

DOI: 10.11964/jfc.20221213821

杀香鱼假单胞菌外膜蛋白 Tol C 的原核表达及其对大黄鱼的免疫保护效果

王莹^{1,2}, 汪浩^{1,2}, 徐伟^{1,2}, 汪玮^{2*}, 施慧², 王庚申², 谢建军², 何杰², 许文军²

1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江舟山 316021

摘要:

【目的】评价大黄鱼杀香鱼假单胞菌外膜蛋白 Tol C (GenBank: EPB97112.1) 的免疫保护效果。

【方法】通过原核表达获得重组的 Tol C 功能域蛋白, 命名为 B6。用兔抗杀香鱼假单胞菌多抗血清对 B6 进行免疫原性的初步检测。将 B6 与明矾佐剂混合制成亚单位疫苗, 腹腔注射免疫大黄鱼, 免疫 4 周后攻毒, 检测相对保护率 (relative percent survival, RPS)。同时, 采集免疫后第 2、4、6、8 周的大黄鱼血清、头肾和脾脏, 测定血清抗体效价和免疫相关基因的表达变化。采集健康和攻毒后大黄鱼的头肾和脾脏组织, 制成石蜡切片, 观察组织病理变化。

【结果】B6 分子质量为 22 ku。Western blot 结果显示, 杀香鱼假单胞菌兔抗血清与 B6 具有强结合条带。接种 B6 亚单位疫苗 4 周后, RPS 达 72.22%。ELISA 结果显示, 免疫后第 2 周起, 血清抗体效价显著升高, 第 4 周时达到峰值 (\log_2 8.65), 随后略有下降, 第 8 周时降至 \log_2 6.98。荧光定量 PCR (RT-PCR) 结果显示, 免疫后第 2、4、6、8 周, 头肾和脾脏中免疫相关基因均有不同程度的表达上调, 其中 *IL-1 β* 和 *MHC I α* 的上调幅度最大, 头肾中分别达到 93.33 倍和 77.02 倍, 脾脏中分别达到 241.13 倍和 131.95 倍。除 *CD8* 外, *IgM*、*IL-1 β* 、*CD4*、*MHC I α* 和 *MHC II β* 在脾脏中的表达上调幅度均高于头肾。石蜡切片显示, 对照组在攻毒后头肾和脾脏组织中出现严重的出血点和结节, 并伴随不同程度的铁黄素沉积, B6 免疫组在头肾和脾脏组织中仅有少量出血点, 无结节和铁黄素沉积。

【结论】通过对大黄鱼杀香鱼假单胞菌外膜蛋白 Tol C 进行原核表达和免疫保护效果评价, 发现 B6 具有良好的免疫原性, 免疫后 4 周 RPS 达 72.22%, 具有作为亚单位候选疫苗的潜力。

关键词: 大黄鱼; 杀香鱼假单胞菌; Tol C; 免疫保护

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国沿海重要的养殖经济鱼类, 近年来, 由于海水养殖密度过高, 水体流通不畅, 海区污染日趋严重,



第一作者: 王莹, 从事海水养殖病害研究, E-mail: 2433760749@qq.com



通信作者: 汪玮, 博士, 从事海水养殖病害研究, E-mail: youcaoke@zjou.edu.cn



资助项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划项目 (2022SNJF70); 国家重点研发计划 (2020YFD0900803); 浙江省基础公益研究计划 (LGN21C190006); 浙江省海洋水产研究所科技计划项目 (HYS-ZX-202102)

收稿日期: 2022-12-01

修回日期: 2023-02-21

文章编号:

1000-0615(2025)02-029415-11

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



病害频繁发生^[1-2]。由杀香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 感染引起的内脏白点病, 是目前网箱养殖大黄鱼常发的细菌性疾病, 患病鱼体通常可见脾脏、肾脏等器官出现大量白色结节 (内脏白点) 并伴随腹水^[3], 发病死亡率高达 70%~80%^[4], 给大黄鱼养殖业造成了巨大的经济损失。

外膜蛋白是革兰氏阴性菌外膜的主要构成部分, 在维持外膜结构和物质转运等方面发挥重要作用^[5], 当病原菌入侵和感染宿主时, 外膜蛋白可起到黏附素 (adhesin) 的作用^[6]。作为病原菌与宿主免疫防线发生接触的主要部位, 外膜蛋白中的一部分被证实具有良好的免疫原性^[7-8]。Tol C 蛋白是革兰氏阴性菌的一种外膜通道蛋白, 介导多种类型化合物的胞外转运, 参与细菌应对外界不利环境的耐受^[9]。研究表明, 在副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi*)^[10]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[11]、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)^[12] 中, Tol C 蛋白均表现出较强的免疫原性, 对于宿主抗细菌感染具有良好的保护效果。目前, 尚未见杀香鱼假单胞菌 Tol C 蛋白免疫原性研究的相关报道。本研究针对生产上日益严重的大黄鱼内脏白点病, 基于已公布的大黄鱼杀香鱼假单胞菌基因组, 通过分子克隆和原核表达, 构建杀香鱼假单胞菌 Tol C 蛋白亚单位疫苗, 对其免疫保护效果进行评估, 以期为大黄鱼内脏白点病的免疫防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杀香鱼假单胞菌毒力株由本实验室从患典型内脏白点病的大黄鱼头肾、脾脏组织中分离鉴定并保存, 原核表达质粒 pET-30a (+) 为本实验室保存, pEasy-T 克隆质粒、BL₂₁(DE₃) 表达菌株购自北京全式金生物技术股份有限公司。

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Roche (瑞士)。胶回收、RNA 提取试剂购自 Omega Bio-Tek (美国)。反转录、荧光定量 PCR (RT-PCR) 试剂购自 TaKaRa (日本)。过硫酸铵、30% 丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (TEMED)、考马斯亮蓝 R-250 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。HRP 标记的羊抗兔

IgG 购自北京索莱宝科技有限公司。兔抗杀香鱼假单胞菌多抗血清、兔抗大黄鱼 IgM 血清为本实验室自制。大黄鱼购自浙江舟山长峙岛网箱。

本研究获得了浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (审批号: 2023033), 实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学伦理规范, 并按照浙江海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 杀香鱼假单胞菌 Tol C 基因克隆

根据 NCBI 中登录的大黄鱼源杀香鱼假单胞菌 NB2011 株外膜蛋白 Tol C 序列 (GenBank 登录号: EPB97112.1), 通过 SMART 在线工具预测 Tol C 结构和功能域, 从中选取特异的外膜蛋白结构域作为克隆靶点。用 DNAMAN、Primer premier 等软件分析蛋白编码序列组成并设计特异性扩增引物, 在引物两端添加适当的酶切克隆位点, 设计好的引物序列为 B6-F: gaattcATGCTCAACGAAGCCGTTTCAGAA (*Bam*H I), B6-R: aagcttCCCGACGACGCTGTAG AAGT (*Hind* III), 下划线处为酶切位点。PCR 扩增参数: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增引物连接 pEasy-T 克隆质粒, 经测序无误后保存。

1.3 原核表达载体构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别双酶切 T 质粒和 pET-30a (+) 质粒, 电泳后回收酶切产物, 按载体与目的片段物质的量 1:4 的比例建立连接反应, 连接产物转化 DH5 α , 提取阳性克隆质粒, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序无误的质粒经双酶切进一步验证。将连接成功的质粒转化至 BL21 (DE3) 表达株, 筛选阳性转化子, 冻存于 -80 °C 备用。

1.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

将构建好的原核表达株在含有卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中培养至 OD 值为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 30 °C 诱导表达 5 h, 离心收集菌体, 加入 8 mol/L 尿素裂解, 离心取上清液, 加入 5 \times 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白表达。重组包涵体蛋白的纯化按常规方法进行, 纯化的蛋白于 4 °C 进行尿素

复性透析至磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 以 SDS-PAGE 检测重组蛋白的纯化效果。收集透析的蛋白溶液, 按照 Bradford 蛋白浓度检测试剂盒说明书测定蛋白浓度后于 -80°C 保存。

1.5 免疫印迹分析

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转至硝酸纤维素膜上, 5% BSA 封闭过夜, 以制备的新西兰兔抗杀香鱼假单胞菌多克隆抗体作为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, 孵育完成后, 用 ECL 化学发光试剂盒显色。

1.6 大黄鱼免疫与攻毒

平均体重约 50 g 的健康大黄鱼, 在室内水泥池 (4.0 m×4.0 m×1.7 m) 充气暂养 1 周后进行免疫实验。实验开始前随机取 5 尾大黄鱼的血清作为阴性对照。实验分 2 组, 其中 1 组为免疫组, 1 组为对照组, 每组设 3 个平行, 每个平行 35 尾。将纯化好的重组蛋白与明矾佐剂按照体积比 1:1 比例混合制成亚单位疫苗, 腹腔注射免疫组大黄鱼, 每尾注射 0.1 mL (免疫剂量为每克鱼肌肉注入 2 μg 蛋白), 对照组注射等量的 PBS, 以消毒曝气后的海水充气暂养, 实验期间水温为 (14±3) $^{\circ}\text{C}$, 每日投喂 1 次商品饵料, 吸污换水 1 次。免疫 4 周后, 根据攻毒预实验数据, 采用 5×10^4 CFU/mL 菌液浸泡 30 min 进行攻毒, 攻毒后每日观察记录鱼的发病和死亡情况, 连续观察 14 d, 统计死亡率, 计算相对保护率 (relative percent survival, RPS)。对攻毒期间死亡的鱼进行无菌解剖和细菌分离培养, 以确定死亡是否源于攻毒菌株。

1.7 血清抗体效价检测

免疫后的第 2、4、6、8 周, 每组随机抽取 3 尾鱼, 用 MS-222 麻醉后, 尾静脉采血, 离心收集血清, 通过间接 ELISA 检测抗体效价。将血清进行梯度稀释, 分别与 1:5 000 稀释的兔抗大黄鱼 IgM 血清、1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后, 加入 TMB 底物显色, 于 450 nm 读数。

1.8 免疫相关基因表达检测

免疫后的第 2、4、6、8 周, 每组随机抽取 3 尾实验鱼, 麻醉后用无 RNA 酶剪刀、镊子取头肾和脾脏组织, 置于装有 RNA 保护液的无

菌 EP 管中, -80°C 保存。取冻存组织 30~50 mg, 用 RNA 小量抽提试剂盒 (Omega Bio-Tek, 美国) 提取总 RNA, NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度后, 反转录成 cDNA, -20°C 保存备用。

根据 NCBI 登录的大黄鱼 β -actin、IgM、IL-1 β 、MHC I α 、MHC II β 、CD4、CD8 基因编码序列, 用 Primer premier 软件设计 RT-PCR 引物 (表 1)。RT-PCR 反应根据 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书进行, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 40 个循环; 熔解曲线反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。以 β -actin 作为内参基因, 每个样本设置 3 个平行重复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物
Tab. 1 RT-PCR primers

基因 genes	NCBI 登录号 NCBI accession no.	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')
β -actin	EU443733.1	F: AGGCTGTGCTGTCCCTGTATG R: GCAGAGCGTAACCCTCGTAG
IgM	FJ589726.1	F: CTTACGAGTCCATACCACAA R: GCTATACACCACATCATTCTT
IL-1 β	KJ459927.1	F: TGGGACTGGACTTGGAGGTT R: GGTCACGCTGCACTGGTAAT
MHC I α	CX349048.1	F: GAGGTGTCCACATTTTCCA R: GAAGTCTTCTCCATCATAACCAT
MHC II β	EF681864.1	F: CCCAGGTCTGGAGAGAAG R: CCGATGGCGATCTTGTTT
CD4	KP099054.1	F: CAAATCATCTCCTCTCCAG R: ATCGCAATTCAGGTCAG
CD8	XR_002042929.2	F: TGTCTTGTAGTCCACTCATACT R: CGGTTTTCTTTTGTAAATGGTGT

1.9 组织切片观察

攻毒后第 7 天, 鱼体表出现掉鳞、溃疡, 陆续死亡时, 每组随机取 3 尾实验鱼, 用锋利剪刀、镊子分别取免疫组和对照组大黄鱼的脾脏和头肾组织, 用多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红 (H.E) 染色后用显微镜观察并拍照保存。另取 3 尾健康未攻毒的大黄鱼相同组织制作切片, 作为参照。

1.10 数据分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 各组相同指标的数据进行单因素方差分析, 结果用平均值±标准差 (mean±SD) 表示。

2 结果

2.1 Tol C 基因的克隆和原核表达载体的构建

通过 SMART 蛋白结构域在线分析工具对杀香鱼假单胞菌 Tol C 蛋白序列 (EPB97112.1) 进行分析。结果显示, Tol C 含有 2 个重复的 OEP (outer membrane efflux protein) 结构域, 分别位于蛋白第 25~222 氨基酸 (图 1-a) 和第 242~427 氨基酸 (图 1-b) 位置。OEP 结构域包含 1 个跨细胞间质的 α 螺旋和 12 个跨外膜的 β 折叠, 可形成完整的 3 聚体跨外膜通道。实验选取第 25~222 位氨基酸的 OEP 结构域作为克隆靶点, 根据蛋白编码框设计 PCR 扩增引物。

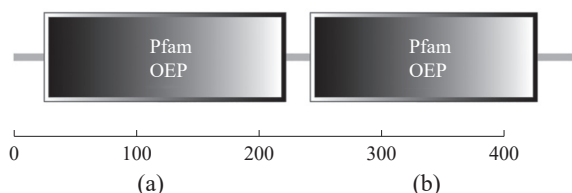


图 1 OEP 结构域

Fig. 1 OEP domains

以实验室保存的杀香鱼假单胞菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得大小为 594 bp 的片段 (图 2-a)。经测序和 BLAST 比对, 该片段序列与 NB2011 株 Tol C 编码序列同源性为 100%。

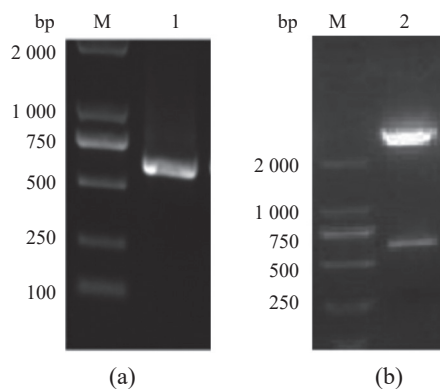


图 2 杀香鱼假单胞菌 Tol C 基因 PCR 扩增产物 (a) 和原核表达载体的构建 (b)

M. DNA 分子质量标准; 1. Tol C PCR 扩增产物; 2. 原核表达 Tol C-pET-30a (+) 双酶切。

Fig. 2 PCR amplification Tol C gene (a) and construction of prokaryotic expression vector (b) of *P. plecoglossicida*

M. DNA marker; 1. PCR product of Tol C; 2. double enzyme digestion of pet-30 a (+) vector.

通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 克隆位点, 将 Tol C 基因插入 pET-30a (+) 质粒的表达框, 筛选阳性克隆, 经测序和酶切鉴定, Tol C 编码序列成功导入 pET-30a (+) 编码框, 重组质粒双酶切获得预期大小的片段 (图 2-b), 证明原核表达质粒构建成功。

2.2 重组蛋白诱导表达和纯化

将构建成功的表达质粒转入 BL21 (DE3) 表达菌株, 挑取阳性转化子进行蛋白诱导表达。加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导 5 h 后, 取全菌蛋白进行 SDS-PAGE。以转化了 pET30a (+) 的 BL21 作为空白对照, 电泳结果显示, 与对照组相比, 转化了重组表达质粒的实验组在 25 ku 左右有一显著诱导条带, 与预期的重组蛋白 (含 His 标签) 大小相符 (图 3-a), 证明诱导表达成功, 将表达成功的重组蛋白命名为 B6。菌液经超声破碎、离心后进行 SDS-PAGE, 结果显示 B6 主要以包涵体形式存在。将表达的蛋白包涵体用 8 mol/L 尿素裂解, 经镍柱纯化后获得单一的条带 (图 3-b)。纯化的重组蛋白 B6 经梯度尿素复性后, 用 Bradford 法测定浓度, 加入 20% 甘油冻存于 -20 °C。

2.3 重组蛋白的免疫原性分析

将纯化的重组蛋白 B6 经 SDS-PAGE 电泳、半干法转膜、抗体孵育、ECL 化学发光试剂盒显色后 (图 4), B6 与杀香鱼假单胞菌兔抗血清

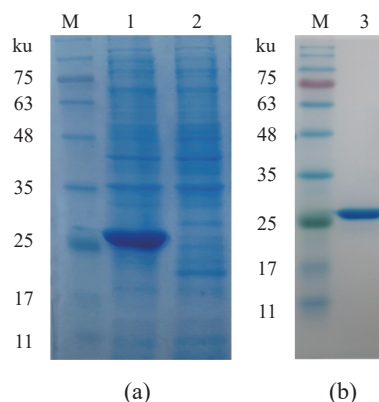


图 3 重组蛋白的诱导表达 (a) 及纯化 (b)

M. 蛋白分子质量标准; 1. B6 蛋白诱导表达; 2. 对照; 3. B6 蛋白纯化。

Fig. 3 Induced expression of recombinant protein (a) and purification (b)

M. protein marker; 1. induced expression of B6 protein; 2. control; 3. purification of B6 protein.

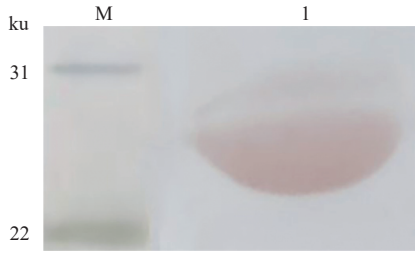


图4 Western blot 检测免疫原性

M. 蛋白分子质量标准; 1. 兔抗血清与重组 B6 蛋白结合条带。

Fig. 4 Immunogenicity was detected by Western blot

M. protein marker; 1. binding band of rabbit antiserum to recombinant B6 protein.

具有强结合条带, 证明 B6 具有良好的免疫原性。

2.4 免疫相对保护率 (RPS)

健康大黄鱼接种 B6 疫苗 4 周后进行浸泡攻毒。攻毒后第 4 天, PBS 对照组陆续出现死亡。第 1~6 天, B6 免疫组无死亡现象; 第 11 天后, 两组都趋于稳定, 无新增死亡出现。对照组在第 8 天到第 10 天达到死亡高峰; B6 免疫组攻毒后死亡趋势整体较为平缓, 没有暴发性集中死亡出现。连续观察 14 d, PBS 对照组和 B6 免疫组的累积死亡率分别为 75.00%、20.83%, 由此计算出 B6 免疫组的 RPS 为 72.22% (图 5)。

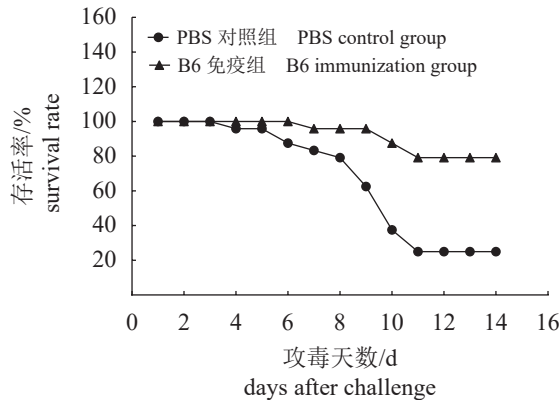


图 5 攻毒后 14 d 存活率统计

Fig. 5 Survival rate of 14 days after challenge

2.5 血清抗体水平

免疫后第 2、4、6、8 周, PBS 对照组和 B6 免疫组的血清抗体水平检测结果显示, B6 免疫组血清抗体水平在第 4 周达到峰值 (\log_2 值为 8.65), 随后缓慢下降, 第 8 周时降至 6.99 (\log_2 值); B6 免疫组血清抗体水平在第 2~8 周均显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.05$) (图 6)。

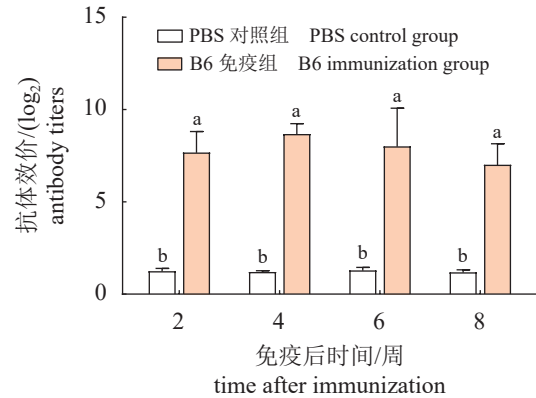


图 6 免疫后大黄鱼血清抗体水平变化

每一个柱子代表平均 \log_2 值 \pm SD, 当 $P/N \geq 2$ ($P/N = \text{待测血清 OD}_{450} / \text{阴性血清 OD}_{450}$) 时血清的最高稀释度。不同字母表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。2、4、6、8 分别表示免疫后第 2、4、6、8 周取样时间, 下同。

Fig. 6 Changes of serum antibody level of *L. crocea* after immunization

Each bar represents mean \log_2 value \pm SD of the highest dilution of the serum when $P/N \geq 2$ ($P/N = \text{OD}_{450}$ of the inspected sera / OD_{450} of the negative serum). Different letters showed significant difference compared with the control group ($P < 0.05$). 2, 4, 6, 8 respectively indicated the sampling time at 2, 4, 6, 8 weeks after immunization, the same below.

2.6 免疫相关基因的表达变化

免疫后第 2~8 周, 头肾和脾脏组织中相关免疫基因的表达变化趋势如图 7 所示。其中, *IgM*、*IL-1 β* 、*MHC II β* 、*CD4*、*CD8* 基因的表达水平均呈现出先升高后降低的趋势: 头肾组织中, *IgM*、*IL-1 β* 、*MHC II β* 在免疫后第 4 周达到峰值, *CD4*、*CD8* 在第 6 周达到峰值。脾脏组织中, *IgM*、*IL-1 β* 、*MHC II β* 、*CD4*、*CD8* 均在第 6 周达到峰值。此外, *MHC I α* 表达水平在免疫后第 2~8 周一一直呈上升趋势。在所检测的 6 个基因中, *IL-1 β* 、*MHC I α* 的相对表达量变化最大, 最高倍数分别达到 241.13 倍 (*IL-1 β* , 脾脏组织, 第 6 周) 和 132.95 倍 (*MHC I α* , 脾脏组织, 第 8 周)。除 *CD8* 外, 其余 5 个基因在脾脏组织中的表达量均高于头肾组织。

2.7 攻毒后组织病理变化

对采集的大黄鱼脾脏样品进行 H.E 染色, 结果显示, 健康未攻毒大黄鱼脾脏含有脾髓, 由淋巴细胞、巨噬细胞和各类粒细胞等组成, 部分区域由红髓和白髓相嵌而成 (图版-1)。PBS 对照组攻毒后, 脾脏出血严重并且伴随着

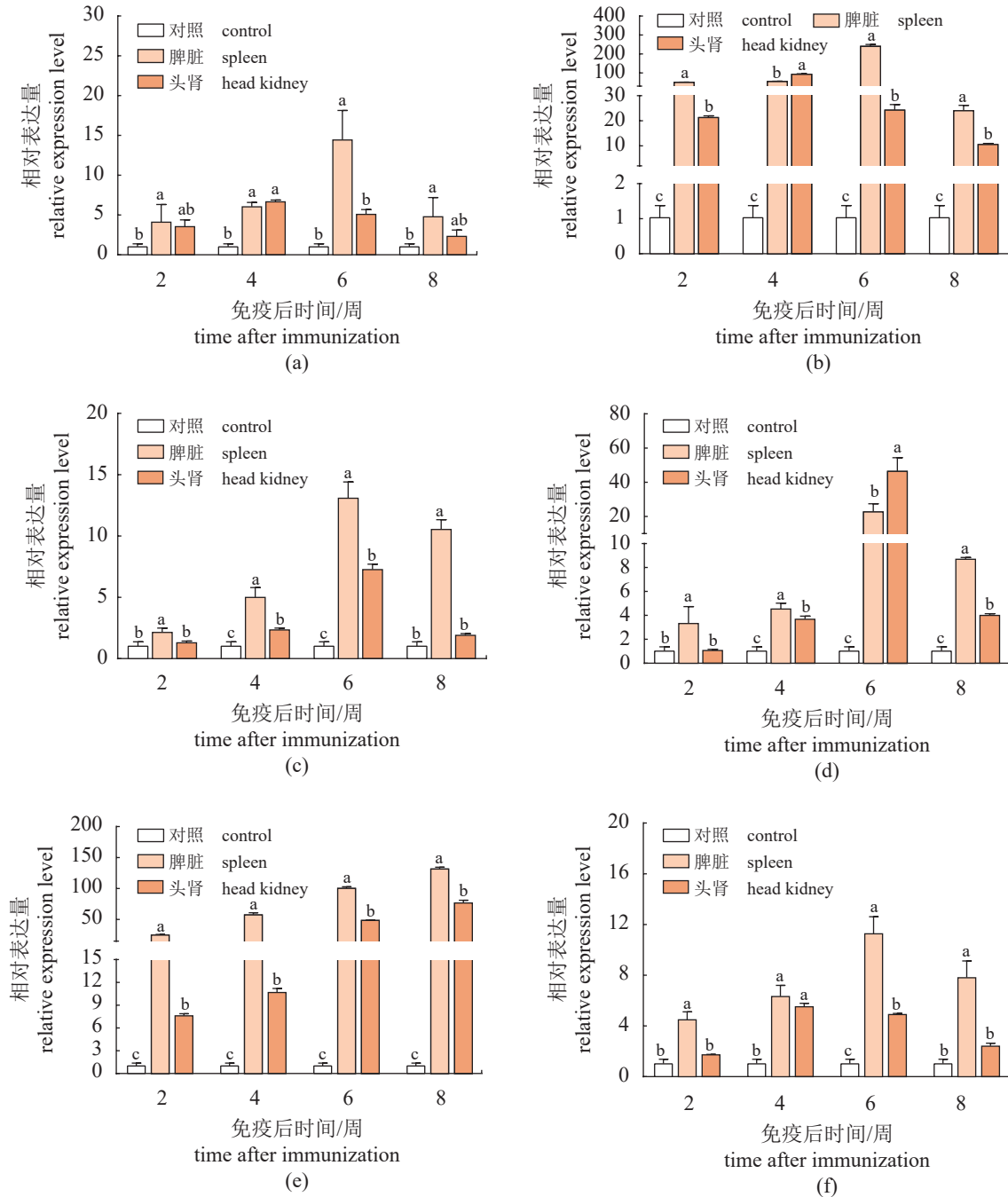


图7 大黄鱼免疫后2~8周免疫相关基因的表达变化

(a) *IgM*, (b) *IL-1 β* , (c) *CD4*, (d) *CD8*, (e) *MHC I α* , (f) *MHC II β* ; 不同字母表示相同条件下实验组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

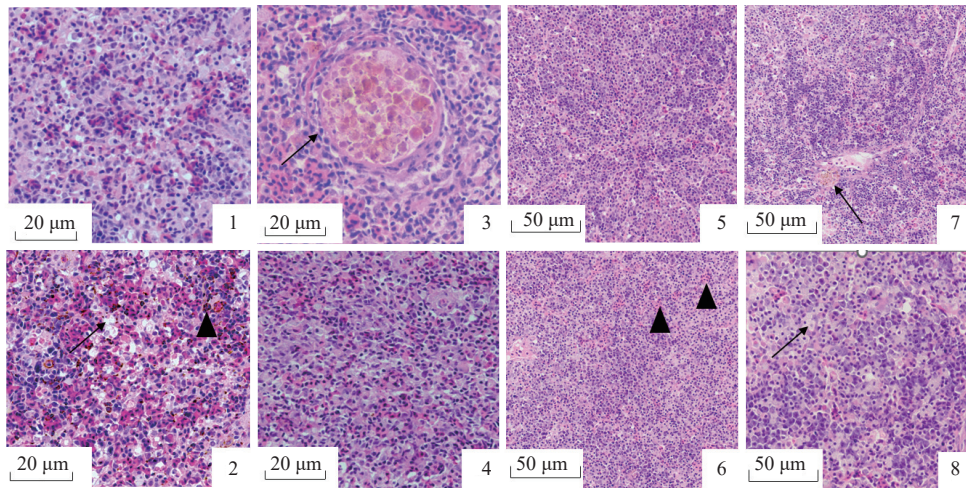
Fig. 7 Expression level changes of immune related genes in *L. crocea* 2-8 weeks after immunization

(a) *IgM*, (b) *IL-1 β* , (c) *CD4*, (d) *CD8*, (e) *MHC I α* , (f) *MHC II β* ; different letters indicated that there were significant differences between the experimental group and the control group under the same conditions ($P < 0.05$).

细胞坏死, 组织结构变性, 部分细胞崩解, 出现空泡化, 周边铁黄素出现明显的沉淀, 经 H.E 染色后着色加深, 呈黄褐色, 并且细胞排列结构紊乱, 出现聚集现象, 细胞核固缩, 细胞失去原有的结构 (图版-2)。更有严重者, 脾

脏实质出现大面积组织坏死和崩解并形成结节 (图版-3)。B6 免疫组攻毒后, 脾脏仅观察到出血点增多 (图版-4), 未发现结节, 相比于对照组, 其病理组织损伤程度较轻。

头肾组织 H.E 染色结果显示, 健康未攻毒



图版 攻毒前后大黄鱼头肾、脾脏组织病理切片

1. 健康未攻毒大黄鱼脾脏；2. PBS 对照组脾脏细胞空泡化(箭头)，铁黄素沉积(三角形)；3. PBS 对照组脾脏结节(箭头)；4. B6 免疫组大黄鱼脾脏；5. 健康未攻毒大黄鱼头肾；6. B6 免疫组大黄鱼头肾出血(三角形)；7. PBS 对照组头肾铁黄素沉积(箭头)；8. PBS 对照组大黄鱼头肾细胞溶解(箭头)。

Plate Immuno-histopathological sections of *L. crocea* head kidney and spleen before or after the challenge

1. spleen of healthy *L. crocea* not challenged with poison; 2. splenic cell vacuolation (arrow) and deposition of ferriflavin (triangle) in PBS control group; 3. splenic nodules (arrow) in PBS control group; 4. spleen of *L. crocea* in B6 immune group; 5. healthy *L. crocea* head kidney without challenge; 6. renal hemorrhage in the head of *L. crocea* in B6 immune group (triangle); 7. iron lutein deposition in the head kidney of PBS control group (arrow); 8. renal cell lysis of *L. crocea* head in PBS control group (arrow).

大黄鱼头肾组织无肾单位，而由大量淋巴细胞、血细胞和粒细胞填充并靠底部的网状支架相互连接成巨型的“网状淋巴组织”(图版-5)。B6 免疫组攻毒后，头肾组织细胞出血增多(图版-6)，相比之下，PBS 对照组攻毒后，头肾组织出现较多出血点，淋巴细胞增多，细胞聚集，细胞出现坏死并伴有铁黄素沉积(图版-7)；部分细胞溶解导致细胞之间界限模糊，失去原有的结构(图版-8)。

3 讨论

近年来，由杀香鱼假单胞菌感染引起的大黄鱼内脏白点病日益严重，已成为困扰大黄鱼养殖的重要因素之一。传统抗生素和化学药物治疗效果不佳，且容易诱导耐药细菌生成^[13]。从长远来看，疫苗安全高效是水产疫病防控的最佳替代手段。从病原相关分子中筛选出高效的免疫保护性抗原，是亚单位疫苗开发的基础和关键^[14]。Tol C 是革兰氏阴性菌的外膜通道蛋白，最早在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中发现，介导大肠杆菌对细菌素的吸收^[15]。随后发现，Tol C 是革兰氏阴性菌外排泵的主要组成部分，参与细菌对外界不利环境的耐受^[16-17]。Tol C 通

常由若干个 OEP 跨膜通道结构域组成，完整的 OEP 结构域包含 1 个跨细胞间质的 α 螺旋和 12 个跨外膜的 β 折叠，形成完整的 3 聚体跨膜通道^[18]。Tol C 的细胞定位和结构特点为其免疫原性的形成提供了基础，有研究表明，在水产嗜水气单胞菌^[11]、迟缓爱德华氏菌^[12] 中，Tol C 均表现出良好的免疫原性，对于宿主抗菌感染具有良好的保护作用。本研究选取大黄鱼杀香鱼假单胞菌 Tol C 的一个 OEP 结构域进行了克隆和原核表达，获得了纯化的重组蛋白 B6，Western blot 结果表明，B6 能与杀香鱼假单胞菌兔抗血清形成特异性免疫结合条带，证明杀香鱼假单胞菌 Tol C 具有较强的免疫原性。

在评价疫苗的 RPS 实验中，选择适宜的攻毒模型是获得准确数据的前提。先前的研究发现，对健康大黄鱼采用注射或浸泡方式进行攻毒，均能建立有效感染^[19]。相比而言，浸泡方式更温和，可显著降低大黄鱼的不良应激^[20]。同时，生产实践和相关研究均表明，杀香鱼假单胞菌的感染和致病力受水温的影响较大，在不同水温条件下，杀香鱼假单胞菌毒力存在显著的差异^[21-23]。本研究中，攻毒时起始水温为 16 °C，根据预攻毒实验得出的数据，选取 5×

10^4 CFU/mL 浸泡浓度建立正式的攻毒实验。攻毒后第 4 天, PBS 对照组出现明显的病症和死亡, 解剖可见死亡鱼体内脏出现特征性的“白点”, 且从头肾和脾脏组织中均分离到单一的杀香鱼假单胞菌, 证明成功建立了感染。攻毒后各组的死亡主要发生在第 4~10 天, 从第 11 天开始, 因气温变化导致水温骤降至 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 随后几天, 无新增死亡出现, 这一结果与胡娇等^[24]的研究相一致, 在水温为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时不会引起大黄鱼发病, 这也进一步证明水温对杀香鱼假单胞菌毒力具有直接影响。经统计, 攻毒后 14 d 内 PBS 对照组和 B6 免疫组死亡率分别为 75.00% 和 20.83%, 由此计算出 B6 免疫组的 RPS 为 72.22%, 证明重组蛋白 B6 对于宿主抗杀香鱼假单胞菌感染具有良好的保护效果。

血清抗体效价是评价疫苗的主要指标之一^[25]。本研究中, 免疫后第 2~8 周血清抗体效价显著升高, 第 4 周时达到峰值 (\log_2 值为 8.65), 证明 B6 有效激活了宿主的体液免疫; 免疫后第 8 周, 抗体效价依旧维持在较高水平 (\log_2 值为 6.99), 进一步说明 B6 疫苗具有良好的免疫持续期。RT-PCR 结果同样表明, 免疫后鱼体头肾和脾脏组织中 *IgM* 的转录水平显著上升。Mo 等^[26]的研究表明, 免疫后鱼体 *IgM* 的转录水平与血清抗体水平具有相关性, 这与本研究结果相符。*IL-1 β* 是一种重要的促炎症细胞因子, 在免疫响应中起着重要的调节作用^[27], 在本实验中 *IL-1 β* 在接种 B6 后转录水平呈现大幅度上调, 脾脏和头肾组织中 *IL-1 β* 最高上调倍数分别达 241.13 倍和 93.33 倍, 暗示了 *IL-1 β* 在大黄鱼响应中具有重要作用。MHC 是免疫系统的重要组成部分, 主要存在于特异性抗原呈递细胞中, 负责抗原的呈递并参与机体的先天免疫反应^[28], 本研究中 *MHC I α* 的上调幅度在脾脏和头肾组织中也达到了 131.95 倍和 77.02 倍, 表明大黄鱼体内与细胞免疫相关的 MHC-I 类抗原呈递途径被激活。相比之下, *MHC II β* 、*CD4* 的表达上调幅度在脾脏和头肾组织中最高分别为 11.29 倍和 13.10 倍, 提示 B6 激活的宿主免疫以天然免疫和体液免疫为主。值得注意的是, 在整个免疫周期 (2~8 周) 中, *MHC I α* 转录水平一直处于上升趋势, 这与其他免疫因子 (*IgM*、*IL-1 β* 、*MHC II β* 、*CD4*、*CD8*) 表现出的先升后降的趋势明显不同, 提

示 B6 激活的天然免疫具有较长的持续期。

接种疫苗对宿主感染后病理损伤的降低程度可直观地反映疫苗对宿主的保护作用。关建义等^[29]通过对银鲫 (*Carassius gibelio*) 注射嗜水气单胞菌灭活疫苗后攻毒, 结果显示, 对照组 (注射生理盐水) 鱼体脾脏、肾脏等器官出现不同程度的病变, 而免疫组相应器官未见明显病变。潘吉脉^[30]对鲟注射嗜水气单胞菌灭活疫苗后攻毒, 对照组 (注射 PBS) 脾脏出现小块坏死病灶, 免疫组脾脏则无相应病变。本实验中, 攻毒发病的大黄鱼头肾和脾脏组织切片显示, PBS 对照组的头肾和脾脏中均有大量明显的出血点, 并伴有结节形成和铁黄素沉积, 相比而言, B6 免疫组头肾和脾脏中出血点数量明显减少, 无结节出现, 表明 B6 对于大黄鱼抗杀香鱼假单胞菌感染具有一定的保护作用。

近年来, 以内脏白点病为代表的大黄鱼病害在网箱养殖中频繁发生, 给沿海养殖户造成了严重的经济损失^[31]。在当前生态优先, 科学养殖的理念下^[32], 疫苗将是今后海水鱼类养殖病害防控的重要方向。本研究中, 通过基因工程方法合成了基于杀香鱼假单胞菌强毒株一种表面抗原的亚单位疫苗, 在攻毒测试中获得了良好的保护效果。由于我国幅员辽阔, 养殖区域广泛, 以大黄鱼为例, 养殖区遍布浙江福建沿海一带, 不仅养殖模式多样化, 养殖环境也存在较大的差异^[33]。同种致病菌在不同海区可能存在多种血清型, 表面抗原存在变异和多样化的可能, 这给疫苗的研发和推广造成了难度。本研究构建的亚单位疫苗对实验毒株表现出良好的保护效果, 然而, 该效果对于不同地域的毒株是否存在差异仍需进一步探索。

参考文献 (References):

- [1] Zhang C, Yu L, Qian R. Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1587-1599.
- [2] 倪海儿, 王国良. 网箱养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 疾病与环境因子的关系 [J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 72-77.
Ni H E, Wang G L. Relationship between diseases in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* in marine cage culture and

- environmental factors[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1): 72-77 (in Chinese).
- [3] 许斌福, 程海华, 池洪树, 等. 大黄鱼内脏白点病的病原分析与鉴定 [J]. *福建农业学报*, 2015, 30(7): 631-635.
Xu B F, Cheng H H, Chi H S, *et al.* Identification of pathogen responsible for white-spots disease in *Larimichthys crocea*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(7): 631-635 (in Chinese).
- [4] 张杰, 毛芝娟. 大黄鱼内脏白点病病原杀香鱼假单胞菌及其毒力因子研究进展 [J]. *浙江万里学院学报*, 2015, 28(6): 69-76,81.
Zhang J, Mao Z J. Research progress on *Pseudomonas plecoglossicida* and its virulence factors of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Zhejiang Wanli University*, 2015, 28(6): 69-76,81 (in Chinese).
- [5] 荣娜, 简思杰, 孙薇, 等. 鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 P5 的原核表达、免疫保护及抗血浆杀菌作用研究 [J]. *西北农业学报*, 2021, 30(3): 333-342.
Rong N, Jian S J, Sun W, *et al.* Study on prokaryotic expression, immunoprotective effect and resistance to plasma sterilization of outer membrane protein P5 of fish pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2021, 30(3): 333-342 (in Chinese).
- [6] Pedersen K, Verdonck L, Austin B, *et al.* Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1998, 48(3): 749-758,
- [7] 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.
Gao Y S, Liu D D, Xu J L, *et al.* Recombinant expression and immunogenicity analysis of the porin protein OmpF of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 234-243 (in Chinese).
- [8] Khushiramani R, Girisha S K, Bhowmick P P, *et al.* Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas* species[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(10): 2263-2268,
- [9] 史姿聪. 外膜通道蛋白 Tol C 在鸭源鸡杆菌生物被膜形成中的功能研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
Shi Z C. The roles of outer membrane channel protein TolC in biofilm formation of *Gallibacterium anatis*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [10] Yang T C, Ma X C, Liu F, *et al.* Screening of the *Salmonella paratyphi* A CMCC 50973 strain outer membrane proteins for the identification of potential vaccine targets[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 5(1): 78-83,
- [11] 荣娜, 简思杰, 孙薇, 等. 鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 TolC 的原核表达及抗原性分析 [J]. *河南农业科学*, 2021, 50(3): 157-164.
Rong N, Jian S J, Sun W, *et al.* Prokaryotic expression and antigenicity analysis of outer membrane protein TolC of fish pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(3): 157-164 (in Chinese).
- [12] 张志强, 杨楠, 李永慧, 等. 迟缓爱德华菌外膜蛋白 TolC 原核表达及其免疫原性 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(2): 339-344.
Zhang Z Q, Yang N, Li Y H, *et al.* Prokaryotic expression and immunological protection analysis of TolC protein of *Edwardsiella tarda*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(2): 339-344 (in Chinese).
- [13] 游宇. 2017 年—2019 年福建大黄鱼内脏白点病病原菌耐药性状况分析 [J]. *中国水产*, 2021(6): 69-73.
You Y. Analysis of drug resistance of pathogenic bacteria of visceral white spot disease in Fujian large yellow croaker from 2017 to 2019[J]. *China Fisheries*, 2021(6): 69-73 (in Chinese).
- [14] 路霞, 杨亚东, 郁川, 等. 鼠伤寒沙门菌 SseK1 蛋白的表达及其免疫生物学特性研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(8): 902-906,921.
Lu X, Yang Y D, Yu C, *et al.* Expression purification and immunological characteristics of *Salmonella typhimurium* antigen SseK1[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(8): 902-906,921 (in Chinese).
- [15] 侯博. TolC 在肠外致病性大肠杆菌中的生物学功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
Hou B. Characterization and function of TolC in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [16] 李彬酉. Cpx 双组份系统在 TolC 影响 ExPEC 生物被膜形成中的作用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
Li B Y. Role of Cpx two-component system in the effect of TolC on ExPEC biofilm formation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [17] 郭泽文. *oqxAB* 质粒对大肠杆菌适应性和氟喹诺酮耐药性的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
Guo Z W. Impact of *oqxAB*-positive plasmids on the development of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [18] 崔爱莲. TolC 介导 ExPEC 生物被膜形成对高渗环境耐受性

- 的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Cui A L. Mechanism of TolC-mediated tolerance of ExPEC biofilm formation to hyperosmotic environment[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [19] 王稳稳. 大黄鱼杀香鱼假单胞菌灭活疫苗开发及佐剂筛选[D]. 上海: 华东理工大学, 2021.
- Wang W W. Development of *Pseudomonas pseudomonas* inactivated vaccine of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and screening of adjuvant[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [20] 王玉娟. 两种佐剂对大菱鲆鳃弧菌浸泡疫苗免疫效果的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Wang Y J. Immune effect of two adjuvants on turbot (*Scophthalmus maximus*) vaccine against *Vibrio anguillarum* delivered by immersion[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [21] Huang L X, Liu W J, Jiang Q L, *et al.* Integration of transcriptomic and proteomic approaches reveals the temperature-dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 207.
- [22] Tao Z, Zhou T, Zhou S M, *et al.* Temperature-regulated expression of type VI secretion systems in fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* revealed by comparative secretome analysis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(22): fnw261.
- [23] Li C W, Wang S L, Ren Q L, *et al.* An outbreak of visceral white nodules disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* at a water temperature of 12 °C in cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(11): 1353-1361.
- [24] 胡娇, 张飞, 徐晓津, 等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 409-417.
- Hu J, Zhang F, Xu X J, *et al.* Isolation, identification and virulence of the pathogen of white-spots disease in internal organs of *Pseudosciaena crocea*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(2): 409-417 (in Chinese).
- [25] Xu Z, Wang G L, Nie P. IgM, IgD and IgY and their expression pattern in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(10): 2124-2132.
- [26] Mo X B, Wang J, Guo S, *et al.* Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734774.
- [27] Dinarello C A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity[J]. *Immunological Reviews*, 2018, 281(1): 8-27.
- [28] 李春梅, 张全启, 齐洁, 等. 鱼类 MHC 基因的研究概况[J]. *海洋湖沼通报*, 2009(4): 39-50.
- Li C M, Zhang Q Q, Qi J, *et al.* Summary of studies on major histocompatibility complex genes in fish[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009(4): 39-50 (in Chinese).
- [29] 关建义, 毛会丽, 贺文旭, 等. 豫北地区嗜水气单胞菌灭活疫苗的制备及免疫效果的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(11): 1501-1504.
- Guan J Y, Mao H L, He W X, *et al.* Preparation of a deactivation vaccine against *Aeromonas hydrophila* and research about its immune effect in the north of Henan[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2015, 31(11): 1501-1504 (in Chinese).
- [30] 潘吉脉. 鲟鱼嗜水气单胞菌灭活疫苗研制及其免疫效果分析[D]. 贵州: 贵州大学, 2020.
- Pan J M. Preparation of inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine and analysis of its immune effect[D]. Guizhou: Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [31] 陈宇. 宁德市三都湾养殖大黄鱼内脏白点病发生规律初探[J]. *海峡科学*, 2019(6): 41-43.
- Chen Y. Preliminary study on occurrence regularity of visceral white spot disease of large yellow croaker in Sandu Bay of Ningde City[J]. *Straits Science*, 2019(6): 41-43 (in Chinese).
- [32] 梁瑞娟, 蒙世聪, 李永金. 浅谈疫病防控对鱼高效养殖的重要性[J]. *农村实用技术*, 2022(6): 105-106.
- Liang R J, Meng S C, Li Y J. Discussion on the importance of disease prevention and control for efficient fish farming[J]. *Rural Practical Technology*, 2022(6): 105-106 (in Chinese).
- [33] 杨卫, 周丹丹. 我国大黄鱼产业的集聚水平研究[J]. *海洋开发与管理*, 2022, 39(10): 26-33.
- Yang W, Zhou D D. The level of industrial agglomeration of large yellow croaker in China[J]. *Ocean Development and Management*, 2022, 39(10): 26-33 (in Chinese).

Prokaryotic expression of outer membrane protein Tol C of *Pseudomonas plecoglossicida* and its immunoprotective effect analysis on *Larimichthys crocea*

WANG Ying^{1,2}, WANG Hao^{1,2}, XU Wei^{1,2}, WANG Wei^{2*}, SHI Hui²,
WANG Gengshen², XIE Jianjun², HE Jie², XU Wenjun²

1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Key Laboratory of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province,
Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316021, China

Abstract: In recent years, due to the high density of mariculture, the water circulation is not smooth, the sea area's pollution is becoming more and more serious and the disease occurs frequently. Visceral white spot disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* is a common bacterial disease of *Larimichthys crocea* in cage culture. A recombinant Tol C domain protein named B6 was obtained by prokaryotic expression to evaluate the immunoprotective effect of Tol C (GenBank: EPB97112.1). The immunogenicity of B6 was preliminarily detected by rabbit anti-*P. plecoglossicida* polyclonal antiserum. Following this, a subunit vaccine was prepared by mixing B6 with alum adjuvant, and *L. crocea* was immunized by intraperitoneal injection. The relative protection rate (RPS) was detected 4 weeks after immunization. Meanwhile, the serum, head kidney and spleen of fish were collected at 2, 4, 6 and 8 weeks after immunization, and the serum antibody titer and the expression level of immune-related genes were determined. Finally, the head kidney and spleen of healthy and challenged individuals were both collected and made into paraffin sections to compare histopathological changes. The results showed that the molecular weight of B6 was 22 ku. The Western blot results showed that the rabbit antiserum against *P. plecoglossicida* could strongly bind to B6 with a single unique band. A total of four weeks after inoculation with B6 subunit vaccine, the RPS reached 72.22%. ELISA showed that the serum antibody titer increased significantly since the second week after immunization, peaked at the fourth week (\log_2 value 8.65), and decreased slightly to \log_2 value 6.98 in the eighth week. RT-PCR showed that the expression level of immune-related genes in the head kidney and spleen were both up-regulated with varying degrees at 2, 4, 6 and 8 weeks after immunization. Among them, the up-regulation rates of *IL-1 β* and *MHC I α* was the largest, with 93.33 and 77.02 times each in the head kidney, and 241.13 and 131.95 times each in the spleen, respectively. Except for *CD8*, the expression up-regulation trend of *IgM*, *IL-1 β* , *CD4*, *MHC I α* and *MHC II β* in the spleen was all higher than that in the head kidney. Paraffin sections showed that severe bleeding spots and nodules appeared in the head kidney and spleen of the control group after the challenge, accompanied by different degrees of siderophore deposition. Comparatively, there were only a few bleeding spots in the head kidney and spleen of the B6 immunized group, and no nodules and siderophore deposition. In conclusion, our study first reported the prokaryotic expression and immune protection evaluation of the outer membrane protein Tol C from *P. plecoglossicida*. The results showed the recombinant Tol C protein had strong immunogenicity and good immune protection in *L. crocea*, with a RPS of 72.22 % 4 weeks after immunization, thus was a potential candidate of subunit vaccine.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Pseudomonas plecoglossicida*; Tol C; immune protection

Corresponding author: WANG Wei. E-mail: youcaoke@zjou.edu.cn

Funding projects: Zhejiang Province "Three Agriculture Nine Side" Science and Technology Cooperation Program Project (2022SNJF70); National Key R & D Program of China (2020YFD0900803); Zhejiang Basic Public Welfare Research Program (LGN21C190006); Zhejiang Marine Fisheries Research Institute Science and Technology Project (HYS-ZX-202102)