



弧菌外膜蛋白OmpU的免疫交叉反应性和交叉保护性

伦镜盛, 张设熙, 董亚萍, 谢少凤, 麦亨, 梅颖怡, 胡忠*

汕头大学生物系, 微生物实验室, 广东 汕头 515063

摘要: 【目的】通过对弧菌外膜蛋白OmpU的克隆、表达以及免疫学特性分析, 明确外膜蛋白OmpU是否为弧菌的共同抗原, 并具有免疫交叉反应性和交叉保护性。【方法】对弧菌外膜蛋白ompU基因进行克隆和生物信息学分析。分别制备副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和霍乱弧菌的OmpU重组蛋白抗血清, 对OmpU的免疫交叉反应特性以及抗原表位定位情况进行比较分析。以霍乱弧菌的OmpU重组蛋白免疫小鼠后, 再以多种弧菌进行攻毒, 分析其交叉免疫保护作用。【结果】外膜蛋白OmpU在弧菌种内和种间相似性分别为73.0%–100%和58.6%–89.0%, 并至少存在9个保守的B细胞抗原表位。OmpU重组蛋白抗血清在弧菌种内和种间均产生显著的免疫交叉反应, 识别弧菌中分子量35–40 kDa的同源蛋白。副溶血弧菌ATCC17802、创伤弧菌ATCC27562和拟态弧菌ATCC33653来源的OmpU重组蛋白抗体能识别供试菌株, 提示这些菌株的OmpU抗原表位定位于细胞表面。OmpU重组蛋白对免疫后的小鼠具有交叉免疫保护作用, 攻毒实验后小鼠相对存活率(RPS)为43.0%–100%。【结论】上述结果表明, 外膜蛋白OmpU是弧菌中一种保守的共同抗原, 具有免疫交叉保护性, 可以作为弧菌广谱疫苗的首选抗原。

关键词: 弧菌, 外膜蛋白, OmpU, 交叉反应性, 交叉保护性

共同抗原(common antigen), 又称“交叉反应性抗原(cross reacting antigen)”, 指2种抗原性物质中的共同抗原分子。抗原(或抗体)除与其相应的抗体(或抗原)发生特异性反应外, 还与其他抗体(或抗原)发生反应, 称为交叉反应(cross-reaction)^[1-2]。弧菌种类多, 血清型复杂, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V.*

alginolyticus)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、霍乱弧菌(*V. cholera*)、拟态弧菌(*V. mimicus*)等多种弧菌是典型的人-兽-渔共患的病原菌^[3]。对弧菌共同抗原和广谱疫苗的筛选和研制, 成为近年来一个新的研究方向和热点^[4-7]。目前, 采用免疫蛋白质组技术, 结合基因克隆、原核表达和抗体制备等方法, 已从副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌(*V.*

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金(2013GB2E000368); 广东省科技计划(2012B020308008); 汕头市科技计划(67)

*通信作者。Tel: +86-754-86502081; E-mail: hzh@stu.edu.cn

收稿日期: 2015-08-11; 修回日期: 2015-11-01; 网络出版日期: 2016-01-22

harveyi) 等病原菌的外膜蛋白中发现了OmpK^[8-11]、Lun等^[12]多个良好的天然广谱疫苗位点。国内外研究显示, 弧菌的外膜蛋白OmpU具有良好的免疫原性和免疫保护性, 能使被免疫的动物抵抗副溶血弧菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌等病原菌的侵袭和感染, 是一种潜在的疫苗候选抗原^[13-17]。但目前对于弧菌外膜蛋白OmpU免疫交叉反应性(cross-reactivity)和交叉保护性(cross-protection) 方面的研究还鲜有报道。课题组前期对 *ompU* 基因的克隆和生物信息学分析显示, *ompU* 基因在弧菌中普遍存在, 且在弧菌种内(intra-species)和种间(inter-species)均具有较高的相似性, 可能是弧菌中一种潜在的共同抗原。为此, 本文拟通过对弧菌 *ompU* 基因进行克隆和表达, 制备重组蛋白抗血清, 并进一步通过Western blot、Whole-cell ELISA技术对弧菌OmpU免疫交叉反应谱、抗原表位的细胞定位等免疫交叉反应特性进行分析, 以及通过免疫动物与攻毒实验对OmpU的免疫交叉保护作用进行评价, 以期作为OmpU作为弧菌广谱疫苗的研制, 以及弧菌病(Vibriosis)的防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

副溶血弧菌CGMCC1.1615、CGMCC1.1616和溶藻弧菌CGMCC1.1833购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC, 北京)。溶藻弧菌MCCC1A08081、MCCC1H00082、创伤弧菌MCCC1A08743、MCCC1H00047购买于中国海洋微生物菌种保藏管理中心(Marine Culture Collection of China, MCCC, 厦门)。副溶血弧菌ATCC17802、溶藻弧菌ATCC33787、创伤弧菌ATCC27562、拟态弧菌ATCC33653、河弧菌(*V. fluvialis*) ATCC33810、弗尼斯弧菌(*V. furnissii*)

ATCC33813、解蛋白弧菌(*V. proteolyticus*) ATCC15338、需钠弧菌(*V. natrigens*) ATCC14048和海弧菌(*V. pelagius*) ATCC25916购于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)。鳗弧菌(*V. anguillarum*) NBRC13266、哈维氏弧菌NBRC15634、美人鱼弧菌(*V. damsel*) NBRC15633、费氏弧菌(*V. fischeri*) NBRC101058、灿烂弧菌(*V. splendidus*) NBRC101061、麦契尼柯夫弧菌(*V. metschnikovii*) NBRC103153、坎氏弧菌(*V. campbellii*) NBRC15631和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) NBRC12658购于日本技术评价研究所生物资源中心(NITE Biological Resource Center, NBRC, Japan)。副溶血弧菌VPL4-90和非O1群霍乱弧菌Vb0由汕头市疾病预防控制中心保藏, 并提供实验所需的DNA、蛋白质及灭活菌体等样品。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、Rosetta (DE3)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由本实验室保藏。

1.2 实验动物

新西兰大白兔(约2.5 kg, 雌性)购于广东医学动物实验中心, 昆明系小白鼠[(28 \pm 2) g, 雌雄各半]购于汕头大学医学院实验动物中心。

1.3 弧菌外膜蛋白 *ompU* 基因的克隆与生物信息学分析

根据NCBI数据库中已公布的弧菌 *ompU* 的基因序列, 利用引物设计软件(CODEHOP、Primer-Premier 5.0等)设计PCR扩增的简并引物(表1)。分别以副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌和拟态弧菌的基因组DNA作为模板进行PCR扩增, PCR反应结束后, 按PCR克隆试剂盒(pMD19-T Vector Kit, TaKaRa)操作流程, 将PCR产物连接至T载体上, 并转化 *E. coli* DH5 α , 每个克隆至少重复测序2次。

表1. 弧菌外膜蛋白基因ompU克隆的简并引物
Table 1. Degenerate primers used for ompU cloning of Vibrio species

Primers*	Primer sequence (5'→3')	T _m /°C	Product size/bp
VpCF	ATGAARAAGRCWSYAHTDRC	53.0	993
VpCR	TTAGAAGTCGTAACGTASAC	53.7	
ValCF	ATGAARAAAGRCWSYAMTB	50.4	1011
ValCR	YTAGAARYCGTAACGTASRC	55.8	
VvCF	ATGAARAAGACATTAATCGCAC	53.6	1011
VvCR	TTAGAAGTCGTAACGTAGACCTAG	58.6	
VcCF	ATGAASAAGACTCTRNTKGCTCT	51.1	1038
VcCF	TTAGAAGYCGTAACGTAGACCRA	56.8	
VmCF	ATGAAMAAGRCWSYRRTKGC	55.8	1032
VmCR	TTAGAARTCGTAACGTARAC	51.7	

*: Vp: *V. parahaemolyticus*; Val: *V. alginolyticus*; Vv: *V. vulnificus*; Vc: *V. cholera*; Vm: *V. mimicus*.

下载NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中已公布的副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌和拟态弧菌的ompU基因的氨基酸序列, 利用ClustalX 1.81进行多序列比对, 并用MEGA 4.0软件构建基于Minimum Evolution法的系统发育树。利用DNAMAN软件对OmpU氨基酸序列进行保守性分析, 并分析种内、种间的相似性范围。另外利用在线工具IEDB (<http://www.iedb.org/>)对副溶血弧菌ATCC17802进行B细胞抗原表位预测, 然后以得到的抗原表位序列为模板, 对弧菌的OmpU氨基酸序列进行多重序列比对, 分析弧菌OmpU抗原表位的同源性。

1.4 重组蛋白的表达、纯化与抗体的制备

利用在线的信号肽分析软件Signal 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 对ompU基因的氨基酸序列进行信号肽预测, 并设计PCR的表达引物以去除编码信号肽的核苷酸序列(表2), 分别以副溶血弧菌ATCC17802、溶藻弧菌ATCC33787、创伤弧菌ATCC27562、霍乱弧菌Vb0和拟态弧菌ATCC33653的基因组作为模板进行PCR扩增, PCR产物连接到pET-32a构建异源表达载体, 转化到*E. coli* BL21(DE3), 每个克隆至少重复测序2次。

将OmpU重组菌接种到LB培养基(含Amp 100 µg/mL)中, 37 °C振荡培养至对数生长期, 加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导6 h。离心收集菌体, 利用亲和层析(镍琼脂糖凝胶FF, 广州威佳公司)对OmpU重组蛋白进行纯化, 并进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(12%分离胶, 5%浓缩胶)。纯化后的OmpU重组蛋白利用超滤管(Ultra-15, Millipore)浓缩, 经SDS-PAGE电泳后, 进行免疫印迹(Western blot)(以抗His-Tag为一抗, 碧云天生物技术研究)或MALDI-TOF-TOF质谱分析鉴定。

取纯化的OmpU重组蛋白作为抗原(免疫剂量约为250 µg蛋白/kg兔), 与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射, 免疫新西兰大白兔。每隔两周加强免疫1次, 加强免疫时, 免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。第2次加强免疫后第7天采血测定血清效价。待确定产生抗体后采血, 收集血清。免疫前取兔血清, 以作阴性对照。

1.5 Western blot分析

将待测菌株扩培至OD₆₀₀约为0.6, 离心收集菌体, 以无菌PBS洗涤并重悬菌体, 在冰浴上超

表2. 弧菌*ompU*基因的表达引物
Table 2. Expressing primers used for *ompU* gene of *Vibrio* species

Primers [*]	Primer sequence (5'→3')	Product size/bp ^{**}	Restriction sites
VpUF	CGCGGATCCATGAAAAAGACTGTACTTG	993	<i>Bam</i> H I
VpUR	CCGCTCGAGGAAGTCGTAACGTAGAC		<i>Xho</i> I
ValUF	CGCGGATCCATGAAAAAGACTCTAAT	1011	<i>Bam</i> H I
ValUR	CCGCTCGAGGAAATCGTAACGTAAAC		<i>Xho</i> I
VvUF	CGCGGATCCATCGCACTTTCTGTATC	993	<i>Bam</i> H I
VvUR	CCGCTCGAGGAAGTCGTAACGTAGAC		<i>Xho</i> I
VcUF	GCGGATCCGCGGAAAATCTATAACCAGGAT	948	<i>Bam</i> H I
VcUR	GCGAGCTCTTAGAAGTCGTAACGTAGACCG		<i>Sac</i> I
VmUF	CGCGGATCCATGAACAAGACTGTGATTGC	1032	<i>Bam</i> H I
VmUR	CCGCTCGAGTTAGAAATCGTAACGTAGAC		<i>Xho</i> I

^{*}: Vp: *V. parahaemolyticus*; Val: *V. alginolyticus*; Vv: *V. vulnificus*; Vc: *V. cholera*; Vm: *V. mimicus*. ^{**}: signal peptide was found in the deduced amino acid sequences of *ompU* gene from *V. vulnificus* (6 amino acids) and *V. cholera* (30 amino acids), respectively. Primers were designed to amplify the *ompU* gene and to remove its signal peptide coding sequence.

声破碎，离心后取上清制成菌体总蛋白液，并用Bradford法进行定量分析。取等量的菌体总蛋白液进行SDS-PAGE电泳(12%分离胶，5%浓缩胶)。电泳结束后采用电转印法将蛋白转移至PVDF膜(Merck Millipore)，加入含5% (W/V) 脱脂奶粉的封闭液，室温封闭2 h。加入1:1000稀释的一抗(OmpU重组蛋白兔抗血清)，37 °C孵育2 h。清洗后加入1:2000稀释的二抗(HRP标记的羊抗兔IgG, 碧云天生物技术研究所)，37 °C孵育1 h。清洗后加入二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride, DAB, 碧云天生物技术研究所)显色。

1.6 全细胞酶联免疫反应(Whole-cell ELISA)分析

将待测菌株扩培至 OD_{600} 约为0.6，离心收集菌体，以无菌PBS (含0.5%甲醛)洗涤并重悬菌体，制成细胞悬液($OD_{600}=1.0$)。用包被缓冲液将上述细胞悬液稀释100倍后加入酶标板中，4 °C包被过夜。清洗后加入含5% (W/V)脱脂奶粉的封闭液，37 °C封闭2 h。清洗后加入1:1000稀释的一抗(OmpU重组蛋白兔抗血清)孵育，并以阴性血清代替一抗作阴性对照，以PBS代替一抗作空白对照，37 °C孵育1 h。清洗后加入1:1000稀释的二抗

(HRP标记的羊抗兔IgG, 碧云天生物技术研究所)，37 °C孵育1 h。清洗后加入四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB)显色液，37 °C下避光反应15 min。终止显色后用酶标仪记录 OD_{450} 。 $P/N=(\text{实验组 } OD_{450}-\text{空白对照 } OD_{450})/(\text{阴性对照 } OD_{450}-\text{空白对照 } OD_{450})$ ，当 $P/N \geq 2.1$ 时，判定为阳性。

1.7 动物免疫与攻毒实验

利用纯化的重组外膜蛋白OmpU (霍乱弧菌Vb0来源)作为抗原，与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射，对小鼠进行免疫(注射2点，0.2 mL/点，免疫剂量约为20 μg蛋白/鼠)。1周后，按同样方法进行加强免疫(抗原与弗氏不完全佐剂混匀、乳化，免疫剂量减半)。在第2次加强免疫后的第7天，小鼠断尾取血，测定效价，检查是否有抗体产生。对照组以无菌生理盐水代替抗原进行免疫。

免疫后，将抗原免疫的小鼠随机分成4组，每组20只，雌雄各半，为免疫组；将无菌生理盐水免疫的小鼠随机分成4组，每组20只，雌雄各半，为对照组。分别以75%致死量的菌液腹腔注射到

各组小鼠体内进行攻毒, 包括霍乱弧菌(3.89×10^8 CFU), 副溶血弧菌(2.45×10^9 CFU), 创伤弧菌(8.90×10^8 CFU) 和拟态弧菌(6.59×10^8 CFU)。正常条件下饲养、观察两周, 记录小鼠死亡数和病理现象, 取死鼠腹腔液在TCBS琼脂(广东环凯微生物科技有限公司)平板上划线, 以确认病原菌。相对存活率(Relative percentage survival, RPS)=[1-(免疫组死亡率/对照组死亡率)] $\times 100\%$ 。以Student-*t*检验作差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 弧菌外膜蛋白ompU基因的克隆及生物信息学分析

为了研究弧菌外膜蛋白OmpU的特性, 设计简并引物对ompU基因进行克隆及生物信息学分析。PCR扩增获得了10株弧菌的ompU基因(部分序列已提交至GenBank), 其编码区大小在993–1038 bp之间, 编码331–346个氨基酸。氨基酸序列比对结果显示, OmpU在弧菌的种内(intra-species)和种间(inter-species)相似性分别为73.0%–100.0%和58.6%–89.0% (表3), 系统发育树分析进一步显示了弧菌OmpU之间的进化关系(图1)。另外, 抗原表位预测及比对发现, 在弧菌的OmpU中至少存在9个保守的B细胞抗原表位(表4)。这些结果说明, 外膜蛋白OmpU在弧菌中不但在氨基

表3. 弧菌种内、种间OmpU氨基酸序列相似性分析
Table 3. Similarities analysis of amino acid sequences of OmpU intra- and inter- *Vibrio* species

<i>Vibrio</i> species	Similarities intra-species/%	Similarities inter-species/%
<i>V. parahaemolyticus</i>	93.0–99.7	61.2–89.0
<i>V. alginolyticus</i>	85.8–99.7	60.9–89.0
<i>V. vulnificus</i>	81.0–99.7	64.4–81.5
<i>V. cholera</i>	73.0–100	58.6–86.4
<i>V. mimicus</i>	80.8–99.4	64.0–86.4

酸序列上具有较高的相似性, 而且还具有较为保守的抗原表位。

2.2 重组蛋白的表达、纯化和抗体的制备

为了研究外膜蛋白OmpU的免疫学特性, 对5种弧菌(包括副溶血弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和霍乱弧菌)的ompU基因进行了克隆表达, 并制备重组蛋白抗血清。经推算, OmpU重组蛋白的分子量分别为: 副溶血弧菌53.2 kDa、拟态弧菌54.5 kDa、创伤弧菌53.0 kDa、溶藻弧菌54.3 kDa和霍乱弧菌52.0 kDa (5种OmpU重组蛋白均为融合蛋白, N端含有一段分子量约为17.7 kDa的组氨酸标签(6 \times His-Tag))。以1 mmol/L IPTG诱导重组菌表达OmpU重组蛋白, 利用Ni²⁺-琼脂糖亲和层析进行纯化, 再以SDS-PAGE电泳(图2-A)和Western blot分析(图2-B)对OmpU重组蛋白进行鉴定。以纯化的OmpU重组蛋白作为抗原免疫兔子, 获得的OmpU重组蛋白抗血清效价均大于1:100000 (数据未显示)。结果提示, 5种弧菌的OmpU重组蛋白抗血清具有较高的效价, 可进一步用于Western blot和Whole-cell ELISA分析。

2.3 OmpU重组蛋白抗血清交叉反应特性分析

为了研究OmpU在弧菌中是否具有交叉反应性, 以OmpU重组蛋白抗血清为一抗进行Western blot分析。如图3, Western blot分析结果显示, 抗血清能与供试菌总蛋白发生交叉反应, 显色条带清晰, 其分子量在35–40 kDa之间, 与预测的OmpU分子量相符, 提示OmpU重组蛋白抗体能识别供试菌中OmpU的同源蛋白。副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和霍乱弧菌来源的OmpU重组蛋白抗血清均能识别全部供试弧菌OmpU的同源蛋白。而用于对照的非弧属细菌则没有发生交叉反应或是反应较弱。结果提示, 外膜蛋白OmpU在弧菌中普遍存在, 并在弧菌种内和种间均展示出显著的免疫交叉反应, 具有交叉

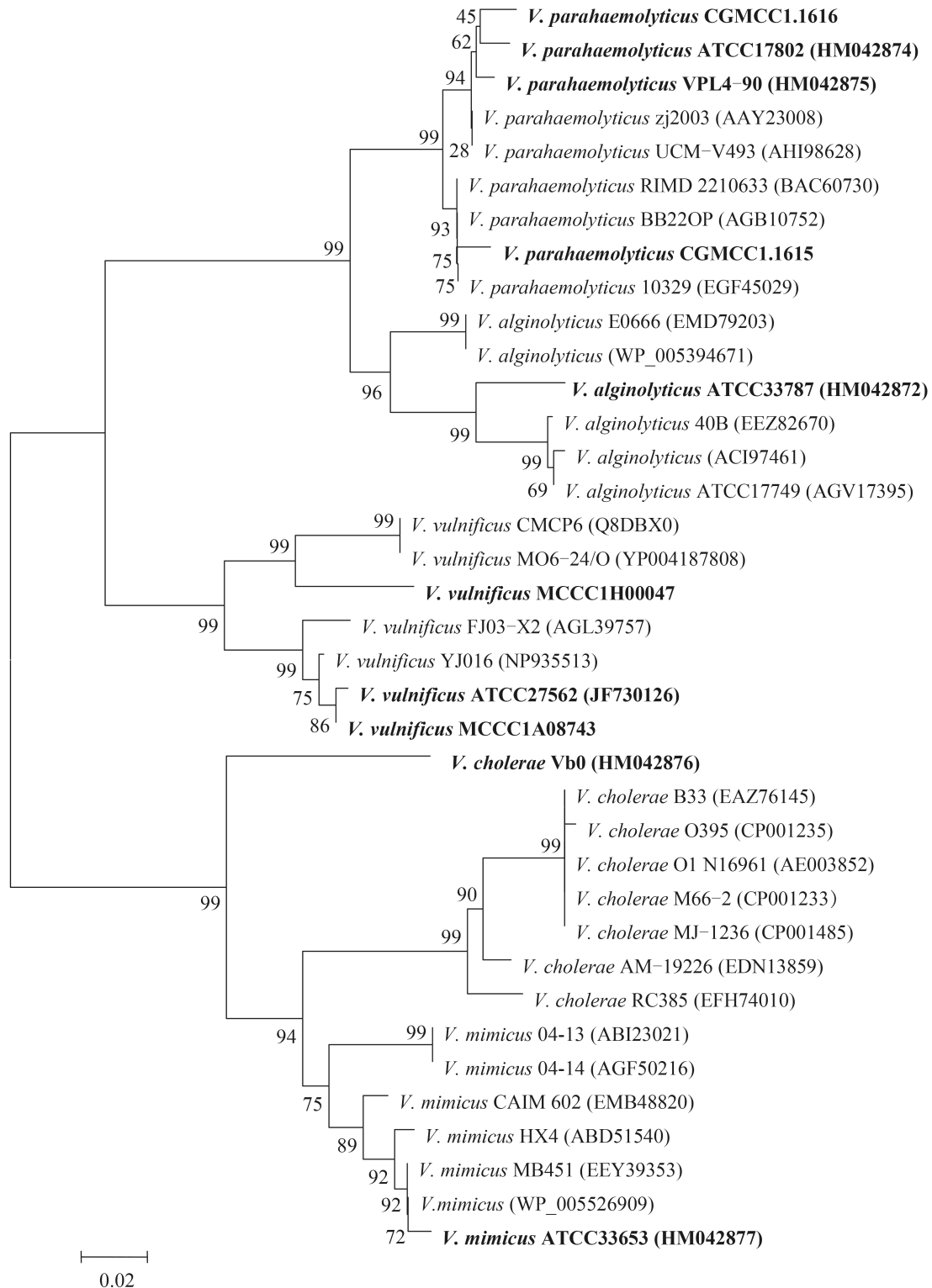


图 1. 弧菌 *ompU* 基因氨基酸序列的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of *Vibrio ompU* gene. The tree was constructed using a Minimum Evolution method (Bootstrap=1000). The *ompU* genes cloned in this study are shown in bold.

表4. 弧菌OmpU中保守的抗原表位
Table 4. Homologous epitopes of OmpU found in *Vibrio* species

Positions	Epitopes	Length
4-14	L L A L S V S A A A	11
96-102	R Y A Y A G L	7
117-123	A L G V I T D	7
137-143	D K L A V A D	7
157-165	N L N V K A S Y R	9
183-196	G Y S L S A I Y A V A D T G	14
246-259	L A G A Y T L G Q T V F T I	14
274-284	N F A V D A S Y Y F K	11
288-296	R G Y V S Y N F N	9

The epitopes of *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 OmpU were predicted. Then the predicted epitopes were utilized as templates for multiple alignment analysis in other tested *Vibrio* strains of figure 1. Identical amino acid residues were boxed in black, amino acid residues with similar side chains were boxed in gray, and amino acid residues with different side chains were boxed in white.

反应抗原的特性。

为了进一步研究OmpU重组蛋白抗血清与弧菌外膜蛋白之间的交叉反应特征，利用OmpU抗血清与13株弧菌的菌体细胞进行Whole-cell ELISA分析。结果显示，副溶血弧菌ATCC17802、创伤弧菌ATCC27562和拟态弧菌ATCC33653来源的OmpU重组蛋白抗血清均能与13株供试弧菌的菌体细胞发生交叉反应，P/N值在4-10之间(图4-A、C、D)。结果提示，OmpU重组蛋白抗体能识别供试菌体细胞表面的抗原表位，进一步确认这些弧菌外膜蛋白OmpU具有(至少是部分)暴露于细胞表面的抗原表位。而溶藻弧菌ATCC33787来源的OmpU重组蛋白抗血清在Western blot分析中能识别弧菌的菌体总蛋白，但

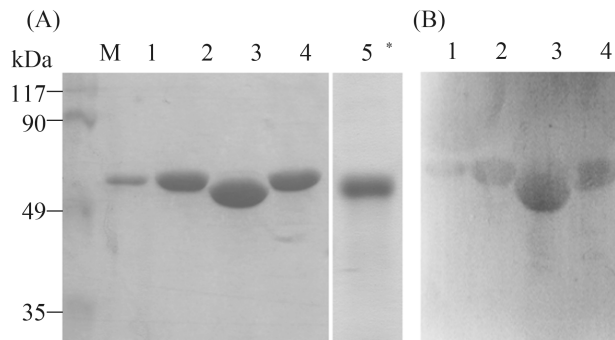


图 2. 重组蛋白OmpU的SDS-PAGE分析 (A) 及 Western blot分析 (B)

Figure 2. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the purified recombinant protein. A: SDS-PAGE profile of recombinant OmpU purified by Ni-NTA agarose. M: Marker; lane 1-5: the purified recombinant OmpU of *V. parahaemolyticus* ATCC17802 (53.2 kDa), *V. mimicus* ATCC33653 (54.5 kDa), *V. vulnificus* ATCC27562 (53.0 kDa), *V. alginolyticus* ATCC33787 (54.3 kDa) and *V. cholera* Vb0 (52.0 kDa), respectively. B: Western blot analysis with the anti-His-Tag serum. lane 1-4: corresponding to purified recombinant OmpU *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. mimicus* ATCC33653, *V. vulnificus* ATCC27562 and *V. alginolyticus* ATCC33787 in the (A), respectively. *: recombinant OmpU of *V. cholera* Vb0 was confirmed by the mass spectrometry analysis after SDS-PAGE (data not shown).

在Whole-cell ELISA分析中却不能识别供试菌株的菌体细胞(图4-B)。另外，用于对照的非弧菌属细菌则没有发生免疫交叉反应。

2.4 OmpU重组蛋白免疫交叉保护性研究

为了对弧菌OmpU的免疫交叉保护性进行分析，利用霍乱弧菌Vb0来源的OmpU重组蛋白作为抗原免疫动物，并选取在Western blot和Whole-cell ELISA分析中免疫交叉反应显著的4种病原弧菌进行攻毒实验。结果如表5所示，OmpU重组蛋白免疫组小鼠的累计死亡率显著低于对照组小鼠的累计死亡率($P < 0.05$)，在霍乱弧菌Vb0、副溶血弧菌ATCC17802、创伤弧菌ATCC27562和拟态弧菌ATCC33653的攻毒实验中，小鼠的相对存活率分

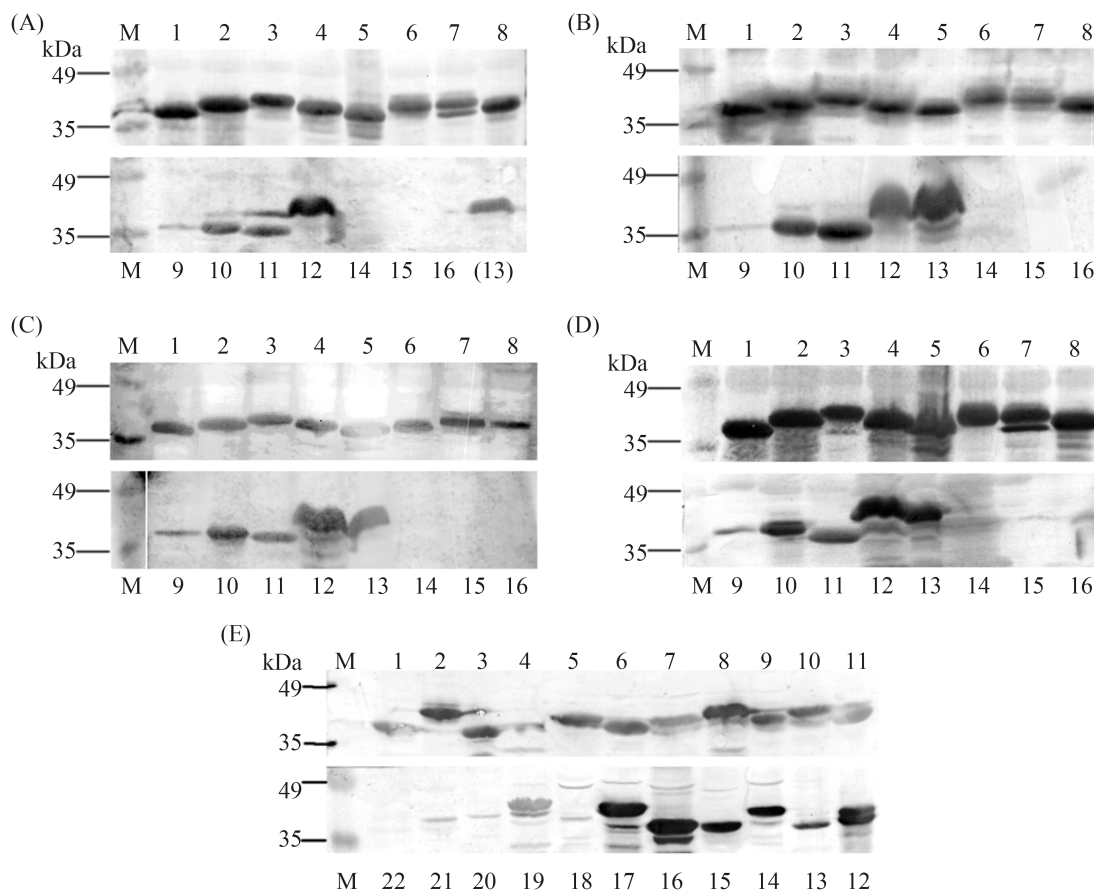


图 3. OmpU重组蛋白抗血清与细菌总蛋白的Western blot 分析

Figure 3. Western blot with the anti-OmpU sera against different bacteria. A–E: Western blot analysis with the anti-OmpU sera (*V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. alginolyticus* ATCC33787, *V. vulnificus* ATCC27562, *V. mimicus* ATCC33653 and *V. cholera* Vb0-derived, respectively). lane 1–13 of (A)–(D): cell lysates of *Vibrio* species, including *V. parahaemolyticus* ATCC17802, VPL4-90, CGMCC1.1615 and CGMCC1.1616, *V. alginolyticus* ATCC33787, CGMCC1.1833, MCCC1A08081 and MCCC1H00082, *V. vulnificus* ATCC27562, MCCC1A08743 and MCCC1H00047, *V. cholera* Vb0 and *V. mimicus* ATCC33653, respectively. lane 14–16: cell lysates of non *Vibrio* species, including *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli* DH5 α , respectively. lane 1–19 of (E): cell lysates of *Vibrio* species, including *V. pelagius* ATCC25916, *V. natriegens* ATCC14048, *V. furnissii* ATCC33813, *V. fluvialis* ATCC33810, *V. mimicus* ATCC33653, *V. vulnificus* ATCC27562, *V. alginolyticus* ATCC33787, *V. cholera* Vb0, *V. parahaemolyticus* ATCC17802, and VPL4-90, *V. proteolyticus* ATCC15338, *V. fischeri* NBRC101058, *V. damsela* NBRC15633, *V. harveyi* NBRC15634, *V. metschnikovii* NBRC103153, *V. campbellii* NBRC15631, *V. splendidus* NBRC101061, *V. anguillarum* NBRC13266 and *A. hydrophila* NBRC12658, respectively. lane 20–22: cell lysates of non *Vibrio* species, including *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* DH5 α , respectively.

别为94%、43%、100%和63%。结果提示，OmpU是弧菌中一种交叉保护性抗原，可作为对抗包括霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌在内引起的弧菌病的广谱疫苗候选抗原。

3 讨论

外膜蛋白(Outer membrane protein, Omp)为革兰氏阴性细菌外膜的主要结构成分，在外膜结构的维持、物质运输等方面有重要作用。此外，外

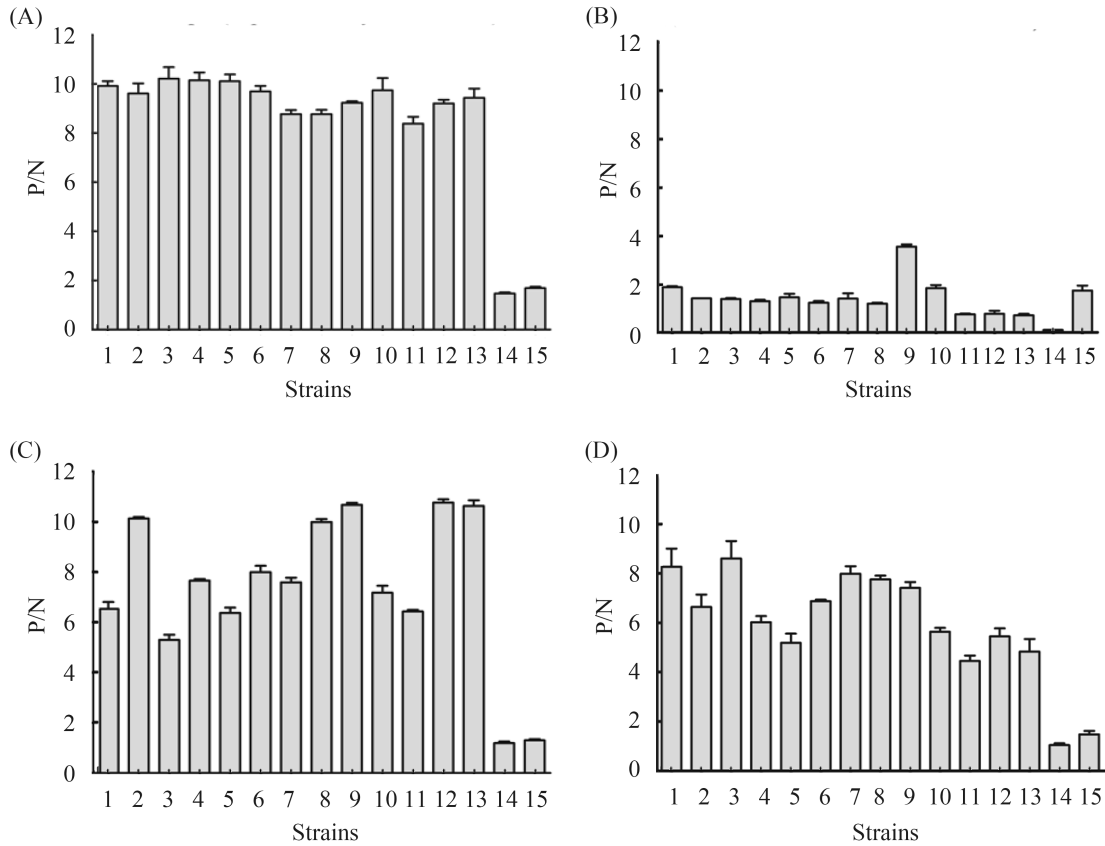


图 4. 重组蛋白抗血清与弧菌菌体细胞的Whole-cell ELISA分析

Figure 4. Whole-cell ELISA analysis with the serum of recombinant protein against different bacterium. A–D: whole-cell ELISA analysis with the anti-OmpU sera (*V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. alginolyticus* ATCC33787, *V. vulnificus* ATCC27562 and *V. mimicus* ATCC33653-derived, respectively). 1–13: *V. parahaemolyticus* ATCC17802, VPL4-90, CGMCC1.1615 and CGMCC1.1616; *V. alginolyticus* ATCC33787, CGMCC1.1833, MCCC1A08081 and MCCC1H00082; *V. vulnificus* ATCC27562, MCCC1H00047 and MCCC1A08743; *V. mimicus* ATCC33653 and *V. cholera* Vb0, respectively. 14–15: *B. subtilis*, *E. coli* DH5a.

表5. 四种病原弧菌攻毒后免疫组及对照组小鼠死亡率
Table 5. the Mortality of vaccinated and unvaccinated mice

Challenge strains	Accumulating death dates in control group	Accumulating death dates in immunized group	RPS/%	Identities/%*
<i>V. cholera</i> Vb0	85% (17/20)	5% (1/20)	94	100.0
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	70% (14/20)	40% (8/20)	43	72.3
<i>V. vulnificus</i> ATCC27562	75% (15/20)	0% (0/20)	100	75.6
<i>V. mimicus</i> ATCC33653	95% (19/20)	35% (7/20)	63	86.7

*: Identity of amino acid sequence of OmpU between challenge strain and homogenous *V. cholera* Vb0.

膜蛋白也是一种良好的抗原，可刺激机体产生特异性抗体及某些细胞因子，从而保护机体免受感染^[18-19]。外膜蛋白OmpU是弧菌的主外膜蛋白

(major outer membrane protein)^[20]，在霍乱弧菌、拟态弧菌、费氏弧菌等病原菌致病过程中起着十分重要的作用，与细菌的粘附、定殖、胆汁耐受

等功能有关^[21-25]。此外,目前已阐明,外膜蛋白OmpU是副溶血弧菌、拟态弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌等病原菌的保护性抗原之一^[13-17]。但尚未发现关于弧菌外膜蛋白OmpU免疫交叉反应特性、交叉保护性方面的报道。课题组前期对弧菌*ompU*基因的克隆和生物信息学分析发现,副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌和拟态弧菌*ompU*基因的氨基酸序列种内和种间的相似性分别为73.0%–100%和58.6%–89.0%(表3)。此外,在这些弧菌的OmpU中至少存在9个保守的B细胞抗原表位(表4)。这些结果提示,外膜蛋白OmpU可能是弧菌的一种共同抗原。

为了证实这一假设,对副溶血弧菌ATCC17802、溶藻弧菌ATCC33787、创伤弧菌ATCC27562、霍乱弧菌Vb0和拟态弧菌ATCC33653的*ompU*基因进行了克隆、表达、纯化以及制备OmpU重组蛋白抗血清,并利用上述弧菌的OmpU重组蛋白抗血清进行免疫学分析。Western blot分析显示,5种弧菌的OmpU重组蛋白抗血清均能与供试菌中35–40 kDa的OmpU同源蛋白发生交叉识别,在弧菌种内和种间均展示出显著的免疫交叉反应(图3)。提示外膜蛋白OmpU在弧菌中普遍存在,并具有交叉反应性抗原的特性。

Li等^[26]研究发现,某些蛋白虽然具有良好的抗原性,能刺激免疫细胞产生抗体,但由于这些抗原并非定位于细胞表面,抗体不能有效地识别这些抗原的抗原表位,因而难以发挥杀菌活性和保护活性。外膜蛋白由于定位于细胞膜表面,其抗原表位更容易被抗体及免疫细胞识别,从而引起免疫应答或者发挥免疫效应^[27]。因此外膜蛋白是杀菌性和保护性抗体(bactericidal and protective antibodies)的理想靶标^[12,26,28]。Whole-cell ELISA被广泛用于目标蛋白的亚细胞定位分析^[12,26,28],为了进一步研究OmpU在弧菌中的亚细胞定位,利用OmpU重组蛋白抗血清与供试菌株的菌体细胞反

应,进行Whole-cell ELISA分析。副溶血弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌来源的OmpU重组蛋白抗体能与副溶血弧菌(4株)、溶藻弧菌(4株)、创伤弧菌(3株)、霍乱弧菌(1株)和拟态弧菌(1株)菌体细胞表面的抗原表位发生交叉识别反应(图4-A、C、D),提示上述这些弧菌的OmpU具有(至少是部分)定位于细胞表面的抗原表位。然而,溶藻弧菌来源的OmpU重组蛋白抗血清在Western blot分析中能与供试菌株发生显著的免疫交叉反应性,但在Whole-cell ELISA分析中却不能识别供试菌株(图4-B)。推测这是由于,溶藻弧菌OmpU含有多个抗原表位,不同的抗原表位被不同的抗体识别。在非变性的条件下,一些抗原表位定位于细胞内部,因而在Whole-cell ELISA分析中不能被OmpU重组蛋白抗体识别。而在SDS的作用下,OmpU的天然构象被打开,原来定位于细胞内部的抗原表位暴露出来,因而在Western blot分析中,这些抗原表位被OmpU重组蛋白抗体识别(不同来源的OmpU重组蛋白抗体可能识别不同的抗原表位),并呈现显著的免疫交叉反应。虽然OmpU的免疫特性还需要更多的研究,但目前的结果显示,外膜蛋白OmpU在弧菌中具有广泛的免疫交叉反应特性。

国内外研究显示,弧菌的外膜蛋白OmpU具有良好的免疫原性和免疫保护性,能使被免疫的动物抵抗副溶血弧菌^[13]、拟态弧菌^[14]、溶藻弧菌^[15-16]、哈维氏弧菌^[17]等病原菌的侵袭和感染。但目前,关于外膜蛋白OmpU的交叉保护性的研究尚没有报道。为了进一步分析OmpU的免疫交叉保护性,利用霍乱弧菌Vb0来源的OmpU重组蛋白作为抗原免疫小鼠,并利用霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌进行攻毒实验。结果显示,OmpU重组蛋白免疫组小鼠的累计死亡率显著低于对照组小鼠的累计死亡率($P < 0.05$)(表5),提示OmpU是弧菌中一种交叉保护性抗原,可作为对抗弧菌病的广谱疫苗候选抗原。

另外, 通过OmpU抗原表位的预测和比对发现, 在弧菌外膜蛋白OmpU中存在9个高度保守的B细胞抗原表位(表4), 因此, OmpU的交叉保护性可能与这些高度同源的抗原表位有关。然而, 由于抗原表位除了由连续的氨基酸残基组成的线性表位(linear epitope)外, 还包括不连续氨基酸区段折叠的构象表位(conformation epitope)。对于蛋白抗原而言, 抗原与抗体之间亲和力大小的差异可能源于氨基酸序列的微小改变, 或者是构象的改变^[29]。因此, 这些通过计算机预测的抗原表位(主要为线性表位)在实际的免疫交叉保护性中的作用有待进一步的分析。

综上所述, 初步的研究结果表明, 外膜蛋白OmpU高度保守, 并广泛存在于供试弧菌中。OmpU重组蛋白抗血清与多种典型弧菌之间存在着显著的免疫交叉反应能力, 是一种潜在的具有免疫交叉保护性的弧菌广谱疫苗候选抗原。

参考文献

- [1] 全国科学技术名词审定委员会. 免疫学名词. 北京: 科学出版社, 2008.
- [2] Peter ML, Alex W, Michael WF. 免疫学. 第2版. 林慰慈, 译. 北京: 科学出版社, 2010.
- [3] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 403–431.
- [4] Li H, Xiong XP, Peng B, Xu CX, Ye MZ, Yang TC, Wang SY, Peng XX. Identification of broad cross-protective immunogens using heterogeneous antiserum-based immunoproteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(9): 4342–4349.
- [5] Li H, Ye MZ, Peng B, Wu HK, Xu CX, Xiong XP, Wang C, Wang SY, Peng XX. Immunoproteomic identification of polyvalent vaccine candidates from *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(5): 2573–2583.
- [6] Yu LP, Hu YH, Sun BG, Sun L. Immunological study of the outer membrane proteins of *Vibrio harveyi*: insights that link immunoprotectivity to interference with bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(4): 1293–1300.
- [7] Li CC, Ye ZC, Wen LY, Chen R, Tian LH, Zhao FK, Pan JY. Identification of a novel vaccine candidate by immunogenic screening of *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. *Vaccine*, 2014, 32(46): 6115–6121.
- [8] Qian RH, Xiao ZH, Zhang CW, Chu WY, Wang LS, Zhou HH, Wei YW, Yu L. A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 2008, 278(1/4): 5–9.
- [9] Li NQ, Bai JJ, Wu SQ, Fu XZ, Lao HH, Ye X, Shi CB. An outer membrane protein, *OmpK*, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 829–833.
- [10] Li NQ, Yang ZH, Bai JJ, Fu XZ, Liu LH, Shi CB, Wu SQ. A shared antigen among *Vibrio* species: outer membrane protein-OmpK as a versatile Vibriosis vaccine candidate in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(5/6): 952–956.
- [11] Hamod MA, Nithin MS, Shukur YN, Karunasagar I, Karunasagar I. Outer membrane protein K as a subunit vaccine against *V. anguillarum*. *Aquaculture*, 2012, (354/355): 107–110.
- [12] Lun JS, Xia CY, Yuan CF, Zhang YL, Zhong MQ, Huang TW, Hu Z. The outer membrane protein, LamB (malto porin), is a versatile vaccine candidate among the *Vibrio* species. *Vaccine*, 2014, 32(7): 809–815.
- [13] Mao ZJ, Yu L, You ZQ, Wei YW, Liu Y. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj 2003. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 567–575.
- [14] Li XF, Li JN, Ji JJ, Yu WY. Prokaryotic expression of outer membrane protein U gene of *Vibrio mimicus* and its immunoprotection. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 307–312. (in Chinese)
李小飞, 李瑾年, 季晶晶, 余为一. 拟态弧菌外膜蛋白OmpU基因的原核表达及其免疫保护性研究. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 307–312.
- [15] Cai SH, Yao SY, Lu YS, Wu ZH, Jian JC, Wang B. Immune

- response in *Lutjanus erythropterus* induced by the major outer membrane protein (OmpU) of *Vibrio alginolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2010, 90(1): 63–68.
- [16] Cai SH, Lu YS, Wu ZH, Jian JC. Cloning, expression of *Vibrio alginolyticus* outer membrane protein-OmpU gene and its potential application as vaccine in crimson snapper, *Lutjanus erythropterus* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(8): 695–702.
- [17] Wang Q, Chen J, Liu R, Jia J. Identification and evaluation of an outer membrane protein OmpU from a pathogenic *Vibrio harveyi* isolate as vaccine candidate in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(1): 22–29.
- [18] 沈萍, 陈向东. 微生物学. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [19] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [20] Simonet VC, Baslé A, Klose KE, Delcour AH. The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19): 17539–17545.
- [21] Sperandio V, Girón JA, Silveira WD, Kaper JB. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(11): 4433–4438.
- [22] Provenzano D, Lauriano CM, Klose KE. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3652–3662.
- [23] Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, Ruby EG. *Vibrio fischeri* outer membrane protein OmpU plays a role in normal symbiotic colonization. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6590–6597.
- [24] Wibbenmeyer JA, Provenzano D, Landry CF, Klose KE, Delcour AH. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT Porins are differentially affected by bile. *Infection and Immunity*, 2002, 70(1): 121–126.
- [25] Goo SY, Lee HJ, Kim WH, Han KL, Park DK, Lee HJ, Kim SM, Kim KS, Lee KH, Park SJ. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2006, 74(10): 5586–5594.
- [26] Li YW, Wooldridge KG, Javed MA, Tang CM, Ala'Aldden DAA. Secreted proteins of *Neisseria meningitidis* protect mice against infection. *Vaccine*, 2009, 27(17): 2320–2325.
- [27] 龚非力. 医学免疫学. 第4版. 北京: 科学出版社, 2014.
- [28] Sun K, Zhang WW, Hou JH, Sun L. Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. *Vaccine*, 2009, 27(21): 2733–2740.
- [29] Paul WE. 基础免疫学. 第4版. 吴玉章, 译. 北京: 科学出版社, 2003.

Immunological cross-reactivity and cross-protection of outer membrane protein OmpU among *Vibrio* species

Jingsheng Lun, Shexi Zhang, Yaping Dong, Shaofeng Xie, Heng Mai, Yingyi Mei, Zhong Hu*

Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] To study the immunological cross-reactivity and cross-protection characteristics of OmpU in *Vibrio* species. [Methods] The *ompU* genes from 10 *Vibrio* strains were cloned, sequenced, followed by bioinformatics analysis. Western blot and whole-cell ELISA assay were used respectively to determine immunological cross-reaction feature and subcellular location of OmpU with rabbit serum against recombinant OmpU from *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. alginolyticus* ATCC33787, *V. vulnificus* ATCC27562, *V. mimicus* ATCC33653 and *V. cholera* Vb0. Finally, the cross-protective property of recombinant OmpU (*V. cholera*-derived) was evaluated through vaccination and subsequent challenge with heterogeneous virulent *Vibrio* strains in mice. [Results] The similarities of OmpU proteins of *Vibrio* ranged from 73.0 to 100% intra-species, and from 58.6 to 89.0% inter-species. Furthermore, homologous epitopes were found in OmpU and shared by different species of *Vibri*os. Western blot of rabbit serum against recombinant OmpU showed cross-recognition intra- and inter-species. Bands were observed ranging from 35 to 40 kDa. Whole-cell ELISA assay further confirmed that the antiserum of recombinant OmpU from *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. vulnificus* ATCC27562 and *V. mimicus* ATCC33653 recognized the tested *Vibrio* species, implying that epitopes of OmpU were located on the cell surface. Recorded relative percent survival of the vaccinated group varied from 43.0 to 100%, showing that mice were protected from *Vibrio* infection after immunization with OmpU protein. [Conclusion] OmpU was a conserved antigen among tested *Vibrio* species and might be a universal vaccine candidate for the prevention of Vibriosis.

Keywords: *Vibrio* species, outer membrane protein, OmpU, cross-reactivity, cross-protection

(本文责编: 李磊)

Supported by the Grants from the Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Fund (2013GB2E000368), by the Science and Technology Department of Guangdong Province (2012B020308008) and by the Science and Technology Department of Shantou (67)

*Corresponding author. Tel: +86-754-86502081; E-mail: hzh@stu.edu.cn

Received: 11 August 2015; Revised: 1 November 2015; Published online: 22 January 2016