

## 用免疫蛋白质组学方法筛选哈氏弧菌免疫反应蛋白

李岩<sup>1,2,3</sup>, 庞欢瑛<sup>1,2,3,4,5</sup>, 鲁义善<sup>1,2,3\*</sup>, 吴灶和<sup>1,2,3</sup>, 简纪常<sup>1,2,3</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院,广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室,广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学水产学院,广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室,广东 湛江 524025;

3. 广东海洋大学水产学院,广东 湛江 524025; 4. 中国科学院南海海洋研究所,广东 广州 510301;

5. 中国科学院研究生院,北京 100049)

**摘要:**用免疫蛋白质组学的研究方法鉴定了哈氏弧菌的免疫反应蛋白。将哈氏弧菌接种于TSB培养基28℃培养18h,利用裂解液裂解细菌,提取全菌可溶性蛋白,一向电泳采用7cm pH4~7的胶条进行等电聚焦,二向用12.5%的SDS-PAGE胶分离蛋白质,考马斯亮蓝染色,获得双向电泳图谱,再结合免疫转印技术检测免疫反应的蛋白质,利用ImageMaster 2D Platinum进行配对分析得到15个非特异性的免疫反应性蛋白点,30个特异性的免疫反应性蛋白点。经过鉴定得到13种非特异性的免疫反应性蛋白质,这其中有2对蛋白在胶上的位置不同,但鉴定为同一种蛋白;同时得到28种特异性的免疫反应性蛋白质,有一个蛋白点没有在数据库中查找到相对应的蛋白质,还有1对蛋白在胶上的位置不同,但鉴定为同一种蛋白。将特异性免疫反应蛋白鉴定结果与非特异性比较发现有1对蛋白鉴定为同一种蛋白;另外, No. 17和No. 19是F0F1 ATP synthase的两个亚基。特异性免疫反应蛋白鉴定结果中有6个蛋白质是已知的其他细菌的具有免疫反应的蛋白,分别为OmpN, OmpW, OmpU, alanine dehydrogenase, Elongation factor Ts (EF-Ts), cysteine synthase成功建立了哈氏弧菌的免疫蛋白质组学研究方法,筛选出28种具有特异性免疫反应的蛋白质,为哈氏弧菌的免疫蛋白研究提供理论依据和操作框架。

**关键词:**哈氏弧菌;免疫蛋白质组学;全菌可溶性蛋白;双向电泳

**中图分类号:**S 942.5

**文献标识码:**A

哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种革兰氏阴性致病菌,广泛分布于海洋环境中<sup>[1]</sup>。最近10多年它才被认识到是水产养殖动物的重要致病菌,会导致甲壳类动物和鱼类发生出血性败血症而大批死亡<sup>[2]</sup>。长期以来,对该病的治疗以抗生素和化学药物为主,其所导致的菌株抗药性、药物残留、食品安全等问题已引起广泛的重视,因此探索新型疾病防控手段至关重要。根据国际上成功的经验,认为接种疫苗是预防弧菌病的有效手段之一<sup>[3]</sup>。目前国内的哈氏弧菌疫苗以传统的减毒活疫苗或全菌灭活疫苗为主,但是传统疫苗抗原成分复杂,批次间差异较大,制备技术耗时、耗功;

新型的亚单位疫苗生产简便,储运方便,而且可制备多价的亚单位疫苗,但是与传统疫苗相比生产成本较高<sup>[4]</sup>。张小江等<sup>[5]</sup>将哈氏弧菌重组外膜蛋白OmpK制成缓释微球颗粒疫苗,口服饲喂石斑鱼,获得高达69.4%的免疫保护率,证实了鱼类亚单位疫苗是可行的。因此,筛选高效的保护性抗原,制备安全、有效、可体外大量表达的保护性抗原基因工程亚单位疫苗是哈氏弧菌疫苗研发的新的生长点。

近年来,随着反向疫苗学的快速发展,免疫蛋白质组学已被广泛应用于病原微生物免疫原及候选疫苗靶位的筛选<sup>[6]</sup>,然而,目前关于哈氏弧菌

的免疫蛋白质组学研究还未见报道。本文应用免疫蛋白质组学技术直接筛选出哈氏弧菌的免疫蛋白,为哈氏弧菌的免疫蛋白研究提供理论依据和操作框架。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

哈氏弧菌 HY99 由本实验室从湛江附近海区网箱养殖的患病石斑鱼身上分离鉴定并保存,是一株强致病菌株。

### 1.2 主要试剂

IPG 干胶条(pH 4.0~7.0), IPG Buffer(pH 4.0~7.0), 蛋白酶抑制剂, 核酶抑制剂, 考马斯亮蓝 R-250, 尿素, 硫尿, 碘乙酰胺购自 GE Healthcare 公司; CHAPS 购自 MD 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、二硫苏糖醇(DTT) 购自 AMRESCO 公司; 蛋白预染 Marker 购自 MBI 公司, SDS 购自 MBCHM。

### 1.3 哈氏弧菌全菌蛋白的制备

参照 Coelho 等<sup>[7]</sup>的方法, 略有改动。使用 Wash Buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mmol/L 醋酸镁) 清洗细胞 3 次。离心, 细胞沉淀在 Lysis Buffer (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫尿, 1% IPG Buffer pH 4.0~7.0, 4% CHAPS, 1% DTT, 1% 蛋白酶抑制剂, 1% 核酶抑制剂) 中悬浮, 使其浓度范围在 5~10 mg/mL。置于冰上裂解 2 h。13 000 r/min 离心 1 h 取上清, -80 ℃ 保存。2-D clean-up Kit 纯化蛋白, 用 2-D Quant Kit 测定样本中蛋白浓度。

### 1.4 双向电泳

依据 GE Healthcare 公司双向电泳操作手册进行, 并参考 GE Healthcare 描述方法进行一些改进。

**水化** 对于 7 cm pH 4.0~7.0 的胶条, 每胶条上样 120 μg 蛋白, 20 ℃, 浸泡 12 h。

**第一向等电聚焦电泳** (1) 100 V 1 h, 200 V 1 h, 300 V 30 min, 1 000 V 1 h, 5 000 V 2 h, 5 000 V 2 h 至等电聚焦完成。(2) 等电聚焦结束后, 迅速取出 IPG 胶条, 分别置于平衡液 A (6 mmol/L 尿素, 2% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 30% 甘油, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝) 和平衡液 B (6 mmol/L 尿素, 2% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 30% 甘油, 3% 碘乙酰胺,

痕量溴酚蓝) 各平衡 15 min。

**第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳** 将平衡好的 7 cm 胶条转入小型电泳槽中进行第二向电泳, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%, 首先 80 V 电泳 30 min, 然后 180 V 直至溴酚蓝指示线到达凝胶底部停止电泳。试验重复 3 次。

**考马斯亮蓝染色** 将凝胶在玻璃板上剥离下来后, 置于固定液 (10% 冰乙酸、40% 甲醇) 染色液 (10% 冰乙酸、45% 甲醇、0.1% 考马斯亮蓝 R-250) 中染色 4 h 或过夜, 在脱色液 (5% 冰乙酸、20% 甲醇) 脱色 3 h。

### 1.5 兔抗哈氏弧菌免疫血清的制备

斜面上, 28 ℃ 下培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗脱细菌, 再用化学方法灭活细菌, 制成浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL 菌悬液。1.5 mL 菌悬液与 1.5 mL 福氏完全佐剂 (FCA) 混匀后, 皮内多点注射 3 只新西兰白兔, 每 10 天注射一次, 注射量分别为每只 1、1、3、3 mL; 10 d 后耳静脉采血, 玻片凝集法测定血清的抗体效价均达到 1:512, 再用 6 mL 菌悬液注射加强免疫, 每只白兔 2 mL。10 d 后颈动脉放血, 大量制备兔抗哈氏弧菌的抗血清。经凝集法测定血清效价均为 1:1 024。兔抗血清分装后, 于 -20 ℃ 下保存备用。

### 1.6 Western-blotting

参照 Sambrook<sup>[8]</sup>的方法, 略作修改。将哈氏弧菌全菌蛋白经双向电泳后用转印槽转移至 PVDF 膜上, 转印条件为 4 ℃, 100 V 恒压转移 2 h。将 PVDF 膜用 3% 牛血清白蛋白的 TBS pH 为 7.5 的缓冲液 4 ℃ 封闭过夜。第 2 天补摇 30 min, 将 PVDF 膜移入 1:1 500 兔抗哈氏弧菌血清-TBS 中 37 ℃ 孵育 1 h; 对照 Western-blotting 用兔正常血清-TBS 孵育。TBS-Tween20 洗涤 4 次, 每次 5 min。于 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (IgG-HRP) 中 37 ℃ 孵育 1 h, TBS-Tween 20 洗涤 4 次, 每次 5 min。将膜放入二氨基联苯胺 (DAB) 显色液中显色, TTBS 冲洗终止反应。试验重复 3 次。

### 1.7 图象扫描及图象分析

利用 Image Scanner III 型扫描仪对考马斯亮蓝染色后的凝胶和显色的 PVDF 膜分别进行透射扫描和图象扫描, 光学分辨率为 300 dpi。得到双向电泳图谱和转印图谱。通过 ImageMaster 2D Platinum 图象分析软件对两者进行匹配分析。

### 1.8 胶内酶切及 MAIDI-TOF 质谱检测

用 Ettan 自动切点仪选取蛋白点,用 EttanTM 全自动斑点处理工作站进行切点、脱色除盐、干燥、酶解、萃取等步骤处理后样品放入 ABI 4800 plus TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析。激光波长为 355 nm,射频频率为 200 Hz,MS/MS 的加速电压为 8 000 V,MS/MS 最优质量分辨率为 5 000 u。扫描质量范围为 700 ~ 3 200 u。加入内标对质谱仪进行校正。所有实验样品的质谱图均以用默认模式获得。

### 1.9 数据库分析

利用软件 Mascot Distiller 过滤基线峰、识别信号峰,再搜索 NCBI nr 数据库 (<http://www.matrixscience.com>),搜索蛋白结果的分数要大于 55。

## 2 结果

### 2.1 哈氏弧菌全菌蛋白的 2-DE 图谱和免疫转印图谱

用 ImageMaster 2D Platinum 图像分析软件对胶面上的蛋白点进行统计,3 块胶的结果平均数是(429 ± 18)个蛋白点。然后软件对胶和用兔抗哈氏弧菌做一抗的转印膜进行配对分析,匹配得到 45 个蛋白质点,在图 1、图 2 中标记出的 1 ~ 45 个斑点即匹配成功的蛋白质点,这 45 个蛋白点为具有免疫反应性蛋白。再用软件对两张转印膜进行配对分析,匹配得到 15 个蛋白点,在图 3 中标记出数字的斑点即匹配成功的蛋白质点,匹配成功的蛋白是非特异性的免疫反应性蛋白,没有匹配成功的蛋白是有特异性的免疫反应性蛋白。

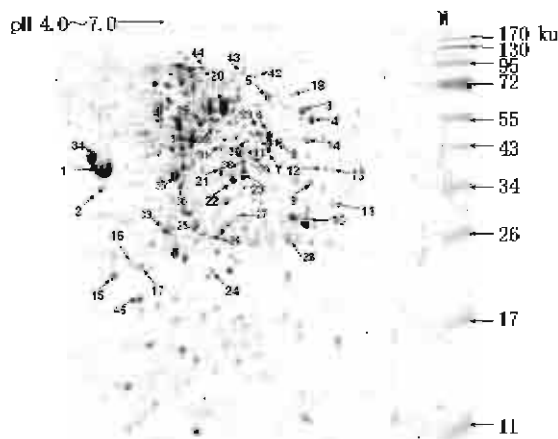


图 1 哈氏弧菌全菌蛋白 2-DE 图谱  
Fig.1 2-DE of whole cell protein of *V. harveyi*

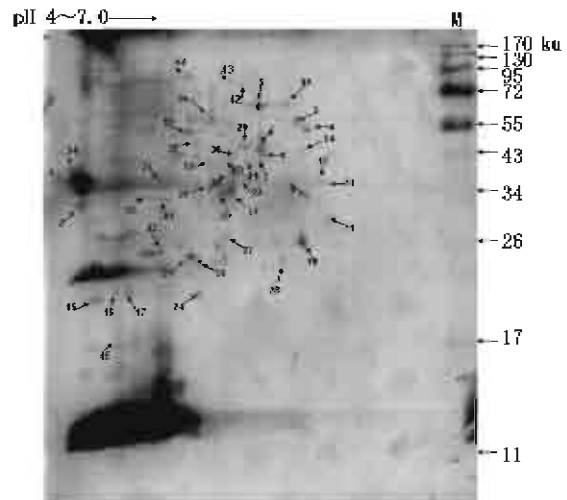


图 2 哈氏弧菌全菌蛋白免疫转印图谱  
兔抗哈氏弧菌为一抗。

Fig.2 2-DE Western blotting of whole cell protein of *V. harveyi*  
Rabbits anti-*Vibrio harveyi* as the primary antibody.

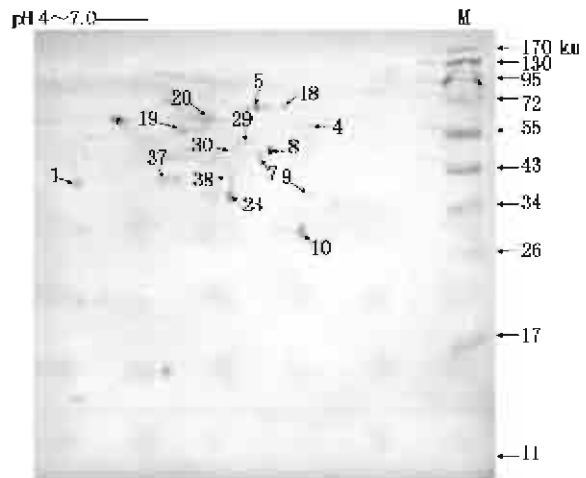


图 3 哈氏弧菌全菌蛋白免疫转印图谱  
兔正常血清为一抗。

Fig.3 2-DE Western blotting of whole cell protein of *V. harveyi*  
Normal rabbit serum as the primary antibody.

### 2.2 质谱鉴定免疫反应性蛋白质

对非特异性免疫反应的 15 个蛋白质点进行质谱鉴定后得到 13 种蛋白,这其中有 2 对蛋白 No. 5、No. 18 (succinate dehydrogenase flavoprotein subunit) 和 No. 23、No. 38 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 虽在胶上的位置不同,但鉴定为同一种蛋白(表 1)。对具有特异性免疫

反应的 30 个蛋白质点进行质谱鉴定后得到 28 种蛋白,有一个蛋白点没有在数据库中查找到相对应的蛋白质,还有 1 对蛋白在胶上的位置不同,但鉴定为同一种蛋白(表 2)。将特异性免疫反应蛋白鉴定结果与非特异性比较发现有 1 对蛋白

(No. 7 和 No. 41) 鉴定为同一种蛋白 Bifunctional N-succinyl diamine aminotransferase/ acetylornithine transaminase protein; 另外, No. 17 和 No. 19 是同一蛋白的两个亚基。

表 1 哈氏弧菌非特异性免疫反应性蛋白质肽质量指纹图谱鉴定结果

Tab. 1 Non-specific-immunoreactive proteins of *V. harveyi* identified by MALDI-TOF MS

蛋白编号 spot no.	鉴定蛋白 identified protein	GeneBank accession number	分数 <sup>a</sup> protein score	分子量(u) protein MW	等电点 pI
1	outer membrane protein	gil27363720	111	40735.3	4.35
4	dihydrolipoamide dehydrogenase	gil28899291	586	50955.6	5.72
5	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	gil28897619	6995.63	64206.5	5.63
7	Bifunctional N-succinyl diamine aminotransferase/ acetylornithine transaminase protein	gil28899571	658	43334.1	5.54
8	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	gil28897797	526	45453.9	5.41
9	leucine transcriptional activator	gil28897124	676	36169.3	6.2
10	glucosamine-6-phosphate deaminase	gil28899893	668	29639.1	5.86
18	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	gil28897619	580	64206.5	5.63
19	FOF1 ATP synthase subunit alpha	gil28899845	650	56601.4	5.1
20	peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	gil28899253	660	62865.1	5.31
23	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gil28898931	666	35204	5.26
29	serine hydroxymethyltransferase	gil27363764	686	45303.6	5.66
30	carbamoyl phosphate synthase small subunit	gil28897244	673	41000.8	5.37
37	phosphopyruvate hydratase	gil54310177	547	45586.2	4.86
38	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gil28898931	127	35204	5.26

注: a. 分数 > 55 时确定质谱鉴定结果正确。

Notes: a The results by MALDI-TOF MS are to succeed when protein score exceed 55.

### 3 讨论

对具有特异性免疫反应性的蛋白进行鉴定,得到 28 种蛋白,计有 6 种蛋白质是已知的其他细菌的具有免疫原性的蛋白。OmpN (No. 2) 是一类细胞外膜孔道蛋白,在弗氏志贺(氏)菌(*Shigella flexneri*), 出血败血性巴斯德(氏)菌(*Pasteurella multocida*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 的研究报道中多次被证明具有免疫反应性<sup>[9-11]</sup>;其中 OmpW (No. 15) 是已知的参与溶藻弧菌渗透调节的蛋白<sup>[12]</sup>,同时也是溶藻弧菌的主要外膜蛋白,具有免疫反应性<sup>[13]</sup>,但其是否具有免疫原性还未见报道。OmpU (No. 34) 是一种纤

维连接蛋白,在致病菌结合宿主细胞的过程中起到至关重要的作用,在创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 的研究报道中也曾多次出现<sup>[14-15]</sup>;另外有 3 个蛋白 alanine dehydrogenase (No. 6), Elongation factor Ts (EF-Ts) (No. 21), cysteine synthase (No. 22) 可被葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) 的抗血清识别<sup>[16]</sup>。这些具有免疫反应的蛋白质在疫苗方面的价值目前尚需要进一步研究。

除此之外,本文发现了另外 3 个已报道过的蛋白质均与细菌的生理代谢相关。对 tryptophanase (No. 32) 的研究得出其分解代谢可抑制 T 细胞分化增殖<sup>[17]</sup>,于金龙等<sup>[18]</sup>还以模式

表 2 哈氏弧菌特异性免疫反应性蛋白质肽质量指纹图谱鉴定结果  
 Tab.2 Specific-immunoreactive proteins of *V. harveyi* identified by MALDI-TOF MS

蛋白编号 spot no.	鉴定蛋白 identified protein	GeneBank accession number	分数 protein score	分子量 (u) protein MW	等电点 pI
2	outer membrane protein N, non-specific porin	gi 28900382	453	37755.1	4.52
3	oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein	gi 27366351	109	60635.7	6.08
6	alanine dehydrogenase	gi 15641907	441	39813.8	5.88
11	未鉴定				
12	DNA-binding transcriptional regulator Cyt R	gi 28897026	809	36811.9	6.11
13	tryptophanyl-tRNA synthetase	gi 37681242	264	37732.1	5.94
14	type II citrate synthase	gi 28897616	295	48187.9	5.66
15	outer membrane protein W	gi 28899951	112	23452.8	4.98
16	hypothetical protein VP0610	gi 28897384	162	22311.1	4.44
17	RF1 ATP synthase subunit delta	gi 28899846	441	19404.8	4.66
21	elongation factor Ts	gi 28899091	192	29755.4	5.18
22	cysteine synthase A	gi 28897571	689	34111.9	5.14
24	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	gi 28897691	205	21961	5.04
25	orfD	gi 6691543	302	28178.5	5.49
26	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein patH precursor	gi 1709588	600	27481.2	5.43
27	pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxJ	gi 28899343	392	26654.9	5.33
28	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase)	gi 1706756	111	25503.1	5.59
31	putative arginine/ornithine succinyltransferase	gi 28899570	171	37688.8	5.51
32	Tryptophanase	gi 28900047	424	52514	5.12
33	triosephosphate isomerase	gi 28897013	419	26915.7	4.72
34	outer membrane protein OmpU	gi 28899241	186	36262.9	4.25
35	malate dehydrogenase	gi 37678651	619	32077.9	4.77
36	thioredoxin reductase	gi 28898025	325	34467	4.8
39	aromatic amino acid aminotransferase	gi 28900791	254	43652.8	5.44
40	glycine cleavage system protein T <sub>2</sub>	gi 28900660	378	40296.8	5.09
41	Bifunctional N-succinyldiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein	gi 28899571	423	43334.1	5.54
42	formate acetyltransferase	gi 15641863	487	87728	6.01
43	formate acetyltransferase	gi 27365431	497	84439.1	5.31
44	N,N'-diacetylchitobiose phosphorylase	gi 28899261	796	90019.6	5.04
45	glucose-specific PTS system component	gi 28897567	617	17943.4	4.47

生物大肠杆菌对色氨酸生物合成途径关键酶的调控进行了研究。对 malate dehydrogenase(No. 35) 研究发现它是 NAD 依赖型脱氢酶家族的一员, 可催化草酰乙酸盐和苹果酸盐之间的相互转化反应, 与二核苷酸辅酶的氧化还原相关<sup>[19]</sup>, 当外界

的渗透压升高时其表达量会上调<sup>[20-21]</sup>。在对幽门螺杆菌和乙型肝炎病毒的研究中发现, thioredoxin reductase( No. 36) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的包含黄素腺嘌呤二核苷酸结构域的二聚体硒酶, 对机体的氧化还原、细胞生长

等生理过程具有重要的调节作用<sup>[22-24]</sup>。

其余的 19 个具有免疫反应性的蛋白质中有 1 对蛋白——formate acetyltransferase (No. 42、43), 它们两两在胶上的位置不同, 但鉴定为同一种蛋白, 推测这是由于蛋白质修饰的多样性和常见性导致蛋白的等电点发生较大的变化<sup>[25]</sup>。No. 41 与非特异性免疫反应蛋白质中的 No. 7 鉴定结果为同一种蛋白 Bifunctional N-succinyl-diaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein, 推测这是蛋白质被修饰后导致它的特异性发生了变化。另外, No. 17 和非特异性免疫反应蛋白质中的 No. 19 是蛋白 F0F1 ATP synthase 的两个亚基。以上这些蛋白中有许多参与能量代谢和蛋白合成, 看起来虽然不可能成为保护性抗原, 但是他们或许可能成为判定病菌感染的标志性蛋白<sup>[26]</sup>。

本研究成功建立了哈氏弧菌全菌蛋白的免疫蛋白质组学研究方法, 下一步将选择若干蛋白, 尤其是特异性的蛋白质进行基因克隆和表达, 并通过免疫和攻毒试验检测蛋白的保护性, 以期获得高效的抗原, 为新型哈氏弧菌疫苗的研制提供候选蛋白。

#### 参考文献:

- [1] 张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 740-743.
- [2] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓义, 等. 抗哈维氏弧菌脂多糖单克隆抗体的制备及其鉴定[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 274-279.
- [3] Kumar S R, Parameswaran V, Ahmed V P, et al. Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23 (2): 316-326.
- [4] 胡慧珍. DNA 疫苗的免疫调节和接种方案的研究进展[J]. 当代畜禽养殖业, 2008, 10(10): 7-13.
- [5] 张小江, 任燕, 常藕琴, 等. 斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球疫苗的示踪及免疫效果[J]. 中国水产科学, 2008, 9(5): 827-843.
- [6] 潘建义, 彭宜宪. 免疫蛋白质组学及疫苗靶位筛选[J]. 生命的化学, 2007, 27(2): 101-104.
- [7] Coelho A, de Oliveira Santos E, Faria M L, et al. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor [J]. Proteomics, 2004, 4(5): 1491-1504.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Kaminski T. Molecular cloning [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Jennison A V, Raqib R, Verma N K. Immunoproteome analysis of soluble and membrane proteins of *Shigella flexneri* 2457T [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(41): 6683-6688.
- [10] Prilipov A, Phale P S, Koebnik R, et al. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180 (13): 3388-3392.
- [11] Daboa S M, Confera A, Montelongo M. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice [J]. Vaccine, 2008, 26(34): 4345-4351.
- [12] Xu C X, Wang S Y, Ren H X, et al. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations [J]. Proteomics, 2005, 5 (12): 3142-3152.
- [13] 钱荣华. 溶藻弧菌主要毒力相关基因的克隆、表达及其免疫原性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007: 1-143.
- [14] Sung Y G, Lee H J, Kim W H, et al. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis [J]. Infection and Immunity, 2006, 10 (74): 5586-5594.
- [15] Osorio C G, Martinez-Wilson H, Camilli A. The OmpU paralogue vca1008 is required for virulence of *vibrio cholerae* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 8(15): 5167-5171.
- [16] Sellman B R, Howell A P, Kelly-Boyd C, et al. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis* [J]. Infect Immun, 2005, 73(10): 6591-6600.
- [17] 彭全辉, 王之盛, 周安国. 色氨酸分解代谢对 T 细胞分化增殖的影响 [J]. 中国饲料, 2007, (18): 4-6.
- [18] 于金龙, 王静, 李剑欣, 等. 大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控研究 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(5): 844-850.
- [19] 朱文滴, 顾继锐, 辜文博, 等. 草鱼胞质苹果酸脱氢酶 (cMDH) 的序列克隆及分析 [J]. 淡水渔业, 2008, 7(4): 66-72.
- [20] 汤佳鑫, 王继花, 俞志敏, 等. 渗透压对酿酒酵母胞

- 内代谢关键酶活性的影响[J]. 酿酒科技, 2008, 5 (167): 45-49.
- [21] 刘建华, 董晓燕, 付敏玲, 等. 渗透剂对苹果酸脱氢酶包含体的复性作用[J]. 化工学报, 2007, 11 (58): 2864-2870.
- [22] 韦珩, 贺东奇, 曾慧慧. 硫氧还蛋白还原酶结构分形研究[J]. 北京大学学报(自然科学版)网络版(预印本), 2007, 2(2).
- [23] 韩萍, 纪冬, 陈国凤, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原蛋白上调硫氧还蛋白还原酶 1 基因的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(4): 344-347.
- [24] 李晶, 赵飞, 肖迪, 等. 幽门螺杆菌动物模型驯化菌株 SS1 与其初始菌株的差异蛋白质组分析[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1508-1512.
- [25] Spreng S, Dietrich G, Goebel W, et al. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein[J]. Vaccine, 2003, 30; 21(7-8): 746-52.
- [26] 吴翔, 赵忠鹏, 罗德, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白免疫蛋白质组学方法的建立[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(4): 385-388.

## Identification for immuno-reactive proteins of *Vibrio harveyi* by two-dimensional electrophoresis method

LI Yan<sup>1,2,3</sup>, PANG Huan-ying<sup>1,2,3,4,5</sup>, LU Yi-shan<sup>1,2,3\*</sup>, WU Zao-he<sup>1,2,3</sup>, JIAN Ji-chang<sup>1,2,3</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals,

College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, College of Fisheries,

Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

3. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

4. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

5. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; )

**Abstract:** *Vibrio harveyi* is one of the most serious marine pathogen that can infect a number of aquaculture species. It has caused severe losses to aquaculture industries worldwide. Attempts to control the infection are hampered by lack of effective vaccines and rapid diagnostic kits, the formulation of which could be facilitated by the identification of immunogenic proteins. In this study, an immunoproteome-based approach was developed to identify candidate antigens of *Vibrio harveyi* for vaccine development. A 2-DE map has been constructed for *Vibrio harveyi*, in the pI range of 4.0 to 7.0. Strain HY99 was grown in TSA medium for 18 hours at 28 °C. Total soluble proteins were extracted using lysis buffer and purified with a 2-D clean-up kit. Protein concentrations were determined by 2-D Quant Kit, and the proteins were separated by 2-DE under immobilized pH gradients (IPG). The 2-DE map was obtained from 3 gels run with 7 cm immobilized pH gradient strips and 12.5% SDS-PAGE gels. The electrophoregrams were obtained by coomassie brilliant blue staining. 2-DE gels were scanned with Image Master 2D Platinum analyzed by 300 dpi 2-DE image analysis revealed (429 ± 18) protein spots. Then *Vibrio harveyi* HY99 anti-sera was analyzed for reactivity by Western-blotting against *Vibrio harveyi* total soluble proteins separated by 2-DE. The 3 maps analyzed revealed 45 pair protein spots by ImageMaster 2D Platinum. 15 spots are non-specific-immunoreactive proteins of *Vibrio harveyi*, and 30 spots are specific-immunoreactive proteins of *Vibrio harveyi*. These 30 spots were chosen for mass spectrometry identification, and 29 spots were successfully matched with the proteins of NCBI database (<http://www.matrixscience.com>). Two isoforms of formate

acetyltransferase were proposed. The 30 spots from the 2-DE map corresponded to 28 proteins. None of these identified proteins have previously been reported as immunogenic in *Vibrio harveyi*. 6 proteins are known from other bacterial immunoproteomic analyses. They may be considered to be cross-reactive antigens from other bacterial infections. OmpN were identified a number of times during the immunoproteome analysis of other bacteria, such as *Shigella flexneri*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*. OmpW is one of the major outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus*, and it is an immunoprotein in the report. OmpU is an important virulence factor involved in the adherence of *Vibrio vulnificus* to the host cells. alanine dehydrogenase, Elongation factor Ts (EF-Ts), cysteine synthase were recognized by anti-sera of *Staphylococcus epidermidis*. To the best of our knowledge, there are no reports about the immunogenicity of the other remaining 18 identified proteins. Their role in immunoreaction is not fully understood. It is suggested that this study may be valuable for the immuno-proteomics research on *Vibrio harveyi*. These immunoreactive proteins could be novel candidates for vaccine development. Future studies will evaluate the protection of the 28 proteins by a nasal immunization and challenge.

**Key words:** *Vibrio harveyi*; immunogenic; total soluble proteins; two-dimensional electrophoresis

**Corresponding author:** LU Yi-shan. E-mail; fishdis@163.com