免目的蛋白降解。

就二联外膜蛋白的免疫原性而言,由于特异性抗体水平是评价蛋白质免疫原性的重要指标,故本研究以不同剂量二联表达蛋白免疫鳊鱼以初步研究其免疫原性。结果表明,与 PBS 注射组相比,不同剂量表达蛋白免疫后第 28 天抗体水平显著 ($P < 0.05$) 升高,表明表达蛋白在一定程度上提高了鳊鱼的体液免疫水平,具有较好的免疫原性。另外,不同剂量的免疫蛋白产生的抗体水平无显著差异 ($P > 0.05$),表明在后续的免疫效果研究中可以使用 50 μg /尾的剂量进行研究^[8,26]。试验还发现对照组鳊鱼血清中也存在较高效价的血清抗体(高 ELISA 值),由于气单胞菌和爱德华氏菌是淡水中的常见病原菌,鳊鱼很可能在本试验前已经接触过该菌^[27],故对照组也具有有一定含量的抗体^[28-29]。当然,亦不排除 PBS 注射组的较高 ELISA 值由酶联板本身的非特异性吸附所致。

参 考 文 献

- [1] 艾红,李永振. 养殖鳊鱼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.
- [2] 郭松林. 鳊鱼细菌性疾病的研究概况[J]. 科学养鱼,2011(7):48-49.
- [3] 殷战,徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究[J]. 水生生物学报,1995,19(1):76-83.
- [4] 郭松林. 鳊鱼病原菌的分类鉴定及相关免疫基础研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所,2006:106-125.
- [5] 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.
- [6] 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):1272-1277.
- [7] 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, 22(25/26):3411-3418.
- [8] 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.
- [9] 杨求华. 养殖鳊鱼致病性气单胞菌的分离与鉴定[D]. 厦门:集美大学水产学院,2012:27-28.
- [10] 陈强,龚晖,杨金先. 欧洲鳊迟顿爱德华氏菌的分离鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(1):7-10.
- [11] GUO S L, FENG J J, YANG Q H, et al. Immune effects of bathing European eels in live pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture Research, 2014, 45(5):913-921.
- [12] 王玉. 鳊鱼病原性气单胞菌与爱德华氏菌外膜蛋白基因工程二联表达载体的构建、表达、纯化与免疫原性初步研究[D]. 厦门:集美大学水产学院,2012:14-36.
- [13] MARSHAK D R, KADONAGA J T, BURGESS R R, et al. Strategies for protein purification and characterizations: a laboratory course manual [M]. Beijing: Science Press, 2002: 249-252.
- [14] 冯建军,关瑞章,郭松林. 欧洲鳊鱼免疫球蛋白阳性细胞的组织化学定位与分布特点[J]. 华中农业大学学报,2008,27(4):500-505.
- [15] 方安平,叶卫平. Origin 8.0 实用指南[M]. 北京:机械出版社,2009:64-77.
- [16] 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.
- [17] 王丽非,朱元军,王松梅,等. 组氨酸标签人 I3 干扰素在 *E. coli* BL2 1(DE3) 中的表达、纯化和活性测定[J]. 中国医药生物技术,2011,6(1):12-17.
- [18] 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 Immunology, 2007, 23(3):567-575.
- [19] ZHANG C, YU L, QIAN R. Characterization of *OmpK*, *GAPDH* and their fusion *OmpK-GAPDH* derived from *Vibrio Harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against *vibriosis* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5):1587-1599.
- [20] 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.
- [21] 罗晓松. 鱼源嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompT*S 在枯草芽孢杆菌中的表达及检测[J]. 农业生物技术学报,2009,17(4):554-560.
- [22] 刘永杰,陆承平. 嗜水气单胞菌弹性蛋白酶的纯化及特性分析[J]. 中国兽医学报,2006,26(1):54-56.
- [23] 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,2010:51-60.
- [24] 萨姆布鲁克,费里奇,曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2002:1474-1486.
- [25] BAMBINI S, RAPPUOLI R. The use of genomics in microbial vaccine development [J]. Drug Discov Today, 2009, 14(5/6):

252-260.

- [26] KHUSHIRAMANI R, GIRISHA S K, KARUNASAGAR I, et al. Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish [J]. *Protein Expression & Purification*, 2007, 1(2): 303-307.
- [27] SINYAKOV M S, DROR M, ZHEVELEV H M, et al. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish [J]. *Vaccine*, 2002, 20(31/32): 3668-3674.
- [28] ESTEVE-GASSENT M D, NIELSEN M E, AMARO C. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*; development of a new method for antibody quantification in skin mucus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(1): 51-61.
- [29] FOUZ B, ESTEVE-GASSENT M D, BARRERA R, et al. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* [J]. *Disease of Aquatic Organism*, 2001, 45(3): 183-189.

Expression, purification and immunogenicity of a bivalent outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* from diseased eels

WANG Yu FENG Jian-jun GUO Song-lin LIN Peng

Fishery College of Jimei University/Anguilla Modern Engineering Research Center of Industrial Technology of the Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract On the basis of the construction of an expressed vector which expresses a bivalent outer membrane protein (OMP) of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* from diseased eels, optimum expression conditions, including different IPTG concentration, temperature, time and bacteria concentration of the recombinant expression vector were studied. The results indicated that different IPTG concentration, temperature, time and bacteria concentration had no significant influence on the expression of the recombinant protein. A bivalent OMP was 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 bivalent OMP with a molecular weight of 87.1 ku was then purified and obtained by Nickel Chelating Affinity Chromatography with ÄKTApurifier-100 protein purification system. After renatured by dialysis, the purified protein was injected to American eels (*Anguilla rostrata*) to study its immunogenicity. The results indicated that the titers of serum antibody in eels at 28 d after immunization, was significantly ($P<0.05$) enhanced in groups injected with different doses of the recombinant protein compare with the PBS injection group, indicating good immunogenicity of the recombinant protein.

Key words bivalent OMP; *Aeromonas hydrophila*; *Edwardsiella tarda*; *Anguilla rostrata*; immunogenicity

(责任编辑:边书京)