

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00848

副溶血弧菌融合蛋白 FlaA-OmpK 疫苗的制备及免疫保护作用

郑磊^{1,2}, 郭养浩¹, 马振宁¹, 樊海平², 吴斌², 唐凤翔¹

1. 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002;
2. 福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002

摘要: 采用延伸 PCR 技术拼接副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* VpATCC17802)的外膜蛋白 K 基因 *ompK* 和鞭毛蛋白 A 基因 *flaA*, 获得融合基因 *flaA-ompK*。制备高纯度的 r-OmpK, r-FlaA 及 r-FlaA-OmpK 蛋白。分别以所制备的 OmpK、FlaA-OmpK 和混合蛋白 OmpK+FlaA 作为免疫原, 通过口服及注射的方法免疫黑石斑鱼(*Centropristis striata*), 研究其免疫原性及对野生副溶血弧菌(Vp89)感染的免疫保护作用。ELISA 分析结果表明, 注射 FlaA-OmpK 组抗体效价最高, 是 OmpK 组的 2 倍, 是混合蛋白组的 4 倍, 注射 FlaA-Ompk 提供的免疫保护率达到 80%。本工作制备了 FlaA-Ompk 肠溶口服微球疫苗, 口服免疫组血清抗体效价低于注射组血清抗体效价, 口服 FlaA-Ompk 提供的免疫保护率达到 50%。研究结果显示融合蛋白 FlaA-Ompk 具有良好的免疫原性, 可作为多元弧菌疫苗抗原成份。

关键词: 副溶血弧菌; 融合蛋白 FlaA-Ompk; 免疫原性; 口服疫苗

中图分类号: S942

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)05-0848-06

近年来, 人工海水养殖规模迅速扩大, 生产集约化程度不断提高。病害已经成为制约水产养殖业健康发展的关键因素。在众多的细菌性病害中, 弧菌病被公认为是鱼类养殖中最为严重的病害之一。目前对海水鱼类弧菌病的防治主要依赖抗生素, 抗生素的使用导致耐药性微生物的产生, 并可能带来水产品药物残留问题。研发高效渔用疫苗, 通过免疫途径提高鱼类自身免疫保护能力, 是目前预防鱼类弧菌病的有效方法之一。因此, 开发渔用弧菌疫苗十分必要。

弧菌的外膜蛋白 OmpK 广泛存在于弧菌属的致病菌, 具有良好的免疫原性和免疫保护性^[1-6]。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)在天然免疫系统中发挥着重要作用^[7]。鱼 TLR5 是鞭毛蛋白的受体, 鞭毛蛋白可能具有免疫增强作用。因此, 本研究选择弧菌鞭毛蛋白作为融合蛋白的一个成分。

当前国内外成功开发渔用口服疫苗较少, 并

且大部分为灭活的全菌疫苗。有关渔用口服疫苗肠溶微球的研发, 国内外未见报道。本研究首次以副溶血弧菌保守结构的外膜蛋白 K(OmpK)和鞭毛蛋白 A(FlaA)的融合蛋白 FlaA-OmpK 作为疫苗的抗原成分, 研究其免疫原性和免疫保护性, 为研发弧菌基因工程亚单位疫苗提供依据, 同时初步探讨了疫苗中鞭毛蛋白的佐剂功能。本研究制备了口服 FlaA-OmpK 疫苗肠溶微球, 对黑石斑鱼(*Centropristis striata*)进行口服免疫实验, 以评价口服疫苗免疫效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和实验鱼 副溶血性弧菌标准株(VpATCC17802)及副溶血弧菌野生株 VP89 由福建出入境检验检疫局赠送; 大肠杆菌 *E.coli*DH5a 和 *E.coli*BL21 (DE3)由本室保存。

收稿日期: 2011-12-18; 修订日期: 2012-03-29.

基金项目: 福建省科技厅计划重点项目(2010N0014); 福建省教育厅 A 类科技项目(JA10024).

作者简介: 郑磊(1986-), 男, 硕士, 研究方向为水产病害防治. E-mail: zhenglei860107@163.com

通信作者: 唐凤翔, 副教授. E-mail: hellotfx@fzu.edu.cn

健康的美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)由福建省水产推广总站提供, 体质量(100±10) g。

1.1.2 试剂 pMD-19T Simple 载体, pET-28a(+) 表达载体购自 TaKaRa 公司。Pfu、Taq plus 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 BamHI、HindIII、XhoI, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海润成生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自美国 omega 公司; 丙烯酸树脂 II 号购自湖州展望化学药业有限公司; 卵磷脂购自沈阳天峰生物工程技术有限公司; HRP 标记羊抗兔购自 Thermo 公司; 可溶型单组分 TMB 底物溶液(100 mL)、Bradford 蛋白质定量试剂盒购自 TIANGEN; 其他试剂均购自国药集团公司。

1.2 实验方法

1.2.1 延伸 PCR 构建融合基因 *flaA-ompK* 取本所提供的 pMD19T-*ompK* 和 pMD19T-*flaA* 重组质粒, 酶切, 胶分离。以 *flaA* 和 *ompK* 基因片段混合物为模板, 采用延伸 PCR 拼接获得融合基因 *flaA-ompK*。

克隆融合片段 *flaA* 基因的引物(划线部分为酶切位点):

FPA: 5'-CGGGATCCATGGCGATTAACGTT-3' (Bam HI)

RPA: 5'-GCTACCGCCACCGCCGCCCAACAA GCTTAG-3'

克隆融合片段 *ompK* 基因的引物:

FPK: 5'-GGCGGTGGCGGTAGCGCAGATTA CTCTGACGGCGATAT-3'

RPK: 5'-CCGCTCGAGTTAGA AACTTGTAAG TTACTGCGA-3'(Xho I)

1.2.2 重组表达载体的构建及重组蛋白的诱导表达 重组克隆质粒 pMD19T-*flaA-ompK* 双酶切后, 经胶回收试剂盒纯化回收, 与经过同样双酶切处理的原核表达质粒 pET-28a(+) 连接, 转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂布 LB(含 Kan50 μg/mL) 平板, 挑取重组工程菌。

将挑选的工程菌接种于含 Kan 50 μg/mL 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6 ~ 0.8, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 继续培养 5 h。4℃, 5 000 g 离心收集菌体。

1.2.3 重组蛋白的纯化 重组包涵体蛋白的纯化按 Qiagen 公司纯化说明书的方法进行, 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 PEG20000 低温浓缩, -80℃ 保存。

1.2.4 肠溶微球口服疫苗的制备及表征 r-FlaA-OmpK 蛋白 5 mg 溶于 1 mL TE-buffer 中, 3 g 丙烯酸树脂 II 号溶于 50 mL 乙醇中, 这两种溶液磁力搅拌混合均匀, 作为内油相。该内油相于高速搅拌条件下(高于 1 000 r/min) 缓缓加入含 500 mL 含 0.25 mL 卵磷脂和 0.35% Span80 的液体石蜡中, 乳化 30 min, 后改为磁力搅拌(400 r/min), 持续搅拌至乙醇完全挥发, 微球固化。离心收集沉淀, 石油醚洗涤数次, 减压干燥 12 h, 即得。

微球的平均粒径采用激光粒度测定仪(Coulter LS-230, 美国)测定。

精密称取微球约 20.0 mg, 加入 5 mL 的 PBS (pH7.4) 溶液, 于 60 r/min、37℃ 振荡 2 h。过滤, 精密量取滤液 1.0 mL, Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白质含量, 计算微球载药量和包封率。

1.2.5 黑石斑鱼的免疫及抗血清的制备 免疫方式分注射免疫和口服免疫两种。注射免疫分为 4 个实验组, 即对照组、OmpK 组[100 μg/(尾·次)]、融合蛋白 FlaA-OmpK 组[100 μg/(尾·次)]、混合蛋白组[OmpK+FlaA, 100 μg/(尾·次)]。实验组腹腔注射疫苗 0.2 mL, 对照组腹腔注射 0.2 mL 无菌生理盐水。首次免疫 20 d 后, 按首免剂量加强免疫 1 次。二免后第 20 天, 随机挑选每组 3 尾石斑鱼断尾采血, 分离抗血清, -20℃ 保存备用。

制备的肠溶微球与石斑鱼粉状饲料混合, 压片成型, 自制饵料中 FlaA-OmpK 含量为 100 μg/g (饵料)。投喂含口服疫苗的饵料, 自然进食。第 1 次免疫, 每尾鱼每天投喂 0.8 g 饵料, 即每天 80 μg FlaA-OmpK, 连续投喂 4 d。首次免疫后第 20 天加强免疫 1 次。二免后第 20 天, 每组随机挑选 3 尾鱼断尾采血, 分离抗血清, -20℃ 保存备用。

1.2.6 抗血清中抗体效价的测定 将纯化后的重组蛋白 OmpK 于 4℃ 过夜包被 96 孔板。PBS 洗涤后, 每孔加 200 μL 含 5% 脱脂奶的 PBS, 37℃ 封闭 2 h; PBS 洗涤, 每孔加入 100 μL 待测石斑鱼抗

血清, 孵育 2 h; PBS 洗涤, 加入二抗(兔抗石斑鱼抗血清, 本实验室制备)^[8], 孵育; PBS 洗涤, 加入三抗(HRP-羊抗兔抗体), 孵育 1 h; 加入 TMB, 37℃ 避光反应 15 min, 每孔加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。测定 450 nm 的吸光度值(OD₄₅₀)。测定过程中同时设置阴性对照和空白对照。P/N≥2.1 时的石斑鱼抗血清最高稀释倍数即是该抗体的效价。

1.2.7 副溶血弧菌攻毒试验 以副溶血弧菌野生株 Vp89 进行感染实验。每尾腹腔注射 0.2 mL, 预实验测定 Vp89 的 LD₅₀ 为 2.53×10⁶ CFU/mL。在石斑鱼二免后第 20 天, 腹腔注射 Vp89 菌液, 菌浓为 2.53×10⁷ CFU/mL。持续观察 14 天, 记录各组鱼的发病和死亡情况。免疫保护率(RPS)的计算参照 Amend^[9]的方法。

2 结果与分析

2.1 延伸 PCR 拼接融合基因 *flaA-ompK*

以 *flaA* 和 *ompK* 基因片段混合物为模板, 采用延伸 PCR 技术拼接, 获得融合基因 *flaA-ompK*。图 1 可观察到融合基因 *flaA-ompK* 约 1 800 bp。PCR 验证和双酶切验证结果以及基因序列测定结果均表明, 目的片段准确地插入到质粒的预定位置上, 基因未发生突变和缺失。

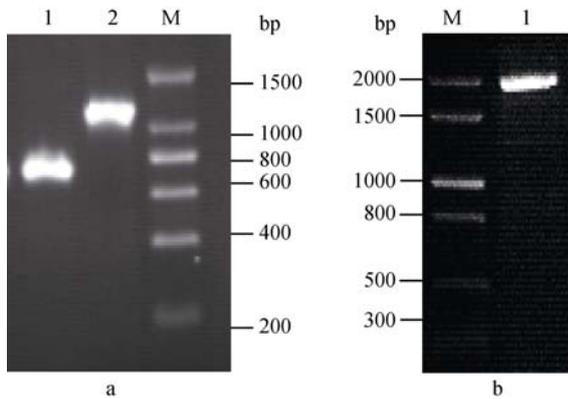


图 1 重叠延伸 PCR 扩增 *ompk*、*flaA*(a)及 *flaA-ompK*(b) 产物的电泳分析图

(a) 1. *ompk* 扩增产物; 2. *flaA* 扩增产物; M. 蛋白分子量标准.
(b) M. 蛋白分子量标准; 1. *flaA-ompk* 片段.

Fig.1 Product of *ompk*, *flaA*(a)and *flaA-ompK*(b) by overlap extension PCR

(a) 1. Amplified fragment of *ompk*; 2. Amplified fragment of *flaA*. M. marker. (b) M. Marker; 1. Fragment of *flaA-ompk*.

2.2 重组蛋白 FlaA 和 OmpK 及融合蛋白 FlaA-OmpK 的诱导表达及纯化

分别构建含有重组质粒 pMD19T-*flaA*, pMD19T-*ompK* 和 pMD19T-*flaA-ompK* 的 *E. coli* BL21 工程菌, 在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中培养至 OD 为 0.6~0.8, 加入 IPTG 诱导 5 h, 收获菌体, 进行重组蛋白纯化。

SDS-PAGE 电泳图(图 2)表明, 纯化后的 3 种重组蛋白均呈单一条带, 达到电泳纯。Ompk 重组蛋白分子量约为 30 kD, FlaA 重组蛋白分子量约 46 kD, 融合蛋白 FlaA-Ompk 分子量约 76 kD。

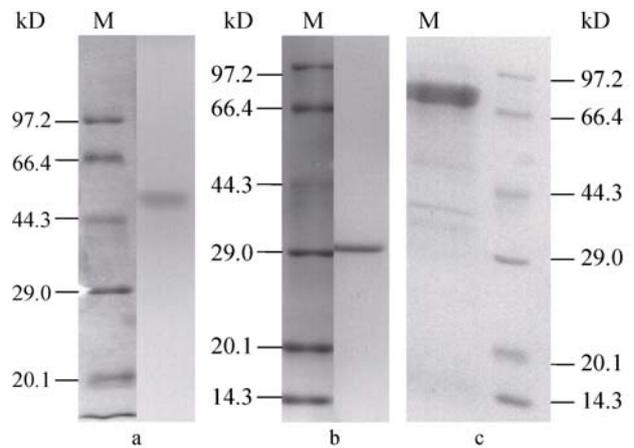


图 2 重组蛋白 FlaA(a)、OmpK(b)和 FlaA-OmpK(c)的纯化产物电泳图

M. 蛋白分子量标准.

Fig.2 Purification of recombinant FlaA(a),OmpK(b) and FlaA-OmpK(c)
M. Protein marker.

2.3 肠溶 FlaA-OmpK 微球的制备

采用 1.2.4 所述方法, 制备肠溶微球。其载药量为 1%, 包封率达(77.5±3.7)%, 平均粒径 118.3 μm。光学显微镜下, 微球呈圆球状, 粒径大小较为均匀(图 3)。

2.4 免疫黑石斑鱼血清抗体效价的测定

取石斑鱼的抗血清, 采用 ELISA 检测方法, 测定抗血清抗体效价。分析结果(表 1)表明: (1)在相同剂量(免疫蛋白质质量)条件下, 注射 FlaA-OmpK 组抗体效价最高, 达到 1 20 480。融合蛋白实验组的抗体效价是 OmpK 实验组的 2 倍, 是混合蛋白组的 4 倍。融合蛋白 FlaA-OmpK 表现出最高

的免疫原性, 高于 OmpK, 也高于混合蛋白(OmpK+FlaA)组; (2)口服 FlaA-OmpK 微球组的抗体效价高于对照组, 表明已诱发免疫反应, 产生了一定数量的抗体, 但抗体效价低于其他注射组血清抗体效价, 口服疫苗生物利用度低可能是主要原因。

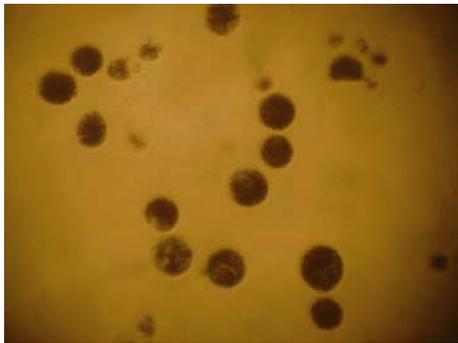


图 3 光学显微镜下的微球形态

Fig.3 Characteristics of microspheres under optical microscope

2.5 FlaA-OmpK 对副溶血弧菌 Vp89 攻击的免疫保护作用

本研究采用副溶血弧菌野生株(Vp89)为感染致病菌, 在攻击菌浓度为 10 倍 LD₅₀ 条件下, 评价融合蛋白的免疫保护作用。

对照组的黑石斑鱼人工感染后表现出典型的急性细菌出血性败血症状: 皮肤和鳍溃烂出血,

肝肿大, 具出血点, 肠道充血发红, 大多数在感染后 2~4 d 内死亡。从濒死的鱼体中分离病原菌并重新鉴定, 证明与用于人工感染的菌株相同。

在 2 个免疫实验组中, 融合蛋白 FlaA-OmpK 注射实验组的免疫保护率达到 80%; 口服实验组的保护率为 50%, 虽然低于注射组, 但也达到较理想的效果(表 2)。实验表明, 融合蛋白 FlaA-OmpK 可以作为弧菌亚单位疫苗的抗原成分, 无论采用注射或口服免疫方式, 融合蛋白 FlaA-OmpK 均可产生良好的免疫保护效果。

3 讨论

外膜蛋白 OmpK 是弧菌属特有的外膜蛋白, 具有高度的保守性, 是一种重要的保护性抗原, 能够激发宿主的免疫反应^[3,10]。Li 等^[10]的实验证明了来源于哈维氏弧菌(EcGs020802)的 Ompk 作为疫苗成分时, 对其他病原弧菌的保护性与其氨基酸序列的同源性程度相关联, 其保护率为 40%~100%。本研究克隆了副溶血性弧菌 VpATCC17802 的 *ompk*, 经与已登录 GenBank 的数据比对, 其序列与 9 株副溶血弧菌 *Ompk* 的同源性达到 86.9%, 与 15 株哈氏弧菌同源性为 82.7%, 与 4 株创伤弧菌同源性为 80.8%, 与 9 株溶藻弧菌同源性为 83.2%, 与 1 株鳗弧菌同源性为 82%。本研究首次

表 1 免疫第 40 天各组鱼血清抗体效价的 ELISA 比较
Tab.1 Specific antibody titers by ELISA in the sera of fish on the 40th day

免疫组别 group	抗体效价 antibody titer	抗体效价(Log ₂) antibody titer(Log ₂)
对照组 control group	8	3
注射 OmpK 组(100 μg·尾 ⁻¹ ·次 ⁻¹) injecting OmpK group	10240	13.32
注射 FlaA-OmpK 组(100 μg·尾 ⁻¹ ·次 ⁻¹) injecting FlaA-OmpK group	20480	14.32
注射 OmpK 和 FlaA 混合组(100 μg·尾 ⁻¹ ·次 ⁻¹) injecting OmpK+FlaA group	5120	12.32
口服 FlaA-OmpK 组(80 μ·尾 ⁻¹ ·次 ⁻¹) oral FlaA-OmpK group	1280	10.32

表 2 FlaA-OmpK 免疫对副溶血弧菌 Vp89 攻击的免疫保护率
Tab. 2 Relative percent survival of vaccinated *Centropristis striata*, following intraperitoneal challenge with *Vibrio parahaemolyticus*89

组别 group	样本数 total number	死亡率/% mortality rate	免疫保护率/% RPS
对照组 control group	10	100	-
口服 FlaA-OmpK 组 oral FlaA-OmpK group	10	50	50
注射 FlaA-OmpK injecting FlaA-OmpK group	10	20	80

将高同源性的 OmpK 作为所制备的融合蛋白 FlaA-OmpK 亚单位疫苗的主要抗原成分,可诱导产生弧菌种间和种内的交叉免疫保护效果。后续实验已证明 FlaA-OmpK 对鳗弧菌具有良好的交叉免疫保护作用,研究成果将陆续报道。

细菌鞭毛蛋白是 TLR5 受体的配体^[11]。Lee 等^[12]通过鼻腔免疫小鼠模型,证明了创伤弧菌的鞭毛蛋白 FlaB 和破伤风类毒素同时给予小鼠时,能够抵御破伤风毒素的毒性。并且通过放射示踪技术证明 FlaB 可结合上皮细胞膜上 TLR5 受体,表明了鞭毛蛋白作为黏膜佐剂能够产生免疫保护性。本研究将鞭毛蛋白 FlaA 与 OmpK 拼接,制备融合蛋白 FlaA-OmpK。免疫试验证明,融合蛋白 FlaA-OmpK 实验组抗血清中抗 OmpK 抗体的效价高于 Ompk 实验组,尽管前者所用疫苗中 OmpK 含量仅为后者的 4/10,可见 FlaA 具有显著的免疫增强效果,在疫苗抗原成分中添加鞭毛蛋白,有助于提高主要抗原成分的免疫作用。融合蛋白 FlaA-OmpK 实验组的免疫原性高于混合蛋白组(OmpK+FlaA)的实验结果表明,为了实现弧菌亚单位疫苗 OmpK 的广谱免疫原性和 FlaA 的免疫增强作用的最佳综合效果,制备融合蛋白是一种可供选择的最佳技术路线。

渔用口服疫苗是国内外的研究热点^[13-17]。解决口服疫苗免疫效果较差的重要途径是提高疫苗成分的生物利用度。国内已有较多的相关研究报告,大部分研究采用两种措施:(1)制备肠溶疫苗,防止抗原成分在鱼胃中被蛋白酶降解而失去活性;(2)制备微球疫苗,有利于疫苗成份在鱼后肠被吸收^[17]。本研究首次采用丙烯酸树脂包裹融合蛋白制备肠溶型微球渔用疫苗,可保证融合蛋白能够很好地到达鱼的后肠。但是口服疫苗实验组的血清抗体效价仍明显低于注射组,且口服疫苗的免疫保护率(50%)也低于注射组(80%),主要原因可能是因制备的肠溶微球颗粒较大的缘故。有研究表明,哺乳动物的小肠可吸收粒径 10 μm 以下的微球,其中粒径小于 5 μm 的微球被小肠集合淋巴结上的微皱褶细胞(M 细胞)吸收,粒径大于 5 μm 的微球仍滞留在集合淋巴结的巨噬细胞内^[18]。要

取得更好的肠道吸收效果,微球粒径需在本实验所作粒径基础上进一步缩小。

参考文献:

- [1] Inoue T, Matsuzaki S, Tanaka S. Cloning and sequence analysis of *Vibrio parahaemolyticus ompK* gene encoding a 26-kDa outer membrane protein, OmpK, that serves as receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40 [J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 134: 245-249.
- [2] Inoue T, Matsuzaki S, Tanaka S. A 26-kDa outer membrane protein, OmpK, common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40 [J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 125: 101-105.
- [3] Mao Z J, Yu L, You Z Q, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 567-575.
- [4] Li N Q, Bai J J, Wu S Q, et al. An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25: 829-833.
- [5] Qian R H, Xiao Z H, Zhang C W, et al. A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from *Vibrio alginolyticus* [J]. Aquaculture, 2008, 278: 5-9.
- [6] 张崇文, 于涟, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 9-14.
- [7] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. Cell, 2006, 124(4): 783-801.
- [8] 郑磊, 马振宁, 吴斌, 等. 美洲黑石斑鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清部分特性[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 494-498.
- [9] Amend D F. Potency testing of fish vaccines[M]. Developments in biological standardization. Basel: S.Karger, 1981: 447-454.
- [10] Li N Q, Yang Z H, Bai J J, et al. A shared antigen among *Vibrio* species: Outer membrane protein-OmpK as a versatile *Vibriosis* vaccine candidate in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28: 952-956.
- [11] Purcell M K, Smith K D, Hood L, et al. Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish [J]. Comp Biochem Physiol, 2006, 1(1)D: 77-88.
- [12] Lee S E, Kim S Y, Jeong B C, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity[J]. Infect Immun, 2006, 74:

- 694–702.
- [13] 李新华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 125–130.
- [14] 余俊红, 沈继红, 王祥红, 等. 鳗弧菌口服微胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 76–79.
- [15] 张小江, 任燕, 常藕琴, 等. 斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球疫苗的示踪及免疫效果[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 837–843.
- [16] 任艳, 张小江, 常藕琴, 等. PELA-OmpK 微球疫苗的部分特征及其对鲫鱼的口服免疫效果[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(11): 1306–1309.
- [17] Plant K P, LaPatra S E. Advances in fish vaccine delivery [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(12): 1256–1262.
- [18] Mestecky J, Eldridge J H. Tarteting and controlled release of antigens for the effective induction of secretory antibody responses [J]. Curr Opin Immunol, 1991, 3(4): 492–495.

Expression and immune characteristics of FlaA-OmpK protein in *Vibrio parahaemolyticus*

ZHENG Lei^{1,2}, GUO Yanghao¹, MA Zhenning¹, FAN Haiping², WU Bin², TANG Fengxiang¹

1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

2. Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China

Abstract: Marine vibrio is a causative agent of vibriosis, a disease that results in severe losses to the aquaculture industry. The development of *Vibrio* vaccines would likely lower the abuse of antibiotics that are currently used to ensure the safety of aquatic products. We prepared and characterized a FlaA-OmpK enteric microsphere vaccine and evaluated the effectiveness of oral vaccination. We cloned the *ompK* and *flaA* genes from the total DNA of *V. parahaemolyticus*. FlaA was fused with *ompK* into *flaA-ompK* by overlap extension PCR. The expression systems OmpK, FlaA, and FlaA-OmpK were then constructed. The recombinant proteins were expressed in large scale in *E. coli* BL21 and purified. OmpK, FlaA-OmpK, and mixed OmpK and FlaA were administered as antigens to immunize *Centropomus striata*. Vaccination with FlaA-OmpK protected against the infection by *V. parahaemolyticus*. The titers of the anti-serum from immunized *C. striata* against FlaA-OmpK were highest 40 d after immunization, and were two times that of the OmpK group and four times that of the OmpK group. The serum titers of the FlaA-OmpK were significantly lower in fish that were treated orally relative to those that were injected. The fish immunized with r-FlaA-OmpK had high survival (80%) compared with the control group. Similarly, the oral FlaA-OmpK protection rate (50%) was lower than that in the injection group. Our results suggest that *V. parahaemolyticus* FlaA-OmpK is an ideal candidate for development of a Vibriosis vaccine.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; fusion protein FlaA-OmpK; immunogenicity; oral vaccine

Corresponding author: TANG Fengxiang. E-mail: hellotfx@fzu.edu.cn.