

哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因克隆、 表达及 DNA 疫苗的免疫效果

黄浦江^{1,2,3}, 黄郁葱^{1,2,3}, 简纪常^{1,2,3*}, 吴灶和^{2,3,4}, 鲁义善^{1,2,3}, 张雪利^{1,2,3}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025;

3. 广东海洋大学广东省高等学校水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025;

4. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘要: 参照 GenBank 上登录的哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因序列, 设计引物扩增 *OmpW* 的开放阅读框, 序列分析结果显示该基因全长 645 bp。将其定向克隆到原核表达载体 pET-32a (+), 在大肠杆菌 BL21 中成功表达出带 His-tag 的融合蛋白, 融合蛋白分子量约为 43.8 ku, 且主要以包涵体形式存在。优化的表达条件为 37 °C, IPTG 浓度 0.1 mmol/L, 诱导时间 5 h。将纯化的融合蛋白免疫 SPF 昆明小鼠制备多克隆抗体, ELISA 方法检测抗体效价达 1:30 000, Western-blot 结果表明鼠抗 *OmpW* 血清能与诱导后的重组蛋白发生特异反应, 提示 *OmpW* 可能是哈维氏弧菌的一种重要保护性抗原。为进一步研究哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因 DNA 疫苗对红笛鲷的免疫保护效果, 构建了真核表达重组质粒 pcDNA-*OmpW*, 然后将真核质粒免疫接种红笛鲷。PCR 结果显示, 免疫接种后第 7~28 天, 在红笛鲷的肌肉、头肾、肝脏和脾脏组织中均存在质粒分布; RT-PCR 结果显示, 免疫接种后第 7~28 天, 红笛鲷上述组织均有目的基因的表达。ELISA 结果表明, 红笛鲷体内血清产生了抗 *OmpW* 蛋白的高效价抗体。Western-blot 分析表明, DNA 疫苗免疫后红笛鲷体内表达了相应的目的蛋白, 并诱导产生了相应抗体。攻毒实验结果表明, 免疫保护率高达 60%, 可见 pcDNA-*OmpW* 可作为红笛鲷预防哈维氏弧菌感染的有效候选疫苗之一。

关键词: 哈维氏弧菌; 外膜蛋白; *OmpW*; 免疫原性; DNA 疫苗

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 广泛存在于海洋环境中, 是一种常见的革兰氏阴性杆菌, 可感染鱼类、虾类及贝类等多种经济动物, 给海水养殖业造成了巨大的经济损失^[1]。红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 是我国沿海的重要养殖鱼类之一, 近年来随着海水鱼类养殖密度的不断增大和环境的日益恶化, 海水鱼弧菌病频繁暴发, 其中由哈维氏弧菌引发的弧菌病危害较重。因此, 开展弧菌病的免疫学研究显得非常迫切。虽然哈维氏弧菌发现较早, 但是对其完整的致病机理尚不十分清楚, 因宿

主物种的不同, 毒力存在较大差异^[2], 致病性与胞外产物 (ECP) 如溶血素、蛋白酶、脂多糖及外膜蛋白等有密切的关系^[3]。Owens 等^[4] 通过实验, 证实哈维氏弧菌的毒力与细胞表面的疏水性和含铁产物相关。张晓华等^[5] 以虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和蛙为模型动物, 对哈维氏弧菌可能的致病因子做了详细的比较研究, 发现由该菌分泌的胞外产物中的溶血素是引起鱼体致病的重要因子。外膜蛋白 (outer membrane proteins, Omps) 是革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 它位于细菌细胞膜表

收稿日期: 2013-07-13 修回日期: 2013-09-23

资助项目: 国家自然科学基金项目 (41240041); 广东省科技厅国际合作项目 (2012B050600029); 国家科技支撑计划 (2012BAD17B02、2012BAD17B03)

通信作者: 简纪常, E-mail: jianjc@gmail.com

面,当病原菌入侵和感染宿主时,可起到粘附素作用,在维持细菌形态、物质代谢及细菌的致病等方面有重要作用^[6]。研究表明,细菌的外膜蛋白具有良好的免疫原性,可刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,且具有异种血清型的免疫交叉保护性,是一种潜在的共同保护性抗原^[7]。

OmpW 是哈维氏弧菌的一种重要的微孔蛋白,由 200 ~ 230 个氨基酸组成,它由 8 股 β 片层组成一股狭长的亲水性通道,研究表明该结构可能与细菌适应不同的环境压力有关^[8]。关于弧菌的 *OmpW* 已开展了较多的研究。Nandi 等^[9]通过对霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的外膜蛋白 *OmpW* 和调控蛋白 *ToxR* 的研究,证实 *OmpW* 是其重要保护性抗原之一。刘明智等^[10]对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 外膜蛋白 *OmpW* 进行基因克隆和原核表达分析,将融合蛋白 His-W 免疫草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*),结果表明,融合蛋白能使草鱼产生明显免疫应答,攻毒实验结果显示免疫组草鱼获得了 57% ~ 86% 的相对保护率,证明了重组嗜水气单胞菌外膜蛋白 *OmpW* 可作为草鱼嗜水气单胞菌基因工程亚单位疫苗。

由哈维氏弧菌引起的疾病,生产上多采用抗菌类药物预防,对于疫苗的研究多停留在全菌灭活疫苗、亚单位疫苗阶段^[11]。DNA 疫苗^[12]是将编码某种抗原蛋白的外源基因直接导入机体,并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白,诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。与传统疫苗相比,DNA 疫苗具有生产成本低、易于保存、免疫时间长等优点^[13]。本实验首先克隆出哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因,验证了该基因编码蛋白的免疫原性;其次以构建的重组真核表达质粒 pcDNA-OmpW 为抗原免疫红笛鲷;最后对该 DNA 疫苗的免疫保护效果做了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 质粒及菌株

病原菌株哈维氏弧菌 ZJ0706 分离自广东省湛江市某鱼排患病的红笛鲷; *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3)、pET-32a(+)、pcDNA3.1(+) 菌株及质粒由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存。

1.2 实验动物

实验用昆明系 SPF 级 8 周小鼠 (20 ~ 25 g) 购自广东医学院实验动物中心,在温度为 18 ~ 22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 60% 条件下,于本实验室动物饲养室暂养 1 周后进行实验。红笛鲷购自湛江某鱼排,健康有活力、体质量 30 g 左右,水温 28 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$,每日投喂小杂鱼,室内养殖室暂养一周后用于实验。

1.3 主要试剂

海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Ex Taq DNA 聚合酶, pMD-18T 购自 TaKaRa 公司; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 连接酶购自美国 NEB 公司; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物技术有限公司; HRP-标记的山羊抗鼠 IgG 及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; EasyScript First-strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 无内毒素质粒提取试剂盒 (Endo-Free Plasmid Maxi Kit) 购自 OMEGA 公司。

1.4 哈维氏弧菌 DNA 提取及 *OmpW* 基因扩增

将保存的哈维氏弧菌 ZJ0706 菌种,接种于 TSB 培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,待 OD_{600} 约为 0.4 ~ 0.6 时,取 3 mL 菌液,离心收集菌体并提取哈维氏弧菌 DNA。根据 GenBank 上登录的哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因序列 (登录号 ACR56379.1) 设计 1 对 5' 末端含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 (下划线) 的接头引物扩增其开放阅读框 (ORF):

上游引物 WF1: 5'-CGCGGATCCATGAAA-AAAACAATCTGCAGTT-3'

下游引物 WR1: 5'-CCGCTCGAGTTAGAA-CTTGTAACCACCGCTGAT-3'

以哈维氏弧菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 33 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收,最后以摩尔比 1:3 (插入片段/载体) 比例克隆入 pMD-18T 载体,蓝白斑筛选单菌落,将阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。

1.5 原核表达载体构建

将重组质粒 pMD18-OmpW 和表达质粒 pET-32a(+) 分别接种于新鲜的含氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中扩大培养,将提取的

pMD18-*OmpW* 和 pET-32a(+) 质粒分别采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 3 h; 对目的条带和载体切胶回收, 采用 T_4 连接酶连接, 连接产物转入 DH5 α 感受态; 将阳性克隆扩大培养, 提取 pET-*OmpW* 重组质粒, 将重组质粒转化至 BL21(DE3) 感受态, 蓝白斑筛选单菌落, 阳性克隆送测。

1.6 表达条件优化及蛋白纯化

将构建成功并保种的重组质粒菌液扩大培养, 设定 IPTG 浓度为 0.1、0.2、0.7 和 1.0 mmol/L, 分别在 28、37 °C 下诱导不同的时间, 确定最佳诱导条件, 采用 SDS-PAGE 电泳分析各表达产物。最佳诱导条件下采用 HisTrapTM HP 亲和层析柱纯化重组蛋白, 不同浓度的咪唑洗脱液洗脱重组蛋白, K4000 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.7 免疫原性分析

将纯化的重组蛋白皮下多点注射免疫 SPF 级 8 周龄雄性小鼠, 每只免疫 200 μ g; 实验组首次采用弗氏完全佐剂乳化抗原免疫, 每隔 1 周加强免疫 1 次, 共加强免疫 3 次, 加强免疫采用弗氏不完全佐剂乳化抗原; 对照组同样的方法注射无菌 PBS。末次免疫 1 周后眼球采血, 分离血清保存备用。以纯化蛋白为抗原, 本实验里制备的鼠抗血清为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, ELISA 测定效价, Western-blot 分析鼠抗血清的免疫反应性。

1.8 真核重组质粒的构建及抽提

将重新提取的重组质粒 pMD18-*OmpW* 和质粒 pcDNA3.1(+), 分别采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物纯化后利用 T_4 连接酶连接, 对构建成功质粒测序鉴定。将重组质粒 pcDNA-*OmpW* 和 pcDNA3.1(+) 分别接种于 Amp⁺/LB 液体培养基中扩大培养, 采用 OMEGA 无内毒素质粒大提试剂盒抽提质粒。

1.9 真核质粒免疫红笛鲷

挑选有活力、健康无异常、体格均衡的红笛鲷 150 尾, 将鱼体随机分为 3 组, 每组 50 尾, 肌肉注射真核质粒; 实验组 A: 每尾鱼注射 20 μ g (溶于 50 μ L 无菌生理盐水) 真核重组质粒 pcDNA-*OmpW*; 对照组 B: 每尾鱼注射 20 μ g (溶于 50 μ L 无菌生理盐水) 空质粒 pcDNA3.1(+); 对照组 C 每尾鱼注射 50 μ L 无菌生理盐水。

1.10 目的基因的核酸水平检测

取免疫接种后第 7 天和第 28 天红笛鲷肌肉、脾脏、头肾和肝脏组织, 提取各组织 DNA; Trizol 法提取各组织 RNA 并立即反转为 cDNA 一链模板。分别以提取各组织的 DNA 和 cDNA 为模板, WF1 和 WF2、内参基因 β -actin 为引物。重组质粒为阳性对照; 注射的空质粒为阴性对照, 以 T7 和 pcDNA3.1R 为引物。PCR 方法检测 *OmpW* 目的基因表达。所用引物见表 1。

表 1 检测所需引物

Tab.1 Primers used in the detection

检测目标 target	引物 primers	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')
β -actin	β S	GCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGA
	β A	CGCCTGAGTGTGTATGAGAAATG
pcDNA	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	pcDNA3.1R	TAGAAGGCACAGTCGAGG
<i>OmpW</i>	WF	CGCGGATCCATGAAAAAACAATCTGCAGT
	WR	CCGCTCGAGTTAGAACTTGTAAACCACCGC

1.11 目的基因的蛋白水平检测

取免疫接种第 14 天的红笛鲷血清, 以目的基因 *OmpW* 纯化的蛋白为抗原, 红笛鲷血清为一抗(1:1 000), 兔抗红笛鲷 IgM(实验室保存) 为二抗(1:1 500), HRP 标记的羊抗兔为三抗(1:20 000), 进行 Western-blot 分析; 取免疫接种后第 7、14、21、28、35 天的红笛鲷血清, ELISA 检测各组血清抗体效价。抗体效价根据 P/N 值来确定。P/N = (待检血清的 OD₄₅₀ - 空白对照的

OD₄₅₀) / (阴性血清的 OD₄₅₀ - 空白对照的 OD₄₅₀)。当 P/N > 2.1 时抗血清的最高稀释倍数为其最终抗体效价, 用 Student's *t*-test 统计显著性差异。

1.12 鱼体攻毒保护实验

从免疫接种第 35 天的 A、B、C 3 组中每组随机抽取 25 尾, 每尾腹腔注射 0.1 mL 的哈维氏弧菌 (1×10^8 CFU/mL) 活菌悬液; 另从未免疫组中取 25 尾鱼注射相同剂量的无菌 PBS 作为健康对照组 D;

活菌攻毒后每天观察并记录各组鱼发病和死亡情况,连续观察 15 d,对病鱼死鱼进行病理解剖和病原分离鉴定,确定是否因为活菌攻毒而死。实验结束后计算各组相对免疫保护率(relative percentage-survival,RPS),其计算公式为 $RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 *OmpW* 的克隆及原核表达载体构建

以哈维氏弧菌 DNA 为模板,利用特异引物 PCR 扩增出 645 bp 的目的条带,与预期相符;将其插入克隆载体 pMD-18T,然后将 pMD18-*OmpW* 和 pET-32a 质粒经双酶切, T_4 连接酶连接,组成重组质粒 pET-*OmpW*,重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,结果出现 2 条带,一条为 pET-32a(+) 的 5 400 bp 左右的条带,另一条为 645 bp 左右的目的条带(图 1)。

2.2 重组蛋白的免疫反应性分析

重组蛋白经 IPTG 诱导后可表达分子量 43.8 ku 的融合蛋白,其中 pET 表达的融合标签为 20.4 ku,SDS-PAGE 凝胶电泳分析与实验预期相符(图 2-a);最佳诱导条件为 IPTG 浓度 0.1 mmol/L、温度 37 °C、诱导 5 h(数据未列出);菌体超声波破碎后,SDS-PAGE 检测目的蛋白主要

以包涵体形式存在,提取包涵体后,HisTrapTM HP 亲和层析柱纯化重组蛋白,咪唑最佳洗脱浓度为 350 mmol/L(数据未列出)。纯化蛋白免疫小鼠第 4 次的第 7 天,眼球采血,分离血清,然后 ELISA 检测鼠抗血清抗体效价达 1:30 000;Western-blot 分析发现,*OmpW* 抗血清能与诱导后重组蛋白发生特异反应(图 2-b)。

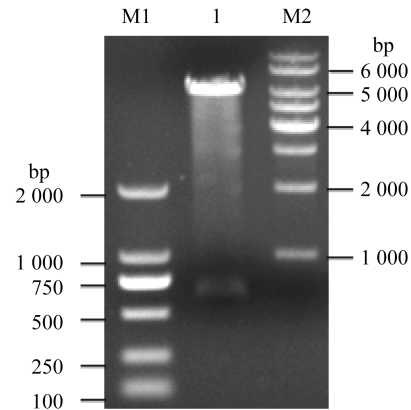


图 1 重组质粒 pET-*OmpW* 酶切鉴定

M1. DL2000 DNA 分子量标准; M2. 1Kb DNA 分子量标准;
1. pET-*OmpW*/*Bam*H I + *Xho* I

Fig. 1 The determination of the recombinant plasmid pET-*OmpW* by enzyme restriction

M1. DL2000 DNA Marker; M2. 1Kb DNA Ladder; 1. pET-*OmpW*/*Bam*H I + *Xho* I

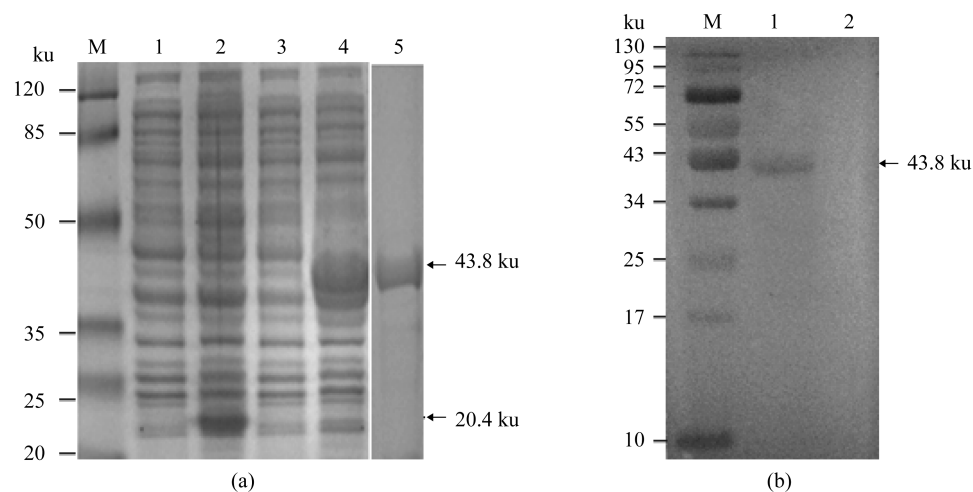


图 2 pET-*OmpW* 在大肠杆菌中表达 SDS-PAGE 分析(a)和 *OmpW* 融合蛋白的 Western-blot 分析(b)

(a) M. 蛋白分子量标准; 1. pET-32a 未诱导; 2. pET-32a 诱导; 3. pET-*OmpW* 未诱导; 4. pET-*OmpW* 诱导的全菌蛋白 5. 纯化后的 *OmpW* 蛋白(b) M. 预染标准分子量蛋白; 1. 实验组抗血清与融合蛋白反应结果; 2. 对照组抗血清与融合蛋白反应结果

Fig. 2 SDS-PAGE(a) and Western-blot(b) analysis of the purified *OmpW* fusion protein

(a) M. protein molecular marker; 1. pET-32a without IPTG induction; 2. pET-32a with IPTG induction; 3. pET-*OmpW* without IPTG induction; 4. pET-*OmpW* with IPTG induction; 5. purified *OmpW* protein; (b) M. prestained protein marker; 1. reaction result based on the specific polyclonal antibody and the *OmpW* fusion protein; 2. reaction result based on the antiserum of 0 day post-injection and the *OmpW* fusion protein

2.3 真核质粒双酶切鉴定及质粒抽提

将双酶切的 pMD18-*OmpW* 目的基因与双酶切的质粒 pcDNA3.1 (+) 采用 T_4 连接酶连接, 构建成功的重组质粒命名为 pcDNA-*OmpW*。重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 电泳鉴定成功插入了一段约 645 bp 的序列 (图 3)。提取的质粒经微量核酸定量仪检测 A260/A280 值都介于 1.75 ~ 1.85 之间, 说明提取的质粒纯度较高, pcDNA-*OmpW* 浓度为 678 ng/ μ L, pcDNA3.1 (+) 浓度为 624 ng/ μ L, 质粒纯度、浓度均符合实验要求。

2.4 基因的 mRNA 和 DNA 水平检测

鱼体注射重组质粒后第 7 天和第 28 天, RT-PCR 检测 *OmpW* 基因在鱼体的肌肉、头肾、肝和脾脏组织中均有不同程度的表达 (图 4), 左图为免疫第 7 天、右图为免疫第 28 天, 阳性对照为质粒的 PCR 结果。

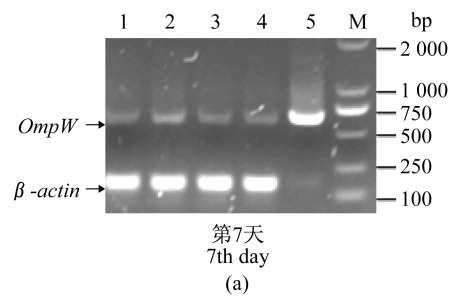


图 4 免疫后第 7 天和第 28 天 *OmpW* 在红笛鲷各组织中表达的 RT-PCR 检测结果

M. DL2000 标记; 1. 头肾; 2. 脾脏; 3. 肝脏; 4. 肌肉; 5. 阳性对照

Fig. 4 Expression of aimed *OmpW* in tissues of fish on 7th and 28th day by RT-PCR

M. DL2000 marker; 1. head kidney; 2. spleen; 3. liver; 4. muscle; 5. positive control

鱼体注射重组质粒后第 7 天和第 28 天, 从 DNA 水平检测重组质粒 pcDNA-*OmpW* 在肌肉、头肾、肝和脾脏组织的转染情况, PCR 均扩增出

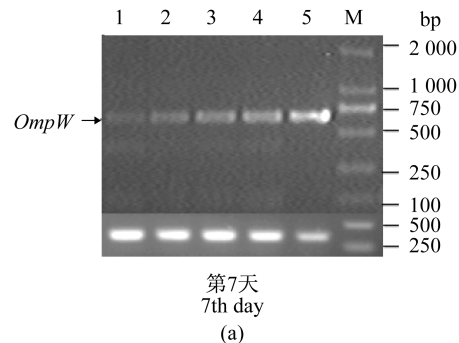


图 5 红笛鲷接种第 7 天和第 28 天后重组质粒 pcDNA-*OmpW* 在各组织中的分布

M. DL2000 标记; 1. 头肾; 2. 脾脏; 3. 肝脏; 4. 肌肉; 5. 阳性对照; 与 1,2,3,4,5 对应的为阴性对照

Fig. 5 Distribution of vaccine DNA in fish tissues sampled on 7th and 28th day

M. DL2000 marker; 1. head kidney; 2. spleen; 3. liver; 4. muscle; 5. positive control; correspond with 1,2,3,4,5 are negative control

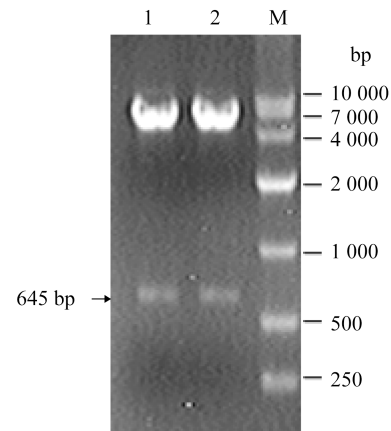
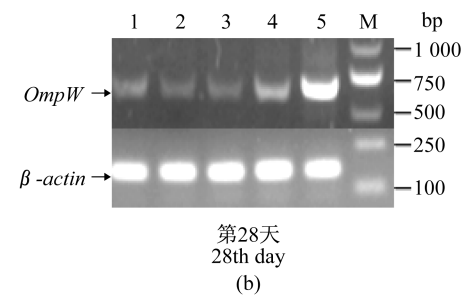


图 3 重组质粒 pcDNA-*OmpW* 双酶切鉴定

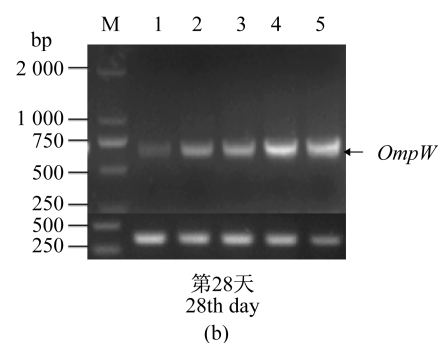
M. DL10000 DNA 分子量标准; 1, 2. pcDNA-*OmpW*/*Bam*H I + *Xho* I

Fig. 3 The determination of the recombinant plasmid pcDNA-*OmpW* by enzyme restriction

M. DL10000 DNA Marker; 1, 2. pcDNA-*OmpW*/*Bam*H I + *Xho* I



了约 645 bp 的条带, 结果证明质粒转染成功 (图 5), 图中约 270 bp 条带为阴性对照空质粒 pcDNA3.1 (+) 组电泳图片。



2.5 Western-blot 分析和血清抗体效价检测

取免疫接种后第 28 天的红笛鲷血清进行 Western-blot 分析,结果表明,鱼体血清中能够检测到一条分子量大小约为 24 ku 的特异条带,空质粒对照组没有特异条带,说明目的蛋白在鱼体内表达(图 6)。ELISA 方法测定抗体效价,结果表明,红笛鲷在免疫后发生了特异免疫应答,所有免疫组与非免疫对照组间都存在明显差异,在第 1 周就可检测到抗体产生,第 3 周抗体水平达到最大值 1:2 896(图 7)。

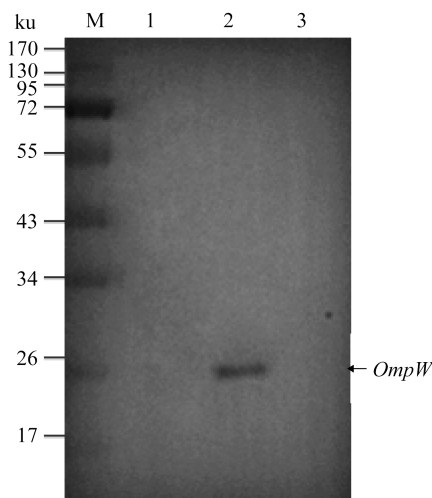


图 6 Western-blot 检测 *OmpW* 基因在红笛鲷体内的表达
M. 蛋白分子量; 1. 注射空质粒 pcDNA 的红笛鲷血清; 2. 注射 pcDNA-OmpW 的红笛鲷血清; 3. 注射生理盐水的红笛鲷血清

Fig. 6 Western-blot analysis of *OmpW* expressed in fish tissues

M. molecular weight; 1. serum injected with negative control pcDNA; 2. serum injected with pcDNA-OmpW DNA vaccine for 4 weeks; 3. serum injected with normal saline

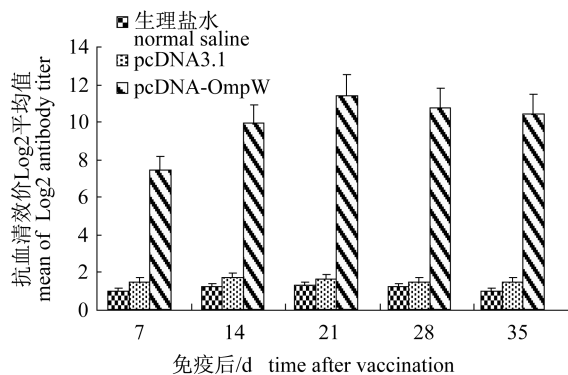


图 7 间接 ELISA 法测定的免疫鱼抗体效价
Fig. 7 Antibody titers of vaccinated fish detected by ELISA

2.6 相对免疫保护率

当哈维氏弧菌攻毒后,实验组及对照组红笛鲷在 15 d 内都出现了不同程度的死亡,相继死亡的时间集中在攻毒后的 5~9 d,随后情况基本稳定,对部分发病鱼的症状观察,以及病灶组织分离,确定了死亡原因的确是因为注射了哈维氏弧菌而引起鱼体感染发病的。实验结果表明:质粒 pcDNA-OmpW 组获得了 60% 的相对保护率,空质粒 pcDNA3.1 对照组只有 15% 的相对保护率,生理盐水对照组则全部死亡,攻毒后 PBS 健康对照组的红笛鲷全部存活(图 8)。

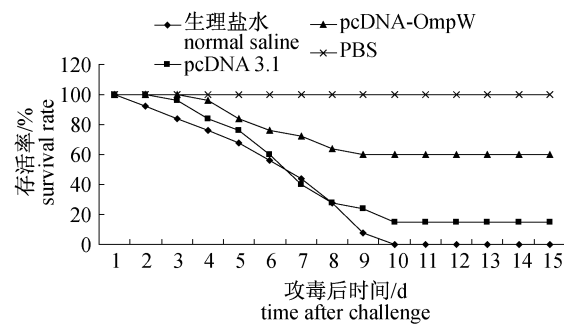


图 8 重组真核质粒免疫后的红笛鲷用哈维氏弧菌攻毒后的存活率

Fig. 8 Survival rate of *L. sanguineus* after being challenged with *Vibrio harveyi*

3 讨论

外膜蛋白存在于细菌表面,与宿主的免疫系统直接接触,能够激发宿主细胞发生免疫反应,因此宿主的免疫反应与细菌的外膜蛋白密切相关^[14]。本研究首先克隆出哈维氏弧菌外膜蛋白基因 *OmpW*,然后将该基因所编码相应蛋白在大肠杆菌中表达。因为大肠杆菌原核表达系统以其成本低廉、操作简单等优点,被广泛应用于基因的原核表达^[15],所以本研究采用功能强大的 pET 原核表达系统。pET-32a(+) 的 N/C 端带有 6 个氨基酸的 His-tag,在蛋白纯化时利用 His-tag 标签的特性纯化目的蛋白,是原核表达常用的载体^[16]。温度是影响重组蛋白表达的重要因素,本实验研究表明诱导温度为 37 °C 时,重组蛋白的表达量明显高于 28 °C 时的表达量,并且重组蛋白主要以包涵体形式存在。包涵体不利于融合蛋白的正确折叠,且复性较难,而且会影响目的蛋白纯化^[17],因此在蛋白纯化之前通过超声细胞破碎、尿素法提

取包涵体,来获得复性的可溶性 *OmpW* 重组蛋白。在最佳生长温度和相对湿度条件下,小白鼠生长良好,身体无异常,待饲养一段时间后,将纯化的重组蛋白腹腔皮下多点注射免疫小白鼠,最终获得了高效价的鼠抗血清,免疫印迹显示该血清可与 *OmpW* 蛋白发生特异反应,提示哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 是它的保护性抗原之一,为 *OmpW* 的 DNA 疫苗研究提供了理论依据。

有效的疫苗既能够增强机体的体液免疫,又能够促进机体细胞免疫;亚单位疫苗虽然能够诱导机体产生较强的体液免疫,但是机体细胞免疫常常表现不足;DNA 疫苗可以同时引起机体的细胞免疫和体液免疫反应,而且以细胞免疫为主^[18]。鱼类常用的 DNA 疫苗载体有 pcDNA3、pcDNA3.1 等,本研究以 Invitrogen 公司研发的 pcDNA3.1 为真核载体,该载体含有复制原点 (SV40)、新霉素和青霉素抗性、人巨细胞瘤病毒启动子 (PCMV), CpG 基元等结构,保证了 DNA 疫苗有较强的转录激活作用,使抗原基因能够在细胞中表达并引发一系列的免疫反应^[19]。DNA 疫苗常用的接种方式包括肌肉注射、口服、浸泡、基因枪法 4 种方式,肌肉注射免疫虽然会存在动物的应激反应和劳动强度大等问题,但是却能够取得较好的免疫效果,同时肌肉注射法又能够诱导抗原基因的持久表达^[20]。研究表明,鱼类 DNA 疫苗一般注射剂量为 1 ~ 50 μg ,鱼体大小 10 ~ 25 g 之间免疫效果较好,背鳍肌肉注射幼鱼能够获得持久的免疫保护^[21]。Sun 等^[22]用海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 抗原基因 *Sia10* 组成的 DNA 疫苗 pSia10 免疫平均体质量为 20 g 的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*),每尾肌肉组织接种 40 μg ,结果表明接种 49 d 仍能检测到质粒残留。本实验选择的注射剂量为 20 μg ,注射方式为肌肉注射,注射体积为 50 μL ,红笛鲷体内产生了高效价血清,并且取得了较强的免疫反应。到目前为止,鱼类 DNA 疫苗的研究主要集中在病毒方面,如病毒性出血败血症病毒 (VHSV)^[23]、传染性造血坏死病毒 (IHNV)^[24]、鱼类虹彩病毒 (RSIV)^[25] 等的研究,而有关细菌 DNA 疫苗的研究报道并不多见,这可能与细菌本身的特点相关,细菌结构比病毒组成更加复杂,如鞭毛、粘附素、外膜蛋白、蛋白酶类等均可作为抗原的候选基因。Kumar 等^[26]将鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 38 ku

的主要外膜孔蛋白作为抗原基因构建了 DNA 疫苗,20 μg /尾接种尖吻鲈 (*Lates calcarifer*),攻毒实验结果构建的 OMP38 DNA 疫苗对尖吻鲈的相对免疫保护率为 55.6%,并且免疫时间长达 49 d。本研究成功构建了真核表达质粒 pcDNA-*OmpW*,免疫红笛鲷后,核酸水平可以检测到基因的表达,蛋白水平也能够检测到抗原蛋白的表达,并且疫苗持续表达时间达 1 个月以上;攻毒实验结果表明,pcDNA-*OmpW* 组获得了 60% 的相对免疫保护率,说明疫苗免疫接种红笛鲷后,对鱼体产生了一定的免疫保护作用,以期为鱼用弧菌 DNA 疫苗的进一步研究、养殖病害的防治提供理论依据和实践经验。

参考文献:

- [1] Austin B, Zhang X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43 (2): 119 - 124.
- [2] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids [J]. Fish Diseases, 2000, 23 (2): 93 - 102.
- [3] Larsen J L, Møllergaard S. Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47 (6): 1261 - 1265.
- [4] Owens L, Austin D A, Austin B. Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27 (6): 157 - 160.
- [5] 张晓华,钟英斌,陈吉祥,等. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术 [J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(5):740 - 748.
- [6] Pedersen K, Verdonck L, Austin B, et al. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, 1998, 48(3): 749 - 758.
- [7] Khushiramani R, Girisha S K, Bhowmick P P, et al. Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas species* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2008, 24 (10): 2263 - 2268.
- [8] Baldermann C, Lupas A, Lubieniecki J, et al. The

- regulated outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded-sheet proteins by its sequence and properties[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15):3741-3749.
- [9] Nandi B, Nandy R K, Mukhopadhyay S, *et al.* Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(11):4145-4151.
- [10] 刘明智, 叶星, 田园园, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 基因的表达及其免疫原性分析[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(3):437-445.
- [11] Sommerset I, Krossøy B, Biering E, *et al.* Vaccines for fish in aquaculture [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(1):89-101.
- [12] Corbeil S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus; efficacy of various routes of immunisation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(8):711-723.
- [13] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, *et al.* DNA vaccines: A novel approach to Immunization [J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 1995, 17(2):79-83.
- [14] Rahman M H, Kawai K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(4):379-382.
- [15] Clark E D. Protein refolding for industrial processes [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(2):202-207.
- [16] Wang R, Shen W B, Liu L L, *et al.* Prokaryotic expression, purification and characterization of a novel rice seed lipoxygenase gene *OsLOX1* [J]. *Rice Science*, 2008, 15(2):88-94.
- [17] 杨晓仪, 林键, 吴文言. 重组蛋白包涵体的复性研究[J]. *生命科学研究*, 2004, 8(2):100-105.
- [18] 任建功, 朱荫昌, 余传信, 等. 日本血吸虫 23 kDa 外膜蛋白 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合应用免疫保护性作用的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002, 14(2):98-101.
- [19] 袁野, 王秀丽, 郭设平. 鱼用基因工程疫苗载体的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008, (5):31-34.
- [20] Plant K P, LaPatra S E. Advances in fish vaccine delivery [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12):1256-1262.
- [21] Tonheim T C, Dalmo R A, Bøgvold J, *et al.* Specific uptake of plasmid DNA without reporter gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) kidney after intramuscular administration [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1):90-101.
- [22] Sun Y, Hu Y H, Liu C S, *et al.* Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2010, 28(23):3905-3912.
- [23] Byon J Y, Ohira T, Hirono I, *et al.* Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis [J]. *Vaccine*, 2006, 24(7):921-930.
- [24] Corbell S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus; efficacy of various routes of immunisation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(8):711-723.
- [25] Caipang C M, Takano T, Hirono I, *et al.* Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(2):130-138.
- [26] Kumar S R, Parameswaran V, Musthaq S S, *et al.* Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(2):316-326.

Cloning, expression and DNA vaccine analysis of *OmpW* of *Vibrio harveyi* ZJ 0607

HUANG Pujiang^{1,2,3}, HUANG Yucong^{1,2,3}, JIAN Jichang^{1,2,3*}, WU Zaohe^{2,3,4},
LU Yishan^{1,2,3}, ZHANG Xueli^{1,2,3}

(1. College of Fishery, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals,
Zhanjiang 524025, China;

3. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;

4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: According to *OmpW* gene sequence published in GenBank, primers were designed and the DNA fragment of about 645 bp (encoding 214 amino acids) was amplified by PCR from genomic DNA of *Vibrio Harveyi* ZJ0607. The full length product was then cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a (+) for protein expression in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). The molecular weight of expression fusion protein *OmpW* was about 43.8 ku. The recombinant protein was highly expressed under induction conditions of exposure at 37 °C, in 0.1 mmol/L of IPTG for 5 h. The recombinant protein was purified by the best expression condition, purified and used as antigen to immunize the Kunming-mice, and the antibody titer reached 1 : 30 000. The result of the Western-blot revealed that specific antigen-antibody reaction occurred between the antiserum and its corresponding recombinant fusion protein. In order to study the immunogenic and protective effects of DNA vaccine, plasmid DNA encoding outer membrane protein *OmpW* gene was used as a DNA vaccine to immunize red snapper (*Lutjanus sanguineus*). PCR results indicated that pcDNA-*OmpW* was distributed in muscle, head kidney, liver, spleen 7 – 28 days after vaccination. RT-PCR results indicated that the *OmpW* gene was expressed in all above tissues of vaccinated fish 7 – 28 days after vaccination. Red snapper immunized with DNA vaccine showed higher serum antibody and corresponding recombinant fusion protein by ELISA and Western-blot. In addition, fish immunized with DNA vaccine developed a protective response to live *Vibrio harveyi* challenged 35 days post-inoculation, as demonstrated by increased survival of vaccinated fish over the control fish. This study indicates that pcDNA-*OmpW* is an effective vaccine candidate against *Vibrio harveyi* infection.

Key words: *Vibrio harveyi*; outer membrane protein; *OmpW*; immunogenicity; DNA vaccine

Corresponding author: JIAN Jichang. E-mail: jianjc@ gmail. com