

文章编号:1000-0615(2010)01-0139-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.061367

溶藻弧菌 HY9901 鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆及原核表达

梁海鹰^{1,2,3,4,5}, 夏立群², 吴灶和^{1,2,3,4*}, 简纪常^{2,3,4*}, 鲁义善^{2,3,4}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088;

4. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088;

5. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:参照 GenBank 上登录的弧菌鞭毛蛋白 *flaB* 基因序列设计引物, PCR 扩增溶藻弧菌 HY9901 株的 *flaB* 全长基因, 序列分析结果显示该基因为 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸。与 GenBank 中其它弧菌的同源基因序列比对显示, 溶藻弧菌 *flaB* 基因与副溶血弧菌 *flaB* 基因的同源性最高(92%)。将该基因定向克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 中, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中成功表达出带 His-tag 的融合蛋白, 分子量大小与预期一致。优化的表达条件为 28 °C, 0.4 mmol/L IPTG 浓度诱导 10 h。用纯化后的融合蛋白免疫 SPF 级小鼠, 制备了多克隆抗体。Western-blotting 结果表明鼠抗 FlaB 血清不仅能与诱导后的重组蛋白发生反应, 而且能与天然的溶藻弧菌全菌蛋白发生反应, 提示鞭毛蛋白 FlaB 可能是溶藻弧菌的重要保护性抗原之一, 为下一步进行 FlaB 蛋白免疫原性的研究以及疫苗的制备奠定了基础。

关键词:溶藻弧菌; 鞭毛蛋白; *flaB* 基因; 原核表达

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 为革兰氏阴性嗜盐嗜温菌, 是海水环境中常见菌, 在一定条件下对海水动物有较强的致病性^[1], 养殖贝类、虾类等壳类动物、养殖鱼类等均可感染该菌^[2-4]。随着养殖环境的恶化, 溶藻弧菌引起的弧菌病暴发呈上升趋势^[5-7], 该病流行面积广, 发病率及死亡率高, 给全世界水产养殖业造成了巨大的经济损失。此外溶藻弧菌对人的致病性也有大量报道, 可引起人食物中毒^[8]、耳炎^[9]等, 是人和海洋动物共感染的一种主要病原弧菌。

针对弧菌病的防治, 目前仍倚重于化学药物和抗生素, 抗生素和化学药物的长期过量使用, 会导致细菌抗药性^[10], 从而增加了病害的防治难度。因而疫苗的研发与应用得到了人们的重视。免疫防控既无污染环境之忧, 又无药物残留带来

的不良后果, 是解决水产业病害的首选方案之一, 如在控制弧菌、气单胞菌、耶尔森氏菌等革兰氏阴性菌引起的疾病方面取得很大进展^[11]。在疫苗的研发中, 寻找有效的抗原至关重要。

弧菌通常具有 3 类抗原: 鞭毛抗原 (H 抗原)、菌体抗原 (O 抗原)、表面抗原 (K 抗原)。K 抗原和 O 抗原的抗原特异性都由他们所含的糖类组分决定, 而鞭毛抗原成分主要是蛋白质^[12], Yancey 等^[13]将粗制鞭毛于 100 °C 加热 15 min, 破坏其蛋白成份, 再免疫动物, 结果其保护力丧失。这提示鞭毛中的保护性抗原是鞭毛蛋白。鞭毛抗原与细菌的免疫保护性密切相关, 易于从基因水平研究其免疫原性, 因此鞭毛抗原既是病原细菌疫苗的重要材料, 又是制备免疫保护特异性强的疫苗的先决因素^[14-16]。本研究克隆了溶藻

收稿日期: 2009-03-05 修回日期: 2009-07-25

资助项目: 国家科技支撑计划 (2007BAD29B03); 广东省科技重大专项 (2004A20401001); 广东省自然科学基金项目 (9151064201000063); 广东海洋大学自然科学研究项目 (0612187)

通讯作者: 吴灶和, Tel: 0759-2339319; E-mail: wuzh@gdou.edu.cn

简纪常, Tel: 0759-2339319; E-mail: jianjichang@21cn.com

弧菌鞭毛蛋白 *flaB* 基因, 通过对其免疫原性的分析, 为其作为基因工程亚单位疫苗的候选成分提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

溶藻弧菌强毒株 HY9901, 由本实验室自广东省湛江海域患病红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 鱼体中分离获得; *Escherichia coli* DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌株由本室保存, 克隆载体 pMD-19TVector、表达载体 pET-32aVector 购自 Takara 公司。

1.2 工具酶和试剂

限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I (TaKaRa), 异丙基- β -D-硫代半乳糖 (IPTG) (BBI), PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN)、DNA 凝胶回收试剂盒 (上海生工)、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (TIANGEN), 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 溶藻弧菌总 DNA 的提取及 *flaB* 基因的克隆

将溶藻弧菌接种于 TSB (5% NaCl) 培养基, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 以上, 测 OD₆₀₀ 约为 0.6。取适量菌液于 Ependoff 离心管中, 10 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体。按照 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取溶藻弧菌基因组 DNA。根据 GenBank 上登录的副溶血弧菌鞭毛蛋白 *flaB* 基因序列 (登录号 AF069392) 设计 1 对引物:

上游引物 P1: 5'-ATGGCAGTGAATGTAAACAC-3'

下游引物 P2: 5'-TTAACCTAGAAGACTTAG-3'

反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后割胶回收并用试剂盒纯化, 最后以摩尔比 1: 3 (载体/插入片段) 的比例克隆入 pMD-19T 载体, 蓝白斑筛选阳性克隆, 菌落 PCR 鉴定后阳性克隆送上海生物工程公司测序。

1.4 原核表达载体构建及大肠杆菌诱导表达

重新设计 1 对末端含有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的接头引物:

上游引物 P3: 5'-CCGGAATTCATGGCAGTG

AATGTAAACAC-3' (*EcoR* I)

下游引物 P4: 5'-CCGCTCGAGTTAACCTAGAAGACTTAG-3' (*Xho* I)

以溶藻弧菌基因组 DNA 为模板, 50 μ L 反应体系扩增目的片段, 试剂盒纯化, *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 割胶回收后定向插入经同样内切酶双酶切的 pET-32a 质粒载体, 构建重组质粒 pET-*flaB*, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布 LB (含 Amp 100 μ g/mL) 平板, 挑取单个菌落, 接种于 5 mL LB 培养基 (含 Amp 100 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。碱裂解法抽提质粒, 经酶切、PCR、测序鉴定插入正确后以 1: 100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基 (含 Amp 100 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.6, 加 IPTG 诱导表达。

1.5 表达条件的优化

IPTG 设 0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.7 mmol/L、1 mmol/L 4 个浓度, 分别在 16 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 下诱导表达, 确定最佳诱导剂浓度和表达温度, 采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳, 丙烯酰胺浓度: 分离胶 12% (v/v), 浓缩胶 5% (v/v)。上样量每孔 10 μ L, 在 60 V 恒压电泳约 30 min, 再 120 V 恒压电泳约 1 h, 考马斯亮蓝 R250 染色, 冰醋酸甲醇脱色。

1.6 表达产物的纯化

先用少许表达菌液超声波破碎后离心, 取上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 电泳, 鉴定表达产物是否形成了包涵体。按说明书进行纯化。采用 Ni²⁺ 琼脂糖凝胶预装柱, 上样细胞裂解液, 用咪唑洗脱缓冲液洗柱, 得纯化蛋白。

1.7 抗血清的制备

将纯化的融合蛋白皮下多点注射免疫 SPF 级小鼠。每只小鼠免疫 50 μ g pET-*flaB* 重组菌表达的 FlaB 融合蛋白, 以注射佐剂 PBS 为对照。每隔 7 d 免疫一次, 共免疫 4 次。首次注射的抗原为蛋白或 PBS 与完全佐剂 FCA 混匀制备, 之后 3 次注射的抗原均采用蛋白或 PBS 与不完全佐剂 FIA 混匀制备。末次加强免疫后 1 周眼球取血, 离心分离血清, 冷冻保存。

1.8 抗血清效价测定和特异性检测

用纯化的重组蛋白为抗原包被 96 孔板, 根据预实验确定最适抗原浓度为每孔 10 μ g/100 μ L。待测鼠抗血清为一抗, 第 1 孔稀释 100 倍, 以后倍

比稀释,注射佐剂 PBS 后的血清作阴性对照,HRP 标记的羊抗鼠的 IgG 为二抗,四甲基联苯胺 (TMB) 溶液显色后酶标仪测定抗体效价。

将诱导表达后的重组菌和溶藻弧菌 HY9901 的全菌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,将其上的蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜。加入一抗(鼠抗 FlaB 血清,1: 10 000 稀释),阴性对照采用注射佐剂 PBS 后的血清。TBST [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),150 mmol/L NaCl,0.05% (v/v) Tween-20 清洗后加入二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1: 400 稀释)]清洗,最后加入 DAB 显色液,待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

2 结果

2.1 *flaB* 基因的克隆

PCR 扩增出一条 1 134 bp 的特异条带(图 1),克隆入 pMD-19T 载体,菌落 PCR、酶切鉴定正确后测序,发现该基因含有一个 1 134 bp 的开放读码框(ORF),编码 377 个氨基酸,预测分子

量约为 40.1 ku,PI 为 4.76(图 2)。该基因在 GenBank 上的登录号为 FJ617267。将该序列及其编码的氨基酸序列与基因库中已登录的其他弧菌的相应基因及氨基酸序列进行同源性比较,结果表 1 和图 3 所示。

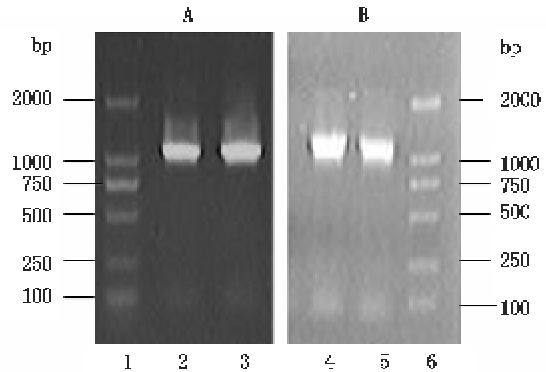


图 1 溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆(A),菌落 PCR(B)
1,6:DL2000 DNA 分子量标记;2,3,4,5:*flaB* PCR 产物
Fig.1 Cloning (A) and identification by PCR (B) of *flaB* gene from *V. alginolyticus*
1,6:DL2000 Marker;2,3,4,5:PCR products of *flaB*

```

ATGGCAGTGAATGTAACACTAACGTATCAGCGATGACCCGCTCAGCGTTACCTAAACAACGCCAAACTCAGCTCAACAACTTCTTATGGAG  90
M A V N V N T N V S A M T A Q R Y L N N A N S A Q Q T S M E
CGTTTGTCTTCAGSTTTTAAATCAACAGCGCAAAAGATGACGCTGCGGTTCTACAAATCTCGAACCGTITGAACTACAAAGCCGTGT  180
R L S S G F K I N S A K D D A A G L Q I S N R L N V Q S R G
TTGGATGATGCGGTTGCGAACGCGAACGCGATGCTGATGCGCAAACTGCTGAAGGTGCAATGATGAGACCCACTATATATCTTCAA  270
L D V A V R N A N D G I S I A Q I A E G A M N E I T N I L Q
CSTATGCGTGACTTGTCTCTGCAATCAGCAAAACGGTTCAAACTCGAAAGCAGAACGTTGCGGATTCAAGAAGAAGTGAACCGCTAAAC  360
R M R D L S L Q S A N G S N S K A E R V A I Q E E V T A L N
CACCACTAAACCCCATCCCAACAAACCACTTCTTCCCTCCTAACACGCTACTAACCCGACACACCCGICCCAAATCCTTCCAAATCCGT  450
D E L N R I A E T T S F G G N K L L N G T H G A K S F Q I G
GCAGATACCGTGAACGAGTGTGCTTGAAGTAAAGACATCGCTTCAGACAACAAATGATGGCGGCTGTGAGCTACCAAGCTGAAAGT  540
A D N G E A V M L E L K D M R S D N X M M G G V S Y Q A E S
GATAAAGGTAAGACUIGGAACGTTGCTGAGGTAAGAAAGCAUCIATAAAATCAACUCAAUCUAAUGGACAGCUAUGGUCUAGAGCAAGAAATCAAC  630
G K G K D W N V A E G K N D L K I N L I T D S Y G Q E Q E I N
ATCAGCGCAAAAGCGGTTGACGATATCGAAGAGCITGCGACTTACATTACCGCCAAACTGACCTAGTGAAGACATCAGTAGACCAAGAT  720
L S A K A G D D I E E L A I Y I N G Q I D L V K A S V D Q D
GGTAACTGCAAAATCITTTGCTGGCAACAACAAAGTCSAAAGCGAAGTCSAGTTTTTCAGGCGCCCTATCTGCGGAGCTAGSTTTGGCGGAA  810
G X L Q I F A G N N X V E G E V E F S G G L S G E L G L G E
GGTAAAAAGTAAACGSTAGATACTATCGACGTAACCTCAGTTGGTGGCGCACAAAGAACTGTTGCTATCATCGATGCGGCACTGAAATAC  900
G K K V T V D T I D V T S V G G A Q E S V A I I D A A L K Y
GTAGACGCCACCGCGCAGAGCTGGGTGCAATCCGAAACCGTTTCAACCAGCAATCAGCAACTTGGACACATTAACGAGAACGTGAAT  990
V D S H R A E L G A F Q N R F N H A I S N L D N I N E N V N
GGGCGAAGAGCCGATCAAAAGATCTGACTTCGCGAAAGAAACGACCGCAATGACCAAAATCACAATTTCTATCGCAAGCGTCAAGCTCA  1080
A S K S R I K D T D F A K E T T A M T X S Q I L S Q A S S S
ATCCTTGGCGAAGCGAAACGCGCTAACTCAGCGCTAAGTCTTCTAGATTAA  1134
T I A Q A K Q A P N S A L S L L G *

```

图 2 溶藻弧菌 HY9901 *flaB* 基因核苷酸及其编码的氨基酸序列
Fig.2 *flaB* gene sequence and putative amino acid sequence from *V. alginolyticus*

表 1 溶藻弧菌 *flaB* 基因及其编码的氨基酸序列与其他弧菌相应序列同源性比较

Tab.1 The homology comparison of *flaB* gene sequence and putative amino acid sequence from *V. alginolyticus* with those of other vibrios

同源性 homology	菌株及其 GenBank 登录号 Strain and Genbank accession No.				%
	副溶血弧菌 AFU69392	哈维氏弧菌 CFU00789	创伤弧菌 BA000037	费氏弧菌 AY514454	
基因序列 gene sequence	92	89	82	67	
氨基酸序列 amino acid sequence	97	95	90	87	

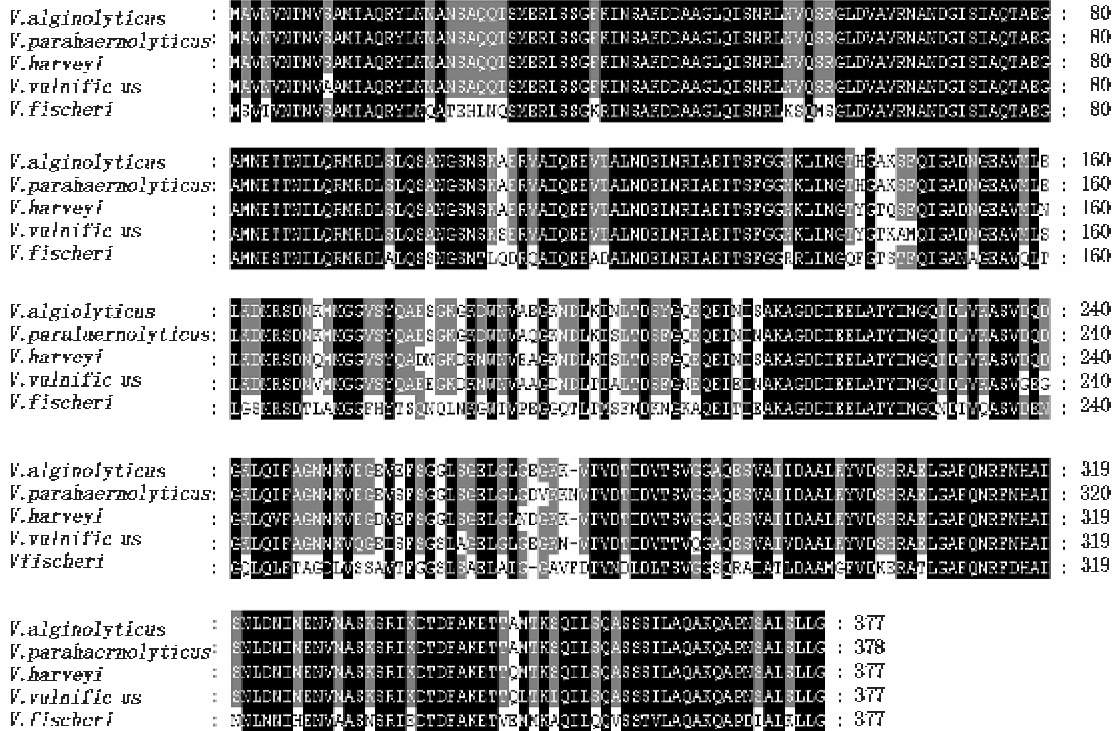


图 3 *flaB* 基因推导氨基酸序列的同源性比较分析

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of *flaB* from *V. alginolyticus* and other strains (listed in Tab.1)

2.2 原核表达载体的构建

用双酶切后的质粒 pET-32a 与双酶切后的 *flaB* 连接,构建的重组质粒命名为 pET-*flaB*。经 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切证实插入了一段约 1 134 bp 的序列(图 4)。

2.3 大肠杆菌的诱导表达

将 pET-*flaB* 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导,可以表达分子量 60.5 ku 的融合蛋白,其中 FlaB 的预计分子量为 40.1 ku, pET 表达的融合标签为 20.4 ku;未经诱导的含重组质粒 pET-*flaB* 的 BL21 (DE3) 菌体作为阴性对照,与诱导后蛋白电泳条带相比,有超强蛋白带的地方无带。同时以诱导的含未重组的质粒 pET-

32a 的 BL21 (DE3) 菌体作对照,分别在约 20.4 ku 的位置有很强的蛋白带,与预期相符,说明了目的蛋白的成功表达(图 5)。预先取少量诱导表达后的菌液经超声波破碎后再离心,分别用上清和沉淀做 SDS-PAGE,结果表明,目的蛋白绝大部分存在于上清中,说明重组蛋白没有形成包涵体。经纯化浓缩后用 Bradford 蛋白定量法测定,纯化的融合蛋白浓度达 756.3 μg/mL。

在其他条件一致的情况下,比较了在较大体积诱导情况下 3 种诱导温度 16 °C、28 °C 和 37 °C 对重组融合蛋白 FlaB 的表达量及其可溶性的影响(图 6)。SDS-PAGE 结果表明,随诱导温度的提高,FlaB 的表达量增高,但是随诱导温度的提

高,上清中可溶性目的蛋白的比例有所减少。用 Gel-Pro 3.1 对图 6 进行蛋白条带分析,得出 37℃ 诱导时可溶性蛋白占重组蛋白的 24%,28℃ 诱导时可溶性蛋白约占重组蛋白的 33%,16℃ 诱导时可溶性蛋白约占重组蛋白的 22%。诱导温度对其可溶性的影响较为明显,我们选择 28℃ 作为重组蛋白表达的诱导温度。SDS-PAGE 凝胶电泳显示,诱导重组 pET-*flaB* 表达的 IPTG 最佳浓度为 0.4 mmol/L,最佳诱导时间为 10 h(图片未列出)。

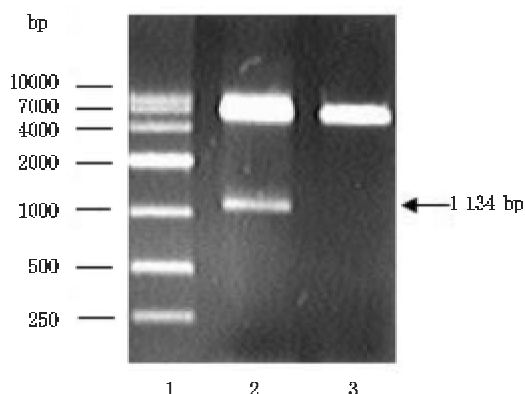


图 4 重组质粒 pET-*flaB* 的酶切鉴定
1:DL10000™ DNA 标记;2:pET-*flaB* 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后的结果;3:pET-32a 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后的结果
Fig. 4 The determination of the recombinant pET-*flaB* by enzyme restriction
1:DL10000™ DNA Marker;2: the result of pET-*flaB* digested by *EcoR* I and *Xho* I;3: the result of pET-32a digested by *EcoR* I and *Xho* I

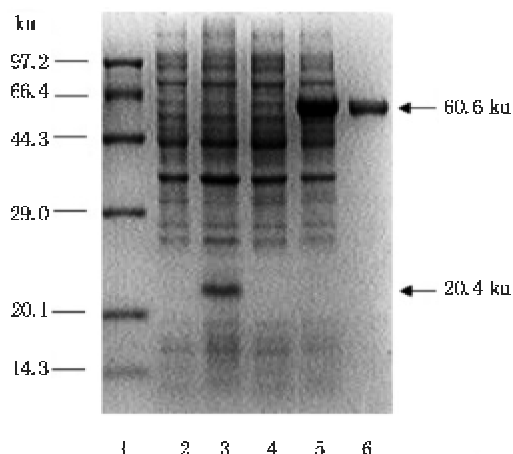


图 5 表达产物的 SDS-PAGE 分析
1:蛋白分子量标准;2:pET-32a 未诱导;3:pET-32a 诱导;4:pET-*flaB* 未诱导;5:pET-*flaB* 诱导;6:纯化后的 FlaB
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression products
1: protein molecular marker; 2: total protein of pET-32a not induced;3: total protein of pET-32a induced; 4: total protein of pET-*flaB* not induced; 5: total protein of pET-*flaB* induced; 6: purified FlaB

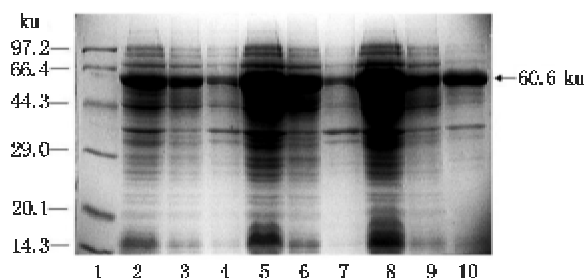


图 6 重组菌 BL21/pET-*flaB* 在不同温度诱导表达 FlaB 的 SDS-PAGE 分析

1:蛋白分子量标准;2:16℃ 诱导全菌蛋白;3:16℃ 诱导上清;4:16℃ 诱导沉淀;5:28℃ 诱导全菌蛋白;6:28℃ 诱导上清;7:28℃ 诱导沉淀;8:37℃ 诱导全菌蛋白;9:37℃ 诱导上清;10:37℃ 诱导沉淀

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of solubility of FlaB at different induced temperature

1: protein molecular marker;2: total protein induced at 16℃;3: supernatant protein induced at 16℃;4: sedimentation protein induced at 16℃;5: total protein induced at 28℃;6: supernatant protein induced at 28℃;7: sedimentation protein induced at 28℃;8: total protein induced at 37℃;9: supernatant protein induced at 37℃;10: sedimentation protein induced at 37℃

2.4 抗血清效价测定和特异性检测

ELISA 检测抗血清效价在 1:40 000 以上。

Western-blotting 分析发现,FlaB 抗血清不仅能与诱导后 60.5 ku 的重组蛋白发生反应,而且能与天然的溶藻弧菌全菌蛋白发生反应,在 40.1 ku 处有印迹带,注射佐剂 PBS 后的血清不能与 60.5 ku 带发生反应(图 7)。

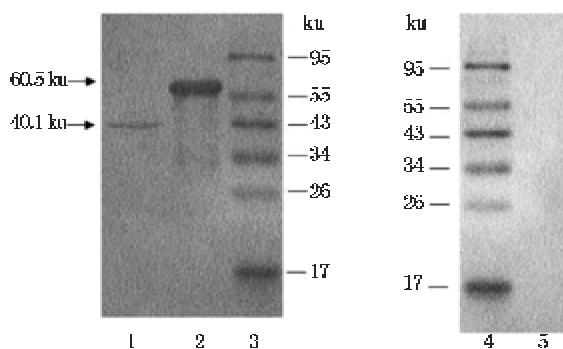


图 7 FlaB 的免疫印迹

1:溶藻弧菌全菌蛋白;2:FlaB 蛋白印迹;3,4:预染蛋白分子量标准;5:阴性对照

Fig. 7 Western-blotting analysis of FlaB

1: the whole cell lysates of *Vibrio alginolyticus* HY9901;2: pET-*flaB* with IPTG induction; 3, 4: prestained protein marker; 5: negative control

3 讨论

将溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaB* 基因序列及其编码的氨基酸序列与基因库中已登录的其他弧菌的相应基因及氨基酸序列进行同源性比较,结果表明溶藻弧菌 *flaB* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与副溶血弧菌的同源性最高,其次是哈氏弧菌 ATCC BAA-1116 菌株,再次是创伤弧菌 YJ016 菌株和费氏弧菌 EF114 菌株,并且它们的氨基酸同源性都高于核苷酸同源性。由于 *flaB* 基因编码的氨基酸在一些致病性弧菌中具有相当高的同源性,推断溶藻弧菌 FlaB 的亚单位疫苗或许可以使其成为一种具有广谱性的抗原。从比较中还发现,这些弧菌的鞭毛蛋白在 N-, C- 两端的氨基酸序列较为保守,且 N- 端的保守区长于 C- 端,而中间区域变异较大,在对其他一些细菌的研究中也发现类似现象, Das 等^[17]认为这些保守区对鞭毛蛋白三级结构的形成和鞭毛丝的准确装配起重要作用。在分析溶藻弧菌 *flaB* 基因编码的氨基酸序列时,发现除了半胱氨酸外,组成蛋白质的其他常见氨基酸都存在,这些与已研究的细菌鞭毛蛋白的氨基酸组成也很相似^[18-19]。

细菌的鞭毛除了作为细菌的运动器官,还在细菌的粘附定居和侵入组织细胞等环节中起重要作用。它的功能体现在 3 方面:与运动有关;与毒力有关;与抗原性有关^[20-21]。Shee 等^[22]运用鼻内免疫小鼠模型,研究了创伤弧菌的鞭毛蛋白 *flaB* 在诱导保护性免疫方面的作用,发现 *flaB* 具有很强的粘膜佐剂活性,可见 *flaB* 与细菌的免疫反应有关。覃映雪等^[23]克隆了副溶血弧菌的极鞭毛蛋白 *flaB* 基因并构建了真核表达载体,该基因序列全长 1 134 bp,该基因编码的蛋白中不含半胱氨酸,这些与本研究结果一致。本研究从溶藻弧菌的总 DNA 中成功克隆了鞭毛蛋白 *flaB* 基因并在大肠杆菌中实现了高效表达。用纯化的融合重组蛋白免疫 SPF 级小鼠获得了高效价的抗血清。免疫印迹结果表明鼠抗 FlaB 的血清不仅与 FlaB 重组蛋白发生免疫反应,免疫条带和预期的带 His-Tag 的 FlaB 重组蛋白大小一致;而且也能与天然溶藻弧菌的全菌蛋白发生免疫反应,免疫条带位于 40.1 ku 处,提示溶藻弧菌鞭毛蛋白 FlaB 是它的主要抗原之一,有望作为其疫苗的有效成分在红笛鲷溶藻弧菌病的防治中发挥作用。

为进一步研究 FlaB 的免疫原性,进而开发基因工程亚单位疫苗和诊断试剂盒奠定基础。当然还可以继续寻找其他良好保护性抗原,或将多种抗原结合,构建融合蛋白亚单位疫苗,为鱼类弧菌病的防治找到更有效的途径。

参考文献:

- [1] 鄢庆彬, 陈强, 邹文政, 等. 不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠粘液的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(2): 254-259.
- [2] Liu P C, Chen Y C, Lee K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Microbios, 2001, 104(408): 71-77.
- [3] Selvin J, Lipton A P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 57(1-2): 147-150.
- [4] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(1): 23-28.
- [5] Jayaprakash N S, Pai S S, Philip R, et al. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. J Fish Dis, 2006, 29(3): 187-191.
- [6] Liu C H, Cheng W, Hsu J P, et al. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing [J]. Dis Aquat Organ, 2004, 61(1-2): 169-174.
- [7] Oros J, Torrent A, Calabuig P, et al. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001) [J]. Dis Aquat Organ, 2005, 63(1): 13-24.
- [8] 封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 331-334.
- [9] Ardic N, Ozyurt M. Case report: Otitis due to *Vibrio alginolyticus* [J]. Mikrobiyol Bul, 2004, 38(1-2): 145-148.
- [10] 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): 539-543.
- [11] 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.

- [12] 陈奖励. 水产微生物学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 474-478.
- [13] Yancey R J, Willis D L, Berry L J. Flagella-induced immunity against experimental cholera in adult rabbits[J]. *Infect Immun*, 1979, 25(1): 220-228.
- [14] 孙宝剑. 鱼类细菌免疫学研究进展[J]. *鱼类病害研究*, 2001, 23(1): 35-42.
- [15] Hugo C R, Martin R J. Bacterial flagellins; mediators of pathogenicity and host immuneresponses in mucosa [J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11): 509-517.
- [16] 韩一凡, 高天翔. 鱼类 DNA 疫苗的研究进展[J]. *海洋科学*, 2005, 29(3): 64-71.
- [17] Das M, Chopra A K, Wood T, *et al*. Cloning, sequencing and expression of the flagellin core protein and other genes encoding structural proteins of the *Vibrio cholerae* flagellum [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 165(1): 239-246.
- [18] Winstanley C, Morgan J A W, Pickup R W, *et al*. Molecular cloning of two *Pseudomonas flagellin* genes and basal body structural genes [J]. *Microbiology*, 1994, 140(8): 2019-2031.
- [19] Yang G C H, Schrank G D, Freeman B A. Purification of Flagellar Cores of *Vibrio cholerae*[J]. *J Bacteriol*, 1977, 129(2): 1121-1128.
- [20] 李任峰, 何启盖, 周锐, 等. 细菌鞭毛研究概况及进展[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 124-127.
- [21] 周化民, 王军, 苏永全. 含副溶血弧菌 FlaI 基因真核表达重组质粒的构建[J]. *厦门大学学报*, 2002, 41(4): 498-501.
- [22] Shee E L, Soo Y K, Byung C J, *et al*. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective Immunity[J]. *Infection and immunity*, 2006, 74(1): 694-702.
- [23] 覃映雪, 苏永全, 周化民, 等. 副溶血弧菌极鞭毛蛋白 *FlaB* 基因的克隆与序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(6): 656-657.

**Cloning and prokaryotic expression of *flaB* gene from
Vibrio alginolyticus strain HY9901,
the causative agent of vibriosis in *Lutjanus sanguineus***

LIANG Hai-ying^{1,2,3,4,5}, XIA Li-qun², WU Zao-he^{1,2,3,4*}, JIAN Ji-chang^{2,3,4*}, LU Yi-shan^{2,3,4}

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

3. Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for
Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;

4. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;

5. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: To investigate the possibility of *flaB* as a candidate antigen for vaccine production, primers were designed based on *flaB* gene sequences published in GenBank. The *flaB* gene of *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus sanguineus*, was amplified by PCR and cloned into pMD19-T vector. Sequence analysis revealed that *flaB* gene is 1 134 bp and encodes a putative protein of 377 amino acids. The amino acid sequence of FlaB of *V. alginolyticus* showed highest identity to *V. parahaemolyticus* (92%). The *flaB* gene was linked into prokaryotic vector pET-32a(+), and the His-FlaB fusion protein with 60.5 ku molecular mass was successfully expressed in *E. coli* BL21. The soluble recombinant protein was highly expressed under induction conditions of exposure to IPTG (0.4 mmol/L) at 28 °C for 10 h and successfully purified on Ni²⁺-IDA column. The purified fusion protein was injected into SPF mice to produce anti-FlaB serum. Western blot analysis revealed that the prepared antiserum not only specifically reacts to the FlaB fusion protein, but also specifically reacts to natural total protein extracted from *V. alginolyticus*. This result indicates that the FlaB may be one of the important protective antigens of *V. alginolyticus*, which could provide a basis for further study on the immunogenicity of FlaB and vaccine preparation.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; flagellin; *flaB* gene; prokaryotic expression

Corresponding author: WU Zao-he. E-mail: wuzh@gdou.edu.cn;

JIAN Ji-chang. E-mail: jianjichang@21cn.com