

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)*tdh2* 基因 和鳃弧菌(*V. anguillarum*)*ompU* 基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)免疫保护作用*

刘 瑞^{1,3} 赵明君¹ 杨 慧² 陈吉祥^{1,3}

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室 青岛 266003;

2. 西北工业大学生命学院 西安 710072; 3. 兰州理工大学石油化工学院 兰州 730050)

摘要 采用基因工程的方法, 将副溶血弧菌的热稳定直接溶血素基因 *tdh2* 和鳃弧菌外膜蛋白基因 *ompU* 进行融合, 在大肠杆菌中得到表达, 并利用该融合基因构建二联 DNA 疫苗 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*。用 DNA 疫苗按 10 和 50 μ g/尾的剂量通过肌肉注射免疫大菱鲂, 对大菱鲂抵抗致病性副溶血弧菌和鳃弧菌的免疫效果进行研究。结果表明, DNA 疫苗免疫的大菱鲂对副溶血弧菌感染的最高保护率为 100%, 对鳃弧菌感染的保护率为 35%。被免疫的大菱鲂肌肉组织中能检测到融合蛋白表达, 在血清中能检测到较高水平特异性抗体, DNA 疫苗引起的体液免疫反应水平和保护效果与注射剂量有关。

关键词 副溶血弧菌, 鳃弧菌, 热稳定溶血素, 外膜蛋白, 二联 DNA 疫苗, 大菱鲂, 免疫性
中图分类号 Q346

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)是引起水产养殖动物细菌性疾病的常见病原菌, 能引起多种水产动物的弧菌病(Vibriosis), 给养殖业带来巨大经济损失(Reen *et al.*, 2006; 宋欣等, 2010)。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)因其具有较高的经济价值, 已成为我国北方沿海重要的养殖品种(马爱军等, 2010)。但随着规模化养殖程度的不断增加, 弧菌病已成为大菱鲂养殖中危害最严重的细菌性病害之一(邹玉霞等, 2004)。

热稳定直接溶血毒素(thermostable direct hemolysin, TDH)是副溶血弧菌的主要致病因子, 主要存在于引起神奈川现象(Kanagawa phenomenon)的阳性菌

株中(Nishibuchi *et al.*, 1990), 这些菌株中编码 TDH 的基因有两个拷贝(*tdh1* 和 *tdh2*), 两者编码的 TDH 仅 7 个氨基酸不同, 90%以上的 TDH 阳性菌株中 *tdh2* 具有表达优势(Takeda *et al.*, 1978)。外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)在鳃弧菌致病过程中具有重要作用, *OmpU* 能够抵抗宿主胆汁对鳃弧菌的杀菌作用。同时 *OmpU* 也是一种很好的保护性抗原(Kumar *et al.*, 2007)。本研究将分别克隆副溶血弧菌的 *tdh2* 基因和鳃弧菌的 *ompU* 基因, 构建成为一个融合基因(*tdh2-ompU*), 并将该融合基因与真核表达载体连接, 制备二联 DNA 疫苗, 并对该二联 DNA 疫苗免疫保护大菱鲂抵抗副溶血弧菌和鳃弧菌感染能力进行研究。

* 国家自然科学基金项目, 30972275 号; 国家 863 计划项目, 2007AA09Z416 号; 农业部公益性行业专项, nyhyzx07-046 号。

刘 瑞, 博士研究生, E-mail: sportsgenie@126.com

通讯作者: 陈吉祥, 教授, E-mail: betcen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-08-04, 收修改稿日期: 2010-10-09

1 材料与amp方法

1.1 菌株和质粒

致病菌株 FYZ8621.4 分离自青岛食物中毒的腹泻病人, 经 TCBS 培养基培养, Vitek 32 细菌检测仪 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)、API 20E (bioMérieux, France)和 16S rDNA 序列分析鉴定为副溶血弧菌, 后被证明同时为鱼类致病菌(Luan *et al*, 2007)。致病菌株 W-1 分离自山东省莱州湾海区某养殖场发病的鲈鱼, 经细菌形态学、生理生化及 BIOLOG 系统鉴定为鳃弧菌(肖慧等, 1999)。弧菌在 28 ℃下培养于 Zobell's 2216E 培养基中。用于构建工程菌的大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)购于 Novagen 公司, 并在 37 ℃下培养于 Luria-Bertani (LB)培养基中。

用于克隆基因的载体 pMD19-T Simple 购于 Takara 公司; 用于原核表达的载体 pET28a(+)购于 Novagen 公司; 用于真核表达的载体 pEGFP-N1 由上海市肿瘤研究所李锦军老师提供。

1.2 *tdh2* 以及 *ompU* 基因的克隆

根据 GenBank 记录的副溶血弧菌 TDH2 基因 (AB112355)和鳃弧菌 *OmpU* 基因(GU230132)序列分别设计两对引物(t1、t2)和(u1、u2), 其中 *tdh2* 的扩增引物中引入 *Bam*H 和 *Eco*R 的酶切位点, *ompU* 的引物中引入 *Eco*R 和 *Xho* 的酶切位点(表 1)。以 FYZ8621.4 和 W-1 的基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5min; 94 ℃变性 1min, *tdh2* 基因为 58 ℃复性 1min (*ompU* 基因为 53 ℃复性 1min), 72 ℃延伸 1min, 反应 30 个循环; 72 ℃延伸 10min。

PCR 产物序列经测序(上海生工生物工程有限公司)后, 分别与克隆载体 pMD19-T Simple 连接, 构建

重组质粒 pMD19-T Simple/*tdh2* 和 pMD19-T Simple/*ompU*。将重组质粒分别转化大肠杆菌 DH5 α , 于 37 ℃在 LB 固体培养基上培养 12h。挑取白斑于 LB 液体培养基中扩大培养后提取质粒 DNA, 分别用酶切和 PCR 扩增的方法对重组质粒进行检测, 并进行序列分析, 筛选含有阳性重组质粒的工程菌株。

1.3 融合基因 *tdh2-ompU* 原核表达质粒的构建

将 pMD19-T Simple/*tdh2* 与原核表达载体 pET28a(+)用 *Bam*H 和 *Eco*R 进行酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测并回收酶切产物 *tdh2* 基因和 pET28a(+), 将纯化的酶切产物用 T₄DNA 连接酶连接, 连接产物为 pET28a(+)/*tdh2*。将连接产物转化到 DH5 α 中, 培养 12h 后挑取菌落经扩大培养后提取质粒 DNA, 经酶切、PCR 扩增以及测序检测, 筛选含有阳性重组质粒的工程菌株。

将 pMD19-T Simple/*ompU* 与重组表达质粒 pET28a(+)/*tdh2* 用 *Eco*R 和 *Xho* 酶切, 并按上述方法将 *ompU* 基因与 pET28a(+)/*tdh2* 连接, 连接产物转化到 DH5 α 中, 提取质粒 DNA 后经酶切、PCR 和测序检测, 筛选含有融合基因的重组表达质粒 pET28a(+)/*tdh2-ompU* 的工程菌株 DH5 α /pET28a(+)/*tdh2-ompU*。

1.4 重组融合蛋白的表达及纯化

从 DH5 α /pET28a(+)/*tdh2-ompU* 中提取重组质粒后转化到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中。重组菌株接种于含 30 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 经终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 在 28 ℃诱导表达 6h 后, 在 4 ℃用 10000g 离心 25min 收集菌体。菌体用生理盐水重悬后, 经 12%的 SDS-PAGE 检测。

将离心收集的 BL21(DE3)/pET28a(+)/*tdh2-ompU* 用含有 8mol/L 尿素的变性缓冲液(20mmol/L PBS,

表 1 本研究中使用的引物核苷酸序列
Tab.1 The nucleotide sequence of the primer used in this study

引物名	序列	酶切位点
t1	5'-CGCGGATCCATGAAGTACCGATATTTGCA-3'	<i>Bam</i> H
t2	5'-CGCGAATTCCTGTGATGTTACATTCAAAA-3'	<i>Eco</i> R
u1	5'-CCGAATTCATGAACAAACTCTGATTGCTTTAG-3'	<i>Eco</i> R
u2	5'-CCCTCGAGGAAGTCGTAACGTAGACCTAGTGCT-3'	<i>Xho</i>
toe1	5'-CGCCTCGAGATGAAGTACCGATATTTGCA-3'	<i>Xho</i>
toe2	5'-CGCGGATCCCCTTAGAAGTCGTAACGTAGACCTA-3'	<i>Bam</i> H
rttu1	5'-TATACAATGGCAGCGGTGTC-3'	—
rttu2	5'-TCGCCTTCGTAGAAACCA-3'	—

注: 表中下划线标注表示限制性内切酶的酶切位点

0.5mol/L NaCl 和 8mol/L 尿素, pH 7.4)重悬后, 超声波破碎 30min, 然后经 0.22 μ m 滤膜过滤。过滤后的溶液经 Ni-NTA 琼脂糖亲和柱纯化, 纯化的蛋白于 4 $^{\circ}$ C 复性透析 24h 后, 经 SDS-PAGE 进行检测。

1.5 重组融合蛋白对斑马鱼的毒性实验

将纯化的融合蛋白(1.8mg/ml)用灭菌的生理盐水稀释成不同浓度(1.8、0.9 和 0.45mg/ml)。48 尾健康的斑马鱼随机分成 4 个组, 平均体重为 0.3g, 每尾斑马鱼腹腔注射 20 μ l, 以生理盐水作对照, 于 14d 内观察并记录死亡状况。

1.6 融合蛋白真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 的构建

根据融合基因 *tdh2-ompU* 的核苷酸序列及真核表达载体 pEGFP-N1 多克隆位点的序列, 设计一对特异性引物 tue1、tue2 (表 1)。以 pET28a(+)/*tdh2-ompU* 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 46 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 反应 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物 5'和 3'端分别带有 *Xho* 和 *Bam*H 酶切位点。PCR 产物经序列分析后, 用 *Xho* 和 *Bam*H 酶切, 与经同样酶切反应的真核表达载体 pEGFP-N1 用 T₄ DNA 连接酶连接。连接产物 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 转化到 DH5 α 中, 提取质粒 DNA 后经酶切、PCR 扩增和测序检测, 筛选含有重组质粒的重组菌株。

1.7 真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 对大菱鲂的免疫及攻毒

实验前一周购买 180 尾健康养殖大菱鲂, 饲养于容积为 200L 的养殖筒中, 通气并正常换水、投饵, 水温 20 $^{\circ}$ C。实验共分 3 个处理组: 肌肉注射空质粒 50 μ g/尾大菱鲂试验组; 肌肉注射重组质粒 10 μ g/尾大菱鲂试验组; 肌肉注射重组质粒 50 μ g/尾大菱鲂试验组。以上处理组注射剂量均为 0.1ml/尾。接种后每周每组取 3 尾鱼进行静脉取血, 放在灭菌的离心管中, 室温静置 1h 后转入 4 $^{\circ}$ C 过夜, 10000g 离心 10min, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于抗体的检测。

大菱鲂免疫接种 4 周后每个处理组分为两部分, 其中一部分通过腹腔注射 0.3ml 浓度为 7.5×10^8 CFU/尾的副溶血弧菌 FYZ8621.4, 另一部分通过肌肉注射 0.1ml 浓度为 4.2×10^5 CFU/尾的鳃弧菌 W-1。每天正常通气、换水、投饵。攻毒 14d 后, 观察并记录各组大菱鲂的死亡情况, 计算相对免疫保护率(RPS)(Amend, 1981)。

$$RPS = (1 - \text{免疫组的死亡率} / \text{对照组的死亡率}) \times 100\%$$

1.8 RT-PCR 检测融合基因 *tdh2-ompU* 在大菱鲂肌肉组织表达

大菱鲂免疫 7 天后每组取 2 条鱼并取背部注射点周围的肌肉, 使用 TRIZOL 法提取总 RNA。经反转录 PCR(RT-PCR)合成 cDNA, RT-PCR 的方法和条件按 Yang 等(2009)的方法进行。以合成的 cDNA 为模板, 根据融合基因 *tdh2-ompU* 的一段序列(该段序列同时包含 *tdh2* 和 *ompU* 的保守序列)设计一对引物 rttu1、rttu2 (表 1)进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 45 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 反应 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.9 Western-bolt 检测融合基因 *tdh2-ompU* 在大菱鲂肌肉组织的表达

大菱鲂免疫 7 天后每组取 2 条鱼并取背部注射点周围的肌肉, 加入 1ml 蛋白提取液(100mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L PMSF, 6% SDS, 2% β -巯基乙醇, pH 6.8)冰浴匀浆 20min, 匀浆液 4 $^{\circ}$ C 10000g 离心 25min 后, 取上清液与 5 \times 上样缓冲液(250mmol/L Tris-HCl, 50%甘油, 10% SDS, 5% β -巯基乙醇, 0.5%溴酚蓝, pH 6.8)混匀, 经 12%的 SDS-PAGE 后将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上后, 按照武汉博士德公司的 Western-blot 试剂盒的方法进行免疫杂交, 其中用兔抗 *OmpU* 的抗血清作为一抗(1:1000)。

1.10 免疫大菱鲂血清中特异性抗体的 ELISA 检测

用直接酶联免疫法(ELISA)对大菱鲂体内产生的抗融合蛋白 TDH2-OmpU 的特异性抗体。具体按 Yang 等(2009)研究中的方法进行, 将从免疫大菱鲂分离到的血清按梯度进行稀释(1:64 到 1:12800)后与固定在酶标板上的融合蛋白结合, 用兔抗大菱鲂的血清 IgM(魏建腾等, 2008)作为一抗(1:1000)、HRP 标记的羊抗兔的 IgG(武汉博士德)作为二抗。反应终止后的酶标板在 450nm 处测量每孔的 OD 值, 血清样品 OD₄₅₀ 在 0.1 以上、OD 免疫组/OD 对照组 ≥ 2.1 可判为阳性, 反之则为阴性。

1.11 统计分析

通过 SPSS 软件的单向显著性差异功能对抗体效价的结果进行统计分析。以 0.05 作为检验因子, 当 $P < 0.05$ 时被认为差异性显著。

2 结果

2.1 融合基因 *tdh2-ompU* 的原核表达

副溶血弧菌 FYZ8621.4 的 *tdh2* 基因和鳃弧菌 W-1 的 *ompU* 基因的 PCR 产物分别连接于质粒

pMD19-T Simple, 构建 pMD19-T Simple/*tdh2* 和 pMD19-T Simple/*ompU*。分别用(*Bam*H 和 *Eco*R) 及(*Eco*R 和 *Xho*)进行酶切检测、PCR 扩增检测, 测序分析等表明重组质粒中分别包含 *tdh2* 基因和 *ompU* 基因完整的编码序列。其中 *tdh2* 基因包含 570bp 的开放阅读框(ORF), 编码 189 个氨基酸; *ompU* 基因包含 993bp 的 ORF, 编码 330 个氨基酸。用 Blast 进行序列比对证明该序列与 GenBank 中记录副溶血弧菌的 *tdh2* 基因和鳗弧菌的 *ompU* 基因的相似性为 100%。先后将 *tdh2* 和 *ompU* 基因与表达载体 pET28a(+) 连接, 构建融合蛋白原核表达质粒 pET28a(+)/*tdh2-ompU*, 经酶切、PCR 扩增以及测序分析, 证明 *tdh2* 和 *ompU* 融合基因构建成功。

2.2 融合蛋白的原核表达及纯化

重组质粒 pET28a(+)/*tdh2-ompU* 转化到表达菌株 BL21(DE3)中后, 接种于 LB 液体培养基进行扩大培

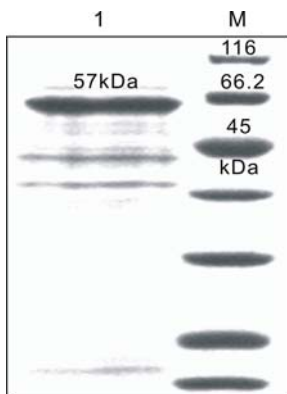


图 1 从菌体中纯化的重组融合蛋白 TDH2-OmpU 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant fusion protein TDH2-OmpU from the bacterial cells

注: 1. 从菌体中纯化的融合蛋白 TDH2-OmpU; M. Marker

养, 当 OD_{600} 值到达 0.6 左右时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 于 28℃ 进行诱导表达 6h, 诱导结束后离心收集菌体, 经 SDS-PAGE 检测后发现在 57kDa 处有特异的蛋白表达, 经计算此蛋白分子量等于 TDH2 和 OmpU 的蛋白分子量之和。诱导后的菌体用变性缓冲液重悬后, 超声波破碎细胞, 经 Ni 琼脂糖亲和柱纯化后, 梯度透析复性。SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白为单一的蛋白条带, 分子量为 57kDa(图 1)。

2.3 表达的融合蛋白对斑马鱼的毒性

为了检测融合蛋白 TDH2-OmpU 对鱼类是否具有毒性, 将 20 μ l 不同浓度纯化的融合蛋白通过腹腔注射到斑马鱼体内, 同时以注射生理盐水为阴性对照。观察 14d 后, 注射融合蛋白组没有出现任何得病症状, 也没有出现死亡。说明该融合蛋白对斑马鱼没有毒性。

2.4 融合基因 *tdh2-ompU* 真核表达质粒的构建及鉴定

融合基因 *tdh2-ompU* 连接到真核表达载体 pEGFP-N1 的多克隆位点中, 构建了重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*, 经酶切和 PCR 扩增检测, 分别能得

到相应的基因片段(图 2), 证明 *tdh2* 基因、*ompU* 基因以及融合基因 *tdh2-ompU* 都存在于 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 中。测序分析证明了融合基因序列完整性。

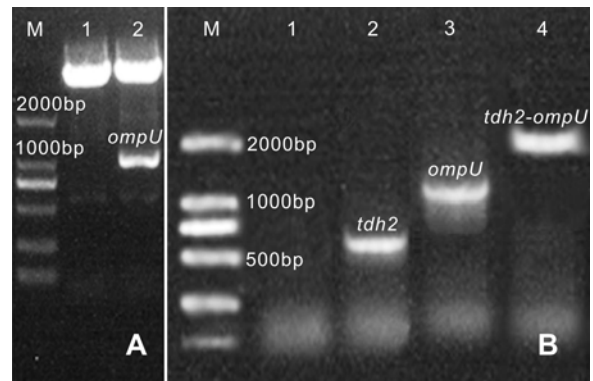


图 2 双酶切和 PCR 检测融合基因重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*

Fig.2 Detection of the recombinant plasmid pEGFP-N1/*tdh2-ompU* by double digestion and PCR reaction
A. 双酶切检测融合基因真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*. M. DL2000 DNA Mraker; 1. 阴性质粒; 2. *ompU* 基因的酶切结果。B. PCR 检测融合基因真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*. M. DL2000 DNA Mraker; 1. 阴性对照; 2. *tdh2* 基因的 PCR 结果; 3. *ompU* 基因的 PCR 结果; 4. *tdh2-ompU* 的 PCR 结果

2.5 RT-PCR 检测融合基因 *tdh2-ompU* 在大菱鲆肌肉组织的表达

取注射 DNA 疫苗第 7 天的大菱鲆, 提取肌肉组织的总 RNA 进行 RT-PCR 检测。结果在 500bp 处有一条特异性条带, 证明融合基因真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 在大菱鲆体内正常表达(图 3A)。

2.6 Western-blot 检测融合基因 *tdh2-ompU* 在大菱鲆肌肉组织的表达

取注射 DNA 疫苗第 7 天的大菱鲆, 提取肌肉组织的总蛋白, 进行 Western-blot 检测。结果在 57kDa 处有一条特异的免疫反应条带(图 3B), 进一步证明了融合基因能够在在大菱鲆体内正常表达。

2.7 免疫大菱鲆血清效价水平

图 4 显示了免疫接种后不同时间各处理组大菱鲆血清中特异性抗体效价的变化。由图 4 可以看出, 在免疫 2 周后, 接种不同剂量重组质粒的试验组大菱鲆的血清抗体效价水平均有明显地升高, 且升高幅度随接种剂量的增加而增大。注射了 10 μ g 和 50 μ g 真核表达质粒的大菱鲆的血清效价最高分别为 1 : 1024 和 1 : 2048。各免疫组血清抗体效价水平的变化规律

没有明显差别。而注射空质粒的对照组血清基本没有抗体效价,在不同时间内无明显变化。

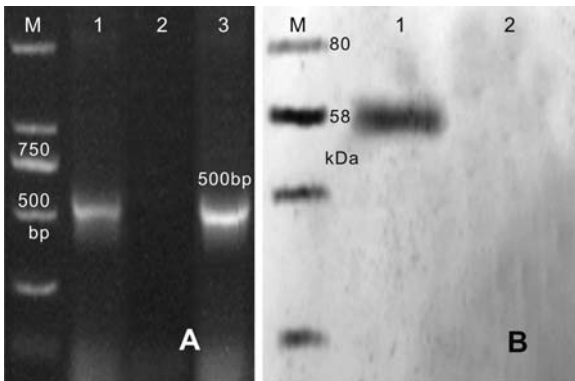


图3 RT-PCR(A)和 Western-blot(B)检测融合基因 *tdh2-ompU* 在大菱鲆肌肉组织中的表达

Fig.3 Detection of the expression of fusion gene *tdh2-ompU* in turbot muscle by RT-PCR (A) and Western-blot (B)

A: M. DL2000 DNA Marker; 1. *tdh2-ompU* 基因的阳性对照;
2. 注射质粒 pEGFP-N1 的大菱鲆肌肉; 3. 注射重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 的大菱鲆肌肉. B: M. 预染蛋白 Marker;
1. 注射重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 的大菱鲆肌肉;
2. 注射质粒 pEGFP-N1 的大菱鲆肌肉

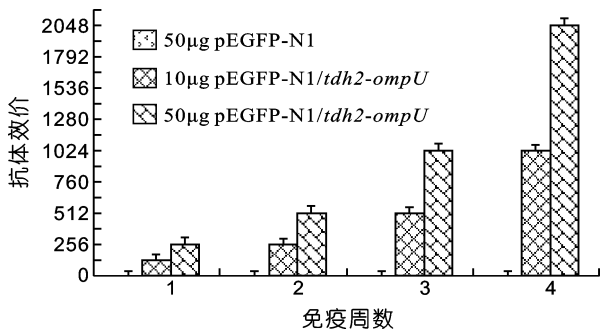


图4 注射重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 后免疫大菱鲆血清中抗融合蛋白的特异性抗体效价的变化

Fig.4 The titers of antiserum against fusion protein in turbot vaccinated with the recombinant plasmid pEGFP-N1/*tdh2-ompU*

2.8 真核表达质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 对大菱鲆的免疫保护作用

经感染预实验确定副溶血弧菌 FYZ8621.4 对大菱鲆的半数致死量为 9.25×10^7 CFU/尾鱼, 鳃弧菌 W-1 对大菱鲆的半数致死量为 1.26×10^5 CFU/尾鱼。因此使用剂量为 7.5×10^8 CFU/尾的 FYZ8621.4 和 4.2×10^5 CFU/尾的 W-1 对大菱鲆进行攻毒实验。

经 DNA 疫苗 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 免疫的大菱鲆对副溶血弧菌和鳃弧菌均有较好的抵抗效果。在副溶血弧菌攻毒组中接种 50µg、10µg 重组质粒大菱鲆的免疫保护率均为 100%。而注射空质粒的对照组在攻毒后 2 天开始陆续死亡, 到实验结束时累计死亡率 83.33%。鳃弧菌攻毒组中接种 50µg、10µg 重组质粒的大菱鲆死亡率分别为 85%和 65%, 免疫保护率为 15%和 35% (表 2)。而注射空质粒的对照组在攻毒后 2 天开始陆续死亡, 到实验结束时累计死亡率 100%。对照组大菱鲆摄食和运动能力明显下降, 注射部位出现红肿, 到实验后期体色变黑, 解剖发现肠道腹水严重。

3 讨论

已有不少鱼类细菌性病原 DNA 疫苗对免疫鱼类保护作用的报道。Kumar 等(2007)用鳃弧菌外膜蛋白 OMP38 DNA 疫苗免疫鲈鱼(*Lates calcarifer*)的免疫保护率为 55.60%。Liang 等(2011)用溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)鞭毛蛋白构建 DNA 疫苗 pcDNA-flaA 免疫红鲷鱼, 4 周后用 RT-PCR 检测到目的蛋白在肝、脾、肾、腮、肌肉组织中的表达, 免疫保护率为 88%。Sun 等(2010)用迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)表面抗原 Esa1 构建 DNA 疫苗, 在免疫牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)后的第 7、21 和 49 天时能检测到目的蛋白的转录, 3 周后能检测到特异性抗体, 对牙鲆的

表 2 重组质粒 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 对大菱鲆的免疫保护效果

Tab.2 Protective effect of the recombinant plasmid pEGFP-N1/*tdh2-ompU* on turbot

组别	死亡率(%) (死亡尾数/每组尾数)	死亡时间(d)	免疫保护率 RPS(%)
副溶血弧菌攻毒实验			
空质粒 50µg/尾大菱鲆实验组	83.33 (15/18)	2	—
重组质粒 10µg/尾大菱鲆实验组	0 (0/18)	14	100
重组质粒 50µg/尾大菱鲆实验组	0 (0/18)	14	100
鳃弧菌攻毒实验			
空质粒 50µg/尾大菱鲆实验组	100 (20/20)	2	—
重组质粒 10µg/尾大菱鲆实验组	85 (17/20)	3	15
重组质粒 50µg/尾大菱鲆实验组	65 (13/20)	4	35

免疫保护率为 57%。海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)分泌抗原 Sia10 的 DNA 疫苗免疫大菱鲂的保护率为 92.3%。作者曾利用鳃弧菌金属蛋白酶基因 DNA 疫苗对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)免疫, 取得较好的免疫保护效果(保护率为 71.4%)(Yang *et al*, 2009)。

DNA 疫苗一个显著优势是能够将不同来源基因序列插入到同一质粒中, 构建多联疫苗。关于二联重组蛋白疫苗的研究表明, 二联疫苗要优于单个蛋白疫苗及两个单价疫苗混合物的免疫效果(Mao *et al*, 2007; Mikalsen *et al*, 2005)。Zhang 等(2007)构建了哈维氏弧菌的外膜蛋白和甘油醛脱氢酶的融合蛋白, r-OmpK-GAPDH、蛋白 r-Omp 和 r-GAPDH 以及 OmpK 和 GAPDH 混合物对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)进行免疫, 结果发现单体蛋白和融合蛋白对鱼都有一定的保护作用, 单体蛋白的免疫保护率为 37.7%和 40.0%, 而融合蛋白的免疫保护率为 70%, 与单体蛋白相比融合蛋白中的 OmpK 和 GAPDH 产生了协同作用。Mao 等(2007)利用副溶血弧菌 zj2003 的 2 个外膜蛋白构成的融合蛋白对病原菌的抵抗力有明显提高。目前关于多联 DNA 疫苗的研究较少(Manthorpe *et al*, 1993)。

作者成功构建了包含副溶血弧菌 *tdh2* 基因和鳃弧菌 *ompU* 的融合蛋白原核表达质粒。表达后的融合蛋白 TDH2-OmpU 注射到斑马鱼体内, 没有引起斑马鱼发病和死亡, 证明该融合蛋白对鱼类没有毒性。将此融合基因连接到含有 SV40 和 PCMV 启动子的真核表达载体 pEGFP-N1 的多克隆位点中, 构建成二联 DNA 疫苗 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*。免疫大菱鲂 1 周后在其肌肉细胞中检测到融合蛋白的表达。通过 Western-blot 对表达的融合蛋白进行免疫杂交, 结果发现融合蛋白 TDH2-OmpU 能与兔抗鳃弧菌 OmpU 的抗体发生特异性结合, 表明在鱼体内表达的融合蛋白的结构中仍然分别保留了 TDH2 和 OmpU 或者至少是 OmpU 原有的抗原表位。这些结果能进一步证明 DNA 疫苗能在鱼体内引起特异的免疫应答。在被 DNA 疫苗 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 免疫过的大菱鲂的血清中, 能检测到融合蛋白 TDH2-OmpU 特异性抗体的存在, 并且抗体的效价与注射二联 DNA 疫苗的剂量成正相关。二联 DNA 疫苗对大菱鲂抵抗副溶血弧菌和鳃弧菌的免疫保护效果不尽相同, 在副溶血弧菌 FZY8621.4 的感染组中, 10 μ g 和 50 μ g 的 pEGFP-N1/*tdh2-ompU* 对大菱鲂表现出很好的保护效

果, 相对保护率都为 100%; 在鳃弧菌的感染组中, 两种剂量的疫苗对大菱鲂的相对保护率为 15%和 35%, 与 pEGFP-N1 对照组相比, 二联 DNA 疫苗对鳃弧菌感染的大菱鲂仍有显著的保护效果。Boudinot 等(1998)发现接种 DNA 疫苗 63—70d 后的鱼类通过 Southern-blot 和 PCR 扩增方法仍能在其注射部位的肌肉中检测到质粒 DNA 的存在。本研究中监测了 30 天内 DNA 疫苗在大菱鲂体内引起的抗体水平, 结果一直呈上升的趋势。

本研究构建了包含来自两种不同弧菌致病因子的二联 DNA 疫苗 pEGFP-N1/*tdh2-ompU*, 对大菱鲂进行免疫取得了较好的免疫保护效果。在后续实验中还将对注射剂量和免疫强度的关系以及更有效的疫苗接种方式做进一步研究, 使 DNA 疫苗在水产养殖业能得到更好的应用。

参 考 文 献

- 马爱军, 王新安, 薛宝贵等, 2010. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)选育家系的构建和培育技术研究. 海洋与湖沼, 41(3): 301—306
- 肖 慧, 李 军, 王祥红等, 1999. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病原菌的研究. 中国海洋大学学报, 29(1): 87—93
- 邹玉霞, 张培军, 莫照兰等, 2004. 大菱鲂出血症病原菌的分离和鉴定. 高技术通讯, 4: 89—93
- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 魏建腾, 陈吉祥, 王淑贤等, 2008. 大菱鲂血清免疫球蛋白 IgM 的纯化及应用研究. 中国海洋大学学报, 6: 932—936
- Amend D F, 1981. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand, 49: 1—486
- Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P *et al*, 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. Virology, 249: 297—306
- Kumar S R, Parameswaran V, Ahmed V P *et al*, 2007. Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*. Fish Shellfish Immunol, 23: 316—326
- Liang H, Wu Z H, Jian J C *et al*, 2011. Protection of red snapper (*Lutjanus sanguineus*) against *Vibrio alginolyticus* with a DNA vaccine containing flagellin flaA gene. Lett Appl Microbiol, 52: 156—161
- Luan X Y, Chen J X, Zhang X H *et al*, 2007. Expression and

- characterization of a metalloprotease from a *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Can J Microbiol*, 53: 1168—1173
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J *et al*, 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther*, 4: 419—431
- Mao Z J, Yu L, You Z Q *et al*, 2007. Expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39: 763—769
- Mikalsen A B, Sindre H, Torgersen J *et al*, 2005. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmonanemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine*, 23: 4895—4905
- Munn C B, 1994. The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol*, 4: 459—473
- Nishibuchi M, Kaper J B, 1990. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol*, 4: 87—99
- Reen F J, Almagro-Moreno S, Ussery D *et al*, 2006. The genomic code: inferring *Vibrionaceae* niche specialization. *Nat Rev Microbiol*, 4: 697—704
- Schnick R A, Alderman D J, Armstrong R *et al*, 1997. World wide aquaculture drug and vaccine registration progress. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 17: 251—260
- Sun Y, Hu Y H, Sun L *et al*, 2010. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. *Vaccine*, 28: 3905—3912
- Takeda Y, Taga S, Miwatani T, 1978. Evidence that thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is composed of two subunits. *FEMS Microbiol Lett*, 4: 271—274
- Yang H, Chen J X, Yang G P *et al*, 2009. Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Vibrio anguillarum* with a DNA vaccine containing the mutated zinc-metalloprotease gene. *Vaccine*, 27: 2150—2155
- Zhang C, Yu L, Qian R, 2007. 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*). *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1587—1599

CONSTRUCTION AND PROTECTION EVALUATION OF A BIVALENT DNA VACCINE CONTAINING *tdh2* OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *ompU* OF *V. ANGUILLARUM* ON TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

LIU Rui¹, ZHAO Ming-Jun¹, YANG Hui², CHEN Ji-Xiang^{1,3}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

2. Faculty of Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xian, 710072; 3. School of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, 730050)

Abstract Vibriosis is one of the most prevalent fish diseases caused by bacteria that belong to the genus *Vibrio*, in which *Vibrio parahaemolyticus* and *V. anguillarum* are two most common pathogenic agents. In this study, a thermostable direct hemolysin (TDH) gene *tdh2* of *V. parahaemolyticus* and an outer membrane protein (OMP) gene *ompU* of *V. anguillarum* were inserted into prokaryotic expression vector pET28a (+) successively. Then the gene encoding the fusion protein TDH2-OmpU was used to construct bivalent DNA vaccine. The protective efficiency of such vaccine against *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum* was evaluated in turbot *Scophthalmus maximus*. Fish immunized with a single intramuscular injection of different doses of the *tdh2-ompU* DNA vaccine showed significantly higher serum antibody levels after vaccination, compared to fish injected with the control eukaryotic expression vector pEGFP-N1. Four weeks after inoculation, turbot vaccinated with the bivalent DNA vaccine were exposed to *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum* by intraperitoneal injection and intramuscular injection, respectively. The highest relative percent survival (RPS) rates, 100% against *V. parahaemolyticus* and 35% against *V. anguillarum*, respectively, were recorded. Furthermore, humoral immune responses and protective effects significantly increased at higher vaccine doses.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, Thermostable direct hemolysin, Outer membrane protein, Bivalent DNA vaccine, Turbot *Scophthalmus maximus*, Immunity