

嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 基因的表达及其免疫原性分析

刘明智^{1,2} 叶星^{1*} 田园园¹ 马冬梅¹ 张莉莉¹ 迟妍妍^{1,2} 邓国成¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广东 广州 510380)

(2. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要: 从患暴发性败血病的草鱼病灶处分离鉴定了嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) Wp3 菌株。以其基因组 DNA 为模板扩增外膜蛋白 W 基因(OmpW), 该基因全长为 865 bp, 开放式阅读框(ORF)为 615 bp, 与标准株 ATCC7966 的 OmpW 基因的同源性为 99.8%。根据 ORF 序列设计引物扩增 OmpW 成熟肽编码序列并将其插入到表达载体 pQE30 中, 转化大肠杆菌, 经诱导可表达分子量为 24.7 kD 的带 His 标签的融合外膜蛋白 His-W。用此融合蛋白免疫草鱼, 所得草鱼血清经 ELISA 分析显示呈现阳性反应, 说明重组蛋白能诱导产生抗体。采用实时荧光定量 PCR 分析草鱼头肾组织 IgM 基因表达水平的变化, 结果显示免疫组 IgM 的表达量均明显高于空白组, 其中低浓度免疫组(2 µg/g)与空白对照组的差异显著($P<0.05$), 说明融合蛋白可使草鱼产生良好的免疫应答并上调抗体基因表达、产生高效抗体。保护性实验显示, 不同免疫剂量均可使免疫组获得较高保护率(57%–86%)。结果显示, 重组嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 可作为草鱼嗜水气单胞菌基因工程亚单位疫苗。

关键词: 嗜水气单胞菌, 外膜蛋白 W, 克隆, 基因工程表达, 免疫原性, IgM, 保护率

Expression and immunogenicity analysis of the outer membrane protein W gene of *Aeromonas hydrophila*

LIU Ming-Zhi^{1,2} YE Xing^{1*} TIAN Yuan-Yuan¹ MA Dong-Mei¹ ZHANG Li-Li¹
CHI Yan-Yan^{1,2} DENG Guo-Cheng¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

(2. Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China)

基金项目: 广东省重点科技项目(No. 2008A020100016); 广东省海洋渔业科技项目(No. A200899F01); 广州市科技项目(No. 2009J1-C021); 荔湾区科技项目(No. 20084411115)

* 通讯作者: Tel: 86-20-81617091; E: gzyexing@163.com

收稿日期: 2010-08-23; 接受日期: 2010-12-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Abstract: The complete gene sequence of the outer membrane protein W (OmpW) was amplified from the genomic DNA of *Aeromonas hydrophila* Wp3 strain which was isolated from grass carp suffered hemorrhage. The OmpW gene was 865 bp in length, containing an open reading frame (ORF) of 615 bp. The cloned gene possessed high similarity with that of the standard strain ATCC7966 (99.8%). The sequence encoding the mature peptide of OmpW was amplified and inserted into the expression vector pQE30. The recombinant vector was transformed into *E. coli*, and a 24.7 kD recombinant fusion protein His-W was expressed. ELISA analysis of the serum of grass carp immunized with His-W showed a positive immune reaction, suggesting production of the antibodies. Total RNA of the head kidney of the immunized grass carp was extracted and mRNA level of IgM was analyzed by qRT-PCR. Expression levels of IgM gene in the immunized group were higher than those of the control group, and significant difference ($P<0.05$) was found in the lowest protein concentration group (2 $\mu\text{g/g}$). These results showed that His-W was able to efficiently induce the immunized grass carp to produce antibodies. Protection experiments showed that the immunized groups had higher survival rates than those of the control groups (57%–86%). This study suggested that the recombinant protein His-W was a candidate vaccine for grass carp *A. hydrophila* disease.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Outer membrane protein W, Cloning, Genetic engineering expression, Immunogenicity, IgM, Protection

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为革兰氏阴性菌, 隶属气单胞菌科、气单胞菌属, 为一类嗜温性、运动性的气单胞菌。嗜水气单胞菌可引发养殖鱼类的暴发性败血症, 是 20 世纪 80 年代末以来引发中国、菲律宾、泰国、印度等亚洲国家传统池塘养殖鱼类暴发性疾病的最重要病原之一, 给水产养殖业造成了严重的经济损失^[1]。研究表明嗜水气单胞菌有致病菌株和非致病菌株之分。该菌具有多种血清型, 存在地理区域差异, 故生化表型和抗原性复杂^[2-4]。传统的嗜水气单胞菌疫苗有灭活全菌疫苗、弱毒疫苗等, 具有制备工艺简单、成本低廉等优点, 但也存在着不足之处, 如成分复杂、易对鱼体产生较大影响, 或存在回复突变的风险, 同时嗜水气单胞菌复杂的血清型也影响着其免疫保护效果。基因工程亚单位疫苗是对一个或多个保护性抗原基因进行重组表达, 具有抗原确定、抗体出现早、滴度高、持续时间长等优点, 因而成为近年疫苗研究的热点。

外膜蛋白(Outer membrane protein, Omp)是革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 在细菌的物质运输、形态维持和有关物质合成方面起着重要作用。研究表明细菌的外膜蛋白具有良好的免疫原性, 可激发机

体的体液免疫, 并可引发细胞免疫^[5-6], 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^[7-10]。蒋蔚等表达纯化了嗜水气单胞菌外膜蛋白 A (OmpA), 经此蛋白免疫后的兔血清可与 9 株不同血清型的嗜水气单胞菌起反应, 说明该外膜蛋白具有很好的免疫原性, 并可能是嗜水气单胞菌的共同保护抗原^[11]。已有研究表明基因工程表达的 Omp 具有良好的免疫原性。Khushiramani 等在大肠杆菌中表达了 OmpTS 蛋白, 免疫印度鲤可使鲤产生抗外膜蛋白 OmpTS 的高效抗体^[12]。胡春霞等采用原核表达系统获得嗜水气单胞菌重组外膜蛋白 OmpA, Western blot 分析显示该重组蛋白可与抗体结合, 说明其抗原结合位点没有改变, 口服该重组蛋白可使小鼠产生一定的免疫保护作用^[13]。Ni 等从嗜水气单胞菌 J-1 菌株中克隆表达并纯化 Omp38, 免疫兔子获得高效价抗体, 该抗体能识别包括 J-1 菌株在内的多株不同血清型的嗜水气单胞菌^[14]。

外膜蛋白 W (OmpW)为一类微孔蛋白, 属于小外膜蛋白家族(Family of small outer membrane protein)^[15], 由 200–230 个氨基酸组成, 可形成由 8 个 β 折叠组成的桶状通道结构、协助疏水性分子通过细菌外膜^[16]。OmpW 广泛存在于革兰氏阴性菌, 如弧

菌 *Vibrio* spp., 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 沙门氏菌 *Salmonella Typhimurium*, 气单胞菌 *Aeromonas* spp. 等^[17]。关于弧菌的 OmpW 已有较多研究, OmpW 基因存在于所有已知弧菌中, 具有很好的免疫原性且较为保守, 推断其具交叉免疫保护作用^[18-19]。关于嗜水气单胞菌 OmpW 的研究尚不多见, Maiti 等 (2009)首次克隆了嗜水气单胞菌 OmpW 基因, 证实 OmpW 分布于大部分气单胞菌中且序列相对保守, 认为该基因可用于气单胞菌的鉴定^[17]。

草鱼出血病至今仍是广东养殖草鱼的主要病害之一。本课题组从广东患出血病的草鱼体上分离到一株致病菌 Wp3 菌株, 经生理生化鉴定与 16S rRNA 和促旋酶 B 亚单位基因鉴定为嗜水气单胞菌^[20]。本研究克隆了该菌株的 OmpW 基因, 制备重组蛋白并进行免疫效果评价, 为草鱼嗜水气单胞菌基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、宿主菌和质粒载体

嗜水气单胞菌强毒株 Wp3 菌株为本实验室分离、鉴定与保存^[20]。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 M15 宿主菌由本实验室保藏; 表达用质粒为 pQE30, 克隆用质粒 pDM-18T 购自 TaKaRa 公司。

1.2 酶和试剂

质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; Trizol reagent 和 Novagen His Bind 蛋白纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司; ReverTra Ace- α -® Kit 购自 TOYOBO; EX-Taq DNA polymerase 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; Power SYBR Green Master Mix 购自 Applied Biosystem 公司; PCR 产物清洁试剂盒购自 V-gene 公司; T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品; RNase Free DNase I 购自 Promega 公司; 硝酸纤维素膜、鼠抗 His 单抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗草鱼血清为本实验室制备与保存; 琼脂糖、DNA 分子 Marker、蛋白分子 Marker 和弗氏不完全佐剂 (FIA) Sigma F-5506 购自广州威佳生物有限公司, 其它试剂为国产分析纯试剂。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 上已登录的嗜水气单胞菌基因组全序列 (NC_008570)^[21], 利用 Primer 5.0 软件设计引物 P1、P2 以扩增 OmpW 基因的全序列。根据扩增到的 OmpW 基因全序列设计引物 P3 (带有 *Bam*H I 位点) 和 P4 (带有 *Hind* III 位点), 扩增成熟肽序列。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 OmpW 扩增与表达载体构建、qRT-PCR 检测 IgM 基因所用的引物

Table 1 Primers for cloning and expression of OmpW gene and qRT-PCR of IgM

Primer	Direction	Sequences (5'→3')	Size (bp)
P1	Fwd	TAACCTCCGATTACATCC	865
P2	Rev	TAGACACTATCGGCACAAAGG	
P3	Fwd	TATGGATCCACCAGGCTGGTG ATATTC	571
P4	Rev	TACTGTAAGCTTTCAGAAAGCGA TAGCCGAC	
GCI-F	Fwd	ATCATCTCCAGAGAGTCCAGGG	176
GCI-R	Rev	GGCAACVACRTATTGGAGTAG TC	
EF1 α -F	Fwd	AAAATTGGCGGTATTGGAAC	274
EF1 α -R	Rev	TGATGACCTGGGCAGTGAA	

注: 下划线为酶切位点。

Note: Underlined nucleotides are restriction enzyme digestion sites.

1.4 OmpW 基因的克隆与序列分析

嗜水气单胞菌 Wp3 菌株接种于普通 LB 培养基中, 28 °C 培养 18 h。取 1 mL 菌液提取基因组 DNA, 具体操作参照试剂盒推荐的方法, 提取的基因组 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C 保存备用。

以 Wp3 菌株的基因组 DNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。反应条件为: 95 °C 7 min, 加入 Ex-Taq 酶; 94 °C 1 min, 65 °C 45 s, 72 °C 2 min, 34 个循环; 72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收。回收产物连接于质粒 pMD18-T 并转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (Amp^r) 的 LB 平板上, 37 °C 培养 12-16 h。挑取单个菌落接种于含 Amp^r 的 LB 液体培养基中,

37 °C、200 r/min 振荡过夜, 取 2 μ L 菌液进行 PCR 鉴定, 阳性克隆送上海生工生物技术有限公司测序。质粒命名为 pT-OmpW。

利用软件 VectorNTI 6.0 及生物信息网站 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、ExPASy (<http://www.expasy.org/>)、SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)、DNASTAR 进行全长序列拼接、ORF 框确定、编码氨基酸序列推导、抗原性预测等。氨基酸序列提交 3D-JIGSAW 服务器 (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>), 转换成 pdb 文本后应用 Swiss-PdbViewer 软件和 RasMol 软件, 分析蛋白高级结构。

1.5 重组质粒 pQE30-W 的构建

提取 pT-OmpW 质粒。以该质粒作为模板, P3、P4 为引物进行 PCR 扩增。反应条件同上。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。回收纯化 PCR 产物, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切并纯化, pQE30 也经同样双酶切和纯化。把 pQE30 与目的片段的酶切纯化产物用 T4 连接酶体系连接, 转化 M15 菌株感受态细胞, 涂布于含 Amp^r 的 LB 平板上, 37 °C 培养 12–16 h。挑取单个菌落接种于含 Amp^r 和 Kan^r 的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡过夜, PCR 鉴定, 测序确认插入正确。

1.6 融合蛋白 His-W 的诱导表达、纯化与检测

将含重组质粒 pQE-W 的 M15 菌株接种于 3 mL LB 液体培养基中培养 12 h, 再以 1:100 转接于液体培养基中, 待菌液 OD 值达 0.6–0.8 时加入终浓度为 0.1 mol/L 的 IPTG, 诱导 4 h。6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 PBS 洗涤 1 次, 用 PBS 重悬并加入 0.2% 的 TritonX-100, 反复冻融 3 次, 将待破碎的细胞溶液放在冰上, 进行超声波破碎 (Time: 20 min; pulse on, 8 s; pulse off, 8 s; Amplitude, 75%)。破碎后收集沉淀, 含有包涵体的沉淀经过洗涤液一 (50 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 均为 8.0) 和洗涤液二 (50 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 2 mol/L Urea, pH 8.0) 分别洗涤 2 次, 用变性液重悬沉淀。37 °C、200 r/min 快摇 1 h, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃掉沉淀。上清液用复性液 (0.1 mol/L Tris pH 8.0, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Cysteine) 透析 2 次, 每次

16 h。复性后的融合蛋白用 Novagen His Bind 纯化试剂盒纯化和浓缩。

纯化后的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后以半干转移法转到 0.45 μ m 的硝酸纤维素薄膜上, 转移电压 10 V, 25 min。将此硝酸纤维薄膜用封闭液封闭 1.5 h 后, 先后以兔抗 His IgG (1:2 000 稀释) 和带 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:2 000 稀释) 在室温中各孵育 1 h, 最后用 DAB 显色试剂盒显色。

1.7 融合蛋白 His-W 的免疫与攻毒实验

以体重 25–30 g 的草鱼为免疫对象, 在水泥池中暂养一周后进行免疫试验。实验期间水温维持在 28 °C–30 °C, 持续充气。实验开始前取 5 尾鱼的血清作阴性对照。实验组分 4 组, 注射剂量 (蛋白量/鱼的体重) 分别为 2、4、8 μ g/g 和空白组, 每组 20 尾, 除空白组外每组均设重复组。用 PBS 稀释融合蛋白至所需浓度, 与等体积的弗氏不完全佐剂完全混匀, 腹腔注射 0.2 mL/尾。免疫 2 周后, 再用相同的蛋白剂量加强免疫 1 次。分别从免疫 2 周和加强免疫 2 周后的每组鱼中取 3 尾鱼的血清。

加强免疫 2 周后, 根据预实验结果采用半致死浓度进行攻毒。攻毒的菌液浓度为 6×10^7 CFU/mL, 每尾注射 0.1 mL。观察 2 周, 每日记录发病与死亡鱼的数量, 统计死亡率。计算免疫保护率 (Relative percent survival, RPS) 的公式如下^[22]:

$$RPS = 1 - \frac{\text{免疫组死亡数}}{\text{空白组死亡数}}。$$

1.8 ELISA 测定抗体效价

按刘玉斌的 ELISA 检测方法进行^[23], 简述如下: 先将 His-W 以 15 mg/L 的浓度包被于酶标板上, 4 °C 过夜; 过夜后的酶标板用洗涤液洗涤 3 次, 加入脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, 洗涤液洗涤 3 次, 加入免疫组鱼血清 (1:200 倍稀释), 37 °C 孵育 1 h, 洗涤液洗涤 5 次彻底除去未结合物质; 再加入兔抗草鱼血清 (1:10 000 倍稀释), 按照上一步骤的条件孵育后洗涤液洗涤 3 次; 最后加入带 HRP 的羊抗兔 IgG (1:32 000 倍稀释) 于酶标孔中, 按上述条件进行孵育和洗涤。用 TMB 显色液显色 20 min 后, 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止显色并立即在酶标仪 (Multiskan Ascent 公司) 中读取 OD 值。设置空白对照, 最后按照 γ 的

大小判定结果($\gamma \geq 2.1$ 即为阳性)^[23]。

$$\gamma = \frac{\text{免疫组标本 OD 值}}{\text{空白组标本 OD 值}}$$

1.9 实时荧光定量 PCR 检测草鱼 IgM mRNA

根据草鱼 IgM 基因的 ORF 框序列,设计引物 GCI-F 和 GCI-R 扩增草鱼 IgM 基因。以 EF1 α 作为内参基因,其扩增引物为 EF1 α -F 和 EF1 α -R^[24](序列见表 1)。以各组的 cDNA 为模板,分别用这两对引物在普通 PCR 仪(Bio-Rad)上扩增。PCR 产物分别经 2% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收目的片段,并连接到 pMD-18T 中,测序。提取质粒 DNA,用紫外分光光度计检测浓度后质粒以 10 倍倍比稀释(10^{-3} – 10^{-10} pmol/L)。所获的含 IgM 或 EF1 α 基因的重组 T 载体分别命名为 pT-IgM 或 pT-EF1 α 。Trizol 试剂提取免疫草鱼及对照鱼的头肾组织总 RNA,反转录成 cDNA。

实时荧光定量 PCR 用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒在 ABI7300 荧光定量 PCR 仪上进行。20 μ L PCR 反应体系包含:模板 cDNA 1 μ L, Power SYBR Green Master Mix 10 μ L, 引物 GCI-F、GCI-R 或 EF1 α -F、EF1 α -R 各 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。扩增条件为:55 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。荧光读板温度为 72 $^{\circ}$ C。PCR 结束后分析溶解曲线,以确保特异性扩增。每个样品重复 3 次,每对引物设置阴性对照。同时为评估每对引物的扩增效率,分别以 10 倍倍比稀释的 pT-IgM 或 pT-EF1 α 质粒(2 – 2×10^{-5} ng)为模板绘制标准曲线。所有标准曲线的相关系数 R^2 均大于 0.99,并且对应的 PCR 扩增效率均在 90%–100% 之间。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[25]比较 Ct 值,计算免疫组草鱼头肾 IgM mRNA 相对于空白组的表达量,结果用平均值 \pm 标准差表示。用 SPSS 15.0 软件对不同组间的基因表达变化进行单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时判定为差异性显著。

2 结果与分析

2.1 OmpW 基因的克隆、序列与高级结构预测

PCR 扩增获得的 OmpW 基因全长 865 bp, 序列已登录 GenBank (Accession No. HM114316)。BLAST

显示所得序列与 GenBank 上的嗜水气单胞菌 ATCC7966 菌株(NC_008570)的 OmpW 的同源性为 99.8%, 与肺炎克氏杆菌(*Klebsiella Pneumoniae*, AP006725)、柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*, CP000822)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, GQ433372)等的 OmpW 基因的同源性在 71%–81% 间。OmpW 基因的 ORF 为 615 bp。信号肽预测其编码序列的前 21 个氨基酸残基构成一明显疏水区,具信号肽的共同特征。OmpW 成熟肽为 184 个氨基酸,分子量约为 23.31 kD。DNASTAR 预测显示成熟肽氨基酸有 13 个区域可形成抗原表位。

将所得的成熟肽序列提交到 3D-JIGSAW 服务器预测高级结构,结果显示 OmpW 蛋白质分子由 8 个 β 折叠组成一个具有疏水性作用的结构(图 1)。

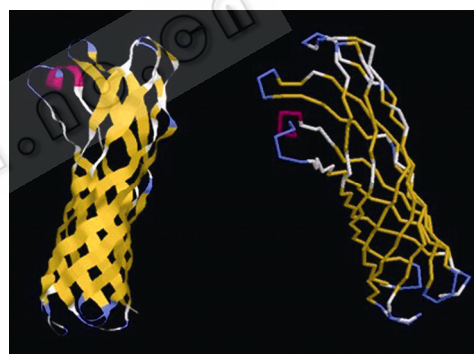


图1 应用 3D-JIGSAW 程序建立的嗜水气单胞菌 OmpW 的结构模型

Fig. 1 OmpW 3-D structure of *A. hydrophila* constructed by 3D-JIGSAW program

注: 红色: α -螺旋; 黄色: β -折叠; 蓝色: 转角; 白色线条: 其它残基。

Note: Magenta: Alpha helices; Yellow: Beta sheets; Pale blue: Turns; White: Other amino acid residues.

2.2 重组表达载体的构建、表达纯化与检测

以重组质粒 pT-OmpW 为模板,引物 P3、P4 扩增获得的片段与 pQE30 分别经双酶切后连接并转化 M15, 筛选重组表达载体 pQE-W。携带此表达载体的基因工程菌经 IPTG 诱导表达,获得分子量约为 25 kD 的蛋白条带(图 2A),与预期分子量相符。未经诱导的基因工程菌株和转化 pQE30 空质粒的 M15 菌株则均未出现相应条带。超声波破碎诱导表达后的细菌,检测显示目标蛋白仅存在于沉淀物中,在

上清中未检测到,表明融合蛋白主要以包涵体形式表达。融合蛋白包涵体经过反复洗涤,变性溶解、复性并经镍柱纯化,获得单一蛋白条带(图 2B)。纯化蛋白经过 Western blot 分析,在分子量约 25 kD 处出现了特异性杂交条带,与预期的重组蛋白 His-W 分子量大小相符(图 2C)。

2.3 融合蛋白 His-W 对草鱼的免疫保护作用

用 3 种不同剂量的 His-W 免疫草鱼,首次免疫 14 d 后加强免疫 1 次。加强免疫后 14 d,用嗜水气

单胞菌强毒株 WP3 进行腹腔注射攻毒,各免疫组均显示具有免疫保护力(64.0%–78.5%)。攻毒后鱼的存活情况见表 2。

2.4 ELISA 检测草鱼血清抗体

应用间接 ELISA 方法检测草鱼血清。各免疫组与空白组的 OD 值比值均大于 2.1,可判定免疫组均呈阳性,即血清产生了高效抗体。各免疫组加强免疫 2 周后的血清效价均高于第 1 次免疫后 2 周的血清效价,免疫组 2 μg/g 的效价最高(表 3)。

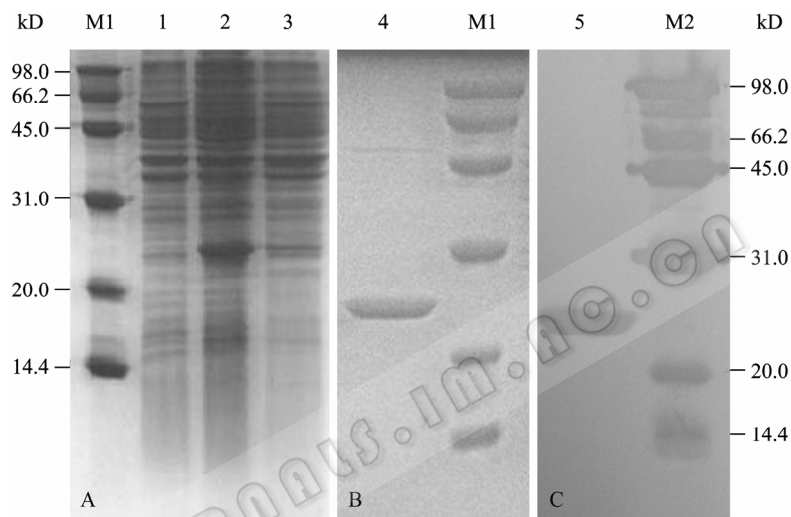


图 2 融合蛋白 His-W 的表达、纯化与免疫原性分析

Fig. 2 Expression, purification of the recombinant protein His-W and its immunogenicity analysis

注: A, B: 诱导产物与纯化产物的 SDS-PAGE 分析; C: 融合蛋白 Western blot 分析. M1: 蛋白 Marker; 1, 2: 未诱导与诱导的基因工程菌; 3: 诱导的空载; 4: 纯化后的融合蛋白; 5: 杂交条带; M2: His 标签 Marker.

Note: A, B: SDS-PAGE analysis of the induced protein and purified protein; C: Western blot of the recombinant protein. M1: Protein marker; 1, 2: Non-induced and induced engineering strain; 3: Strain transformed with control vector induced; 4: Purified recombinant protein; 5: Hybridized band; M2: His-tagged marker.

表 2 重组 OpmW 免疫的草鱼攻毒后的存活率				
Table 2 Survival rate of grass carp immunized with His-W followed by <i>A. hydrophila</i> challenged				
免疫原/体重 Immunogen/ body weight (μg/g)	攻毒鱼尾数 No. challenged	存活尾数 No. survival	存活率 Survival rate (%)	免疫保护力 RPS (%)
2	20	18	90	86
	20	16	80	71
4	20	14	70	57
	20	16	80	71
8	20	17	85	79
	20	15	75	64
空白组 Control group	20	6	30	

表 3 草鱼血清间接 Elisa 抗体检测结果
Table 3 Elisa detection of antibody level of the immunized grass carp

样品 Sample	2 μg/g	4 μg/g	8 μg/g	空白组 Control group
一免后 2 周 OD_{450} The OD_{450} in two weeks after first immunity	0.501±0.008	0.520±0.009	0.998±0.011	0
二免后 2 周 OD_{450} The OD_{450} in two weeks after enhanced immunity	1.450±0.005	0.831±0.006	1.231±0.004	0.101±0.003

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 IgM mRNA 水平

采用荧光定量 PCR 方法检测草鱼头肾 IgM 的转录, 结果显示加强免疫 2 周后 3 个不同浓度免疫组 (2、4 和 8 μg/g) 的 IgM mRNA 水平均高于对照组, 相对表达量(免疫组/对照组)分别为 10.6、7.8 和 8.9 (图 3)。用 SPSS 15.0 软件对免疫组与对照组间的基因表达变化进行单因素方差分析, 显示免疫组 2 μg/g 与空白组存在显著性差异($P<0.05$)。

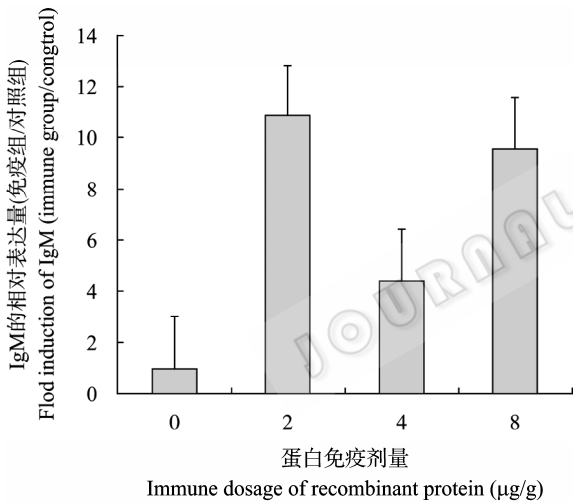


图 3 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算草鱼免疫组 IgM 的相对表达量

Fig. 3 The relative level of IgM of the immunized grass carp calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method

3 讨论

OmpW 广泛存在于革兰氏阴性菌中, 研究显示, 弧菌的 OmpW 具有很好的免疫原性和保守性, 推断其具有交叉免疫保护作用^[18-19]。但嗜水气单胞菌 OmpW 的研究尚不多见。Maiti (2009) 等从鲢鱼病灶处分离了一株嗜水气单胞菌, 设计了一对特异性引物首次克隆了该菌的 OmpW 基因, 并用于扩增气单胞菌属内的 42 种不同菌, 结果显示除了一种菌

(*A. veronii* biovar *veronii*, VTE338) 外, 其余的均能扩增出特异性条带。Western blot 显示利用重组融合蛋白 OmpW 制备的抗体能与此 42 种菌产生免疫印迹反应, 说明 OmpW 可能是气单胞菌属的共同保护性抗原^[17]。

本研究克隆了嗜水气单胞菌 Wp3 菌株的 OmpW 基因。蛋白高级结构预测该蛋白质分子具有由 8 个 β 折叠组成的一个具有疏水性作用的结构, 与大肠杆菌 OmpW 的结构相似, 这种结构可能有利于在平面脂双层之间形成一个离子通道、穿越整个细菌外膜, 协助小疏水分子的运输^[16]。用 DNASTAR 预测该蛋白的抗原性, 综合亲水性、表面可及性以及抗原指数 3 项指标, 根据有关指数与表位形成的关系, 即当亲水性 >0 , 抗原指数 >0 , 表面可及性 >1 时, 形成表位的可能性较大^[26-29], 可推测 Wp3 菌株的 OmpW 成熟肽氨基酸有 13 个区域可形成抗原表位, 说明该蛋白应具有较强的免疫原性。

本研究采用原核表达获得重组融合蛋白 His-W。ELISA 分析显示经该重组蛋白免疫后的草鱼血清与 His-W 反应均呈阳性, 说明该重组蛋白具有较强的免疫原性, 其中以 2 μg/g 剂量免疫的草鱼抗体水平最高。IgM 为一类免疫球蛋白, 占免疫球蛋白总量的 5%–10%, 有很强的抗原结合能力, 是初次体液免疫应答中最早出现的抗体, 在机体的早期防御中起着重要作用, 其转录水平是评价脊椎动物体液免疫系统产生特异性免疫的有效指标^[30-32]。多数观点认为 IgM 是真骨鱼类所具有的唯一的一种免疫球蛋白。草鱼 IgM 主要在头肾、中肾和脾脏中表达^[33]。本研究用 qRT-PCR 方法检测草鱼 IgM mRNA, 结果显示各免疫组 IgM mRNA 的水平均比对照组的高, 且也以低剂量组的转录水平最高。

刘庆中等使用 50、100 和 200 μg 3 种剂量的重

组日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 免疫小鼠, 结果显示以 100 μg 抗原量免疫小鼠获得的保护率最好, 免疫保护性与免疫剂量有一定关系。抗体水平的检测显示 50 μg 剂量组的抗体水平没有 100 μg 和 200 μg 组的高, 说明抗体产生的量可能与抗原的量有关, 而达到一定量后增加抗原量产生的抗体水平将不再增加^[34]。本研究 3 种剂量的免疫保护率以及 IgM 基因的转录水平均以低剂量组(2 $\mu\text{g/g}$)为最高, 但剂量相关关系不明显。一般在适温条件下, 鱼接种抗原 7–10 d 后出现 Ig 产生细胞, 7–14 d 后血清中出现 Ig^[35]。本研究攻毒的时间与 IgM mRNA 测定的时间均在抗体产生的合适时间范围内, 实验结果说明, 2 $\mu\text{g/g}$ 的重组蛋白剂量已能有效上调 IgM 的转录、产生免疫保护作用。关于 His-W 的免疫剂量与免疫保护率间是否存在剂量依赖关系, 以及最适的免疫剂量, 尚待下一步采用更大的样本量以及更宽的免疫剂量范围加以确证。

参 考 文 献

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282–288.
- [2] Guinée PA, Jansen WH. Serotyping of *Aeromonas* species using passive haemagglutination[J]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1987, 265(3/4): 305–313.
- [3] Sakazaki R, Shimada T. O-Serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains[J]. Jpn J Med Sci Biol, 1984, 37(5/6): 247–255.
- [4] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 460–464.
- [5] Matsui K, Arai T. Protective immunity induced by porin in experimental mouse salmonellosis[J]. Microbiol Immunol, 1989, 33(9): 699–708.
- [6] 董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3): 285–290.
- [7] Vázquez-Juárez RC, Romero MJ, Ascencio F. Adhesive properties of a LamB-like outer-membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion[J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(4): 700–708.
- [8] Ebanks RO, Goguen M, McKinnon S, et al. Identification of the major outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida*[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 68(1): 29–38.
- [9] Khushiramani R, Girisha SK, Bhowmick PP, et al. Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas* species[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(10): 2263–2268.
- [10] 鱼艳荣, 刘希成, 张彦明, 等. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展[J]. 动物医学进展, 2000, 21(2): 35–39.
- [11] 蒋蔚, 刘永杰, 陆承平. 嗜水气单胞菌 J-1 株 OmpA 融合蛋白的高效表达及免疫原性分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 301–306.
- [12] Khushiramani R, Girisha SK, Karunasagar I, et al. Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish[J]. Protein Expr Purif, 2007, 51(2): 303–307.
- [13] 胡春霞, 李梅, 李卫芬, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 (OMP) 的原核表达及其对 BALB/c 小鼠的免疫保护研究[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 218–224.
- [14] Ni XD, Wang N, Liu YJ, et al. Immunoproteomics of extracellular proteins of the *Aeromonas hydrophila* China vaccine strain J-1 reveal a highly immunoreactive outer membrane protein[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 58(3): 363–373.
- [15] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(4): 593–656.
- [16] Hong H, Patel DR, Tamm LK, et al. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel[J]. J Biol Chem, 2006, 281(11): 7568–7577.
- [17] Maiti B, Raghunath P, Karunasagar I, et al. Cloning and expression of an outer membrane protein OmpW of *Aeromonas hydrophila* and study of its distribution in *Aeromonas* spp.[J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(4): 1157–1167.
- [18] Jalajakumari MB, Manning PA. Nucleotide sequence of the gene, *ompW*, encoding a 22 kDa immunogenic outer membrane protein of *Vibrio cholerae*[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(8): 2180.
- [19] Das M, Chopra AK, Cantu JM, et al. Antisera to selected outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* protect against challenge with homologous and heterologous strains of *V. cholerae*[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998, 22(4): 303–308.
- [20] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1170–1177.
- [21] Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, et al. Genome se-

- quence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades[J]. J Bacteriol, 2006, 188(23): 8272–8282.
- [22] Simon B, Nomellini J, Chiou P, et al. Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials[J]. Dis Aquat Organ, 2001, 44(1): 17–27.
- [23] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989: 150–163.
- [24] Ye X, Zhang LL, Tian YY, et al. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(5): 501–509.
- [25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [26] 韩婷, 高金燕, 李欣, 等. 牛乳 β -乳球蛋白过敏原线性表位串联体的分子设计[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 465–468.
- [27] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. J Mol Biol, 1982, 157(1): 105–132.
- [28] Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by A virus- specific synthetic peptide[J]. J Virol, 1985, 55(3): 836–839.
- [29] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181–186.
- [30] Flajnik MF. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(9): 688–698.
- [31] Xu Z, Wang GL, Nie P. IgM, IgD and IgY and their expression pattern in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. Mol Immunol, 2009, 46(10): 2124–2132.
- [32] Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. J Fish Dis, 2004, 27(7): 409–417.
- [33] 王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先, 等. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 13–20.
- [34] 刘庆中, 胡元生, 沈继龙, 等. 重组日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 不同剂量对免疫保护性的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(4): 248–252.
- [35] 王长法, 安利国, 杨桂文, 等. 鱼类免疫球蛋白研究进展[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 105–107.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。