

文章编号: 1674-7054(2020)02-0145-11

鱼类神经坏死病毒衣壳蛋白 MCP 和鮡爱德华氏菌外膜蛋白 ompN1 融合基因的原核表达

张转丹, 肖正泮, 武新丽, 孙 艳, 罗 应, 吴 昊,

韦双双, 裴业春, 王大勇

(海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228)

摘要: 目前在针对鱼类神经坏死病毒的疫苗研究中, 主要是将神经坏死病毒某些蛋白作为抗原进行注射免疫, 但是传统的注射免疫并不能有效地激发黏膜免疫。笔者将鱼类神经坏死病毒的衣壳蛋白(MCP)与鮡爱德华氏菌的跨粘膜蛋白 ompN1 融合表达, 拟制备能够抵抗神经坏死病毒的粘膜炎疫苗; 利用从 NCBI GenBank 库里获得的鱼类神经坏死病毒的外壳蛋白 MCP 和鮡爱德华氏菌的外膜蛋白 ompN1 的基因序列, 将两者进行序列优化与全基因合成, 分别构建原核表达载体: MCP-ompN1 pET28a 和 MCP pET28a 和 ompN1 pET28a, 并在大肠杆菌内分别诱导表达融合蛋白 MCP-ompN1, MCP, ompN1 后, 再利用包涵体纯化及透析复性获得 MCP-ompN1, MCP, ompN1 蛋白。SDS-PAGE 结果显示, 原核表达纯化得到了较纯的 MCP-ompN1 融合蛋白, Western Blotting 结果表明, 纯化得到的 MCP-ompN1 融合蛋白不仅具有 MCP 抗原性, 还具有 ompN1 抗原性。本实验通过原核表达纯化得到了鱼类神经坏死病毒衣壳蛋白 MCP 和鮡爱德华氏菌外膜蛋白 ompN1 的融合蛋白 MCP-ompN1, 为进一步验证融合蛋白 MCP-ompN1 能否作为抵抗神经坏死病毒的粘膜炎疫苗奠定了基础。

关键词: 病毒性神经坏死病; 鮡爱德华氏菌; 融合蛋白; 包涵体

中图分类号: Q 786; Q 943

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2020.02.004

病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, VNN)是一种传染病, 其病原体为神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV), 该病可引起鱼类病毒性神经坏死, 是我国鱼类养殖中危害极大的病毒性疾病之一, 特别是在我国东南沿海地区较常见。据报道, 30 多种海鱼在苗期和培养过程中, 曾受到 VNN 的影响^[1-2], 其对石斑鱼仔鱼和幼鱼, 会造成很高的死亡率, 给海洋鱼类养殖造成较大的经济损失^[3-4]。国际兽疫组织(OIE)将该病列为重要的鱼类病害。目前, 石斑鱼养殖产业针对该病毒的防疫主要在两方面, 一方面是注意在鱼卵、用具、水、饵料生物的消毒。比如用 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 残存臭氧的海水来清洗鱼卵, 场所的再次清洁、干燥及消毒, 可提供有效的保护, 但是这些措施只能在一定程度上减少感染; 另一方面是制备疫苗, 对石斑鱼进行免疫接种^[5]。对石斑鱼注射病毒性神经坏死病的抗原(MCP)进行免疫接种^[6-9]的方法存在成本高、工作量大、不适合对较小幼鱼注射等局限^[10], 为此该方法不适合在石斑鱼产业中广泛应用。目前通过肌肉内或腹膜内注射的几种类型 NNV 疫苗已经开发并应用, 包括重组衣壳蛋白^[11], 病毒样颗粒^[12-13] 和灭活病毒体^[14-15], 但注射免疫的方式并不能有效激起鱼的黏膜免疫, 且免疫过程费时、费力、费用昂贵。因此, 针对目前注射免疫接种方法的局限, 笔者将神经坏死病毒的衣壳蛋白(MCP)和鮡爱

收稿日期: 2020-02-28

修回日期: 2020-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31760246); 国家自然科学基金资助项目(31860726)

第一作者: 张转丹(1992-), 女, 海南大学生命科学与药学院 2016 级硕士研究生. E-mail: 728971926@qq.com

通信作者: 裴业春(1985-), 男, 博士, 硕士生导师. 研究方向: 生物技术与分子药理学. E-mail: ycepei@hainanu.edu.cn; 王大勇(1972-), 男, 博士, 教授, 博导. 研究方向: 生物技术与分子药理学. E-mail: wangdy@hainanu.edu.cn

德华氏菌的外膜蛋白 N1(ompN1)进行融合表达,拟利用融合抗原 MCP-ompN1 制备粘膜疫苗,该粘膜免疫疫苗可通过口服和浸泡的方式使石斑鱼的幼鱼达到免疫和更早保护的目的,同时还可以大批量免疫从而降低免疫成本。

1 材料与方法

1.1 基因序列 OmpN1 基因序列(GenBank: NC_012779, protein ID: WP_015870209.1)和 MCP 基因序列(GenBank: AF534998.3)。MCP 连接在 ompN1 的 N 端,中间用柔性氨基酸链 GGGS 连接,该重组基因序列 MCP-ompN1 经海南大学生命科学与药学院生物技术与分子药理实验室优化后,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 菌株、载体和试剂 大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PET28a 原核表达载体和 pMD19-T(sample) 克隆载体均由海南大学生命科学与药学院生物技术与分子药理实验室保存;胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;BamH I 和 Sal I 限制性内切酶均购自 New England Biolabs 公司;透析袋购自 Solarbio 公司(货号:YA1072);氢氧化铝凝胶为本实验室自制;不完全佐剂和完全佐剂购自 sigma 公司。

1.3 BALB/c 小鼠 BALB/c 小鼠雌性,6~8 周龄,体质量约 20 g,购自广东省医学实验动物中心。

1.4 构建 MCP-ompN1 pET-28a 原核表达重组质粒 将优化合成的 MCP-ompN1 融合基因利用 BamH I 和 Sal I 双酶切后回收,连接至经 BamH I 和 Sal I 双酶切回收的 PET-28a 载体上,构建 MCP-ompN1 pET-28a 原核表达重组质粒。

1.5 构建 MCP pET-28a 原核表达质粒 根据已经进行密码子优化后的 MCP 基因序列以及 pET-28a 表达载体上的 BamH I 和 Sal I 酶切位点,设计 1 对含有酶切位点的特异性引物。上游引物为 F1: 5'-CGCGGATCCATGGTTCGTAAAGGTGAAAAAAAC-3';下游引物为 R1: 5'-ACGCGTTCGACTTATTAGTTTCAGAGTCAACACGGGTGCAA-3';其中引物 F1 下划线表示的是 BamH I 酶切位点,引物 F2 下划线表示的是 Sal I 酶切位点。以 MCP-ompN1 重组基因序列作为模板,扩增出目的基因 MCP,其片段大小和预期的一致为 1 017 bp。将扩增并回收的目的基因 MCP 连接到 pMD19-T(simple) 克隆载体中,连接产物转化至感受态细胞 DH5 α 后,依次通过菌落 PCR 鉴定,质粒 PCR 鉴定,双酶切鉴定和最后的测序确定 MCP pMD19-T 重组质粒构建成功。重组克隆质粒 MCP pMD19-T(simple) 和表达质粒 pET28a 进行 BamH I 和 Sal I 的双酶切,再通过胶回收试剂盒从 MCP pMD19-T(simple) 酶切产物中得到目的基因 MCP,与 BamH I 和 Sal I 双酶切后 pET28a 连接,最终完成原核表达质粒 MCP pET28a 的构建。

1.6 构建 ompN1 pET-28a 原核表达质粒 同样根据已经进行密码子优化后的鮎爱德华氏菌外膜蛋白 OmpN1 基因序列,设计含有酶切位点的上下游引物来扩增 OmpN1 的基因序列,上游酶切位点为 BamH I,引物的序列为 F2: 5'-CGCGGATCCGCTGAAATCTACAACAAAACG-3';下游酶切位点为 Sal I,引物的序列为 R2: 5'-ACGCGTTCGACTTATTAGAAAGTTGTACTGG -3'。其中,限制性内切酶位点用下划线表示。以 MCP-ompN1 重组基因序列作为模板,扩增出目的基因 OmpN1,其片段大小和预期的一致为 1 146 bp。将扩增并回收的目的基因 OmpN1 连接到 pMD19-T(simple) 克隆载体中,连接产物转化至感受态细胞 DH5 α 后,同样通过菌落 PCR 鉴定,质粒 PCR 鉴定,双酶切鉴定和最后的测序确定 ompN1 pMD19-T 重组质粒构建成功。

重组克隆质粒 ompN1 pMD19-T(simple) 和表达质粒 pET28a 均进行 BamH I 和 Sal I 双酶切,将酶切产物 OmpN1 片段通过胶回收试剂盒进行回收,与双酶切后的表达载体 pET28a 连接,完成原核表达质粒 ompN1 pET-28a 的构建。

1.7 IPTG 浓度梯度分别诱导融合蛋白 MCP-ompN1, ompN1 及 MCP 蛋白 将原核表达质粒 MCP-ompN1

pET28a, MCP pET28a, ompN1 pET28a, 分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 挑取单菌落至 10 mL 含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养箱中振荡过夜。次日, 按体积比为 1 : 100 转接培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 。取出 1 mL 菌液作为非诱导对照。然后将剩下的菌液分别取 1 mL 至 EP 管中, 每个蛋白共 8 管。设置不同 IPTG 浓度诱导实验。IPTG 的浓度设置为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹, 37 °C 诱导 4 h, 收集等量菌体, SDS-PAGE 蛋白电泳检测, 确定每个蛋白所需的最适合 IPTG 诱导浓度。

1.8 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白的可溶性表达检测 将每个重组蛋白用其最适的 IPTG 诱导浓度进行诱导表达, 对诱导表达后的菌液进行离心并收集菌体, 反复冻融后进行超声波破碎, 离心后用上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。其中, 沉淀用含 2 mol·L⁻¹ 尿素和 2 mol·L⁻¹ 盐酸胍的洗涤液洗涤, 洗涤后 8 000 r·min⁻¹, 10 min 离心弃上清收集沉淀, 连续洗涤 3 次, 然后用含 8 mol·L⁻¹ 尿素缓冲液溶解沉淀, 至沉淀完全溶解为止。将溶解液 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃沉淀取上清。

1.9 包涵体的纯化及复性 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白均在包涵体中表达, 所以要进行包涵体的复性及纯化, 具体的步骤如下。

(1) 包涵体的纯化大量诱导表达的菌液以 6 000 ~ 8 000 r·min⁻¹, 4 °C, 离心 15 min, 弃上清; 用 9 倍体积的菌体破碎缓冲液 I 振荡重悬菌体, 并用超声破碎仪在冰浴条件下超声破碎。超声破碎条件: 功率 40 %, 工作 5 s, 暂停 3 s, 破碎 15 min, 8 000 r·min⁻¹ (50 mL 离心管转速, 以下同) 离心 15 min。将离心收集的包涵体依次用 PBS 缓冲液、缓冲液 II、缓冲液 III 进行包涵体沉淀的洗涤, 最终放置 10 min。4 °C, 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 收集沉淀。然后按照每克初始湿菌体加 100 μL 包涵体溶解缓冲液 I, 重悬包涵体, 缓慢振荡 1 h。4 °C, 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集上清。

(2) 蛋白质透析将蛋白浓度调整至 0.1 ~ 1.0 g·L⁻¹, 装入透析袋中, 放置于复性缓冲液 I 进行梯度透析复性。梯度透析复性步骤: 1) 在含 6 mol·L⁻¹ 脲素的复性缓冲液 I 中, 4 °C 缓慢透析 6 h; 2) 在含 4 mol·L⁻¹ 脲素的复性缓冲液 I 中, 4 °C 缓慢透析 6 h; 3) 在含 2 mol·L⁻¹ 脲素的复性缓冲液 I 中, 4 °C 缓慢透析 6 h; 4) 将已经依次进行 6, 4, 2 mol·L⁻¹ 脲素梯度透析复性的蛋白溶液置于磷酸盐 (PBS) 缓冲液中透析过夜, 然后 SDS-PAGE 检测蛋白纯度。复性后的蛋白进行镍 (Ni) 柱纯化, 得出复性及纯化后的蛋白 MCP-ompN1, MCP 及 ompN1, 最后用超滤管进行蛋白浓缩得到最适浓度, 对蛋白进行 -80 °C 保存。

表 1 缓冲液的配方

Tab. 1 Formulae of buffers

| 缓冲液 Buffer | 配方 Formula |
|-----------------|--|
| 菌体破碎缓冲液 I | 50 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L ⁻¹ EDTA, 100 mmol·L ⁻¹ NaCl, 1% TritonX-100, pH8.5 |
| PBS 缓冲液 | 8.0 g NaCl, 28.65 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 0.234 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (1 L) pH8.5 |
| 缓冲液 II | 50 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L ⁻¹ EDTA, 100 mmol·L ⁻¹ NaCl, 1% TritonX-100, 2 mol·L ⁻¹ 脲素, pH8.5) |
| 缓冲液 III | 50 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L ⁻¹ EDTA, 100 mmol·L ⁻¹ NaCl, 1% TritonX-100, 2 mol·L ⁻¹ 盐酸胍, pH8.5 |
| 包涵体溶解缓冲液 I | 50 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L ⁻¹ EDTA, 100 mmol·L ⁻¹ NaCl, 10 mmol·L ⁻¹ DTT, 2 mmol·L ⁻¹ 脱氧胆酸钠, 8 mol·L ⁻¹ 脲素, pH8.5 |
| 复性缓冲液 I | (50 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol·L ⁻¹ NaCl, 6 mol·L ⁻¹ /4 mol·L ⁻¹ /2 mol·L ⁻¹ 脲素, 1% 甘氨酸, 5% 甘油, 0.2% PEG (相对分子量 3 550), 1 mmol·L ⁻¹ 氧化型谷胱甘肽, 1 mmol·L ⁻¹ 还原型谷胱甘肽, pH8.5 |
| Blocking buffer | 10 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4, 104 mmol·L ⁻¹ NaCl; 25 mmol·L ⁻¹ NaF, 8 mmol·L ⁻¹ NaN ₃ , 0.1% Tween 20 |

1.10 免疫小鼠及抗血清的制备 取 BALB/c 小鼠 9 只, 其中 3 只注射 PBS 作为对照。3 只注射纯化后 ompN1 蛋白制备成的抗原, 另 3 只注射纯化后 MCP 蛋白制备成的抗原。注射前从眼角取 0.5 mL 血液制备血清, 留作对照。免疫方式采用皮下多点注射方式进行, 免疫剂量为 1 g·L⁻¹ 抗原; 在首次免疫 7 d 后进行第 2 次免疫, 以后每隔 7 d 免疫 1 次, 共免疫 4 次。每次免疫前一天对小鼠进行眼角采血, 将采到的血

样 4 ℃ 下放置过夜,在血块收缩后,4 ℃ 下 $1\ 200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离出血清部分,进行后续的检测。

1.11 Western-blotting 检测抗血清的特异性 将纯化后的 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后将胶条割至合适大小,用转膜缓冲液平衡。预先裁好与胶条同样大小的滤纸和 NC 膜,浸入转膜缓冲液中 10 min。转膜装置从下至上依次按阳极碳板、24 层滤纸、NC 膜、凝胶、24 层滤纸、阴极碳板的顺序放好,滤纸、凝胶、NC 膜精确对齐,每一步去除气泡,用玻璃棒来回滚动,将碳板上多余的液体吸干。接通电源,恒压 25 V,转移 1.5 h。转移结束后,断开电源将膜取出,割取待测膜条做免疫印迹。用 $1\times\text{TBST}$ 洗膜,5 min \times 3 次,加入封闭液(1x Blocking buffer(表 1)加入 5% 脱脂奶粉),平稳摇动,室温 2 h。弃封闭液,用 $1\times\text{TBST}$ 洗膜,15 min \times 5 次。孵血清一抗(按体积比 1 : 2 000 封闭液稀释,液体必须覆盖膜的全部),4 ℃ 下放置过夜。弃一抗,用 $1\times\text{TBST}$ 洗膜,15 min \times 5 次,加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(按体积比 1 : 5 000 用封闭液稀释),避光放置 2 h。弃二抗,用 $1\times\text{TBST}$ 洗膜,15 min \times 5 次。最后通过 Western-blot 进行分析。

2 结果与分析

2.1 MCP-ompN1 pET-28a 重组原核表达载体的构建 MCP-ompN1 pET-28a 重组表达载体由 BamH I 和 Sal I 进行双酶切,其中双酶切体系为 10 μL : MCP-ompN1 pET-28a 重组质粒 3 μL , BamH I 和 Sal I 各 0.5 μL , $10\times\text{NEB Buffer}$ 1 μL , ddH₂O 5 μL , 37 ℃ 水浴锅反应 4 h,将酶切产物进行琼脂糖电泳凝胶检测,实验结果显示,载体经过双酶切得到两条带(图 1),一条分别是酶切后的空载体,另一条是目的条带 MCP-OmpN1,其条带大小位于 2 000 ~ 3 000 bp 之间。将产物胶回收测序,测序结果与预期大小一致,为 2 217 bp,且测序正确,这表明原核表达 MCP-ompN1 pET-28a 重组表载体构建成功。

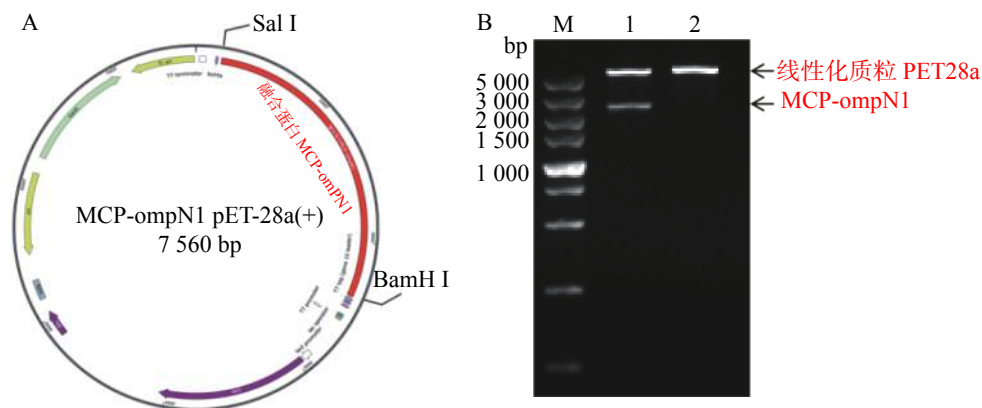


图 1 MCP-ompN1 pET-28a 重组质粒图谱及酶切验证

A. MCP-ompN1 pET-28a 重组质粒图谱; B. MCP-ompN1 pET-28a 重组质粒由 BamH I 和 Sal I 双酶切鉴定; M: DL 5 000 bp DNA marker; 1: MCP-ompN1 pET-28a 重组质粒被 BamH I 和 Sal I 双酶切后得到线性化空质粒 PET28a 和目的片段 MCP-ompN1; 2: 线性化空质粒 PET28a 对照。

Fig. 1 MCP-ompN1 pET-28a recombinant plasmid map and digestion verification

A. MCP-ompN1 pET-28a recombinant plasmid map; B. MCP-ompN1 pET-28a recombinant plasmid was identified by BamH I and Sal I double digestion; M: DNA marker DL 5 000; 1: MCP-ompN1 pET-28a recombinant plasmid was double digested with BamH I and Sal I to produce a linearized empty plasmid PET28a and a target fragment MCP-ompN1; 2: A linearized empty plasmid PET28a control.

2.2 ompN1 pET-28a 原核表达载体的构建 ompN1pET-28a 表达质粒由 BamH I 和 Sal I 进行双酶切,将酶切产物用 0.9% 凝胶电泳检测,实验结果显示 ompN1 目标条带位于 1 000 ~ 1 500 bp 之间,并且与阳性对照 ompN1 基因(1 146 bp)的条带位于同一位置(图 2)。将双酶切产物电泳后进行胶回收,回收产物进行测序。测序序列与原始序列比对后结果显示两者的相似度为 100%,证明原核表达 ompN1 pET-28a 表载体构建成功。

2.3 MCP pET-28a 原核表达载体的构建 将构建好的 MCP pET-28a 表达质粒分别由 BamH I 和 Sal I 进

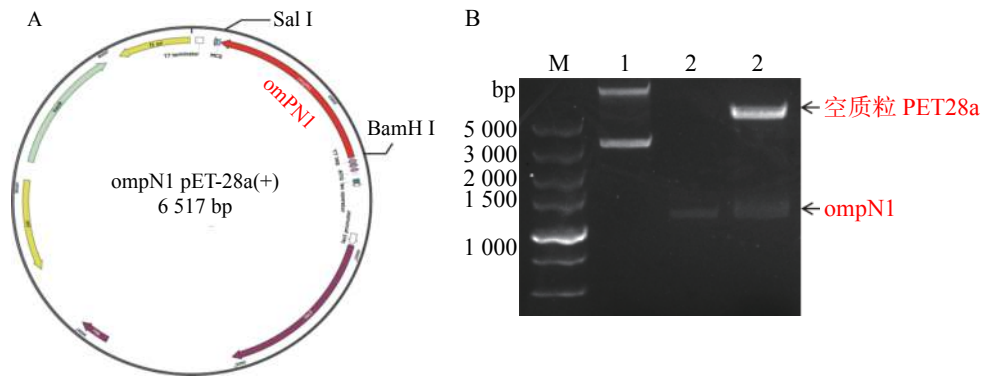


图 2 ompN1 pET-28a 重组质粒图谱及酶切验证

A. ompN1 pET-28a 重组质粒图谱; B. ompN1 pET-28a 质粒由 BamH I 和 Sal I 双酶切鉴定; M: DL 5 000 bp DNA marker; 1: 环状空质粒 PET28a 对照; 2: ompN1 阳性对照; 3: ompN1 pET-28a 重组质粒由 BamH I 和 Sal I 双酶切后得到线性化空质粒 PET28a 和目的片段 ompN1。

Fig. 2 Map of ompN1 pET-28a recombinant plasmid and enzyme digestion verification

A. The ompN1 pET-28a recombinant plasmid map; B. The ompN1 pET-28a plasmid was identified by double digestion with BamH I and Sal I; M: DNA marker DL 5 000; 1: Circular empty plasmid PET28a control; 2: ompN1 positive control; 3: The ompN1 pET-28a recombinant plasmid was double digested with BamH I and Sal I to produce a linearized empty plasmid PET28a and a target fragment ompN1.

行双酶切, 双酶切产物经凝胶电泳检测显示, 酶切产物出现 2 条带, 其中最小的 1 条带位于 1 000 bp 附近, 与 MCP 基因片段 (1 017 bp) 大小一致 (图 3 所示)。预测最大的条带为 PET28a 线性化空质粒, 最小条带为目的条带, 为了确认预测结果正确, 将最小的条带进行胶回收后测序, 测序结果比对后确认原核表达 MCP pET-28a 表载体构建成功。

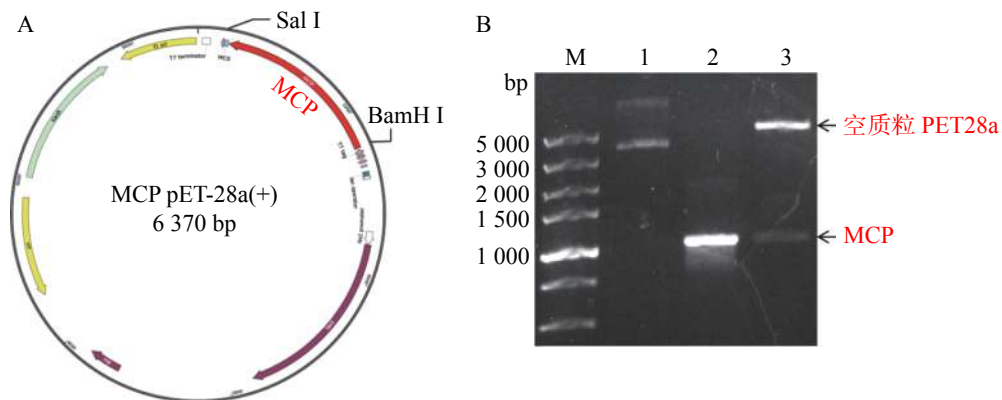


图 3 MCP pET-28 重组质粒图谱及酶切验证

A. MCP pET-28 重组质粒图谱; B. MCP pET-28 重组质粒由 BamH I 和 Sal I 双酶切鉴定; M: DL 5 000 bp DNA marker; 1: 环状空质粒 PET28a 对照; 2: MCP 阳性对照; 3: MCP pET-28a 重组质粒被 BamH I 和 Sal I 双酶切后得到线性化空质粒 PET28a 和目的片段 MCP。

Fig. 3 MCP PET28a recombinant plasmid map and enzyme digestion verification

A. MCP pET-28 recombinant plasmid map; B. MCP pET-28 recombinant plasmid was identified by BamH I and Sal I double digestion; M: DNA marker DL 5 000; 1: Circular empty plasmid PET28a control; 2: MCP positive control; 3: The MCP pET-28a recombinant plasmid was digested with BamH I and Sal I to produce a linearized empty plasmid PET28a and a target fragment MCP.

2.4 MCP-OmpN1/ompN1/MCP 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 分析 将构建好的 MCP-ompN1 pET-28a, MCP pET-28a 及 ompN1 pET-28a 表达质粒分别转化至 BL21(DE3)感受态细胞后, 小量梯度诱导表达检测其最适的 IPTG 浓度及蛋白是否为可溶性表达, 然后再根据相应的最适诱导浓度进行大量诱导表达制备和纯化蛋白。

2.5 MCP-ompN1 pET-28a 原核表达载体的梯度诱导表达 MCP-ompN1 pET-28a 重组表达载体转化至 BL21(DE3)感受态细胞后,用 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度梯度,其中以未加 IPTG 诱导的菌液作为对照,37 °C 诱导 4 h,收集等量菌体,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。实验结果显示每个 IPTG 浓度均在约 85 kDa 位置处有蛋白表达(图 4),这与预期的 MCP-ompN1 融合蛋白(82 kDa)大小基本一致,其中第 1 泳道为未加 IPTG 浓度的对照组,第 2 泳道 0.1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度诱导蛋白表达最明显,说明 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 是 MCP-ompN1 融合蛋白最适表达浓度。

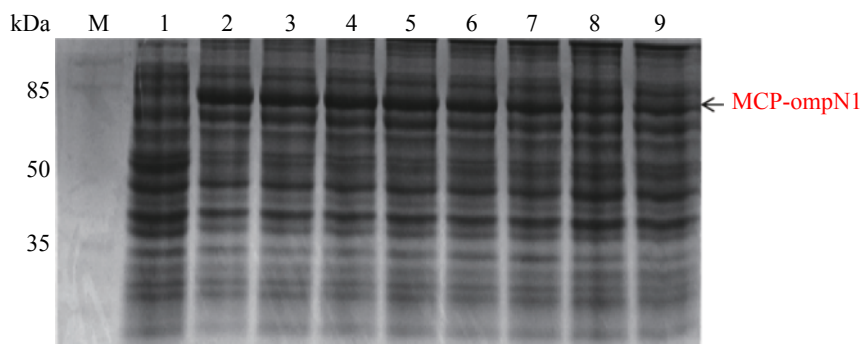


图 4 MCP-ompN1 PET28a 重组表达载体的梯度诱导

M: 120 kDa Protein Marker; 1:未加 IPTG 对照组; 2-9: 分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度。

Fig. 4 MCP-ompN1 PET28a recombinant expression vector gradient induction

M: 120 kDa Protein Marker; 1: Control group without IPTG; 2-9: IPTG at the concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹, respectively.

2.6 ompN1 pET-28a 原核表达载体的梯度诱导表达 ompN1 pET-28a 表达载体转化至 BL21(DE3)感受态细胞后,同样用 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度梯度,其中以未加 IPTG 诱导的菌液作为对照,37 °C 诱导 4 h,收集等量菌体,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。实验结果显示每个 IPTG 浓度均在约 45 kDa 位置处有蛋白表达(图 5),这与预期的 ompN1 蛋白(44.5 kDa)大小一致,其中第 1 泳道为未加 IPTG 浓度的对照组,第 3 泳道 0.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度诱导蛋白表达最明显,说明 0.2 mmol·L⁻¹ IPTG 是 ompN1 蛋白最适表达浓度。

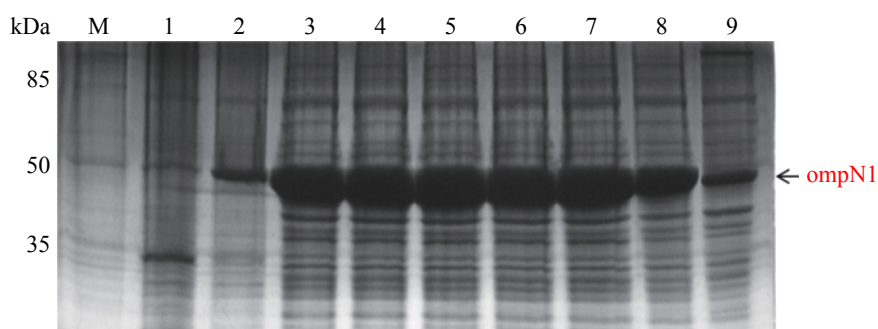


图 5 ompN1 pET-28a 表达载体的梯度诱导

M: 120 kDa Protein Marker; 1: 未加 IPTG 对照组; 2-9: 分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度。

Fig. 5 Gradient induction of ompN1 pET-28a expression vector

M: 120 kDa Protein Marker; 1: Control group without IPTG; 2-9: IPTG at the concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹, respectively.

2.7 MCP pET-28a 原核表达载体的梯度诱导表达 MCP pET-28a 表达载体转化至 BL21(DE3)感受态细胞后,同样用 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度梯度,其中以未加 IPTG 诱导的菌液作为对照,37 °C 诱导 4 h,收集等量菌体,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。实验结果显示每个 IPTG 浓度均在约 45 kDa 位置处有蛋白表达(图 6),即为 MCP 基因和 PET28a 载体起始密码子和多克隆位点间的

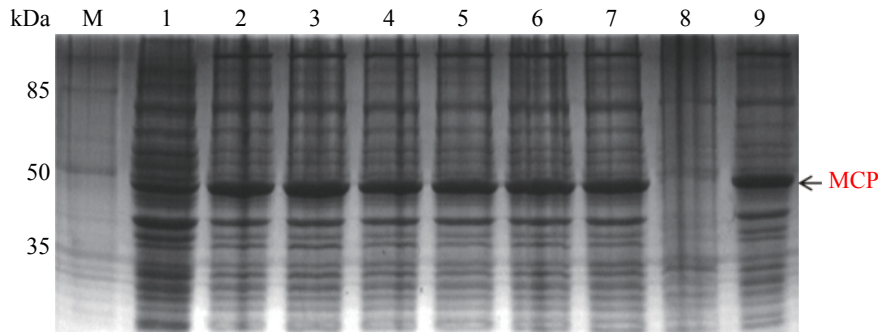


图 6 MCP pET-28a 表达载体的梯度诱导

M: 120 kDa Protein Marker; 1: 未加 IPTG 对照组; 2~9: 分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 浓度。

Fig. 6 MCP pET-28a expression vector gradient induction

M: 120 kDa Protein Marker; 1: control group without IPTG; 2~9: IPTG at the concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

基因表达的融合蛋白约为 45 kDa, 这与预期结果一致, 其中第 1 泳道为未加 IPTG 浓度的对照组, 第 3 泳道 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 浓度诱导蛋白表达最明显, 说明 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 是 MCP 蛋白最适表达浓度。

2.8 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白的可溶性表达检测 MCP-ompN1 pET-28a, MCP pET-28a 及 ompN1 pET-28a 表达质粒分别转化至 BL21(DE3)感受态细胞后, 分别加入已确定最适的 IPTG 浓度诱导 4 h, 然后收集菌体将其破碎, 取上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白是在上清中表达还是在包涵体中表达, 以诱导全菌为对照组, 实验结果见图 7。从 7-A 可以看出, 泳道 4 诱导表达后破碎沉淀中 MCP-ompN1 蛋白含量很高, 而泳道 3 诱导表达后破碎上清的 MCP-ompN1 蛋白含量极少。从图 7-B 可以看出, 泳道 3 诱导表达后破碎沉淀中 ompN1 蛋白含量非常高, 而泳道 2 诱导表达后破碎上清的 ompN1 几乎没有。从图 7-C 可以看出, 泳道 3 诱导表达后破碎沉淀中 MCP 蛋白含量非常高, 而泳道 2 诱导表达后破碎上清的 MCP 蛋白含量几乎可以忽略不计。以上结果表明 MCP-ompN1, ompN1 和 MCP 这 3 个蛋白均以包涵体形式表达。

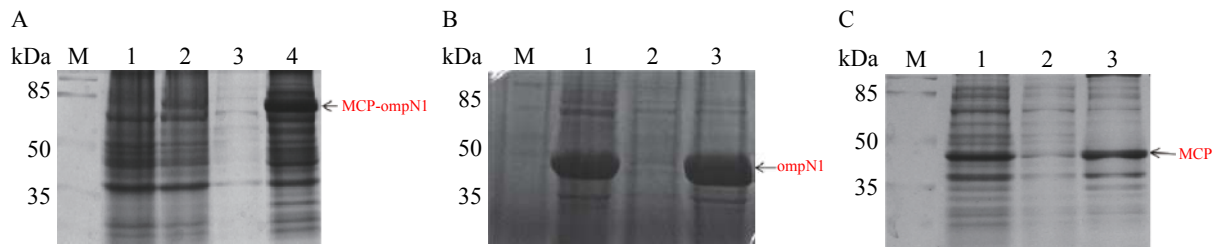


图 7 融合蛋白的可溶性表达检测

M: 120 kDa Protein Marker; A. MCP-ompN1; 1: 未加 IPTG 诱导; 2: 加入 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 3: 诱导表达后破碎上清; 4: 诱导表达后破碎沉淀。B. ompN1; 1: 加入 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 2: 诱导表达后破碎上清; 3: 诱导表达后破碎沉淀。C. MCP; 1: 加入 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 2: 诱导表达后破碎上清; 3: 诱导表达后破碎沉淀。

Fig. 7 Soluble expression detection of the fusion protein

M: 120 kDa Protein Marker; A. MCP-ompN1; 1: Induction without IPTG; 2: Whole bacteria induction with addition of 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 3: Supernatant after fragmentation after induction; 4: Fragmentation after induction of expression precipitation. B. ompN1; 1: Whole bacteria induction with addition of 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 2: Supernatant broken after induction of expression; 3: Broken pellet after induction of expression. C. MCP; 1: Whole bacteria induction with addition of 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 2: Broken supernatant after induction of expression; 3: Broken precipitate after induction of expression.

2.9 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白的包涵体复性及纯化 MCP-ompN1 pET-28a, MCP pET-28a 及 ompN1 pET-28a 表达质粒分别转化至 BL21(DE3)感受态细胞大量表达(1 L)。收集菌体, 用菌体破碎缓冲液 I 溶解菌体, 将其在超声破碎仪冰上破碎, 然后离心弃上清收集沉淀, PBS 缓冲液及洗涤缓冲液 II 和 III 依次洗涤沉淀, 其次用溶解缓冲液 I 将洗涤后的沉淀溶解, 最后依次在含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲素、4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲素、2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲素的复性缓冲液 I 和 PBS 缓冲液中进行梯度透析复性得到纯化和复性后的蛋白(见图 8)。

图 8-A 显示泳道 2 和 3 均在 82 kDa 置处有明显的条带,即 MCP-ompN1 蛋白,而泳道 3 相比于泳道 1 和 2 除了目的蛋白没有任何的杂带。图 8-B 显示相比于泳道 1 未诱导组,泳道 2 和 3 均在大约 45 kDa 位置处有明显的条带,即为 MCP 基因和 PET-28a 载体起始密码子和多克隆位点间的基因表达的融合蛋白,与泳道 1 和 2 相比泳道 3 除了目的蛋白没有任何的杂带。图 8-C 显示相比于泳道 1 未诱导组,泳道 2 和 3 均在大约 44.5 kDa 位置处有明显的条带,即 ompN1 蛋白,而泳道 3 相比于泳道 1 和 2 除了目的蛋白没有任何的杂带。以上结果表明 MCP-ompN1, MCP 和 ompN1 蛋白纯化成功。

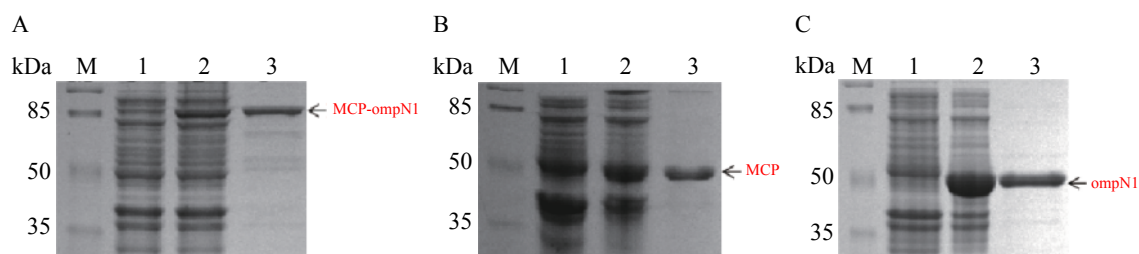


图 8 SDS-PAGE 检测 MCP-ompN1/MCP/ompN1 蛋白

M: 120 kDa Protein Marker; A. MCP-ompN1; 1:未加 IPTG 诱导; 2: 加入 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 3: 复性及纯化后 MCP-ompN1 融合蛋白。B. MCP; 1: 未加 IPTG 诱导; 2: 加入 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 3: 复性及纯化后 MCP 蛋白。C. ompN1; 1: 未加 IPTG 诱导; 2: 加入 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 的全菌诱导; 3: 复性及纯化后 ompN1 蛋白。

Fig. 8 SDS-PAGE detection of MCP-ompN1/ MCP/ ompN1 protein

M: 120 kDa Protein Marker; A. MCP-ompN1; 1: Induction without IPTG; 2: Whole bacteria induction with addition of $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 3: Renaturation and purification of MCP-ompN1 fusion protein. B. MCP; 1: Induction without IPTG; 2: Whole bacteria induction with $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 3: Renaturation and purified MCP protein. C. OmpN1; 1: Induction without IPTG; 2: Whole bacteria induction with addition of $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG; 3: Renaturation and purification of ompN1 protein.

2.10 Western-blot 检测抗血清特异性检测 将纯化后的 MCP-ompN1/ompN1/MCP 蛋白作为抗原进行 SDS-PAGE 电泳。MCP 和 ompN1 免疫血清作为一抗 (MCP 免疫血清按体积比 1 : 1 000 稀释, MCP 免疫血清按体积比 1 : 2 000 稀释)。辣根过氧化物酶偶联作为二抗 (按体积比 1 : 5 000 稀释) 进行 western-blot 检测。结果 (图 9) 显示, 图 9-A 以 ompN1 和 MCP-ompN1 蛋白作为抗原特异性结合 ompN1 免疫血清, 其中泳道 1 为阳性对照 ompN1 蛋白, 泳道 2 为 MCP-ompN1 融合蛋白, 大小分别大约在 44.5 kDa 和 82 kDa 位置, 与预期的实验结果一致。图 9-B 以 MCP 和 MCP-ompN1 蛋白作为抗原特异性结合 MCP 免疫血清, 其中泳道 1 为阳性对照 MCP 蛋白, 泳道 2 为 MCP-OmpN1 融合蛋白, 大小分别大约在 45 kDa 和 82 kDa 位置, 与预期的实验结果一致。实验结果表明, 重组 MCP-ompN1 融合蛋白均能与 MCP 及 ompN1 免疫小鼠血清结合, 并且具有很好的特异性。

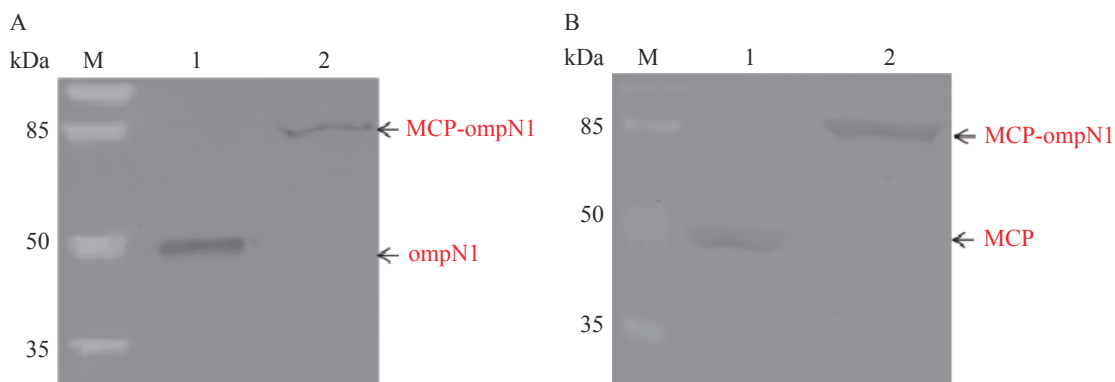


图 9 纯化后的融合蛋白 MCP-ompN1 的 Western blot 检测

M: 120 kDa Protein Marker; A 中 1: ompN1 蛋白; 2: 融合蛋白 MCP-OmpN1; B 中 1: MCP 蛋白; 2: 融合蛋白 MCP-OmpN1。

Fig. 9 Western blotting of purified fusion protein MCP-ompN1

M: 120 kDa Protein Marker; A. 1: OmpN1 protein; 2: Fusion protein MCP-OmpN1; B. 1: MCP protein; 2: Fusion protein MCP-OmpN1.

3 讨 论

鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)隶属于肠杆菌科爱德华氏菌属的一种 G-短杆菌。该菌在水生动物是一种常见高死亡率的致病菌^[16],其在鱼类中主要引起斑点叉尾鲷肠败血症(Enteric septicemia of catfish, ESC)^[17-18]。鲷爱德华氏菌可以通过胃肠道、鳃、皮肤等粘膜组织或口腔、鼻孔(鼻子)进入鱼体引发斑点叉尾鲷肠败血症^[19-20]。目前可用于该病的商业化疫苗是 AQUAVAC-ESC®弱毒活疫苗,该疫苗主要是通过浸泡的方式进行免疫。鲷爱德华氏菌的外膜蛋白 N(OmpN)基因在基因组中编码了 3 种外膜蛋白,分别为 ompN1, ompN2 和 ompN3^[21]。该菌编码的外膜蛋白 N 具有参与粘附和侵袭,赋予其毒力属性,具体作用:①参与粘附,在大多数感染中,病原菌只有吸附在宿主上才能致病;②有助于细菌通过宿主的防御屏障;③OmpN 有助于逃避宿主免疫系统的免疫防御机制^[22],其中编码的 OmpN1 蛋白参与了鞭毛在内膜和外膜之间的肽聚糖层的锚定以及参与蛋白信号的转导,并且容易被受感染的宿主识别^[23]。因此,笔者认为 OmpN1 蛋白具有跨膜作用,在鲷爱德华氏菌的跨粘膜致病机制中扮演一个重要的角色。所以,本实验将鱼类神经坏死病毒的衣壳蛋白(MCP)与鲷爱德华氏菌的跨粘膜蛋白 ompN1 融合表达,拟借助 ompN1 蛋白的跨膜作用,将神经坏死病毒的衣壳蛋白 MCP 带入黏膜上皮细胞内,诱导鱼类的黏膜免疫,从而制备能够抵抗神经坏死病毒的粘膜疫苗。本实验对融合蛋白 MCP-ompN1 基因序列进行了密码子优化,构建了相应的原核表达质粒 MCP-ompN1 pET-28a, MCP pET-28a 及 ompN1 pET-28a。MCP-ompN1, MCP 和 ompN1 3 个蛋白均呈现包涵体表达,通过透析复性及镍柱亲和层析方法纯化出融合蛋白 MCP-ompN1, MCP 蛋白及 ompN1 蛋白。Western Blotting 结果显示, anti-MCP 抗血清或者 anti-ompN1 抗血清均检测出融合蛋白 MCP-ompN1, 这表明了原核表达纯化得到的融合蛋白 MCP-ompN1 既具备了 MCP 蛋白的抗原性,又具备了 ompN1 的抗原性。本实验也为进一步验证融合蛋白 MCP-ompN1 能否作为抵抗神经坏死病毒的粘膜疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] MUNDAY B L, KWANG J, MOODY N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(3): 127 - 142.
- [2] GOMEZ D K, BAECK G W, KIM J H, et al. Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2008, 20(1): 38 - 44.
- [3] FUKUDA Y, NGUYEN H D, FURUHASHI M, et al. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis [J]. *Fish Pathol*, 1996, 31(3): 165 - 170.
- [4] CHI S C, LO C F, KOU G H, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(3): 185 - 193.
- [5] SEONG C H, YOUNG S J, IK P S, et al. Oral immunization with recombinant protein antigen expressed in tobacco, against fish nervous necrosis virus [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, 80(2): 272 - 279.
- [6] H SGARD S, GROTMOL S, HJELTNES B, et al. Immune response to a recombinant capsidprotein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45(1): 33 - 44.
- [7] TANAKA S, MORI K, ARIMOTO M, et al. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 24(1): 15 - 22.
- [8] YUASA K, KOESHARYANI I, ROZA D, et al. Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(1): 53 - 56.
- [9] COEURDACIER J L, LAPORTE F, PEPIN J F. Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14(5): 435 - 447.
- [10] DHAR A K, MANNA S K, ALLNUTT F C T. Viral vaccines for farmed finfish [J]. *Virus Disease*, 2014, 25(1): 1 - 17.
- [11] SOMMERSET I, SKERN R, BIERING E, et al. Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recom-

- binant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(1): 13 – 29.
- [12] THIERY R, COZIEN J, CABON J, et al. Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(20): 10201 – 10207.
- [13] LIU W, HSU C H, CHANG C Y, et al. Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles [J]. *vaccine*, 2006, 24(37/38/39): 6282 – 6287.
- [14] PAKINGKING R, SERON R, L DELA PEÑA, et al. Immune responses of Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(5): 457 – 463.
- [15] YAMASHITA H, FUJITA Y, KAWAKAMI H, et al. The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN) [J]. *Fish Pathol*, 2005, 40: 15e21.
- [16] HAWKE J P. A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1979, 36(12): 1508 – 1512.
- [17] CRAIG S T, ROBERT R S. Channel catfish culture [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1987, 18(3): 207 – 208.
- [18] WAGNER B A, WISE D J, KHOO L H, et al. The Epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2002, 14(4): 263 – 272.
- [19] THUNE R L, JOHNSON M C. Effect of oral sarafloxacin dose and dose duration on *Edwardsiella ictaluri*-infected channel catfish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1992, 4(4): 252 – 256.
- [20] MENANTEAU-LEDOUBLE S, KARSI A, LAWRENCE M L. Importance of skin abrasion as a primary site of adhesion for *Edwardsiella ictaluri* and impact on invasion and systematic infection in channel catfish *Ictalurus punctatus* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148(2/3/4): 425 – 430.
- [21] YANG Q, PAN Y L, WANG K Y, et al. OmpN, outer membrane proteins of *Edwardsiella ictaluri* are potential vaccine candidates for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Molecular Immunology*, 2016, 78: 1 – 8.
- [22] MOHAMMED NEEMA, IDDYA KARUNASAGAR, INDRANI KARUNASAGAR. Structural and functional characterization of outer membrane protein N in *Edwardsiella ictaluri*: A bioinformatic approach [J]. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 2011, 2(1): 13 – 26.
- [23] ELLIS T N, KUEHN M J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles [J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(1): 81 – 94.

Prokaryotic Expression of Fusion Gene of Fish Nervous Necrosis Virus Capsid Protein MCP and *Edwardsiella Ictaluri* Outer Membrane Porin Protein OmpN1

ZHANG Zhuandan, XIAO Zhengpan, WU Xinli, SUN Yan, LUO Ying, WU Hao,
WEI Shuangshuang, PEI Yechun, WANG Dayong

(School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: At present, certain proteins of the nervous necrosis virus are injected into fish as vaccines, but traditional injection immunization cannot effectively stimulate mucosal immunity. In this experiment, the capsid protein (MCP) of the fish nervous necrosis virus was fused with the transmucosal protein ompN1 of *Edwardsiella ictaluri* to prepare a mucosal vaccine against the nervous necrosis virus. The gene sequences of the coat protein MCP of the fish nervous necrosis virus and the outer membrane protein ompN1 of *E. ictaluri* were obtained from the NCBI GenBank, and then optimized and synthesized, and the synthesized genes were used to construct prokaryotic expression vectors respectively: MCP-ompN1 pET28a, MCP pET28a, ompN1 pET28a. The fusion proteins MCP-ompN1, MCP and ompN1 were induced and expressed in *Escherichia coli*,

respectively, and they were purified through inclusion body purification and refolded through dialysis. SDS-PAGE results showed that the purified MCP-ompN1 fusion protein was obtained by prokaryotic expression and purification. Further Western blotting showed that the purified MCP-ompN1 fusion protein had both MCP antigenicity and ompN1 antigenicity. It is indicated that the MCP-ompN1 protein into which the fish nervous necrosis virus capsid protein MCP was fused with *E. ictaluri* outer membrane protein ompN1 was obtained by prokaryotic expression and purification. Further study is needed to observe whether the fusion protein MCP-ompN1 can be used as a mucosal vaccine against nervous necrosis virus.

Keywords: viral nervous necrosis; *Edwardsiella ictaluri*; fusion protein; inclusion body

(责任编辑:叶静)

(上接第 137 页)

Reconstruction and Protein Expression of Flag-ALD Fusion Vector

CAO Xin, TANG Yanqiong, LI Hong, MA Xiang, LIU Zhu

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education/ School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Alanine dehydrogenase (ALD, EC 1.4.1.1) is a microbial enzyme, which plays an important role in the transformation of alanine to pyruvate, carbon metabolism, nitrogen metabolism, and energy metabolism in microorganism. In order to study the function of ALD protein in *Aeromonas veronii* that causes important aquatic diseases, C4 genomic DNA of *A. veronii* was used as a template to amplify *ALD* gene with Flag tag on the N-terminal by PCR. The target gene was incorporated into the expression vector pACYCDuet, and the recombinant plasmid pACYCDuet-Flag-ALD was transformed into *E. coli* BL21. The recombinant protein was induced by Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). SDS-PAGE and Western blot showed that the recombinant protein of Flag-ALD was successfully expressed in a soluble form in *E. coli*. The results laid a foundation for the expression of exogenous ALD protein. The flag labeled target protein may provide a technical support for the further study on the function of alanine dehydrogenase in *A. veronii* and the development of bacteriostatic agents.

Keywords: alanine dehydrogenase; gene cloning; recombinant plasmid; protein expression

(责任编辑:潘学峰)