

综述

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00163

鱼类病原菌外膜蛋白及其免疫原性研究进展

熊 静^{1, 2, 3, 4} 关瑞章^{1, 2, 3, 4} 郭松林^{2, 4} 黄文树^{2, 4}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 集美大学水产学院, 厦门 361021; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
4. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021)

A REVIEW ON THE IMMUNOGENICITY OF FISH PATHOGENIC BACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEINS

XIONG Jing^{1, 2, 3, 4}, GUAN Rui-Zhang^{1, 2, 3, 4}, GUO Song-Lin^{2, 4} and HUANG Wen-Shu^{2, 4}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Fishery College, Jimei University, Xiamen 361021, China;
3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021)

关键词: 鱼类病原菌; 外膜蛋白; 免疫原性; 免疫保护作用; 交叉免疫保护作用

Key words: Fish pathogenic bacteria; Outer membrane proteins (OMPs); Immunogenicity; Immuno-protection; Cross immuno-protection

中图分类号: S942 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)01-0163-07

细菌性疾病是水产养殖病害中最常见且危害甚为严重的一类疾病^[1]。长期以来,一直用于鱼类细菌性疾病防治的西药类药物,由于会导致病原菌产生耐药性,在鱼体内产生药物残留危害人类健康等副作用而被限制使用^[2]。因此,为了选择更加安全有效的防治方法,疫苗免疫逐步得到了人们的重视。自1942年Duff首次将灭活的鲑鱼产气单胞菌口服疫苗(*Bacterium salmonicida*)应用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)获得成功后^[3],世界各国普遍展开了渔用疫苗的研制。在全菌灭活苗、亚单位疫苗、DNA疫苗等各类渔用疫苗中,亚单位疫苗由于具有接种剂量小、免疫原性强、毒副作用小等优点得到了很多关注^[4]。位于病原菌表面的外膜蛋白(Outer membrane proteins, OMPs)由于具有良好的免疫原性和免疫保护作用,逐步成为渔用疫苗开发的研究热点。

细菌分为革兰氏阳性菌(Gram positive bacteria, G⁺)和革兰氏阴性菌(Gram negative bacteria, G⁻)两大类,鱼类病原菌则大多数是G⁻^[1]。OMP是G⁻特有的成分,在维持自身菌体结构及物质转运方面发挥着重要作用^[5,6]。但对于宿主来说,病原菌OMP却是一种重要的保护性抗

原,能够有效激发宿主的体液免疫和细胞免疫^[7-9]。并且,某些OMP还在多种病原菌间高度保守,可对不同种或同种不同血清型菌株的感染产生交叉保护,从而成为亚单位疫苗最具潜力的免疫抗原候选成分之一^[10-13]。为此,本文将对鱼类病原菌OMP的基本特征、免疫原性、免疫保护作用及交叉免疫保护作用等方面的研究进展作一综述,以期对OMP疫苗的研制提供参考,从而为鱼类细菌性疾病的防治提供一种新的解决途径。

1 病原菌外膜蛋白 OMPs 基本特征

细菌以其独特的膜系统维持自身的生理功能与遗传特性。G⁺的膜系统由胞浆膜构成,G⁻则由外膜和胞浆膜(内膜)两种不同的膜共同构成^[14]。外膜是G⁻细胞壁特有的结构,位于菌体胞浆膜和肽聚糖的外侧,包围着整个细菌,具有典型的非对称性磷脂双层结构,厚约8—10 nm;主要由外膜蛋白OMP、脂质双层及脂多糖等成分组成,约占细胞壁干重的80%^[14]。其中,OMP约占外膜全部成分的1/2;分子量大小不等,主要集中在7—80 kD之间;按照在单细胞中表达的拷贝数高低,分为主要蛋白

收稿日期: 2009-12-01; 修订日期: 2010-10-14

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项基金(鳗鱼3-51); 水产病害防治新药的研发技术平台福建省教育厅(2009N2003-1); 福建省自然科学基金(B0740010)资助

作者简介: 熊静(1979—),女,河北保定人;博士研究生;主要从事渔业水体生态与病害防治研究。E-mail: xiongjing@jmu.edu.cn

通讯作者: 关瑞章,男,教授,博导; Tel: 0592-6188973; Fax: 0592-6188973; E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

和微量蛋白^[14,15]。主要蛋白在单细胞中表达的拷贝数为 1×10^5 — 2×10^5 ，包括外膜蛋白 A(Outer membrane Protein A, OmpA)、微孔蛋白(Porins, OmpC)及脂蛋白(Lipoprotein, Lpp)等；微量蛋白在单细胞中表达的拷贝数为 1×10^3 — 1×10^4 ，约有 10—20 种^[15]。同时，OMP 的数量及种类随着菌株的不同及培养条件的不同而有所变化^[16]。

OMP 作为外膜的主要组分，在细菌的生命活动中具有重要的生理功能。富含 β 折叠结构的外膜蛋白 A(OmpA)，不但维持着外膜的完整性，而且还是不同噬菌体的受体，在受体细胞的连接、结合等方面发挥着重要作用^[6,14]。微孔蛋白(OmpC)由于以非共价键与肽聚糖紧密结合，形成了相对非特异性的通道，在对外界营养物质的摄取、代谢物质的运输、物质合成上起着重要作用；同时由于 OmpC 形成的孔径大小不同，还能够有效阻止某些抗生素、去污剂、补体、溶菌酶和其他毒性化学物质进入菌体内，充当着选择屏障、有效维持细胞正常形态等功能^[5,17]。脂蛋白(Lpp)除了是一种含量最丰富的结构蛋白外，还具有稳定细菌外膜-肽聚糖复合体的功能^[18]。大部分微量蛋白都参与特异性扩散过程，与细胞生长密切相关^[18]。某些病原菌 OMP 具有黏附素作用，有助于病原菌对宿主细胞的黏附^[10]；某些病原菌 OMP 还具有抗吞噬、抗补体及抗血清杀菌等作用，有助于病原菌逃避宿主的免疫防御，从而达到致病目的^[18,19]。

2 鱼类病原菌外膜蛋白 OMPs 免疫原性研究

由于位于病原菌表面，OMP 在病原菌侵袭宿主时，虽然能够协助病原菌完成对宿主的感染和致病，但是却 also 容易被宿主的免疫防御体系识别为异物，从而刺激宿主免疫系统的免疫细胞对 OMP 进行识别，并产生一系列的连锁反应。在这一过程中，抗原递呈细胞(巨噬细胞等)对 OMP 进行处理、加工和递呈，抗原特异性淋巴细胞(T 淋巴细胞、B 淋巴细胞)对 OMP 进行识别后活化、增殖、分化，最后产生免疫效应因子，表现为体液免疫和细胞免疫^[18]。由于病原菌 OMP 具有良好的免疫原性，免疫保护作用及交叉免疫保护作用，逐步成为渔用疫苗开发的研究热点。目前，获得病原菌 OMP 主要有分离纯化和重组表达两种方法。

2.1 分离纯化的病原菌 OMPs 免疫原性

研究表明，无论是利用 N-十二烷基肌氨酸钠裂解法和超速离心法分离获得的鱼类病原菌 OMP 混合物^[20-25]，还是进一步双向电泳、凝胶柱层析、分子筛层析等方法纯化 OMP 单一成分^[10,26]，均具有良好的免疫原性，能够有效刺激机体产生特异性抗体。某些 OMP 还能够显著增强鱼体吞噬细胞的吞噬活性^[10,23,25]，同时可对相应病原菌的感染提供 50%—100% 的免疫保护率(表 1)。这些研

究为开发以 OMP 作为主要抗原的渔用疫苗奠定了良好的理论基础，但是这些传统分离纯化病原菌 OMP 的方法，一般都存在着过程复杂、一次获得量较少、成本昂贵等缺点，难以在生产实践中得以广泛应用。

2.2 重组表达的病原菌 OMPs 免疫原性

Vázquez-Juárez, *et al.* 利用反向 PCR、Southern-blot 杂交等技术从威隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)全基因组基因库中克隆，筛选到编码具有良好免疫原性的 48 kD OMP 的基因片段^[11,27]，并对其进行了核苷酸序列测序及同源性比对，为进一步研究其重组蛋白的免疫保护作用奠定了基础^[11]。这是首次尝试借助分子克隆等生物技术进行 OMP 的基因克隆，尽管其重组蛋白的免疫保护作用尚未可知，但为鱼类病原菌重组 OMP 的研究翻开了新的一页。

随着基因组学、蛋白质组学及生物信息学等学科的快速的发展，越来越多的病原菌 OMP 的基因序列测序得以完成。根据互联网数据库已知 OMP 的基因序列设计特异性引物，然后从病原菌基因组中扩增目标基因，再利用合适的载体进行重组表达，大大加快了疫苗抗原筛选的速度。目前，已有来源于副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[28]、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[29]、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)^[30-32]及嗜水气单胞菌(*Aeromonas Hydrophila*)^[33]等近十种 OMP 得以顺利重组表达与纯化。同时，这些重组 OMP 也分别在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[28,29,32,34]、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[30,31]和印度草鱼(*Labeorohita Hamilton*)^[33]等多种鱼类中进行了免疫接种试验。结果显示，这些重组 OMP 保持了天然 OMP 的免疫原性和免疫保护作用，均能有效刺激鱼体产生特异性抗体，其中某些还能够显著增强机体吞噬细胞的吞噬活性^[32]，并且能对相应病原菌的感染提供 50%—90% 不等的免疫保护率(表 2)。

由于生物技术在渔用疫苗开发中的应用，疫苗开发时间和成本得以大幅度缩短和降低。此外，利用生物技术构建多价重组 OMP 疫苗也大有应用前景。何鸣筱等构建了嗜水气单胞菌外毒素(Act)和外膜蛋白(OmpTS)双基因融合表达载体，其融合蛋白保留了外毒素和外膜蛋白的反应原性，为进一步研究此融合蛋白作为疫苗候选成分提供了理论依据^[35]。值得关注的是，利用哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的外膜蛋白(OmpK)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)双基因构建融合表达载体，表达的融合蛋白(r-OmpK-GAPDH)免疫大黄鱼后，与单一的重组蛋白(r-OmpK)相比，能够刺激机体产生更高水平的抗体效价和免疫保护作用^[32]。

2.3 鱼类病原菌 OMPs 共同抗原免疫原性

由于鱼类病原菌种类繁多、血清型复杂，针对单种

病原菌逐一研制疫苗, 必然存在研发周期长、免疫次数多、对动物正常活动干扰大等问题。因此, 若利用不同病原菌间的共同抗原开发疫苗则有望解决这些问题。根据 SDS-PAGE 图谱及免疫印迹发现, 多种病原菌间存在着

表 1 分离纯化的病原菌 OMPs 免疫原性分析
Tab. 1 Immunogenicity analysis of extracted pathogenic bacterial OMPs

免疫原性 Immunogenicity	病原菌分离提纯的 OMPs Extracted pathogenic bacterial OMPs							
	杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas sal-</i> <i>monicida</i> 铁调 OMP 混合物 ^[20]	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> OMP 混合物 ^[21]	爱德华菌 <i>Edwardsiella</i> <i>ictaluri</i> OMPs 混合物 ^[22]	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> OMP 混 合物 ^[23]	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> OMP 混 合物 ^[24]	爱德华菌 <i>Edwardsiella</i> <i>ictaluri</i> OMP 混 合物 ^[25]	杀鲑气单菌 <i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i> 约 28 kD OMP ^[26]	嗜水气 单胞菌 <i>A. hydrophila</i> 43 kD OMP ^[10]
种类 Kinds	大西洋鲑 <i>Atlantic salmon</i>	金鱼 <i>Carassius aur-</i> <i>atus</i> Linn.	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus</i> <i>punctatus</i>	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus</i> <i>punctatus</i>	欧洲鳗鲡 <i>Anguilla</i> <i>anguilla</i>	日本牙鲆 <i>Paralichthys</i> <i>olivaceus</i>	虹鳟 <i>Salmo</i> <i>gairdneri</i>	蓝丝鲈 <i>Trichogaster</i> <i>trichopterus</i>
规格 Weigh	约 52 g/尾	10—12 g/尾	约 16 g/尾	约 123 g/尾	20—30 g/尾	(100 ± 6) g/尾	10—12 g/尾	10—12 g/尾
免疫途径 Immunize way	腹腔注射	腹腔注射	注射免疫	注射免疫	腹腔注射	腹腔注射	腹腔注射	腹腔注射
剂量 Dose	200 µg /尾	35—40µg /尾	12.5 µg /尾	270 µg /尾	20 µg /尾	50 µg /尾	20 µg /尾	15 µg /尾
抗体水平 Level of spe- cific antibody	在第 28 天和第 49 天均能检测到特 异抗体	第 21 天特异性 凝集抗体效价 1:2 ^{3.8} —1:2 ^{4.4}	第 21 至第 35 天均检测到 特异性抗体	第 7 至第 28 天 均检测到特异 性抗体	第 14 至第 30 天抗体效价在 1:2 ⁸ —1: 2 ¹⁰	第 14 至第 98 天抗体效价 保持在 1:2 ⁵ —1: 2 ¹²	—	第 7 至第 35 天抗体效价 维持在 1:2 ¹¹ —1: 2 ¹²
细胞免疫 Cellular im- mune factors	—	—	—	细胞吞噬百分 比及吞噬指数 显著提高	—	吞噬细胞吞 噬百分比显 著提高	—	吞噬细胞吞 噬百分比显 著提高
攻毒 Challenge	1×10 ⁵ CFU/mL 浸泡感染	1.5×10 ⁵ — 1.5×10 ⁸ CFU/尾 注射感染	2×10 ⁷ CFU/mL 浸泡感染	3.6×10 ⁷ CFU/尾 注射感染	3×10 ⁷ CFU/尾 注射感染	5×10 ⁶ CFU/尾 注射感染	1×10 ⁷ CFU/mL 浸泡感染	1×10 ⁶ CFU/尾 注射感染
保护率 Protective rates	最高免疫保护作 用达到 89.36%	分别产生 40%— 100%的免疫保 护作用	55%—66.7% 的相对免疫 保护率	73.1%的相对 免疫保护率	80%—100%相 对免疫保护率	第 30 天产生 71%相对免疫 率, 第 100 天 保持在 53%	产生 53.2% 的相对免疫 保护率	可对 3 株菌 产生 70%— 90%的免疫 保 护率
其他 Others	首次证明特异性 抗体水平与免疫 保护率成正比	—	加强免疫注 射没有显著 提高免疫效 果	—	OMP 免疫刺 激复合物没有 明显的血清特 异性	特异性抗体 水平与免疫 保护率成正 比	该 OMP 产生 免疫保护率 低于全菌灭 活疫苗 (72.6%)	加强免疫能 提高抗体水 平; 对不同 菌产生交叉 免疫保护

某些分子量大致相同的 OMPs 抗原, 例如, 28 kD 的 OMP 是鳗弧菌(*V. Anguillarum*)和副溶血弧菌的共同抗原; 36 kD 的 OMP 既是副溶血弧菌和溶藻弧菌^[36,37], 也是鳗弧菌、鱼肠道弧菌(*V. ichthyenteri*)、哈维氏弧菌和创伤弧菌(*V. vulnificus*)等海洋致病性弧菌的共同抗原^[38]。根据序列同源性比对发现, 威隆气单胞菌 48 kD OMP 的氨基酸序列与杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)、副溶血弧菌、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)等多种病原菌 OMPs 具有高度同源性; 并且该 OMP 具有良好的交叉免疫原性, 其特异性免抗血清不但能够有效抑制威隆气单胞菌的黏附, 还可同时对嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)等病原菌的黏附起到交叉抑制作用^[39]。还有研究表明, 分子量大小为 82、77、72 和 70 kD 的 4 种铁调外膜蛋白(IROMPs)同时存在于 18 株杀鲑气单

胞菌中。含有这 4 种 IROMPs 的 OMP 混合物免疫大西洋鲑(*Atlantic salmon*), 可以对其中 3 株鲑气单胞菌的人工感染分别产生 53.3%、56.7%和 100%的相对免疫保护率^[40]。因此, 该结果说明这些同时存在于不同种或同种不同血清型菌株的 OMPs 极有可能成为有效的亚单位疫苗抗原成分的发展对象。

随着研究的深入, 目前已发现某些 OMPs 共同抗原, 可对同种不同血清型的多种病原菌感染提供交叉免疫保护作用。Kawai, *et al.*分别从 3 株不同血清型的迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)中, 利用十二烷基肌氨酸钠抽提、超速离心、免疫印迹、双向电泳等方法均分离提纯到分子量大小约为 37 kD 的 OMP。该蛋白免疫日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)后, 对这 3 株病原菌的感染分别提供 50%、65.5%和 70%的交叉免疫保护作用^[12]。Merino, *et*

al. 分别从氨基酸序列同源性分析、血清敏感性试验、补体 C1q 结合试验及鱼体免疫试验等 4 个方面证明了分子量为 40 kD 的 OMP 是 28 株杀鲑气单胞菌的共同抗原, 该

蛋白免疫虹鳟, 能够对其 3 株不同杀鲑气单胞菌的感染分别提供 70%、80% 和 100% 的交叉免疫保护作用^[13]。此外, Fang, *et al.* 首次成功利用基因克隆、重组表达等生

表 2 病原菌重组 OMPs 免疫原性分析

Tab. 2 Immunogenicity analysis of recombinant pathogenic bacterial OMPs

免疫原性 Immunogenicity	重组病原菌 OMPs Recombinant pathogenic bacterial OMPs						
	副溶血弧菌 <i>Vibrio para-haemolyticus</i> OmpW OmpV OmpK OmpU TolC ^[28]	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i> OmpW ^[29]	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i> OmpK ^[30]	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i> OmpK ^[31]	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i> OmpK ^[32]	嗜水气单胞菌 OmpTS ^[33]	副溶血弧菌铁调 外膜蛋白 psuA pvuA 混合物 ^[34]
质粒 Plasmid	pET30a(+)	pET30a(+)	pBV220	pBV220	pGEM-Teasy	pQE 30-UA	pET30a(+)
外膜蛋白大小 Weigh of OMP	27—47 kD 不等	约 28 kD	28 kD	28 kD	35 kD	37 kD	78、81 kD 混合物
鱼种类 Kind	大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	印度草鱼 <i>Labeorohita Hamilton</i>	大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>
鱼规格 Fish weight	平均 150 g/尾	平均 50 g/尾	(20.85±1.4) g/尾	(20.7±3.8) g/尾	平均 50 g/尾	平均 35 g/尾	平均 150 g/尾
免疫途径 Immunize way	腹腔注射	腹腔注射	腹腔注射	口服免疫	腹腔注射	腹腔注射	腹腔注射
免疫剂量 Dose	100 μg/尾	200 μg/尾	50 μg/尾	—	100 μg/尾	50 μg /尾	100 μg/尾
抗体水平 Level of specific Antibody	第 28 至第 56 天均能检测相 应特异性抗体	第 21 至第 49 天均能检测到 特异性抗体, 第 35 天抗体效 价最高	第 7 至第 56 天均能检测到特 异性抗体, 在第 28 天达到峰值 1:2 ¹²	血清抗体效价 第 28 天达峰值 1:2 ¹⁰ , 而后持 续下降, 第 56 天为 1:2 ⁵	第 35 天检测到 特异性抗体效 价约为 1:2 ⁶	—	感染后存活鱼血 液检测到特异性 抗体
细胞免疫 Cellular immune factors	—	—	—	—	吞噬细胞百分 比与吞噬指数 均有显著提高	—	—
攻毒 Challenge	2×10 ⁷ CFU/尾 腹腔注射	1×10 ⁸ CFU/尾 腹腔注射	1×10 ⁸ CFU /mL 浸泡感染	1×10 ⁷ CFU/尾 腹腔注射	5×10 ⁶ CFU/尾 腹腔注射	2×10 ⁷ CFU/尾 肌肉注射	2×10 ⁷ CFU/尾 注射感染
相对免疫保护率 Relative percent survivals(RPS)	80%—90%	78%	80%	62.5%	37.7%	57%	80%
其他 Others	各 OMPs 提供 的免疫保护率 与灭活菌苗相 比没有显著差 异	OmpW 氨基酸 序列在溶藻弧 菌、美人鱼发 光杆菌及副溶 血弧菌中保守 性较高	该重组质粒通 过温度诱导表 达而不是常规 的 IPTG 诱导	将可生物降解 高分子聚 DL- 乳酸-聚乙二醇 共聚物包裹 OmpK 作口服 抗原	—	—	OMP 混合物免疫 组提供的免疫保 护率稍低于全菌 苗免疫组的 90%

注: RPS 指相对免疫保护率

Note: RPS refers to relative percent survivals

物技术获得分子量为 43 kD 的重组 OMP, 并利用氨基酸序列同源性分析、Western-blot 免疫印迹等方法证明该 43 kD 的 OMP 是 9 株嗜水气单胞菌和 1 株温和气单胞菌的共同 OMPs 抗原。该重组 OMP 免疫蓝丝鲈(*Trichogaster trichopterus*)后, 能够针对其中 2 株相同血清型和 1 株不同血清型嗜水气单胞菌的感染提供分别为 87.5%、75% 和 44.4% 的交叉免疫保护率^[41]。尽管这些在实验室取得成功的研究成果很有开发前景, 但目前还没有一项实验结果作为商业渔用疫苗正式投入到生产实践中。

2.4 鱼类病原菌多个 OMPs 的 DNA 疫苗构建尝试

随着 DNA 疫苗的兴起, Vazquez-Juarez, *et al.* 将编码威隆气单胞菌外膜蛋白 Omp38 和 Omp48 的 DNA 片段与质粒重组后, 以 20 μg/尾的浓度注射免疫斑点虹鳟 (*Paralabrax maculatofasciatus*)。结果表明, 在免疫后的 4—6 周内, 尽管在免疫鱼体内检测到针对 Omp38 和 Omp48 蛋白的特异性抗体效价比较低, 但是仍然能够针对该病原菌的感染产生 50%—60% 的交叉免疫保护作用^[42]。但是, 研究者对该 DNA 疫苗的免疫保护机理并不

了解,因而还有待进一步研究。

2.5 鱼类病原菌 OMPs 新型口服疫苗的尝试

为了提高机体对口服疫苗吸收与传递效率, Maurice, *et al.* 将杀鲑气单胞菌主要 OMPs 基因 (*At*) 与鲫鱼 (*Carassius auratus* Kaposi fibroblast) 自身的生长因子 (MTS) 基因融合构建表达载体, 其表达产物 At-MTS 作为抗原口服免疫鲫鱼, 结果发现该重组口服疫苗能够显著提高鱼体内特异性抗体水平, 但是却不能对该病原菌的感染提供保护作用^[43]。这是首次利用病原菌主要抗原基因与宿主机体基因融合表达构建重组口服疫苗的例子。

张小江等采用可生物降解的合成高分子聚 DL-乳酸-聚乙二醇共聚物 (DL-poly lactide-co-polyethylene glycol, PELA), 包裹哈维氏弧菌重组外膜蛋白 OmpK 后, 制备成 PELA-OmpK 微球口服免疫斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)。结果表明, 口服 PELA-OmpK 组血清抗体效价和黏液抗体效价均显著高于口服 OmpK 蛋白溶液组与对照组, 但是低于注射组; 在哈维氏弧菌人工感染时, 口服 PELA-OmpK 组提供了 62.5% 相对保护率, 显著高于口服 OmpK 蛋白组 (12.5%) 而低于注射组 (87.5%)^[31]。这是首次采用可生物降解材料 PELA 作为鱼类口服疫苗的投递载体成功的例子。

3 小结与展望

鱼类病原菌 OMPs 作为一种重要的保护性抗原, 在渔用疫苗开发上具有广阔的应用前景, 然而若要将其大规模应用到实际生产中, 还应继续深入研究以下几个问题:

首先, 鱼类病原菌 OMPs 的免疫作用机理有待进一步研究。以上所有提到的研究, 多是关注 OMPs 免疫后机体的特异性抗体水平及免疫保护率。但是一些实践应用的细节, 比如一次免疫甚至是加强免疫后, 特异性抗体水平能够持续多久, 鱼类能否像哺乳类动物一样能够保持终身抗体等, 这些有关疫苗保护效果的机理问题需要进一步研究。此外, OMPs 能够提供良好的免疫保护作用, 是否只有特异性抗体在抗感染中起到了关键作用; 是否还有其他特异性或非特异性体液免疫因子或细胞免疫因子同样起到了举足轻重的作用; 这些也还需要进一步的深入研究进行证实。

其次, 免疫途径还有待进一步优化。以上综述的免疫保护研究以 OMPs 免疫鱼体时, 主要采用腹腔注射, 其主要优点是用量小、见效快、效果好; 缺点是操作较麻烦、易造成损伤、工作量繁重, 仅较适合个体较大的鱼类。改善这种状况的途径可以采用机械化自动注射, 以减少鱼体损伤和降低工作量; 还可采用口服免疫的途径, 例如, 可以将 OMPs 基因转入真核生物表达系统 (如酵母菌), 采用酵母投喂的方法进行大规模鱼群免疫; 或研制新型口

服基因靶向控释疫苗; 或研制一种有效的载体投递系统配合重组蛋白疫苗使用, 以防止疫苗作用效果受胃肠道消化酶及酸性环境的影响而降低功效。

此外, 由于鱼类病原菌种类多、血清型复杂, 使得开发一种能够同时预防多种病原菌引起的疾病的疫苗有更加广阔的应用前景。随着基因组学、蛋白质组学、生物信息学等学科快速发展, 利用反向疫苗学理念, 结合 PCR 扩增技术及各种生物信息学软件筛选不同病原菌间的共同抗原, 然后利用生物重组技术开发重组共同蛋白疫苗, 有望同时预防多种病原菌引起的疾病。例如, 本课题组目前利用 GenBank 数据库, 参考了 20 株已知鳃鲈病原菌, 成功地筛选到 3 株鳃鲈主要病原菌的共同外膜蛋白基因片段 *Omp-G*, 该重组表达产物 rOmp-G 能够分别诱导新西兰大白兔和欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 产生特异性抗体, 并在相应 2 株嗜水气单胞菌和 1 株温和气单胞菌感染鳃鲈时, 分别提供 50%、70% 和 75% 相对免疫保护率, 这说明利用该方法开发疫苗是可行的。在将来的重组蛋白疫苗开发中, 同时也可以尝试利用融合 PCR 技术将多种共同或主要抗原基因进行融合表达, 以进一步构建多价重组蛋白疫苗或是多价 DNA 疫苗, 从而进一步扩大防病范围。

参考文献:

- [1] Yin Z, Xu B H. Studies on the bacteriosis of fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, **19**(1): 76—83 [殷战, 徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究. 水生生物学报, 1995, **19**(1): 76—83]
- [2] Adams A, Thompson K D. Biotechnology offers revolution to fish health management [J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, **24**(5): 201—205
- [3] Duff D C P. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida* [J]. *Journal of Immunology*, 1942, **44**: 37—94
- [4] Henderson L M. Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology [J]. *Journal of the International Association of Biological Standardization*, 2005, **33**: 203—209
- [5] Achouak W, Heulin T, Page J M. Multiple facets of bacterial porins [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2001, **199**: 1—7
- [6] Bishop R E. Structural biology of membrane-intrinsic β -barrel enzymes: Sentinels of the bacterial outer membrane [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1778**: 1881—1896
- [7] Heckels J E, Fletcher J N, Virji M. The potential protective effect of immunization with outer membrane protein I from *Neisseria gonorrhoeae* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1989, **135**: 2269—2276

- [8] Loosmore S M, Yang Y P, Coleman D C, *et al.* Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease [J]. *Infection and Immunology*, 1997, **65**: 3701—3707
- [9] Mukhopadhyaya A, Mahalanabis D, Chakrabarti M K. Role of *Shigella flexneri* 2a 34 kDa outer membrane protein in induction of protective immune response [J]. *Vaccine*, 2006, **24**: 6028—6036
- [10] Fang H M, Ling K C, Ge R, *et al.* Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion [J]. *Journal of Fish Disease Fish*, 2000, **23**: 137—145
- [11] Vázquez-Juárez R C, Barrera-Saldaña H A, Hernández-Saavedra N Y, *et al.* Molecular cloning, sequencing and characterization of omp48, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **94**: 908—918
- [12] Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, *et al.* A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate [J]. *Vaccine*, 2004, **22**: 3411—3418
- [13] Merino S, Vilches S, Canals R, *et al.* A Clq-binding 40 kDa porin from *Aeromonas salmonicida*: Cloning, sequencing, role in serum susceptibility and fish immunoprotection [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2005, **38**: 227—237
- [14] Koebnik R, Locher K P, Gelder P V. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, **37**(2): 239—253
- [15] Yu Y R, Liu X C. Progress of study on membrane protein of gram-negative bacteria [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2000, **21**(2): 35—39 [鱼艳荣, 刘希成. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展. 动物医学进展, 2000, **21**(2): 35—39]
- [16] Schulz G E. The structure of bacterial outer membrane proteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1565**: 308—317
- [17] Aleskun M N, Levy S B. The marregulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals [J]. *Trends in Microbiology*, 1999, **7**: 410—413
- [18] Zhao X R. The structure and function of bacterial outer membrane proteins [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1999, **29**(10): 20—23 [赵香汝. 细菌外膜蛋白的结构与功能. 中国兽医科技, 1999, **29**(10): 20—23]
- [19] Cox A J, Hunt M L, Boyce J D, *et al.* Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2003, **34**: 287—296
- [20] Bricknell I R, King J, Bowden T J, *et al.* Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1999, **9**: 139—151
- [21] Rahman M H, Kawai K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2000, **10**: 379—382
- [22] Bader J A, Shoemaker C A, Klesius P H. Immune response induced by *N-lauroylsarcosine* extracted outer-membrane proteins of an isolate of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, **16**: 415—428
- [23] Xia L, Wang C Z, Chen C F. Immune Response of Channal Catfish to Outer Membrane Protein of Three Pathogenic Bacteria [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(3): 371—375 [夏露, 汪成竹, 陈昌福. 斑点叉尾鲷对 3 种致病菌外膜蛋白(OMP)的免疫应答. 华中农业大学学报, 2007, **26**(3): 371—375]
- [24] Dong C P, Lin T L, Gong H, *et al.* Major Outer Membrane Protein of *Aeromonas Hydrophila* Induced Protective Immunity to European Eels (*Anguilla anguilla*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(3): 285—289 [董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验. 水生生物学报, 2005, **29**(3): 285—289]
- [25] Tang X Q, Zhan W B, Sheng X Z, *et al.* Immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, **28**(2): 333—343
- [26] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R E, *et al.* A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. *Infection and Immunology*, 1995, **63**: 3137—3142
- [27] Guzman-Murillo M, Merino-Contreras M L, *et al.* Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**: 897—906
- [28] Mao Z J, Yu L, You Z Q, *et al.* Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003 [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, **23**: 567—575
- [29] Qian R H, Chu W Y, Mao Z J, *et al.* Expression, Characterization and Immunogenicity of a Major Outer Membrane Protein from *Vibrio alginolyticus* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, **39**(3): 194—200
- [30] Li N Q, Bai J J, Wu S Q, *et al.* An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, **25**: 829—833
- [31] Zhang X J, Ren Y, Chang O Q. Trace and immune efficacy

- of oral PELA-OmpK microsphere vaccine in grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(5): 837—843 [张小江, 任燕, 常藕琴. 斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球疫苗的示踪及免疫效果. 中国水产科学, 2008, **15**(5): 837—843]
- [32] 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*). *Journal of Applied Microbiology*, 2007; **103**: 1587—1599
- [33] Khushiramani R, Girisha S K, Karunasagar I, *et al.* Protective efficiency of recombinant OmpTS protein of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp [J]. *Vaccine*, 2007, **25**: 1157—1158
- [34] Mao Z J, You Z Q, Wei Y W, *et al.* Cloning, expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003 [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(4): 563—569 [毛芝娟, 由振强, 魏永伟, 等. 副溶血弧菌 ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性. 中国水产科学, 2007, **14**(4): 563—569].
- [35] He M X, 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): 160—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): 160—173]
- [36] Dong C P, Lin T L, Xu B F, *et al.* Electrophoretic and immunoblot analysis of the major outer membrane protein (MOMP) and polysaccharides antigen (PSA) of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, **20**(7): 619—623 [董传甫, 林天龙, 许斌福, 等. 电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原. 中国人兽共患病杂志, 2004, **20**(7): 619—623]
- [37] Zhang W N, Zhou L, Xing J, *et al.* Antigenicity of outer membrane proteins of a pathogenic *Vibrio* strain, *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(3): 419—424 [张伟妮, 周丽, 邢婧, 等. 大菱鲆致病性溶藻弧菌 SR1 的外膜蛋白及其抗原性分析. 中国水产科学, 2007, **14**(3): 419—424]
- [38] Tang X Q, Zhan W B, Zhou L, *et al.* Characterization of 36 kDa Outer Membrane Proteins of Six Pathogenic *Vibrio* Species [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, **39**(2): 197—202 [唐小千, 战文斌, 周丽, 等. 6 种海洋致病性弧菌 36 kDa 外膜蛋白特性分析. 中国海洋大学学报, 2009, **39**(2): 197—202]
- [39] Vázquez-Juárez R C, Romero M J, Ascencio F. Adhesive properties of a LamB-like outer-membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**: 700—708
- [40] Hirst I D, Ellis A E. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1994, **4**: 29—45
- [41] Fang H M, Ge R, Sin Y M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, **16**: 645—658
- [42] Vazquez-Juarez R C, Gomez-Chiarrib M, Barrera-Saldanac H, *et al.* Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2005, **19**: 153—163
- [43] Maurice S, Nussinovitch A, Jaffe N, *et al.* Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant A-layer proteins entrapped in alginate beads [J]. *Vaccine*, 2004, **23**: 450—459