

嗜水气单胞菌气溶素的原核表达 及其多克隆抗血清的制备

杜娜 顾泽茂 袁军法 林鑫 翟艳花 刘学芹 罗宇良

华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心/
农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 根据 GenBank 中致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)气溶素(aerolysin, Aer)基因的序列设计引物,以来自湖北的鱼源 *A. hydrophila* 分离株为模板扩增出 *aer* 基因的 ORF 序列,克隆到 pMD18-T 载体上进行序列测定。测序结果表明,*A. hydrophila* 的 *aer* 基因的系统进化树中国内菌株聚为一支,国外菌株聚为一支。通过 pET-32a(+)载体构建 Ah15 株 *aer* 基因的表达载体 pET32a-15,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中进行诱导表达,通过 SDS-PAGE 分析,显示与预期大小约 72.2 ku 相吻合的融合蛋白带,且以包涵体形式存在。浓缩后的包涵体蛋白免疫新西兰大白兔获得了重组蛋白的抗血清,Western blot 结果显示,兔抗血清可以识别 *A. hydrophila* 的重组毒素,说明该基因的重组蛋白具有很好的免疫原性,可作为 *A. hydrophila* 基因工程疫苗研制的候选基因。

关键词 嗜水气单胞菌; 气溶素; 原核表达; 多克隆抗血清

中图分类号 S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)03-0065-07

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)隶属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*),是人、畜及水生动物共患的条件致病菌,也是气单胞菌属的模式种^[1]。该细菌广泛存在于水环境和土壤中,是多种水产动物的主要致病菌。由 *A. hydrophila* 导致的淡水鱼类细菌性败血症,对我国淡水养殖业的危害尤为严重,每年都会造成严重的经济损失甚至导致生态污染^[2]。国内外学者针对 *A. hydrophila* 及其引起的病害开展了大量研究,已经确认了该菌的致病性与毒力因子密切相关。其毒力因子分为两类,一类是外毒素,主要包括气溶素^[3]、溶血素^[4]、胞外蛋白酶^[5];另一类是内毒素,主要包括 S 层^[6]、脂多糖^[7]及 4-型鞭毛^[8]。

气溶素(Aer)是 *A. hydrophila* 的主要毒力因子之一,目前在 GenBank 中可以搜索到世界各地提交的气溶素基因序列约 100 多条。该基因编码的 Aer 蛋白是细菌通道形成毒素,具有溶血性、细胞毒性和肠毒性,由 463 个氨基酸组成,分子质量约 51.5

ku^[9]。研究表明,Aer 是 *A. hydrophila* 的重要共同保护性抗原之一^[10-12],朱大玲^[13]克隆了 *A. hydrophila* 强毒株 XS91-4-1 的 *aer* 基因全序列,为 Aer 的进一步研究奠定了基础。郭闯等^[14]虽直接从 *A. hydrophila* 培养上清中纯化得到 Aer 并制备单克隆抗体,ELISA 检测具较高阳性率,但 Aer 仍为粗提毒素,且蛋白回收率仅为 15%。

迄今为止,*A. hydrophila* 造成了淡水鱼类的大量死亡,而对引起的淡水鱼类细菌性败血症主要依靠抗生素治疗,大量使用抗生素类药物必然导致耐药菌株的产生,不仅对有效防治这种疾病带来阻碍,抗生素类药物在水产品和环境中的残留还对人类健康产生威胁。*A. hydrophila* 疫苗的研制和应用受到了广泛关注,不过,由于 *A. hydrophila* 抗原成分复杂,且存在众多血清型,不同地区流行的菌株在毒力和免疫原性等方面存在着明显差异,导致该菌的灭活疫苗使用受到限制。因此,在寻找该菌的共同保护性抗原的基础上研制疫苗,是提高 *A. hy-*

收稿日期: 2013-05-26

基金项目:湖北省杰出青年人才基金项目(2011CDA091)和中央高校基本科研业务费专项(2013PY023, 2013PY069, 2013PY070, 2013PY071)

杜娜,硕士研究生,研究方向:水产动物医学. E-mail: duna19870602@163.com

通信作者:顾泽茂,博士,副教授. 研究方向:水生生物医学. E-mail: guzemaomail@mail.hzau.edu.cn

drosophila 疫苗预防疾病效果的关键。Aer 作为 *A. hydrophila* 的共同保护性抗原之一,在抗原性、毒力及基因结构方面已有较多的报道^[6,15-17],但免疫原性方面的报道尚不完善^[14]。本研究对 *A. hydrophila* 国内分离菌株潜在的共同保护性抗原 *aer* 基因进行克隆、融合表达并制备了多克隆抗体,旨在为研制基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

Ah15 由笔者所在实验室鉴定保存^[18],大肠杆菌 DH5 α 购自大连宝生物工程有限公司;大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;pMD18-T 载体、pMD19-T simple 载体购自 TaKaRa 公司;pET-32a (+)由笔者所在实验室保存。

1.2 主要试剂

Hind III、*Bam* H I、X-gal、IPTG、DNA marker DL 2000、PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶、蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen Biosciences 公司;碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔购自武汉三鹰生物技术有限公司;NBT/BCIP 浓缩显色液购自上海索莱宝生物科技有限公司;1 kb DNA Ladder 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;氨苄青霉素(Amp)和氯霉素(Cam)等试剂均为进口的分析纯级别。

1.3 *aer* 基因的扩增、克隆及测序

DNA 模板提取方法参照试剂盒说明书。根据 GenBank 中发表的嗜水气单胞菌 *aer* 基因序列(登陆号:DQ186611.1 和 EU650663)的 ORF 上下游区域,利用 Clustalx 软件比对,手工设计了 1 对特异性引物 F/R,由上海生工生物工程技术有限公司合成。F: 5'-CGCTGGTGAACGTATGTCAATG-3', R: 5'-CGGTTCCATCACTACAACGCACT-3', 引物长度为 1 482 bp。

PCR 反应体系和程序:50.0 μ L 体系,10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ Plus):5.0 μ L,dNTPs:4.0 μ L, *Taq* 酶:0.5 μ L(5 U/5.0 μ L),F/R:各 1.0 μ L(10.0 μ mol/L),模板 DNA:2.0 μ L,加 ddH₂O 补足至 50.0 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,

49 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物 1.0%凝胶电泳,DNA 凝胶回收试剂盒回收和纯化 PCR 产物。纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体、转化、蓝白斑筛选,挑取白斑,PCR 鉴定,阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 序列特征和生物信息学分析

测序结果在 NCBI 的 Blast 里进行同源性分析,通过在线分析系统(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测序列的信号肽,跨膜区的预测采用在线分析系统(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>),将成熟肽氨基酸序列输入在线分析系统(<http://pfam.janelia.org/search/sequence>)分析 Aer 特有的结构域。系统进化树采用 MEGA 4.0 程序进行分析,选取同源性高的国内外气单胞菌属的 *aer* 基因序列(表 1),用邻接法构建系统进化树,其中以杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)17-2 菌株为外群(outgroup),bootstrap 值为 1 000。

1.5 融合表达载体的构建及原核表达

将测序正确的重组质粒命名为 Aer-T18。质粒提取试剂盒提取重组质粒(Aer-T18),并以其为模板。根据测序结果设计切除信号肽序列的引物,并根据基因内部酶切位点和 pET-32a(+)载体的多克隆位点情况,在引物的 5'端相应加入酶切位点,所用引物为 F2/R2。其中,F2:5'-CGCGGATCCATGGCAGAGC-CCGTCTAT -3', R2:5'-CCCAAGCTTCTGCCGT-TATTGATTGGC -3',引物长度为1 413 bp。

PCR 反应体系和程序与上述描述一致,纯化的 PCR 产物连接 pMD19-T simple 载体、转化、挑取白斑、双酶切,表达载体 pET-32a (+)双酶切,在 T₄ DNA 连接酶的作用下连接、转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞,阳性克隆测序。阳性克隆接种于含有 Amp/Cam 的 LB 液体培养基过夜培养,以 1:100 的比例扩大培养至 D₆₀₀=0.5~0.8,取 1 mL 菌液作为未诱导组,1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,分别收集诱导 1、2、3、4、5 h 的菌液,收获菌体、超声破碎、高速离心,分离上清和沉淀进行可溶性分析。

表1 用于进行气溶素基因进化分析的气单胞菌属菌株

Table 1 The strains of *Aeromonas* used to the phylogenetic analysis of aerolysin gene

菌株 Strain	登录号 Accession number	产地 Locus	参考文献 Reference
Ah15	HQ425625	中国 China	本文 This study
Ah563	HQ425626	中国 China	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> XS-91-4-1	DQ186611	中国 China	[14]
<i>A. hydrophila</i> BZ	EF450824	中国 China	[19]
<i>A. hydrophila</i> NK	EF450825	中国 China	[19]
<i>A. hydrophila</i> TPS-30	FJ380998	中国 China	[20]
<i>A. hydrophila</i> Ah-J1	DQ408263	中国 China	[20]
<i>A. hydrophila</i> ML316	AF539467	中国 China	[21]
<i>A. hydrophila</i> BA17	DQ302121	中国 China	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> GA1	DQ302122	中国 China	[22]
<i>A. hydrophila</i> HA7	DQ302123	中国 China	[22]
<i>A. hydrophila</i>	AB021152	中国 China	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> HB1	HQ656578	中国 China	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> ZN1	EF189591	中国 China	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AH1	X65045	日本 Japan	[23]
<i>A. hydrophila</i> AH14	EU650663	印度 India	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AEOHFPA	M16495	法国 France	[24]
<i>A. hydrophila</i> AHBHP3	AF485759	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AHTKB2	AF485762	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AHK4	AF485772	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AHK7	AF485764	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AHK11	AF485766	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. hydrophila</i> AHC11	AF485767	马来西亚 Malaysia	未发表 Unpublished
<i>A. salmonicida</i> 17-2	X65048	日本 Japan	[25]

1.6 融合蛋白的浓缩

收集诱导表达的菌体,重悬于 Binding Buffer (0.5 mmol/L NaCl, 20.0 mmol/L Tris, 5.0 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 中,冰浴超声破碎、离心,沉淀重悬于包涵体洗涤液 (0.5 mmol/L NaCl, 20.0 mmol/L Tris, 5.0 mmol/L 咪唑, 6.0 mol/L 尿素, pH 7.9) 中,置 4 °C 过夜、12 000 r/min 离心 40 min,取上清。从 6.0 mol/L 尿素浓度,梯度透析,每 0.5 mol/L 为一个梯度,每个梯度透析 12 h,直至尿素完全透析出来。PEG20000 浓缩,−20 °C 保存。

1.7 SDS-PAGE 分析

蛋白样品 12.0% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,样品在浓缩胶中低压 80 V 电泳约 20 min,当样品进入分离胶后,电压调整为 120 V,继续电泳约 120 min 至溴酚蓝前沿至凝胶底部。电泳结束后,考马斯亮蓝 R250 微波染色 1 min、水煮脱色,分析蛋白条带。

1.8 多克隆抗体的制备

浓缩的蛋白经 12.0% SDS-PAGE 电泳,切胶回收于研钵中,加入适量 PBS,研磨成很细的颗粒状,作为免疫原接种新西兰大白兔。2.0 mL 浓缩蛋白(约 500.0 μg)多点注射背部两侧和脚掌,每点

注射 0.2 mL。2 周后加强免疫 1 次,剂量为 300.0 μg,方法同上。第 2 次免疫 11 d 后,颈动脉取血。将全血 37 °C 水浴 1 h、4 °C 放置过夜,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清,分装后于 −20 °C 冻存。

1.9 Western blot 分析

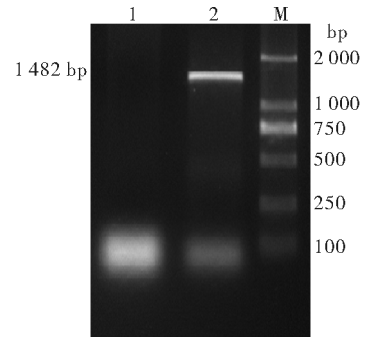
浓缩的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳,Western blot 具体操作方法参照文献[3],简述如下:将蛋白转移至 PVDF 膜,用 3.0% BSA 的 TBS 溶液 (10.0 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 150.0 mmol/L NaCl) 4 °C 封闭过夜;用 TBST 溶液 (0.05% Tween 20) 洗膜 10 min,稀释的抗血清 (1:8 000, 1:4 000, 1:2 000, 1:1 000, 1:500) 作为一抗,37 °C 1 h;二抗为 AP 标记的羊抗兔, TBST 溶液洗膜 4 次,每次 10 min,用 NBT/BCIP 浓缩显色液显色。

2 结果与分析

2.1 aer 基因的序列特征

Ah15 分离株 PCR 产物大小为 1 482 bp (图 1),登录号为 HQ425625,为 *A. hydrophila aer* 基因序列的 ORF 区域,Editseq 软件推导的氨基酸序列包含 494 个氨基酸残基,无跨膜区,前 23 个氨基酸为

信号肽, 24~106 个氨基酸为 Aer 的 APT 结构域 (aerolysin/pertussistoxin domain), 119~477 aa 区域为 Aer 结构域。Ah15 的 *aer* 基因序列与国内分离株核苷酸同源率为 97%~99%, 与国外分离株核苷酸同源率为 94.0%~99.0%。*aer* 基因的分子系统进化树显示 *A. hydrophila* 分为 3 个单系类群, 分离于国内的 *A. hydrophila* 菌株聚为一支, 表现较高的支持率, 为第一类群, Ah15 落于第一类群; 来自日本、印度和马来西亚的 *A. hydrophila* 菌株聚成一支, 为第二类群; 第三类群为分离自法国的 *A. hydrophila* AEOHFPA 菌株, 处于系统树最底部(图 2)。



M: DNA marker (DL 2000); 1: 阴性对照 Negative control; 2: *aer* 扩增产物 PCR fragment of *aer*.

图 1 *aer* 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *aer* gene fragment with PCR

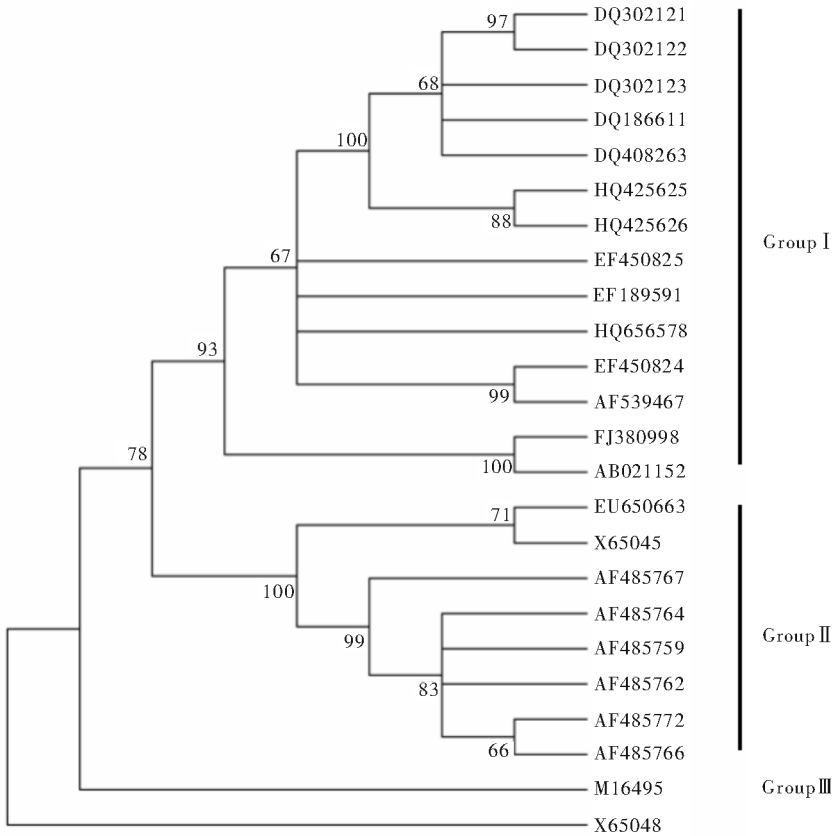


图 2 用邻接法构建的气溶素蛋白的进化树

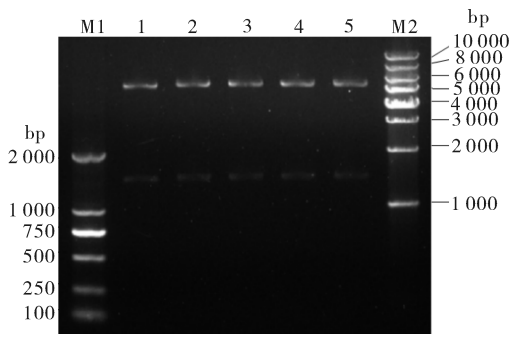
Fig. 2 The phylogenetic tree of aerolysin constructed using the Neighbor-Joining algorithm

2.2 重组质粒 pET32a-15 的鉴定

双酶切结果显示 2 条带, 分子质量小的条带为 1 413 bp(图 3)。测序结果表明重组质粒 pET32a-15 的 *aer* 基因序列的 ORF 区域未移码, 无任何突变, 表明 *aer* 基因成功连接于 pET-32a(+) 载体。

2.3 表达分析

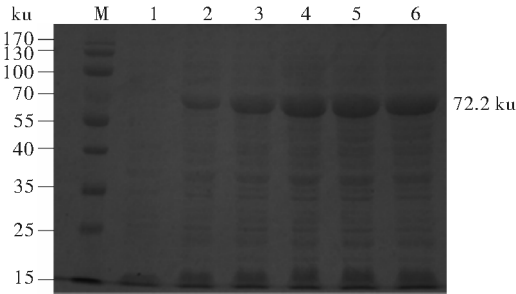
融合蛋白分子质量约为 72.2 ku, 与预期大小吻合。未经 IPTG 诱导的 BL21/pET32a-15 没有发现目的条带, 诱导表达的菌体 BL21/pET32a-15 出现目的条带, 分别在 3、4 和 5 h 时得到高效表达, 4 h 时条带最明显, 表达量最大(图 4)。菌体超声上



M1: DNA marker (DL 2000); M2: 1 kb DNA Ladder; 1-5: *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切消化的 pET32a-15 pET32a-15 digested by *Hind*III and *Bam*HI .

图 3 重组质粒的酶切鉴定结果

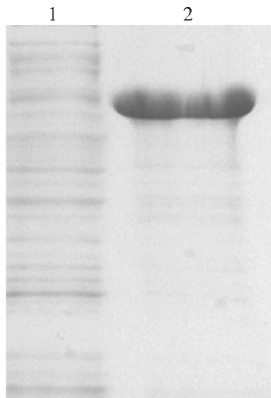
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by restricted endonuclease digestion



M: 标准蛋白 marker; 1、2、3、4、5、6 分别是诱导 0、1、2、3、4 h 后的 pET32a-15 的菌体总蛋白 M: Protein marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6: 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h induced pET32a-15.

图 4 不同诱导时间 Aer 的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the aerolysin expression at different induction times



1、2 分别为 Aer 超声上清和沉淀 The supernatant and precipitate of induced *E. coli* cells expressing Aer, respectively.

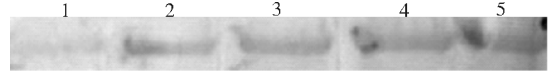
图 5 37 °C 下 Aer 表达产物的可溶性分析

Fig. 5 Dissolvability analysis of the aerolysin expressed in *E. coli* under induction temperatures of 37 °C

清中没有发现目的条带,而在沉淀中出现目的条带(图 5)。

2.4 蛋白的浓缩与免疫原性

浓缩的包涵体蛋白以高浓度的可溶形式存在, Western blot 结果显示,利用浓缩的包涵体制备的兔抗血清可以很好地识别嗜水气单胞菌产生的 Aer 毒素,效价为 1 : 8 000(图 6)。



1、2、3、4、5 分别为 1 : 8 000, 1 : 4 000, 1 : 2 000, 1 : 1 000, 1 : 500 的抗血清 Lane 1, 2, 3, 4 and 5: Anti-serum of 1 : 8 000, 1 : 4 000, 1 : 2 000, 1 : 1 000, 1 : 500.

图 6 用抗 Aer 的兔血清 Western blot

检测菌体总蛋白中的重组蛋白

Fig. 6 The fusion proteins were detected by Western blot analysis using the rabbit serum of anti-Aer

3 讨 论

A. hydrophila 是我国淡水鱼类主要的致病菌之一,研究发现不同菌株的致病性存在差异,该菌的气溶素、溶血素、S 层及外膜蛋白是重要的毒力因子,毒力因子与致病性有一定关系^[3-8]。潘晓艺等^[26]对 *A. hydrophila* TPS-30 菌株的丝氨酸蛋白酶基因(*Spe*)与溶血素基因(*Hly*)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免疫原性。本研究以鱼源 *A. hydrophila* Ah15 为研究对象,克隆了其 *aer* 基因。通过比对 Aer 的核苷酸和氨基酸序列,我们发现 *A. hydrophila* 核苷酸序列之间的差异多位于密码子的第 3 位,即沉默突变,不会引起氨基酸序列的变化,对蛋白的功能无影响。构建的系统进化树表明,*A. hydrophila* Ah15 分离株与国内菌株聚在一支,而来自国外的 *A. hydrophila* 菌株聚为另一支,表现出明显的地理差异性,说明 Ah15 株的 *aer* 基因与国内分离株的 *aer* 基因同源性更高。Ah15 的 *aer* 基因序列与 2 株国内分离株 *A. hydrophila* XS-91-4-1 和 Ah563 相似性最高,为 99%,*A. hydrophila* XS-91-4-1 和 Ah563 均分离于湖北地区,说明同一地区分离菌株的 *aer* 基因具有较高相似性,而 Ah15 与国外分离株核苷酸同源性为 94.0%~99.0%,说明气溶素基因具有高度的保守性,表明该基因适合作为基因工程疫苗的候选基因。

aer 的 ORF 区为功能区域,故诸多的研究着眼于此。李寿崧等^[19]对 *A. hydrophila* 的 BZ 和 NK 菌株克隆得到 1 393 bp 的 *aer* 部分序列,未能得到完整的 ORF 区。Singh 等^[16]对 *aer* 的 ORF 区域进行原核表达,并得到高纯度的 Aer 融合蛋白,但未进行效价测定。因此,我们不能推断该 Aer 是否具有免疫原性。郭闯等^[14]直接从 *A. hydrophila* 培养上清中纯化 Aer 并制备了单克隆抗体,该蛋白为粗提毒素且蛋白回收率较低。本研究构建的 pET 表达载体在大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中获得高效表达,表达产物以包涵体形式存在,经透析和浓缩,重组毒素以可溶形式存在,原核表达的重组毒素经免疫新西兰大白兔得到的多克隆抗体效价为 1 : 8 000,可以识别重组毒素,具有很好的免疫原性,表明 *A. hydrophila* 的 *aer* 基因有望作为制备工程疫苗的候选基因。

参 考 文 献

- [1] 李爱华. 气单胞菌(*Aeromonads*)分类与命名的最新进展[J]. 鱼类病害研究, 2001, 23(2): 25-32.
- [2] POOBALANE S, THOMPSON K D, DIAB A, et al. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 45(1): 60-69.
- [3] ZHU D L, LI A H, WANG J G, et al. Cloning expression and characterization of aerolysin from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli* [J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2007, 44(4): 204-208.
- [4] ESTEVE C, BIRKBECK T H. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 994-1001.
- [5] 刘永杰, 陆承平. 嗜水气单胞菌弹性蛋白酶的纯化及特性分析[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(1): 54-56.
- [6] YU H B, ZHANG Y L, LAU Y L, et al. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4469-4477.
- [7] DOOLEY J S, LALLIER R, TRUST T J. Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1986, 12 (1/2/3/4): 339-344.
- [8] 朱兴国, 范红结, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌 J-1 株粘附素及其受体分析[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(2): 82-84.
- [9] 陈怀青. 嗜水气单胞菌外毒素研究进展[J]. 国外医学: 微生物分册, 1992, 15(6): 256-259.
- [10] POOBALANE S, THOMPSON K D, ARDÓ L, et al. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish[J]. Vaccine, 2010, 28(20): 3540-3547.
- [11] NI X D, WANG N, LIU Y J, et al. Immunoproteomics of extracellular proteins of the *Aeromonas hydrophila* China vaccine strain J-1 reveal a highly immunoreactive outer membrane protein[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2010, 58(3): 363-373.
- [12] 刘明智, 叶星, 田园园, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 基因的表达及其免疫原性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 437-445.
- [13] 朱大玲. 嗜水气单胞菌毒力基因及基因工程疫苗[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [14] 郭闯, 方苹, 郭立新, 等. 嗜水气单胞菌气溶素单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 水产科学, 2007, 26(3): 167-170.
- [15] DAS B K, SAMAL S K, SAMANTARAY B R, et al. Protein finger printing profiles in different strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased freshwater fish [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(4): 587-591.
- [16] SINGH V, SOMVANSHI P, RATHORE G, et al. Gene cloning, expression, and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(7): 1985-1991.
- [17] SINGH V, RATHORE G, KAPOOR D, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(4): 453-458.
- [18] 王美珍. 耐药嗜水气单胞菌的外膜结构和免疫原性变化的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2011.
- [19] 李寿崧, 郭立新, 江树勋, 等. 嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆与序列分析[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 700-704.
- [20] 孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(3): 20-23.
- [21] 龚辉, 林天龙, 俞伏松, 等. 鳃源嗜水气单胞菌 β -溶血素基因的克隆及表达[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 124-130.
- [22] 方兵, 李耀年, 祖国掌, 等. 应用多重 PCR 检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 473-477.
- [23] HIRONO I, AOKI T, ASAO T, et al. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. Microbial Pathogenesis, 1992, 13(6): 433-446.
- [24] 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.

- [25] HIRONO I, AOKI T. Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1993, 15(4): 269-282.
- [26] 潘晓艺, 郝贵杰, 姚嘉赞, 等. 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[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(3): 591-597.

Prokaryotic expression and polyclonal antiserum preparation of aerolysin of *Aeromonas hydrophila*

DU Na GU Ze-mao YUAN Jun-fa LIN Li ZHAI Yan-hua LIU Xue-qin LUO Yu-liang

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China

Abstract *Aeromonas hydrophila* is a causative agent of motile aeromonas septicaemia (MAS) and has been associated with illness in a broad spectrum of hosts, including mammals, reptiles, amphibians and fish. Aerolysin (*aer*) gene is one of important virulent factors of *A. hydrophila*. We have isolated *A. hydrophila* Ah15 from fish farms, and it has caused high mortality of fish in Hubei Province, China. In order to obtain purified Aer protein for polyclonal antibody preparation, *aer* gene from *A. hydrophila* Ah15 was amplified by PCR, subsequently, the *aer* gene fragment was cloned into T-vector and sequenced. The length of *aer* gene was 1 482 bp and GenBank number was HQ425625. The deduced open reading frame contained 494 aa in which 24-106 aa was aerolysin/pertussistoxin domain. Based on the *aer* gene sequences from 23 strains of *A. hydrophila* isolated from different countries, phylogenetic analysis showed that all strains were divided into three groups and Ah15 fell into the first group which were all isolated from China. A band of 72.2 ku fusion protein was observed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS and highest expression level was detected in the inclusion body 4 hours after induced by adding IPTG. Western-blotting results showed that the polyclonal antiserum obtained by immunizing rabbits with the purified protein could recognize the recombinant fusion protein and the titer was 1 : 8 000. Taken together, the recombinant aerolysin has good immunogenicity, and will be a good candidate for vaccine development.

Key words *Aeromonas hydrophila*; aerolysin; prokaryotic expression; polyclonal antiserum

(责任编辑:边书京)