

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

李小飞, 李瑾年, 季晶晶, 余为一

(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 自行构建的 pMD18T-OmpU 重组克隆质粒经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切后, 定向插入原核表达质粒 pGEX-4T-1 中构建重组表达质粒 pGEX-4T-1-OmpU。将重组表达质粒转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 进行 IPTG 诱导表达。表达产物经 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 分析显示, 以包涵体形式表达的 GST-OmpU 融合蛋白的分子量约为 62.9 kD, 可与鼠抗拟态弧菌外膜蛋白 (Omps) 免疫血清发生特异性反应, 提示重组 OmpU 保留了天然 Omps 的抗原性。用纯化的融合蛋白免疫昆明系小鼠, 以 50 LD₅₀ 拟态弧菌 (5×10^8 CFU/mL) 攻击, 小鼠的免疫保护率为 60% (9/15)。表明 OmpU 是拟态弧菌的保护性抗原之一, 具有研发成为外膜蛋白基因工程亚单位苗的潜在价值。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 307-312]

关键词: 拟态弧菌; OmpU 基因; 原核表达; 免疫保护性

中图分类号: S942.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0307-06

拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 是一种人-兽-水产动物共患病原菌, 不仅可引起中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 和鱼类的腹水病, 亦可引发人兽腹泻或食物中毒^[1-4]。鱼蟹类腹水病是安徽省水产养殖中常见的细菌性疾病之一^[5], 目前防治该病的主要方法仍是使用抗生素, 但是随着抗生素的反复使用, 细菌产生耐药性, 抗菌治疗的效果不明显, 导致患病鱼蟹的平均死亡率达 40%~50%, 给水产养殖业造成了严重的经济损失。因此, 寻找免疫保护性抗原是预防该病暴发的重要手段。

外膜蛋白 (Outer membrane proteins, Omps) 是存在于革兰氏阴性菌外膜之中及与外膜有关的所有蛋白的总称, 在维持外膜结构、保证物质运输、参与细菌致病过程等方面有重要作用^[6]。此外, 多数外膜蛋白也是一种良好抗原, 它们可刺激机体产生特异性抗体, 通过空间阻断效应抑制细菌黏附从而保护机体免受感染^[7-9]。目前已阐明, 外膜蛋白 OmpU 是霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的重要保护性抗原之一^[10]。作者的前期研究工作表明, 拟态弧菌安徽分离株也携带 OmpU 基因, 并且 OmpU 编码基因在拟态弧菌不同分离株之间以及拟态弧菌与霍乱弧菌之间具有高度保守性^[11], 如能证实拟态弧菌的重组 OmpU 具

有良好免疫保护性, 则可将其作为基因工程苗的候选抗原。为此, 本研究以保守性高的拟态弧菌 OmpU 为靶蛋白, 对 OmpU 基因进行原核表达, 测定重组融合蛋白 GST-OmpU 的免疫保护性, 旨在为研制拟态弧菌外膜蛋白基因工程苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

拟态弧菌 HX4 安徽分离株由本研究室自患腹水病的中华绒螯蟹体内分离鉴定和保存; 重组克隆质粒 pMD18T-OmpU 由本研究室构建; 宿主菌大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 由中国科技大学生命科学院惠赠; 表达载体 pGEX-4T-1 购自 Takara 公司。

1.2 工具酶与试剂

*Bam*HI 和 *Eco*RI 限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA 清洁试剂盒、聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜)、HRP 标记羊抗鼠 IgG、低分子量蛋白 Marker、DNA Marker DL2000 和 λ DNA/*Hind* III + *Eco*RI Marker 均购自 Takara 公司; 标签蛋白 GST 购自 Sigma 公司。

1.3 实验动物

昆明系小鼠 (18~22 g) 购自安徽医科大学实验动物中心。

收稿日期: 2007-07-13; 修订日期: 2007-11-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771654); 安徽省自然科学基金项目 (070411019); 安徽省教育厅自然科学基金项目 (KJ2007A100)。

作者简介: 李小飞 (1981-) 女, 硕士研究生, 主要从事分子病原微生物学研究。E-mail: IPUO@163.com

通讯作者: 李瑾年。Tel: 0551-3388375; E-mail: Lijinnian2000@163.com

1.4 鼠抗拟态弧菌外膜蛋白免疫血清的制备

参照董传甫等^[12]报道的方法提纯拟态弧菌外膜蛋白(Omps),提纯后Omps浓度为3.2 mg/mL。用无菌生理盐水将提纯Omps稀释为400 µg/mL的蛋白溶液,加入等量弗氏不完全佐剂或弗氏完全佐剂,充分乳化免疫实验小鼠。免疫程序为:用Omps加弗氏完全佐剂进行首次免疫,免疫途径为四肢腋窝和背部皮下多点注射,免疫剂量为100 µg/只;首次免疫14 d后再用Omps加弗氏不完全佐剂背部皮下多点注射小鼠,免疫剂量同上;第二次免疫10 d后直接使用Omps腹腔注射小鼠进行第3次免疫,免疫剂量同上;第3次免疫7 d后摘眼球取血,分离血清,采用免疫琼脂扩散沉淀试验测定血清抗体效价,并于-20℃冻存备用。

1.5 重组表达质粒pGEX-4T-1-OmpU的构建与鉴定

自行构建的重组克隆质粒pMD18T-OmpU经BamHI和EcoRI双酶切后,用DNA清洁剂试剂盒回收OmpU基因,并与经同样双酶切处理的原核表达质粒pGEX-4T-1按2:1连接,转化至*E.coli* BL21感受态细胞,经Amp^r筛选获得阳性重组表达质粒pGEX-4T-1-OmpU。挑取单克隆菌落接种于5 mL LB培养液,37℃振荡培养过夜,采用碱裂解法抽提重组表达质粒,进行PCR和双酶切鉴定。

1.6 重组表达质粒pGEX-4T-1-OmpU的诱导表达

经PCR和双酶切鉴定证实为阳性的重组菌接种于含100 µg/mL Amp的LB培养液,37℃振荡培养至OD₆₀₀达0.6,加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,37℃继续振荡培养3~4 h进行诱导表达。分别提取重组菌的外周质部分、胞内可溶物和包涵体进行SDS-PAGE分析,以确定表达产物的存在位置及其可溶性。提取步骤为:重组菌沉淀悬浮于pH 8.0,含63 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA和200 g/L蔗糖的溶液中,冰浴10 min,12 000 r/min离心10 min,所得上清即为细胞外周质部分。用150 µL裂解缓冲液(pH 8.0,50 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,100 µg/mL溶菌酶)重悬沉淀,30℃水浴15 min,超声波破碎2次(150 W,每次10 s,间隔10 s),13 000 r/min离心2 min,上清为可溶性部分,沉淀为包涵体部分。

1.7 表达产物的Western-blot分析

含有pGEX-4T-1-OmpU的重组菌和含有空质粒的重组菌诱导表达后,将其细菌裂解液进行SDS-PAGE(10%分离胶和5%浓缩胶),电转移

至PVDF膜上,用含10%小牛血清的PBS封闭过夜。加1:200稀释的一抗(鼠抗拟态弧菌Omps免疫血清),清洗后加1:2 000稀释的二抗(羊抗鼠HRP-IgG),清洗后加入显色剂3,3'-二氨基联苯胺四盐酸,待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

1.8 重组融合蛋白的提取

收集诱导表达的阳性重组菌沉淀,pH 7.4,0.01 mol/L PBS离心洗涤3次,用30 mL缓冲液A(pH 8.0,50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,2 mmol/L DTT,0.1 mmol/L PMSF)重悬沉淀,-20℃反复冻融3次,超声波裂解菌体,4℃,12 000 r/min离心5 min,收集沉淀,然后用包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,0.5% TritonX-100 pH 8.0)离心洗涤2次,用30 mL STE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,2 mmol/L DTT pH 8.0)重悬沉淀,最后加入十二烷基肌氨酸钠(终浓度为15 g/L),超声波(150 W)振荡3 min,12 000 r/min离心5 min,取上清置于透析袋中,以0.01 mol/L pH 7.0 PBS透析48 h,PEG-6000浓缩后Folin-酚法测定其蛋白浓度为0.1 mg/mL,低温保存备用。

1.9 鼠免疫保护性试验

60只实验小鼠随机分成4组,每组15只。分组情况为:第1组为融合蛋白GST-OmpU免疫组、第2组为拟态弧菌外膜蛋白免疫组(Omps阳性对照组)、第3组为谷胱甘肽巯基转移酶(GST)免疫组(标签蛋白对照组)、第4组为生理盐水空白对照组。用无菌生理盐水分别将融合蛋白GST-OmpU、Omps和GST稀释为400 µg/mL,并与弗氏佐剂充分乳化制成免疫原免疫各实验组小鼠,免疫程序同1.4。末次免疫7 d后,采血分离血清测定抗体效价,同时用50 X LD₅₀浓度的拟态弧菌(5×10⁸ CFU/mL)以腹腔途径进行攻毒,攻毒后观察14 d,记录小鼠存活情况,计算免疫保护率[免疫保护率=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%]。本实验重复2次。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建与鉴定

原核表达质粒pGEX-4T-1和重组克隆质粒pMD18T-OmpU经双酶切、纯化和连接后,形成重组表达质粒pGEX-4T-1-OmpU。PCR鉴定重组表达质粒,表明在1 038 bp附近有1条特异性DNA

条带 (图 1 泳道 5); 双酶切鉴定重组质粒的结果显示 2 条 DNA 条带, 大小分别约为 4.9 kb 和 1.0 kb (图 1 泳道 4), 分别与 pGEX-4T-1 质粒 (图 1 泳道 2) 和 *OmpU* 基因片段 (图 1 泳道 5) 的大小基本相符, 说明重组表达质粒构建成功。

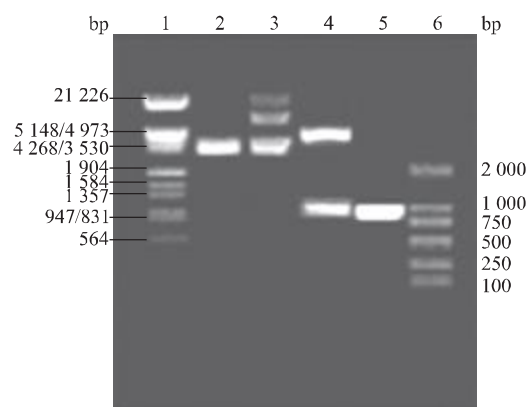


图 1 重组表达质粒的 PCR 与酶切鉴定

1: DNA marker λ DNA/*Hind* III + *Eco*RI; 2: pGEX-4T-1 质粒; 3: pGEX-4T-1-OmpU 重组质粒; 4: 经 *Bam*H I 和 *Eco*RI 双酶切的重组质粒; 5: PCR 扩增产物; 6: DNA marker DL2000.

Fig.1 PCR analysis and restriction enzyme digestion identification of recombinant plasmid

1: DNA marker λ DNA/*Hind* III+*Eco*RI; 2: pGEX-4T-1; 3: pGEX-4T-1-OmpU; 4: pGEX-4T-1-OmpU digested by *Bam*H I /*Eco*RI; 5: PCR product; 6: DNA DL2000 marker.

2.2 *OmpU* 基因的原核表达

阳性重组菌经 IPTG 诱导表达后, 细菌裂解产物 SDS-PAGE 显示出 1 条大小约为 62.9 kD 的浓染蛋白带 (图 2 泳道 5), 预期 *OmpU* 蛋白大小为 36.9 kD, GST 标签蛋白大小约为 26.0 kD, 该蛋白大小与融合蛋白 GST-*OmpU* 相符。诱导前空质粒和诱导前重组质粒电泳后均未出现 62.9 kD 浓染蛋白带 (图 2 泳道 2 和 4); 诱导后空质粒电泳后显示出 1 条大小约为 26.0 kD GST 标签蛋白带 (图 2 泳道 3)。表明 *OmpU* 基因得到成功的融合表达。

2.3 融合蛋白在原核细胞中的表达定位

重组表达质粒 pGEX-4T-1-OmpU 经诱导表达后, 分别提取细菌外周质部分、胞内可溶性部分和胞内包涵体进行 SDS-PAGE 分析。结果由图 3 可见, 外周质部分和细菌裂解上清液中有少量的融

合蛋白, 而包涵体中含有大量融合蛋白, 表明融合蛋白 GST-*OmpU* 主要以包涵体形式表达。

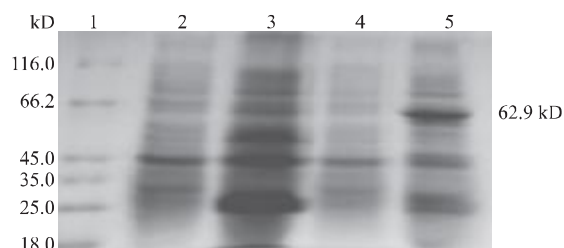


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

1: 蛋白质标准分子量; 2: 诱导前空质粒 pGEX-4T-1; 3: IPTG 诱导后空质粒 pGEX-4T-1; 4: 诱导前重组质粒 pGEX-4T-1-*OmpU*; 5: IPTG 诱导后重组质粒 pGEX-4T-1-*OmpU*.

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression products

1: Protein molecular weight marker; 2: pGEX-4T-1 without induction; 3: pGEX-4T-1 with IPTG induction; 4: pGEX-4T-1-*OmpU* without induction; 5: pGEX-4T-1-*OmpU* with IPTG induction.

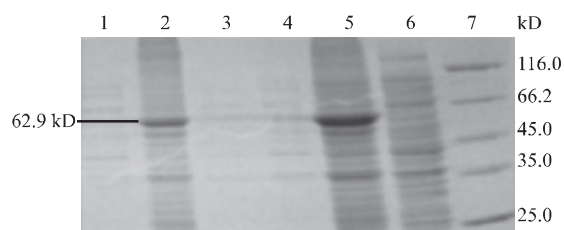


图 3 融合蛋白在原核中的表达定位

1: 上清液; 2: 包涵体; 3-4: 外周质部分; 5: 诱导后重组菌; 6: 诱导前重组菌; 7: 蛋白质标准分子量。

Fig.3 Expression of fusion protein in prokaryotic cells

1: Soluble supernatant of recombinant BL21; 2: inclusion body of recombinant BL21; 3 4: cell periplasm protein of recombinant BL21; 5: recombinant BL21 with IPTG induction; 6: recombinant BL21 without induction; 7: protein molecular weight marker

2.4 融合蛋白的 Western blot 分析

将含 pGEX-4T-1-OmpU 和含空质粒的重组菌诱导表达后的细胞裂解液一起作 SDS-PAGE, 并电转移至 PVDF 膜作 Western blot。结果显示鼠抗拟态弧菌外膜蛋白免疫血清与融合蛋白在预期大小处 (62.9 kD) 有 1 条明显的免疫反应条带, 而诱导后的空质粒对照无此条带 (图 4), 说明表达的重组 *OmpU* 蛋白具有天然 *Omps* 的抗原性。

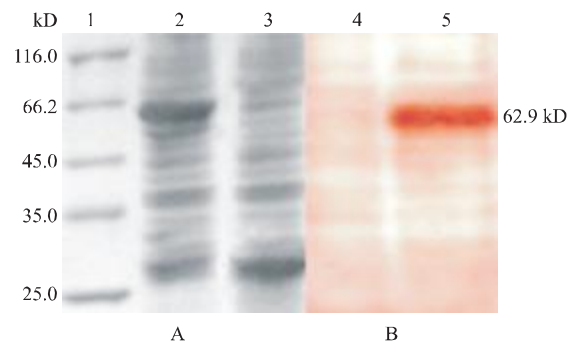


图4 融合蛋白的 SDS-PAGE (A) 和免疫印迹 (B)
1: 蛋白质标准分子量; 2、5: 诱导后重组质粒 pGEX-4T-1- OmpU; 3、4: 诱导后空质粒。

Fig.4 SDS-PAGE (A) and Westernblotting (B)
1: Protein molecular weight marker; 2, 5: pGEX-4T-1-OmpU with IPTG induction; 3, 4: pGEX-4T-1 with IPTG induction.

2.5 融合蛋白GST-OmpU的免疫保护性

实验小鼠分别经拟态弧菌外膜蛋白 Omps、重组融合蛋白 GST-OmpU 和 GST 标签蛋白免疫后, 体内均产生相应抗体, 鼠抗 Omps 抗体的琼扩效价为 1 : 32, 鼠抗 GST-OmpU 抗体的琼扩效价为 1 : 4~1 : 8, 鼠抗 GST 抗体的琼扩效价为 1 : 4。攻毒后 Omps 阳性对照组小鼠全部存活; 重组融合蛋白免疫组小鼠存活 9 只, 死亡 6 只, 免疫保护率为 60%; GST 标签蛋白对照组和生理盐水注射的空白对照组小鼠全部死亡 (表 1)。死亡小鼠的病理变化主要表现为腹腔积液, 肝、脾和肾出血或有白色坏死灶, 十二指肠明显积液, 肠黏膜轻微出血, 从肝脏和肠道内均分离得到大量拟态弧菌。表明重组 OmpU 具有一定的免疫保护性。

表 1 实验小鼠免疫保护性试验结果
Tab.1 The result of immunoprotective trial on experimental mice

组别 Group	相应抗体效价 Antibody titer	攻毒剂量 (CFU•ind ⁻¹) Challenge dosage	攻毒数 / 只 Challenged number	存活数 / 只 Survival number	保护率 / % Protective rate
GST-OmpU 免疫组 Immunized with GST-OmpU	1 : 4~1 : 8	5×10 ⁸	15	9	60
Omps 免疫组 Immunized with Omps	1 : 32	5×10 ⁸	15	15	100
GST 免疫组 Immunized with GST	1 : 4	5×10 ⁸	15	0	0
对照组 Control	—	5×10 ⁸	15	0	0

3 讨论

以往提纯细菌外膜蛋白主要采用传统的蛋白分离纯化技术, 费时费力, 得率也低, 限制了其临床应用。近年来随着基因工程技术的迅速发展, 寻找病原微生物保护性抗原并克隆其基因, 表达出具有免疫原性的基因工程亚单位疫苗日益得到人们的关注。目前关于水产动物病原菌外膜蛋白基因克隆表达的研究已有一些报道^[13-16], 但有关拟态弧菌外膜蛋白的研究尚未见有报道。本研究成功地在 大肠杆菌中表达了拟态弧菌外膜蛋白 OmpU, 重组 OmpU 可保护实验小鼠抵抗拟态弧菌的感染, 表明外膜蛋白 OmpU 是拟态弧菌的保护性抗原之一, 可作为基因工程亚单位疫苗的候选抗原在腹水病免

疫防治中发挥作用。

拟态弧菌是一种人-兽-水产动物共患病原菌, 小鼠也是该菌的易感动物, 同时考虑到哺乳动物易于免疫和采血, 以及有以小鼠为实验动物研究鱼源弧菌的文献报道^[17]。因此, 作者在研究中选用昆明系小鼠作为实验动物, 初步测定融合蛋白 GST-OmpU 是否具有免疫保护性, 以便在此基础上进一步做鱼体保护性试验。研究中使用重组蛋白 3 次免疫实验小鼠经后, 虽然产生了抗体, 但抗体水平较低, 琼扩效价仅在 1 : 4~1 : 8 之间, 以致于未能完全保护小鼠抵抗病原的攻击。分析抗体产生水平较低的可能原因是: (1) 虽然 GST 的正确折叠, 可引导表达产物进行正确折叠及正确生成二硫键, 但

是表达的融合蛋白与天然蛋白在构象上仍存在一定差异,不可能完全保留天然蛋白构象,因而影响其免疫原性;(2)以包涵体形式表达的融合蛋白需要经过变性与复性,复性效果可能不理想,这样活性蛋白含量就较低,导致免疫效果不好。

研究中采用的融合表达质粒为 pGEX-4T-1,在标签蛋白 GST 与 OmpU 之间有一凝血酶作用位点,通过凝血酶的酶解作用可将它们分开,获得重组 OmpU。但是作者未进行酶解处理,仍使用融合蛋白 GST-OmpU 免疫动物,主要是基于以下两方面考虑:一是融合蛋白较稳定,分子量大,免疫原性强;二是 GST 的存在并不影响动物产生针对目的蛋白的特异性抗体。

参考文献:

- [1] Thune R L, Hawke J P, Sibeling R J. Vibriosis in the red swamp crawfish [J]. Biomed Lett, 1991, 46: 97-101.
- [2] 沈锦玉,尹文林,钱冬,等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究 [J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 89-92.
- [3] 王国良,郑天伦,金珊,等. 黑鲷幼鱼腹水病病原菌 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 33-34.
- [4] Shah P D, Deokule J S. Isolation of *Vibrio mimicus* from a case of acute diarrhoea a case report [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2006, 49(3): 455-456.
- [5] 李瑾年,李玉英,胡守奎,等. 中华绒螯蟹腹水病病原研究 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(3): 267-274.
- [6] 徐建国. 分子医学细菌学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 76-80.
- [7] 李福胜,赵凤兰,胡军,等. 鼠伤寒杆菌外膜蛋白免疫原性及免疫保护性的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13(3): 156-158.
- [8] Suzuki S, Kuroe K, Yasae K, et al. Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35kD porin-like protein of *Listonella anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species [J]. Let Appl Microbiol, 1996, 23: 257-260.
- [9] 高松,吴晓东,张扬,等. 禽大肠杆菌外膜蛋白、脂多糖疫苗的免疫保护试验 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 457-459.
- [10] Chakrabarti S R, Chaudhuri K, Sen K, et al. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU [J]. J Bacteriol, 1996, 178(2): 524-530.
- [11] 李小飞,李瑾年,张传亮. 拟态弧菌安徽分离株外膜蛋白基因 OmpU 的克隆测序与生物信息学分析 [J]. 水利渔业, 2007, 29(3): 13-16.
- [12] 董传甫,林天龙,龚晖,等. 嗜水气单胞菌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): 285-289.
- [13] 谢俊锋,叶巧真,何建国,等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 OmpTS 的高效表达及其免疫原性 [J]. 生物工程学报, 2005, 18(3): 300-303.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Qian R, Chu W, Mao Z, et al. Expression, characterization and immunogenicity of a major outer-membrane protein from *Vibrio alginolyticus* [J]. Acta Biochim Biophys Sinica, 2007, 39: 194-200.
- [17] 黄志坚,何建国. 溶藻弧菌外膜蛋白 (Va-OMP) 的免疫原性及免疫保护性 [J]. 水产学报, 2006, 30(4): 538-543.

Prokaryotic expression of outer membrane protein U gene of *Vibrio mimicus* and its immunoprotection

LI Xiao-fei, LI Jin-nian, JI Jing-jing, YU Wei-yi

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Ascitic fluid disease of *Eriocheir sinensis* and fish caused by *Vibrio mimicus* is one of the most common epidemic diseases in Anhui province. Exploiting outer membrane protein vaccine against *V.mimicus* is one of the most effective means to prevent the disease. At present the domestic and foreign scholars have expounded that the outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio cholerae* is a protective antigen. Our recent studies indicate that four isolate strains of *V.mimicus* in Anhui all carry *OmpU* gene, and homology of the *OmpU* gene is high between *V.mimicus* and *V. cholerae*. To construct the prokaryotic expression plasmid for OmpU of *V. mimicus* in this study, the *OmpU* gene was inserted between *Bam*HI and *Eco*RI sites of pGEX-4T-1 after cleavage by corresponding enzymes. The recombinant expression plasmid was named as pGEX-4T-OmpU. The fusion protein GST-OmpU with molecular weight of 62.9 kD by SDS-PAGE was expressed in *E. coli* BL21 at 37 °C after 1.0 mmol/L IPTG induction for 4 hours. Western blot analysis showed that mouse anti-Omps serum could specifically react to the recombinant OmpU, which suggested the recombinant OmpU retained antigenicity of natural Omps of *V.mimicus*. In order to determine the immunoprotection of fusion protein, experimental mice were immunized by purified fusion protein GST-OmpU, one positive (immunized with outer membran protein of *V.mimicus*) and two negative controls [immunized with glutathione s-transferase (GST) and non-immunized] were set. After three times of vaccination, mice were all challenged by *V. mimicus* isolate strain HX4 with 50% lethal dosage which was about 5×10^8 CFU/mL to mice. The mice immunized with Omps all survived. The mice immunized with GST-OmpU beared protective rates of 60%. The mice immunized with GST or non-immunized mice all died. All these results indicated that OmpU of *V.mimicus* may be one of the important protective antigens to *V.mimicus* for animals and it may play an important role in developing genetic engineering subunit vaccine of outer membrane protein to prevent ascitic fluid disease. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2) : 307-312]

Key words: *Vibrio mimicus*; *OmpU* gene; prokaryotic expression; immunoprotection

Corresponding author: LI Jin-nian. E-mail: Lijinlian2000@163.com