

刘建欣,刘 蕾,郭珊珊,等. 副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 重组表达及其免疫原性分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(15):43-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.15.006

副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 重组表达 及其免疫原性分析

刘建欣^{1,2,3}, 刘 蕾^{1,2,3}, 郭珊珊^{1,2,3}, 袁倩云^{1,2,3}, 王文彬^{1,2,3}

(1. 江苏省海洋生物技术重点实验室,江苏连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心,江苏连云港 222005;
3. 江苏海洋大学食品科学与工程学院,江苏连云港 222005)

摘要:副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 是 β -桶组装 BAM 复合物的核心成分,参与细胞外膜蛋白运送和安装过程,是潜在的新型靶标抗原,目前其在免疫检测抗原和疫苗中的潜在价值尚未有研究报道。本研究通过生物信息学软件 SnapGene 和 Protean 分析 BamA 的序列并筛选出多肽,采用 PCR 扩增出外膜蛋白 BamA 的基因片段,构建重组质粒 pET-28a(+)-BamA;经大肠杆菌 BL21 诱导表达 BamA 重组蛋白(90 ku);多肽与 BSA 偶联,制备的抗原免疫 BALB/c 小鼠制备了血清。采用酶联免疫分析(ELISA)和蛋白质印迹法(Western blot)测定 BamA 蛋白及多肽免疫血清对 24 株弧菌的交叉反应。ELISA 测定结果表明,免疫血清对 BamA 蛋白的效价在 121 K 以上,对副溶血性弧菌等弧菌的效价较弱(0.5 K);免疫印迹结果显示,BamA 蛋白血清与副溶血性弧菌 CICC 21617、CICC 21618、杀岩龙虾弧菌和非 O1 型霍乱弧菌等弧菌属细胞裂解物中 90 ku 左右的蛋白可发生特异性反应,而对费氏类弧菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌等非弧菌属无交叉反应。弧菌外膜蛋白 BamA 具有弧菌属保守性并可以诱导产生弧菌特异性抗体,多肽在菌体表面的暴露性可能受到其他抗原的影响,这给后续弧菌诊断抗原和疫苗抗原研究提供了依据。

关键词:副溶血性弧菌;外膜蛋白 BamA;重组表达;免疫原性;ELISA;免疫印迹

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)15-0043-08

弧菌是革兰氏阴性嗜盐菌,在海洋环境中分布广泛,是海产品中常见的食源性致病菌^[1-2]。食用致病性弧菌污染的食物通常会引起急性肠胃炎,重症患者则表现为脱水、休克昏迷甚至死亡^[3]。最常见的致病性弧菌包括副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)和霍乱弧菌(*V. cholerae*),其中创伤性弧菌对鱼类的致死率较高,副溶血性弧菌在海鲜中具有更高的流行率^[4]。此外,弧菌病是一种重要的海洋水产动物病害,已发现了 50 多种易感的水产动物,危害了海洋水产健康养殖,构成了重要的经济威胁^[5]。

弧菌诊断特异性抗原是建立准确、快速弧菌免疫检测手段的基础,也有助于弧菌病害的防控^[6]。

外膜蛋白(outer membrane protein,简称 Omp)因其基本功能、表面暴露性和在菌株中的保守性,常被用于疫苗的候选抗原^[7]。目前,已证实的弧菌属保守性和特异性较好的外膜蛋白较少,仍然需要新的弧菌属外膜蛋白。伦镜盛等分别重组表达了 5 种弧菌的外膜蛋白 U(OmpU),来自副溶血性弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌(*V. mimicus*)的 OmpU 的小鼠免疫血清与 13 种弧菌发生交叉反应,与菌属外不发生免疫交叉反应,表明 OmpU 是弧菌保守的候选免疫抗原^[8]。副溶血性弧菌外膜蛋白 VP1243 在弧菌中广泛分布,具有高度保守性,诱导了对副溶血弧菌、溶藻弧菌和创伤弧菌的交叉免疫反应和免疫保护,是预防弧菌感染的多功能疫苗候选蛋白^[9]。Li 等用同源和异源细菌免疫小鼠,采用免疫蛋白组学确定了弧菌外膜蛋白的多价疫苗候选物,发现了 30~40 种弧菌外膜蛋白^[10]。其中,重组外膜蛋白 A(OmpA)和肽聚糖相关脂蛋白(Pal)对溶藻弧菌、嗜水气单胞菌和荧光假单胞菌均有免疫保护作用。

BamA 作为跨膜桶状蛋白具有较好的表面暴露性,是 β -桶状组装系统(BAM)家族的核心成分,目前在所有已测序的革兰氏阴性菌中均有发

收稿日期:2021-05-07

基金项目:江苏省海洋生物技术重点实验室研究基金(编号:HS2019003);江苏省研究生科研与实践创新计划(编号:KYCX19-2290);江苏省优势学科建设工程项目(编号:PAPD)。

作者简介:刘建欣(1995—),女,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事海洋动物免疫及病害学研究。E-mail:jxliu0903@163.com。

通信作者:王文彬(1990—),男,河南南阳人,博士,副教授,主要从事病原菌检测与控制研究。E-mail:wenbin66@jou.edu.cn。

现^[11-12]。前期我们建立了生物信息学方法对副溶血性弧菌 4 831 个编码蛋白进行筛选,获得了 101 个位于外膜的蛋白,并通过表面蛋白质组检验筛选结果,2 种方法均表明 BamA 是外膜蛋白,且该蛋白在弧菌属中具有广泛保守性,具有作为弧菌免疫检测抗原的潜力。目前,关于弧菌 BamA 的重组表达及免疫原性的研究未见报道,其作为诊断抗原和疫苗抗原的价值仍不清楚。因此,本研究进一步对 BamA 的保守性和基本结构进行分析,并通过生物信息学方法筛选特异性多肽,采用酶联免疫分析(ELISA)和免疫印迹评价其免疫 BALB/c 小鼠后血清与 7 株副溶血性弧菌、9 种常见弧菌、发光杆菌等海洋细菌及其他常见细菌的交叉反应。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

本研究所用的菌株详见表 1,于 2019 年 4 月在江苏海洋大学实验室中培养。原核表达载体 pET-28a(+)为笔者所在实验室保存。副溶血性弧菌(CICC21617)用含 3% NaCl 的 LB 培养基(1.0% 胰蛋白,0.5% 酵母提取物,3.0% NaCl)在 37℃ 条件下过夜培养。大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 作为工程菌株,培养条件为 LB 培养基(1.0% 胰蛋白,0.5% 酵母提取物,1.0% NaCl)37℃ 过夜培养,用于重组质粒构建和蛋白质表达。将 pET-28a(+)质粒载体转化到大肠杆菌 DH5 α 中,保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶 BamH I 和 Xho I,均购自宝生物工程(大连)有限公司;弗氏完全和不完全佐剂、牛血清蛋白 BSA,均购自 Sigma 公司;沉淀型四甲基联苯胺(TMB)底物缓冲液,购自广州捷倍斯生物科技有限公司;质粒抽提试剂盒、卡那霉素、异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、DNA Marker、双色预染蛋白 Marker、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)所需试剂,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;羊抗鼠二抗,购自 Jackson ImmunoResearch 公司;4-N-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸盐琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)和二甲基甲酰胺(DMF),购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司;其他化学试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司;96 孔酶标板,购自无锡国盛生物工程股份有限公司;透析袋(截留相对分子质量为 14 000),购自上海桥星贸易

有限公司;酶标仪为 Infinite F50;半干式转膜仪型号为 AmershamTM TE 70。

表 1 本研究所用菌株

编号	菌株名称	菌株编号
1	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CICC 21617
2	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CICC 21618
3	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CICC 21619
4	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CICC 10552
5	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CICC 21528
6	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CGMCC 1.1614
7	副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	CGMCC 1.1616
8	杀岩龙虾弧菌(<i>V. jasicida</i>)	MCCC 1A15010
9	非 O1 型霍乱弧菌[<i>V. cholerae</i> (Non-O1)]	MCCC 1A02608
10	魔鬼弧菌(<i>V. diabolius</i>)	MCCC 1A03504
11	鳗弧菌(<i>V. anguillarum</i>)	MCCC 1A07299
12	哈维氏弧菌(<i>V. harveyi</i>)	MCCC 1A00232
13	解藻酸弧菌(<i>V. alginolyticus</i>)	MCCC 1A03220
14	坎氏弧菌(<i>V. campbellii</i>)	MCCC 1A02605
15	创伤弧菌(<i>V. vulnificus</i>)	CGMCC 1.8674
16	拟态弧菌(<i>V. mimicus</i>)	MCCC 1A02602
17	美人鱼发光杆菌(<i>Photobacterium damsela</i>)	MCCC 1A00223
18	霍氏格里蒙特氏菌(<i>Grimontia hollisiae</i>)	MCCC 1H00085
19	费氏另类弧菌(<i>Aliivibrio fischeri</i>)	MCCC 1A02700
20	ASP 嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	CICC 10500
21	迟缓爱德华氏菌(<i>Edwardsiella tarda</i>)	分离株
22	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	SSI 82000
23	阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	CICC 10011
24	无丙二酸柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter malonate</i>)	CICC 21522

1.3 副溶血性弧菌 BamA 蛋白拓扑结构分析及多肽的筛选

副溶血性弧菌的外膜蛋白 BamA 的氨基酸序列(GI:28899084)从美国国家生物技术信息中心的蛋白数据库(NCBI)中获得,并采用搜索比对工具 BLAST 分析其与其他弧菌属弧菌序列的同源性水平。为了直观分析 BamA 蛋白在弧菌属及革兰氏阴性菌株蛋白之间的关系,用 ClustalX 分析蛋白质序列的多重比对,并使用 MEGA 7.0 中的邻接(neighbor-joining,简称 NJ)法构建系统进化树。设置了 10 000 次重复的 Bootstrap 测试,以检查分支拓扑的有效性。BamA 蛋白质三维结构使用 SWISS-MODEL 同源建模法在线生物信息学软件进行模拟,将候选蛋白质的序列输入至序列框中,SWISS-MODEL 同源建模法可自动找到与目标序列同源的已知结构作为模板,为目标序列与模板序列创建序

列比对,根据序列比对,用同源建模软件预测结构模型,评估模型质量。模拟结构同时通过 I-TASSER^[13] 和 TrRosetta^[14] 进行了验证。利用 Pymol 软件分析最佳蛋白模型的结构。结合 SnapGene 和 Proten 软件对副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 的保守区域进行分析,筛选出保守且对弧菌属物种具有特异性的多肽序列。利用 Pymol 软件分析蛋白结构,将在弧菌属中具高保守性的多肽定位到蛋白结构,找到其中的暴露性表位氨基酸序列。

1.4 BamA 重组质粒的构建和表达

利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide,简称 CTAB)法提取 DNA,副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 基因(登录号为 BA000031.2 和 BA000032.2),通过 PCR 进行扩增。上游引物:5'-CACGGATCCATGGCGATTAA GCGAATTCT-3',下游引物:5'-CCGCTCGAGGAA AGTTCTACCGATAGTGAAT-3'。PCR 程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,目的基因和 pET-28a(+) 质粒均用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,并用 T₄ DNA 连接酶进行连接。将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中,用含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板,选择 5 个单菌落进行 PCR 扩增目的基因,并通过测序验证。将阳性重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中,并保存在加入 15% 甘油的 LB 培养基中,-80 ℃ 冻存。

用含有卡那霉素(50 μ g/mL)抗性的 LB 培养基过夜培养阳性重组菌株,以 1:100(体积比)加入到 LB 培养液中,在 37 ℃ 摇床中孵育至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.5~0.8 时,加入诱导剂 IPTG。通过单因素试验优化培养温度、IPTG 浓度(0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L)和 IPTG 诱导时间。最终培养条件为诱导时间 16 h,温度 16 ℃,诱导剂浓度 0.4 mmol/L。4 ℃,5 000 r/min 离心 30 min 收集菌体,用含有 2 mol/L 尿素和 1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,在冰浴中 260 W 超声破碎 30 min,超声开 3 s,超声关 7 s。4 ℃,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液和沉淀,然后将沉淀溶于含有 8 mol/L 尿素的 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 值为 8.0)中。通过 10% SDS-PAGE 分离胶,用 5% 浓缩胶研究目标蛋白的表达形式(可溶性表达或包涵体)。

将 8 mol/L 尿素溶解后的溶液 12 000 g、4 ℃ 离

心 10 min,取上清液。将上清液通过装有镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)进行纯化,通过优化含咪唑的尿素缓冲液梯度纯化蛋白,并采用 200 mmol/L 咪唑洗脱,得到单一条带。纯化后的 BamA 蛋白,浓度稀释到 0.5 mg/mL,装入透析袋(截断分子量为 14 000)中,低温梯度透析,用磁力搅拌器低速搅拌,透析缓冲液(0.05 mol/L PBS,8 mol/L 尿素)浓度从 8 mol/L 尿素梯度降低至不含尿素的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。蛋白浓度通过 Bradford 方法确定。蛋白质的表达和纯化通过 10% SDS-PAGE 分离胶进行验证,并通过考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白质条带,制备的重组 BamA 蛋白在 -80 ℃ 保存,待用。

1.5 多肽偶联

采用 Sulfo-SMCC 作为偶联剂,在 0.1 mol/L PBS 缓冲液中,7 mg 载体蛋白 BSA 与 2.3 mg Sulfo-SMCC 偶联,将反应的溶液移至 10 ku 超滤管中,反复超滤 3 次以去除多余的 Sulfo-SMCC。称取 7 mg 多肽于 BSA-SMCC 体系中,室温磁力搅拌 12 h,将偶联完成的溶液装入透析袋,并通过蛋白电泳表征。

1.6 动物免疫

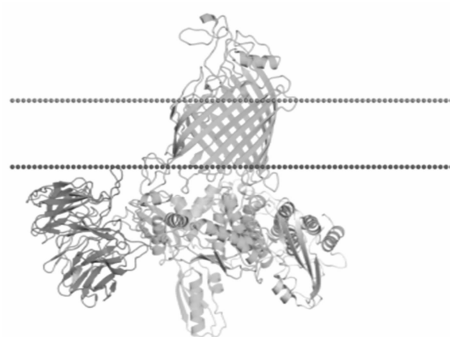
6~8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠购自扬州大学兽医学院。将纯化的 BamA 可溶蛋白与弗氏完全佐剂等体积乳化后免疫小鼠。小鼠第 1 次免疫使用的乳化剂为弗氏完全佐剂,之后的加强免疫使用的乳化剂为弗氏不完全佐剂。共免疫 4 次,首次和第 2 次免疫剂量为 80 μ g/只,第 3、第 4 次免疫剂量减半。免疫间隔时间为 3 周,免疫方式为小鼠背部皮下多点注射。第 3、第 4 次免疫后 1 周小鼠尾部采血,获得血清并于 -20 ℃ 保存。

1.7 间接 ELISA 和蛋白质印迹法(Western blot)测定血清效价及交叉反应

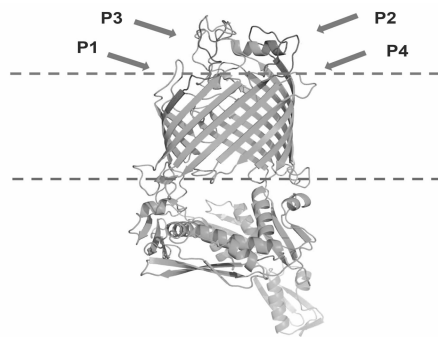
表 1 中的菌株过夜培养并计数后,在 100 ℃ 煮沸 15 min 灭活并冷却至室温。用碳酸盐缓冲液(pH 值为 9.6)将菌体浓度稀释到 10⁸ CFU/mL,每孔 100 μ L 加入到 96 孔酶标板中,37 ℃ 包被 2 h;用含 0.05% 吐温-20 的磷酸缓冲液(PBST)洗涤 3 次后,每孔加 200 μ L 含 0.2% 明胶的碳酸盐缓冲液封闭酶标板,37 ℃ 封闭 2 h;小鼠血清用抗体稀释液(PBS 缓冲液,0.1% 明胶,0.05% Tween-20)稀释 500 倍,并以 3 倍梯度稀释 6 个梯度,并用稀释液作阴性对照,每孔 100 μ L,37 ℃ 孵育 30 min;用 PBST 洗板 3 次;加入用抗稀释液 4 000 倍的辣根过氧化

物酶 (HRP) 标记羊抗鼠 IgG (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 用 PBST 洗板 4 次; 加入 100 μL 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 ~ 15 min; 50 μL 2 mol/L 硫酸溶液终止反应, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。当最高稀释度的阳性血清的 $D_{450\text{ nm}}$ 与空白对照的 $D_{450\text{ nm}}$ 之比 (P/N) ≥ 2.1 时, 该稀释度即为血清效价。

免疫印迹方法参考文献 [15 - 16]。简要步骤为将过夜培养的 50 mL 菌液离心, 弃上清, 用 15 mL PBS 缓冲液将沉淀重悬; 采用“1.2.4”节中的方法冰浴破碎; 离心取上清, 将细菌蛋白上样 10 μL 至 SDS - PAGE 电泳仪, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%; 电泳完成后用半干转膜仪 TE 70 将蛋白转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 电流为 30 mA, 转膜 30 min; 用 50 mL 含 5% 脱脂奶粉的 (PBS 缓冲液) 封闭 PVDF 膜上的多余位点, 37 $^{\circ}\text{C}$ 轻轻振荡 2 h; 加入 20 mL 血清稀释液 (稀释 1 000 倍数), 室温孵育 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每次在摇床轻轻振荡 5 min, 加入 20 mL 抗稀稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 室温避光孵育 1 h; 洗涤 5 次, TMB 显色剂显色 5 ~ 10 min, 有清晰条带出现后洗涤拍照。



a. 大肠杆菌 K12 蛋白拓扑结构



b. 副溶血性弧菌 BamA 蛋白拓扑结构

箭头指向 4 条多肽位置

图1 BamA 蛋白结构及多肽位置

通过 NCBI 中 BLAST 与副溶血性弧菌 BamA 蛋白序列进行比对, 结合 SnapGene 软件进行分析 (图 2), 最终选取出相似性在 80% 以上的连续氨基酸序列。利用 Pymol 软件, 将找出的氨基酸序列在模拟蛋白结构中标记出来, 得到 4 条保守性较高且位于膜外的表位氨基酸, 分别为 BamA - 1 (P1) YYDYSDPTNYRSS、BamA - 3 (P2) NGYGQTDGNDNLF、BamA - 4 (P3) VYRDYSGSN、BamA - 5 (P4) QADNIDSSGALNT, 位置见图 1 - b, 这些序列都是 8 ~ 13 aa 的短肽, 分子量为 1 163 ~ 1 896 u, 这些表位具有较高的保守性及较好的暴露性, 使得 BamA 蛋白具有潜在的检测价值及疫苗价值。

2 结果与分析

2.1 BamA 蛋白保守性及多肽分析

BamA 是外膜蛋白组装复合体的一部分, 它参与 β - 桶蛋白的组装及其插入外膜^[17]。BamA 是 Omp85 超级家族的成员, Omp85 超级家族是一组 16 链 β - 桶状蛋白, 参与细菌和细胞器中的膜蛋白插入和蛋白分泌反应^[18 - 19]。图 1 - a 为大肠杆菌 BamA 蛋白的结构图 (PDB: 5D00), 图 1 - b 是以大肠杆菌 K12 的 BamA 为模板模拟的副溶血性弧菌 BamA 蛋白的结构图, 从图中可知 BamA 蛋白结构具有 β - 桶状结构, 具有细胞外的无规则卷曲环区 (由上至下第 1 条虚线的上方为膜外部分), 说明蛋白具有一定的暴露性。为了进一步了解 BamA 的保守性, 选取了具有代表性的弧菌属蛋白序列与副溶血性弧菌 BamA 蛋白序列进行比对。同源性分析结果表明, BamA 蛋白在所有弧菌中广泛分布, 较保守, 序列一致性在 83% 以上, 与其他革兰氏阴性细菌的蛋白序列相似性较低, 最高相似度在 50% 以下, 说明 BamA 蛋白属内保守性较高, 具有一定的特异性。

2.2 副溶血性弧菌 BamA 蛋白的表达及多肽偶联

采用 CTAB 法从副溶血性弧菌 (CICC 21617) 中提取 DNA, 并以此为模板扩增出分子量为 2 000 ~ 3 000 bp 的基因片段 (图 3 - a), 与 BamA 基因片段长度 (2 415 bp) 一致。将其插入 pET - 28a(+) 中, 构建的重组质粒经双向测序后与 BamA 符合度为 100%, 确认构建成功。

采用不同浓度 IPTG 及诱导时间诱导 BamA 蛋白表达, 培养温度为 16 $^{\circ}\text{C}$, 将超声破碎后的上清和沉淀经 SDS - PAGE 分析。结果如图 3 - b 所示, 在 70 ~ 100 ku 出现过表达的蛋白条带, 重组质粒带有 6 个组氨酸标签, BamA 理论分子量为 89 ku, 表达的

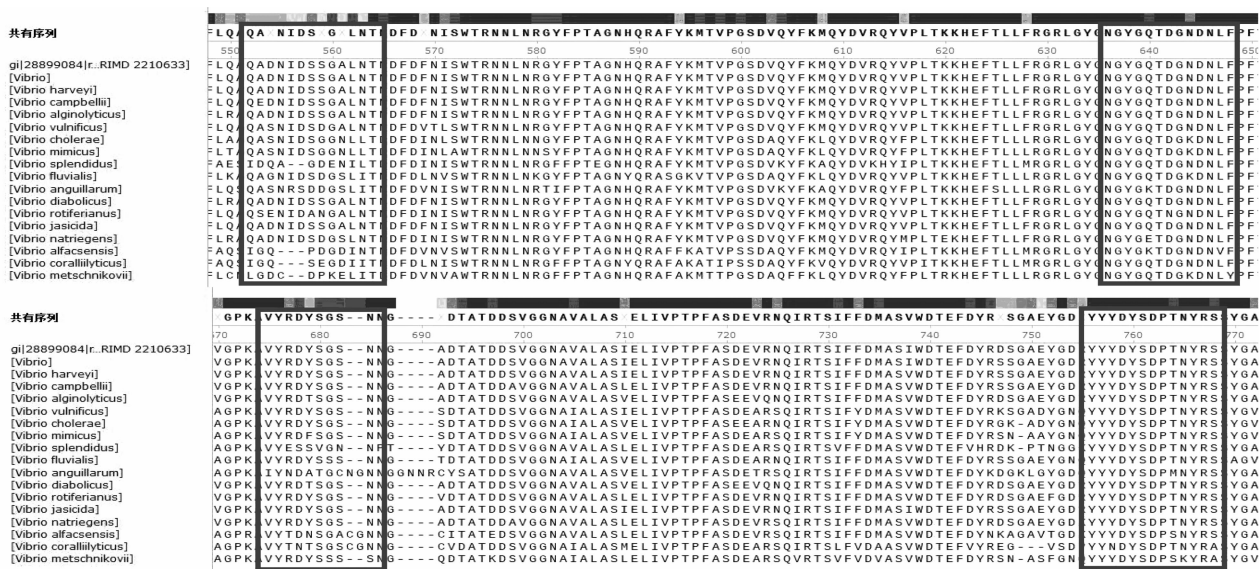


图2 BamA 蛋白序列一致性

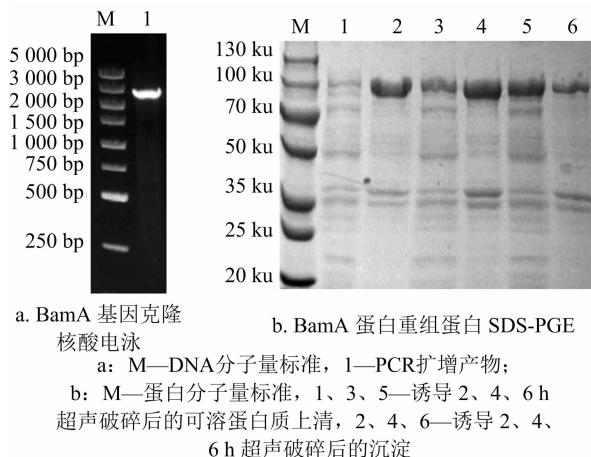


图3 BamA 基因克隆和表达结果

蛋白位置与理论值较为吻合。IPTG 浓度为 0.4 mmol/L、诱导时间为 6 h 时,可溶性蛋白表达量较高,但后期纯化时回收率较低,蛋白 BamA 最终以包涵体形式制备,诱导条件为 16 °C 培养,IPTG 浓度为 0.4 mmol/L,诱导时间为 16 h。

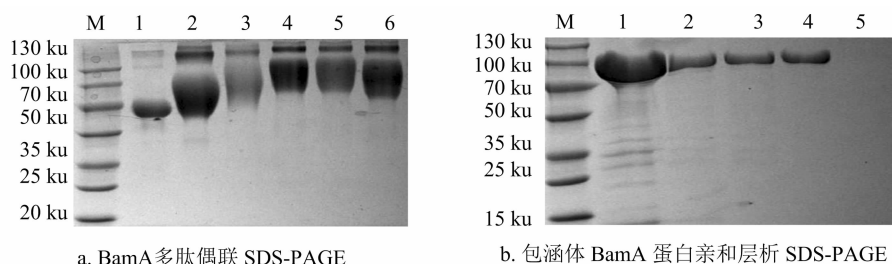
为了将多肽与载体蛋白偶联形成完全抗原,所

有多肽的 N 端均用半胱氨酸修饰。通过 SDS - PAGE 表征偶联情况,如图 4 - a 所示,BSA 蛋白条带在与 Sulfo - SMCC 连接后移至更高的位置(泳道 2),与多肽反应后蛋白条带进一步上移,说明分子量进一步增加(泳道 3 至泳道 6),多肽偶联成功。

采用 Ni - NTA 亲和层析柱纯化包涵体蛋白,对柱子的洗脱采用浓度为 8 mol/L 的尿素缓冲液,其所含咪唑浓度分别是 5、10、200、300 mmol/L。如图 4 - b 所示,在咪唑浓度为 200 mmol/L 时可以在 90 ku 左右得到清晰的单一蛋白条带。可溶性蛋白与包涵体蛋白相比具有正确的折叠结构,存在着较好的功能性^[20]。因此,对 BamA 包涵体蛋白进行纯化和尿素梯度透析复性,透析复性设置的尿素浓度梯度分别为 8.0、6.0、4.0、3.0、2.0、1.5、1.0、0.5 mol/L,随后又进行了 0.05 mol/L PBS 和 0.01 mol/L PBS 的透析,透析袋中无可见沉淀,提示复性成功。

2.3 免疫血清评价

蛋白抗原在第3次免疫后,用间接ELISA方法

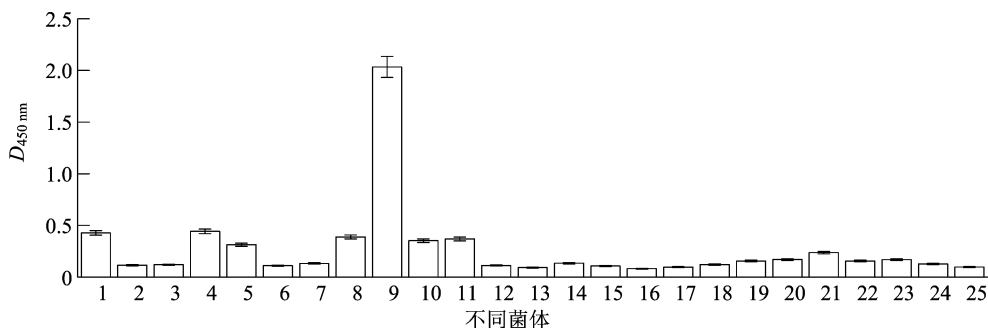


a: M—蛋白分子量标准, 1—BSA 蛋白, 2—BSA-SMCC, 3—BSA-SMCC-P1, 4—BSA-SMCC-P2, 5—BSA-SMCC-P3, 6—BSA-SMCC-P4 咪唑浓度洗脱;
b: M—蛋白分子量标准, 1—纯化前包涵体蛋白, 2、3、4、5—咪唑浓度为 5、10、200、300 mmol/L

图4 BamA 抗原制备结果

检测小鼠血清对免疫抗原的效价,结果见图 5。纵轴表示 450 nm 处吸光度,横轴表示测试菌株,血清稀释 500 倍。BamA 免疫血清对 BamA 重组蛋白的平均吸光度为 2.121,与副溶血性弧菌 CICC10552 等包板时的平均吸光度为 0.428,与哈维氏弧菌等弧菌属包板的平均吸光度为 0.345;对美人鱼发光杆菌等弧菌属外细菌的平均吸光度为 0.155。BamA 蛋白免疫血清对弧菌及其他细菌菌体效价大多仅为 0.5 K,而对 BamA 重组蛋白的效价高达 121.5 K。说明免疫过程诱导产生了 BamA 重组蛋白的抗体,但血清与菌体的识别性较弱。BamA 蛋

白多肽 P1、P2、P3、P4 免疫血清对 BamA 重组蛋白的平均吸光度为 2.058、0.625、1.222、1.184,与副溶血性弧菌包板的平均吸光度分别为 0.344、0.478、0.243、0.278,对哈维氏弧菌等弧菌属包板的平均吸光度分别为 0.302、0.361、0.213、0.232,对美人鱼发光杆菌等弧菌属外包板平均吸光度为 0.173,结果表明免疫血清与菌属外几乎无交叉反应。BamA 多肽免疫血清对 BamA 蛋白的效价为 13.5 K,而对弧菌及其他细菌菌体的效价大多为 0.5 K,表明选取的多肽位于 BamA 蛋白表面,受空间结构影响并不大,但免疫血清与菌体的识别性同样较弱。



1—CICC 21617; 2—CICC 21618; 3—CICC 21619; 4—CICC 10552; 5—CICC 21528; 6—CGMCC 1-1614; 7—CGMCC 1-1616; 8—鳗弧菌; 9—BamA蛋白; 10—哈维氏弧菌; 11—坎氏弧菌; 12—拟态弧菌; 13—解藻酸弧菌; 14—杀岩龙虾弧菌; 15—魔鬼弧菌; 16—创伤弧菌; 17—费氏另类弧菌; 18—霍氏格里蒙特氏菌; 19—非O1型霍乱弧菌; 20—美人鱼发光杆菌; 21—大肠杆菌; 22—嗜水气单胞菌; 23—无丙二酸柠檬酸杆菌; 24—迟缓爱德华氏菌; 25—阴沟肠杆菌

图5 间接 ELISA 法测 BamA 蛋白的滴度和交叉反应

为验证血清的结合蛋白和交叉反应,采用免疫印迹进行进一步分析。由图 6 可知,BamA 蛋白血清与 7 株副溶血性弧菌以及 9 株其他弧菌的全菌蛋白在 70~100 ku 出现显色条带,其中对副溶血性弧菌 CICC 21618 及非 O1 型霍乱弧菌反应较弱,识别位置与副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA (89 ku) 分子量大小一致,对弧菌属外的全菌蛋白多数不反应,只对霍氏格里蒙特氏菌有反应,但在全菌 ELISA 中

未观察到与霍氏格里蒙特氏菌有交叉反应的。免疫印迹结果说明 BamA 重组蛋白免疫血清能与大部分弧菌的 BamA 蛋白产生特异性反应,BamA 蛋白在弧菌属具有较高的保守性和特异性。

3 讨论与结论

弧菌是一种水产动物和人类共患的条件致病菌,其引起的细菌性病害给我国南美白对虾、海产

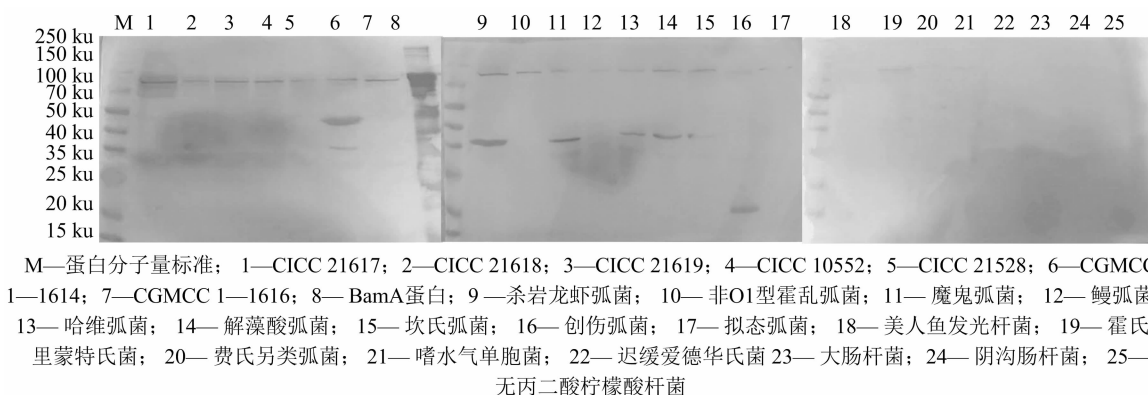


图6 BamA 免疫血清对副溶血性弧菌和其他测试菌株全菌蛋白的免疫印迹

鱼类等水产养殖业造成了较大的经济损失^[21]。细菌外膜蛋白的序列部分暴露于细胞外环境,这些膜外多肽结构不仅使外膜蛋白质具有基本的生理或病理功能,也可以诱导特定的免疫反应^[22-23]。

外膜蛋白是否可用作潜在的检测抗原和疫苗抗原应考虑多种因素,包括表面暴露、菌株间的保守性和诱导免疫反应的能力^[24-25]。 β -桶状外膜蛋白通常是跨膜或是嵌入细胞膜内,在细胞质中合成后,通过分泌系统运输到细胞膜上的 β -桶状组装系统(BAM)上,并完成组装和在细胞膜上的定位。在革兰氏阴性细菌中,BAM复合物参与细胞外膜蛋白运送和安装过程,负责将合成的外膜蛋白插入并折叠到细菌胞膜^[26-27]。BAM家族蛋白具有较好的保守性,其中BamA是该系统的核心并且在细胞外膜具有较好的暴露性,其他BamB、BamC、BamD均位于细胞外膜的膜内,BamA由嵌入外膜的C末端 β -桶和周质N末端区域组成,该区域包含多个与转运相关的表位^[28-29]。对副溶血性弧菌BamA蛋白进行基于弧菌菌株之间的保守性分析结果表明该蛋白具有较高保守性,与常见弧菌序列一致性达到83%,与属外常见菌序列一致性低于50%。

通过小鼠模型研究了弧菌副溶血性弧菌BamA重组蛋白及多肽抗原的免疫原性。BamA重组蛋白经纯化获得包涵体蛋白并成功复性,制备的BamA重组蛋白与天然蛋白具有更为接近的结构。免疫血清测试结果表明,BamA重组蛋白的抗体可与常见弧菌及其全菌蛋白发生特异性反应。免疫印迹中,重组BamA蛋白和弧菌超声破碎裂解物出现的目的条带位置相同,说明菌体与血清的抗原结合位点也为BamA蛋白。免疫血清与7种副溶血性弧菌和9种测试弧菌全菌蛋白发生不同程度的特异性结合,而与美人鱼发光杆菌、费氏另类弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、大肠杆菌、阴沟肠杆菌、无丙二酸柠檬酸杆菌没有交叉反应,仅与霍氏格里蒙特氏菌出现特异性反应条带。霍氏格里蒙特氏菌是弧菌科中的一种致病菌,2003年前分类属于弧菌属,名为霍利斯弧菌(*V. hollisae*),可引起人类肠胃炎^[30]。因此,与该菌蛋白的反应主要由于较近的亲缘关系。值得一提的是,本试验采用的弧菌属菌株较为广泛,且具有代表性,包含了对人类具有致病性的霍乱弧菌、溶藻弧菌、拟态弧菌,及对水生物具有致病性的鳃弧菌和哈维氏弧菌^[31]。

ELISA和免疫印迹的结果表明,BamA蛋白和

多肽免疫血清对BamA蛋白具有较强的结合,但与不同副溶血性弧菌菌体的结合均较弱。免疫印迹是菌体破碎后的蛋白与免疫血清直接反应,而ELISA则是用菌体包板,ELISA中菌体与外膜蛋白BamA免疫血清结合较差提示抗原抗体的结合可能受到了菌体表面其他抗原的影响。革兰氏阴性菌表面存在有荚膜和脂多糖(LPS)等抗原,其中荚膜是副溶血性弧菌等弧菌主要的表面抗原,细菌荚膜长度为0.2~0.5 μm ,可以掩盖抗体与菌体外膜蛋白的结合,抵抗宿主免疫系统的杀伤^[32-33]。Vij等研究发现,采用菌体免疫结合重组BamA蛋白加强免疫的方法制备了81个大肠杆菌BamA单克隆抗体,其中7个抗体可以对大肠杆菌K12(缺失核心多糖)和LPS核心多糖突变株(ΔwaaD)有90%以上的抑制生长率,证明了BamA为大肠杆菌的外膜蛋白并具有中和性抗原表位,但正常大肠杆菌完整的LPS结构限制了抗体与BamA的接触而不被BamA抗体识别^[34]。后续研究可通过设计突变菌株研究免疫血清与副溶血性弧菌的结合,验证是否存在荚膜、脂多糖等表面抗原的影响^[35]。这也提示筛选外膜蛋白作为诊断抗原和疫苗抗原,除了应位于外膜,具有一定保守性、特异性,还应该考虑其在其他抗原影响下的表面暴露性。

综上,本研究首次报道了副溶血性弧菌外膜蛋白BamA重组质粒的构建、重组蛋白的表达纯化、多肽的筛选和偶联,以及BamA抗原在小鼠中的免疫原性。ELISA和免疫印迹的结果表明,免疫血清与弧菌属菌体蛋白存在交叉反应,与迟缓爱德华氏菌等弧菌属外细菌蛋白无交叉反应,血清与弧菌菌体的结合效价较低,可能与弧菌表面荚膜等其他表面抗原的影响有关。该研究证明了弧菌BamA具有弧菌属保守性和良好的特异性,但表面可暴露性可能较为有限,这为后续验证研究指明了方向,也为弧菌属免疫检测抗原和疫苗抗原开发提供了新的影响因素和研究思路。

参考文献:

- [1] Hackbusch S, Wichels A, Gimenez L, et al. Potentially human pathogenic *Vibrio* spp. in a coastal transect: occurrence and multiple virulence factors [J]. Science of the Total Environment, 2020, 707:136113.
- [2] Bonnin - Jusserand M, Copin S, Le Bris C, et al. *Vibrio* species involved in seafood - borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): review of microbiological versus

- recent molecular detection methods in seafood products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2019,59(4):597–610.
- [3] Elmahdi S, DaSilva L V, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries; a review [J]. Food Microbiology, 2016, 57: 128–134.
- [4] Hartnell R E, Stockley L, Keay W, et al. A pan – European ring trial to validate an international standard for detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafoods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 288: 58–65.
- [5] 谢庆超, 张红敏, 刘海泉, 等. 几种常见生食水产品中生物危害与化学危害测定分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2020, 10(1): 52–59.
- [6] Baker – Austin C, Oliver J D, Alam M, et al. *Vibrio* spp. infections [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 1–19.
- [7] Pore D, Chakrabarti M K. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a; a promising subunit vaccine candidate [J]. Vaccine, 2013, 31(36): 3644–3650.
- [8] 伦镜盛, 张设熙, 董亚萍, 等. 弧菌外膜蛋白 OmpU 的免疫交叉反应性和交叉保护性[J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 867–879.
- [9] Gao Z C, Ye C, Zhou L T, et al. Evaluation of the β – barrel outer membrane protein VP1243 as a candidate antigen for a cross – protective vaccine against *Vibrio* infections [J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104419.
- [10] Li H, Peng B, Xu C X, et al. Immunoproteomic identification of polyvalent vaccine candidates from *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins[J]. Amer Chemical SOC, 2010, 9(5): 2573–2583.
- [11] Han L, Zheng J G, Wang Y, et al. Structure of the BAM complex and its implications for biogenesis of outer – membrane proteins[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2016, 23(3): 192–196.
- [12] Gu Y H, Li H Y, Dong H H, et al. Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex [J]. Nature, 2016, 531(7592): 64–69.
- [13] Yang J Y, Yan R X, Roy A, et al. The I – TASSER suite: protein structure and function prediction [J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 7–8.
- [14] Yonekita T, Morishita N, Arakawa E, et al. Development of a monoclonal antibody for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* and analysis of its antigen[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 173: 105919.
- [15] Wang W, Sang Y, Liu J, et al. Identification of novel monoclonal antibodies targeting the outer membrane protein C and lipopolysaccharides for *Escherichia coli* O157: H7 detection [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(4): 1245–1258.
- [16] 高云山, 刘丹丹, 徐俊林, 等. 嗜水气单胞菌孔蛋白 OmpF 重组表达及其免疫原性分析[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 234–243.
- [17] Noinaj N, Kuszak A J, Balusek C, et al. Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function[J]. Structure, 2014, 22(7): 1055–1062.
- [18] Baud C, Guérin J, Petit E, et al. Translocation path of a substrate protein through its Omp85 transporter[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5271.
- [19] Höhr A I C, Lindau C, Wirth C, et al. Membrane protein insertion through a mitochondrial β – barrel gate [J]. Science, 2018, 359(6373): 289.
- [20] Martínez – Alonso M, González – Montalbán N, García – Fruitós E, et al. Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 4.
- [21] 高 杨. 南美白对虾致病性弧菌的鉴定及药敏分析[J]. 河北渔业, 2019(2): 18–20.
- [22] Baliga P, Shekar M, Venugopal M N. Potential outer membrane protein candidates for vaccine development against the pathogen *Vibrio anguillarum*: a reverse vaccinology based identification[J]. Current Microbiology, 2018, 75(3): 368–377.
- [23] 王亚磊, 王 权, 白雪瑞, 等. 副溶血弧菌 SH112 株 OmpA 蛋白的高效表达及免疫学特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 1937–1947.
- [24] 姜倩雯, 张丽珊, 李小艳, 等. 单壁碳纳米管载嗜水气单胞菌外膜蛋白亚单位疫苗的研制及免疫效果评价[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1424–1434.
- [25] 易 洁, 刘 青, 孔庆科. 革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 911–921.
- [26] Noinaj N, Fairman J W, Buchanan S K. The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 407(2): 248–260.
- [27] Kim S, Malinverni J C, Sliz P, et al. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine[J]. Science, 2007, 317(5840): 961–964.
- [28] 代先祝, 罗 峰. 革兰氏阴性细菌 β – 桶状结构外膜蛋白折叠与组装的研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 261–268.
- [29] Luthra A, Anand A, Hawley K L, et al. A homology model reveals novel structural features and an immunodominant surface loop/opsonic target in the *Treponema pallidum* BamA ortholog TP0326 [J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(11): 1906–1920.
- [30] Hineostroza F, Madeira R G, Bourbeau P P. Severe gastroenteritis and hypovolemic shock caused by *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* infection [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10): 3462–3463.
- [31] 陈 静, 祁 露, 郑雅露, 等. 致病性弧菌及其噬菌体防治研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9288–9294.
- [32] Klemm P, Vejborg R M, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(2): 451–459.
- [33] Wessels M R. Cell wall and surface molecules: capsule [M]// Ferretti J J, Stevens D L, Fischetti V A. Streptococcus pyogenes: basic biology to clinical manifestations. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
- [34] Vij R, Lin Z H, Chiang N, et al. A targeted boost – and – sort immunization strategy using *Escherichia coli* BamA identifies rare growth inhibitory antibodies[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 7136.
- [35] Wang W B, Liu J X, Guo S S, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. specific outer membrane proteins by reverse vaccinology and surface proteome [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 625315.