

## 溶藻弧菌外膜蛋白 *OmpK* 基因表达和 间接 ELISA 检测方法的初步建立

李星云\*, 丁文超, 陈炯, 史雨红

(宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 溶藻弧菌是中国南部水产养殖业中弧菌病的最主要病原菌, 数量居海洋类弧菌之首, 其快速检测具有重要意义。以溶藻弧菌国内标准株 ATCC17749 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出外膜蛋白 *OmpK* 基因, 将其克隆入表达载体 pET-28a 中, 获得重组质粒 pET-28a-*OmpK*, 限制性内切酶结合琼脂糖凝胶电泳分析和序列测定结果表明, 该序列开放读码框正确且与已发表的 *OmpK* 结构编码序列完全一致。将重组质粒 pET-28a-*OmpK* 转化大肠杆菌 BL21 pLys E, 高效表达重组蛋白, 将其纯化后免疫小鼠所得的高免血清能外膜蛋白 *OmpK* 特异性结合, 表明体外表达的重组蛋白 *OmpK* 具有良好的免疫原性和反应原性。利用该抗溶藻弧菌外膜蛋白 *OmpK* 的抗血清建立了间接 ELISA 检测方法, 检测灵敏度为  $10^4$  CFU/mL, 能特异性检测出溶藻弧菌, 与其他菌株无交叉反应。

**关键词:** 溶藻弧菌; *OmpK* 基因; 原核表达; 间接酶联免疫吸附法

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 为革兰氏阴性嗜盐菌, 广泛存在于海水中, 寄主范围广, 可引起人类伤口感染、食物中毒、中耳炎、胃肠炎<sup>[1]</sup>, 同时可引起海洋动物如海水鱼、虾、贝、蟹伤口感染、胃肠炎和败血症等, 严重影响我国水产养殖业的发展<sup>[2]</sup>。因此, 在水产养殖病害监控及水产品的加工销售过程中, 溶藻弧菌一直是检验检疫的重点。

外膜蛋白 (outer membrane protein, Omp) 是弧菌特有结构外膜的重要组成成分。在感染和诱导宿主免疫反应的过程中起重要作用, 在禽大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[3]</sup>、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)<sup>[4]</sup>、杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*)<sup>[5]</sup>、鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 等病原菌中均有报道。外膜蛋白 *OmpK* 是一种宽宿主的噬菌体受体, 广泛存在于海水鱼致病性弧菌中, 位于弧菌细胞壁外膜的外层, 是弧菌细胞表面一种组成性蛋白, 具

有同外界广泛接触的机会, 它们之间有较高的相似性<sup>[6]</sup>, 是弧菌的主要表面抗原之一。

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是比较成熟的简便、快速、特异、敏感、便于临床推广应用的诊断技术, 广泛应用于生物学和医学等许多领域。对鱼类细菌性疾病的快速检测也在国内外报道较多, 是迄今为止较为常用的检测手段。本实验将溶藻弧菌的外膜蛋白基因 *OmpK* 克隆到原核表达载体 pET-28a 构建重组质粒 pET-28a-*OmpK*, 诱导表达并纯化蛋白, 免疫小鼠制备外膜蛋白 *OmpK* 的多克隆抗体, 初步建立了溶藻弧菌间接 ELISA 检测方法, 为进一步开发诊断试剂奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细菌菌株和质粒

溶藻弧菌 ATCC17749 菌株由浙江省出入境

收稿日期:2010-06-25 修回日期:2010-07-29

资助项目:长江学者和创新团队发展计划 (IRT0734); 国家科技支撑计划 (2007BAD43B08); 浙江省重大国际合作项目 (2006C14017); 宁波市重大委托项目 (2008C10022)

通讯作者:李星云, Tel:0574-87609571, E-mail:limingyun@nbip.net

检验检疫局技术中心微生物室黎昊雁高级工程师惠赠,鳃弧菌 ayu-H080701 由本实验室分离保存,哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) ATCC33866 菌株购自中国普通微生物菌种保藏中心,副溶血弧菌 ATCC33847、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由浙江省疾控中心馈赠。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 pLysE 菌株购自 Promega 公司,克隆载体 pMD19-T Vector 购自 Sigama 公司,原核表达载体 pET-28a 购自 Novagen 公司。

### 1.2 工具酶与试剂

QIAquick Gel Extraction 试剂盒购自 QIAGEN 公司;SDS-PAGE 低分子量蛋白标准购自中国科学院上海生物化学研究所;rTaq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、*Nde* I 和 *Bam*H I 等均购自 TaKaRa 公司;羊抗鼠 IgG (碱性磷酸酶共价结合) 等均购自 Sigma 公司;BCIP/NBT Solution 为 Amresco 公司产品;其余药品试剂均为进口分析纯。溶藻弧菌免疫血清由本实验室制备。抗鼠 IgG (碱性磷酸酶共价结合) 购自 Sigma 公司。溶藻弧菌免疫血清由本实验室制备。用试管凝集法测定抗体效价及交叉反应效价<sup>[7]</sup>。用哈维氏弧菌、铜绿假单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌菌株进行交叉试验,有交叉反应的菌株(副溶血弧菌)进行吸附,即在免疫血清中加入过量的已经灭活了的该菌细胞,混匀,在 4 °C 下过夜,离心,取上清过量除菌。吸附后的血清经测定如无交叉反应,即可分装,于 -70 °C 下保存备用。

### 1.3 溶藻弧菌 *OmpK* 基因的克隆和鉴定

菌体 DNA 的抽提按 Biospin Tissue Genomic DNA Extraction Kit (BioFlux 公司) 操作说明进行。根据 GeneBank 上已登录的相关弧菌的 *OmpK* 基因序列设计引物: VA-*OmpK* (+): CCATATGCG-TAAATCACTTTTAGCTC, VA-*OmpK* (-): CGG-ATCCTTAGAAGTTGTAAGTTACAGCAA, (下划线为添加的限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 的识别序列)。PCR 扩增产物经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶中电泳 (100 V) 初步鉴定后,克隆于 pMD19-T 载体构建重组质粒。通过氨苄抗性及蓝白斑筛选重组子,提取质粒进行 PCR 鉴定。

### 1.4 原核表达载体的构建、诱导表达及可溶性分析

用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切 (双酶切反应体

系如表 2 所示) 质粒 pMD19-T-*OmpK*, 纯化回收后定向插入经同样内切酶双酶切的原核表达载体 pET-28a 中, 构建可在大肠杆菌中表达的重组质粒 pET-28a-*OmpK*。将其转化大肠杆菌 BL21 pLys E 菌株, 挑取单个菌落, 抽提质粒, 经 PCR 和酶切鉴定正确后, 进一步测序鉴定。

将测序正确的重组菌置于 5 mL LB 培养液中 (含 Kan<sup>+</sup> 50  $\mu$ g/mL LB), 37 °C 振荡过夜。次日, 以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基中, 37 °C 继续振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.5~0.8, 加 IPTG 至终浓度为 100  $\mu$ g/mL, 在 37 °C 下 180~200 r/min 摇床培养 4 h 诱导表达。离心收集菌体, 用 20 mL PBS 悬浮菌体, 超声破碎。12 000  $\times$  g, 离心 15 min, 分别取上清和沉淀, 取 15  $\mu$ L 加入等体积的 2  $\times$  样品缓冲液, 沸水中加热 5 min, 12 000  $\times$  g 离心 1 min。取上清, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 G-250 染色检测表达情况。

### 1.5 表达产物的纯化及抗血清制备

按照钱荣华等<sup>[8]</sup>的方法进行包涵体溶解得到可溶性蛋白, 应用 Biologic Duoflow 10 system 纯化蛋白。将纯化的 *OmpK* 蛋白免疫小鼠制备抗血清。首次免疫用弗氏完全佐剂乳化, 加强免疫 3 次, 用弗氏不完全佐剂乳化。最后一次免疫后断食 3 d, 眼动脉取血, 4 °C 静置制备抗血清。

### 1.6 Western-blotting 分析

取融合表达产物及空载体表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 用制备的鼠抗溶藻弧菌外膜蛋白 *OmpK* 阳性血清为一抗, 羊抗鼠 IgG (碱性磷酸酶共价结合) 为二抗进行 Western-blotting 检测, 最后采用 BCIP/NBT 显色, 具体操作参照徐晓娟等<sup>[9]</sup>的方法进行。

### 1.7 间接 ELISA 的初步建立

间接 ELISA 方法实验过程 将所用抗原用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 作适当稀释后包被酶标板, 每孔 100  $\mu$ L, 60 °C 烘干包被抗原。加入含 50 g/L 脱脂奶粉的封闭液, 每孔 150  $\mu$ L, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤后, 加入适当稀释的抗血清 (ELISA 缓冲液稀释), 同时设对照, 每孔 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 2 h。PBST 洗涤后, 加入 1/5 000 的羊抗鼠 IgG - 碱性磷酸酶 (Sigma, ELISA 缓冲液稀释) 作为二抗, 每孔 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 2 h。PBST 洗涤, 加入 1 mg/mL 的 p-Npp (Sigma,

溶于底物缓冲液, pH 9.8), 每孔 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 黑暗中孵育 30 min, 测 OD<sub>405</sub> 值。

**棋盘滴定法选择抗原包被浓度和一抗最适工作浓度** 将 10<sup>8</sup> CFU/mL 浓度的溶藻弧菌作系列 10 倍梯度稀释至 10<sup>5</sup> CFU/mL, 抗血清(作为一抗)和阴性血清做 1:600、1:800、1:1 000 稀释, 每个稀释度都以 PBST 作为空白对照进行间接 ELISA, 且设置 3 个平行孔。以测得的 OD<sub>405</sub> 值为 1.0 左右, 且 P/N 值(阳性对照 OD<sub>405</sub> 值 - 空白对照 OD<sub>405</sub> 值/阴性对照 OD<sub>405</sub> 值 - 空白对照 OD<sub>405</sub> 值)最大的抗原浓度和抗体稀释度作为抗原、抗体最适反应比<sup>[10]</sup>。

**敏感性实验** 将溶藻弧菌菌悬液稀释成 10<sup>7</sup> CFU/mL, 而后进行一系列 10 倍梯度稀释至 10<sup>3</sup> CFU/mL, 将抗血清及阴性血清按 1:800 稀释, 每个稀释度设置 3 个平行孔, 同时以 PBST 作为空白对照, 进行间接 ELISA 实验。以产生的 P/N 值  $\geq 2.1$  判为阳性, 确定最小抗原检测浓度<sup>[11]</sup>。

**交叉实验** 用 McFarland 比浊法将溶藻弧菌、副溶血弧菌等菌浓度都定为 10<sup>7</sup> CFU/mL, 于 60  $^{\circ}$ C 烘干包被酶标板, 每株菌平行包被 3 孔, 阴性血清和阳性血清均采用 1:800 的稀释度, 同时以 PBST 作为空白对照, 进行间接 ELISA 实验, 以产生的 P/N 值  $\geq 2.1$  判为阳性, 确定交叉反应情况<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pET-28a-OmpK 的构建及鉴定

经 PCR 扩增得到约 809 bp 的特异性条带(图 1), 与预期值一致。重组质粒 pET-28a-OmpK 进行 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切, 产生一条与 PCR 产物大小一致的片段(图 2), 将该重组质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序, 序列分析表明该重组质粒含有外膜蛋白 *OmpK* 基因序列, 且没有发生突变, 该基因在 GeneBank 中的登录号为 DQ063588, 其预测的 *OmpK* 蛋白分子量约为 29.4 ku, 表明重组质粒 pET-28a-OmpK 构建成功。

### 2.2 原核表达和抗血清制备

重组质粒在大肠杆菌 BL21 pLys E 中经 IPTG 诱导表达(图 3), 出现两条高表达目的蛋白带, 分子量分别为 29.4 ku 左右和小于 29.4

ku。取表达菌体超声波破碎并离心后的上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳, 可见融合表达产物大部分以包涵体形式存在于菌体沉淀中。包涵体经破碎纯化, 目的蛋白溶于缓冲液中, 经 Biologic Duoflow 10 system 纯化后, 电泳检测结果显示两条带蛋白均可通过镍柱亲和层析被纯化出来(图 3), 初步分析它们均是具有 His-tag 的目的蛋白。将纯化的蛋白免疫小鼠, 制备抗血清。

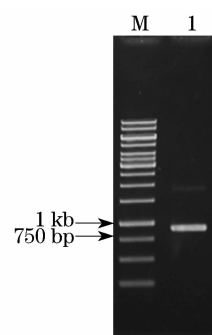


图 1 溶藻弧菌的 *OmpK* 基因 PCR 产物电泳图

M:1 kb DNA 标准分子量(Fermentas 公司); 1: PCR 扩增产物。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of *ompK* gene obtained by amplification from *V. alginolyticus*

M:1 kb DNA Marker(Fermentas company); 1: PCR product of *ompK* gene.

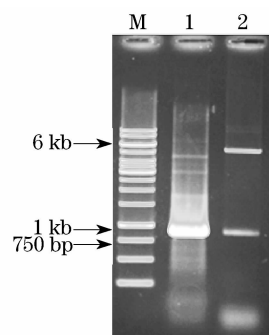


图 2 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定结果

M:1 kb DNA 标准分子量(Fermentas 公司); 1:PCR 鉴定结果; 2:*Bam*H I 和 *Nde* I 双酶切鉴定结果。

Fig.2 Electrophoresis identification of the pET-28a-OmpK recombinant plasmid by restriction enzyme analysis and PCR analysis

M:1 kb DNA Marker (Fermentas Company); 1: PCR identification results; 2: *Bam*H I and *Nde* I double enzyme restriction digestion results.

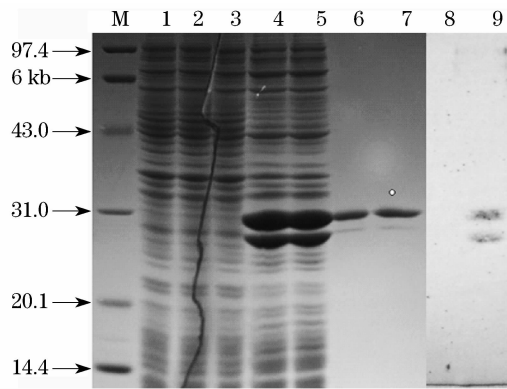


图3 pET-28a-OmpK 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达和 Western-blotting 结果

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质; 1: BL21 Plys E 表达菌株 IPTG 诱导 4 h; 2: pET-28a 空载体 IPTG 诱导; 3: pET-28a-OmpK 重组表达载体未诱导; 4、5: pET-28a-OmpK 重组表达载体 IPTG 诱导; 6、7: 重组蛋白纯化后的电泳结果; 8: BL21 空载体菌体蛋白硝酸纤维素杂交膜印迹; 9: OmpK 蛋白硝酸纤维素杂交膜印迹。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pET-28a-OmpK expression in *E. coli*

M: protein marker; 1: total protein of BL21 Plys E bacteria; 2: the bacteria contain pET-28a plasmid induced by IPTG; 3: the bacteria contain pET-28a-OmpK plasmid non-induced by IPTG; 4、5: the bacteria contain pET-28a-OmpK plasmid induced by IPTG; 6、7: purified recombinant protein; 8: Total protein of BL21 bacteria react with antiserum; 9: Total proteins of bacteria contain recombinant OmpK.

### 2.3 Western-blotting 检测

Western-blotting 检测表明, 制备的抗血清能与转化有 pET-28a-OmpK 质粒的 BL21 pLysE 裂解物的两条高表达目的蛋白带均起强特异性反应, 与纯化后的目的蛋白在分子量为 29.4 ku 处也有一特异性免疫反应带(图 3), 抗血清与 pET-28a 载体空转的 BL21 pLysE 裂解物不起反应。

### 2.4 抗原、抗体最适工作浓度的确定

从表 1 可以看出, 当抗原浓度为  $10^7$  CFU/mL、一抗稀释度为 1:800 时, 所得的  $OD_{405}$  值在 1.0 左右, 且 P/N 值较大, 因此本实验采用抗原浓度为  $10^7$  CFU/mL、抗体稀释度为 1:800 作为抗原抗体最适工作浓度。

### 2.5 敏感性实验

敏感性实验用最适稀释度的血清(1:800, V/V), 通过间接 ELISA 实验, 测定抗原检测的灵敏度。测定结果显示, 菌悬液浓度为  $10^4$  CFU/mL 时即可检出, 即每孔  $10^3$  CFU/mL(表 2)。

### 2.6 交叉实验

检测副溶血弧菌、鳃弧菌、哈维氏弧菌、铜绿假单胞菌与抗溶藻弧菌阳性血清交叉反应情况, 溶藻弧菌作对照。结果显示, 只有溶藻弧菌呈阳性, 其余细菌均呈阴性(表 3)。

表 1 棋盘滴定法确定抗原、抗体最适工作浓度

Tab. 1 Determination of the optimum antigen concentration and the optimum antisera concentration

一抗稀释度 serum dilution		抗原包被浓度(CFU/ mL) antigen concentration			
		$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$
1:600	positive serum $OD_{405}$	2.982 133	1.276 040	0.950 292	0.253 664
	negative serum $OD_{405}$	0.159 028	0.148 417	0.121 977	0.112 643
	P/N	48.203 860	23.921 190	37.400 370	11.506 940
1:800	positive serum $OD_{405}$	1.689 060	1.128 417	0.435 108	0.184 812
	negative serum $OD_{405}$	0.165 654	0.123 987	0.114 723	0.110 895
	P/N	23.931 580	41.557 360	21.667 780	7.331 944
1:1 000	positive serum $OD_{405}$	0.958 347	0.944 159	0.338 416	0.130 593
	negative serum $OD_{405}$	0.160 510	0.135 011	0.129 520	0.123 717
	P/N	14.017 690	23.608 430	7.894 561	1.280 703

表 2 免疫血清敏感性实验结果

Tab. 2 Result of antisera sensitivity

	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$
阳性血清 $OD_{405}$ positive serum $OD_{405}$	1.791 090	0.851 713	0.494 211	0.231 458	0.183 428
阴性血清 $OD_{405}$ negative serum $OD_{405}$	0.171 727	0.199 830	0.164 297	0.149 577	0.166 010
P/N	28.654 780	8.522 392	7.452 911	3.249 077	1.329 643

表 3 免疫血清交叉实验结果  
Tab.3 Result of antisera cross test

	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>
阳性血清 OD <sub>405</sub> positive serum OD <sub>405</sub>	1.964 24	0.302 645	0.377 949	0.229 291	0.403 264 3
阴性血清 OD <sub>405</sub> negative serum OD <sub>405</sub>	0.198 493	0.206 672 7	0.224 12	0.239 254	0.252 213
P/N	21.076 904	1.998 370 2	1.193 136	0.922 589	2.066 224 6
交叉反应 cross-reactivity	+	-	-	-	-

### 3 讨论

外膜蛋白是革兰氏阴性菌细胞壁的特有成分,位于细菌的表层,具有直接与机体免疫系统接触的机会,并且在维持外膜结构,保证物质运输,作为大肠菌素、噬菌体受体以及参与 F 因子结合等方面有重要作用<sup>[12]</sup>。另外, *Omp* 在细菌致病性和免疫性中的作用也日益受到重视。鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌等菌的外膜蛋白已成功获得分离<sup>[6,13]</sup>。*OmpK* 是一种孔蛋白,在结构和生物学功能方面具有保守性,它是细菌细胞内外物质交流的通道,同时也是细菌定植于宿主组织的主要粘附素。Inoue 等<sup>[14]</sup>从蛋白水平和基因水平上证实外膜蛋白 *OmpK* 在海水鱼致病性弧菌中普遍存在,说明外膜蛋白 *OmpK* 是一种宽宿主的噬菌体受体,广泛存在于多种弧菌之中。

溶藻弧菌是中国南部水产养殖业中弧菌病的最主要病原菌<sup>[15]</sup>。本实验利用 PCR 技术以溶藻弧菌国内标准株 ATCC17749 基因组 DNA 为模板成功扩增出外膜蛋白 *OmpK* 基因,将其克隆入表达载体 pET-28a,鉴定和筛选出含 *OmpK* 基因正确阅读框架的 pET-28a-*OmpK* 重组质粒,进一步转化进诱导表达系统 *E. coli* BL21 pLys E,诱导表达获得重组蛋白。本研究中原核表达出现两条高表达条带,其中一条略小于预测大小,都可经过镍柱亲和层析被纯化,说明两者均具有 His tag 标记,是表达的重组蛋白,惟大小不同且其中一条略小,可能是由于表达过程中提前终止引起的。Western-blotting 免疫印迹分析发现,用纯化的融合重组蛋白免疫小鼠制备的鼠抗高免血清抗体能特异性识别外膜蛋白的两条表达带,表明该重组蛋白具有良好的免疫原性和反应原性。

目前对溶藻弧菌的检测方法报道很多,如常规的微生物学检测、DNA 指纹技术<sup>[16]</sup>、实时荧光定量 PCR<sup>[15,17]</sup>、DNA 微阵列技术<sup>[17]</sup>等。采取常

规的细菌分离及生化鉴定的方法,费时较长;而 PCR 技术虽然具有特异性好、检测速度快且灵敏等优点,但是成本较高。间接 ELISA 方法是血清学检测方法中较为敏感、特异的方法,具有操作方便、易重复、所需仪器设备简单等优点,目前已在医学临床上和生物学研究中广泛地用于检测各种抗原、抗体。

选择合适的抗原是建立间接 ELISA 检测方法的关键。黄志坚等<sup>[13]</sup>研究发现与 VA-LPS 和灭活菌苗相比 VA-OMP 具有较强的免疫原性。本研究利用抗溶藻弧菌外膜蛋白 *OmpK* 的抗血清建立了 ELISA 检测方法,检测灵敏度为 10<sup>4</sup> CFU/mL。另外,吸附实验去除了抗血清中溶藻弧菌与其他细菌的多数共同抗体,增加了与溶藻弧菌反应的特异性。为了更好的将这种方法应用于养殖生产实践,可通过进一步的完善,将研究成果转化为商品化的检测试剂盒,可能会具有良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] Hlady W G, Klontz K C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981 - 1993 [J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(5): 1176 - 1183.
- [2] Lee K K, Yu S R, Liu P C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *V. alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Curr Microbiol*, 1997, 34(2): 110 - 117.
- [3] 高崧, 吴晓东, 张扬, 等. 禽大肠杆菌外膜蛋白、脂多糖疫苗的免疫保护试验 [J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(5): 457 - 459.
- [4] Habibur M, Kenji K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10: 379 - 382.
- [5] Peter L, Anrice M E, Oberter W H, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provided protective immunity to rainbow trout [J]. *Infect and Immun*,

- 1995,63(8):3137-3142.
- [6] 杨智慧,李宁求,白俊杰,等. 19株海水鱼致病性弧菌 *OmpK* 基因序列及其抗原性分析[J]. 中国水产科学,2006,13(5):807-813.
- [7] 林清华. 免疫学实验[M]. 武汉:武汉大学出版社,1999:254-260.
- [8] 钱荣华,于涟,毛芝娟,等. 溶藻弧菌铁调蛋白基因的克隆、表达及其特征分析[J]. 科技通报,2007,23(5):651-657.
- [9] 徐晓娟,何启盖,徐高原,等. 胸膜肺炎放线杆菌 *apxII-CA* 基因的克隆、表达及 *apxII* ELISA 检测方法的初步建立[J]. 中国兽医学报,2004,24(4):335-337.
- [10] 樊景凤,梁玉波,宋立超,等. 凡纳滨对虾红体病病原菌间接 ELISA 快速检测方法的研究[J]. 水产学报,2006,30(1):113-117.
- [11] 张晓华,Robertson P, Austin B, 等. 检测海洋弧菌的酶联免疫吸附实验研究[J]. 青岛海洋大学学报,1997,27(3):326-331.
- [12] 徐建国. 分子医学细菌学[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [13] 黄志坚,何建国. 溶藻弧菌外膜蛋白(Va-OMP)的免疫原性及免疫保护性[J]. 水产学报,2006,30(4):509-543.
- [14] Inoue T, Matsuzaki S, Tanaka S, *et al.* A 26 kD outer membrane protein, OmpK, common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibrio phage, KVP40 [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995,125(1):101-105.
- [15] Zhou S, Hou Z, Li N, *et al.* Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(5):1897-1906.
- [16] George M R, John K R, Iyappan T, *et al.* Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting [J]. Lett Appl Microbiol, 2005, 40(5):369-372.
- [17] Tracz D M, Backhouse P G, Olson A B, *et al.* Rapid detection of *Vibrio* species using liquid microsphere arrays and real-time PCR targeting the *ftsZ* locus [J]. J Med Microbiol, 2007, 56(1):56-65.

## Expression of *OmpK* gene of *Vibrio alginolyticus* and development of a detection method of indirect ELISA

LI Ming-yun<sup>\*</sup>, DING Wen-chao, CHEN Jiong, SHI Yu-hong

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** *Vibrio alginolyticus* is the main *Vibrio* pathogen in aquaculture in the south of China, the number of which is the largest in marine *Vibrio* class. In the present study, the outer membrane protein K gene (*OmpK*) of *V. alginolyticus* strain ATCC17749 was amplified by PCR and cloned into high efficient expression vector pET28a. The results of sequencing and restriction enzyme analysis combined with agarose gel electrophoresis showed that the open reading frame sequence was correct and fully consistent with what had reported. The recombinant plasmid of pET-28a-*OmpK* was successfully constructed and transformed into *E. coli* BL21 pLys E. The fusion protein was expressed under the IPTG inducing condition, and the expression product was purified by an affinity chromatographic method. Mouse anti-*OmpK* poly-clonal antibodies (PABs) were obtained via applying protein *OmpK* as antigen to immune mice. Western-blotting analysis proved the recombinant protein has a good reactive ability against *OmpK* positive serum. Then, an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the rapid diagnosis of *V. alginolyticus* has been developed using the PABs. The lowest *V. alginolyticus* suspension was  $10^4$  CFU/mL. Cross reactions of antisera with other bacteria were detected, and all results were negative. The results indicated the suitability and simplicity of the test as a rapid, field diagnostic tool for *V. alginolyticus* and it can be used for the rapid detection of *V. alginolyticus*. Further investigation will be focused on the development of an indirect ELISA Kit for the detection of *V. alginolyticus*.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; *OmpK* gene; prokaryotic expression; indirect ELISA

**Corresponding author:** LI Ming-yun. E-mail: limingyun@nbip.net