

副溶血弧菌 ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性

毛芝娟^{1,2}, 由振强³, 魏永伟³, 于涟³

(1. 浙江大学 生物医学工程和仪器科学学院, 浙江 杭州 310027; 2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012; 3. 浙江大学 动物预防医学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要:从浙江省象山港网箱养殖大黄鱼病鱼分离的一株副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ZJ2003 中克隆了两种铁调外膜蛋白 *psuA* 和 *pvuA* 的基因(GenBank 登录号:DQ141607、DQ141608), 经 PCR 的方法去除两基因的信号肽编码序列后亚克隆到原核表达载体 pET30a(+) 中, 经 IPTG 诱导获得大量表达。表达的重组蛋白以包涵体形式存在。包涵体蛋白经尿素法纯化及梯度透析法复性后以 100 μ g/尾的剂量免疫大黄鱼, 4 周后经活菌攻毒获得 80% 的免疫保护率。免疫印迹分析表明, 人工感染存活鱼的血清可以识别此两种重组蛋白。研究结果显示该两种铁调外膜蛋白具有良好的免疫原性, 有可能作为高效疫苗成份。[中国水产科学, 2007, 14(4): 563–569]

关键词:副溶血弧菌; 铁调外膜蛋白; 克隆; 表达; 免疫原性

中图分类号:S941

文献标识码:A

文章编号:1005–8737–(2007)04–0563–07

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是导致多种海水养殖动物弧菌病的主要致病菌, 其感染对象包括鱼、虾、蟹、贝等多种经济动物^[1–5]。对于该菌引起的感染进行免疫预防已有了初步的尝试^[2], 但是有关该菌保护性抗原方面还知之甚少。外膜蛋白中的铁调外膜蛋白(Iron-regulated outer membrane proteins, IROMPs)是一种在体外铁元素限制培养条件下或者在机体内表达的外膜蛋白, 是病原菌摄铁系统的重要成份, 对细菌在宿主中的生存、感染的确立及毒力的表达等发挥不可或缺的作用; 同时 IROMPs 往往也是参与机体保护性免疫的重要成分, 已在数种重要病原菌中观察到了此类外膜蛋白的免疫原性和免疫保护作用: 在健康人体可检测到自然产生的大肠杆菌(*Escherichia coli*) IROMPs 的抗体^[6]; 针对该菌 IROMPs 的抗血清被动免疫火鸡可以保护其免于该菌引发的败血症^[7]; 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)在体内培养时能够产生数种 IROMPs, 如分子量为 76 kD 的亚铁血红素受体和 85 kD 的载铁体受体蛋白^[8], 并且针对 IROMPs 的抗体与保护性免疫相关^[9]。关于副溶血弧菌, 也已报道了多种 IROMPs, 其中 *psuA* 和 *pvuA* 分别为一种尚不明起源的载铁体和该菌自身产生的载铁体弧菌铁素的受体蛋白, 推测分子量约为 75 kD 和 78 kD, 是

该菌摄铁系统的重要组成部分^[10–12]。本研究旨在探明此两种 IROMPs 对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的免疫原性, 以对疫苗研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌株、质粒和表达菌株 病原菌株自浙江省象山港网箱养殖大黄鱼病鱼中分离, 命名为 ZJ2003 株。原核表达质粒 pET 30a(+) 为 Novagen 公司产品, 表达菌株 *E. coli* BL₂₁(DE₃) 菌株, 为本实验室保存。

1.1.2 分子生物学试剂 Taqplus DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 Takara 公司; 聚丙烯酰胺, N,N'-一亚甲双丙稀酰胺等购自上海生物工程技术有限公司; 辣根过氧化物酶 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司, 兔抗大黄鱼 IgM 重链血清为本实验室自备。

1.2 方法

1.2.1 铁调外膜蛋白的基因克隆 根据 GenBank 上发表的副溶血弧菌标准菌株基因组序列(基因登录号 BA000032), 在 2 种目的基因的 ORF 两侧分别设计上下游引物。PCR 产物纯化后测序, BLASTN 比对, 确定为副溶血弧菌的两种铁调外膜蛋白的基因,

收稿日期:2006–09–04; 修订日期:2007–01–04.

基金项目:浙江省科技厅重点资助项目(2005C23082).

作者简介:毛芝娟(1973–), 女, 工程师, 在读博士, 研究方向为鱼病及免疫. E-mail: zhijuanmao@tom.com

登录 GenBank, *psuA* 和 *pvuA* 序列号分别为 DQ141607 和 DQ141608 (此部分内容未在此文中显示)。上述 2 种外膜蛋白, 以 *SingalP* 软件预测信号肽序列, 分别针对信号肽后编码序列和 ORF 终止密码前序列设计上下游引物, *psuA* 上游引物为 p1 5' CGGGATCCTCA-GAAGAGACAACTCAACCC 3', 下游引物为 p2 5' ACGCTCGAGCTAGAACTGGTATCCGTAGCTA 3'; *pvuA* 上游引物为 p3 5' TAGAATTCGCTCCT-GCCGCAAAAAACGAAA 3', 下游引物为 p4 5' TAGAATTCGCTCCTGCCGCAAAAAACGAAA 3', 分别在 5' 端加上酶切位点 *Bam*H I、*Xho* I 和 *Eco*R I、*Xho* I 位点。PCR 循环参数为: 初始变性 94 ℃ 5 min, 主循环 94 ℃ 30 s, 两基因为对应退火温度则分别为 53.6 ℃ 和 52.4 ℃, 退火时间 30 s; 72 ℃ 延伸 140 s, 30 个循环; 循环结束后继续延伸 8 min。

1.2.2 表达载体的构建 用相应酶分别双酶切 PCR 产物和 pET30a(+) 载体, 琼脂糖电泳回收酶切产物, 按载体与目的片段物质的量 1:3 的比例建立连接反应, 连接产物转化 CaCl_2 法制备的 BL₂₁ (DE₃) 感受态细菌。提取阳性克隆菌的质粒, 进行双酶切鉴定后交由英杰公司 (Invitrogen Co, Ltd.) 进行核苷酸测序。

1.2.3 外膜蛋白在 BL₂₁ (DE₃) 的表达和纯化 经鉴定的阳性克隆在含有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 液体培养基中培养至 OD 值为 0.5~0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 37 ℃ 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 加入 5× 上样缓冲液, 100 ℃ 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE。重组包涵体蛋白的纯化按常规方法进行, 最后以 8 mol/L 尿素溶解后以梯度透析法进行包涵体复性。以 SDS-PAGE 检测重组蛋白的纯化效果。收集透析的蛋白溶液, 以 PEG6000 低温浓缩, 经紫外法测定蛋白浓度后, 以 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, PBS) 调整到 0.5 mg/mL, -80 ℃ 保存。

1.2.4 大黄鱼的免疫和攻毒 平均质量为 150 g 的健康大黄鱼购自浙江省象山港养殖网箱, 在室内水泥池 (3 m×1.6 m×2 m) 充气暂养 1 周后进行免疫试验。试验开始之前先取 5 尾鱼的血清, 作为阴性对照。试验分 3 组, 分别为灭活全菌苗免疫组 (0.5% 福尔马林灭活的全菌疫苗 formalin-killed-whole cells, FKWC, 菌浓度 1.0×10^9 cfu/mL)、等量重组外膜蛋白混合物 (0.5 mg/mL) 免疫组和对照组。每组 40 尾, 以腹腔注射法分别注射 0.2 mL 上述抗

原, 对照组则注射相同剂量的灭菌 PBS。以沙滤海水充气暂养, 每日早晚各投喂一次海水鱼湿颗粒饵料, 投饵率为 8%, 每日吸污换水一次。免疫注射 4 周后, 每组鱼各取 10 尾进行攻毒试验, 每尾分别注射 0.2 mL 1.0×10^8 cfu/mL 的活菌液, 观察 2 周, 记录每日的发病和死亡鱼情况, 统计死亡率, 计算免疫保护率 (Relative percent survival, RPS); 对死亡鱼进行无菌解剖和病原分离, 以确定是否死于攻毒菌引起的感染。攻毒菌液浓度由前期预备试验确定, 并收集预试中感染两周后存活鱼的血清, -80 ℃ 保存。试验期间水温为自然水温, 范围为 20~24 ℃。

1.2.5 免疫印迹分析 以常规方法进行, 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后以湿转法转移到 0.45 μm 的硝酸纤维素薄膜上, 后分别以感染存活鱼抗血清 (1:50 稀释)、1:500 稀释的兔抗大黄鱼 IgM 重链血清、1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 中室温孵育, 最后以 TMB 底物缓冲液显色。试验设立大黄鱼阴性血清对照, 以相同的倍比稀释。

2 结果与分析

2.1 铁调外膜蛋白的 PCR 克隆和原核表达载体 pET30a-IROMP 构建

以新鲜提取的副溶血弧菌 ZJ2003 菌株的 DNA 为模板, 以相应引物进行 PCR, 成功克隆到两种目的蛋白成熟肽的编码基因 (图 1-a)。将目的基因分别克隆到 pET 30a(+) 载体的 *Bam*H I 和 *Xho* I 及 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点, 阳性克隆提取质粒经酶切鉴定, 分别切出相应大小的目的片段 (图 1-b)。测序结果表明, 插入片段长度分别为 1 962 bp 和 2 028 bp, 经 BLASTN 比对, 与副溶血弧菌 RIMD 2210633 相应基因的同源性均达到 98%。

2.2 重组铁调外膜蛋白的表达和纯化

E. coli BL₂₁ (DE₃) 重组表达菌株经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h, 其全菌蛋白经 SDS-PAGE 后蛋白带的组成情况见图 2-a。预测重组 *psuA* 和 *pvuA* 分子量分别为 77.94 kD 和 80.77 kD, 重组菌中分别出现了加粗的分子量约为 80 kD 的蛋白条带, 与预期片段大小基本相符, 而仅转化了 pET30a 原始载体的对照菌株则无此种现象。表达菌悬液经超声破碎后发现, 目的蛋白在沉淀中, 表明重组蛋白以包涵体形式表达。重组的包涵体蛋白经尿素法纯化后, 获得较单一的蛋白条带, 纯化率在 85% 以上 (图 2-b)。

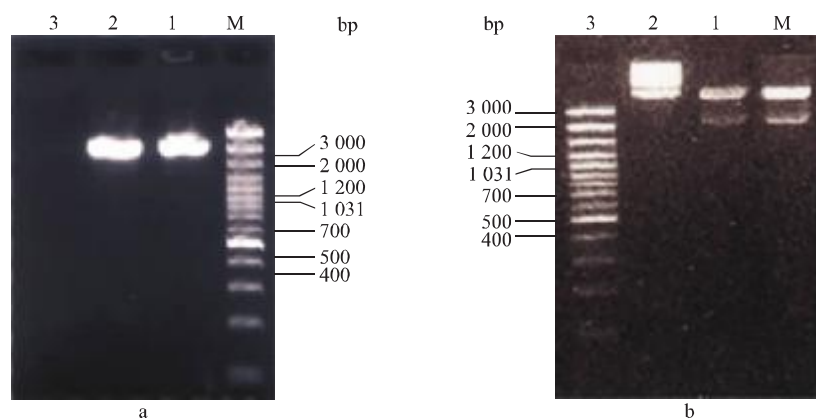


图 1 *psuA* 和 *pvuA* 的 PCR 克隆 (a) 和原核表达载体 pET30a-IROMP 的构建 (b)

M: 核酸分子量标准; a: 1, *psuA*; 2, *pvuA*; 3, 阴性对照; b: 1, pET30a; 2, pET30a-*psuA*; 3, pET30a-*pvuA*

Fig.1 PCR amplifying of mature peptide coding sequence of *psuA* and *pvuA* (a) and enzyme digestion of recombinant vector pET30a-IROMP (b)

M: marker; a: 1, *psuA*; 2, *pvuA*; 3, negative control; b: 1, pET30a; 2, pET30a-*psuA*; 3, pET30a-*pvuA*

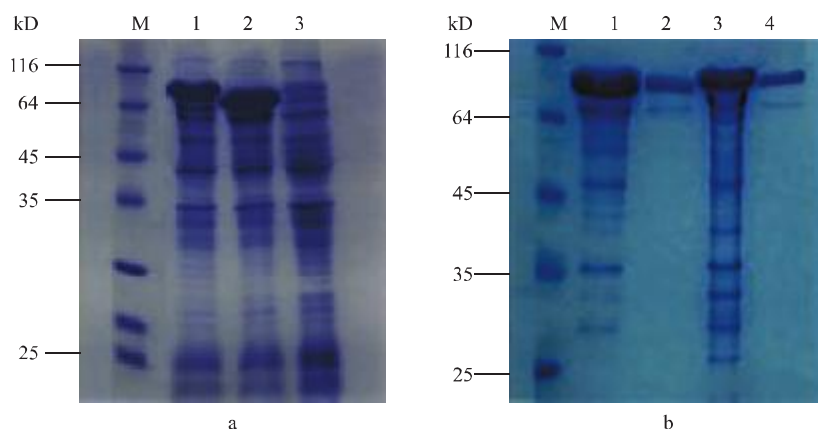


图 2 重组蛋白的诱导表达 (a) 及包涵体的纯化 (b)

M: 蛋白分子量标准; a: 1, *psuA*; 2, *pvuA*; 3, 对照; b: 1, *psuA* 包涵体; 2, 纯化的重组 *psuA*; 3, *pvuA* 包涵体; 4, 纯化的重组 *pvuA*

Fig.2 Expression and purification of the recombinant IROMP

M: protein marker; a: 1, *psuA*; 2, *pvuA*; 3, control; b: 1, fusion body of *psuA*; 2, purified recombinant *psuA*; 3, fusion body of *pvuA*; 4, purified recombinant *pvuA*

2.3 重组铁调外膜蛋白对大黄鱼的免疫保护率 (RPS)

人工攻击后试验鱼的累计死亡情况见图 3。攻击后 14 天内重组铁调外膜蛋白和灭活全菌苗免疫组分别出现了 20% 和 10% 的死亡率,而对照组试验鱼在攻毒后 7 天内全部死亡;100 μ g/尾腹腔注射两种重组蛋白的混合物免疫大黄鱼获得了 80% 的免疫保护率,稍低于全菌苗免疫组 (表 1)。

2.4 攻毒存活鱼血清对重组铁调外膜蛋白的识别

经初步纯化的重组 *psuA* 和 *pvuA* 在 SDS-PAGE 后转移到 NC 膜上,以 Western blot 测试攻毒存活鱼血清对此两种蛋白的识别情况,结果在两目的蛋白的对应位置各出现了一条反应带,而阴性对照血清则未识别出任何条带 (图 4),表明副溶血弧菌活菌感染后存活鱼体内可产生针对此两种 IROMPs 的抗体。

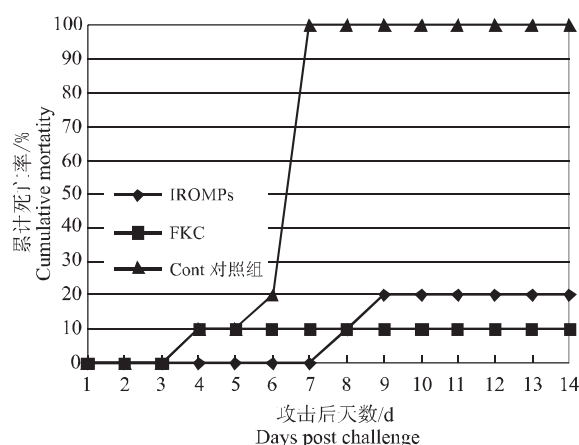


图 3 人工攻击后 14 天内试验鱼累计死亡率

Fig.3 Cumulative mortality of the challenged fish in 14 days

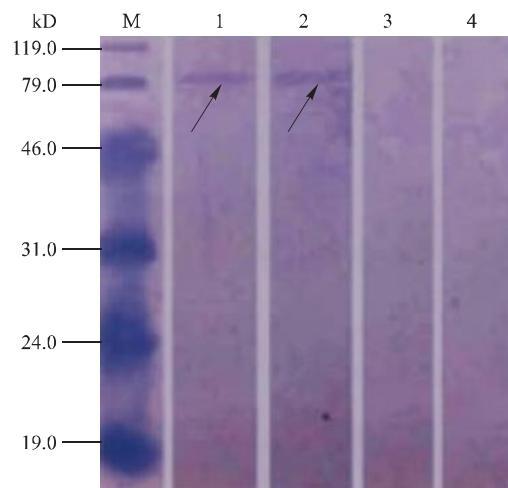


图 4 感染存活鱼血清对重组蛋白的识别

M, 预染的蛋白分子量标准; 1, psuA; 2, pvuA; 3, psuA 阴性对照; 4, pvuA 阴性对照

Fig.4 Western blot analysis of the recombinant proteins with antisera from survived fish after artificial challenge

M, prestained protein marker; 1, psuA; 2, pvuA; 3, negative control of psuA; 4, negative control of pvuA

表 1 以副溶血弧菌 ZJ2003 人工攻击大黄鱼后 14 d 内实验鱼的累计死亡率和免疫保护率 (RPS)

Tab.1 Cumulative percent mortality and RPS of vaccinated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), following intraperitoneal challenge with *V. parahaemolyticus* ZJ2003

分组 Group	样本数 /尾 Sample	14 天内累计死亡数 /尾 Cumulative mortality in fourteen days post challenge (pcs)														死亡率 /% Mortality	保护率 RPS /%
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d		
IROMP	10	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	20	80
FKC	10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	90
对照 Control	10	0	0	0	1	1	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100	—

3 讨论

3.1 铁调外膜蛋白的功能

铁是多数细菌生存的必需营养成分。在宿主体内,游离铁是很少的,大部分铁元素被铁结合蛋白所保留,如转铁蛋白和乳铁蛋白,或者与亚铁血红素结合在一起,病原微生物往往发展出数种摄铁系统以夺取机体内的铁供己之用;由高效铁螯合剂载铁体和相应的膜表面受体蛋白,即铁调外膜蛋白 IROMPs 所介导的铁螯合和输送系统是目前研究最多的一种。在弧菌中,霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 产生载铁体弧菌素和数种 IROMPs, 对该菌在体内的生存和定殖起到极为重要的作用^[13]。鳗弧菌由质粒编码的载铁体鳗弧菌素与受体外膜蛋白 OM2 组成

的摄铁系统是该菌重要的毒力因子^[14-15]。关于副溶血弧菌,已报道的几种重要 IROMPs 均为该菌摄铁系统的组成部分,担当重要的生理功能;如分子量为 78 kD 和 83 kD 的两种,分别为载铁体弧菌铁素和亚铁血红素的受体,其中 78 kD 的弧菌铁素受体蛋白的编码基因已被克隆到,命名为 pvuA, 其后紧随 psuA 基因,编码一种尚不明起源的载铁体的受体蛋白,推导分子量约为 75 kD, 两种蛋白对副溶血弧菌均起到重要的作用,其中任何一种蛋白基因的突变均严重影响该菌的生长^[10-12]。

3.2 铁调外膜蛋白的免疫原性

IROMPs 因其参与摄铁系统的重要生理功能和表达在细胞外膜上的胞内定位,使其自然地成为激发宿主免疫的优良抗原。关于 IROMPs 的保护性

免疫功能,在大肠杆菌、杀鲑气单胞菌、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 和脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 等病原菌中已得到证实^[7,9,16-18]。转铁蛋白受体 2 是脑膜炎奈瑟氏菌的一种重要 IROMP,其单克隆抗体可阻断该菌对铁的摄取,被认为是开发高效疫苗的良好对象^[19-20]。可以推测,多种细菌 IROMPs 激发的保护性免疫具有相似的应答机制,即特异性抗体阻断了经铁调外膜蛋白受体介导的铁转运过程,从而影响了菌体的生长和定殖。

本研究克隆了副溶血弧菌大黄鱼分离株的两种 IROMPs,并成功进行了原核表达,经包涵体纯化得到的重组蛋白对大黄鱼进行免疫注射,4 周后获得了 80% 的保护率,仅稍低于灭活全菌苗免疫组,说明经重组 IROMPs 注射免疫后大黄鱼产生了良好的免疫应答,能够保护鱼体免于感染;免疫印迹结果显示,感染存活鱼血清识别这两种外膜蛋白,提示了副溶血弧菌在鱼体内生存和增殖时表达这两种蛋白,并且刺激宿主免疫系统产生了相应的抗体。需指出的一点是,虽然预试验中分别以单一的重组蛋白免疫大黄鱼时也获得了一定的保护力(结果未在此文中显示),但稍有缺憾的是,本研究中未同时进行单一重组蛋白的免疫保护性试验,所以无法确切评价每个蛋白对免疫保护率的贡献;不过,本研究结果已经明确显示了此两种蛋白具有良好的免疫原性,是副溶血弧菌的重要保护性抗原。另外,本研究中免疫识别反应并不是很强,这可能跟注射感染与取血的时间间隔较短有关系,因为存活鱼血样是在感染活菌两周后进行的,此时的血清抗体水平一般较低。研究表明,鱼类抗体的产生需要一定的时间周期,多数鱼类受抗原刺激后往往在 2 周时才有少量可测的抗体,以后抗体效价经历一个缓慢升高的过程,在 4 周后达到比较高的效价值^[21-23]。

3.3 铁调外膜蛋白作为疫苗成份的可能性

目前,用于水产养殖动物细菌性疾病的疫苗多数仍然是灭活全菌苗,存在诸多不足之处,如疫苗研制需要组合复杂的血清型,实际使用时免疫效率不高,注射部位易出现坏死的副反应等。在人类和畜禽疫苗中针对部分传染性疾病,早已发展出安全系数高、免疫效果理想的亚单位疫苗和基因工程疫苗,如乙肝表面抗原亚单位疫苗、猪伪狂犬病毒糖蛋白基因缺失疫苗等。目前水产动物疫苗的研究和发展

也正朝着此方向进行。部分病原菌的外膜蛋白在不同血清型株菌间保守性强,免疫原性好,极有可能作为亚单位疫苗或基因疫苗的发展对象。前人的研究表明,psuA 和 pvuA 在不同来源的副溶血弧菌分离株中具有一定的保守性^[11];本研究结合两种重组蛋白免疫大黄鱼获得了良好的保护效果,证实了副溶血弧菌的两种铁调外膜蛋白 psuA 和 pvuA 能够激发保护性免疫,具有优良的免疫原性;可以推论,此两种蛋白可能作为高效疫苗的重要成份。进一步工作中有必要开展多种血清型分离株中该两种蛋白的保守性及重组蛋白免疫对不同来源毒株攻毒的保护力研究,为开发高效疫苗打下基础。

参考文献:

- [1] 毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 大黄鱼溃疡病病原的分离和鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 20 (4): 435-438.
- [2] 张建设,周丽,邢婧,等. 致病性副溶血弧菌脂多糖的制备及其对牙鲆的免疫效应[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34 (4): 571-576.
- [3] 樊景凤,宋立超,王斌,等. 一株引起凡纳滨对虾红体病的病原菌一副溶血弧菌的初步研究[J]. 海洋科学, 2006, 30 (4): 40-44.
- [4] 毛芝娟,卓华龙,杨季芳,吴雄飞. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20 (2): 187-192.
- [5] 邓先余,王智学,何建国. 三株杂色鲍致病菌一副溶血弧菌的 16S-23SrDNA 间区序列的分析[J]. 微生物学报, 2004, 44 (3): 304-308.
- [6] Griffiths E, Stevenson P, Thorpe R, et al. Naturally occurring antibodies in human sera that react with the iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* [J]. Infect Immun, 1985, 47 (3): 808-813.
- [7] Bolin C A, Jensen A E. Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia [J]. Infect Immun, 1987, 55 (5): 1239-1242.
- [8] Ebanks R O, Dacanay A, Goguen M, et al. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and *in vivo* growth conditions [J]. Proteomics, 2004 4 (4): 1074-1085.
- [9] Bricknell R, King J A, Bowden T J, et al. Duration of protective antibodies and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide [J]. Fish Shell Immunol, 1999 (9): 139-151.
- [10] Dai J H, Lee Y S, Wong H C. Effects of iron limitation on production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on hydrophobicity, cell adherence, and lethality for mice of

- Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Infect Immun*, 1992, 60 (7): 2 952 – 2 956.
- [11] Yamamoto S, Hara Y, Tomochika K, et al. Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources of *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron-repressible hemin-binding protein [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995 (128): 195 – 200.
- [12] Funahashi T, Moriya K, Uemura S, et al. Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Bacteriology*, 2002, 184 (4): 936 – 946.
- [13] Tashima K T, Carroll P A, Rogers M B, 1 et al. Relative importance of three iron-regulated outer membrane proteins for in vivo growth of *Vibrio cholerae* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64 (5): 1 756 – 1 761.
- [14] Actis L A, Potter S A, Crosa J H. Iron-regulated outer membrane protein OM2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJM1 [J]. *Bacteriology*, 1985, 161 (2): 736 – 742.
- [15] Tolmasky M E, Crosa J H. Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum* [J]. *Biol Met*, 1991, 4 (1): 33 – 35.
- [16] Prado M E, Dabo S M, Confer A W. Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein [J]. *Veterin Microbiol*, 2005 (105): 269 – 280.
- [17] Chibber S, Bhardwaj S B. Protection in a mouse peritonitis model mediated by iron-regulated outer-membrane protein of *Salmonella typhi* coupled to its Vi antigen [J]. *Med Microbiol*, 2004, 53: 705 – 709.
- [18] Ala Aldeen D A, Borriello S P. The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains [J]. *Vaccine*, 1996, 14 (1): 49 – 53.
- [19] Pintor M, Ferron L, Gomez J A, et al. Blocking of iron uptake by monoclonal antibodies specific for the *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein 2 [J]. *J Med Microbiol*, 1996, 45 (4): 252 – 257.
- [20] Ala Aldeen. Transferrin receptors of *Neisseria meningitidis*: promising candidates for a broadly cross-protective vaccine [J]. *J Med Microbiol*, 1996, 44 (4): 237 – 243.
- [21] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen [J]. *Devel Compar Immunol*, 2002, 26 (2): 181 – 90.
- [22] Davidson G A, Lin S H, Secombes C J, et al. Detection of specific and “constitutive” antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*) [J]. *Veter Immunol Immunopath*, 1997, 58 (3 – 4): 363 – 374.
- [23] Houghton G, Healey L J, Matthews R A. The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetrahymena pyriformis* with *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Devel Compar Immunol*, 1992, 16 (4): 301 – 312.

Cloning, expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003

MAO Zhi-juan^{1,2}, YOU Zhen-qiang³, WEI Yong-wei³ YU Lian³

(1. College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Ningbo Oceanography and Fishery Institute, Ningbo 315012, China; 3. Institute of preventive veterinary medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In the coastal provinces of eastern China, *V. parahaemolyticus* was one of the causative agents of vibriosis that endangered the aquaculture of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), and no effective therapy was found. To throw some light for vaccine development against this pathogen, more information on protective antigens of the bacteria must be explored. Outer membrane proteins have been proved to be strong immunogenic in many gram-negative bacteria, however, little is known about this pathogen. In this study, genes encoding two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003, which was isolated from diseased large yellow croaker net-cage cultured in Xiangshan Bay, Zhejiang Province, were cloned and inserted into prokaryotic expression vector pET30a(+). The recombinant vectors were transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE₃) and expression of the recombinant proteins was induced by addition of 1 mmol/L IPTG to the exponential phase culture and continued shaking the bacteria for 6 h at 37 °C. The recombinant proteins were over expressed in insoluble fusion bodies and were preliminary purified by urea method. Fourty large yellow croaker were individually immunized with 100 µg of the mixture of the recombinant proteins by intraperitoneal injection, while the positive control group were injected with 0.2 mL of formalin killed cells of the bacteria with the concentration of 10⁹ cfu/mL, and the negative control was treated with the same volume of sterile PBS. Four weeks after vaccination, ten fish in each group were artificially challenged by intraperitoneal injection with live bacteria and the mortality was recorded in the following 14 d. Relative percent survival rate of the tested group reached 80%. Immunoblotting results showed that both of the recombinant proteins were recognized by antisera from survival fish. It is suggested that the recombinant proteins were immunogenic, and the two iron-regulated outer membrane proteins were expressed during in vivo infection and elicited protective immunity in the fish. PvuA and psuA are important IROMPs of *V. parahaemolyticus*, which acts as outer membrane receptor for the native siderophore vibrioferrin and a siderophore of unknown origin, respectively. Both of these proteins are essential elements of iron uptake systems of the bacteria, mutation of either of the genes resulted with impairment of the bacteria growth. Antibody against the IROMPs may block the transportation of siderophore iron complex and thus damage the survival and propagation of the bacteria. Since strong immunogenicity has been demonstrated by our study, these proteins should be given enough attention for their potential of vaccine components. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 563 – 569]

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; iron-regulated outer membrane proteins; cloning; expression; immunogenicity