

创伤弧菌 OmpU 与嗜水气单胞菌 OmpII 外膜蛋白 二联表达及其初步免疫原性

郭松林^{1,2}, 陆盼盼^{1,2}, 冯建军^{1,2}, 林 鹏¹

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 从发病的养殖鳗鲡中分离出创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 提取其基因组 DNA, 再通过 PCR 法克隆创伤弧菌外膜蛋白 OmpU 和嗜水气单胞菌外膜蛋白 OmpII 的基因全长。采用融合 PCR 法体外连接这 2 个基因表达膜外片段的序列并成功构建了二联表达载体(pGEX-2T-Vibr-Aero-his)。在大肠杆菌(BL21)的吸光度 A_{600} 为 0.6~1.0 时, 采用 1.0 mmol/L IPTG 诱导剂, 16 ℃ 过夜诱导表达。表达产物经离心柱亲和层析纯化后获得分子量为 82.2 ku 的外膜蛋白。蛋白经透析复性后免疫于鳗鲡以测定其血清抗体效价。结果表明, 重组蛋白注射组的鳗鲡血清抗体效价在免疫后第 14 天和第 21 天显著($P < 0.05$) 高于 PBS 对照组, 第 28 天和第 42 天达到极显著($P < 0.01$) 水平。

[关键词] 创伤弧菌; 迟缓爱德华氏菌; OmpU; OmpII; 表达产物; 免疫原性

[中图分类号] S 917

Combined Expression and Primary Immunogenicity Study of Outer Membrane Protein OmpU and OmpII of *Vibrio vulnificus* and *Aeromonas hydrophila*

GUO Songlin^{1,2}, LU Panpan^{1,2}, FENG Jianjun^{1,2}, LIN Peng¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Morden Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, template DNAs were extracted from pathogenic *Vibrio vulnificus* and *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased eels and confirmed by challenge experiment. According to gene sequences coding the protein Omp in GenBank database, two pairs of primers were designed respectively and the whole gene fragments of OmpII of *A. hydrophila* and OmpU of *V. vulnificus* were amplified by PCR. Two gene fragments, encoding the out part of the membrane region of OmpU and OmpII respectively, were successfully obtained and the recombinant expression vector (pGEX-2T-Vibr-Aero-his) was combined by fusion PCR. Expression of the bivalent Omp was induced over night by 1.0 mmol/L IPTG at 16 ℃ when the concentration of 600 nm optical density of the bacteria was 0.6-1.0, and the expressed protein with the molecular weight of 82.2 ku was obtained and purified by HisPur Ni-NTA Resin and Kits. Eels were immunized with the bivalent OMP after purified and renatured by dialysis to determine the antibody titer. Compared with eels in

[收稿日期] 2017-01-26

[修回日期] 2017-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31001136); 福建省自然科学基金项目(2015J01143); 福建省教育厅项目(JA15283)

[作者简介] 郭松林(1976—), 男, 教授, 博士, 硕导, 从事鱼类病害与免疫防治相关研究。

PBS group, the serum titers of anti-*V. vulnificus* and *A. hydrophila* antibody in eels of Omp group, showed significant ($P < 0.05$) increase on 14 d and 21 d, and the different between the two groups reached very significant levels ($P < 0.01$) on 28 d and 42 d. The study laid a foundation for the vaccine research and application in aquaculture of the bivalent outer membrane protein.

Keywords: *Vibrio vulnificus*; *Aeromonas hydrophila*; ompU; ompII; expression; immunogenicity

0 引言

养殖鳗鲡时常发生由细菌性病原引起的病害,使鳗鲡养殖户蒙受巨大经济损失。嗜水气单胞菌(*Aeromona shydrophila*)和创伤弧菌(*Vibrio vlnnificus*)是引起养殖鳗鲡发病的 2 种主要病原菌,人工养殖的日本、欧洲和美洲鳗鲡均可因其引发肝脏溃疡、肾肿大、败血症、烂尾或烂鳃等传染性疾病^[1-2]。化学药物或抗生素在很长的一段时期内被用于有效治疗这些病原引起的疾病,由于耐药性等原因,导致可供选择使用的安全药物减少^[3],因而疫苗作为安全可靠的防病药物越来越受水产研究者的重视。近年来,关于嗜水气单胞菌和创伤弧菌灭活全菌或亚单位疫苗的研究均有过报道^[4-6],但灭活疫苗毒性较大,而单联亚单位疫苗则不能解决这 2 种病原菌复合感染的问题。迄今为止,未见嗜水气单胞菌和创伤弧菌二联外膜蛋白表达以及表达产物免疫原性的相关报道。自 2002 年以来,本试验室分离到 87 株鳗鲡病原菌,经生化和分子生物学鉴定结果表明,气单胞菌和创伤弧菌为养殖鳗鲡的主要致病菌^[7]。本文分别克隆嗜水气单胞菌外膜的 II 型孔蛋白(OmpII)和创伤弧菌外膜蛋白 U(OmpU)的基因全长,选取其可直接接触免疫系统的膜外多肽部分对应的基因片段,采用融合 PCR 法将这 2 个基因片段连接后进行联合表达,用表达产物免疫美洲鳗鲡后测定其特异性抗体水平,以期能研究出同时抵抗这 2 种病原菌感染的二联亚单位疫苗。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

自养殖的发病鳗鲡中分离的创伤弧菌和嗜水气单胞菌,经 16S rRNA 序列分析和 Biolog 菌鉴系统鉴定到种^[7]。大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 *E. coli* BL21 (DE3) 购于 TaKaRa 公司。表达载体(pGEX-2T-His)经商业化 pGEX-2T 质粒改造加入 His 标签后兼具 Gst 和 His 标签(4916 bp),含 *EcoR* I 和 *Bam*H I 等酶切位点,具 Amp 抗性。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

将创伤弧菌与嗜水气单胞菌接种于含 0.5% (质量分数)氯化钠的 LB 液体培养基中 28 ℃ 培养 16 h,收集菌体后用天根生化科技有限公司的试剂盒提取基因组 DNA,具体操作参照试剂盒说明书。提取的 DNA 经 1% (质量分数)琼脂糖电泳测定其分子量后调其质量浓度为 50 ng/μL,备用。

1.3 基因片段的選擇与扩增

在本试验室已经递交的 OmpU (GenBank accession number: KY072957) 和 OmpII (GenBank accession number: KC297682) 基因全长的膜外区域,分别选择 657 bp (307 bp—963 bp) 与 843 bp (238 bp—1080 bp) 进行扩增。

扩增 OmpU 基因片段用的引物 P1: 5'-CCGGAATTCtacgcaggtctaggcggcaagt-3'引入了 *EcoR* I 位点; P2: 5'-ACCCGAGCCACCACCGCCCCGAGCCTATACGagcgtagccagcaccgccaact-3'引入了 21 bp 连接序列(阴影)和 9 bp 的保护性碱基(斜体)。扩增 OmpII 基因片段用的引物 P3: 5'-TCGGCGCGTGGCG-GCTCGGGTGGCGGATCAtccggtatcgccaagactgaatg-3'引入了 21 bp 与 P2 的 5'端互补的序列(阴影)和 9 bp 的保护性碱基(斜体); P4: 5'-CCGGAATTCctggatcttgtactcgggttaggc-3'引入了 *Bam*H I 位点。

分别以 P1、P2 和 P3、P4 为引物扩增 OmpU 和 OmpII 的基因片段,扩增条件如下: 10 × Pfu Buffer; MgSO₄ 2.5 μL; dNTP Mix (10 mmol/L) 0.5 μL; P1 或 P3 (10 mmol/L) 0.4 μL; P2 或 P4 (10 mmol/L) 0.4 μL; 模板 DNA (50 ng/μL) 1.3 μL; Pfu DNA Polymerase 0.4 μL; 超纯水补足至

25 μL 。PCR 反应条件和 PCR 产物胶回收方法参考文献 [8] 进行。

1.4 融合 PCR 连接基因片段

第一步 PCR: 条件同 1.3, 52.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 循环 13 次。反应体系中以 OmpU 和 OmpII 基因胶回收片段各 125 ng 为模板。

第二步 PCR 反应条件同第一步, 反应体系中的 Pfu Buffer、dNTP 和 Pfu 酶同第一步, 取第一步 PCR 产物 5 μL 为 DNA 模板, P1 (10 mmol) 1 μL 、P4 (10 mmol/L) 0.5 μL , 超纯水补足 25 μL 。

取第二步的 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳确定连接产物是否成功扩增, 胶回收纯化, 备用。

1.5 重组表达载体的构建

质粒提取和感受态细胞的制备法 (CaCl_2 法) 参照文献 [9]。质粒和基因连接产物的双酶切条件: 质粒 (pGEX-2T-His) 1 μL (约 0.5 μg) 或基因连接产物 8 μL (约 0.5 μg), 10 \times BamHI 缓冲液 2 μL , BamHI 1 μL , EcoRI 1 μL , 加超纯水至 20 μL , 轻轻混匀并稍离心。PCR 仪内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h, 80 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 酶热失活, 酶切产物胶回收并测定其质量浓度。连接反应体系 (20 μL) 的设计参考文献 [8]。

1.6 菌落 PCR、双酶切和测序法筛选和鉴定重组质粒

从培养好的具 Amp 抗性的 LB 培养基平板上, 牙签随机挑选 10 个单克隆置于含 300 μL LB 液体培养基 (氨苄青霉素终质量浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的离心管中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、280 r/min 摇床培养 80 min 后分别以 10 管菌液为 DNA 模板, 参考文献 [8] 的方法扩增表达载体上的连接基因序列。提取阳性重组质粒以 BamHI 和 EcoRI 进行双酶切, 检验有无双基因片段插入。质粒的双酶切方法同 1.5。选取 Amp 平板上的阳性重组子, 利用表达载体 pGEX-2T-his 的通用引物对重组子中连接的双基因进行测序与分析。

1.7 外膜蛋白重组子的表达与表达形式的鉴定

将含有重组质粒的 BL21 菌划平板后置于生化培养箱中过夜培养, 然后液体培养基摇床扩大培养, 菌液吸光度 A_{600} 为 0.6 ~ 1.0 时加入诱导剂异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 125 μL , 使菌液 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L, 180 r/min、16 $^{\circ}\text{C}$ 摇床诱导过夜后取诱导重组菌全菌, 冰浴超声破碎菌体 5 min (90 W、破碎 1 s、停 3 s), 取沉淀、上清和重组菌全菌进行 SDS-PAGE 电泳检测, 同时设未诱导全菌作对照。

1.8 表达蛋白的纯化与复性

样品用镍柱纯化前应进行处理, 处理步骤如下: 取最适诱导条件下的 500 mL 菌液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min 离心 10 min, 沉淀于适量灭菌水中重悬, 同条件再离心 1 次, 沉淀转移至 50 mL 离心管后加入 40 mL 缓冲液 (含 2 mol/L 尿素)、400 μL 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 溶液 (1.74 g PMSF 加入 100 mL 异丙醇) 冰浴超声破碎菌体 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心破碎后的菌体, 离心 5 min 后取出沉淀。取上清重复于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心并取沉淀。合并 2 次的沉淀于 PBS 中重悬, 再 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心洗涤重悬液, 5 min 后取沉淀。在沉淀中加入 6 mL 预冷的结合缓冲液 (尿素 48.0 g、磷酸钠 7.6 g、氯化钠 29.22 g、咪唑 1.36 g、甘油 100 mL, 双蒸水定容至 1000 mL, 调节 pH 至 7.44) 菌体重悬; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、离心 5 min (20 000 r/min), 上清转移后沉淀再离心 1 次, 合并 2 次的上清于镍柱 (PureCube Ni-NTA Agarose, 10 mL) 进行蛋白纯化 (操作步骤参考说明书), 纯化蛋白冻干后备用。

1.9 鳗鲡外膜蛋白抗血清的制备与效价测定

将冻干的二联蛋白用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 稀释为 1 mg/mL, 取适量与等体积的弗氏不完全佐剂充分混合, 同时设 PBS 注射对照组。取混合液或 PBS 对每尾鳗鲡腹腔注射 0.2 mL, 于注射后第 7, 14, 28, 42 天每组麻醉鳗鲡 5 尾, 断尾取血, 血液室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 3000 r/min 离心 10 min 后取血清, 用间接 ELISA 法测定鳗鲡血清抗体效价, 检测方法参考文献 [9-10]。

1.10 数据统计与分析

试验结果采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析 (Anova), 同时采用多重比较 (Duncan 法, 双尾) 确定其差异显著性。测定结果采用平均值 \pm 标准差表示后输入 origin 8.0 软件作图。

2 结果

2.1 基因片段扩增与连接

基因片段扩增与连接的琼脂糖电泳分析结果（见图 1）表明：OmpU 和 OmpII 基因中表达膜外多肽的基因片段得到扩增，序列分析表明扩增的序列顺序完全正确，前者为 657 bp，后者为 843 bp。2 个基因片段经两步法连接后，第一步 PCR 在约 1500 bp 处有条带（9 + 657 + 21 + 843 + 9 = 1539 bp）；第二步 PCR 扩增出清晰的双基因片段连接条带，此产物经胶回收测序证实 100 % 正确，包括接头和 2 个酶切位点在内，全长 1539 bp。

2.2 质粒与基因连接产物双酶切

将纯化的质粒 pGEX - 2TH - His 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明：质粒纯化效果良好（见图 2 泳道 1）；该质粒采用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切后发现其基本为单一条带（见图 2 泳道 2）；二联基因片段与 T 载连接后经 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切，获得带有酶切位点的双基因连接产物（见图 2 泳道 3）酶切效果良好，产物可以用于构建重组质粒。

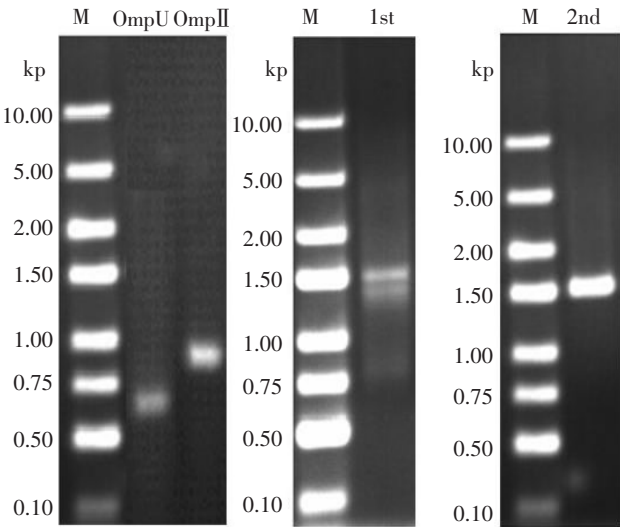
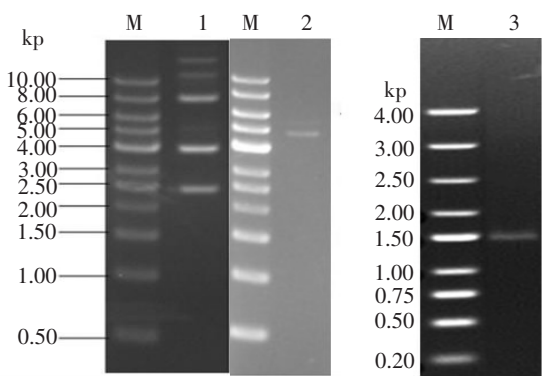


图 1 PCR 扩增的 2 个基因片段及其体外连接后电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of two gene fragments (OmpU and OmpII) and the combined DNA fragment



说明：M—DNA marker；泳道 1—质粒提取结果；泳道 2—双酶切质粒；3—双酶切基因连接产物。

Notes: M—DNA marker; lane 1—the extracted plasmid; lanes 2 and 3—purified plasmid and combined gene digested by *EcoR* I and *BamH* I respectively.

图 2 质粒和双基因连接产物双酶切电泳结果

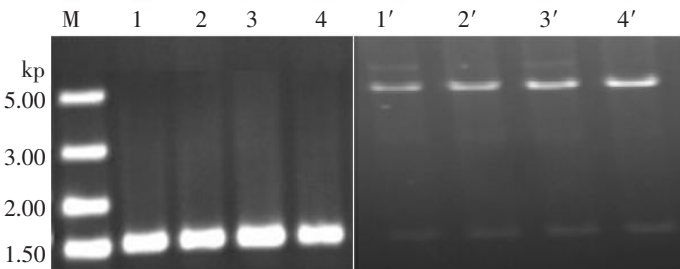
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the extracted plasmid and double digestion products of purified plasmid and two gene combined fragments

2.3 重组质粒的鉴定

任取 4 个菌落经 PCR 鉴定，发现全部扩增出预期大小片段的条带，约有 1540 bp（见图 3，1 - 4）。将扩增出目的片段的菌落进行扩大培养，提取并纯化重组质粒，经 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切获得预期大小的 2 个条带（见图 3，1' - 4'），分别为约 5 kb 的 pGEX - 2T - His 质粒和约 1.5 kb 的连接片段。经测序分析，连接序列 100 % 与预期条带相符。

2.4 目的蛋白表达形式的鉴定

SDS - PAGE 电泳表明，重组的二联融合表达蛋白主要存在于菌液超声波破碎的沉淀（见图 4 泳道 3、4）中，而在上清中



说明：M—DNA marker；1-4—4 个菌落的 PCR 产物电泳结果；1'-4'—重组表达载体双酶切后的 2 个条带。

Notes: M—DNA marker; 1-4—agarose gel electrophoresis of PCR products of 4 colonies; 1'-4'—four bands of the recombinant expression vector digested by *EcoR* I and *BamH* I.

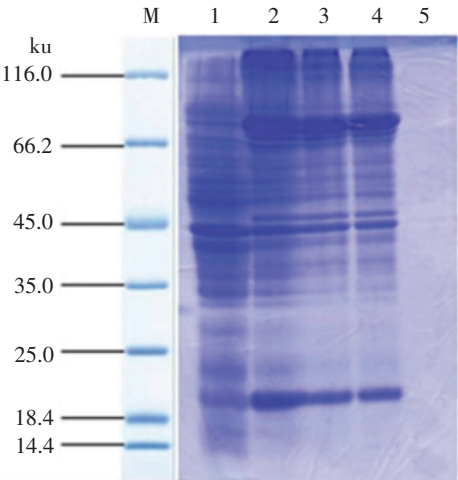
图 3 菌落 PCR 产物及其琼脂糖电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of the colony PCR

没有检测到表达蛋白(见图4泳道5),表明该二联蛋白的表达形式是包涵体。

2.5 目的蛋白的镍柱纯化与复性

融合蛋白在咪唑浓度分别为 10, 25, 250 mmol/L 条件下获得纯化,将二联融合外膜蛋白稀释并去除尿素,蛋白复性成功后溶解于 PBS 可观察到是透明无沉淀的。复性液经 SDS-PAGE 电泳检测后发现在82.2 ku处有一微弱蛋白条带(见图5泳道1),表明蛋白复性后没有降解或断裂。



说明:M—蛋白质 marker;泳道 1—未诱导的重组菌;泳道 2—诱导的重组菌;泳道 3—超声破碎重组菌诱导表达的沉淀;泳道 4—超声破碎重组菌诱导表达的上清。
Notes:M—protein marker;1—expression of recombinant BL21 with no induction;2—expression of recombinant BL21 after induction;3—expression of pellet of the ultrasonication sample;4—expression of supernatants of the ultrasonication sample.

图4 目的蛋白表达形式的 SDS-PAGE 电泳结果

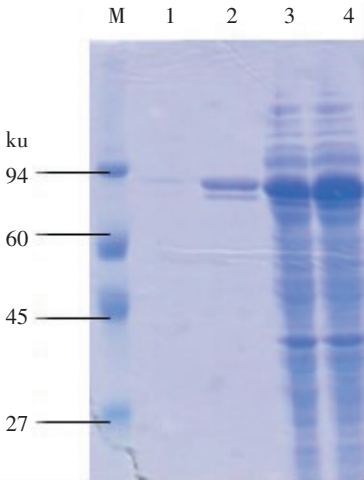
Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis analysis of different expression form of the target protein

2.6 表达蛋白免疫鳎后的初步免疫原性

鳎经二联表达外膜蛋白免疫后,从第 14 天开始就产生了显著高于 PBS 组效价的抗体(见图6);第 28 天和第 42 天,表达蛋白免疫注射组极显著 ($P < 0.01$) 高于对照组。这表明表达的二联蛋白免疫原性好,免疫后抗体持续的时间较长。

3 讨论

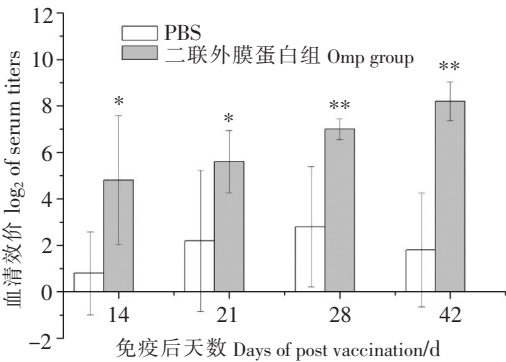
2 个外膜蛋白基因连接时应除去其膜内信号肽和跨膜区序列,因此段序列所表达的多肽不能接触鱼类的免疫系统,从而不具免疫原性。本试验考量以上原则,选择了 2 个外膜蛋白基因中表达膜外区域的序列片段(OmpU 和 OmpII 分别为 657 bp 和 687 bp),尽可能提高表达产物的免疫原性^[11]。本研究在设计连接基因的接头时,于 OmpU-R 和 OmpII-F 引物的 5'端均增加了一段反向互补序列,该连接序列编码的氨基酸序列(SP-PPPSP)富含柔韧性好的半胱氨酸(P)和精氨酸



说明:M—蛋白质 marker;泳道 1—复性后的二联蛋白条带;泳道 2—二联蛋白纯化后条带;泳道 3—4—重组菌全菌蛋白。
Notes:M—protein marker;1—band of the renatured OMP;2—band of the purified OMP;3—4—band of whole lysated cells of the recombinant bacteria BL21.

图5 蛋白纯化与复性后的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the purified and renatured expression protein



说明:Log₂ 稀释度, mean value \pm S.D., N=5; ** 和 * 分别表示同一时间点组间存在极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 差异。

Notes: Each datum column represents the mean of log 2 antibody titers with standard error bar, N=5; ** and * indicate significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ between treatment groups and PBS control group, respectively.

图6 外膜蛋白二联表达产物(100 μ g/尾)免疫后 14,21,28,42 天鳎血清特异性抗体的 ELISA 效价

Fig.6 Antibody titers of vaccinated American eels (*Anguilla rostrata*) on 14,21,28 and 42 days post vaccination

(S), 从而易暴露 2 段外膜蛋白的抗原表位^[8]。笔者曾对嗜水气单胞菌 II 型孔蛋白和迟缓爱德华氏菌 OmpS2 外膜蛋白基因连接后表达的外膜蛋白进行了免疫原性研究, 结果发现连接表达的外膜蛋白充分保留了 2 个外膜蛋白的免疫原性^[9]。本研究构建了爱德华氏菌 OmpII 和创伤弧菌 OmpU 的二联蛋白表达载体并进行了高效表达, 从而为鳗鲡 2 株常见病原菌的二联亚单位疫苗的研究奠定了基础。

影响外源基因在大肠杆菌内表达的因素较多。重组表达的目的蛋白分子量一般应在 5 ~ 100 ku 之间^[12]。合适的表达载体对重组蛋白的表达也有重要影响。课题组在表达重组蛋白方面有较丰富的研究经验, 本次试验采用的融合表达载体 (pGEX-2TH-His) 中含有启动子及 Lac 操纵子基因、SD 序列, SD 序列上游是 GST 标签, 下游是 6 个 His 标签, 研究结果表明该载体对二联外膜蛋白进行了高效表达。诱导重组蛋白表达的条件对重组蛋白能否成功表达也有影响, 包括诱导温度、诱导时间、诱导剂浓度和诱导时菌液浓度^[13-14]。文献 [15] 的研究结果表明, 通常选择的三个诱导温度 (16、25、37 °C), 在蛋白表达量上无明显差异, 但是低温有利于重组蛋白的折叠和构象的形成, 因此本研究采用 16 °C 进行诱导表达。根据本课题组之前的研究结果表明, 诱导剂 IPTG 的浓度在 0.25 ~ 1.00 mmol/L 都可表达, 诱导时间在 3 ~ 9 h 时对表达量影响不大, 诱导时菌液 $A_{600\text{ nm}}$ 在 0.1 ~ 1.0 之间均能高效表达。

重组蛋白的纯化方法包括柱层析、离子交换层析、亲和层析等, 而亲和层析是利用生物大分子之间专一的亲和力而达到分离纯化的目的, 具有低成本、高选择、回收效率高和纯度高等特点, 尤其适用于表达蛋白中含有 GST 和 His 标签的纯化^[16]。His 标签为连续 6 个组氨酸, 含 His 标签的重组蛋白可进行组氨酸亲和层析; GST 标签是一个含有 211 个氨基酸的蛋白, 标签蛋白的分子量在 26 ku 左右, 该蛋白为谷胱甘肽硫转移酶, 含有 GST 标签的重组蛋白可进行谷胱甘肽硫转移酶亲和层析 (His 标签表达的外源多肽分子量不足 1 ku)。本研究是在目的蛋白的前端加入 GST 标签, 尾部加入 His 标签, GST 标签亲和层析只能纯化可溶性蛋白, 而 His 标签亲和层析则可用于可溶性和包涵体蛋白的纯化。由于重组蛋白 (OMP-Vibrio-Edwa) 表达时以包涵体形式存在, 并且携带 His 标签, 之前采用自动蛋白核酸层析系统 AKTA purifier 100 来纯化重组蛋白费时费力^[16], 而本次试验使用的镍柱中含氯化镍, 既可与含 His 标签的重组蛋白结合, 也可与咪唑结合, 调整咪唑洗脱浓度就可将杂蛋白与目的蛋白进行高效分离, 整个过程操作简单, 省时省力。

本试验采用表达的二联外膜蛋白免疫鳗鲡后, 检测了其抗血清的效价, 初步研究了二联外膜蛋白的免疫原性。结果表明, 表达的二联外膜蛋白免疫后早期 (第 14 天和第 21 天) 抗体水平就显著 ($P < 0.05$) 高于 PBS 注射组, 晚期 (第 28 天和第 42 天) 则出现极显著 ($P < 0.01$) 差异, 说明表达的二联外膜蛋白具有较好的免疫原性。此外, 研究结果表明, PBS 对照组的鳗鲡也存在一定量的血清抗体 (见图 6), 由于创伤弧菌和爱德华氏菌是鳗鲡养殖池中的常见菌, 鳗鲡可能在本试验进行之前已经接触过这 2 株菌^[17-18]。总之, 本研究结果为鳗鲡创伤弧菌和迟缓爱德华氏菌的二联外膜蛋白亚单位疫苗研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] HAENEN O, VAN ZANTEN E, JANSEN R, et al. *Vibrio vulnificus* outbreaks in Dutch eel farms since 1996: strain diversity and impact [J]. *Dis Aquat Organ*, 2014, 108: 201-209.
- [2] 郭松林. 鳗鲡细菌性疾病的研究概况 [J]. *科学养鱼*, 2011(7): 48-49.
- [3] 彭金菊, 马驿, 梁淑莹, 等. 30 种中药及其复方对温和气单胞菌的抗菌作用 [J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(6): 42-45.
- [4] ESTEVE-GASSENT M, FOUZ B, AMARO C. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004(16): 93-105.
- [5] GUO S L, FENG J J, YANG Q H, et al. Immune effects of bathing European eels in live pathogenic bacteria, *Aeromonashydrophila* [J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(5): 913-921.

- [6] 刘雨果,潘厚军,石存斌,等. 3种免疫途径对嗜水气单胞菌灭活疫苗保护作用的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(4): 81-85.
- [7] GUO S L, YANG Q H, FENG J J, et al. Phylogenetic analysis of the pathogenic genus *Aeromonas* spp. isolated from diseased eels in china [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 101(12): 12-23.
- [8] 王玉. 鳗鲡病原菌外膜蛋白二联基因工程产物的表达与免疫原性初步研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2012: 14-80.
- [9] 郭松林,冯建军,陆盼盼,等. 鳗鲡病原性嗜水气单胞菌与爱德华氏菌二联表达外膜蛋白的免疫原性 [J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 113-120.
- [10] 冯建军,关瑞章,郭松林. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白阳性细胞的组织化学定位与分布特点 [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 500-505.
- [11] 郭松林,王玉,冯建军,等. 鳗鲡病原菌二联外膜蛋白基因工程表达载体的构建 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(5): 330-338.
- [12] 吕宪禹. 蛋白质纯化实验方案与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 34-50.
- [13] 黄瑜,张雪利,鲁义善,等. 红笛鲷 *idt* 基因融合蛋白原核表达条件的优化及纯化 [J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(1): 44-49.
- [14] 黄浦江,黄郁葱,简纪常,等. 融合蛋白 il6-ompw 的质粒构建及表达纯化 [J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(4): 43-48.
- [15] 任增亮,堵国成,陈坚,等. 大肠杆菌高效表达重组蛋白策略 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 103-109.
- [16] 王玉,冯建军,郭松林,等. 嗜水气单胞菌与迟顿爱德华氏菌二联外膜蛋白的表达及其初步免疫原性 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(1): 96-102.
- [17] SINYAKOV M S, DROR M, ZHEVELEV H M, et al. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish [J]. Vaccine, 2002, 20(31/32): 3668-3674.
- [18] ESTEVE-GASSENT M D, NIELSEN M E, AMARO C. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15(1): 51-61.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)