



网络出版日期:2021-03-18

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2021.03.002

网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20210317.1353.016.html>

鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 的原核表达、免疫保护及抗血浆杀菌作用研究

荣 娜,简思杰,孙 薇,康 超,伍娜娜,刘 祥

(陕西理工大学 生物科学与工程学院,中德天然产物研究所,陕西汉中 723001)

摘要 研究鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 的免疫学功能,为相关疫苗开发奠定理论基础。采用生物信息学方法分析 P5 的理化性质;分子克隆构建 P5 表达菌株并确定其最佳诱导表达条件,包涵体洗涤和 SDS-PAGE 电泳切胶纯化 P5 蛋白,并免疫小鼠制备 P5 抗血清;Western blotting 检测抗血清特异性与效价,免疫酶联法模拟 P5 抗血清对嗜水气单胞菌的体外识别;P5 抗血清被动免疫红鲫,攻毒以评价 P5 蛋白的免疫保护功能;Western blotting 分析 P5 蛋白抵抗鱼血浆的杀菌作用。结果表明:P5 蛋白在气单胞菌属间同源性较好,进化保守。成功克隆表达、纯化 P5 蛋白,其最佳表达条件为:诱导时菌液浓度 OD₆₀₀ = 1.0, IPTG 浓度 0.5 mmol/L,32 ℃诱导 8 h。Western blotting 验证 P5 抗血清特异性较好,效价达到 1:1 600,ELISA 显示 P5 抗血清与嗜水气单胞菌存在识别作用,表明 P5 蛋白具有较好的免疫原性与抗原性。被动免疫显示 P5 抗血清对红鲫的免疫保护率为显著性的 56%,具有良好的免疫保护作用。Western blotting 发现 P5 蛋白可通过表达下调有效抵抗鱼血浆的杀菌作用,表明其可能与细菌抗血浆杀菌有关。综上,嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 是一种保护性抗原,有望作为防治嗜水气单胞菌感染的疫苗候选成分。

关键词 嗜水气单胞菌;外膜蛋白 P5;多克隆抗血清;血浆杀菌作用;被动免疫

中图分类号 Q71

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2021)03-0333-10

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于弧菌科气单胞菌属,是一种在水生环境中广泛存在的条件致病菌,可诱发水生动物局部出血和败血症,给水产养殖业带来巨大的收入损失^[1-2]。对于该菌的防治,传统上主要采用抗生素药物,但长期使用会导致菌株抗药、机体抗生素残留和水体污染等问题^[3]。疫苗免疫安全性高、无毒害,但目前普遍应用于水产养殖的灭活疫苗存在免疫效果欠佳和二次感染的风险^[4-5],因此有必要研制有效防治嗜水气单胞菌的新型疫苗。亚单位疫苗是一种以纯化的蛋白、核酸或多糖等免疫活性片段作为组分的新型疫苗,具有安全稳定且免疫持久等优点^[6-7],受到广泛关注。

外膜蛋白 (Outer membrane protein, OMP) 是细菌外膜的主要构成部分,在维持细菌结构完整性和物质转运等方面有着重要作用^[8-9]。此外,外膜蛋白具有高度的免疫原性,是一种潜在的保

护性抗原^[10]。P5 蛋白是革兰氏阴性细菌的一个主要外膜蛋白,也是 OmpA 蛋白的超家族成员,参与了细菌在体内的定植^[11]。有研究表明,P5 蛋白免疫原性较强,可激发机体体液免疫产生保护性抗体,是参与机体免疫应答的早期抗原^[12]。谢乐新等^[13]将副猪嗜血杆菌外膜蛋白 P5 分段表达,发现表达的 3 个蛋白均表现出良好的免疫原性和抗原性。王海峰等^[14]研究显示,P5 免疫动物后能诱导产生高水平特异性抗体,并可显著保护豚鼠抵抗副猪嗜血杆菌感染。P5 也是嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白,然而关于该蛋白的免疫功能研究尚未见报道。

基于以上现状,本研究选取嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 P5 为研究对象,原核表达纯化 P5 蛋白并确定其最佳诱导表达条件;将纯化的 P5 蛋白免疫小鼠制备 P5 多克隆抗血清,探究 P5 抗血清对红鲫鱼的免疫保护效果;体外评价 P5 蛋白

收稿日期:2020-07-12 修回日期:2020-09-28

基金项目:国家外国专家局项目(GDT20186100426);陕西省科技厅重点研发计划项目(2020LSFP2-38);陕西理工大学人才项目(SLGQD1803)。

第一作者:荣 娜,女,硕士研究生,研究方向为蛋白质组学与免疫学。E-mail:rongna0628@163.com

通信作者:刘 祥,男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为蛋白质组学与免疫学。E-mail:liuxiang888525@163.com

抵抗鱼血浆杀菌的作用,结合 P5 蛋白的生物信息学分析,以期为嗜水气单胞菌蛋白亚单位疫苗的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及供试动物 嗜水气单胞菌 ATCC 7966、*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α 、BL21 菌株及 pET-32a 质粒由陕西理工大学中德天然产物研究所保存;4~5 周龄昆明鼠购自西安交通大学医学部,试验前饲养 3 d,每日定量喂食供水;红鲫鱼购自汉中水产市场,外表健康无病,平均体质量约 30 g,身长 15 cm 左右,试验前于养殖水箱饲养 1 周,每 3 d 换水 1 次,每次换掉 1/3,养鱼用水经除氯气处理,水温控制为(27±1) °C,每天早晚按照体质量 1% 投喂鲫鱼专用鱼粮(厦门华普水产有限公司),24 h 供氧。1 周后红鲫鱼呈健康状态,未出现任何感染症状。

1.1.2 主要试剂 rTaq 聚合酶、T₄-DNA 连接酶、内切酶 EcoR I 和 Hind III 购自 TaKaRa 公司;细菌基因组提取、质粒提取试剂盒购自上海生工公司;IPTG、TMB 显色液为西安赫特生物科技有限公司产品;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购于 Sigma 公司;引物合成、基因测序由天润奥科生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 NCBI 数据库获取不同血清型嗜水气单胞菌和不同种类气单胞菌的 P5 蛋白序列:嗜水气单胞菌 ATCC 7966 (GenBank: ABK37458. 1)、GYK1 (ABK37458. 1) 和 ML09-119 (AGM45792. 1), 达氏气单胞菌(登录号: WP_026142030. 1), 兽生气单胞菌 (WP_043554548. 1), 鲤鱼气单胞菌(WP_099994858. 1), 豚鼠气单胞菌 (WP_109111770. 1), 沙氏气单胞菌 (WP_131731585. 1)。通过 GeneDoc 软件绘制多重序列比对图,利用 MEGA 软件构建系统发育树;采用 ProParam 数据库预测 P5 的氨基酸数、分子质量大小、等电点、稳定指数等参数,并从 ProScale analysis 数据库中获取亲水性图谱;采用 TMHMM 2.0 和 Signal P 3.0 软件预测 P5 的跨膜区域和信号肽位置,并利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 软件分别进行二级结构和三维结构预测。最后使用 STRING 软件在线构建 P5 与其他蛋白的相互作用关系网络。

1.2.2 重组菌株的构建 根据 NCBI 数据库中嗜水气单胞菌 ATCC 7966 全基因组序列 (GenBank: CP000462. 1),设计引物扩增 P5 基因。F-P5: CAAGAATTCAATGAATAAAACACTG ATT; R-P5: CATAAGCTTCACTGCTGA-ACTTCCGA(划线部分分别为 EcoR I 和 Hind III 的酶切位点)。以全基因组为模板,利用 rTaq 聚合酶实现 P5 基因扩增,反应体系为 50 μL,退火温度设为 55 °C。扩增产物经核酸电泳鉴定并回收,EcoR I 和 Hind III 同时双酶切 PCR 产物与载体 pET-32a,在 T₄-DNA 连接酶作用下将 P5 基因导入质粒 pET-32a,转化 *E. coli* DH5 α 中,获得重组质粒。双酶切和基因测序进一步验证重组质粒,将构建成功的重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中,构建 P5 原核表达菌株。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化 挑取 P5 表达菌的单菌落过夜培养,以 1:100 转接培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,加入 0.1 mol/L 的 IPTG,摇床诱导 6 h,取 1 mL 菌液收集菌体,加入 300 μL 2×SDS 吹打混匀,高温变性蛋白 5 min,离心取上清 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳,检测 P5 的表达情况,结合包涵体洗涤和 SDS-PAGE 蛋白电泳,切胶法纯化 P5 蛋白^[15]。

1.2.4 重组蛋白表达条件的优化 以 L₉(3⁴) 模型(表 1)进行 P5 的最佳诱导表达条件研究。简要过程为:以 1:100 将过夜培养的 P5 饱和菌液转接至 600 mL 培养液中,37 °C、200 r/min 培养至设定的不同 OD₆₀₀ 值,按照不同试验组合要求加入不同终浓度的 IPTG,并在规定条件下诱导,每个组合进行 3 组重复。收取 1 mL 诱导菌液,沉淀加入 300 μL 2×SDS,高温变性蛋白 5 min,样品通过 SDS-PAGE 电泳获得不同诱导条件下 P5 蛋白的表达图谱。使用软件 Phoretix 1D 和 SPSS 13.0 分别进行表达图谱光密度和不同因子的显著性分析。

1.2.5 蛋白小鼠抗血清的制备及特异性检测 昆明鼠试验组和对照组各 15 只,试验组每只取纯化的 P5 蛋白 100 μg 混合 100 μL 弗氏完全佐剂,腹腔注射免疫小鼠。14 d 后,等量蛋白混合 100 μL 弗氏不完全佐剂,二次免疫小鼠。7 d 后,同二免,进行第三次免疫,对照组免疫 PBS。1 周后眼球取血,静置,待血清自然析出后于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min,收集抗血清于 -80 °C 保存,备用。Western blotting 验证 P5 抗血清特异性,

步骤简述如下:SDS-PAGE电泳嗜水气单胞菌全蛋白,恒压80 V转NC膜1 h,NC膜充分封闭2 h,然后与不同稀释倍数(1:400,1:800,1:1 600,1:3 200)的P5抗血清于37 °C轻摇孵

育40 min,对照为阴性抗血清。用TNT缓冲液冲洗3次,再与1:3 000倍稀释的二抗于37 °C轻摇孵育1 h,洗涤后通过DAB显色法确定P5抗血清的特异性。

表1 P5表达条件试验的因子与水平

Table 1 Factors and levels of P5 expression condition test

因子 Factor	代号 Code	水平 Level		
		1	2	3
加IPTG菌液OD ₆₀₀ 值 Strain OD ₆₀₀ value	A	0.5	0.8	1.0
IPTG终浓度/(mmol/L) Final IPTG concentration	B	0.1	0.3	0.5
诱导时间/h Inducing time	C	3	8	12
诱导温度/°C Inducing temperature	D	28	32	37

1.2.6 体外模拟蛋白抗血清与嗜水气单胞菌的相互作用 ELISA^[16]检测蛋白抗血清与嗜水气单胞菌的相互作用:培养嗜水气单胞菌至OD₆₀₀约1.0,菌体用 $\varphi=1\%$ 的甲醛生理盐水80 °C灭活,生理盐水调整菌液OD₆₀₀=0.2,分装为1 mL/管(菌量10⁸ CFU),小管菌分别与100 μL不同稀释倍数的蛋白抗血清(1:400,1:800,1:1 600,1:3 200,1:6 400)孵育90 min,对照为阴性血清,再与200 μL 1:3 000倍稀释的二抗孵育1 h,洗涤菌体并混合20 μL PBS至酶标板中,加入200 μL TMB显色液,避光显色10 min,加入终止液2 mol/L H₂SO₄50 μL,450 nm读数。

1.2.7 抗血清的被动免疫保护试验 红鲫鱼试验组和对照组各15尾,试验前已饲养1周,确定未感染嗜水气单胞菌。取嗜水气单胞菌甘油菌接种至600 mL的LB培养基中,28 °C培养至OD₆₀₀为1.0,菌体经生理盐水洗涤并调整OD₆₀₀至1.0(菌浓度10⁹ CFU/mL)。依据抗血清效价,取P5抗血清腹腔注射15尾红鲫鱼,每尾60 μL(对照注射生理盐水),2 h后,以嗜水气单胞菌对红鲫鱼的半数致死量(4×10⁹ CFU)感染试验鱼,观察并记录试验鱼的病变及死亡情况,当死亡数稳定时,统计试验组与对照组受试鱼的死亡率,并计算免疫保护率(RPS)。RPS=1-(试验组死亡率/对照组死亡率)×100%^[15]。

1.2.8 蛋白抵抗鱼血浆的杀菌作用 28 °C过夜培养嗜水气单胞菌,以1:100转接至100 mL新的培养液中,培养至OD₆₀₀为0.5,菌体用 $\varphi=0.85\%$ 的生理盐水洗涤并调整OD₆₀₀为1.0,收取7管1 mL菌液离心获取菌体,小管菌分别与600 μL不同稀释倍数的鱼血浆(未稀释血浆,

1:2,1:4,1:8,1:16,1:32)于28 °C、200 r/min孵育5 h,对照为生理盐水。孵育后菌体用生理盐水洗涤3次,SDS-PAGE分离全蛋白并转NC膜,NC膜充分封闭后依次与一抗、二抗孵育,通过DAB显色液进行显色。对比特异性条带的亮度,分析P5的差异表达以评价其抵抗鱼血浆的杀菌作用。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

2.1.1 P5同源性与系统发育分析 通过GeneDoc软件绘制不同菌株P5蛋白氨基酸序列比对图(图1),结果显示,不同血清型的嗜水气单胞菌以及气单胞菌属间的P5蛋白同源性均较好。利用MEGA软件构建系统发育树(图2),发现3种不同血清型嗜水气单胞菌的亲缘关系最为紧密,且不同气单胞菌间亲缘关系也较近。因此推测,P5蛋白免疫动物产生的抗体可能为不同种类的气单胞菌提供交叉免疫保护作用。

2.1.2 P5理化性质、结构与蛋白互作预测

ProtParam数据库分析显示:P5含有351个氨基酸,分子质量为36 830.20 u,等电点为4.65,半衰期大于10 h,不稳定指数为25.68,归类为稳定蛋白;亲水性图谱分析得出P5亲水性平均值为-0.178,属于亲水性蛋白(图3-A);跨膜结构预测图谱(图3-B)显示,全序列中预测到的跨膜区域可信度较低,该蛋白属于外膜蛋白;信号肽预测结果(图3-C)显示,P5的N端1~21位氨基酸组成了信号肽序列,21~22位氨基酸之间存在切割位点,可信度达0.9677;SOPMA软件的二级结构预测显示, α -螺旋占全序列24.1%,延伸链占23.6%,无规则卷曲占52.3%(图3-D);SWISS-

MODEL 软件的预测结果显示, P5 的三维结构为桶状(图 3-E);通过 STRING 数据库构建蛋白互

作网络,发现有 10 种蛋白可与 P5 相互作用,其中蛋白 rpsL 和 rplD 与 P5 作用关系最为紧密(图 3-F)。

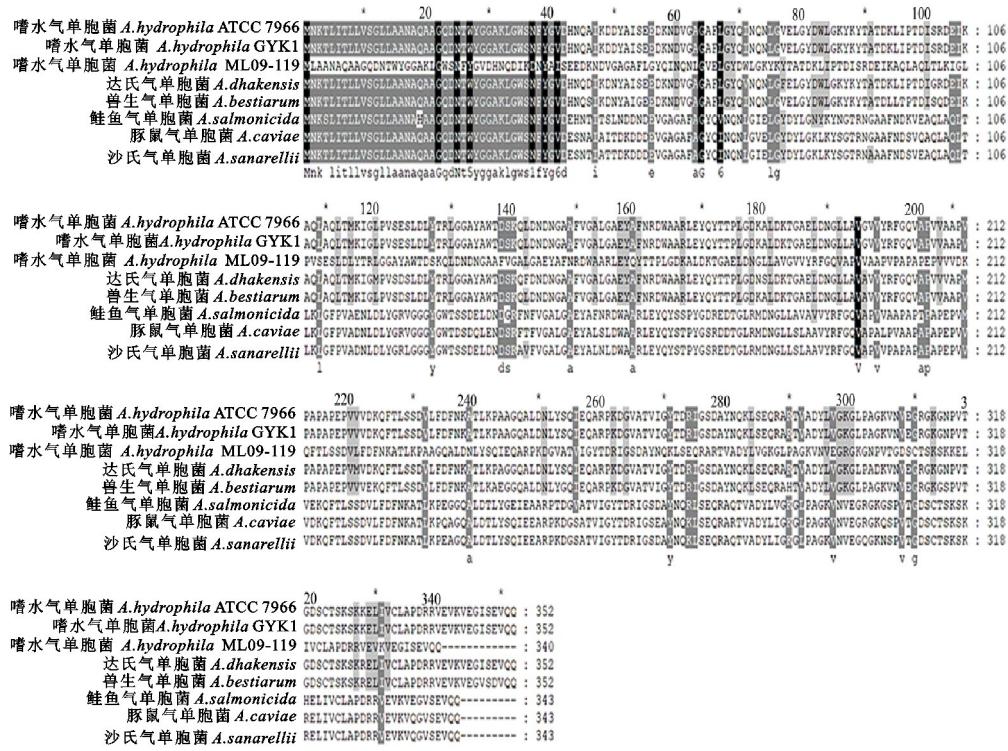


图 1 P5 氨基酸序列比对图

Fig. 1 Sequence alignment of amino acid of P5

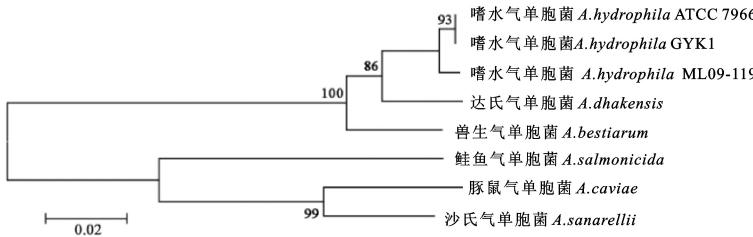


图 2 P5 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of P5

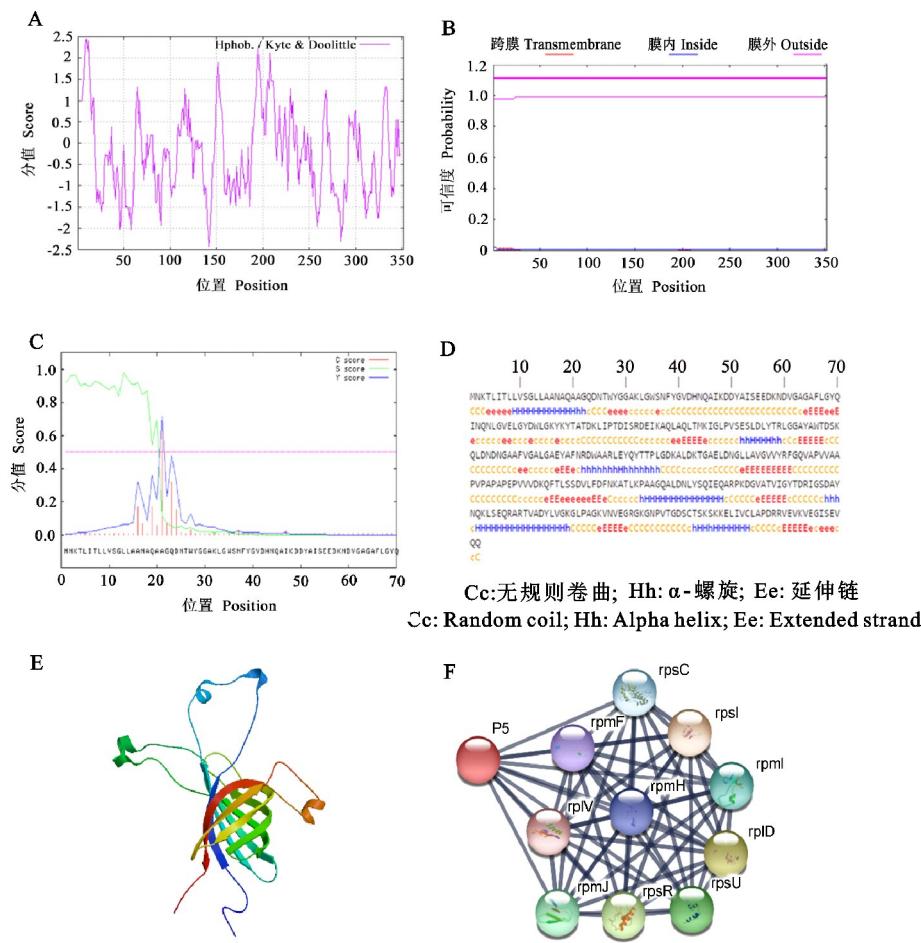
2.2 P5 重组质粒的构建及蛋白表达纯化

利用引物 F-P5、R-P5 扩增 P5 基因,电泳显示在约 1 000 bp 处存在单一条带(图 4-A),大小与理论值 1 059 bp 相符。重组质粒 pET-32a-P5 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切,得到一条约 1 000 bp 的条带,大小符合预期(图 4-B)。目的基因经测序比对,显示与 NCBI 数据库所公布的 P5 基因序列一致,表明成功构建重组质粒。重组质粒转化至 *E. coli* BL21 获得 P5 表达菌,经 IPTG 诱导后,电泳显示目标蛋白成功表达,分子质量大小约 59 ku;利用包涵体洗涤和 SDS-PAGE 电泳切

胶法纯化获得 P5 蛋白(图 4-C)。

2.3 P5 蛋白表达条件的优化

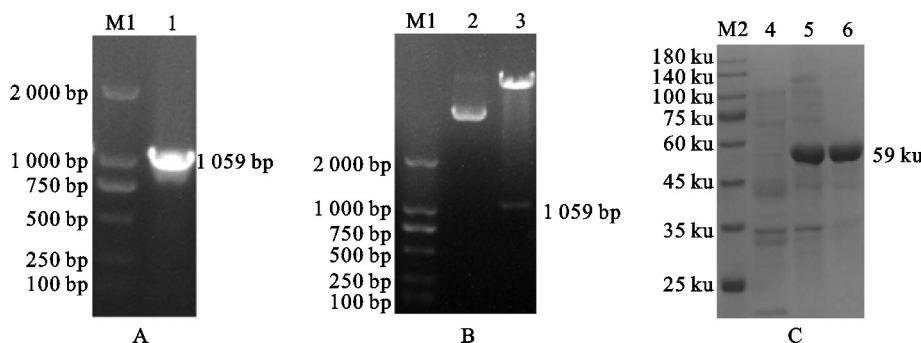
诱导菌经 SDS-PAGE 电泳获得不同诱导条件下 P5 的表达图谱(图 5),图谱光密度值如表 2 所示,所得数据极差和方差分析如表 3 和表 4 所示。从表 3 可得出,在诱导 P5 菌株表达时,最佳条件组合为 A3B3C2D2,即在菌液 OD₆₀₀ 为 1.0 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,32 °C 诱导 8 h。表 4 分析结果显示,加诱导剂时菌液 OD₆₀₀ 值达到显著性,由此可得诱导时菌液浓度对于 P5 蛋白的高效表达尤为重要。



A. 亲水性预测；B. 跨膜结构预测；C. 信号肽预测；D. 二级结构预测；E. 三级结构预测；F. 蛋白互作网络
A. Hydrophilic prediction; B. Transmembrane structure prediction; C. Signal peptide prediction; D. Secondary structure prediction;
E. Tertiary structure prediction; F. Protein-protein interaction network

图 3 P5 理化性质、结构与蛋白互作预测

Fig. 3 Physicochemical properties, structure and protein interaction prediction of P5

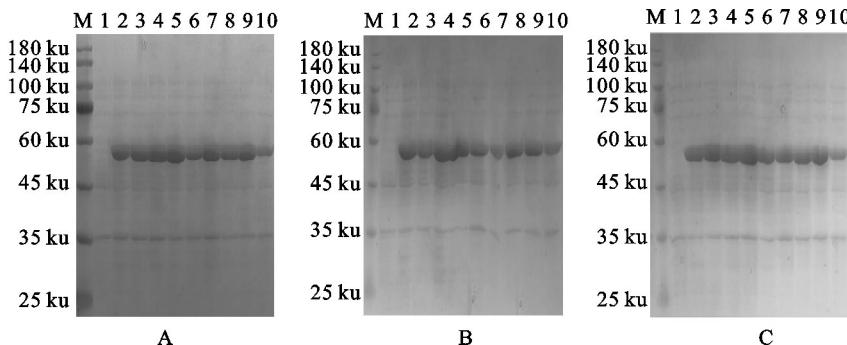


A. PCR 扩增 *P5* 基因；B. 重组质粒 pET-32a-*P5* 的双酶切；C. *P5* 蛋白的表达纯化；M1. DNA marker；M2. 蛋白 Marker；1. *P5* 基因；2. 重组质粒 pET-32a-*P5*；3. *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切；4. 未诱导菌株；5. 诱导菌株；6. 纯化的 *P5* 蛋白

A. Amplification of *P5* gene by PCR; B. Double digestion of recombinant plasmid pET-32a-*P5*; C. Expression and purification of *P5*;
M1. DNA marker; M2. Protein marker; 1. *P5* gene; 2. Recombinant plasmid pET-32a-*P5*; 3. Double digestion by *Eco*R I and
Hind III; 4. Uninduced strain; 5. Induced strain; 6. Purified *P5* protein

图 4 P5 重组质粒的构建及蛋白纯化检测

Fig. 4 Construction of recombinant plasmid and protein purification of P5



A、B、C 为 3 重复; M. 蛋白 marker; 1. 未诱导菌株; 2~4. OD₆₀₀ 值为 1.0, 诱导温度分别为 28, 37, 32 °C; 5~7. OD₆₀₀ 值为 0.8, 诱导温度分别为 28, 32, 37 °C; 8~10. OD₆₀₀ 值为 0.5, 诱导温度分别为 37, 32, 28 °C

A, B, C are three repetitions; M. Protein marker; 1. Uninduced strain; 2~4. OD₆₀₀ is 1.0, inducing temperature is 28, 37, 32 °C respectively; 5~7. OD₆₀₀ is 0.8, inducing temperature is 28, 32, 37 °C respectively; 8~10. OD₆₀₀ is 0.5, inducing temperature is 37, 32, 28 °C respectively

图 5 不同诱导条件下 P5 蛋白表达图谱

Fig. 5 Expression map of P5 under different induction conditions

表 2 P5 蛋白表达图谱光密度分析 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Opticaleldensity analysis of P5 expression map

试验编号 Test number	光密度值 ($\times 10^5$) Optical density value
A1B1C1D1	1.421±0.128
A1B2C2D2	1.993±0.166
A1B3C3D3	1.831±0.165
A2B1C2D3	1.916±0.332
A2B2C3D1	1.965±0.084
A2B3C1D2	2.131±0.289
A3B1C3D2	2.142±0.058
A3B2C1D3	1.933±0.225
A3B3C2D1	2.040±0.133

表 3 P5 表达图谱光密度数值的极差分析

Table 3 Range analysis of optical density of P5 expression map

均值分析 Mean analysis	因子 Factor			
	A ($\times 10^5$)	B ($\times 10^5$)	C ($\times 10^5$)	D ($\times 10^5$)
均值 1 Mean 1	1.748	1.826	1.828	1.809
均值 2 Mean 2	2.004	1.964	1.983	2.089
均值 3 Mean 3	2.038	2.001	1.980	1.893
极差 Range	0.290	0.175	0.155	0.280

2.4 P5 蛋白抗血清的特异性与效价检测

Western blotting 结果显示 P5 抗血清与 P5 蛋白特异性结合, 呈现出明显的单一一条带, 阴性对照无条带, 表明 P5 具有良好的免疫原性, 可刺激机体产生特异性抗血清, 效价达到 1:1600 (图 6)。

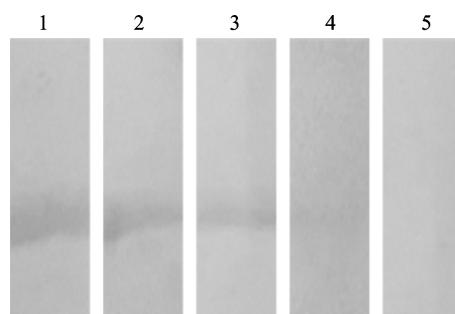
表 4 P5 表达图谱光密度数值的方差分析

Table 4 Variance analysis of optical density of P5 expression map

因子 Factor	光密度值 Optical density		
	均方根 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
A	0.227	3.963	*
B	0.076	1.329	—
C	0.070	1.224	—
D	0.186	3.250	—

注: * $P < 0.05$, 具有显著性差异。下同

Note: * indicates significant difference at $P < 0.05$. The same below



1~4. 抗血清稀释倍数分别为 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200; 5. 阴性血清 (1:400 倍稀释)

1~4. Dilution proportion of antiserum is 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, respectively; 5. Negative serum (dilution proportion was 1:400)

图 6 Western blotting 检测 P5 抗血清特异性与效价

Fig. 6 Specificityand titer of P5 antiserum by Western blotting

2.5 P5 蛋白抗血清与嗜水气单胞菌的相互作用

ELISA 体外模拟 P5 抗血清与嗜水气单胞菌

的相互作用,结果显示,随着抗血清稀释倍数的增大,P5 抗血清与嗜水气单胞菌的结合能力逐渐减弱,当抗体滴度达 1:3 200 时,仍可检测到两者的相互作用(图 7)。可见,P5 抗血清与嗜水气单胞菌在体外存在相互作用,表明 P5 蛋白具有良好的抗原性。

2.6 P5 蛋白抗血清对红鲫鱼的被动免疫评价

P5 抗血清被动免疫红鲫鱼,嗜水气单胞菌攻毒后观察试验鱼 15 d,发现攻毒后 3 d 内试验组鱼体出现部分死亡,死亡情况于第 4 天稳定。对照组 48 h 内鱼体出现大量死亡,随后死亡率降低,至第 5 天死亡情况稳定,试验组与对照组试验鱼存活曲线如图 8 所示。试验鱼死亡症状为:体

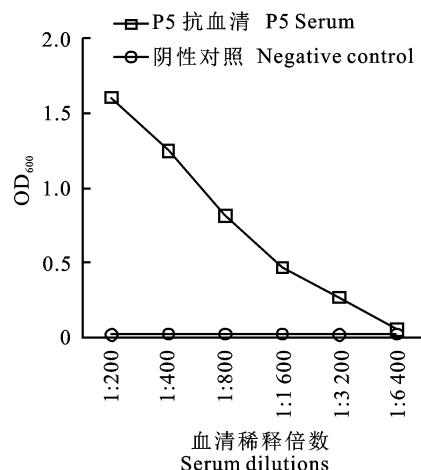


图 7 P5 抗血清与嗜水气单胞菌体外相互作用

Fig. 7 Interaction between P5 antiserum and *Aeromonas hydrophila* in vitro

表有血斑,鱼鳃和各鳍基部充血,腹部突出,肛门红肿。经统计计算,第 5 天即死亡情况稳定时试验组死亡率为 32.3%,对照组 73.3%,P5 抗血清的免疫保护率为 56.0%,SPSS 13.0 分析显示与对照组相比差异显著(表 5),表明 P5 蛋白抗血清免疫红鲫鱼对嗜水气单胞菌感染具有一定的免疫保护作用。

2.7 P5 蛋白抵抗鱼血浆的杀菌作用

体外模拟 P5 蛋白抵抗鱼血浆对嗜水气单胞菌的杀菌作用,采用 Western blotting 检测 P5 蛋白与鱼血浆作用后的差异表达情况。结果显示,试验组与对照组 P5 蛋白均检测到特异性条带,且随着血浆浓度的降低,P5 蛋白的表达呈上调趋势(图 9),推测 P5 蛋白可能为孔道蛋白,关闭孔道可以有效抵抗血浆杀菌因子进入细胞而杀伤菌体。

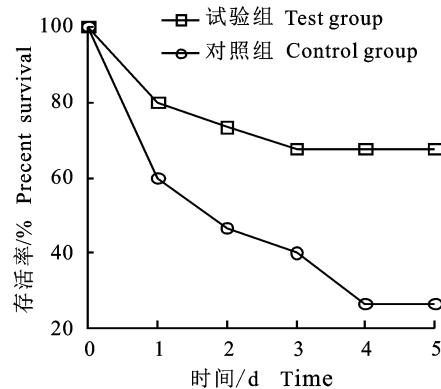


图 8 红鲫鱼被动免疫保护试验的存活率

Fig. 8 Percent survival of passive immune protection test for *Carassius auratus*

表 5 P5 抗血清对红鲫的被动免疫保护效果

Table 5 Passive immune protection of P5 antiserum

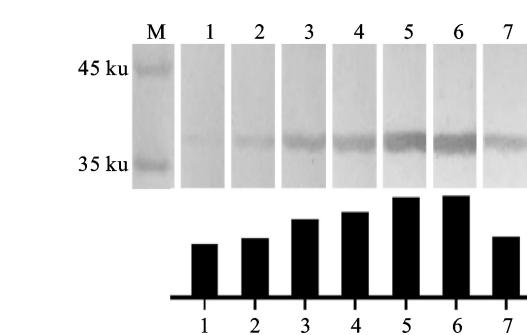
组别 Group	抗体效价 Antibody titer	试验鱼数 Sample nos	存活鱼数 Survival nos	存活率/% Survival rate	免疫保护率/% Immune protection rate
试验组 Test	1:1 600 ×	15	10	67.7	56.0*
对照组 Control	0	15	4	26.7	—

注 Note: * $P < 0.05$.

3 结论与讨论

嗜水气单胞菌是水产养殖鱼类爆发性传染病的主要病原菌,也是一种人、畜及水生动物共患的条件致病菌。P5 蛋白是嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白之一,具有较强的免疫原性^[17],本研究发现 P5 蛋白免疫小鼠产生的抗体可增强红鲫鱼对病菌的抵抗力,因此,在疫苗研制方面,P5 蛋白具有很好的应用前景。

生物信息学可准确预测蛋白的理化性质、结构与抗原表位,为蛋白功能研究提供参考价值^[18]。本研究分析发现,P5 为稳定的亲水性蛋白,在气单胞菌属间进化保守,推测 P5 蛋白在不同气单胞菌间功能相近,所产生的抗体可能为多种气单胞菌提供交叉免疫保护。此外,其二级结构主要以无规则卷曲为主,该结构易扭曲盘旋而暴露在蛋白外层,形成优势细胞抗原表位的可能性较大^[19-20]。蛋白表达由于受到原核表达系统的



1~6. 血浆稀释倍数分别为:未稀释血浆, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 7. 阳性对照(生理盐水); M. 蛋白 Marker

1~6. Dilution proportion of plasma was undiluted plasma, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 7. Positive control(normal saline); M. Protein marker

图 9 P5 蛋白的差异表达

Fig. 9 Differential expressions of P5 protein

影响, 其最佳表达条件往往是唯一的, 本研究发酵试验发现, 菌液 OD₆₀₀ 为 1.0, IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 32 °C 诱导 8 h, P5 获得最大表达量。有研究报道 IPTG 具有一定毒性, 诱导蛋白表达时应添加合适浓度的 IPTG, 另外, 长时间诱导会导致蛋白被细菌蛋白酶降解, 不利于蛋白的高效表达^[21-22], 本研究也发现适度的诱导剂浓度与诱导时间更利于 P5 蛋白的高效表达。

研究显示, 外膜蛋白是嗜水气单胞菌的主要毒力因子之一, 能够激发机体产生高水平保护性抗体, 且利用原核表达纯化的蛋白免疫动物是制备蛋白多抗的普遍方法^[23-24]。毛然然等^[25]用纯化的 OprM 蛋白肌肉注射斑马鱼, 在转录水平检测到相关免疫基因表达上调, 揭示该蛋白可在斑马鱼体内引起免疫应答。Maiti 等^[26]利用外膜蛋白 OmpW 在兔体内制备了抗重组蛋白的多克隆抗体, 并证实抗体的特异性反应, 表明 OmpW 可能是一种潜在保护原。Khushiramani 等^[27]用利用重组外膜蛋白 Omp48 制备了兔抗免疫血清, 且免疫 Omp48 的鱼体可有效抵抗嗜水气单胞菌感染, 免疫保护率达到 69%。本研究用纯化获得的嗜水气单胞菌 P5 蛋白免疫小鼠制备特异性 P5 多克隆抗血清, 抗血清被动免疫红鲫鱼, 发现鱼体可有效抵抗嗜水气单胞菌的感染, 较对照组免疫保护率达到显著的 56%, 可见, 嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 具有较强的免疫原性和免疫保护功能。为进一步探究 P5 的抗原性, 体外模拟试验显示 P5 抗血清与嗜水气单胞菌存在体外识别作用, 表明 P5 也具有良好的抗原性。

体外模拟鱼血浆杀菌作用, 发现嗜水气单胞菌进入鱼体后, 血浆存在非特异性的杀菌作用, P5 蛋白表现为下调以抵抗血浆因子识别, 该现象可能与所预测 P5 蛋白三维结构为桶状相关, 推测 P5 可能通过关闭孔道以减少与血浆杀菌因子的结合, 从而达到保护细菌的作用。

综上所述, 嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 在气单胞菌间进化保守, 二级结构以无规则卷曲为主, 三维结构呈桶状。P5 蛋白具有较强的免疫原性和抗原性, 对红鲫鱼具有显著的免疫保护作用。此外, P5 蛋白可有效抵抗鱼血浆对嗜水气单胞菌杀伤作用。本研究表明嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 是一种良好的保护性抗原, 有望作为防治嗜水气单胞菌蛋白亚单位疫苗的候选抗原成分。

参考文献 Reference:

- [1] YADAV S K, MEENA J K, SHARMA M, et al. Recombinant outer membrane protein C of *Aeromonas hydrophila* elicits mixed immune response and generates agglutinating antibodies[J]. *Journal of Immunology Research*, 2016, 64(4):1087-1099.
- [2] ZHAO X L, WU G, CHEN H, et al. Analysis of virulence and immunogenic factors in *Aeromonas hydrophila*: towards the development of live vaccines[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(7):747-755.
- [3] CHEN C, KANG C, RONG N, et al. Evaluation of immunogenicity, protective immunity on aquaculture pathogenic *Vibrio* and fermentation of *Vibrio alginolyticus* flagellin Fla Cprotein[J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2019, 17(3):e2628.
- [4] WANG Y, CHEN H, GUO Z, et al. Quantitative proteomic analysis of iron-regulated outer membrane proteins in *Aeromonas hydrophila* as potential vaccine candidates[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68:1-9.
- [5] 陈 章, 刘晓露, 姚焱彬, 等. 猪丹毒丝菌灭活疫苗制备及其对小鼠免疫效力的评价[J]. 西北农业学报, 2019, 28(6): 877-887.
- [6] CHEN ZH, LIU X L, YAO Y B, et al. Preparation of inactivated vaccine against *Erysipelothrix rhusiopathiae* and evaluation of immune efficacy in mice[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2019, 28(6):877-887.
- [7] 李松建, 周雅坪, 吕天星, 等. 奶牛乳房炎无乳链球菌 Fc-Sip 和金黄色葡萄球菌 Fc-FnBPB-ClfA 亚单位疫苗的免疫试验研究[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(3):280-286.
- [8] LI S J, ZHOU Y P, LÜ T X, et al. Immunological study of *Streptococcus agalactiae* Fc-Sip and *Staphylococcus aureus* Fc-Fn BPB-Clf A subunit vaccine against dairy cow mastitis [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(3):280-286.
- [9] ZHANG T, LIU Y, CHEN Y, et al. A single dose glycoprotein D-based subunit vaccine against pseudorabies virus infection[J]. *Vaccine*, 2020, 38(39):6153-6161.
- [10] 刘 望, 杨佳杰, 杨 静, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白原核表达及其免疫保护性研究[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(6):125-130.

- LIU W, YANG J J, YANG J, et al. The prokaryotic expression and immunoprotection analysis of membrane protein of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2017, 35(6):125-130.
- [9] SINGH V, CHAUGHARY D K, MANI I, et al. Development of diagnostic and vaccine markers through cloning, expression, and regulation of putative virulence-protein-encoding genes of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(3):275-282.
- [10] 高云山, 刘丹丹, 徐俊林, 等. 嗜水气单胞菌孔蛋白OmpF重组表达及其免疫原性分析[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9):234-243.
- GAO Y SH, LIU D D, XU J L, et al. Recombinant expression and immunogenicity analysis of the porin protein OmpF of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9):234-243.
- [11] ABDELHAMED H, IBRAHIM I, NHO S W, et al. Evaluation of three recombinant outer membrane proteins, OmpA1, Tdr, and TbpA, as potential vaccine antigens against virulent *Aeromonas hydrophila* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66:480-486.
- [12] OLVERA A, PINA S, PEREZ-SIMO M, et al. Virulence-associated trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis* are antigenic proteins expressed in vivo [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 41(3):26.
- [13] 谢乐新, 李森, 宋帅, 等. 副猪嗜血杆菌外膜蛋白P5的分段表达及免疫学性质分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(5):48-52.
- XIE L X, LI M, SONG SH, et al. Expression and immunological characteristics analysis of the fragments of the outer membrane protein P5 of *Haemophilus parasuis* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(5):48-52.
- [14] 王海峰, 王萍, 黄建珍, 等. 副猪嗜血杆菌OMP5的克隆表达及其对豚鼠免疫保护作用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(4):26-30.
- WANG H F, WANG P, HUANG J ZH, et al. Expression of outer membrane protein P5 of *Haemophilus parasuis* and evaluation of its protective immunity in guinea pigs [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 44(4):26-30.
- [15] 俱雄, 陈春琳, 刘祥, 等. 大肠埃希菌外膜蛋白OmpC的原核表达与免疫保护作用研究[J]. 生命科学研究, 2015, 19(2):131-136.
- JU X, CHEN C H L, LIU X, et al. Prokaryotic expression and immunoprotection potential of *E. coli* outer membrane protein OmpC [J]. *Life Science Research*, 2015, 19(2):131-136.
- [16] LIU X, SHE X T, ZHU Q F, et al. Heterogeneous interactome between *Litopenaeus vannamei* plasma proteins and *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1):192-198.
- [17] 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.
- [18] 王海燕, 何梦雅, 余飞艳, 等. 幽门螺杆菌OmpP1蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(1):1-4, 9.
- WANG H Y, HE M Y, YU F Y, et al. Bioinformatic analysis of *Helicobacter pylori* ompP1 gene [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(1):1-4, 9.
- [19] 伍娜娜, 荣娜, 康超, 等. 大肠杆菌免疫蛋白OmpA生物信息学分析及表位多肽疫苗设计[J]. 河南农业科学, 2019, 48(6):131-138.
- WU N N, RONG N, KANG CH, et al. Bioinformatics analysis of *Escherichia coli* immune protein OmpA and epitope polypeptide vaccine design [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(6):131-138.
- [20] 付小哲, 方翔, 李宁求, 等. 鳜鱼嗜水气单胞菌GYK1株外膜蛋白A基因的克隆及其生物信息学分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(9):1222-1227.
- FU X ZH, FANG X, LI N Q, et al. Cloning and bioinformatics of outer membrane protein A gene of *Aeromonas hydrophila* GYK1 strain [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2013, 26(9):1222-1227.
- [21] RIBEIRO V T, ASEVEDO E A, DE PAIVA VASCONCELOS L T C, et al. Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania chagasi* expression in *E. coli* M15 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(16):6495-6504.
- [22] 伍娜娜, 康超, 荣娜, 等. 大肠杆菌外膜蛋白F的原核表达、多克隆抗体制备及生物信息学分析[J]. 河南农业科学, 2019, 48(3):145-152.
- WU N N, KANG CH, RONG N, et al. Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and bioinformatics analysis of *Escherichia coli* outer membrane protein F [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(3):145-152.
- [23] ASCOLI C A, AGGELER B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies [J]. *Biotechniques*, 2018, 65(3):127-136.
- [24] 欧文军, 余厚美, 安飞飞, 等. 木薯钙调蛋白的原核表达及其单克隆抗体的制备[J]. 西北农业学报, 2017, 26(9):1317-1323.
- OU W J, YU H M, AN F F, et al. Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation of calmodulin originated from cassava [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2017, 26(9):1317-1323.
- [25] 毛然然, 李小艳, 武瑶, 等. 嗜水气单胞菌OprM蛋白的克隆表达与免疫保护作用评价[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9):244-248.
- MAO R R, LI X Y, WU Y, et al. Cloning and expression of outer membrane protein OprM from *Aeromonas hydrophila* and the evaluation of its immunoprotective effect [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9):244-248.
- [26] MAITI B, RAGHUNATH P, KARUNASAGAR I, et al. Cloning and expression of an outer membrane protein OmpW of *Aeromonashydrophila* and study of its distribution in *Aeromonas* spp [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(4):1157-1167.
- [27] KHUSHIRAMANI R M, MAITI B, SHEKAR M, 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(4):286-291.

Study on Prokaryotic Expression, Immunoprotective Effect and Resistance to Plasma Sterilization of Outer Membrane Protein P5 of Fish Pathogenic *Aeromonas hydrophila*

RONG Na, JIAN Sijie, SUN Wei, KANG Chao, WU Nana and LIU Xiang

(Chinese-German Joint Institute for Natural Product Research, College of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong Shaanxi 723001, China)

Abstract To evaluate the immunological function of outer membrane protein P5 of fish pathogenic *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) and provide a theoretical basis for vaccine development. The bioinformatics method was used to analyze the physicochemical properties of P5 protein. The molecule cloning method was used to develop recombinant strain expressing P5 protein, which was purified by inclusion body washing and SDS-PAGE, and immunized mice to prepare P5 antiserum. Western blotting was used to detect the specificity and titer of the antiserum, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to simulate the recognition effect between P5 antiserum and *A. hydrophila*. P5 antiserum was passively immunized to *Carassius auratus* and challenged with *A. hydrophila* to evaluate the immune protective function. Western blotting was used to detect the P5 protein effect for bacteria against fish plasma sterilization. The results showed that P5 had high homology and conservative evolution among *Aeromonas*. The P5 gene was cloned, expressed and purified successfully, and the optimal expression conditions for P5 protein included a strain OD₆₀₀ value of 1.0, final isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) concentration of 0.5 mmol/L, an inducing temperature of 32 °C and an inducing time of 8 hours. Western blotting and ELISA analysis showed that the antiserum of P5 held high specificity and titer(1 : 1 600). The P5 antiserum could recognize with *A. hydrophilain* vitro, indicating that P5 had high immunogenicity and antigenicity. The results of passive immunity showed that P5 protein demonstrated a significant immune protection function (56%) against *A. hydrophila* infection. P5 protein could protect effectively bacteria against fish plasma sterilization by down regulating expression, and P5 may be related to plasma sterilization. In summary, the outer membrane protein P5 of *A. hydrophila* is a protective antigen and expected to be a potential vaccine against *A. hydrophila* infection.

Key words *Aeromonas hydrophila*; Outer membrane protein P5; Polyclonal antiserum; Plasma sterilization; Passive immunity

Received 2020-07-12 **Returned** 2020-09-28

Foundation item The Program of State Administration of Foreign Experts Affairs (No. GDT20186100426); the Key R&D Program of Shaanxi Science and Technology Department (No. 2020LSFP2-38); the Talent Program of Shaanxi University of Technology (No. SLGQD1803).

First author RONG Na, female, master student. Research area: proteomics and immunology. E-mail: rongna0628@163.com

Corresponding author LIU Xiang, male, Ph. D, associate professor, master supervisor. Research area: proteomics and immunology. E-mail: liuxiang888525@163.com