



副溶血弧菌 SH112 株 OmpA 蛋白的高效表达及免疫学特性

王亚磊, 王权, 白雪瑞, 别闯南, 陈兆国, 韩先干*, 蒋蔚*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要:【目的】我们前期研究表明副溶血弧菌 SH112 株的 OmpA 蛋白在该菌的致病过程中发挥重要作用, 是亚单位疫苗研制的潜在靶标抗原。本研究进一步对 *ompA*(VPA1186)基因进行克隆表达, 并研究其免疫学特性。【方法】扩增去除信号肽序列的成熟外膜蛋白 OmpA 的基因片段, 定向克隆至表达载体, 基因测序后对其编码蛋白质进行生物信息学分析。重组蛋白 His-OmpA 经纯化后, 免疫 ICR 小鼠制备鼠多抗血清。Western blotting 检测该蛋白的免疫原性及鼠多抗血清的特异性。动物实验验证其免疫保护率。【结果】成功表达分子量约为 40.0 kDa 的重组蛋白 His-OmpA。制备的鼠多抗血清 ELISA 效价可达 1:50000 以上。Western blotting 检测结果显示, 该血清可与 His-OmpA 蛋白、总外膜蛋白和全菌蛋白发生特异性反应, 说明所表达的目的蛋白保持原蛋白的免疫原性。此外, 该高免血清可与其他主要血清型的副溶血弧菌发生特异性交叉反应, 而与其他非副溶血弧菌菌株无交叉反应, 表明该血清特异性较高, 且提示 OmpA 蛋白可能是副溶血弧菌属的共同保护性抗原。小鼠免疫保护实验结果表明, 该蛋白可提供约 35% 的免疫保护率。【结论】OmpA 蛋白可作为诊断副溶血弧菌感染和亚单位疫苗研制的靶蛋白, 为进一步开展该蛋白的功能研究提供了参考。

关键词: 副溶血弧菌, OmpA, 免疫原性, 保护性作用

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为革兰氏阴性菌, 弧菌属, 具嗜盐性。广泛分布于海水、进海口、海底淤泥、海鲜贝类中^[1]。通常暴发在近海地区, 人类使用污染本菌的鱼、贝类可引致腹泻、呕吐等食物中毒症状, 严重者可引起严重的胃肠炎、败血症甚至死亡^[2-3], 是主要食源性致病菌^[4]。

革兰氏阴性菌的细胞壁较薄, 由外膜(outer membrane, OM)和周质间隙组成。外膜蛋白(outer membrane proteins, OMP)是外膜的重要成分, 占外膜的 50%, 包括外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA)、微孔蛋白(porins)、脂蛋白(lipoprotein, Lpp)和微量蛋白等^[5]。研究表明, OmpA 是革兰氏阴性菌主要的外膜蛋白, 也是宿

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200201); 上海市科学技术委员会科研计划(17140900400)

*通信作者。Tel: +86-21-34293397; Fax: +86-21-54081818; E-mail: 蒋蔚, jiangweijw99@163.com, 韩先干, hanxgan@163.com

收稿日期: 2018-10-30; 修回日期: 2018-12-27; 网络出版日期: 2019-02-28

主免疫系统清除细菌的靶向识别蛋白,介导多种疾病的发生,同时也激活机体的免疫机制对抗细菌的感染,是一种重要的细菌毒力因子,影响着革兰氏阴性菌对机体的黏附、侵袭、发挥毒性作用等过程^[6-7]。此外,革兰氏阴性菌 OmpA 在动物疫苗上有较好的应用前景^[8]。蒋蔚等^[9]首次报道了嗜水气单胞菌 J-1 株 OmpA 蛋白的免疫原性,提示 OmpA 可能是嗜水气单胞菌的共同保护性抗原。马文昭等^[10]对鲍曼不动杆菌 OmpA 蛋白进行免疫原性分析,提示该蛋白可用于建立快速的免疫学检测方法并作为新型亚单位疫苗的候选抗原。

OmpA 位于细胞壁外膜的最外层,具有同外界广泛接触的机会^[11]。副溶血弧菌共有 4 个 OmpA (VPA1186、VP0764、VPA0248、VP0636),其中 VPA1186 和 VP0764 具有良好的免疫原性和疫苗开发潜力^[12-13]。本实验室先前的研究发现,副溶血弧菌 *ompA* 基因(VPA1186)的缺失降低细菌对小鼠的毒力作用,在该菌的致病过程中发挥一定的作用,推测其可能是副溶血弧菌的主要保护性抗原^[14]。本研究克隆表达了副溶血弧菌 SH112 株 OmpA 蛋白,并制备鼠抗 His-OmpA 蛋白多克隆抗体,Western blotting 验证其特异性和对不同血清型副溶血弧菌的交叉反应,通过动物实验对该蛋白的免疫保护作用进行分析,从而为进一步研究副溶血弧菌的快速诊断方法奠定了基础,并为研制副溶血弧菌基因工程亚单位疫苗提供了新的候选靶位。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和实验动物

副溶血弧菌 SH112 为临床分离株,血清型为 O3:K6,具有耐热直接溶血素(TDH)、三型分泌系统(T3SS)和六型分泌系统(T6SS)等毒力相关因子^[14-15]。副溶血弧菌其他血清型的临床菌株 VP502 (O2:KI)、VP59 (O1:KI)、VP26 (O10:KIII)、VP67 (O4:KII)由本实验室保存。霍乱弧菌(CICC23794)、创伤弧菌(ATCC27562)、大肠杆菌 O157:H7 (ATCC35150)和肠炎沙门氏菌(CVCC1805)分别购买自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)、中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)和美国模式培养物集存库(ATCC)。pMD19-T Simple 载体购自 TaKaRa 公司。原核表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存。5 周龄雌性 ICR 小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司。

根据 GenBank 上发表的 RIMD 2210633 株 VPA1186 基因(登录号:BA000032)序列,利用 Primer premier 5.0 软件设计扩增 VPA1186 基因引物(表 1)。

1.2 试剂和仪器

琼脂糖凝胶回收试剂盒购自康宁生命科学(苏州)有限公司;质粒小提试剂盒、异丙醇硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)和 TMB 底物显色液购自天根生化科技(北京)有限公司;T₄连接酶、限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 购自宝生物工程(大连)有限公司;IDA His.Bind 树脂纯化试剂盒购自

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study

Name	Oligonucleotide sequences (5'→3')	Product size/bp
VPA1186-ORF-F	ATGAACAAAGTAGCAATTGCAGTAGCAGCA	990
VPA1186-ORF-R	TTATGGTTGAACCATCTCTTGGTATTTCG	
VPA1186-F	CTAGGATCCGAAATGTATATCGGGGGCAA(<i>Bam</i> H I)	933
VPA1186-R	TCTGAGCTCTGGTTGAACCATCTCTTGGT(<i>Sac</i> I)	

MERCK 公司; 弗氏佐剂购自 Sigma 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术(上海)有限公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Abcam 公司; 基本型 ECL 发光液购自圣尔生物科技(上海)有限公司; 蛋白分子量标准购自 TaKaRa 公司; 多功能酶标仪和凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司。

1.3 VPA1186 编码蛋白质的生物信息学分析

以 SH112 株基因组为模板, VPA1186-ORF-F/R 为引物, 扩增整个编码区的 *ompA* (VPA1186) 基因序列。将纯化的 PCR 产物连入 pMD19-T Simple 载体, 挑取阳性克隆送去测序。用 ClustalX2 和 MEGA-X 软件对 *ompA* (VPA1186) 基因核苷酸序列进行遗传进化分析并采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建进化树, 比较其与 GenBank 上公布的 11 株不同来源的副溶血弧菌参考菌株的同源性。

通过 Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行蛋白质的信号肽预测; 利用 ProtParam 在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算蛋白质的理论分子量、理论等电点; 通过 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析蛋白质的亲水性与疏水性; 将 SH112 株 *ompA* (VPA1186) 基因与 GenBank 已知的 10 多株副溶血弧菌不同菌株该基因的核苷酸和氨基酸序列进行对比分析, 并应用 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白质的三级结构。

1.4 重组表达质粒的构建、鉴定和目的基因的表达

以 SH112 株基因组为模板, VPA1186-F/VPA1186-R 为引物, 扩增去除信号肽编码区的 *ompA* (VPA1186) 基因序列。将纯化的 PCR 产物和空质粒 pET28a(+)分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, T₄ 连接酶连接后, 构建重组表达质粒 pET28a-*ompA*。将构建的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 加入终浓度为 1 mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷

(IPTG), 诱导表达重组蛋白, SDS-PAGE 检测蛋白表达。对诱导表达的 His-*OmpA* 蛋白, 用 MERCK 公司的 IDA His.Bind 树脂纯化试剂盒进行蛋白纯化。

1.5 细菌外膜蛋白的提取

参考文献[16]提取副溶血弧菌外膜蛋白, 步骤简述如下: 将 SH112 接种于 250 mL LB 液体培养基中, 振荡培养 24 h。收集菌液于 50 mL 离心管中, 10000×g、4 °C 离心 10 min, 用 4 °C 预冷的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)洗涤 1 次。10000×g、4 °C 离心 10 min, 沉淀重悬于 20 mL 上述缓冲液中, 超声破碎。将破碎好的菌体 7000×g、4 °C 离心 10 min, 收集上清。后 40000×g、4 °C 离心 30 min, 沉淀溶于 25 mL 0.5% 十二烷基肌氨酸钠(SLS)。4 °C 静置过夜后, 40000×g、4 °C 离心 30 min, 沉淀即为副溶血弧菌 SH112 外膜蛋白, 用 2 mL 双蒸水溶解后于 -20 °C 保存。BCA 法测总外膜蛋白蛋白浓度。

1.6 His-OmpA 蛋白的鼠多抗制备

将纯化的 His-*OmpA* 蛋白与等量弗氏完全佐剂(Sigma 公司产品)混合乳化后, 足垫免疫 ICR 小鼠, 共免 5 只, 免疫剂量为 0.1 mg/只。14 d 后二免, 剂量同首免, 用弗氏不完全佐剂乳化, 背部皮下多点注射。二免后 14 d 后进行三免, 剂量和乳化方法同二免, 腿部肌肉注射。第 3 次免疫后 7 d, 眼球采血制备血清。用纯化的 His-*OmpA* 蛋白作为包被抗原(包被浓度为 0.4 μg/mL, 每孔 100 μL), 间接 ELISA 方法检测其效价。以总外膜蛋白、全菌蛋白和表达的 His-*OmpA* 蛋白为抗原, Western blotting 检测重组蛋白免疫原性。

1.7 抗 OmpA 蛋白高免血清的特异性测定

选择副溶血弧菌主要血清型菌株 VP502、VP59、VP26 和 VP67, 以及霍乱弧菌、创伤弧菌、大肠杆菌和沙门氏菌菌株, 培养至对数生长期, 4 °C、12000×g 离心 5 min, 收集菌体。以抗 SH112

株 OmpA 蛋白的血清为一抗, 对上述细菌的全菌蛋白进行 Western blotting 检测, 运用 ECL 发光显色, 验证制备血清的特异性。

1.8 His-OmpA 蛋白免疫效果的初步研究

为评价 His-OmpA 蛋白免疫保护性, 45 只 5 周龄 ICR 小鼠, 随机分为 3 组, 每组各 15 只, 分别免疫 1×10^9 CFU SH112 甲醛灭活全菌疫苗、0.1 mg 的 His-OmpA 蛋白和 PBS。首次免疫用等量弗氏完全佐剂乳化, 二免和三免用等量弗氏不完全佐剂, 每 14 d 免疫 1 次。三免后 7 d, 以灭活的 SH112 为包被原 (每孔约 1×10^7 CFU), 小鼠尾尖采血, 1000 倍稀释血清, 间接 ELISA 测定各组血清效价水平。三免 10 d 后攻毒。攻毒剂量为每只小鼠腹腔注射 200 μ L, 约 2×10^7 CFU。观察 24 h, 记录小鼠死亡情况。

2 结果和分析

2.1 基因 *ompA* (VPA1186) 编码蛋白质的生物信息学分析

序列分析表明, SH112 株 *ompA* (VPA1186) 基

因共 990 个核苷酸 (GenBank 登录号为 MN413200)。与 11 株副溶血弧菌的 *ompA* 序列分析结果表明: 其核苷酸序列相似性在 99.0%–100%, 氨基酸序列相似性均为 100%。遗传进化结果分析表明, OmpA 在各菌株间同源性较高, 系统进化树进一步显示了各菌株间的进化关系 (图 1)。Signal P 在线软件分析结果表明, OmpA 蛋白的 N 端有一个端信号肽序列, 位于 1–24 号氨基酸残基。利用 ExPASy 在线软件中 ProtParam 工具分析结果表明, SH112 的 *ompA* (VPA1186) 编码成熟外膜蛋白理论分子量约为 33.8 kDa, 推测其理论等电点为 4.25, 分子式为 $C_{1495}H_{2246}N_{384}O_{489}S_{11}$, 原子总数为 4625, 不稳定指数为 34.47, 表明该蛋白为稳定蛋白。运用 ProtScale 在线工具对 *OmpA* (VPA1186) 的分析表明, 氨基酸序列中疏水最大值为 4.500 (亲水性为负, 疏水性为正), 最小值为 -4.500, 表明该蛋白属于亲水性蛋白。应用 SWISS-MODEL 预测蛋白质的三级结构 (图 2), 预测该蛋白由 8 个跨膜反向平行的 β -桶装结构域构成, 膜的外表面由 4 个环构成, 该结构符合 OmpA 蛋白超家族的共同特征。

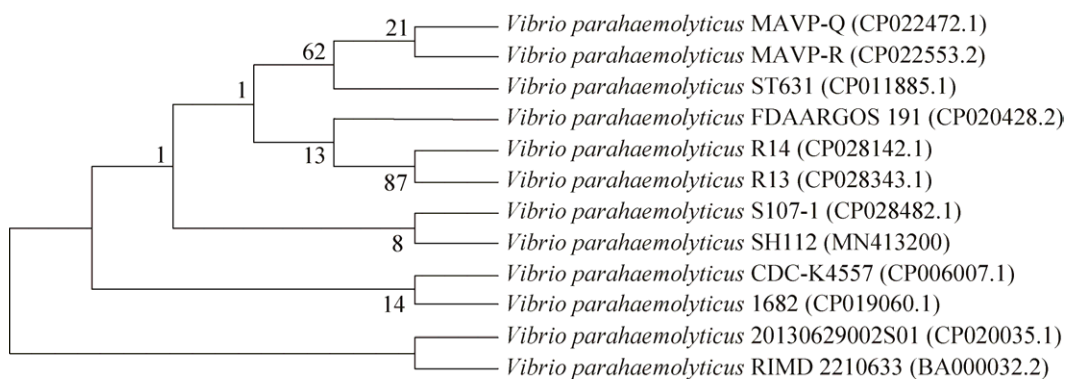


图 1. 副溶血弧菌 *ompA* 基因核苷酸序列系统进化树

Figure 1. The phylogenetic tree of *V. parahaemolyticus ompA* gene sequences. The evolutionary distances were calculated by MEGA-X software. Bootstrap values at nodes were calculated using 1000 replicates by Maximum Composite Likelihood model. Numbers at branching points are bootstrap values. The GenBank accession numbers are given in parentheses.

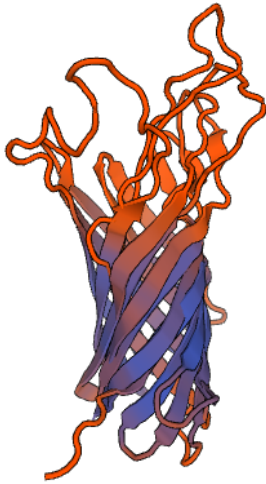


图 2. 副溶血弧菌 OmpA 蛋白的三级结构
Figure 2. The 3D structure of *V. parahaemolyticus* OmpA protein.

2.2 重组表达质粒的构建和 OmpA 蛋白的表达、纯化

通过 PCR 获得目的片段, 大小正确(图 3-A), 对构建的重组表达质粒 pET28a-ompA 进行双酶切鉴定, 结果表明得到 2 条大小分别约 933 bp 和 5900 bp 的片段(图 3-B), 与预期结果一致, 测序

结果表明, 成功构建该重组质粒。

该重组质粒经诱导表达后, SDS-PAGE 检测结果表明, 成功表达分子量约为 40 kDa (包含 pET28a 质粒编码的约 6.2 kDa 的标签蛋白)的 His-OmpA 重组蛋白, 该蛋白呈可溶性表达(图 4)。可溶性 His-OmpA 重组蛋白经纯化后(图 5), 可获得浓度为 2.77 mg/mL 的纯化的 His-OmpA 重组蛋白。

2.3 His-OmpA 蛋白高免血清制备、效价检测及其免疫原性检测

对三免后的血清进行 ELISA 检测, 结果表明制备的抗 His-OmpA 血清, 其效价可达 1 : 50000 以上。Western blotting 检测结果表明, 制备的抗 OmpA 蛋白鼠多抗, 与提取的总外膜蛋白、全菌蛋白和表达的 His-OmpA 重组蛋白均呈现特异性反应, 分别在约 33.8 kDa (总外膜蛋白和全菌蛋白)和 40.0 kDa (重组蛋白)处显示目的条带, 而与阴性对照牛血清白蛋白(BSA)没有反应(图 6), 表明纯化蛋白诱导机体产生了良好的免疫反应。

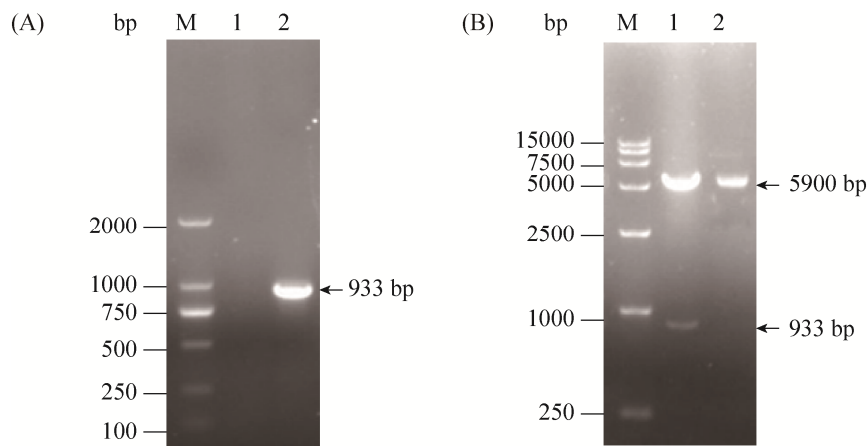


图 3. 重组载体 pET28a-ompA 的构建

Figure 3. Construction of recombinant pET28a-ompA. A: PCR amplification of *ompA* (VPA1186) gene. Lane 1: Negative control; lane 2: A 933bp fragment was amplified from SH112 genomic DNA using primers VPA1186-F and VPA1186-R; M: DL2000. B: Identification of recombinant pET28a-ompA by dual-enzyme digestion. Lane 1: Double digestion of the recombinant pET28a-ompA with *BamH* I and *Sac* I; lane 2: Double digestion of the pET28a(+)vector with *BamH* I and *Sac* I; M: DL15000.

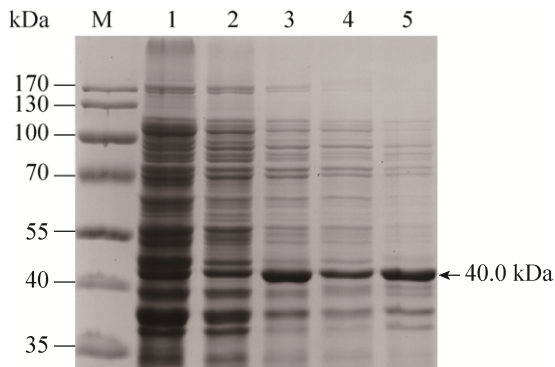


图 4. BL21 表达菌的 SDS-PAGE 分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis of His-OmpA expression products. M: protein marker; lane 1: pET28a/BL21 before induced; lane 2: pET28a-*ompA*/BL21 before induced; lane 3: pET28a-*ompA*/BL21 induced by IPTG; lane 4: The protein supernatant fluid of pET28a-*ompA*/BL21 induced by IPTG; lane 5: The protein deposition of pET28a-*ompA*/BL21 induced by IPTG.

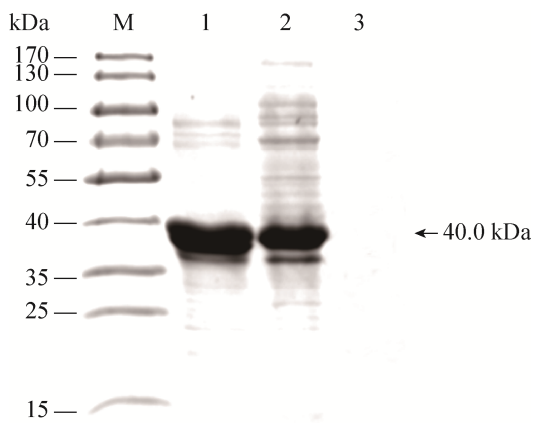


图 5. His-OmpA 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of His-OmpA purification. M: protein marker; lane 1: purified His-OmpA protein; lane 2: supernatant of bacteria with IPTG induction; lane 3: blank control (BSA).

运用 BCA 法, 对提取的总外膜蛋白进行浓度测定, 结果表明, 浓度为 1.3651 mg/mL。用提纯的 SH112 株总外膜蛋白为包被抗原, 抗 SH112 株总外膜蛋白的血清为阳性对照, 未免疫血清为阴性对照进行 ELISA 检测, 当免疫血清以 1:1000

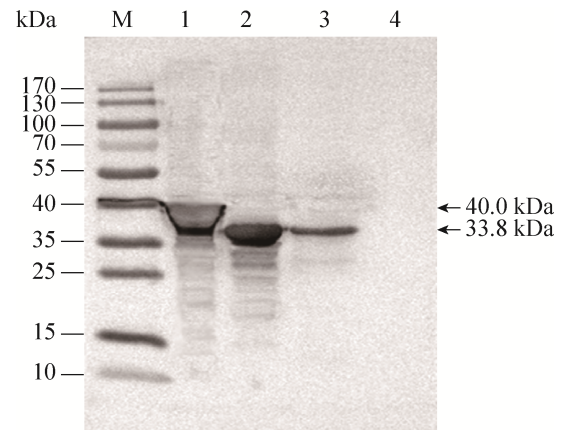


图 6. OmpA 蛋白的 Western blotting 分析

Figure 6. Western blotting analysis of OmpA protein. M: Protein marker; lane 1: Purified expression protein OmpA; lane 2: Total outer membrane protein of SH112 strain; lane 3: Whole-cell proteins from SH112 strain; lane 4: Blank control (BSA).

稀释时, 与总外膜蛋白反应的 OD_{450} 值均大于 1.0, 标准阴性血清 OD_{450} 的值为 0.10 左右。证明所表达的 His-OmpA 蛋白能刺激机体产生特异性抗体。

2.4 抗 OmpA/(VPA1186)蛋白高免血清的鉴别诊断

Western blotting 分析表明, SH112 株 OmpA 鼠多抗可与 O2:KI、O1:KI、O10:KIII、O4:KII 血清型副溶血弧菌(VP502、VP59、VP26 和 VP67) 发生交叉反应, 与霍乱弧菌、创伤弧菌、大肠杆菌和肠类沙门氏菌不发生交叉反应(图 7), 表明制备的鼠抗 OmpA 多抗具有良好的交叉反应性和特异性, 可用于诊断副溶血弧菌的感染。

2.5 His-OmpA 蛋白免疫小鼠及免疫效果的初步研究

三次免疫后, 以全菌为包被原测定血清效价水平, 结果显示, 与对照 PBS 免疫组相比, His-OmpA 蛋白组小鼠体内抗体水平显著提高, 提示该蛋白可以产生对 SH112 的保护性抗体(图 8)。三免后

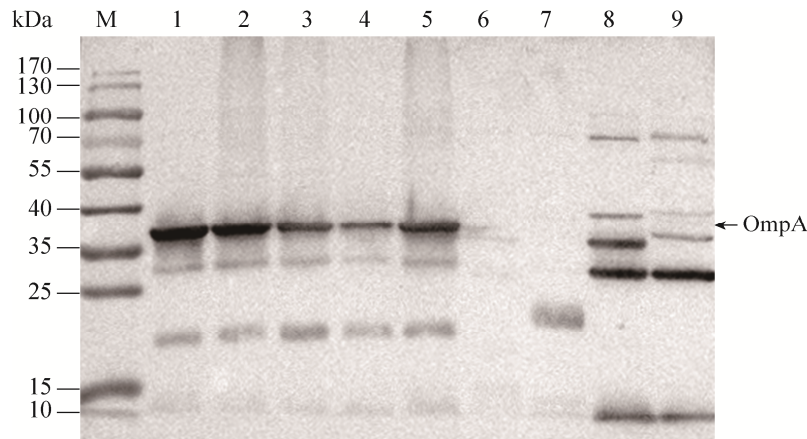


图 7. 副溶血弧菌和其他非副溶血弧菌全菌蛋白的 Western blotting 鉴定

Figure 7. Identification of whole bacterial protein of *V. parahaemolyticus* stains and non-*V. parahaemolyticus* stains by Western blotting. M: Protein markers; lane 1–9: Whole-cell proteins from *V. parahaemolyticus* strains: SH112, VP502, VP59, VP26, VP67, and non-*V. parahaemolyticus* strains: *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *E. coli* O157:H7 and *S. enteritidis*.

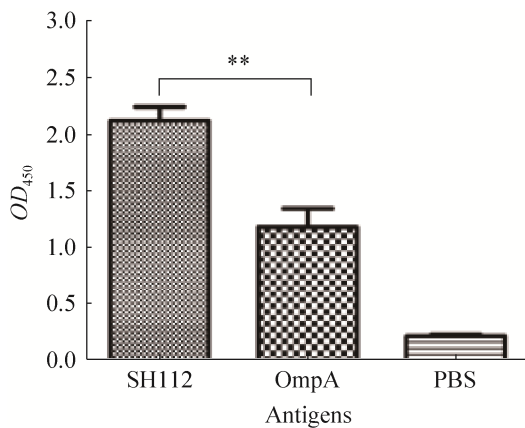


图 8. 三免后小鼠体内抗体水平的 ELISA 检测

Figure 8. ELISA detection of antibody levels in mice after immunization. At the 7th day after the third immunity, the serum was collected to detect their titer by ELISA with inactivated SH112 as the coating antigen. **: $P < 0.01$.

10 d, 各组小鼠腹腔注射 SH112 活菌 2×10^7 CFU, 观察小鼠死亡情况。24 h 后甲醛灭活全菌组死亡 4 只, His-OmpA 重组蛋白组死亡 10 只, PBS 组死亡 14 只, 存活曲线见图 9, 结果说明全菌组的保护率为约 75%, 重组蛋白组的保护率约为 35%, 该结果与上述图 8 结果相对应, His-OmpA 蛋白免疫组的小鼠产生的抗 SH112 抗体显著低于细菌免疫组。

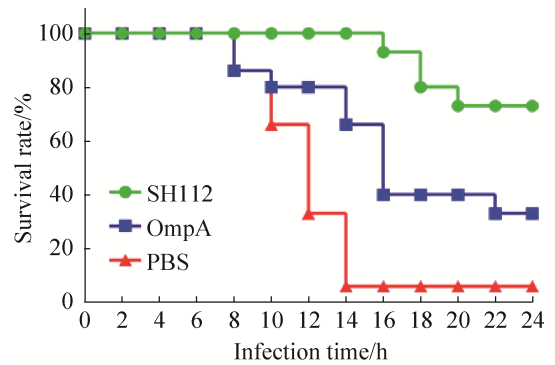


图 9. 感染小鼠的存活曲线

Figure 9. Survival curve of mice infected with SH112.

3 讨论

副溶血弧菌对水产养殖和人类饮食健康均造成了巨大威胁^[4]。OmpA 是革兰氏阴性菌主要外膜蛋白, 能维持细菌外膜结构完整和细菌形态, 在细菌对宿主的黏附和侵袭, 以及宿主免疫系统清除细菌的靶向识别上起关键作用^[17-18]。本研究成功克隆 SH112 株 *ompA* (VPA1186) 基因, 并实现了 OmpA 蛋白的高效表达和纯化。本实验选取的副溶血弧菌 SH112 为临床分离株, 经前期鉴定, 血清型为 O3:K6, 为国内主要流行血清型。生物信

息学表明, SH112 株副溶血弧菌 *ompA* (VPA1186) 基因核苷酸和氨基酸序列与国内外主要菌株同源性较高。由于信号肽序列可能会影响外膜蛋白的可溶性表达及蛋白表达量, 因此本研究在克隆目的基因的时候去除了信号肽序列, 结果获得了高效的可溶性蛋白表达, 为后续实验打下良好基础。

用纯化的 His-OmpA 重组蛋白免疫 ICR 小鼠, 获得高效价的鼠抗血清, 将其用于 Western blotting 分析, 结果表明重组 OmpA 蛋白、总外膜蛋白和全菌蛋白均出现目的蛋白条带, 表明重组融合蛋白抗原结合位点没有改变, 且抗 OmpA 蛋白小鼠抗体能够识别天然蛋白, 提示该蛋白可能为保护性抗原。Western blotting 进一步分析表明, SH112 株 OmpA 蛋白的鼠抗血清可与多种血清型的副溶血弧菌发生特异性结合反应, 而与四种其他常见的食源性病原微生物(霍乱弧菌、创伤弧菌、大肠杆菌和肠类沙门氏菌)不发生反应, 该结果首先提示该蛋白具有良好特异性, 可作为副溶血弧菌诊断的一个靶标蛋白, 可用于研制高灵敏性和特异性的 ELISA 或胶体金免疫层析检测方法, 以实现副溶血弧菌的快速检测及鉴别诊断。其次本实验所选取的副溶血弧菌血清型广泛, 包含了国内 5 个主要血清型, 特别是近年来广泛流行于上海、舟山、宁波等地的 O2:KI、O1:KI、O10:KIII、O4:KII 血清型以及杭州湾地区的副溶血弧菌优势血清型 O3:K6^[19], 本结果提示 OmpA 蛋白很可能为不同血清型的副溶血弧菌的共同保护性抗原。

需要说明的是, *ompA* (VPA1186) 基因理论上编码分子量为 33.8 kDa 的成熟外膜蛋白, 但是在 Western blotting 分析中实际蛋白条带大小约 36 kDa, 原因可能是 OmpA 超蛋白家族(又称热修饰蛋白), 包括 4 个由 β 折叠组成的细胞外环状结构, N 端构成 8 个跨膜反向平行的 β -桶装结构域, 这一特

殊结构使该蛋白具有温度依赖性, 高于 50 °C 经 SDS 加热后, 分子构象改变, 导致不对称性增加^[20-21]。因此在进行 SDS-PAGE 时, 泳动速度显著降低, 导致在 Western blotting 实验结果中的目的条带稍微上移(图 6 和图 7)。

目前已有多种实验动物模型用于副溶血弧菌的致病机制研究, 包括小鼠口服感染和腹腔注射感染, 以及兔回肠环结扎、乳兔和小鼠口腔感染等方法模型^[22-23]。研究表明通过口服或腹腔注射方法感染副溶血弧菌可导致小鼠死亡^[24-25]。在我们之前的研究中^[26]已通过小鼠腹腔注射感染方法来评价疫苗免疫效果。本研究以 His-OmpA 重组蛋白免疫小鼠进行动物保护性实验, 以全菌为包被原测定血清效价水平来看, 免疫 OmpA 蛋白的小鼠可产生高效的针对副溶血弧菌的特异性抗体。三免后腹腔攻毒副溶血弧菌 SH112 株, OmpA 蛋白免疫组小鼠存活率明显高于空白组, 获得了约 35% 的免疫保护率。这与 Wang 等^[8]用迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*) OmpA 进行小鼠的免疫保护评价获得的 47.1% 的保护率相近。比较攻毒前后抗体的效价变化, 发现攻毒后 24 h 抗体效价明显降低(结果未显示), 进一步说明攻毒后小鼠体内产生的抗 OmpA 蛋白抗体与副溶血弧菌发生了中和作用。我们的结果也表明该膜蛋白的保护性显著低于灭活菌免疫组, 可能单个蛋白的保护性没有那么高, 在后期研究中, 我们拟筛选出其他具有保护性作用的蛋白, 做串联表达来制备基因工程亚单位疫苗, 也许可以增加保护率, 当然这需要进一步研究证实, 希望有新的发现。

本研究首次报道了副溶血弧菌 SH112 株 OmpA 蛋白(VPA1186)可能是国内一些主要血清型的共同保护性抗原, 对感染副溶血弧菌的强毒株具有一定的保护性作用, 可作为基因工程亚单

位疫苗的候选蛋白;此外该蛋白具有良好的特异性,可作为副溶血弧菌诊断的一个靶标蛋白。以上结果为 OmpA 作为副溶血弧菌特异性诊断靶标和基因工程亚单位疫苗的候选成分提供了理论基础和数据支持。

参考文献

- [1] Elmahdi S, Dasilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 2016, 57: 128–134.
- [2] Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 2003, 81(3): 197–204.
- [3] Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 549–558.
- [4] Boehme J, Frischer ME, Jiang SC, Kellogg CA, Pichard S, Rose JB, Steinway C, Paul JH. Viruses, Bacterioplankton, and Phytoplankton in the Southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, 97: 1–10.
- [5] Xu CX, Ren HX, Wang SY, Peng XX. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology*, 2004, 155(10): 835–842.
- [6] Ayalew S, Shrestha B, Montelongo M, Wilson AE, Confer AW. Immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* recombinant outer membrane proteins serotype 1-specific antigen, OmpA, OmpP2, and OmpD15. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(12): 2067–2074.
- [7] Abe Y, Haruta I, Yanagisawa N, Yagi J. Mouse monoclonal antibody specific for outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2013, 32(1): 32–35.
- [8] Wang C, Liu YJ, Li H, Xu WJ, Zhang HL, Peng XX. Identification of plasma-responsive outer membrane proteins and their vaccine potential in *Edwardsiella tarda* using proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(4): 1263–1275.
- [9] Jiang W, Liu YJ, Lu CP. Expression and immunogenicity analysis of the fusion protein OmpA from *Aeromonas hydrophila* strain J-1. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 301–306. (in Chinese)
- 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. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 301–306.
- [10] Ma WZ. Isolation, identification, analysis expression of outer membrane protein a and development of an indirect ELISA for acinetobacter baumanII from chicken. Master Dissertation of Henan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- 马文昭. 禽源鲍曼不动杆菌的分离鉴定与 OmpA 蛋白的原核表达及其初步应用. 河南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [11] Selvaraj SK, Periandythevar P, Prasadarao NV. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes and Infection*, 2007, 9(5): 547–557.
- [12] Li H, Chu X, Li D, Zeng ZH, Peng XX. Construction and immune protection evaluation of recombinant polyvalent OmpAs derived from genetically divergent *ompA* by DNA shuffling. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 230–236.
- [13] 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.
- [14] Bai XR, Wang Q, Chen YJ, Wan Y, Ling J, Wang YL, Jiang W. Biological characteristics and pathogenicity of an *ompA* mutant of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 902–910. (in Chinese)
- 白雪瑞, 王权, 陈永军, 万莹, 凌娇, 王亚磊, 蒋蔚. 副溶血弧菌 *ompA* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 902–910.
- [15] Bai XR, Wang Q, Ling J, Wan Y, Chen YJ, Fang WH, Sun WD, Jiang W. Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS1 and T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(3): 455–466. (in Chinese)
- 白雪瑞, 王权, 凌娇, 万莹, 陈永军, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. T3SS1 和 T3SS2 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致

- 病性的比较. 微生物学报, 2018, 58(3): 455–466.
- [16] Chen HQ, Lu CP. Analysis of s-layer protein and OMP composition on *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1993, 16(2): 69–73. (in Chinese)
陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌表层蛋白及外膜蛋白的初步分析. 南京农业大学学报, 1993, 16(2): 69–73.
- [17] Krishnan S, Prasadarao NV. Outer membrane protein A and OprF: Versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *The FEBS Journal*, 2012, 279(6): 919–931.
- [18] Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infection and Immunity*, 1991, 59(7): 2252–2258.
- [19] Dai M, Wang DP, Chen WY, Shi XM. Serotyping for clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates and analysis of their virulence genes. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(2): 159–164. (in Chinese)
代敏, 王大鹏, 陈万义, 史贤明. 副溶血弧菌临床分离株的血清分型及毒力基因分析. 中国食品学报, 2013, 13(2): 159–164.
- [20] Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273(1): 1–11.
- [21] Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu KS, Kumarasiri M, Hesek D, Lee M, Mobashery S, Song JH, Kim SI, Lee JC, Cheong C, Jeon YH, Kim HY. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *The FASEB Journal*, 2012, 26(1): 219–228.
- [22] Piñeyro P, Zhou XH, Orfe LH, Friel PJ, Lahmers K, Call DR. Development of two animal models to study the function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems. *Infection and Immunity*, 2010, 78(11): 4551–4559.
- [23] Boutin BK, Townsend SF, Scarpino PV, Twedt RM. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 37(3): 647–653.
- [24] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772–1780.
- [25] Hoashi K, Ogata K, Taniguchi H, Yamashita H, Tsuji K, Mizuguchi Y, Ohtomo N. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice. *Microbiology and Immunology*, 1990, 34(4): 355–366.
- [26] Jiang W, Han XG, Wang Q, Li XT, Yi L, Liu YJ, Ding C. *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 4937–4948.

Expression and immunological characterization of the OmpA protein from *Vibrio parahaemolyticus* strain SH112

Yalei Wang, Quan Wang, Xuerui Bai, Chuangnan Bie, Zhaoguo Chen, Xianghan Han*, Wei Jiang*

Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Objective] OmpA protein (VPA1186) of *Vibrio parahaemolyticus* SH112 strain plays an important role in pathogenesis and can be a potential vaccine candidate against *V. parahaemolyticus* infection. We expressed and immunologically characterized OmpA protein from strain SH112. [Methods] The *ompA* gene from strain SH112 was amplified by PCR method and cloned into express vector. The coding protein was analyzed according to the sequencing analysis. The protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The mouse anti-OmpA antisera were generated by immunization of ICR mice with the recombinant protein purified by Ni-NTA. The immunogenicity and the specificity of OmpA were detected by Western blotting analysis. The vaccine protective efficacy of OmpA was verified by animal challenge experiment. [Results] The 40 kDa recombinant protein His-OmpA was successfully expressed. ELISA result shows that the titer of antiserum was above 1:50000. Moreover, Western blotting results reveals the antiserum reacted not only specifically with the purified His-OmpA protein but also with outer membrane proteins and whole-cell proteins of *V. parahaemolyticus*, suggesting that the expressed protein remained the immunogenicity of original OmpA protein. In addition, Western blotting result reveals that the antiserum reacted specifically with about 36 kDa proteins from four other *V. parahaemolyticus* strains with major serotypes in domestic, but not reacted with other non-*V. parahaemolyticus* strains, suggesting the antisera have a high specificity and the protein maybe a common protective antigen in different *V. parahaemolyticus* isolates. We further showed that OmpA conferred protective effect as about 35% of mice survived *V. parahaemolyticus* infection. [Conclusion] Our findings indicate that OmpA protein could play important roles in development of diagnostic test and may serve as candidate vaccine against *V. parahaemolyticus* infection.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, OmpA, immunogenicity, protective effect

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Programs of China (2017YFC1200201) and by the Shanghai Science and Technology Commission Scientific Research Project (17140900400)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-34293397; Fax: +86-21-54081818; E-mail: Wei Jiang, jiangweijw99@163.com, Xianghan Han, hanxgan@163.com

Received: 30 October 2018; Revised: 27 December 2018; Published online: 28 February 2019