

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00728

霍乱弧菌 TcpA 蛋白的表达及其免疫活性分析

陆吉虎, 李瑾年, 岑俊宇, 李世东, 李冠青

安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 采用 PCR 方法从鱼源霍乱弧菌 Y1 株 (*Vibrio cholerae* Y1) 扩增毒素共调菌毛蛋白 A (toxin-coregulated pilin A, TcpA) 基因并克隆至 pMD18-T 载体。序列分析显示 tcpA 基因 ORF 长 675 bp, 编码 224 个氨基酸 (GenBank 登录号 EU649677)。同源性比对发现, 该基因与 GenBank 中登录的 7 个霍乱弧菌参考株相应基因序列的核苷酸同源性和氨基酸同源性均很高, 分别为 99.6%~99.7%和 98.7%~99.1%, 表明 TcpA 蛋白相当保守。将 tcpA 基因亚克隆到表达载体 pGEX-4T-1, 并进行 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析发现分子量约为 47.0 kD 的重组 TcpA 融合蛋白主要以包涵体形式表达。Western blot 检测结果显示, 重组 TcpA 融合蛋白可与鼠抗 Vc Y1 菌株菌毛蛋白抗血清发生特异性结合反应。用纯化的重组 TcpA 融合蛋白免疫草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)制备抗血清, 双相免疫扩散试验检测抗体效价达 1:16, 且该抗血清能够明显抑制 Vc Y1 菌株对 HEp-2 细胞的黏附。草鱼免疫后第 25 天用 Vc Y1 菌株攻毒, 结果相对免疫保护率达到 73.33%。研究结果表明, 重组 TcpA 蛋白仍保留着天然菌毛蛋白的免疫原性、免疫反应性和免疫保护性, 重组 TcpA 蛋白可作为霍乱弧菌的候选诊断抗原和疫苗抗原。

关键词: 霍乱弧菌; TcpA 蛋白; 基因表达; 免疫活性

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0728-07

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 是一种人与水产动物共患病病原菌, 不仅可引起鱼类严重的脱黏病和细菌性肠炎^[1-3], 而且可通过水体和水产品感染人类, 引起烈性肠道传染病霍乱和食物中毒^[4-5]。因此, 寻找一种理想的抗原, 建立霍乱弧菌的快速检测方法以及研制其疫苗显得十分必要。

毒素共调菌毛(toxin-coregulated pilin, Tcp)是存在于霍乱弧菌表面的 IV 型菌毛黏附素, 它通过介导细菌定居、繁殖和协同霍乱毒素的分泌而发挥着致病作用^[6-8]。毒素共调菌毛蛋白 A(TcpA)是 TCP 的主要结构亚单位, 该蛋白位于菌毛顶端, 直接参与和易感细胞表面受体的特异性结合。TcpA 蛋白还是一种潜在的保护性抗原, 刺激机体产生的特异性抗体能保护人和动物抵抗霍乱弧菌的感染^[9-11]。致病性霍乱弧菌 Y1 株是本研究室从

患病草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)体内分离鉴定获得的安徽分离株, 本研究在克隆表达 Vc Y1 菌株 tcpA 基因的基础上, 系统测定重组 TcpA 蛋白的免疫原性、免疫反应性和免疫保护性以及重组蛋白抗血清的黏附抑制性, 以探明重组 TcpA 蛋白是否保留天然菌毛蛋白的免疫活性, 是否可作为候选诊断抗原和疫苗抗原。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

致病性霍乱弧菌 Y1 株(Vc Y1)由本研究室分离鉴定和保存; 工程菌 *E.coli* DH5 α 、*E.coli* BL21 (DE3)和原核表达质粒 pGEX-4T-1 为 Novagen 公司产品。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T₄ DNA 连

收稿日期: 2010-08-12; 修订日期: 2010-10-15.

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2010A118).

作者简介: 陆吉虎(1972-), 男, 硕士研究生, 从事水产动物病害研究.

通信作者: 李瑾年. E-mail: Lijinnian2000@163.com

接酶、溶菌酶、HRP 标记羊抗鼠 IgG、蛋白 Marker 和 DNA Marker 均购自 Takara 公司; 鼠抗霍乱弧菌 Y1 菌株菌毛蛋白抗血清由本研究室制备。谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析柱购自北京天根生物技术有限公司。

1.3 实验动物与细胞

草鱼(体质量约 100 g)购自安徽省肥西县丙子渔场; HEp-2 细胞由安徽省医科所病毒室惠赠。

1.4 tcpA 基因的 PCR 扩增与序列分析

根据已发表的霍乱弧菌 *tcpA* 基因序列^[12], 应用 Primer5.0 设计 1 对特异性引物(P1: 5'-CCTTAA AACACAAATGGTGGAGT-3', P2: 5'-CCAAAAT CGCTCCAATAATCC-3'; 预期扩增片段长度为 832 bp)。以提取的 Vc Y1 菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系含 10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μL, 25 μmol/L P1 和 P2 各 1.0 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 双蒸水 17.0 μL。循环条件为: 预变性 94℃, 5 min, 然后按 94℃, 45 s; 54℃, 60 s; 72℃, 60 s; 循环 30 次, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 纯化产物克隆至 pMD18-T 载体, 转化 *E.coli* DH5α, 用含 50 μg/mL Amp 的 LB 琼脂平板进行蓝白斑筛选, 挑白斑进行酶切和 PCR 鉴定。将阳性克隆送至上海生物公司测序和进行序列分析。

1.5 重组表达质粒的构建与鉴定

根据霍乱弧菌 Y1 菌株 *tcpA* 基因的全序列及表达载体 pGEX-4T-1 的阅读框要求, 重新设计 1 对特异性引物(P3: 5'-GCGGGATCCATGCAATTA TTAACAGC-3', 下划线处为 *Bam*H I 位点; P4: 5'-TGCTCTGAGCAAAATCGCTCCAATAATCC-3', 下划线处为 *Xho*I 位点), 预期扩增片段长度为 817 bp。以 pMD-18T-*tcpA* 为模板, P3、P4 为引物, 按上述条件扩增 *tcpA* 基因的完整开放阅读框。PCR 纯化产物和表达质粒 pGEX-4T-1 经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后, 用 T₄DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pGEX-4T-1-*tcpA*, 转化 *E.coli* BL21, 挑取单菌落提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。

1.6 TcpA 融合蛋白的诱导表达与纯化

将重组菌 pGEX-4T-1-*tcpA*/BL21 接种含 100 μg/mL Amp LB 培养液, 37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加入 1.0 mmol/L IPTG, 37℃诱导表达 4 h, 离心收集菌体进行 10% SDS-PAGE 分析。

收集诱导表达的菌体, 重悬于细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、100 μg/mL 溶菌酶, pH8.0), 水浴超声破碎, 离心, 沉淀重悬于包涵体洗涤液 (50 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、2 mol/L 尿素, pH8.0), 12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀重悬于包涵体增溶液(100 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、8 mol/L 尿素、25 mmol/L MDTT, pH8.0), 室温搅拌溶解 30 min, 并 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液经谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析柱进一步纯化, Bradford 法测定蛋白浓度, -20℃冻存备用。

1.7 TcpA 融合蛋白的 Western blot 检测

TcpA 融合蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后, 转至 PVDF 膜上, 用 10%BSA 4℃封闭过夜, PBST 洗膜 3 次, 加入 1:200 稀释的鼠抗 Vc Y1 菌株菌毛蛋白抗血清, 37℃孵育 1 h。洗膜后加入 1:2 000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG, 37℃孵育 1 h, 洗膜后加入二氨基联苯胺(DAB)显色, 分析 TcpA 融合蛋白的免疫反应性。

1.8 TcpA 融合蛋白的免疫原性和免疫保护性测定

将纯化的 TcpA 融合蛋白(100 μg/mL)和 GST 标签蛋白(100 μg/mL)分别与等体积弗氏完全佐剂充分乳化制成免疫原。实验草鱼随机分成 3 组, 分别注射 TcpA 融合蛋白(TcpA 融合蛋白免疫组)、GST 标签蛋白(GST 标签蛋白免疫组)和无菌生理盐水(对照组), 每组 25 尾(其中 10 尾用于采血获得抗血清), 0.3 mL/尾。14 d 后各组再加强免疫 1 次, 免疫剂量同前。于免疫后第 24 天采血分离血清, 采用双相免疫扩散试验测定抗体效价。免疫后第 25 天对草鱼攻毒, 每尾腹腔注射 Vc Y1 菌株 1.0×10⁸ CFU/ind, 连续观察 2 周, 记录死鱼数, 计算相对免疫保护率。相对免疫保护率(RPS)=[1-(受免鱼死亡率/对照鱼死亡率)]×100%。

1.9 细胞黏附抑制试验

TcpA 融合蛋白抗血清、GST 标签蛋白抗血清和正常草鱼血清各 500 μL 分别与等体积的 Vc Y1 菌株悬液(1.0×10^8 CFU/mL)混合, 37℃作用 1 h, 取混合液加入长满单层 HEp-2 细胞培养板中(预先加有盖玻片, 细菌与细胞比约为 60:1), 37℃作用 1 h。吸去菌液, PBS 洗涤 3 次, 取出盖玻片, 甲醇/冰乙酸固定、结晶紫染色、水洗、封片, 油镜下随机计数 30 个细胞表面的黏附菌数, 各实验组黏附菌数用平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, 并进行方差分析和多重比较检验, 分析 TcpA 融合蛋白抗血清对 Vc Y1 菌株黏附上皮细胞的影响。

2 结果与分析

2.1 tcpA 基因的 PCR 扩增与序列分析

由图 1 可见, 以 Vc Y1 菌株基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增到与预期大小相符的 832 bp 目的基因片段。重组质粒 pMD18-T-tcpA 经 *Bam*HI / *Sal*I 双酶切, 得到 2 条大小约为 2 622 bp 和 832 bp 的片段, 表明重组克隆质粒 pMD18-T-tcpA 构建成功。测序结果显示 Vc Y1 菌株 *tcpA* 基因 ORF 长 675 bp, 编码 224 个氨基酸(GenBank 收录序列号 EU649677)。Vc Y1 菌株 *tcpA* 基因与 GenBank 中登录的 7 个霍乱弧菌参考株(H1、M794、E7946、N16961、SM115、M045 和 8585 菌株)的相应基因序列的同源性分析显示: 它们彼此间核苷酸同源性和推导的氨基酸同源性均很高, 分别介于 99.6%~99.7%和 98.7%~99.1 %之间, 说明 TcpA 蛋白具有高度保守性(表 1)。

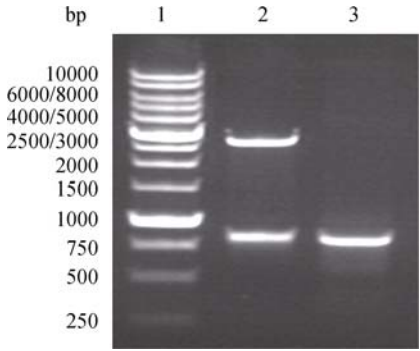


图 1 重组克隆质粒 pMD18-T-*tcpA* 的 PCR 鉴定及双酶切鉴定

1. DNA Marker SDM22; 2. pMD-18T-*tcpA* 双酶切产物;
3. pMD-18T-*tcpA* PCR 产物.

Fig.1 Electrophoresis identification of the pMD-18T-*tcpA* by PCR and restriction endonucleases analysis
Lane 1: DNA Marker SDM22; Lane 2: pMD-18T-*tcpA* digested with *Bam*HI and *Sal*I; Lane 3: amplified fragment of *tcpA*.

2.2 重组表达质粒 pGEX-4T-1-tcpA 的鉴定

重组表达质粒经 PCR 扩增, 在 817 bp 附近有一特异性 DNA 条带(图 2 泳道 5)。用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 观察到与预期大小相符相对分子量约为 4.9 kb 和 817 bp 的 2 条 DNA 条带, 分别与 pGEX-4T-1 质粒(图 2 泳道 2)和 *tcpA* 基因(图 2 泳道 5)的大小相符。

2.3 TcpA 融合蛋白的诱导表达与纯化

由图 3 可见, 重组菌 pGEX-4T-1-*tcpA*/BL2 经诱导表达后, 得到 1 条分子量约为 47.0 kD 蛋白带, 与预期的理论值(26.0 kD GST + 21.0 kD TcpA)大小一致, 而空质粒经诱导后仅表达了分子量约为 26.0 kD 的 GST 标签蛋白。菌体经超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析, 发现 TcpA 融合蛋白主要以包涵

表 1 不同霍乱弧菌菌株 *tcpA* 基因 ORF 的同源性比较
Tab.1 Homology comparison of *tcpA* ORF of different *V. cholerae* strains

菌株 strain	核苷酸同源性/% nucleotide homology	氨基酸同源性/% amino acide homology	ORF 长度/ bp length of ORF
安徽分离株 Vc Y1 strain isolated in Anhui	100.0	100.0	675
参考株 8585 reference strain 8585	99.7	99.0	675
参考株 E7946 reference strain E7946	99.7	99.1	675
参考株 H1 reference strain H1	99.7	99.1	675
参考株 M045 reference strain M05	99.7	99.0	675
参考株 M794 reference strain M794	99.6	98.7	675
参考株 N16961 reference strain N16961	99.7	99.0	675
参考株 SM115 reference strain SM115	99.7	99.0	675

体形式表达, 纯化后的蛋白质量浓度约为 4 mg/mL。

2.4 TcpA 融合蛋白的反应原性分析

Western blot 检测结果显示, TcpA 融合蛋白与 Vc Y1 菌株菌毛蛋白抗血清发生了特异性抗原抗体反应, 在 47.0 kD 处出现 1 条特异性条带, 而作为对照的 GST 标签蛋白不能与菌毛蛋白抗血清发生反应(图 4), 说明重组 TcpA 蛋白具有良好的免疫反应性。

2.5 TcpA 融合蛋白的免疫原性和免疫保护性分析

采用双相免疫扩散试验从免疫后第 24 天的草鱼血清检测到相应抗体, 抗 TcpA 融合蛋白抗

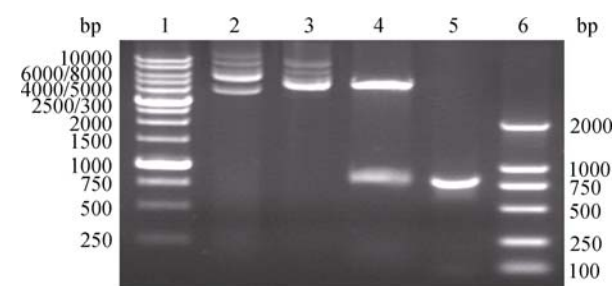


图 2 重组表达质粒 pGEX-4T-1-tcpA 的 PCR 及双酶切鉴定
1. DNA Marker SDM22; 2. pGEX-4T-1; 3. pGEX-4T-1-tcpA;
4. pGEX-4T-1-tcpA/BamHI+XhoI; 5. pGEX-4T-1-tcpA PCR 产物; 6. MarkerDL2,000.

Fig. 2 PCR and restriction enzyme digestion identification of recombinant expression plasmid pGEX-4T-1- tcpA
Lane 1: DNA marke DM22; Lane 2: pGEX-4T-1; Lane 3: pGEX-4T-1-tcpA; Lane 4: pGEX-4T-1-tcpA digested with BamHI and XhoI; Lane 5: PCR products; Lane 6: DL2,000 marker.

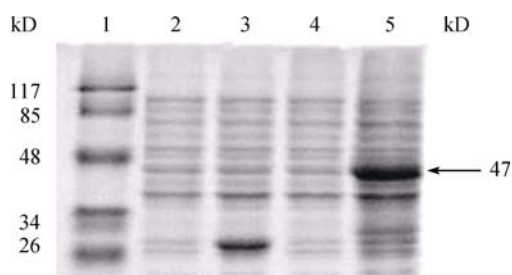


图 3 pGEX-4T-1-tcpA 表达产物的 SDS-PAGE 分析
1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导的 pGEX-4T-1/BL21; 3. 诱导后的 pGEX-4T-1/BL21; 4. 未诱导的 pGEX-4T-1- tcpA/BL21; 5. 诱导后的 pGEX-4T-1- tcpA/BL21.

Fig. 3 SDS-PAGE of pGEX-4T-1-tcpA expression in *E. coli* BL21(DE3)

Lane1: protein molecular marker; Lane 2: uninduced pGEX-4T-1-BL21; Lane 3: induced pGEX-4T-1-BL21; Lane 4: uninduced pGEX-4T-1-tcpA-BL21; Lane 5: bacterial precipitate of induced pGEX-4T-1-tcpA-BL21.

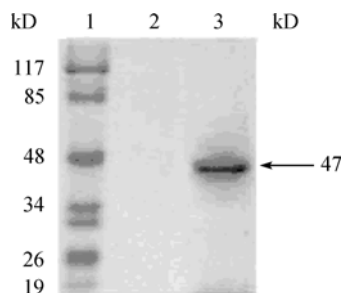


图 4 TcpA 融合蛋白的 Western blot 检测

1.蛋白分子量标准; 2.GST 标签蛋白; 3. TcpA 融合蛋白

Fig.4 Western blot assay of TcpA fusion proteins
Lane1: protein molecular marker; Lane 2: GST tag protein;
Lane 3: TcpA fusion protein

体和抗 GST 标签蛋白抗体的效价为 1:16 和 1:4(图 5)。由表 1 可见, TcpA 融合蛋白免疫组草鱼攻毒后存活 11 只, 死亡 4 只, 相对免疫保护率为 73.33%; GST 标签蛋白免疫组和对照组草鱼攻毒后全部死亡, 并从死亡鱼腹水中分离得到大量 Vc Y1 菌株。这些结果表明重组 TcpA 蛋白具有良好的免疫原性和免疫保护性。

2.6 TcpA 融合蛋白抗血清的黏附抑制作用

由表 2 和图版 1 可见 Vc Y1 菌株具有较强的细胞黏附性; Vc Y1 菌株经 TcpA 融合蛋白抗血清处理后, 对 HEp-2 细胞的黏附作用明显降低, 仅个别细胞表面黏附了几个细菌; 而细菌经 GST 标

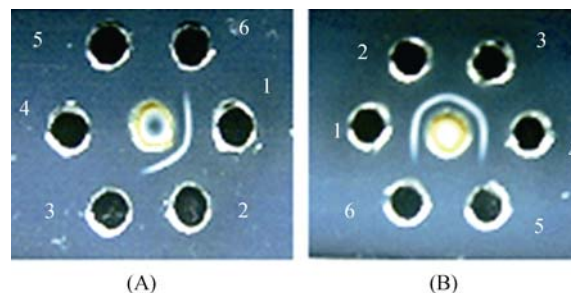


图 5 双相免疫扩散试验测定免疫后第 24 天草鱼血清中抗体效价

(A)中央孔为 GST 蛋白抗原, 1-6 孔为 1:2~1:64 稀释度的抗 GST 抗体; (B)中央孔为 TcpA 融合蛋白抗原, 1-6 孔为 1:2~1:64 稀释度的抗 TcpA 抗体

Fig. 5 Antibody titer of *Ctenopharyngodon idellus* serum at day 24 after immunization determined by double immunodiffusion test

(A) GST protein antigen in central well, serially diluted anti-GST antibodies from 1:2 to 1:64 in around wells;
(B)TcpA fusion protein antigen in central well, serially diluted anti-TcpA antibodies from 1:2 to 1:64 in around wells

表 2 免疫后实验草鱼的相对免疫保护率
Tab. 2 RPS of experimental *Ctenopharyngodon idellus* immunized

组别 group	免疫攻毒数 total number	死亡数 death number	相对免疫保护率/% relative percentage survival
TcpA 融合蛋白免疫组 immunized with TcpA fusion protein	15	4	73.33
GST 标签蛋白免疫组 immunized with GST-tag protein	15	15	0
对照组 control	15	15	0

表 3 不同抗血清对 Vc Y1 菌株黏附 HEp-2 细胞的影响
Tab. 3 Effect of different antisera on adhesion of Vc Y1 strain to HEp-2 cells

组别 group	黏附菌数 average adhesion bacterial numbers
TcpA 融合蛋白抗血清处理组 treated with antisera against TcpA fusion protein	1.367±0.890 ^a
GST 标签蛋白抗血清处理组 treated with antisera against GST-tag protein	55.283±7.257 ^b
正常草鱼血清处理组 treated with normal <i>C. idellus</i> sera	56.200±5.821 ^b
黏附对照组 adhesion control	57.100±6.288 ^c

注：a 与 c 表示两组间差异极显著 ($P<0.01$), b 与 c 表示两组间差异不显著($P>0.05$), a 与 b 间表示两组间差异不显著($P>0.05$).
Note: values with a and c show significant different ($P<0.01$); values with b and c show no difference($P>0.05$), and values with a and b show no difference($P>0.05$).

签蛋白抗血清和正常草鱼血清处理后仍能良好地黏附细胞。TcpA 融合蛋白抗血清处理组的平均黏附菌数(1.367±0.890)与黏附对照组 (57.100±6.288)相比差异极显著($P<0.01$), 而 GST 标签蛋白抗血清处理组和正常草鱼血清处理组的平均黏附菌数(55.283±7.257)和(56.200±5.821)与黏附对照组(57.100±6.288)相比差异不显著($P>0.05$)。表明重组蛋白抗血清具有特异性抑制 Vc Y1 菌株对上皮细胞的黏附作用。

3 讨论

由霍乱弧菌引起的水产动物脱黏病和细菌性肠炎, 对水产养殖业危害严重, 建立该病的免疫学快速诊断方法显得十分必要。作为诊断抗原应具有良好的特异性、保守性、免疫原性和免疫反应性。即该抗原是特定病原体所特有的、且不易发生抗原变异, 在发生感染后能有效刺激机体产生抗体,并且能够与抗体产生良好的抗原抗体结合反应从而便于检测的实现。

本实验选择霍乱弧菌所特有的毒素共调菌毛 A 蛋白(TcpA)为研究对象, 首先比较分析了鱼源霍乱弧菌安徽分离株(Vc Y1 菌株)*TcpA* 基因序列

与 7 个霍乱弧菌参考株的相应基因序列的同源性, 结果发现它们彼此间 *TcpA* 基因的核苷酸同源性和氨基酸同源性均很高(99.6%~99.7% 和 98.7%~99.1%), 说明 *TcpA* 蛋白是霍乱弧菌所特有且高度保守的菌毛蛋白。

由于菌毛蛋白在细菌表面表达量很低, 采用传统的蛋白分离纯化技术提取菌毛蛋白, 不仅含量低, 而且纯度不高, 难以满足制备大量诊断抗原的需要。大肠杆菌表达系统是应用最广泛的基因操作系统, 利用该系统表达目的蛋白, 具有工艺简单、表达量高、生产成本低等优点, 但存在的缺点是缺乏真核蛋白翻译后加工机制, 目的蛋白常以包涵体形式表达, 这种以包涵体形式表达的目的蛋白在变性和复性处理过程, 常常因不能正常解折叠而失去活性^[13]。因此, 以包涵体形式表达的目的蛋白仍需通过实验验证其是否保留原有活性。关于包涵体的复性是一个非常复杂的过程, 除与复性过程控制因素相关外, 很大程度上与蛋白质本身性质有关, 有些蛋白非常容易复性, 而另一些蛋白至今尚无复性方法。本实验采用尿素变性和透析复性法提取了以包涵体形式表达的 *TcpA* 融合蛋白, 并经亲和层析柱纯化后免疫草鱼,

结果该融合蛋白可刺激机体产生较高水平的特异性抗体; Western-blot 检测结果也显示 TcpA 融合蛋白能被 Vc Y1 菌株菌毛蛋白抗血清所识别, 从而证实重组 TcpA 蛋白仍保留着天然蛋白的抗原性, 可作为诊断抗原使用。因此, 可应用基因工程技术大量制备重组 TcpA 蛋白以解决诊断抗原不足的问题, 为霍乱弧菌的免疫学检测提供物质基础。

有关 TcpA 蛋白的免疫保护作用已有一些报道。Wu 等^[14]以 TcpA 合成肽与佐剂混合免疫小鼠, 结果显示合成肽能够保护小鼠抵抗霍乱弧菌的攻击。杜艳等^[15]用聚乙酸-聚乙二醇材料包裹 TcpA 蛋白, 制成缓释微球疫苗免疫小鼠, 使小鼠获得良好的免疫保护力, 相对免疫保护率达到 90%。本实验以 TcpA 融合蛋白与弗氏佐剂混合免疫草鱼, 免疫后第 25 天进行攻毒试验, 结果显示 TcpA 融合蛋白对草鱼的相对免疫保护率为 73.33%, 而 GST 标签蛋白不具有免疫保护作用。本实验还使用了 HEp-2 细胞模型作细胞黏附抑制试验, 初步探讨 TcpA 融合蛋白抗血清在抵抗霍乱弧菌黏附中的作用, 结果显示抗血清能明显抑制 Vc Y1 菌株对上皮细胞的黏附。这些结果表明重组 TcpA 蛋白也具有较好的免疫保护性, 可作为霍乱弧菌疫苗研制的候选抗原。

人源 HEp-2 细胞表面具有多数革兰氏阴性细菌(如霍乱弧菌)的黏附素受体, 是应用较多的细胞黏附模型^[16]。考虑到霍乱弧菌是一种人-水产动物共患病原菌以及不同宿主来源的霍乱弧菌 TcpA 蛋白相当保守, 故本实验选用 HEp-2 细胞模型测定 TcpA 融合蛋白抗血清的黏附抑制作用, 以后仍需选用鱼类细胞系进行重复试验, 比较试验结果是否存在差异。

参考文献:

- [1] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8 (1): 89-92.
- [2] 樊海平, 黄晓沅, 徐娟儿. 养殖欧洲鳗鲡脱粘病的研究[J]. 中国水产科学, 1998, 5 (2): 68-72.
- [3] 杨鸾劫, 俞菊华, 陈辉, 等. 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测[J]. 水产学报, 2006, 30 (4): 525-530.
- [4] Khuntia H K, Pal B B, Meher P K, et al. Environmental *Vibrio cholerae* O139 may be the progenitor of outbreak of cholera in coastal area of Orissa, eastern India[J]. Am J Trop Med Hyg, 2008, 78 (5): 819-822.
- [5] Bompangue D, Giraudoux P, Handschumacher P, et al. Lakes as source of cholera outbreaks, Democratic Republic of Congo[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5): 798-800.
- [6] Taylor RK, Miller VL, Furlong D B. Use of phoA gene fusions to identify a colonization factor coordinately regulated with cholera toxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(84): 2833-2837.
- [7] Craig L, Taylor R K, Pique M E. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and pseudomonas aeruginosa PAK pilin[J]. Mol Cell, 2003, 11(5): 1139-1150.
- [8] Kim T J, Bose N, Taylor R K. Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*[J]. Mol Microbiol, 2003, 49(1): 81-92.
- [9] Asaduzzaman M, Ryan E T, John M, et al. The major subunit of the toxin-coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139[J]. Infect Immun, 2004, 72(8): 4448-4454.
- [10] Taylor R K, Kim T J, Meeks M D, et al. A *Vibrio cholerae* classical TcpA amino acid sequence induces protective antibody that binds an area hypothesized to be important for toxin-coregulated pilus structure[J]. Infect Immun, 2004, 72(10): 6050-6060.
- [11] Sharma D P, Stroehner U H, Thomas C J. The toxin-coregulated pilus (TCP) of *Vibrio cholerae*: molecular cloning of genes involved in pilus biosynthesis and evaluation of TCP as a protective antigen in the infant mouse model[J]. Microb Pathog, 1989, 7(6): 437-448.
- [12] 王颖芳, 谢婧, 段广才, 等. 霍乱弧菌毒素协同调节菌毛基因 tcpA 的克隆及序列分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 2 (2): 97-101.
- [13] Ito W, Kurosawa Y. Development of a prokaryotic expression vector that exploits dicistronic gene organization[J]. Gene, 1992, 118(1): 87-91.
- [14] Wu J Y, Wade W F, Taylor R K. Evaluation of cholera vaccines formulated with toxin-coregulated pilin peptide plus polymer adjuvant in mice[J]. Infect Immun, 2001, 69: 7695-7702.
- [15] 杜艳, 缪应雷, 贾文祥. 霍乱弧菌 O139 菌毛微球疫苗制备初探[J]. 昆明医学院学报, 1999, 20 (2): 19-22.
- [16] Sherman P, Cockerill F, Soni R, et al. Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157 adherence to epithelial cells[J]. Infect Immun, 1991, 59: 890-899.

Expression and immune characteristics analysis of TcpA protein of *Vibrio cholerae*

LU Jihu, LI Jinnian, CEN Junyu, LI Shidong, LI Guanqing

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

Abstract: *Vibrio cholerae* is a causative agent of mucous-sloughing disease and bacterial enteritis in fish, with high morbidity and mortality. Toxin-coregulated pilus (TCP) is a major virulence factor of *V. cholerae*. As a major structural protein of TCP, toxin-coregulated pilin A (TcpA) is potential candidate for diagnostic antigen and vaccine development. In this study, the *tcpA* gene was amplified by PCR from genomic DNA of the Y1 strain of *Vibrio cholerae* isolated from diseased grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The *tcpA* gene was cloned into a pMD18-T vector and sequenced. The *tcpA* gene fragment containing the open reading frame (ORF) was then subcloned into pGEX-4T-1 to construct expression plasmid pGEX-4T-1-*tcpA*. The recombinant fusion protein (rGST-TcpA) was expressed by IPTG induction in *E. coli* for subsequent immunological characterization. Sequence analysis revealed that the ORF of the *tcpA* gene from the Y1 strain (GenBank accession no. EU649677) is 657 bp and encodes a protein of 224 amino acids. The gene is 99.6%–99.7% identical at the nucleotide level and 98.7%–99.1% identical at the protein level to seven *tcpA* sequences in GenBank, which suggested that the TcpA protein is considerably conserved. SDS-PAGE analysis showed that the 47.0 kD rGST-TcpA fusion protein was mainly expressed in inclusion bodies. Western blotting demonstrated that rGST-TcpA could react specifically with mouse antisera raised against the pilus protein of strain Y1. The purified rGST-TcpA was used to immunize grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The titer of the antisera was 1:16, as determined by a double immunodiffusion test, and it could significantly inhibit adherence of Y1 strain to HEp-2 cells *in vitro*. A relative percentage survival (RPS) of 73.33% was found in immunized grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) suffering from Y1 strain challenge at day 25 after immunization. This study indicated that the rTcpA protein possess the same immunogenicity, immunoreactivity, and protective efficacy as the natural pilus protein of *V. cholerae*.

Key words: *Vibrio cholerae*; TcpA protein; clone expression; immunological characteristics

Corresponding author: LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com