DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00591

嗜水气单胞菌 TPS-30 株丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因在大肠杆菌中的融合表达

潘晓艺 郝贵杰 姚嘉赟 徐 洋 尹文林 沈锦玉
(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要: 嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶和溶血素是该菌重要的致病因子与保护性抗原。致病性嗜水气单胞菌 TPS-30 株为江浙一带鱼类暴发病病原主要血清型 O:9 的代表株。研究利用 PCR 方法扩增嗜水气单胞菌 TPS-30 株的丝氨酸蛋白酶基因(*Spe*)和溶血素基因(*Hly*), 将基因 *Spe* 和 *Hly* 通过柔性片段进行融合, 并将融合片段插入 pET32a 的多克隆位点, 构建成重组融合表达载体 pET32a-*Spe-Hly*。将重组载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经异丙醛-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 获得融合蛋白 Spe-Hly。表达产物经 SDS-PAGE 检测, 显示与预期大小约 130 kD 相吻合的融合蛋白带。纯化融合蛋白并对鲫鱼进行免疫攻毒试验。结果表明, 丝氨酸蛋白酶基因和溶血素基因融合表达载体构建成功, 并成功获得了融合蛋白 Spe-Hly, 对鲫鱼的免疫保护率达 81.4%。这为基因工程亚单位多价疫苗的开发提供基础。

关键词: 嗜水气单胞菌; 丝氨酸蛋白酶基因; 溶血素基因; 融合表达
中图分类号: Q786; S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0591-07

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛存在于水、土壤和水生动物, 是水产养殖动物的主要病原菌之一, 可引起养殖水产动物的多种疾病, 给水产养殖业造成严重的经济损失。国内外学者皆对嗜水气单胞菌进行了深入的研究, 大量的研究表明该菌的致病性与其众多的毒力因子密切相关。毒力因子包括气溶素[1]、溶血素[2]、胞外蛋白酶[3—5]及 S 层蛋白[6,7]等。

其中丝氨酸蛋白酶和溶血素的研究较为广泛, 据朱大玲等[8]的研究表明, 带丝氨酸蛋白酶基因的菌株都为毒力菌株, 并且其分析的大部分菌株都带溶血素基因。而通过序列分析发现溶血素基因和气溶素基因高度相似, 说明这两种毒力因子之间可能存在共同的抗原表位。Micheal, *et al*.对临床和环境(其中包括鱼源)中的嗜水气单胞菌进行研究, 96%菌株呈 HlyA 阳性, 78%菌株呈 aerA 阳性, 所有的毒力嗜水气单胞菌菌株是 HlyA 阳性[8—10]。

对环境和养殖水域中的毒力嗜水气单胞菌引起的水产动物疾病的预防, 疫苗的预先免疫至关重要。由于嗜水气单胞菌抗原成分复杂, 存在众多血清型, 不同地区流行的菌株在毒力和免疫原性方面存在着明显差异, 灭活疫苗的使用受到限制, 商品化生产不理想。共同保护性抗原的寻找及其疫苗的研制成了预防嗜水气单胞菌病的重点。因此本研究克隆并融合表达了嗜水气单胞菌两个潜在的共同保护性抗原基因丝氨酸蛋白酶基因 *Spe* 和溶血素基因 *Hly*, 并分析了其免疫保护率, 为研制基因工程多价苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验用银鲫(*Carassius auratus gibelio*)由浙北水产苗种基地提供, 平均 100 g 左右, 暂养水泥池一周后备用。

收稿日期: 2009-03-16; 修订日期: 2009-09-18
基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD03B05); 浙江省科技计划项目(2008C22058); 湖州市科研计划项目(2007YN22)资助
作者简介: 潘晓艺(1979—), 男, 汉, 浙江青田人; 助理研究员, 硕士; 主要从事水生动物病害预防与控制。Tel: 0572-2041403; E-mail: panxiaoyi@163.com
通讯作者: 沈锦玉, Tel: 0572-2041403; E-mail: sjinyu@126.com

1.2 细菌菌株和质粒

嗜水气单胞菌 TPS-30 由沈锦玉等[11]分离并鉴定; 原核表达载体 pET-32a(+)(Novagen), *E. coli* DH5*α*, *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) 菌株由本实验室保存。

1.3 工具酶与试剂

各种限制性内切酶、*Pfu* DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、标准分子量 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 低熔点琼脂糖和质粒小量抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; PCR 产物胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 免疫佐剂 Montanide ISA763A 购自法国赛比克公司。其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.4 嗜水气单胞菌总 **DNA** 的提取

将超低温保存的嗜水气单胞菌 TPS-30 接种于 TSB 培养基, 30℃振荡培养 15h。取 3 mL 菌液于 Ependoff 管中离心收集细菌; 用灭菌 ddH_2O 悬浮细菌洗涤两次; 加入 50 μL ddH_2O 和 50 μL TZ 溶液 (4% TritonX-100, 5.0 mg/mL NaN_3, 溶于 25 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 中), –20℃放置 30min; 沸水浴 10min; 冰浴 10min; 5000 r/min 离心 5min, 取上清 –40℃保存备用。

1.5 ***Spe*** 基因和 ***Hly*** 基因的克隆

根据在 GenBank 上已登录的嗜水气单胞菌的 *Spe* 基因(CP000462)和 *Hly* 基因(CP000462)序列, 使用软件 SignalP 3.0 程序分析两基因信号肽序列, 应用 Primer Premier 软件分别设计去掉信号肽序列的引物(表 1)。并根据基因内部酶切位点和 pET32a(+)载体的多克隆位点情况, 在引物的 5′端相应加了酶切位点和接头片段(图 1)。

表 1 基因融合表达的引物

Tab. 1 Primers for the expression of fusion gene

引物 Primer	引物序列 Sequence	酶切位点 Enzyme
AHSpe-up	TAAAAGCTTATGGACGACGACGACAAGGAGAGTTGCACCCCATTGACCGGC	*Hin*d III
AHSpe-dn	AATCTCGAGTCATGAGCGGGTGGCATCGTGGCCGATCACCCGCAGGGAC	*Xho* I
AHHly-up	TAAGATATCATGGAGCCCGTCTATCCAGACCAGCT	*Eco*R V
AHHly-dn	TATAAGCTTCGGGCCTTGATTGGCAACTGGCGT	*Hin*d III

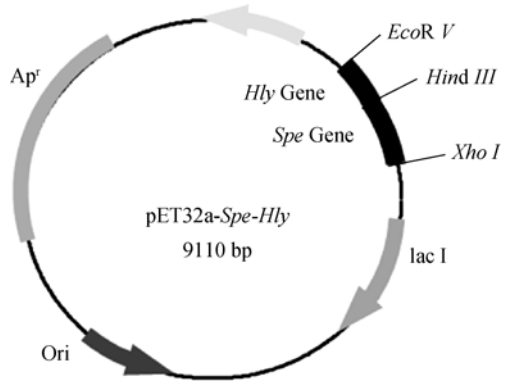


图 1 重组质粒 pET32a-*Spe-Hly* 构建图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pET32a-*Spe-Hly*

通过 PCR 方法, 以 TPS-30 基因组为模板, 扩增 *Spe* 基因和 *Hly* 基因。PCR 反应程序如下: 95℃预变性 3min; 94℃ 40s, 47℃ 40s, 72℃ 110s, 共 30 个循环; 再 72℃延伸 10min。纯化回收 PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.6 序列特征和生物信息学分析

测序结果在 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), 进行同源性分析, 信号肽使用软件 SignalP 3.0 程序分析。

1.7 融合表达载体的构建与原核表达

分别对 *Spe* 基因 PCR 纯化产物和 *Hly* 基因 PCR 纯化产物进行双酶切, 获得 *Spe*/(*Hin*d III+*Xho* I)和 *Hly*/(*Eco*R V+*Hin*d III)片段, 根据测序结果发现 *Hly* 片段中带有 *Xho* I 酶切位点, 因此将 *Spe*/(*Hin*d III+*Xho* I)先与 pET32a(+)/(*Hin*d III+*Xho* I)进行连接, 构建 pET32a-*Spe*。再将 pET32a-*Spe* 双酶切, 将获得的 pET32a-*Spe*/(*Eco*R V+*Hin*d III)片段与 *Hly*/(*Eco*R V+*Hin*d III)片段在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接, 并转化感受态 DH5α 挑取白斑, 抽取阳性质粒进行酶切鉴定, 进一步测序鉴定, 并将构建成功的表达载体命名为 pET32a-*Spe-Hly*。将融合表达载体转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 将阳性菌接种于 5 mL 含 Amp (100 μg/mL) LB 培养基中, 过夜培养, 以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基(含 Amp100 μg/mL LB)中, 37℃继续振荡培养至 A_{600} 达到 0.5—0.8, 此时取 1 mL 菌液作为未诱导组保存, 再添加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 进行诱导表达, 并取不同诱导时间段的菌液保存。

1.8　SDS-PAGE 分析

将诱导表达的重组菌全菌蛋白, 用 10%聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳后, 经考马斯亮兰 R250 染色 45min、脱色过夜后分析蛋白条带。

1.9　Spe-Hly 融合蛋白的纯化及攻毒保护试验

融合表达蛋白的纯化方法和免疫方法参照文献[12]进行, 按 Bradford 方法进行蛋白定量。分别用福尔马林灭活的重组表达蛋白 *Hly-Spe* (0.08 mg/fish)、福尔马林灭活的重组表达蛋白 *Spe* (0.08 mg/fish)、福尔马林灭活的 TPS-30 (1×10^9 CFU/mL, 0.2 mL)、福尔马林灭活的 BSK-10 (1×10^9 CFU/mL, 0.2 mL)和 PBS 免疫银鲫, 灭活时福尔马林终浓度为 0.2%, 28℃灭活 24h, 平板法检查灭活成功后, 每组 3 尾进行毒性试验, 证明无毒后用 PBS 稀释至所需浓度备用, 佐剂采用 Montanide ISA763A。在免疫后第 4 周(28d)进行攻毒, 每尾腹腔注射 0.2 mL 浓度为 2×10^8 CFU/mL (约 50 LD_{50}, TPS-30 的 LD_{50} 为 $10^{5.24}$ CFU/fish, BSK-10 的 LD_{50} 为 $10^{5.35}$ CFU/fish)[11] , 观察 14d, 记录试验鱼的发病与死亡情况。

免疫保护率(*RPS*)按文献[13]进行计算:

RPS(%)＝(1–试验组死亡率/对照组死亡率)×100%

1.10　血清中和抗体动态规律

每 7 天采集血清测定抗体效价, ELISA 法检测抗体效价。*Hly-Spe* 组和 *Spe* 组分别包被各自纯化的重组蛋白, 包被浓度为 5 μg/mL, 100 μL/孔; 灭活苗组用各自对应的嗜水气单胞菌全菌经煮沸 10min 处理后用 PBS 稀释至 1×10^9 CFU/mL, 100 μL/孔进行包被; 对照组用 TPS-30 株同灭活苗组处理进行包被。96 孔酶标板分别以上述抗原包被, 银鲫血清以 2 倍系列稀释度加到各孔中, 初始稀释度为 1:8, 每个稀释度加并排的两孔作为重复, 第 12 孔加 100 μL PBS 作为空白对照。二抗为鼠抗银鲫 IgM 单抗[14](本实验室制备, 稀释度 1:500), 三抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(稀释度 1:1000), 550 型酶标仪(BIO-RAD)于波长 492 nm 读数。试验血清吸光度值(*P*)＝待检血清 OD 值–空白 OD 值, 阴性对照血清吸光度值(*N*)＝阴性血清 OD 值–空白 OD 值, 当两者比值>2.1 时, 则判断为阳性; 阳性孔的最大稀释度即为抗体效价。

2　结　果

2.1　*Spe* 和 *Hly* 基因的克隆

基于要将 *Spe* 和 *Hly* 基因进行串连融合表达, 为了减少表达的蛋白受融合表达的影响, 更好的折叠, 根据设计的引物 AHSpe 和 AHHly, 从 TPS-30 基因组中, 经 PCR 扩增分别得到 1839 bp 和 1437 bp 的扩增条带, 切胶回收后进行测序, 测序结果在 NCBI 上 BLASTN 比对, 分别确定为嗜水气单胞菌的 *Spe* 基因和 *Hly* 基因的 ORF 区, 测序结果的登录号分别为 FJ403392 和 FJ380998, 推导的氨基酸序列分别包含 600 和 470 个氨基酸残基, 分别编码 66 kD 和 51.7 kD 的蛋白。

2.2　序列特征

通过跟嗜水气单胞菌标准菌株 7966 的对应基因比对, 发现 TPS-30 的 *Spe* 基因 ORF 缺失了 3′端第 1555—1611 的一段序列, 并且在 *Spe* 基因 ORF 的第 1616 处和 1846 处缺失了两个碱基, 导致了 *Spe* 基因的 ORF 在 1726 处提前终止。而 TPS-30 的 *Hly* 基因有两个氨基酸发生了突变, 分别是第 92 位的酪氨酸突变为丝氨酸和 101 位酪氨酸突变为异亮氨酸。

两基因表达的氨基酸同源性分析, TPS-30 的 *Spe* 基因表达的蛋白跟嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶同源性最高为 98%, 其次为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 93%和温和气单胞菌 88%。这表明 *Spe* 基因是高度保守的, 可作为基因工程疫苗的候选基因。TPS-30 的 *Hly* 基因表达的蛋白跟嗜水气单胞菌丝氨酸溶血素同源性最高为 99%, 跟气溶素的同源性为 98%, 表明嗜水气单胞菌溶血素基因 *Hly* 高度保守的同时还和气溶素之间可能存在共同抗原表位。这说明嗜水气单胞菌 *Hly* 基因也可作为基因工程疫苗的候选基因。

2.3　重组质粒 pET32a-*Spe-Hly* 的鉴定

挑取阳性克隆, 过夜培养, 抽取重组质粒, 根据表达载体 pET32a(+)上酶切位点的特点, 选用合适的内切酶对重组质粒进行酶切鉴定, 酶切鉴定图谱(图 2)。

2.4　融合基因序列测定

酶切鉴定正确的重组质粒经上海英俊生物技术有限公司序列测定, 结果与亚克隆时测定的序列一致, 融合基因 *Hly*-(Linker)-*Spe* 核苷酸序列测定及其编码蛋白的氨基酸结果(图 3)。

2.5　表达分析

取适量诱导表达后保存的菌体悬浮于双蒸水中, 加等量 2×上样缓冲液, 采用 10% SDS-PAGE 进行电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色分析。诱导表达的蛋白

Spe-Hly 和 *Spe* 的分子量分别为 130 kD 和 78 kD 左右(图 4), 与预期大小吻合。没经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)/pET32a-*Spe-Hly* 没有目的条带, 而经过 IPTG 诱导 1h 后, 融合蛋白便有了微量表达, 诱导表达 3h 和 4h, 融合蛋白的表达量变化不明显。而 BL21(DE3)/pET32a-*Spe* 在诱导 4h 后, *Spe* 蛋白的表达量达到菌体总蛋白的 50%左右, 但其在未诱导时也有微量表达。结果表明丝氨酸蛋白酶基因 *Spe* 和溶血素基因 *Hly* 融合表达载体构建成功, 且能在 BL21(DE3)中正常表达, 表达蛋白分子量与预期吻合。

2.6 免疫保护率

试验鱼在活菌攻击后 14d 内出现了程度不等的死亡率, 死亡时间集中在攻击后 4—9d, 以后趋于稳定。重组蛋白 *Spe-Hly* 和 *Spe* 对两血清型毒株 TPS-30 和 BSK-10 都产生了大于 65%的相对免疫保护率, 但对异源菌株的免疫保护率都低于其对应的甲醛灭活苗组(表 2)。

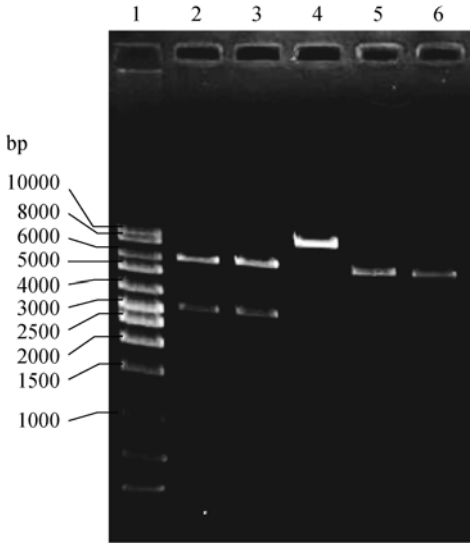


图 2 重组质粒 pET32a-*Spe-Hly* 酶切鉴定

Fig. 2 The results of restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pET32a-*Spe-Hly*

1. 1 kb DNA maker; 2. *Xho* I; 3. *Bgl* II/*Bpu*1102 I; 4. *Hin*d III; 5, 6. *Xho* I/*Hin*d III

ATC ATG GAG CCC GTC TAT CCA…*Hly* gene…AGC CTG AGC GTG ACG CCA GTT GCC AAT CAA
I M E P V Y P …… S L S V T P V A N Q
GGC CCG AAG CTT ATG GAC GAC GAC GAC AAG GAG AGT …*Spe* gene… GAC TGG AGG TGA
G P K L M D D D D K E S …… D W R --

图 3 融合基因 *Hly*-(Linker)-*Spe* 的核苷酸序列及其编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of fusion gene of *Hly*-(Linker)-*Spe*

表 2 免疫攻毒保护试验

Tab. 2 The RPS of experimental animal immunized by vaccine

组别 Group	攻毒菌株 Strain	攻毒鱼数 Total number	死亡鱼数 Death number	死亡率 Mortality	相对保护率 *RPS*
融合蛋白*Hly-Spe* Fusion protein of *Hly-Spe*	TPS-30	30	5	16.7%	81.4%
融合蛋白*Spe* Fusion protein of *Spe*	TPS-30	30	9	30%	66.7%
TPS-30灭活苗 FKC of TPS-30	TPS-30	30	8	26.7%	70.3%
Control group-1	TPS-30	30	27	90%	/
融合蛋白*Hly-Spe* Fusion protein of *Hly-Spe*	BSK-10	30	7	23.3%	73.1%
融合蛋白*Spe* Fusion protein of *Spe*	BSK-10	30	9	30%	65.4%
BSK-10灭活苗 FKC of BSK-10	BSK-10	30	6	20%	76.9%
Control group-2	BSK-10	30	26	86.7%	/

2.7 血清效价分析

免疫后, 各免疫组均产生了显著的特异性抗体效价(图 5), 试验鱼中 *Spe-Hly* 和 *Spe* 特异性的抗体效价在试验期间持续上升, 而 TPS-30 和 BSK-10 灭活苗组的抗体效价在免疫后第 1—4 周上升, 以后表现出了一定的下降。在第 7 周试验结束时, 所有试验组抗体效价的 Log_2 均达到 8.0 以上。

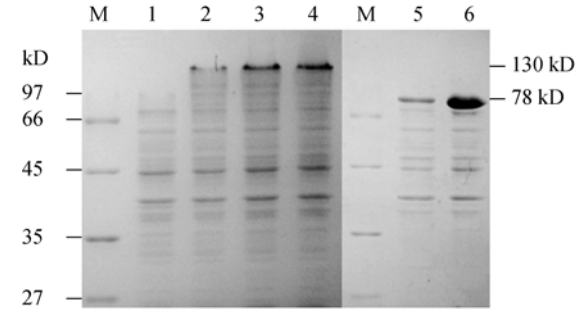


图 4　pET32a-*Spe-Hly* 和 pET32a-*Spe* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of BL21(DE3) with pET32a-*Spe-Hly* and pET32a-Spe

M. 蛋白质 Maker; 1、2、3、4. BL21(DE3) /pET32a-*Spe-Hly* 诱导 0、1、3、4h; 5、6. BL21(DE3) /pET32a-*Spe* 诱导 0、4h

Lane M. Protein standard molecular weight marker; 1, 2, 3, 4. BL21(DE3) /pET32a-*Spe-Hly* induced by IPTG for 0, 1,3, 4h; 5, 6. BL21(DE3) /pET32a-*Spe* induced by IPTG for 0, 4h

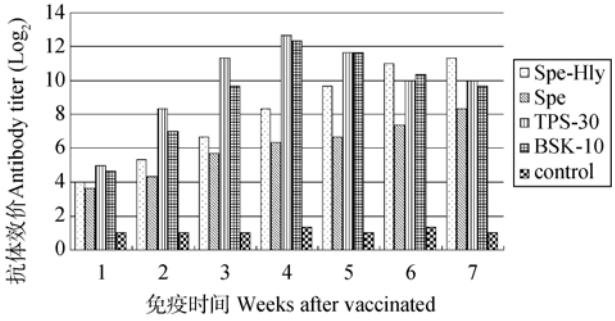


图 5　免疫后在第 1—7 周鲫鱼抗体效价 ELISA 检测

Fig. 5　Specific antibody titers by ELISA in *Carassius auratus gibelio* sera at the 1st to 7th week after vaccination with different vaccines.

3　讨　论

3.1　表达基因的选择

嗜水气单胞菌是我国淡水鱼类重要的致病菌之一，其不同菌株致病力不同，研究表明该菌的气溶素、溶血素及蛋白酶是重要的毒力因子[1—3]。何鸣筱等[15]对中华鳖源嗜水气单胞菌(Ah961004)的细胞毒肠毒素基因(*act*)与外膜蛋白基因(*OmpTS*)进行了融合表达，并对表达的蛋白进行免疫原性分析，发现融合蛋白保留了外毒素和外膜蛋白的免疫原性。本试验采用江浙鱼源的毒力嗜水气单胞菌的流行血清型 O:9 的代表株 TPS-30 的基因组为模板，对嗜水气单胞菌的主要毒力因子溶血素和丝氨酸蛋白酶基因进行克隆和融合表达，为预防嗜水气单胞菌引起的疾病提供保护性抗原。

对丝氨酸蛋白酶和溶血素基因克隆与测序结果发现，TPS-30 的丝氨酸蛋白酶基因有较大的变异，在靠近 ORF 的 C 端缺失了 56 bp，并且在缺失区的前后各缺失了一个碱基，导致序列的移位，丝氨酸蛋白酶基因的终止子提前出现，使得表达的蛋白空间结构发生变化，其缺失的氨基酸部分在丝氨酸蛋白酶功能上所起的作用还不得而知，值得进一步探讨。而溶血素基因跟嗜水气单胞菌标准株相比只突变了两个位点，氨基酸未发生移位。通过序列比较发现丝氨酸蛋白酶和溶血素基因高度保守，并且溶血素基因跟气溶素同源性高达 98%。这说明丝氨酸蛋白酶和溶血素存在是嗜水气单胞菌共同保护性抗原的可能性。这也是本研究进行这两个基因融合表达的原因之一。

3.2　融合表达载体构建策略

由于 pET 系列载体的表达技术已相当成熟，因此本研究选取了 pET32a(+)作为表达载体。将丝氨酸蛋白酶和溶血素基因通过 Linker 片段进行连接，Linker 包括了一个 *Hin*d III 酶切位点和一个肠激酶蛋白酶切位点。*Hin*d III 酶切位点利于两基因片段的连接，而肠激酶蛋白酶切位点则方便融合表达蛋白的切割。通过诱导表达发现表达量并不是很高，远远低于单独丝氨酸蛋白酶基因表达的量，可能与溶血素基因的表达情况有关。因为进行两基因的融合时，溶血素基因在丝氨酸蛋白酶基因之前，所以进行翻译表达时，也是先对溶血素基因进行翻译。因此溶血素基因的表达情况严重影响着融合蛋白的表达量。融合蛋白的诱导表达还需进一步优化。

3.3　不同抗原的免疫性比较

通过不同抗原对鲫鱼进行免疫试验，全菌灭活苗组的血清抗体效价在第 4 周达到峰值，并在随后几周呈缓慢下降趋势；而重组蛋白 Spe-Hly 和 Spe 免疫组的血清抗体效价在试验期间都呈上升趋势，全菌灭活苗组血清抗体效价在第 5 周开始呈下降趋势；前 5 周重组蛋白免疫组的血清抗体效价都低于全菌灭活苗组血清抗体效价的峰值，第 6 周重组蛋白 Spe-Hly 组血清抗体效价开始超过全菌灭活苗组，说明重组蛋白产生的免疫刺激持续性较全菌灭活苗要强，短期的抗体效价不如全菌灭活苗，长期则重组蛋白要优于全菌灭活苗。在采用血清型 O:9 代表菌株 TPS-30 和 O:97 代表菌株 BSK-10 对免疫的银鲫进行攻毒试验，重组蛋白 Spe-Hly 和 Spe 免疫组对同源和异源菌株都表现出了一定的免疫保护率，其中对同源菌株 TPS-30 的免疫保护率分别为 81.4%和

66.7%, 对异源菌株 BSK-10 的免疫保护率分别为 73.1%和 65.4%。这表明 *Spe* 与 *Hly* 重组融合表达的蛋白比单一 *Spe* 重组表达的蛋白表现出更高的免疫保护率, 且 Spe-Hly 对同源菌株的免疫保护率要高于全菌灭活苗组。

本研究首次对中国鱼源嗜水气单胞菌 O:9 血清型代表株 TPS-30 株的 Spe 丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因的进行了融合表达, 并进行了免疫学试验。这为嗜水气单胞菌基因工程亚单位多价苗的开发奠定了基础。

参考文献:

[1] Howard S P, Garland W J, Green M J, *et al*. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(6): 2869—2871

[2] Hirono I, Aoki T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1991, **11**(3): 189—197

[3] Cascon A, Fregeneda J, Aller M, *et al*. Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, **23**(1): 49—59

[4] Cascon A, Yugueros J, Temprano A, *et al*. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 2000, **68**(6): 3233—3241

[5] Chang T M, Liu C C, Chang M C. Cloning and sequencing analysis of the gene (eprA 1)encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Gene*, 1997, **199**(1): 225—229

[6] Thomas S R, Trust T J. Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*： Molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, **245**(5): 568—581

[7] Yan Y X, Chen H Q, Lu C P. Purification and characterization of S-layer protein from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1996, **36**(2): 144—150 [严亚贤, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞苗 S 蛋白提纯及特性分析. 微生物学报, 1996, **36**(2): 144—150]

[8] Zhu D L, Li A H, Wang J G, *et al*. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of Aeromonas hydrophila strains [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2006, **45**(1): 82—85 [朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性. 中山大学学报, 2006, **45**(1): 82—85]

[9] Heuzenroeder M W, Flower R L, Wong C Y. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **174**(1): 131—136

[10] Gonzalez-Serrano C J, Santos J A, Garcia-Lopez M L, *et al*. Virulence marker in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii biovar sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**(3): 414—419

[11] Shen J Y, Chen Y Y, Shen Z H, *et al*. Study on pathogen of outbreaks of infectious disease of fishes in Zhejiang province I.isolation, pathogenicity, physiological and biochemical and biochemical characteristics of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 1993, **9**(6): 397—401 [沈锦玉, 陈月英, 沈智华, 等. 浙江省养殖鱼类暴发性流行病病原的研究 I. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)分离、致病性及生理生化特性. 科技通报, 1993, **9**(6): 397—401]

[12] Sambrook J, Fritsh E F, Manitatis T, *et al*. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. Zhang D Y (Eds.), Beijing: Science Press. 1996, 845—848, 855 [J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社. 1996, 845—848, 855]

[13] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [A]. In: Anderson D P, Hennessen H (Eds.), Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Developments in biological standardization [C]. Basel: Karger. 1981, 447—454

[14] Li X H, Shen J Y, Yin W L, *et al*. Immunity and immunohistochemistry by oral vaccination of *Carassius Auratus Gibelio* using *Aeromonas hydrophila* vaccine [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(1): 125—130 [李新华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究, 水生生物学报, 2007, **31**(1): 125—130]

[15] He M Y, Ye Q Z, Chen C, *et al*. Construction and high expression of an Act-OmpTS fusion vector of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(2): 169—173 [何鸣筱, 叶巧真, 陈诚, 等. 嗜水气单胞菌外毒素和外膜蛋白双基因融合表达载体的构建和高效表达. 水生生物学报, 2004, **28**(2): 169—173]

FUSION EXPRESSION OF *SPE* GENE WITH *HLY* GENE OF *AEROMONAS HYDROPHILA* STRAIN TPS-30 IN *ESCHERICHIA COLI*

PAN Xiao-Yi, HAO Gui-Jie, YAO Jia-Yun, XU Yang, YIN Wen-Lin and SHEN Jin-Yu

(*Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries*, *Huzhou* 313001)

Abstract: Serine protease (Spe) and hemolysin (Hly) are important pathogenic factors and protective antigens of *Aeromonas hydrophila*. The pathogen *A. hydrophila* TPS-30 strain was assigned to serogroup O: 9 of the Sakazaki and Shimada (National Institutes of Health) scheme, which caused hemorrhagic septicemia in Jiangsu Province. In this study, two pairs of primers were designed and synthesized according to the sequence of gene *Spe* and *Hly*. The *Spe* and *Hly* DNA fragments were amplified by PCR Spe from *A. hydrophila* TPS-30 genomic DNA respectively. The subsequent sequence analysis revealed the *Spe* gene of TPS-30 has an open reading frame of 1800 bp encoding a 600 amino-acid protein with a molecular weight of 66.6 kD, the *Hly* gene of TPS-30 has an open reading frame of 1410 bp encoding a 470 amino-acid protein with a molecular weight of 51.7 kD. Gene *Spe* and *Hly* were fused and cloned into expression vector pET32a (+) at the site of polyclone resulting to recombinant vector pET32a-*Spe-Hly*, gene *Hly* lying in 5' end and gene *Spe* in 3' end. The expression vector pET32a-*Spe-Hly* were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). After engineered, *E. coli* were incubated in LB medium at 37 ℃ for 18h, 1% inoculums volume were transferred into LB medium to incubate. When A_{600} reached 0.5, engineered *E. coli* were induced by the isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at ultimate concentration 0.2 mmol/L with 4h. Fusion protein (Hly-Spe) was expressed. The molecular weight of the fusion engineered protein was about 130 kD, which was identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that Spe-Hly fusion protein expression vector pET32a-*Spe-Hly* was constructed successfully and the Spe-Hly fusion protein was highly expressed in recombinant strain BL21(DE3) (pET32a-*Spe-Hly*). To test the effectiveness of the recombinant Spe-Hly as a vaccine, *Carassius auratus gibelio* were immunised with the recombinant Spe-Hly and then challenged with different bacterial strains. The immune fish were significantly protected from challenges by the homologous strain (*A. hydrophila* TPS-30) and one serologically different strain (*A. hydrophila* BSK-10), giving RPS values of 81.4% and 73.1%, respectively, as compared with the control groups (injected with Montanide ISA763A and PBS). All these findings suggest that this recombinant Spe-Hly has the potential to be developed into an effective vaccine in fish against the infections of *A. hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; Serine protease gene; Hemolysin gene; Fusion expression