



半滑舌鲷源哈维氏弧菌分泌蛋白 HutZ 的功能鉴定及免疫原性

尚玉曼¹, 王恒¹, 刘静茹¹, 袁增智^{1,2*}, 孙金生^{1,2*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387;

2. 天津师范大学, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要: 哈维氏弧菌为我国海水鱼类养殖过程中的常见病原, 为了进一步探究哈维氏弧菌的致病机制, 本实验分别从前期筛选到的哈维氏弧菌强毒株 H2LB1 和弱毒株 H1SAI3 中提取胞外产物 (ECPs), 并通过蛋白质组学进行差异蛋白鉴定。从中选取了哈维氏弧菌强毒株特异性蛋白 HutZ 为研究对象, 对其功能和免疫原性开展深入研究。首先利用 qRT-PCR 检测了哈维氏弧菌在不同铁源培养基培养条件下的 HutZ 基因表达量差异, 进一步将克隆 HutZ 基因连接到原核表达载体上, 并在大肠杆菌中成功表达出重组 HutZ 蛋白。将纯化的 HutZ 蛋白与血红素共孵育, 检测发现该蛋白能够结合血红素并改变其光吸收峰。将 HutZ 蛋白乳化后免疫半滑舌鲷 2 次, 以间接血凝法检测免疫后 1—7 周的血清效价, 同时在免疫 4 周后进行攻毒检测其免疫保护率。研究表明, HutZ 蛋白免疫后的半滑舌鲷抗体效价最高可达 1:128, 攻毒免疫保护率达 73.3%, 说明 HutZ 蛋白可作为开发预防半滑舌鲷感染哈维氏弧菌的亚单位疫苗的有效候选抗原。

关键词: 半滑舌鲷; 哈维氏弧菌; HutZ 蛋白; 免疫

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是海洋环境中发现的革兰氏阴性菌, 目前已成为野生及养殖海洋鱼类和无脊椎动物的重要病原体, 特别是在亚洲、南欧和南美洲的温暖水域^[1-3]。迄今已有多种海洋鱼类被报告为哈维氏弧菌易感宿主, 如凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、七星鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 等^[4-8]。感染哈维氏弧菌的水产动物症状各不相同, 但一般都会有对外界反应迟钝、厌食、眼球突出、体表出血的症状, 严重的会出现鳞片脱落、皮肤

及肌肉溃烂、烂尾、烂鳍等症状^[9-10]。半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 是一种温水性近海大型底层鱼类, 主要分布在我国黄海和渤海海域, 目前已成为我国沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一。随着养殖规模的不断扩大, 近年来养殖的半滑舌鲷陆续发生各种疾病, 造成了很大的经济损失, 病害已成为制约其健康发展的重大障碍^[11]。

目前哈维氏弧菌的致病机制研究的还不够深入, 有研究发现哈维氏弧菌的致病因子主要包括胞外蛋白酶、磷脂酶、溶血素、外毒素、脂多糖等胞外产物 (extracellular products, ECPs)^[12-14]。本实验利用差异蛋白质组学, 发现了哈维氏弧菌强毒株特有的 ECP, 即 HutZ 蛋白, 此蛋白在霍乱弧

收稿日期: 2021-02-11 修回日期: 2021-03-29

资助项目: 国家自然科学基金 (31402322); 天津市应用基础项目 (15JCQNJC46400); 天津师范大学博士基金 (52XB1412)

第一作者: 尚玉曼 (照片), 从事水生生物分子生物学研究, E-mail: 17853592998@163.com

通信作者: 袁增智, 从事水生动物传染病学研究, E-mail: skyyzz@mail.tjnu.edu.cn;

孙金生, 从事重要水产养殖动物病害的发生和免疫防治研究, E-mail: skysjs@mail.tjnu.edu.cn



菌 (*V. cholerae*) 中被鉴定为血红素降解酶^[15]。霍乱弧菌中 *hutZ* 基因与另外两个基因 *hutW* 和 *hutX* 一起编码在一个操纵子中, *hutZ* 与 *hutW*、*hutX* 一同被认为是细菌从血红素中获取铁所必须的^[16]。研究表明, HutZ 可以结合并利用由 HutX 运输的血红素, 起到类似于人血红素加氧酶 (hHO) 的作用^[17-18]。

本课题组前期从患病半滑舌鳎体内分离出 20 株哈维氏弧菌, 并通过对半滑舌鳎攻毒筛选出了致病力最强的毒株 H2LB1 和致病力最弱的毒株 H1SAI3, 本研究从 2 株有致病力差异的哈维氏弧菌的胞外产物 (ECPs) 入手, 利用蛋白质组学鉴定技术及生物信息学手段筛选出强毒株特异性蛋白 HutZ 蛋白作为对象。首先探究了哈维氏弧菌在不同铁源培养条件下 *HutZ* 基因的表达量差异, 然后将 *HutZ* 基因克隆并进行原核表达, 将纯化的 HutZ 蛋白与血红素共孵育以验证其功能, 再用纯化的蛋白免疫半滑舌鳎并检测半滑舌鳎血清抗体产生情况, 最后用哈维氏弧菌对免疫后的半滑舌鳎攻毒以评价 HutZ 蛋白对半滑舌鳎的免疫保护力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒与菌株 哈维氏弧菌 H2LB1 和 H1SAI3 菌株分离自天津市某养殖场患病半滑舌鳎; *E. coli* DH5a 购自北京擎科生物技术有限公司, *E. coli* BL21(DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司, pET-28a(+) 质粒为本实验室保存。

实验动物 实验用幼龄半滑舌鳎购自天津市某水产养殖场, 体长 (15±2) cm, 体质量 (20±2) g, 体格健壮无外伤, 水温 24 °C 左右, 每日饲喂 2 次, 于养殖室内暂养 1 周后进行实验。

主要试剂 2×T5 Driect PCR Kit 试剂盒购自北京擎科生物技术有限公司; 反转录试剂盒购自 Promega 生物技术有限公司; qPCR 酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 高保真酶、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Ex *Taq* 酶、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; TSB 培养基购自海博生物公司; 2-2 联吡啶 (2-2'DP)、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 氯化血红素、醛化绵羊红细胞购自索莱宝生物技术有限公司。

1.2 实验方法

哈维氏弧菌 ECPs 的提取 采用平板玻璃纸覆盖技术^[19] 提取哈维氏弧菌强毒株 H2LB1 和弱毒株 H1SAI3 的 ECPs。将实验室保存的 H2LB1 和 H1SAI3 菌种活化后, 接种于 TSB 液体培养基中, 28 °C 振荡培养过夜; 取 0.2 mL 菌液均匀涂布于表面覆盖无菌玻璃纸 (孔径 0.016 μm, 厚度 20 μm) 的 TSA 平板上, 28 °C 培养 36 h; 用无菌 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.4) 冲洗玻璃纸上的细菌及其分泌物, 并将其收集到 1.5 mL 离心管中, 4 °C 下 14 000×g 离心 20 min; 收集上清液, 并用 0.22 μm 的滤器抽滤, 于 -80 °C 保存。

蛋白质组学鉴定 将提取的 ECPs 进行蛋白浓度测定, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测。将提取的 H2LB1 和 H1SAI3 两株菌的 ECPs 送往上海美吉生物医药科技有限公司进行 Label free 蛋白质组学鉴定。

哈维氏弧菌基因组 DNA 的提取 H2LB1 菌种于 TCBS 固体培养基上, 28 °C 培养 16 h, 用 T5 Direct PCR Kit 试剂盒提取基因组 DNA, 具体方法: 用接种环挑取单菌落于 50 μL Lysis buffer A 中, 95 °C 热处理 10 min。涡旋仪上涡旋振荡混匀, 短暂离心后将上清液转入新的 EP 管中, 加入等体积 Dilution Buffer B 中, 于 -20 °C 保存。

荧光定量 PCR (qRT-PCR) 将活化好的 H2LB1 菌株按 1:100 的比例接入含不同铁源的 TSB 培养基^[20] 中: ①正常 TSB 培养基; ②加入终浓度为 20 μmol/L FeCl₃ 的 TSB 培养基; ③加入终浓度为 30 μmol/L Hemin 的 TSB 培养基; ④加入终浓度为 100 μmol/L 2-2 联吡啶 (2-2'DP) 的 TSB 培养基; ⑤加入终浓度为 100 μmol/L 2-2 联吡啶和 200 μmol/L FeCl₃ 的 TSB 培养基; ⑥加入终浓度为 100 μmol/L 2-2 联吡啶和 300 μmol/L Hemin 的 TSB 培养基。哈维氏弧菌在 28 °C 培养箱振荡培养 12 h 后, 用 Trizol 法提取哈维氏弧菌的 RNA, 并反转录成 cDNA, -80 °C 保存备用。

根据本课题组前期对哈维氏弧菌 H2LB1 基因组测序结果, 找到 *HutZ* 的 ORF 区序列, 用 Primer 3 Plus 在线设计软件设计 *HutZ* 的定量 PCR 引物。上游引物 RT-*HutZ*-F: TGATGCAGAAGGT CGTCCAA; 下游引物 RT-*HutZ*-R: CGCAACC GCATCAAACGTTA。

内参基因使用哈维氏弧菌 16S rRNA。上游引物 RT-16S rRNA-F: TTCGCTCACTCTCGCAA

GTT; 下游引物 RT-16S rRNA-R: AACTCTGAG ACAGGTGCTGC。

以上述 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 以检测不同铁源培养基下的 *HutZ* 基因的表达式差异。qRT-PCR 反应结束后导出数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对不同铁环境培养条件下的目标基因在转录水平上的相对表达式变化进行分析。应用 GraphPad Prism 7 软件对结果进行 *t* 检验分析, 以 TSB 组为对照组, 当 $P < 0.01$ 时, 表示实验组目标基因 mRNA 表达式与对照组差异极显著; 当 $P < 0.05$ 时, 表示实验组目标基因 mRNA 表达式与对照组差异显著。

***HutZ* 基因的扩增与原核表达载体的构建** 找到 *HutZ* 的 ORF 区序列并去除信号肽, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计 *HutZ* 基因克隆引物(下划线部分为酶切位点)。上游引物 *HutZ*-*EcoR* I -F: CCGGAATTTCGGTCGTCTAGGACCAGAAATTAAG; 下游引物 *HutZ*-*Xho* I -R: CCGCTCGAGCGCTTTTTCGACTCTCTTGTGAC。

以哈维氏弧菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应条件为 98 °C 预变性 10 min, 98 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化, 于 -20 °C 保存。

用限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 同时对目的基因和表达载体 pET-28a(+) 进行酶切, 之后用 T_4 DNA 连接酶按照目的基因: 载体=1:7 的比例进行连接, 并将连接产物转化至 *E. coli* DH5a 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行 PCR 检测, 并送由华大基因进行测序; 将测序正确的菌株扩大培养量, 进行质粒提取并转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取阳性克隆并检测后保存备用。

***HutZ* 蛋白表达、纯化与 Western-blot 分析**

将构建成功的含有重组质粒的菌种活化后, 分别在 16 和 37 °C 扩大培养, IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 诱导时间分别为 3、6 和 16 h, 菌体用裂解液裂解后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 根据目的条带确定最佳诱导条件。在最佳诱导条件下扩大培养量, 进行 *HutZ* 蛋白大量诱导表达, 采用镍柱亲和和层析法进行蛋白纯化, 将纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 并以鼠源 His 抗体为一抗、羊抗鼠抗体为二抗进行 Western-blot 验证。纯化的重组蛋白超滤浓缩后在 -80 °C 超低温冰箱保存。

***HutZ* 蛋白与血红素共孵育** 参照 Uchida

等^[18] 和李君^[21] 的方法(稍有改动), 将纯化的 *HutZ* 蛋白用含有 50 mmol/L Tris-HCl 和 150 mmol/L NaCl (pH 值 8.0) 的分子筛缓冲液稀释至终浓度为 20 μ mol/L; 将氯化血红素 (Hemin) 溶解在 0.1 mol/L NaOH 中, 使 Hemin 还原成血红素 (Heme), 并用分子筛缓冲液将血红素稀释至 20 μ mol/L; 稀释后的 *HutZ* 蛋白与血红素按 1:1 (摩尔比) 的比例冰上孵育 30 min, 对照组为相同体积的 1×PBS 与 Heme 冰上孵育 30 min, 观察颜色变化, 并用全波段多功能酶标仪进行光谱扫描, 扫描范围为 300~700 nm。

免疫原性分析 将纯化的 *HutZ* 蛋白浓度稀释为 1 500 μ g/mL, 与弗氏不完全佐剂 1:1 混合并乳化; 100 尾幼龄半滑舌鳎随机分为两组, 每组 50 尾, 实验组每条鱼注射 0.2 mL 乳化后的 *HutZ* 蛋白, 对照组每条鱼注射同等剂量乳化后的 PBS; 免疫 3 周后用同样方法加强免疫 1 次; 加强免疫 1 周后, 每组取 15 尾鱼用 H2LB1 菌株进行攻毒, 攻毒剂量为 5×10^6 CFU/尾; 免疫期间, 每周分别采集 5 尾对照组和实验组半滑舌鳎尾椎血, 进行抗体检测。免疫保护率 (%)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。

间接血凝法检测半滑舌鳎血清抗体 用纯化的 *HutZ* 蛋白致敏醛化绵羊红细胞; 向 96 孔 V 型血凝板每孔加入 50 μ L 0.15 mol/L PBS (pH 值 7.2), 然后将对照组和实验组血清各 50 μ L 加入到第 1 孔中, 混匀后吸取 50 μ L 至第 2 孔中, 依次作倍比稀释至第 10 孔, 第 11 孔加入 50 μ L 0.15 mol/L PBS (pH 值 7.2); 向已倍比稀释的各孔加入 50 μ L 已致敏的绵羊红细胞, 37 °C 孵育 6 h, 观察结果。

血细胞凝集判定标准 参照邓茂刚^[22] 的判定标准, 结果判定以出现“++”孔的血清最高稀释倍数, 定为本间接血凝试验的凝集效价。

2 结果

2.1 哈维氏弧菌强弱毒株 ECPs 的提取

采用平板玻璃纸覆盖技术分别提取哈维氏弧菌强毒株 H2LB1 和弱毒株 H1SAI3 的 ECPs, 进行 SDS-PAGE 电泳, 各样品上样量为 10 μ g, 得到如图 1 所示电泳条带。SDS-PAGE 电泳结果显示, 两组 ECPs 的电泳条带清晰丰富, 二者之间有明显差异, 强毒株 H2LB1 条带更为丰富。二者都存在特异性的条带, 反映出两菌株都存在一些

特异性蛋白。二者也有大小相同或相近的条带, 条带深浅不一, 反映出相应蛋白在两菌株之间的表达量有所差异。

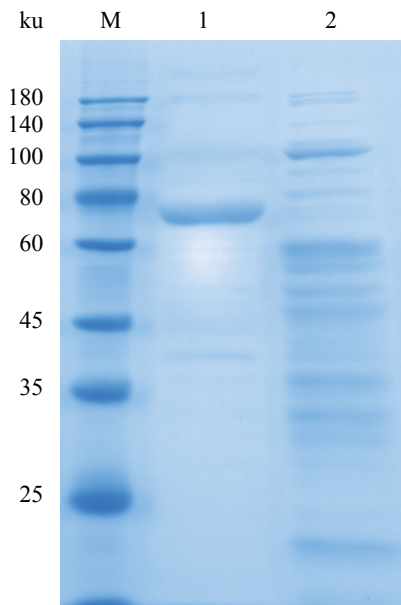


图 1 H1SAI3 和 H2LB1 菌株 ECPs SDS-PAGE 分析

M. 蛋白分子量标准; 1. H1SAI3 ECPs; 2. H2LB1 ECPs

Fig. 1 ECPs SDS-PAGE analysis of H1SAI3 and H2LB1 strains

M. protein molecular weight standard; 1. H1SAI3 ECPs; 2. H2LB1 ECPs

2.2 哈维氏弧菌强弱毒株 ECPs 的蛋白组学分析

将提取的两株菌的 ECPs 进行 Label free 蛋白组学鉴定, 蛋白差异分析显示, H2LB1 菌株的 ECPs 相对于 H1SAI3 菌株的 ECPs 蛋白表达量下调的有 415 种, 蛋白表达量上调的有 601 种 (图 2, 表 1), 其中包含在 H1SAI3 中表达量为 0 的蛋白, 即 H2LB1 ECPs 特异性表达的蛋白, 表 1 为表达量居于前 10 位的蛋白, 其中包括在 H1SAI3 中表达量为 0 的蛋白。

对所有差异蛋白进行生物信息学分析后, 选定 H2LB1 菌株 ECPs 中特异性蛋白 HutZ 蛋白, 即一种血红素降解蛋白进行后续实验验证。

2.3 荧光定量 PCR 检测 HutZ 在不同铁环境下的表达量差异

哈维氏弧菌的 HutZ 基因在不同铁源培养基培养条件下表达量有所差异 (图 3)。以在 TSB 培养基培养条件为对照, HutZ 基因在铁源丰富的培养基 (TSB+FeCl₃) 中表达量相对降低, 而在铁源限制培养基即加入铁螯合剂 2-2'DP 的培养基

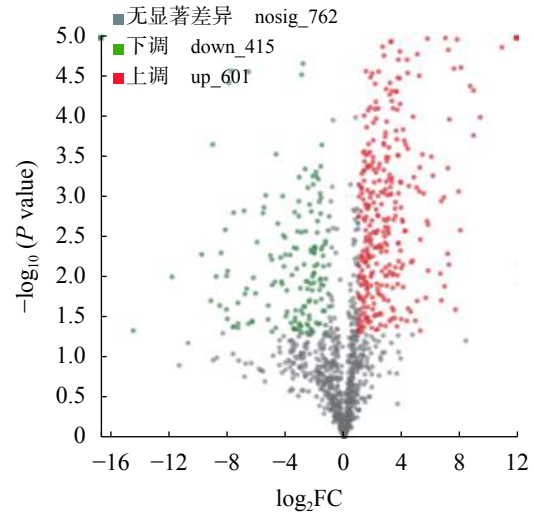


图 2 两组 ECPs 之间的蛋白差异分析

横坐标为蛋白在两个样本间表达差异的倍数变化值, 纵坐标为蛋白表达量变化差异的统计学检验值, 即 P 值。图中每个点代表一个特定的蛋白, 绿色的点为表达差异下调的蛋白, 红色的点为表达差异上调的蛋白, 灰色的点表示无显著差异的蛋白

Fig. 2 Analysis of protein differences between the two groups of ECPs

The abscissa is the fold change value of the difference in protein expression between two samples, and the ordinate is the statistical test value of the difference in protein expression, that is, the P value. Each dot in the figure represents a specific protein, the green dots are proteins whose expression is differentially down-regulated, and the red dots are proteins whose expression is differentially up-regulated, the gray dots are the proteins with no significant difference in expression

(TSB+DP) 中表达量显著升高, 在铁源限制的培养基中加入 FeCl₃ (TSB+DP+FeCl₃) 表达量也有显著升高, 说明铁会抑制摄铁基因 HutZ 的表达; 在正常培养基中加入氯化血红素, (Hemin) HutZ 基因表达量有少许升高, 而在铁源限制培养基中加入 Hemin (TSB+DP+Hemin), 表达量极显著升高, 说明血红素的存在会诱导 HutZ 的表达, 而这种诱导在铁源限制的条件下作用更为明显。

2.4 HutZ 基因扩增与原核表达载体的构建

以哈维氏弧菌 H2LB1 的基因组 DNA 为模板, 以 HutZ 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 得到 495 bp 的条带 (图 4-a), HutZ 基因整个 ORF 区长度为 531 bp, 去除信号肽及终止子的长度为 495 bp, 扩增结果与预测结果一致。将重组质粒 HutZ-pET 28a 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 得到一条约为 5 400 bp 的 Pet-28a(+) 的条带和一条约为 500 bp 的 HutZ 基因条带 (图 4-b)。重组质粒送往华大基因进行基因测序, 测序结果显示重组原核表达载体 HutZ-

表 1 差异蛋白功能预测

Tab. 1 Function prediction of differential proteins

蛋白登录号 protein accession number	蛋白信息描述 protein information description	蛋白功能预测 protein function prediction
A0A3A1PWD3	丙氨酸脱氢酶 alanine dehydrogenase	调节机体代谢 regulate body metabolism
K5UJL3	伸长因子Ts elongation factor Ts	促进蛋白翻译 promote protein translation
A0A454CW67	推定的RTX毒素结构域蛋白(片段) putative RTX toxin domain protein (fragment)	毒力因子 virulence factors
A0A3A1PZR2	热激蛋白HslJ heat shock protein HslJ	与机体应激反应相关 related to the body's stress response
A0A454CX42	血红素利用蛋白HutZ heme utilization protein HutZ	利用血红素 utilize heme
A0A0D0IER3	超氧化物歧化酶[Cu-Zn] superoxide dismutase [Cu-Zn]	维持机体活性氧平衡 maintain the body's active oxygen balance
K5SNF4	ATP依赖性蛋白酶ATPase亚基HslU ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	ATP酶 ATPase
A0A380NDL6	RTX毒素 RTX toxin	毒力因子 virulence factors
A0A2S0S6V6	ATP依赖性锌金属蛋白酶 ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	水解蛋白质 hydrolyzed protein
A0A0D0JB06	竞争蛋白ComFB competence protein ComFB	调节DNA摄取机制 regulation of DNA uptake mechanism

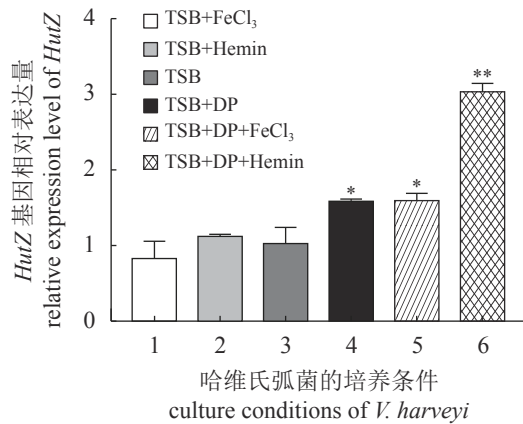


图 3 HutZ 基因在不同铁源培养条件下的表达量差异

Fig. 3 Difference of HutZ expression in different iron source culture conditions

1. TSB+FeCl₃, 2. TSB+Hemin, 3. TSB, 4. TSB+DP, 5. TSB+DP+FeCl₃, 6. TSB+DP+Hemin, "*" . P<0.05, "***" . P<0.01

pET-28a 构建成功。

2.5 HutZ 重组蛋白原核表达及纯化

对构建成功的重组菌进行 IPTG 诱导表达，图 5 显示了 HutZ 蛋白在菌体裂解后上清液中的表达情况。根据预测，HutZ 蛋白分子量大小为 23.7 ku 左右，重组蛋白表达量最高的诱导条件为 37 °C 诱导 6 h。

在蛋白表达量最高的诱导条件下扩大细菌培养量，大量诱导表达 HutZ 重组蛋白，经镍柱纯化

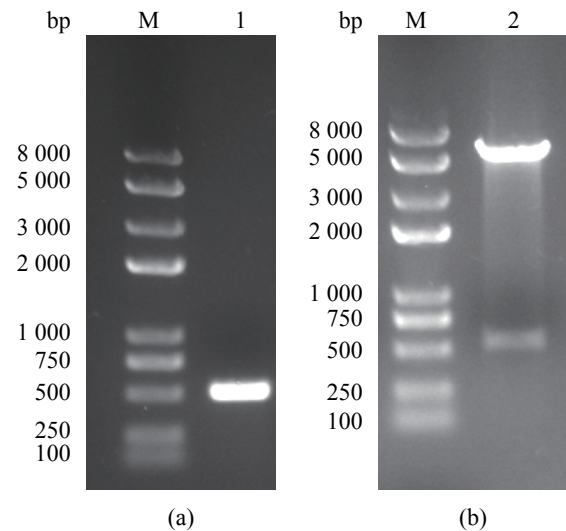


图 4 HutZ 基因扩增 (a) 与重组质粒 HutZ-pET-28a 双酶切验证 (b)

M. 标准物质 8000, 1. HutZ, 2. HutZ-pET-28a

Fig. 4 HutZ gene amplification (a) and enzyme digestion verification of recombinant plasmid HutZ-pET-28a(b)

M. reference material 8000, 1. HutZ, 2. HutZ-pET-28a

后进行 SDS-PAGE 检测，目的蛋白条带清晰且单一，目的条带位置与对应蛋白大小一致(图 6)。用鼠源 His 抗体作为一抗、羊抗鼠二抗进行蛋白 Western-blot 分析，显示出单一的印迹(图 6)，大小与预测相符，表明蛋白表达及纯化效果很好，

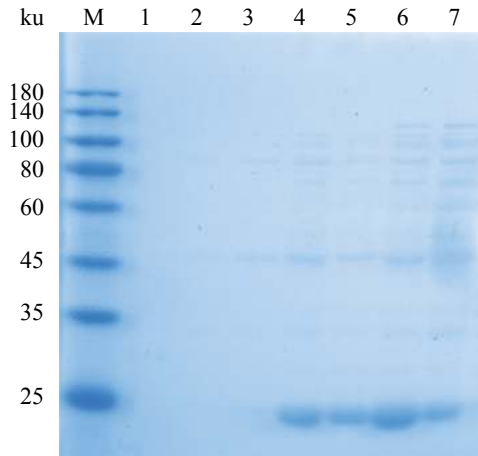


图 5 HutZ 重组蛋白在不同诱导条件下的表达

M. 蛋白分子量标准; 1. 未诱导全菌上清液; 2. 16 °C 3 h; 3. 16 °C 6 h; 4. 16 °C 16 h; 5. 37 °C 3 h; 6. 37 °C 6 h; 7. 37 °C 16 h

Fig. 5 Expression of HutZ recombinant protein under different induction conditions

M. protein molecular weight standard; 1. uninduced whole bacterial supernatant; 2. 16 °C 3 h; 3. 16 °C 6 h; 4. 16 °C 16 h; 5. 37 °C 3 h; 6. 37 °C 6 h; 7. 37 °C 16 h

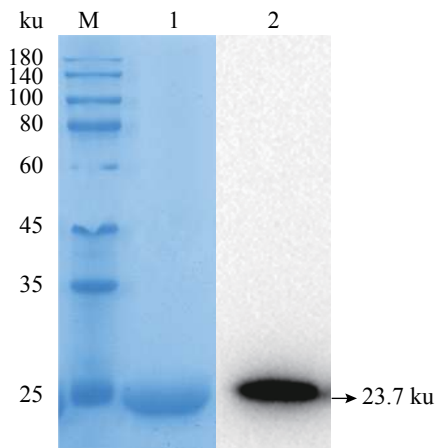


图 6 HutZ 重组蛋白纯化及 Western-blot 验证

M. 蛋白分子量标准; 1. 重组蛋白 HutZ; 2. 重组蛋白 HutZ Western-blot

Fig. 6 HutZ recombinant protein purification and Western-blot verification

M. protein molecular weight standard; 1. recombinant protein HutZ; 2. recombinant protein HutZ Western-blot

可以用于后续研究。

2.6 HutZ 重组蛋白功能体外鉴定

纯化的 HutZ 重组蛋白与血红素在分子筛缓冲液中按照摩尔比 1 : 1 的比例冰上孵育 30 min, 发现溶液颜色由墨绿色变为血红色, 用全波段多功能酶标仪测定 300~700 nm 波长的吸光值变化,

发现 HutZ 重组蛋白与血红素孵育后光吸收峰明显右移, 最大吸收峰值有少许增加, 在 500~600 nm 处有起伏 (图 7)。HutZ 蛋白与血红素孵育前后, 颜色和光谱扫描结果都有变化, 可能是由于 HutZ 蛋白与血红素结合, 导致血红素结构发生了变化, 从而发生了光吸收峰的变化。

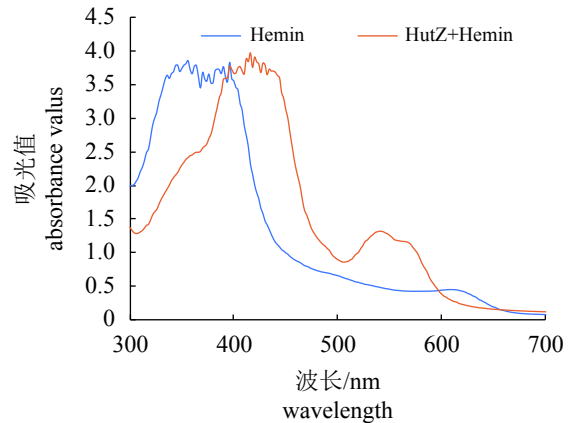


图 7 HutZ 重组蛋白与血红素孵育前后吸光值变化

Fig. 7 Changes in absorbance of hemin before and after incubation with recombinant protein HutZ

2.7 半滑舌鳎对 HutZ 重组蛋白的免疫反应

分别采集免疫后 1—7 周的半滑舌鳎尾椎血并收集血清, 利用间接血凝法测定半滑舌鳎抗体效价。表 2 结果显示 HutZ 免疫组在免疫后第 3 周开始检测出抗体, 在免疫后第 6 周即二次免疫后第 3 周达到最大抗体效价 (1 : 128), 对照组 (PBS 免疫组) 和阴性组 (健康鱼) 均没有检测到抗体。

在免疫后第 4 周用哈维氏弧菌 H2LB1 菌株的活菌对两组免疫的半滑舌鳎进行攻毒, 并另取一组非免疫的半滑舌鳎注射相同剂量的无菌 PBS 作为阴性对照。PBS 免疫组的半滑舌鳎在攻毒后第 2 天开始出现行动迟缓、摄食减少、腹水增多的现象, 在第 3 天开始出现死亡现象, 直至第 17 天 15 条半滑舌鳎全部死亡。HutZ 免疫组半滑舌鳎攻毒后第 3 天开始出现死亡现象, 经过几天的平缓期, 在第 8 天又开始出现死亡现象, 在第 11 天之后趋于稳定, 没有再出现死亡现象。注射无菌 PBS 的对照组自注射以来未出现死亡现象, 运动能力及摄食能力没有变化 (图 8)。经计算, HutZ 免疫组的免疫保护率达 73.3%。

PBS 免疫组半滑舌鳎攻毒后的发病症状与 HutZ 免疫组在攻毒后的发病症状相比更为严重, 腹水较多, 体表有轻微溃烂 (图 9-d), 肠从肛门脱

表 2 血清抗体效价检测结果

Tab. 2 Results of serum antibody titer test

组别 groups	免疫时间/周 immunization time	抗体效价 antibody titer
HutZ 免疫组 HutZ immune group	3	1 : 16
	4	1 : 64
	5	1 : 64
	6	1 : 128
	7	1 : 64
PBS 免疫组 PBS immune group	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
健康鱼 healthy fish		0

出(图 9-c), 内脏黏连(图 9-f)。对发病的半滑舌鲷体表、腹水、肝脏、肠道等病灶处进行分菌, 在 TCBS 上划线, 均长出黄色菌落, 外形与 H2LB1

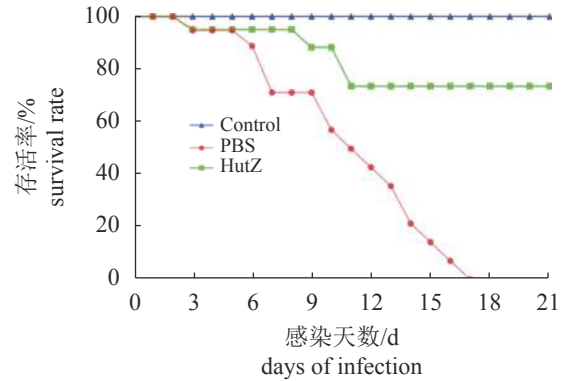


图 8 哈维氏弧菌攻毒后半滑舌鲷的存活率

Control. 注射 PBS; PBS. PBS 免疫组攻毒; HutZ. HutZ 免疫组攻毒

Fig. 8 Survival rate of *C. semilaevis* after *V. harveyi* challenge

Control. PBS injection; PBS. PBS immune group challenge; HutZ. HutZ immune group challenge

无明显差异, 说明半滑舌鲷发病确由哈维氏弧菌 H2LB1 引起。

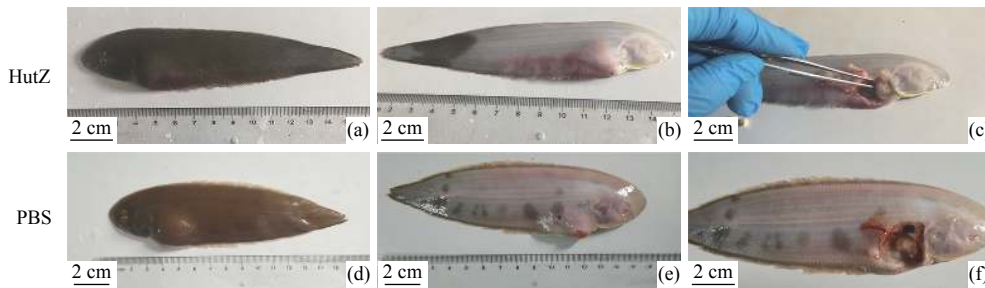


图 9 哈维氏弧菌攻毒后半滑舌鲷发病症状

Fig. 9 Symptoms of *C. semilaevis* after injection with *V. harveyi*

3 讨论

ECPs 一直被认为是致病菌重要的致病因子, Lee 等^[23]发现从患病对虾中分离的哈维氏弧菌所分泌的胞外产物能够抑制对虾的血凝。Inamura 等^[19]发现鳗弧菌 (*V. anguillarum*)的胞外产物可致多种鱼类死亡。牟海津等^[24]证实了副溶血弧菌 (*V. parahemolyticus*)的胞外产物具有多种酶活性, 是细菌侵染中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的主要成分之一。从哈维氏弧菌强弱毒株 ECPs 的差异蛋白功能预测结果可以发现, 这些强毒株特异性表达的蛋白与机体的应激反应、维持机体平衡以及细菌毒力相关, 说明强毒株可能对环境的适应能力、逃避机制及应激反应能力更强, 这或许是其具有强致病力的原因之一。

铁是细菌生长所必需的元素, 参与了许多生命活动过程, 且在动植物的宿主-病原体相互作用中起着关键作用, 因此, 铁是细菌入侵和感染宿主必需的物质^[25-27]。由于宿主体内绝大多数的铁是以血红素铁的形式存在, 所以血红素铁是大多数病原菌的主要铁来源, 因此, 许多病原菌已经进化出多种策略, 从宿主获得血红素来满足自身对铁的需求^[28-30]。本实验通过改变哈维氏弧菌的培养条件, 发现 *HutZ* 的表达受铁的负调控, 这一结果与 Wyckoff 等^[17]在霍乱弧菌中的研究结果一致。*HutZ* 基因在有氯化血红素存在的铁源限制培养基中表达量有极显著升高, 与 Lemos 等^[31]在鳗弧菌中的研究结果相符, 说明当血红素作为唯一铁源时, 哈维氏弧菌会启动 *HutZ* 基因大量表达以获得生长所必需的铁。

为了确定 HutZ 蛋白是否具有结合血红素的活性, 将 HutZ 蛋白在体外重组表达并纯化。将重组 HutZ 蛋白与血红素共孵育 30 min 后, 血红素由墨绿色变为血红色, 300~700 nm 光谱扫描结果显示, 在 416 nm 左右处出现最大光吸收峰, 与典型的血红素和蛋白结合的特征峰相似, 而在 540 和 560 nm 处的吸收峰对应了血红素结合蛋白的两个卟啉环, 这些现象说明 HutZ 蛋白确实能够与血红素相结合, 并且可能使血红素发生降解。Wyckoff 等^[17]发现霍乱弧菌的 HutZ 蛋白与血红素结合的吸收光谱与本实验的结果相似, 但不同的是 Wyckoff 等得到的光谱具有单一的索氏带, 而本实验得到的光谱最大吸收峰在 390~440 nm 有波动, 原因可能是不同物种间 HutZ 蛋白与血红素结合的能力或者方式有差异。

将纯化的 HutZ 蛋白与弗氏不完全佐剂混合作为抗原, 对半滑舌鳎进行免疫, 结果显示, 半滑舌鳎的血清免疫效价达 1:128。由于缺少半滑舌鳎的血清抗体, 无法用间接 ELISA 法检测抗体效价, 故而选择用间接血凝法检测血清抗体, 据统计, ELISA 法的灵敏度比血凝法高 8~12 倍, 所以实际上 HutZ 蛋白对半滑舌鳎的免疫效果应该更显著。在免疫后第 4 周用哈维氏弧菌对半滑舌鳎攻毒, 结果显示 PBS 免疫组 (即对照组) 半滑舌鳎在 17 d 内全部死亡, 而 HutZ 蛋白免疫组的半滑舌鳎在 21 d 内的死亡率不足 26.7%, 相对免疫保护率达 73.3%。薛丽丽^[20]对溶藻弧菌摄铁系统的研究表明, 溶藻弧菌的 HutZ 蛋白对青石斑鱼 (*E. awoara*) 的免疫保护率为 78.26%。在哈维氏弧菌中, 陶然等^[32]的研究表明, 硫氧还蛋白还原酶对大菱鲆的免疫保护率为 75%。辛瑞晓^[33]的研究表明, 超氧化物歧化酶对大黄鱼的免疫保护率为 80%。潘晓艺^[34]的研究表明, 哈维氏弧菌重组胞外蛋白酶 Δ ProA 蛋白对大黄鱼的免疫保护率为 75%, 本研究中 HutZ 蛋白对半滑舌鳎的免疫保护率为 73.3%, 与其他亚单位疫苗保护率相差不大, 说明 HutZ 蛋白对半滑舌鳎具有良好的保护性。

综上所述, 本研究发现 HutZ 蛋白不仅是哈维氏弧菌摄铁系统的重要组成部分, 也是重要的免疫原性蛋白, 可以作为亚单位疫苗的候选抗原, 为养殖鱼类哈维氏弧菌感染的免疫预防提供新的技术支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Austin B, Zhang X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119-124.
- [2] Firmino J P, Andree K B, Furones M D, et al. Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 734210.
- [3] Zhang X H, Lin H Y, Wang X L, et al. Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—a review[J]. *Science China Earth Sciences*, 2018, 61(10): 1357-1368.
- [4] Ransangan J, Mustafa S. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass *Lates calcarifer* by use of 16S ribosomal DNA sequencing[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21(3): 150-155.
- [5] Ruwandeepika H A D R, Jayaweera T S P, Bhowmick P P, et al. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 59-74.
- [6] Shen G M, Shi C Y, Fan C, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(10): 1351-1362.
- [7] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(2): 93-102.
- [8] Zhou J, Fang W, Yang X, et al. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "Bacterial White Tail Disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e29961.
- [9] 王凤青, 孙玉增, 任利华, 等. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2018, 8(2): 49-56.
Wang F Q, Sun Y Z, Ren L H, et al. Research progress on the main pathogenic vibrio affecting aquatic animals in mariculture[J]. *China Fishery Quality and Standards*, 2018, 8(2): 49-56 (in Chinese).
- [10] 闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 海水养殖动物致病弧菌的研究进展[J]. *水产科学*, 2009, 28(8): 475-481.
Yan M C, Chen S B, Shan L Z, et al. A critical review: pathogenic vibrio in maricultural animals[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(8): 475-481 (in Chinese).
- [11] 姚志贤. 半滑舌鳎皮肤溃疡病原及免疫保护研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.
Yao Z X. Studies on the pathogens and immune protec-

- tion of skin ulcer of *Cynoglossus semilaevis*[D]. Xiamen: Jimei University, 2012 (in Chinese).
- [12] 沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特性分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(2): 142-148.
- Shen J Y, Li X H, Pan X Y, *et al.* Characterization of major virulent factor produced by pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2011, 37(2): 142-148 (in Chinese).
- [13] Liuxy P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(6): 413-416.
- [14] 陈吉祥, 杨慧, 颜显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 580-587.
- Chen J X, Yang H, Yan X H, *et al.* Cloning of hemolysin gene from a pathogenic *Vibrio harveyi* SF1 and its detection in diseased marine animals and marine environments[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(5): 580-587 (in Chinese).
- [15] Uchida T, Sekine Y, Matsui T, *et al.* A heme degradation enzyme, HutZ, from *Vibrio cholerae*[J]. Chemical Communications, 2012, 48(53): 6741-6743.
- [16] Sekine Y, Tanzawa T, Tanaka Y, *et al.* Cytoplasmic heme-binding protein (HutX) from *Vibrio cholerae* is an intracellular heme transport protein for the heme-degrading enzyme, HutZ[J]. Biochemistry, 2016, 55(6): 884-893.
- [17] Wyckoff E E, Schmitt M, Wilks A, *et al.* HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(13): 4142-4151.
- [18] Uchida T, Dojun N, Ota K, *et al.* Role of conserved arginine in the heme distal site of HutZ from *Vibrio cholerae* in the heme degradation reaction[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 677: 108165.
- [19] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*[J]. Fish Pathology, 1984, 19(2): 89-96.
- [20] 薛丽丽. 溶藻弧菌摄铁系统相关基因的克隆、表达及功能分析 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- Xue L L. Cloning, expression and functional analysis of iron uptake system related genes from *Vibrio alginolyticus*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [21] 李君. 霍乱弧菌 HutX 蛋白的提取和血红素结合能力研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- Li J. Research on *Vibrio cholerae* HutX protein purification and the combination with heme[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013 (in Chinese).
- [22] 邓茂刚. 猪弓形虫间接红细胞凝集试验[J]. 山东畜牧兽医, 2008, 29(2): 1-3.
- Deng M G. Indirect red blood cell agglutination test of *Toxoplasma gondii*[J]. Shandong Animal Husbandry and Veterinary, 2008, 29(2): 1-3 (in Chinese).
- [23] Lee K K, Chen Y L, Liu P C. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease[J]. Blood Cells Molecules and Diseases, 1999, 25(4): 180-192.
- [24] 牟海津, 李筠, 包振民, 等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273-280.
- Mou H J, Li Y, Bao Z M, *et al.* Pathogenicity of extracellular products of *Vibrio parahaemolyticus* to *Penaeus chinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2000, 31(3): 273-280 (in Chinese).
- [25] Fillat M F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 546: 41-52.
- [26] Schaible U E, Kaufmann S H E. Iron and microbial infection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(12): 946-953.
- [27] Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, *et al.* Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013, 3: 90.
- [28] Wilks A, Burkhard K A. Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme[J]. Cheminform, 2007, 24(3): 511-522.
- [29] Genco C A, Dixon D W. Emerging strategies in microbial haem capture[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(1): 1-11.
- [30] Choby J E, Skaar E P. Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(17): 3408-3428.
- [31] Lemos M L, Osorio C R. Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish[J]. Biometals, 2007, 20(3-4): 615-626.
- [32] 陶然, 刘瑞, 王晴, 等. 哈维氏弧菌硫氧还蛋白还原酶在大肠杆菌中的表达及对大菱鲂的免疫保护作用[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 137-142.
- Tao R, Liu R, Wang Q, *et al.* Expression of thioredoxin

- reductase of *Vibrio harveyi* SF1 in bacterium *Enterobacter coli* and immunogenicity in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(2): 137-142 (in Chinese).
- [33] 辛瑞晓. 哈维氏弧菌超氧化物歧化酶的原核表达及免疫原性的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Xin R X. Expression and immunoprotective analysis of superoxide dismutase from *Vibrio harveyi* on turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [34] 潘晓艺. 哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因的克隆、表达及其免疫原性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- Pan X Y. Cloning, expression, immunogenicity of extracellular proteinase from *Vibrio harveyi*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009 (in Chinese).

Function and immunogenicity of the secretory protein HutZ of *Vibrio harveyi* from *Cynoglossus semilaevis*

SHANG Yuman¹, WANG Heng¹, LIU Jingru¹, YUAN Zengzhi^{1,2*}, SUN Jinsheng^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: *Vibrio harveyi* is a pathogen common in the marine fish culture of China. To explore the pathogenic mechanism of *V. harveyi* and develop effective methods for prevention and control *V. harveyi* infection, we extracted extracellular products (ECPs) from the high virulent strain H2LB1 and the low virulent strain H1SAI3 of *V. harveyi*. The proteins of ECPs were analyzed and identified by using the label-free proteomics method. According to the result of protein identification, we selected the high virulent strain-specific protein HutZ for further analysis. Firstly, qRT-PCR technology was used to detect the expression difference of *V. harveyi* gene *HutZ* under culture conditions with different iron sources. Secondly, the gene *HutZ* was cloned to the expression vector, and recombinant HutZ protein was successfully expressed and purified. Then the purified recombinant HutZ protein was incubated with hemin, and the spectrum was scanned at 300-700 nm. Finally, *Cynoglossus semilaevis* were immunized with purified recombinant HutZ protein twice. After immunization, the serum titers of 1-7 weeks were detected by the indirect hemagglutination method, and the challenge experiment was performed after 4 weeks of immunization. The results showed that the expression of gene *HutZ* is related to the iron source; HutZ protein affected the absorbance of hemin; the antibody titer of *C. semilaevis* against HutZ protein reached up to 1 : 128, and the immune protection rate was as high as 73.3%. These results indicated that HutZ protein is a vital factor for the iron uptake of *V. harveyi* and potential candidate antigen for developing effective subunit vaccines to prevent the *V. harveyi* infection.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio harveyi*; HutZ protein; immunity

Corresponding authors: YUAN Zengzhi. E-mail: skyyzz@mail.tjnu.edu.cn;

SUN Jinsheng. E-mail: skysjs@mail.tjnu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402322); Tianjin Applied Fundamental Project (15JCQNJC46400); Tianjin Normal University Doctoral Fund Project (52XB1412)