

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00152

哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因的克隆表达及免疫原性

潘晓艺^{1,2} 沈锦玉² 余旭平¹ 许文军³ 曹 铮² 尹文林² 郝贵杰²

(1. 浙江大学, 杭州 310029; 2. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001; 3. 浙江省海洋水产研究所, 舟山 316100)

摘要: 根据实验室分离的大黄鱼弧菌病主要病原菌哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)GYC1108-1株的胞外蛋白酶基因序列, 设计胞外蛋白酶基因($\Delta ProA$)特异性引物, 扩增获得 1552 bp 的 $\Delta ProA$ 基因, 克隆于 pUC57-T 载体; 将 $\Delta ProA$ 基因亚克隆到原核表达载体 pET-28a 进行融合表达, SDS-PAGE 电泳检测发现, $\Delta ProA$ 融合蛋白经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 分子量大小约 55 kD, 诱导 5h 的表达蛋白产量约占细菌总蛋白的 21%。Western blot 分析, 表达的 55 kD 蛋白具有较高免疫原性。用纯化的 $\Delta ProA$ 融合蛋白对大黄鱼进行免疫试验, 结果免疫保护率达到 75%。

关键词: 哈维氏弧菌; 胞外蛋白酶; 原核表达; 包涵体; 大黄鱼

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0152-05

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是引起水生动物发病的一种重要病原菌, 能引起鱼、虾等海水养殖动物发病^[1-3], 造成很大的危害。2003年9月至10月及2004年9月至10月浙江省某地深水网箱养殖大黄鱼发生了大量死亡。经细菌分离鉴定, 并进行回归感染实验, 哈维氏弧菌是主要病原菌。哈维氏弧菌的致病因子国内外研究的较少, Liu, *et al.*^[4]认为蛋白酶、磷脂酶、溶血素及外毒素都可能是其主要致病因子。Lee, *et al.*^[5]用分离的哈维氏弧菌胞外蛋白酶注射对虾, 结果发现该株哈维氏弧菌分泌的胞外蛋白酶能够抑制对虾凝血性, 并且对对虾有致死作用, 确定为该菌的主要致病因子。

而近年来对弧菌病的防治的研究, 主要集中在灭活全菌疫苗以及脂多糖、胞外产物等的提取物对海洋动物进行免疫预防, 并取得了较好的免疫效果。但提取的脂多糖、胞外产物常对免疫对象产生毒性作用, 而全菌苗成分复杂, 对鱼体生理有较大影响, 使得应用范围受到限制^[6-8]。本研究从哈维氏弧菌主要毒力基因着手, 通过胞外蛋白酶基因的克隆、表达载体的构建和体外表达, 并研制成亚单位疫苗, 进行大黄鱼免疫试验, 以

期预防由哈维氏弧菌引起的大黄鱼弧菌病, 为其他细菌基因工程亚单位疫苗开发提供研究思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

哈维氏弧菌 GYC1108-1 菌株分离自发病大黄鱼, 由本实验室保存, 大肠杆菌 TG1 由浙江大学动物科学学院预防兽医研究所提供, 原核表达载体 pET28a(+)为 Novagen 公司产品, 克隆载体 pUC57-T 购自南京金思特科技有限公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Taq* 酶、dNTP、DNA Markers(DL2000)、T4 DNA 连接酶、Agarose Gel DNA Purification Kit、卡那霉素等购自大连宝生物工程有限公司; IPTG、蛋白 Marker、NC 膜、透析袋、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 等购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 胞外蛋白酶基因 $\Delta ProA$ 的扩增及产物的克隆与鉴定

根据本实验室已克隆的哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因, 登录号为 EF126129, 通过 SignalP 3.0 Server

收稿日期: 2008-03-03, 修订日期: 2009-01-19

基金项目: 浙江省科技厅重点项目(2005F12005)资助

作者简介: 潘晓艺(1979—), 男, 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研究。E-mail: panxiaoyi@163.com, Tel: 0572-2041403

通讯作者: 沈锦玉, E-mail: sjinyu@163.com; 余旭平, E-mail: xpyu@zju.edu.cn.

生物信息学分析, 在 GYC1108-1 的 ProA 蛋白 N 端 23 个氨基酸为核定位信号序列, 会影响该蛋白在大肠杆菌中的表达, 因此设计时去掉了 N 端 23 个氨基酸的编码区, 再结合 pET28a 表达载体的多克隆位点序列, 设计了含酶切位点的引物, 以确保二者的对位插入。上游和下游引物序列为 P1: 5'-TAGGATC-CCAATCGACAGAACTCCCAAATGA-3' (31 bp, 引入 BamH I 位点); P2: 5'-TGAAGCTTCGATACTTTCTACTATGCGTAACAG-3' (33 bp, 引入 Hind III 位点), 预计产物为 1552 bp; 引物由赛百盛公司合成。

以提取的 GYC1108-1 菌株的总 DNA^[9]为模板, 扩增条件为: 预变性 94℃, 240s, 然后按 94℃, 40s; 48℃, 40s; 72℃, 90s; 循环 30 次, 最后 72℃延伸 480s。按文献[9]操作, 进行 PCR 产物的双酶切和 T-A 克隆到 pUC57-T 载体, 转化大肠杆菌 TG1, 用含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板进行蓝白斑筛选。挑白斑进行酶切和 PCR 鉴定。

1.4 重组表达质粒的构建及鉴定

抽提并纯化阳性克隆株(TG1/pUC57-ΔProA)的质粒, 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 克隆于表达载体 pET28a 中, 构建成重组表达质粒 pET28a-ΔProA, 转化大肠杆菌 TG1, 以含有 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板, 挑取阳性克隆 37℃过夜培养提取质粒, 进行双酶切和 PCR 鉴定, 将重组表达质粒送上海英俊公司进行测序。

1.5 ΔProA 融合蛋白的表达、纯化及复性

将含有 ΔProA 基因的阳性重组克隆接种于 5 mL LB 培养液中(含 50 μg/mL 的卡那霉素), 37℃, 250 r/min 振荡培养过夜; 按 1%的量转接于 50 mL 的 LB 中(含 50 μg/mL 的卡那霉素), 于 37℃振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.6 左右时取样 1 mL(诱导 0h 样品), 然后加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 诱导培养; 在诱导后的不同时间(1、3、4 和 5h) 各取 1 mL 样品。菌液样品离心, 弃上清, 沉淀加入适量的 1×SDS 裂解液裂解, 煮沸 5min, 作为 SDS-PAGE 电泳上样样品。

收集诱导表达的菌体, 重悬于细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、1% NP-40, pH8.0), 冰浴超声破碎, 离心, 沉淀重悬于包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、2 mol/L 尿素, pH8.0), 12000 r/min 离心 15min, 沉淀重悬于包涵体增溶液(100 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、

8 mol/L 尿素、25 mmol/L M DTT, pH8.0), 室温搅拌溶解 30 min 后, 12000 r/min 离心 20min, 上清液经 Ni-NTA 柱子进一步纯化, 纯化产物置于透析袋中, 用 TE 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0)透析, PEG6000 浓缩, 去除盐分, -40℃保存^[9]。

1.6 多克隆抗体的制备

以纯化的 ΔProA 蛋白为抗原免疫小鼠, 免疫程序为将纯化蛋白 100 μg 与等体积弗氏完全佐剂混合后进行一免, 21d 后用纯化蛋白 50 μg 与弗氏不完全佐剂混合进行二免, 第 28 天进行血清采集。

1.7 表达产物免疫学活性测定

重组表达产物经 10% SDS-PAGE 分离, 然后将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上(30 mA, 1h), 用含 5%脱脂奶的 TBST 4℃封闭过夜; 洗后, 与 TBST 稀释的一抗, 室温孵育 1h; 洗后, 与经 TBST 稀释(1:1 000)辣根过氧化物酶偶联的抗鼠抗体, 37℃ 孵育 1 h; 洗后, 放入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)底物溶液中, 于室温振摇至褐色区带充分显现, 膜放重蒸水中洗涤, 终止显色反应。

1.8 免疫保护试验

分别用纯化的重组表达蛋白(0.05 mg/ind.)、GYC1108-1 灭活苗(6×10⁸ CFU/mL, 0.2 mL)、TG1/pET28a-ΔProA 灭活苗(6×10⁸ CFU/mL, 0.2 mL)和 PBS 对照组分别免疫小鼠和大黄鱼, 各 1 组, 小鼠每组 20 只(其中 8 只用来采集血清), 大黄鱼每组 50 尾(其中 10 尾用来采集血清), 第 28 天加强免疫 1 次, 第 35 天进行攻毒试验, 每尾腹腔注射 5×10⁸ CFU/ind.。免疫保护率按文献[10]进行计算:

免疫保护率=(1-试验组死亡率/对照组死亡率)×100%

2 结 果

2.1 胞外蛋白酶基因 ΔProA 克隆载体的构建与鉴定

提取 GYC1108-1 菌株的基因组, 以此为模板, 用带酶切位点的特异性引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增(图 1), 在 1552 bp 左右处有一条带, 与设计要扩增的目的片段大小相同。将 PCR 产物纯化后克隆到 T 载体 pUC57-T, 得到克隆载体 pUC57-ΔProA, 转化大肠杆菌 TG1, 阳性克隆株(TG1/pUC57-ΔProA)抽提质粒进行双酶切及 PCR 鉴定, 都获得与理论 1552 bp 的大小相符的条带。

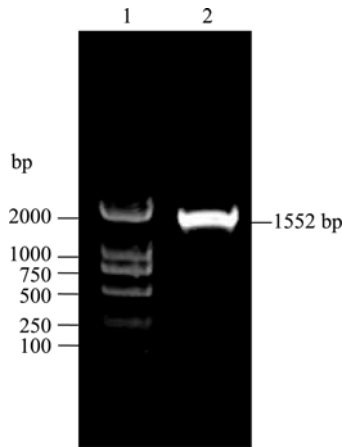


图1 $\Delta ProA$ 的 PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 1 $\Delta ProA$ PCR products from Agarose electrophoresis

1. DNA 分子量标准(DL2000); 2. $\Delta ProA$ 基因 PCR 产物

1. DNA Marker (DL2000); 2. PCR amplification of $\Delta ProA$ gene

2.2 pET28a- $\Delta ProA$ 重组质粒的鉴定

纯化的 pUC57- $\Delta ProA$ 质粒, 双酶切, 纯化目的基因, 克隆至表达载体 pET28a(+), 得到重组表达质粒 pET28a- $\Delta ProA$ 。重组表达质粒 pET28a- $\Delta ProA$ 测序结果表明克隆的 $\Delta ProA$ 基因与预期序列完全一致, 读码框正确, 其中融合部分与引物设计完全一致。

2.3 $\Delta ProA$ 融合蛋白的诱导表达和纯化

1 mmol/L IPTG 在 30℃ 能有效地诱导重组 $\Delta ProA$ 蛋白的表达, M_r 约为 55 kD, 与预期分子量大小吻合。而没有经 IPTG 诱导的 pET28a- $\Delta ProA$ 的细胞裂解液没有出现目的条带(图 2)。TG1/pET28a- $\Delta ProA$ 经诱导 1 h 后, 表达产物明显增加, 而诱导

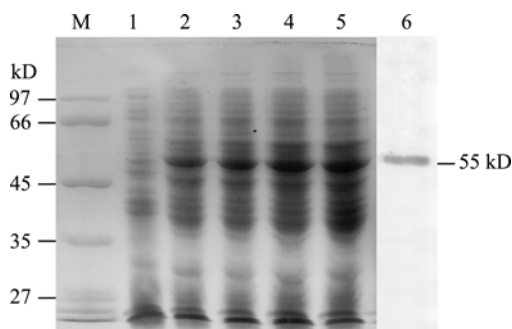


图2 不同诱导条件下 pET28a- $\Delta ProA$ 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of TG1 with pET28a- $\Delta ProA$

M. 蛋白质 Maker; 1—5. TG1/ pET28a- $\Delta ProA$ 用 IPTG 诱导 0, 1, 3, 4, 5h; 6. 纯化蛋白

M. Protein standard molecular weight marker; 1—5. TG1/ pET28a- $\Delta ProA$ induced by IPTG for respectively 0, 1, 3, 4, 5h; 6. purified recombinant proteins

3—5 h, 表达产物浓度无明显差异, 诱导 5 h 的表达蛋白产量约占细菌总蛋白的 21% (图 2)。诱导表达的菌体通过超声破碎细胞分析, 表达产物主要存在于菌体超声破碎物离心后的沉淀中, 说明表达的蛋白以包涵体形式存在。经 Ni-NTA 柱纯化的蛋白, SDS-PAGE 后, 通过 BandScan 软件分析, 纯化后的蛋白纯度达到 92%。

2.4 表达蛋白的 Western blot 检测

将表达后的产物经 SDS-PAGE 后, 进行 Western blot 检测。以鼠抗 GYC1108-1 的血清为一抗, Western blot 检测 pET28a- $\Delta ProA$ 表达的蛋白, 55 kD 处出现一条特异性条带, 而对照组没有出现目的条带(图 3)。

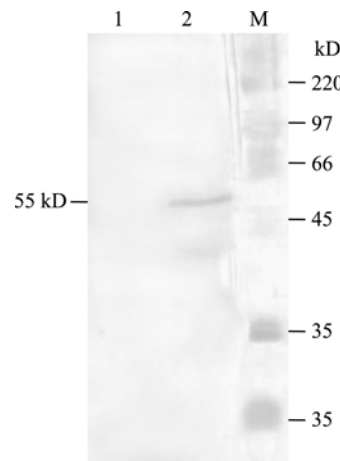


图3 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of pET28a- $\Delta ProA$ expressed in *E. coli* TG1

1. TG1/ pET28a; 2. TG1/ pET28a- $\Delta ProA$; M. 蛋白质 Maker

2.5 血清效价分析及免疫保护率

大黄鱼采集的血清检测, 在第 35 天时 $\Delta ProA$ 免疫组效价达到最高, 而 GYC1108-1 组在第 28 天达到最高, 两者效价峰值比较, 前者略低于后者。试验动物在第 28 天进行二次免疫, 1 周后进行了细菌攻毒, 免疫保护率(表 1)。由表中可知, 重组表达蛋白($\Delta ProA$)疫苗的免疫保护率高于 GYC1108-1 灭活苗, TG1/pET28a- $\Delta ProA$ 灭活苗的免疫保护率最低。

3 讨论

研究表明胞外蛋白酶是嗜水气单胞菌、鳃弧菌、溶藻弧菌等多种主要水产动物致病菌的主要致病因子之一^[11-14], 也是哈维氏弧菌的主要致病因子之一^[5]。石存斌等^[15]对两株致病性哈维氏弧菌胞外产

表 1 免疫后试验动物的免疫保护率
Tab. 1 The RPS of experimental animal immunized
by different vaccine

组别 Group	免疫攻毒数 Total number	死亡数 Death number	死亡率 Mortality (%)	保护率 Protective rate (%)
$\Delta ProA$	40	10	25	75
GYC1108-1	40	12	30	70
TG1/pET28a- $\Delta ProA$	40	25	62.5	37.5
对照组 Control group	40	40	100	0

物的特性进行了分析,发现 38 kD 的蛋白酶对鲫鱼有致死毒性;钟英斌等^[16]对哈维氏弧菌的溶血素和外膜蛋白 OmpK 进行了原核表达;张崇文等^[17]对哈维氏弧菌的外膜蛋白 OmpK 进行了原核表达,并对其免疫原性进行了分析,发现其融合表达的蛋白对从哈维氏弧菌中提取的约 27 kD 的外膜蛋白能够发生特异反应;而哈维氏弧菌胞外蛋白酶还未被进行过克隆表达,本研究主要根据本实验室克隆到的哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因全序列进行分析后,通过大肠杆菌 TG1 进行表达,并对表达的蛋白进行了免疫原性分析,为致病性哈维氏弧菌的疫苗开发提供原始数据。

哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因开放阅读框共 1593 个碱基,编码 530 个氨基酸,通过对氨基酸序列的分析,发现 N 末端有一段由 23 个氨基酸组成的信号肽序列。由于蛋白酶分泌表达对表达宿主有毒性作用,导致表达产量不高,因此设计了一对扩增产物不含信号肽序列的引物,使得 *ProA* 基因在 pET28a 表达载体中得以进行高效融合表达。选用的原核表达载体 PET28a 含有 T7 强启动子,并且在多克隆位点上游有 6 个组氨酸和凝血酶位点,可利用固化 Ni²⁺亲和层析柱纯化表达的融合蛋白,还可以用凝血酶切割纯化的融合蛋白,从而获得重组的目的蛋白。*ProA* 基因与 pET28a 载体构建的表达载体 pET28a- $\Delta ProA$,转化大肠杆菌 TG1,通过 IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 蛋白电泳分析显示融合表达产物的分子量约为 55kD,和理论值一致,且得到了高效表达,目的蛋白的表达量最高占菌体总蛋白量的 21%。为了获得最优化的蛋白表达条件。在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时,在不同时间段进行取样检测表达量,发现 TG1/pET28a- $\Delta ProA$ 经诱导 2h 后,表达产物明显增加,而诱导 3—5h,表达产物浓度无明显

差异,诱导 5h 的表达蛋白产量约占细菌总蛋白的 21%。经 Ni-NTA 柱纯化的蛋白,SDS-PAGE 后,通过 BandScan 软件分析,纯化后的蛋白纯度达到 92%。Western blot 的检测结果和免疫保护率的结果表明,*ProA* 基因的融合表达能很好的保持免疫原性,且对原始菌株 GYC1108-1 具有较高的免疫保护率。以融合表达的 *ProA* 蛋白为免疫原,对网箱养殖的大黄鱼放养苗进行了的田间免疫,到成鱼时免疫的大黄鱼成活率显著高于未免疫组。这说明哈维氏弧菌主要毒力基因的表达产物 *ProA* 是哈维氏弧菌基因工程亚单位苗的理想蛋白之一。

参考文献:

- [1] Qin Y X, Chi X C, Su Y Q, et al. The pathogeny of ulcer disease in *Epinephelus awoara* [J]. *Fisheries of China*, 2004, **28**(3): 297—302 [覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病原. 水产学报, 2004, **28**(3): 297—302]
- [2] Wu H B, Pan J P. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of *Seriola dumerili* in marine cage culture [J]. *Fisheries of China*, 1997, **21**(2): 171—174 [吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲷的弧菌病致病菌研究. 水产学报, 1997, **21**(2): 171—174]
- [3] Karunasagar I, Pai R, Malathi G R, et al. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection [J]. *Aquaculture*, 1994, **128**: 203—209
- [4] Liu P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **22**: 413—416
- [5] Lee K K, Chen Y L, Liu P C. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease [J]. *Blood Cells Molecules and diseases*, 1999, **25**(4): 180—192
- [6] Lee K K, Liu P C, Kou G H, et al. Passive immunisation of the tiger prawn, *Penaeus monodon*, using rabbit antisera to *Vibrio harveyi* [J]. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, **25**: 34—37
- [7] Lee K K, Liu P C, Kou G H, et al. Investigation on the major exotoxin of *Vibrio harveyi* 770527 isolated from diseased *Penaeus monodon* [J]. *Fish Dis. Res.*, 1997, **18**: 33—42
- [8] Lee K K, Liu P C, Chen Y L. Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi* [J]. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 3343—3346
- [9] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatitis T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press. 1989
- [10] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [A]. In: Anderson D P, Hennessen H (Eds.), *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. Developments in biological standardiza-

- tion [C]. Basel: Karger, 1981, 447—454
- [11] Thune R L, Gramhan T E, Raddle L M. Extracellular products and endotoxin from *Aeromonas hydrophila*: effects on age-O channel catfish [J]. *Trans. Am. Fish Soc.*, 1982, **111**: 749—754
- [12] Wei Y X, Wang J C, Cheng D L, *et al.* Purification and property of extracellular protease from *Vibrio anguillarum* [J]. *Chin J Appl Environ*, 2002, **8**(4): 414—418 [魏玉西, 汪靖超, 程殿林, 等. 鳃弧菌胞外产物中蛋白酶的纯化及其性质. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(4): 414—418]
- [13] Lee K K, Yu S R, Liu P C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Curr. Microbiol.*, 1997, **34**: 110—117
- [14] Wu H B, Pan J P. Virulence mechanisms of pathogenic vibrio [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(4): 422—426 [吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003, **27**(4): 422—426]
- [15] Shi C B, Hu X F, Chen X G, *et al.* Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(1): 83—87 [石存斌, 胡学峰, 陈献稿, 等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析. 水生生物学报, 2007, **31**(1): 83—87]
- [16] Zhong Y B, Zhang X H, Chen J X, *et al.* Expression of *Vibrio harveyi* Hemolysin Gene *vhhA* in *E. coli* and its biological activities [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, **37**(1): 97—102 [钟英斌, 张晓华, 陈吉祥, 等. 哈维氏弧菌溶血素基因 *vhhA* 在大肠杆菌中的表达及活性研究. 中国海洋大学学报, 2007, **37**(1): 97—102]
- [17] Zhang C W, Yu L, Mao Z J, *et al.* Cloning and expression of *OmpK* gene from *Vibrio harveyi* in *Pseudosciaena crocea* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(1): 9—14 [张崇文, 于涟, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpK* 基因的克隆及原核表达. 水产学报, 2006, **30**(1): 9—14]

CLONING, EXPRESSION, IMMUNOGENICITY OF EXTRACELLULAR PROTEINASE FROM *VIBRIO HARVEYI*

PAN Xiao-Yi^{1,2}, SHEN Jin-Yu², YU Xu-Ping¹, XU Wen-Jun³, CAO Zheng², YIN Wen-Lin² and HAO Gui-Jie²

(1. Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: *Vibrio harveyi* is a causative agent of vibriosis that infects large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) as well as some other marine fish and brings severe loss to their culture. The extracellular proteases of *V. harveyi* have a role in the virulence of the organism and are potential candidates for vaccine development. In this study, the specific primers of extracellular protease ($\Delta ProA$) gene excluding the region coding for signal peptide were designed according to the sequence of *V. harveyi* strain GYC1108-1 $\Delta ProA$ gene (GeneBank No.: EF126129), and a piece of DNA sequence about 1552 bp was amplified by PCR from genomic DNA of GYC1108-1 strain. The $\Delta ProA$ gene was cloned into pUC57-T easy vector and sequenced. Then the $\Delta ProA$ gene fragment were subcloned into pET-28a(+) to construct expression plasmid pET28a- $\Delta ProA$. It expressed a 55 kD fusion protein HIS- $\Delta ProA$ in *E. coli* TG1 when induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG). SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein was expressed in the form of inclusion body and accumulated up to 21% of the total bacteria protein. It revealed that, by western blot analysis, the fusion proteins $\Delta ProA$ had immunoreactivity. The purified fusion protein $\Delta ProA$ used as antigen to immunize large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and mice, the relative percentage survival (RPS) were 75% and 91.6% respectively. This result indicates that the $\Delta ProA$ may be one of the important protective antigens of *V. harveyi*, and may play a role in protecting fish from infection of *V. harveyi*.

Key words: *Vibrio harveyi*; ECPase; Prokaryotic expression; Inclusion bodies; *Pseudosciaena crocea*