

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

蒋蔚, 刘永杰, 陆承平

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 以嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) J-1 株基因组为模板, 根据 GenBank 已发表的嗜水气单胞菌外膜蛋白的基因序列设计 1 对引物, 扩增去除信号肽序列的成熟外膜蛋白 OmpA 的基因片段, 定向克隆至表达质粒 pET32a(+) 中, 重组质粒经限制性酶切鉴定后测序。结果表明, 插入片段长度为 948 bp, 与 NCBI 上登录的几个相关序列相比, 同源性在 93.1%~95% 之间, 缺失 4 个氨基酸。将重组原核表达质粒 pET32a-OmpA 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 经诱导可表达分子量约 57.4 kD 的蛋白, 凝胶薄层扫描显示 OmpA 在转化菌中表达量占全菌蛋白的 50% 以上。用兔抗 J-1 株总外膜蛋白血清进行 Western blot, 在 57.4 kD 处有明显反应条带。融合蛋白经 Ni-NTA 树脂柱亲和层析纯化后免疫新西兰兔制备抗血清, ELISA 效价达 1:12 800 以上。Western blot 检测结果显示, 该血清与 9 株具有代表性的气单胞菌的分子量约 35 kD 的外膜蛋白均有较强反应, 说明所表达的融合蛋白不仅保持原有外膜蛋白的免疫原性, 而且提示 OmpA 可能是嗜水气单胞菌的共同保护性抗原。[中国水产科学, 2008, 15(2): 301-306]

关键词: 嗜水气单胞菌; OmpA 融合蛋白; 表达; 免疫原性

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0301-06

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 在自然界广泛分布, 普遍存在于淡水、污水及土壤中, 是引起鱼类出血性败血症的重要病原之一, 人类也可因致病性嗜水气单胞菌感染而发生腹泻、食物中毒、继发感染^[1-2]。目前, 国外食品卫生检测已将嗜水气单胞菌纳入腹泻病原菌的检测范围^[3]。

嗜水气单胞菌存在多种血清型, 随地域和宿主的差异而有所不同, 这限制了灭活疫苗的使用范围^[4]。因此迫切需要找出不同血清型菌株共同的保护性抗原, 研制出新型亚单位疫苗。近年研究表明, 细菌外膜蛋白 (Outer membrane protein, OMP) 具有良好的免疫原性, 而且具有异种血清型免疫交叉保护性, 是一种潜在的共同保护性抗原^[4-5]。嗜水气单胞菌的外膜蛋白含量丰富, 生物学功能复杂, 在对宿主的感染中扮演着重要的角色, 不仅可以刺激体液免疫, 而且对细胞免疫亦有刺激作用^[5-6]。按其菌体细胞中的拷贝数量高低可分为主要蛋白和微量蛋白, 主要蛋白包括外膜 A 蛋白 (OmpA)、微孔蛋白、脂蛋白。OmpA 又称热修饰蛋白, 分子量 34~36 kD, 是一种跨膜蛋白, 在维持外膜结构上

具有重要作用, 并且其序列高度保守^[7]。

嗜水气单胞菌 Ah J-1 株具有完整的保护性抗原 (S 层、菌毛、HEC 毒素、胞外蛋白酶等), 已有不少实验证实其为理想的疫苗候选株^[8-11]。本研究克隆表达了嗜水气单胞菌 J-1 株 OmpA 基因, 并制备了兔抗 OmpA 融合蛋白的血清, 与 8 株具有代表性的嗜水气单胞菌的外膜蛋白进行免疫原性反应, 分析 OmpA 蛋白是否为嗜水气单胞菌的一种潜在的共同保护性抗原, 为研制基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所用 8 株嗜水气单胞菌的来源详见表 1。分离的时间跨度从 1989 年到 2006 年, 分离地点为江苏、浙江、湖北及福建地区。其中 J-1 株、DF850P 株和 Y-65 株为本实验室分离。其余 5 株由浙江省淡水研究中心惠赠。杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 参考株 ATCC14174 来自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection; ATCC)。

收稿日期: 2007-05-11; 修订日期: 2007-10-20。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400332); 教育部科学技术计划重点项目 (105091); 国际科学基金 (A/4108-1)。

作者简介: 蒋蔚 (1980-), 女, 硕士, 研究方向为动物病原微生物学与免疫学。Tel: 025-84395328, E-mail: jiangweijw99@163.com

通讯作者: 刘永杰 (1972-), 副教授, 博士。E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

表 1 实验用 8 株嗜水气单胞菌来源
Tab.1 The sources of 8 stains of *Aeromonas hydrophila* used in this study

菌株 Strain	宿主 Host	分离地点 Isolation location	年代 Isolation year
J-1	鲫 (<i>Carassium auratus</i>)	江苏 Jiangsu	1989
BSK-10	鲫 (<i>Carassium auratus</i>)	浙江 Zhejiang	1990
TPS30	鳊 (<i>Parabramis pekinensis</i>)	浙江 Zhejiang	1991
SPS104	鳊 (<i>P. pekinensis</i>)	浙江 Zhejiang	1993
AH9617	鲢 (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	湖北 Hubei	1996
DF850P	鲫 (<i>Carassium auratus</i>)	江苏 Jiangsu	1997
L316	日本鳗鲡 (<i>Anguilla japonicus</i>)	福建 Fujian	2000
Y-65	鲫 (<i>Carassium auratus</i>)	江苏 Jiangsu	2006

1.2 引物设计和目的基因的PCR扩增

根据已发表的嗜水气单胞菌外膜蛋白基因序列 (GenBank 登录号 AF146597), 利用软件 primer5.0 设计 1 对引物扩增去除信号肽的结构基因。上游引物 P1: 5'-AGTCTCGAGTGACGACATCTACTTCG GT-3' (下划线处为 *Xho*I 位点); 下游引物 P2: 5'-CCCGAATTCCTTCTGAACTTCTTGACG-3' (下划线处为 *Eco*RI 位点)。引物由上海英骏生物公司合成。提取嗜水气单胞菌 J-1 株的基因组, 以其为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (50 μ L) 含 Mg^{2+} 5 $\times$ Prime STARTM Buffer (lot: CN601BA) 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 引物 P1 (10 pmol/L) 和 P2 (10 pmol/L) 各 2 μ L, Prime STARTMHS DNA Polymerase 0.25 μ L, 模板 2 μ L, 补水至 50 μ L。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖恒压 90 V 电泳约 30 min, 紫外灯下观察结果, 自动凝胶成像扫描仪拍照及处理。PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (U-gene 产品) 回收。

1.3 重组表达质粒的构建和鉴定

PCR 产物和空质粒 pET32a(+) 分别用 *Xho*I (Lot: CK501C) 和 *Eco*RI (Lot: CK1552A) 双酶切, 酶切后用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收, 将回收产物用 T4 连接酶 (Lot: CK3101A) 进行连接, 转化感受态细胞 *E.coli* TOP10, 挑取单个菌落培养, 提取质粒, 酶切鉴定。将阳性克隆送至上海英骏生物公司测序。以上所用酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.4 目的基因在大肠杆菌中的表达和鉴定

分别将空质粒 pET32a(+) 和重组表达质粒 pET32a-OmpA 转化感受态细胞 *E.coli* BL21 (DE3), 将重组子接种于 2 mL 含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB

液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日以 1:100 转接入含 100 μ L/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8 时, 加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 3~4 h 后, 离心收集菌体, 加入上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 离心 1 min, 上清用于 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。分离胶浓度为 12%, 浓缩胶为 5%, 100 V 电泳约 3 h, 考马斯亮蓝染色。Western-blot 检测融合蛋白的免疫原性, 以 1:500 稀释的兔抗嗜水气单胞菌 J-1 株的主要外膜蛋白血清 (自制) 为一抗, 以 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔血清 (购自武汉博士德公司) 为二抗, 联苯二胺 (DAB) 显色。

1.5 融合蛋白的亲纯化、抗血清制备和鉴定

用 Novagen 公司的 Ni-NTA His.Bind Resin 纯化试剂盒亲和凝胶柱纯化融合蛋白, 包涵体的收集、洗涤和溶解参照操作说明书进行。将纯化的目的蛋白与等量弗氏完全佐剂 (Sigma 公司产品) 乳化后, 背部皮下多点注射 2.5 kg 纯种新西兰家兔 (购自江苏省农业科学院), 总注射量为 0.4 g/kg 体重。15 d 后加强免疫 1 次, 剂量同首免, 用不完全弗氏佐剂乳化。第 2 次免疫后 10 d, 心脏采血制取血清。以提纯的 J-1 株总外膜蛋白 OMPs 为包被抗原, 检测其抗体反应, 同时用纯化的 OmpA 表达蛋白为包被抗原, 检测其效价。按常规方法进行 ELISA 检测以测定血清效价, 以方阵实验数据为依据, 将纯化的蛋白包被聚苯乙烯板, 以倍比稀释的血清为一抗, 以 HRP-羊抗兔 IgG 为二抗, OPD-H₂O₂ 显色。纯化的融合蛋白和提纯的气单胞菌外膜蛋白的混合物经 SDS-PAGE 后, 电转移到 PVDF 膜上。以免疫兔血清为一抗, 以 HRP-羊抗兔 IgG 酶标结合物为二抗, Western blot 检测抗体特异性。

1.6 细菌外膜蛋白的提取

参考文献 [9] 提取各菌株的总外膜蛋白。

2 结果与分析

2.1 *OmpA* 基因的 PCR 扩增和克隆

嗜水气单胞菌 J-1 株基因组为模板,经 PCR 扩增得到与预期大小相符的约 948 bp 的 *OmpA* 基因目的片段 (图 1)。将 *OmpA* 基因定向克隆至表达质粒 pET 32a(+). 重组质粒经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切得到约 948 bp 和 5 900 bp 的片段 (图 2),与预期结果一致。将重组表达质粒命名为 pET32a-OmpA。

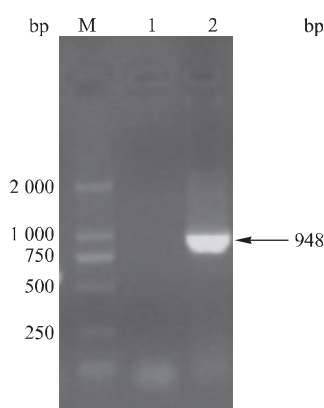


图 1 *OmpA* 基因 PCR 扩增

M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: *OmpA* 基因的 PCR 产物。

Fig.1 PCR amplification of *OmpA* gene

M: Marker; 1: Negative control; 2: PCR product of AhJ-1 *OmpA* gene.

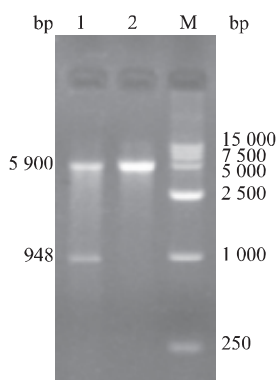


图 2 pET32a-OmpA 双酶切鉴定

M: DNA Marker; 1: *Xho*I 和 *Eco*RI 消化的 pET32a-OmpA 质粒; 2: 无插入片段的 pET32a(+) 质粒。

Fig.2 Restriction endonuclease identification of pET32a-OmpA

M: DNA Marker; 1.: The *Xho*I and *Eco*RI digested pET32a-OmpA; 2: pET32a(+) vector without the inserted fragment.

2.2 基因测序及同源性分析

运用 DNASTar 和 ClustalW 进行序列分析表明, J-1 株成熟外膜蛋白 *OmpA* 基因序列共 948 个碱基, 编码 316 个氨基酸, 推测的编码蛋白分子量约为 34.8 kD。与美国嗜水气单胞菌 ATCC 7966 株的全序列 (GenBank 登录号 CP000462) 比对发现, 与其中 MOMP (Major outer membrane protein) 基因和 *OmpA* II 的核苷酸同源性为 95% 和 55.2%, 氨基酸同源性为 95% 和 55.1%; 与新加坡 PPD134-91 株、Ah-1 株和中国福建株 ML316 株的 *OmpA* 比对, 核苷酸同源性分别为 92.3%、94.7% 和 94.6%, 氨基酸的同源性分别为 94%、93.4% 和 94.3%, 同源性均较高; 与以上各株相比均少 12 个碱基, 分别在两个位置少 1 个和 3 个氨基酸, 不过读码框正确, 未发生移码。与英国杀鲑气单胞菌 NCIMB1102 株 *OmpA* I 基因比对核苷酸和氨基酸同源性分别为 89.1% 和 87%; 根据与 NCBI 上相应菌株的 Blast 比对结果, J-1 株 *OmpA* 基因与大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和志贺氏菌 (*Shigella*) 等革兰氏阴性细菌外膜蛋白 *OmpA* 基因同源性为 25%~30%。

2.3 目的基因在大肠杆菌中的表达及鉴定

AhJ-1 株成熟外膜蛋白的分子量约 34.8 kD, 加上 pET32a(+) 质粒编码的共表达约 22.6 kD 的蛋白片段, 推测融合蛋白分子量为 57.4 kD。表达菌经诱导后, 取样裂解处理, 进行 SDS-PAGE, 在预期分子量 57.4 kD 处出现明显的目的融合蛋白条带 (图 3), 凝胶薄层扫描显示 *OmpA* 在转化菌中表达量占全菌蛋白的 50% 以上。表达产物经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜上进行 Western blot, 结果显示, 表达产物能被抗 J-1 株总外膜蛋白的阳性血清所识别, 在约 57.4 kD 处显示明显的棕色条带 (图 4), 证明表达产物具有很强的免疫原性。

2.4 高免血清的检测

纯化蛋白免疫新西兰大白兔后, 获得了兔抗 J-1 株 *OmpA* 的血清。用提纯的 J-1 株总外膜蛋白 OMPs 为包被抗原, 抗 J-1 株总外膜蛋白的血清为阳性对照, 未免疫兔血清为阴性对照进行 ELISA 检测, 当免疫血清以 1:100 倍稀释时, 与 OMPs 反应的 OD₄₉₂ 值均大于 1.0, 标准阴性血清 OD₄₉₂ 的值为 0.110 左右, 证明所表达的 *OmpA* 能刺激机体产生特异性抗体。以纯化的表达蛋白为包被抗原, 检测该血清的效价达 1:12 800 以上, 表明纯化蛋白诱导机体产生了良好的免疫反应。

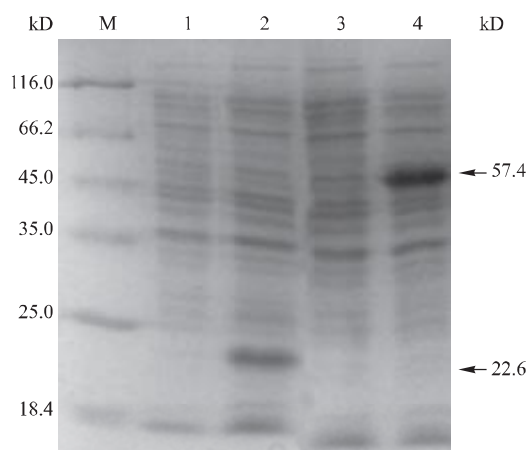


图3 细菌裂解上清的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前的 pET32a/BL21; 2: 诱导后的 pET32a/BL21; 3: 诱导后的 pET32a-OmpA/BL21 重组质粒; 4: IPTG 诱导后的 pET32a-OmpA/BL21.

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression products

M: Molecular weight marker; 1: pET-32a/BL21 before induced; 2: pET-32a/BL21 induced by IPTG; 3: pET32a-OmpA/BL21 before induced; 4: pET32a-OmpA/BL21 induced by IPTG.

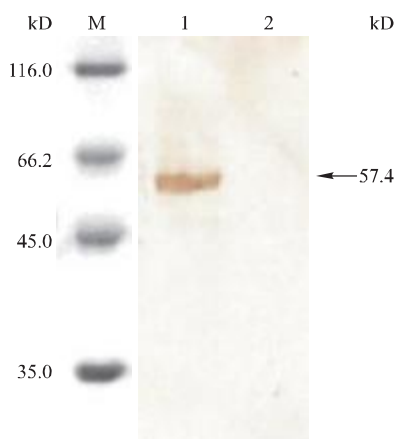


图4 融合蛋白的 Western blot 分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化的 OmpA 表达蛋白; 2: 阴性对照.

Fig. 4 Western blot analysis of the fusion protein

M: Molecular weight protein marker; 1: Purified expression protein OmpA; 2: Negative control.

从具有代表性的 8 株嗜水气单胞菌和 1 株杀鲑气单胞菌中分别提取总外膜蛋白, 以兔抗 OmpA 的免疫血清为一抗进行 Western blot, 结果显示, 在 35 kD 左右处均有明显反应条带 (图 5), 表明免疫血清可以有效识别天然外膜蛋白的抗原表位, 所表达的融合蛋白具有良好的免疫原性。

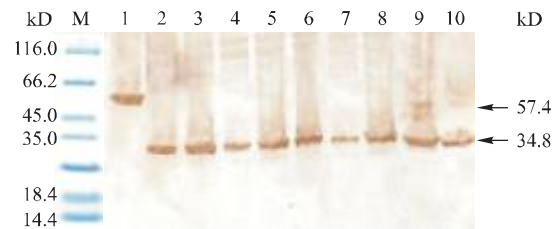


图5 嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌外膜蛋白的 Western blot 检测结果

M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化的 OmpA 表达蛋白; 2-10: 来自于嗜水气单胞菌 AhJ-1, AhY-65, AhTPS30, AhL316, AhAH9617, AhSPS-104, AhBSK-10, AhDF850P 和 ATCC4197 株的 OMPs.

Fig.5 Western blot analysis of OMPs from 8 strains of *A. hydrophilia* and one strain of *A. salmonicida* using the antibody against fusion protein

M: Protein marker; 1: purified expression protein OmpA; 2-10: OMPs from AhJ-1, AhY-65, AhTPS30, AhL316, AhAH9617, AhSPS-104, AhBSK-10, AhDF850P and *A. salmonicida* ATCC4197, respectively.

3 讨论

嗜水气单胞菌是中国淡水鱼类一种重要的条件致病菌, J-1 株是国内标准的疫苗制备菌株, 对其毒力因子、培养特性等背景已有较清楚的了解, 但对 J-1 株的 OMPs 研究不多。本实验首次克隆表达了 J-1 株的外膜蛋白 *OmpA*, 并分析了其免疫原性。兔抗融合蛋白抗体与 J-1 株及从其他 7 株鱼源嗜水气单胞菌中提取的分子量约 35 kD 的外膜蛋白均有较强反应, 说明 *OmpA* 与表达载体共表达的融合蛋白抗原结合位点没有改变。与 GenBank 登录的序列 (AF146597) 比对, 尽管 J-1 株缺失了 4 个氨基酸, 但并未影响蛋白的免疫原性。本实验所选 8 株鱼源嗜水气单胞菌包含了国内 3 个主要血清型, 包括 20 世纪 90 年代初广泛流行于湖北、浙江和江苏等地的主要血清型 O: 9 (代表株 Ah9617, AhTPS30); O: 5 (代表株 J-1, BSK-10), 以及福建鳖源嗜水气单胞菌优势血清型 O: Ah10501 (代表株 M316)^[12]。提示嗜水气单胞菌 *OmpA* 可能是嗜水气单胞菌属的共同保护性抗原。

BLAST 进一步比对发现, 嗜水气单胞菌 J-1 株的 *OmpA* 与杀鲑气单胞菌 NCIMB 1102 株的 *OmpAI* 的核苷酸和氨基酸序列同源性也相对较高 (87% 和 89%)。Western blot 显示, 兔抗 *OmpA* 融合蛋白的抗体与杀鲑气单胞菌参考株 ATCC14174

的外膜蛋白也有交叉免疫反应,表明 OmpA 蛋白有可能是嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌的共同保护性抗原。

据报道,气单胞菌纯化的 OMP 具有较强免疫保护性^[5-7,13]。但是 OMP 的提纯过程复杂,耗时长,且一次获得量较少。基因工程表达的嗜水气单胞菌 OMP 则可以大量表达目的蛋白,并且同样具有良好的免疫原性^[14-15]。欧阳岁东等^[16]曾克隆表达了鳗源嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 MOMP(属于 OmpA 蛋白家族),与本研究的 J-1 株的 OmpA 核苷酸和氨基酸序列相比,同源率为 94.6% 和 94.3%,在两个位置上分别缺少 1 个和 3 个氨基酸,并且包括了信号肽序列。考虑到信号肽序列可能会影响表达菌本身外膜蛋白的表达,从而影响蛋白表达量,本研究克隆了去除信号肽序列的成熟外膜蛋白基因,并获得高效表达。

本研究首次报道了中国鱼源嗜水气单胞菌代表株 J-1 的 OmpA 与国内外的一些分离株氨基酸序列上的差别。鉴于嗜水气单胞菌菌株间的毒力差异较大,其缺失的氨基酸部分在外膜蛋白功能上所起的作用还不得而知,值得进一步探讨。但是研究表明所缺失的部位没有影响表达蛋白的免疫活性,而且提示 OmpA 蛋白很可能为气单胞菌属的共同保护性抗原,这些结果为 OmpA 作为嗜水气单胞菌基因工程亚单位疫苗的候选成份提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 陈怀青,陆承平. 家养鲤科鱼爆发性传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报,1991,14(4): 87-91.
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病[J]. 水产学报,1992,16(3): 282-288.
- [3] Altwegg M, Geiss H K. *Aeromonas* as a human pathogen[J]. Crit Rev Microbiol, 1989, 16: 253-286.
- [4] 钱冬,陈月英,沈锦玉. 引起鱼类爆发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型毒力及溶血性[J]. 微生物学报,1995,35: 460-464.
- [5] Maji S, Mali P, Joardar S N. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 462-473.
- [6] Rahman M H, Kawai K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(4): 379-382.
- [7] 鱼艳荣,刘希成,张彦明,等. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展[J]. 动物医学进展,2000,21(2): 35-39.
- [8] 涂小林,陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及特性分析[J]. 微生物学报,1992,32(6): 432-438.
- [9] 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[J]. 南京农业大学学报,1993,16(2): 69-73.
- [10] 严亚贤,孙建和,陈怀青,等. 嗜水气单胞菌菌毛的提纯及特性分析[J]. 南京农业大学学报,1995,18(3): 88-93.
- [11] 严亚贤,陈怀青,陆承平. 嗜水气单胞菌 S 蛋白提纯及其特性分析[J]. 微生物学报,1996,36: 144-150.
- [12] 董传甫,林天龙,俞伏松,等. 鱼源气单胞菌的分离鉴定及血清学调查[J]. 水利渔业,2004,24(6): 78-81.
- [13] 董传甫,林天龙,龚晖,等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验[J]. 水生生物学报,2005,29(3): 285-290.
- [14] 黄晓,叶巧真,何建国,等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 ompTS 的克隆与序列分析[J]. 水产学报,2001,25(6): 552-558.
- [15] 谢俊峰,叶巧真,何建国,等. 嗜水气单胞菌胞外膜蛋白基因 ompTS 的高效表达及其免疫原性[J]. 生物工程学报,2002,18(3): 300-303.
- [16] 欧阳岁东,林天龙,陈孝煊,等. 鳗源嗜水气单胞菌主要外膜蛋白基因克隆及其表达[J]. 水产学报,2006,30(4): 566-570.

Expression and immunogenicity analysis of the fusion protein OmpA from *Aeromonas hydrophila* strain J-1

JIANG Wei, LIU Yong-jie, LU Cheng-ping

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic & Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is a significantly important pathogen for freshwater fish and human. Outer membrane proteins from *Aeromonas* spp. have been identified as suitable candidate for vaccine development in fish. In order to express the outer membrane protein A (OmpA) of *A. hydrophila* strain J-1 and examine its immunogenicity, primers were designed according to the gene sequence of *OmpA* of *A. hydrophila* published in GenBank. With the specific primers, the coding region of *OmpA* gene from *A. hydrophila* strain J-1 was amplified by PCR method and cloned into pET-32a(+) vector. The recombinant plasmid pET32-OmpA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced with IPTG. The sequence analysis revealed that the cloned gene had 93.1%–95.0% homology with the sequences of OMPs from other strains of *A. hydrophila*, and lacked 4 amino acid residues in two sites. SDS-PAGE and western blot analysis showed that the target recombinant protein with the molecular weight of 57.4 kD was hyperexpressed in the form of inclusion body. After purified by Ni²⁺-affinity chromatography, the protein was used to immunize the rabbit. Antiserum was collected and used to detect the specificity of recombinant protein. ELISA result showed that the titer of antiserum was above 1 : 12 800. Moreover, western blot result revealed that the antiserum reacted not only specifically with the purified recombinant protein but also with about 35 kD OMPs from 8 strains of *A. hydrophila*, involving 3 major serotypes in China and one strain of *A. salmonicida*. The result indicates that recombinant OmpA has the same immunity epitopes as natural one and may be the common protective antigen in different *Aeromonas* isolates. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2) : 301–306]

Key words: *Aeromonas hydrophila*; fusion protein OmpA; expression; immunogenicity

Corresponding author: LIU Yong-jie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn