

迟缓爱德华氏菌 OppA 蛋白的免疫原性及免疫保护分析

王妍妍^{1,2}, 李贵阳^{1,2}, 李杰^{1,2}, 肖鹏¹, 莫照兰¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是水产养殖动物重要的病原菌,引起鱼类爱德华氏菌病,免疫防治是针对该病的一个有效途径。OppA 是迟缓爱德华氏菌的一个寡肽透过酶组分,作者开展 OppA 的免疫原性及免疫保护性的研究,旨在评价其作为鱼类爱德华氏菌疫苗候选抗原的可行性。将致病性的迟缓爱德华氏菌 LSE40 的 *oppA* 克隆于表达载体 pPROEXHTa,转化入大肠杆菌 BL21(DE3),表达重组蛋白 6His-OppA,并利用 Ni-NTA Sefinose™ kit 进行纯化。以纯化的 6His-OppA 两次注射免疫大菱鲆(*Scophthalmus maximus*),第 34 天后检测血清抗体效价为 1:1024;以 LSE40 对免疫的大菱鲆进行人工感染,测得免疫保护率是 25.9%。结果表明,OppA 可刺激大菱鲆产生免疫应答,并具有免疫保护效果。

关键词: 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*); OppA; 原核表达; 免疫应答; 免疫保护

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)05-0019-05

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一种革兰氏阴性细菌,能引起水生动物发病,感染海水和淡水鱼类引起的疾病称为爱德华氏菌病(Edwardsiellosis),给养殖业带来重大经济损失^[1-4]。利用疫苗预防爱德华氏菌病的研究已取得一些进展,灭活菌体、细胞碎片、表面脂多糖等菌体成分具有良好的免疫原性^[5-7],亚单位疫苗、减毒疫苗、DNA 疫苗显示了良好的免疫保护^[8-14]。由于迟缓爱德华氏菌存在血清型差异,导致一些疫苗的应用效果不稳定。筛选具有交叉保护作用的抗原是解决这个问题的一条有效途径。

细菌的寡肽透过酶(Oligopeptide permease, 简称 Opp)由 OppABCDEF 5 个蛋白构成,主要负责依赖 ATP 水解的寡肽营养摄取^[15]。革兰氏阴性菌的 OppA 作为底物结合蛋白,能结合多种形式的寡肽,为细菌提供营养^[16],还可作为细胞膜受体,参与其他生理过程的调控,如密度感应^[17],孢子形成^[18],抗生素抗性^[19],菌膜形成^[20],细胞黏附^[21],胞内寄生^[22]等。一些研究显示,同种细菌的 OppA 高度保守,作为抗原具有较好的免疫原性,能够不同程度地诱导宿主产生免疫应答,提高宿主针对相应病原的免疫保护力^[23-26]。根据 NCBI 已公布的基因组序列信息,爱德华氏菌属的 OppA 氨基酸序列间相似度较高,分布在 92%~99%。因此,OppA 可能是一个抵抗爱

德华氏菌病的良好的交叉保护性抗原。在前期工作中,本实验室从迟缓爱德华氏菌 LSE40 fosmid 文库克隆得到编码寡肽透过酶的 *opp* 基因簇^[27]。本研究通过体外表达迟缓爱德华氏菌 OppA,评价该蛋白在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)中的免疫原性和免疫保护效果。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基

迟缓爱德华氏菌 LSE40 由本实验室从患病大菱鲆体内分离保存^[8];克隆载体 pEASY-T1(氨苄青霉素抗性)和大肠杆菌 Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司,表达载体 pPROEXHTa(氨苄青霉素抗性)来自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(液体 TSB 和固体 TSA)用于培养迟缓爱德华氏菌, LB 培养基用于培养大肠杆菌;氨苄青霉素(Amp)的使用质量浓度为 100 mg/L。

收稿日期: 2011-02-22; 修回日期: 2011-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072245); 国家鲆鲽类产业技术体系项目(NCYTX-50); 青岛市科技发展计划项目(08-1-7-2-HY)

作者简介: 王妍妍(1987-),女,山东济宁人,硕士,主要从事海洋微生物与水产动物病害防治研究, E-mail: wyy8701@163.com; 莫照兰,通信作者,电话: 0532-82898561, E-mail: zhlmo@qdio.ac.cn

1.2 实验动物

大菱鲆购自山东青岛胶南养殖场, 体长 6 ~ 8 cm, 体质量 15 g 左右, 暂养于通气的水族箱, 水温 16 ~ 18 ℃, 每隔两天换水和投喂饵料。实验前随机选取 3 尾鱼, 取血清与迟缓爱德华氏菌 LSE40 做血清凝集实验; 同时取鱼的内脏器官匀浆涂布于 TSA 平板进行细菌分离。在确定未出现凝集反应以及未分离到细菌的情况下, 该批鱼方能进行后续实验。

1.3 OppA 表达载体的构建

根据迟缓爱德华氏菌 LSE40 的 *opp* 基因簇序列^[27]设计上游引物 OppA-*EcoRI*-F(5'-TGAGAATTC-GCCGAGGTTCCGGCCGGTGTA-3', 下划线为 *EcoRI* 内切酶位点) 和下游引物 OppA-*XhoI*-R(5'-GCCTCGAGCACGACGCGCAATTAATGTTGAA-CG-3', 下划线为 *XhoI* 内切酶位点), 扩增 *oppA* 基因的 1583 bp 片段, 该片段去除了编码 OppA N 端信号肽的 81 bp。所得 PCR 产物克隆到 pEASY-T1 载体, 转化大肠杆菌 Trans-T1, 在 LB+Amp 固体平板培养基上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落经扩大培养, 提质粒进行 *EcoRI/XhoI* 双酶切, 选择插入片段大小符合的阳性重组质粒送上海博尚生物技术有限公司进行测序。确认克隆序列的正确后, 将插入片段连接到表达载体 pPROEXHTa, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 LB+Amp 培养基筛选阳性菌落, 进行扩大培养, 提取质粒经 *EcoRI/XhoI* 双酶切和 OppA-*EcoRI*-F/OppA-*XhoI*-R 为引物的 PCR 扩增鉴定插入片段。含有正确重组质粒的菌株命名为 BL21/HtaOppA; 同时将空质粒 pPROEXHTa 转化到 BL21(DE3), 获得对照菌株 BL21/Hta。

1.4 OppA 重组蛋白的诱导表达及纯化

以 37 ℃、1 mmol/L IPTG 诱导培养 BL21/HtaOppA, 同时设 BL21/HtaOppA 未诱导对照及 BL21/Hta 空质粒对照, SDS-PAGE(12%分离胶和 5%浓缩胶)检测目的蛋白表达情况。对 BL21/HtaOppA 进行表达条件的优化, 设置条件为: IPTG 诱导浓度 0.8、0.4、0.2 mmol/L, 诱导温度 20、26、30、37 ℃, 诱导时间 3、4、5 h, 3 要素形成 36 个组合。每组实验均以 BL21/Hta 为对照。诱导培养的细菌菌液经超声波破碎、离心, SDS-PAGE 检测上清和沉淀, 根据蛋白表达量的情况确定其中最优的诱导条件组。按照优化的诱导表达条件对 BL21/HtaOppA 大量培养(300 mL), 5 000 g 离心 6 min 收集菌体, 以 Ni-NTA

Sefinose™ kit(BIO BASIC INC.)纯化目的蛋白。以 SDS-PAGE 检测纯化效果, 以 Bradford 蛋白质定量试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)测定纯化蛋白浓度。

1.5 免疫实验

将大菱鲆随机分成免疫组和对照组, 每组 30 尾。纯化的 OppA 重组蛋白 6His-OppA 与等体积完全弗氏佐剂(Sigma)混合, 以 30 μg 6His-OppA/尾鱼的剂量, 对免疫组进行腹腔注射免疫; 对照组则以等体积 PBS 代替 6His-OppA, 其他条件与免疫组相同。第 16 天进行二次免疫, 此时改用不完全弗氏佐剂, 其他处理方法与第一次相同。

二次免疫后第 34 天, 免疫组和对照组分别随机挑取 3 尾鱼, 取血清, 对照组血清作为阴性对照, 以间接 ELISA 方法检测免疫组血清抗体效价^[28]。其余的鱼以浓度为 2.73×10^4 cfu/尾的 LSE40 进行腹腔注射攻毒。观察并记录死鱼数量, 根据公式计算免疫保护率:

$$\text{免疫保护率} = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%^{[29]}$$

2 结果

2.1 OppA 表达载体构建

以筛选的 BL21/HtaOppA 作菌落模板, 以 OppA-*EcoRI*-F/OppA-*XhoI*-R 扩增得到的片段大小为 1.6 kb 左右(图 1a)。该 DNA 片段去除了 OppA 蛋白 N 端 27

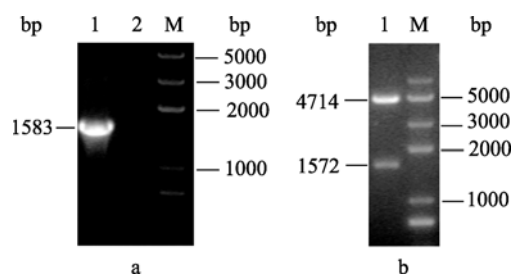


图 1 重组表达菌株 BL21/HtaOppA 的构建和鉴定

Fig. 1 Construction and identification of recombinant strain BL21/HtaOppA

a. PCR 扩增 *oppA* 片段; 1. BL21/HtaOppA 为菌落 PCR 模板; 2. 阴性对照; M. DNA marker; b. 重组质粒 pPROEXHTaOppA 的 *EcoRI/XhoI* 双酶切鉴定; 1. 重组质粒 pPROEXHTaOppA 的 *EcoRI/XhoI* 双酶切图谱; M. DNA marker

a. PCR amplification of *oppA*; 1. PCR amplification using BL21/HtaOppA as a template; 2. negative control; M. DNA marker; b. Identification of the recombinant plasmid pPROEXHTaOppA digested with *EcoRI* and *XhoI*; 1. Restriction profiles of the recombinant plasmid pPROEXHTaOppA digested with *EcoRI* and *XhoI*; M. DNA marker

个氨基酸的信号肽编码区,目的是提高 6His-OppA 在大肠杆菌的表达量。同时, BL21/HtaOppA 中的质粒经 *EcoRI/XhoI* 双酶切产生 1.6 kb 左右的 DNA 片段(图 1b), 与预期的片段大小一致, 表明成功获得 OppA 重组表达菌株 BL21/HtaOppA。

2.2 OppA 重组蛋白的诱导表达及条件优化

实验中发现, 经 1 mmol/L IPTG、37 °C 条件诱导的 BL21/HtaOppA, 6His-OppA 成功表达(图 2a), 但是主要以包涵体形式存在于细胞沉淀, 只有 30%左右的可溶蛋白存在于细胞上清。为提高可溶蛋白含量, 作者优化了细菌的培养温度、培养时间和 IPTG 诱导浓度, 优化得到的条件为: 在 26 °C 培养条件下,

以 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 此时约有 80%的可溶性重组蛋白存在于细胞破碎物的上清(图 2b), 经纯化, 获得了高纯度的目的蛋白(图 2c)。

2.3 血清抗体效价及免疫保护率

大菱鲆经两次免疫, 在加强免疫后的第 34 天, 检测得到的免疫大菱鲆血清抗体效价是 1:1 024。免疫组和对照组经 LSE40 毒株攻毒, 如图 3 所示, 对照组于攻毒后的第 8 天开始出现死亡, 免疫组于攻毒后的第 11 天开始出现死亡; 在攻毒后第 22 天, 两组累积死亡率均趋于稳定, 此时免疫组累积死亡率为 74.1%, 对照组为 100%, 且免疫组死亡时间明显延后($P<0.01$), 计算得到的免疫保护率是 25.9%。

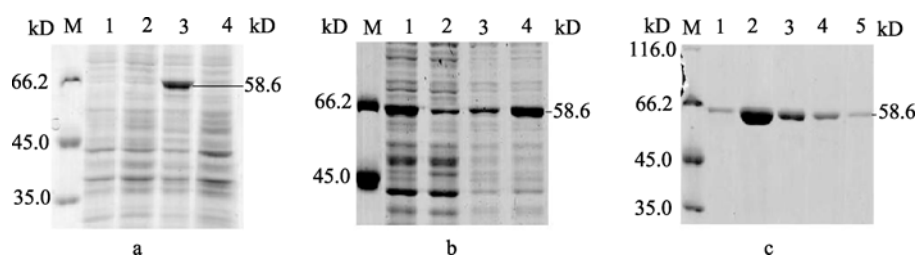


图 2 SDS-PAGE 检测 OppA 重组蛋白的表达及纯化

Fig. 2 SDS-PAGE of 6His-OppA in bacteria lysates and in elution buffer

a. OppA 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测; M. protein marker; 1. BL21/Hta 总蛋白(诱导); 2. BL21/Hta 总蛋白(未诱导); 3. BL21/HtaOppA 总蛋白(诱导); 4. BL21/HtaOppA 总蛋白(未诱导); b. BL21/HtaOppA 菌株 OppA 重组蛋白的可溶表达优化; M. protein marker; 1 和 3. BL21/HtaOppA 超声破碎后分离的沉淀和上清 (1 mmol/L IPTG、37 °C 诱导 4 h); 2 和 4. BL21/HtaOppA 超声破碎后分离的沉淀和上清 (0.4 mmol/L IPTG、26 °C 诱导 4 h); c. 纯化重组 OppA 的 SDS-PAGE 检测; M. protein marker; 1~5 依次是过柱纯化得到的 OppA 重组蛋白 1~5 管洗脱液

a. analysis of 6His-OppA in bacterial lysates; M. protein marker; 1. total cellular proteins of BL21/Hta (induced); 2. total cellular proteins of BL21/Hta (uninduced); 3. total cellular proteins of BL21/HtaOppA (induced); 4. total cellular proteins of BL21/HtaOppA (uninduced); b. optimization of soluble 6His-OppA expressed in the strain BL21/HtaOppA; M. protein marker; 1 and 3. precipitate and supernatant isolated from ultrasonication product of BL21/HtaOppA, respectively (induced at 1 mmol/L IPTG, 37 °C for 4 h); 2 and 4. precipitate and supernatant isolated from ultrasonication product of BL21/HtaOppA, respectively (induced at 0.4 mmol/L IPTG, 26 °C for 4 h); c. analysis of 6His-OppA in elution buffer; M. protein marker; 1~5. eluate collection of 6His-OppA

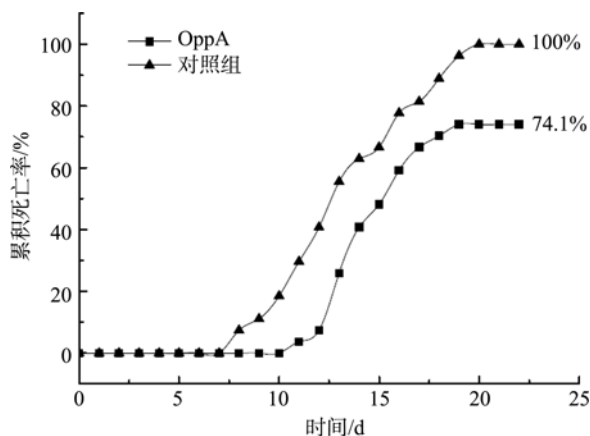


图 3 以迟缓爱德华氏菌 LSE40 攻毒后的大菱鲆累积死亡率
Fig. 3 Accumulative mortalities of turbot after challenged with *E. tarda* LSE40

3 讨论

本研究利用大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 将迟缓爱德华氏菌 OppA 蛋白编码基因克隆到表达质粒 pPROEXHTa 的 6His 标签之后, 获得重组蛋白 6His-OppA。由于诱导表达的目的蛋白主要以包涵体形式存在, 蛋白纯化过程中需经变性和复性处理, 将会增加操作难度, 所以我们进行了表达条件的优化。通过降低诱导时的培养温度以及 IPTG 浓度, 有效减少包涵体生成, 使可溶性蛋白含量由 30%提高到 80%。

本实验表明, 迟缓爱德华氏菌 OppA 重组蛋白作为抗原, 能使大菱鲆产生特异性免疫应答, 并起

到一定的免疫保护作用,这与鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)和卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)的 OppA 蛋白免疫小鼠的结果较一致^[23, 26]。根据结果,本实验从免疫鱼获得的血清抗体效价(1: 1 024)低于鼠疫耶尔森菌和卡他莫拉菌的 OppA 免疫小鼠获得的血清抗体效价(1: 10 000 ~ 1: 32 000)。这种血清抗体效价的差异可能是因为大菱鲆与小鼠相比,免疫系统相对不完善,免疫应答能力比小鼠弱。另外,体外表达抗原的结构变化、免疫剂量、免疫佐剂类型以及免疫途径等,都可能导致免疫应答水平和免疫保护效果的不同^[26]。最近的一个研究显示,通过黏膜免疫途径免疫卡他莫拉菌的 OppA 蛋白,提高了小鼠清除肺部致病性病原的能力^[23]。

ABC 输送器家族蛋白被认为是潜在的针对病原菌的疫苗候选抗原或药物作用靶点^[24]。Opp 为 ABC 输送器家族的一员,其在抵抗病原侵染方面的功能日益受到人们的关注。通过本实验得到的初步结果,OppA 在大菱鲆显示了一定的免疫应答和免疫反应。作者下一步将在免疫剂量、免疫佐剂类型以及免疫途径等方面开展工作,以期提高该蛋白的免疫应答和免疫保护力,达到控制爱德华氏菌病的目的。

参考文献:

- [1] 董传甫, 林天龙, 陈日升. 日本鳎败血腹水病原研究[J]. 水产科学, 2002, 21(1): 5-8.
- [2] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲆腹水病原的研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(4): 649-654.
- [3] 薛淑霞, 冯守明, 孙金生, 等. 海水工厂化养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)腹水病原菌的分离与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 548-554.
- [4] 张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 31-37.
- [5] Feng S M, Zhan W B, Sheng X Z, et al. Response of mucosal and systemic sIgM-positive cells in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunization with *Edwardsiella tarda*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 129(1-2): 108-114.
- [6] Gutierrez M A, Miyazaki T. Responses of Japanese eels to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin-killed cells or lipopolysaccharide of the bacterium[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1994, 6(2): 110-117.
- [7] Salati F, Kawai K, Kusuda R. Immune response of eel against *Edwardsiella tarda* antigens[J]. Fish Pathology, 1983, 18(3): 135-141.
- [8] Lan M Z, Peng X, Xiang M Y, et al. Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(3): 521-530.
- [9] Liu Y, Oshima S, Kurohara K, et al. Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis[J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(7): 605-612.
- [10] Verjan N, Hirono I, Aoki T. Genetic loci of major antigenic protein genes of *Edwardsiella tarda*[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5654-5658.
- [11] Wang B, Mo Z L, Xiao P, et al. EseD, a putative T3SS translocon component of *Edwardsiella tarda*, contributes to virulence in fish and is a candidate for vaccine development [J]. Mar Biotechnol (NY), 2010, 12(6): 678-685.
- [12] Jiao X D, Zhang M, Cheng S, et al. Analysis of *Edwardsiella tarda* DegP, a serine protease and a protective immunogen [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(4): 672-677.
- [13] Jiao X D, Dang W, Hu Y H, et al. Identification and immunoprotective analysis of an in vivo-induced *Edwardsiella tarda* antigen [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(5): 633-638.
- [14] Jiao X D, Zhang M, Hu Y H, et al. Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigens[J]. Vaccine, 2009, 27(38): 5 195-5 202.
- [15] Detmers F J M, Lanfermeijer F C, Poolman B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters[J]. Res Microbiol, 2001, 152(3): 245-258.
- [16] Monnet V. Bacterial oligopeptide-binding proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(10): 2100-2114.
- [17] Alloing G, Martin B, Granadel C, et al. Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease[J]. Mol Microbiol, 1998, 29(1): 75-83.
- [18] Rudner D Z, Ledeaux J R, Ireton K, et al. The spook locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(4): 1388-1398.
- [19] Acosta M B, Ferreira R C, Padilla G, et al. Altered

- expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains[J]. *J Med Microbiol*, 2000, 49(5): 409-413.
- [20] Lee E M, Ahn S H, Park J H, et al. Identification of oligopeptide permease (opp) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 240(1): 21-30.
- [21] Cundell D R, Pearce B J, Sandros J, et al. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells[J]. *Infect Immun*, 1995, 63(7): 2493-2498.
- [22] Borezee E, Pellegrini E, Berche P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12): 7069-7077.
- [23] Yang M, Johnson A, Murphy T F. Characterization and evaluation of the *Moraxella catarrhalis* oligopeptide permease A (OppA) as a mucosal vaccine antigen[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(2): 846-857.
- [24] Garmory H S, Titball R W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(12): 6757-6763.
- [25] Nowalk A J, Gilmore Jr R D, Carroll J A. Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(7): 3864-3873.
- [26] Tanabe M, Atkins H S, Harland D N, et al. The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(6): 3687-3691.
- [27] 杨佳银, 莫照兰, 茅云翔, 等. 从迟缓爱德华氏菌 fosmid 文库克隆编码寡肽透过酶的 *opp* 基因簇[J]. *海洋科学*, 2008, 32(11): 13-19.
- [28] 肖鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 等. 鳃弧菌油乳化二价口服疫苗免疫养殖大菱鲂的免疫应答及免疫效果的研究[J]. *高技术通讯*, 2007, 17(9): 979-985.
- [29] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [J]. *Dev Biol Stand*, 1981, 49: 447-454.

Immunogenicity and immunoprotection of oligopeptide permease A (OppA) of *Edwardsiella tarda*

WANG Yan-yan^{1,2}, LI Gui-yang^{1,2}, LI Jie^{1,2}, XIAO Peng¹, MO Zhao-lan¹

(1. Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb., 22, 2011

Key words: *Edwardsiella tarda*; OppA; Prokaryotic expression; Immune response; Immunoprotection

Abstract: *Edwardsiella tarda* is an important pathogen to aquaculture animals, causing fish edwardsiellosis diseases. Vaccination is an efficient protection against this disease in fish. OppA is a component of the oligopeptide permease system of *E. tarda*. We evaluated the potential of OppA as an antigenic candidate vaccine against edwardsiellosis. The *oppA* gene was cloned into expression vector pPROEXHTa and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed 6His-OppA was purified with Ni-NTA SefinoseTM Kit and used as an antigen to immunize turbot (*Scophthalmus maximus*) twice. At day 34 post-vaccination, the serum antibody titer in the immunized fish was 1:1024, and the relative percentage survival (RPS) was 25.9% when the immunized turbot was challenged with pathogenic *E. tarda*. The present studies indicate that OppA of *E. tarda* can induce immune response in fish and provide protection against edwardsiellosis.

(本文编辑: 谭雪静)